Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

SUPERINDUSTRIA
Radicacion : 00056835
Fecha (RAD): 2000-08-04 11:22:33 Folios: 513
Tramite : 002 PATENTES D ! REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2220 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social: PFIZER PRODUCTS INC.

No. de Identificación:

Representante Legal (Persona Jurídica):

País de Domicilio: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

Departamento o Estado: ESTADO DE CONNECTICUT

Dirección: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340

Ciudad: Teléfono:

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: CALLE 35 No. 7-25 Piso 4

Ciudad: SANTAFE DE BOGOTÁ Teléfono: 285-14-00/570-0010

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es): YAN CHEN, CLAES GUSTAFSSON, ANKE KREBBER, JEREMY STEPHEN MINSHULL, SUN AI RAILLARD, KIM JONELLE STUTZMAN-ENGWALL

Identificación:

Dirección:

Ciudad: Teléfono:

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención: GEN DE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE LA RELACION DE AVERMECTINAS B2:B1.

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País	(32) Fecha	(31) No. Solicitud
US	Agosto 12, 1999	60/148,645

Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12N 15/31

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC Adjunto	☒
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras de la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud	☒
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☒
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE CARLOS R. OLARTE CC. 79.782.747 de Bogotá T.P.No. 74.295

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00058635 C0030200 Folios: 513
Fecha (AMD): 2020-08-04 11:22:33
Tramite : 032 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800178089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 35,488
FECHA : JUNIO 7 DE 2000

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CORREA ORDONEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2852510	23,935,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL : $	608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PAGADURIA

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

Raisbeck, Lara, Rodríguez
Miembros de la Firma
BAKER & McKENZIE
Abogados
Apartado Aéreo 3746
Teléfono : 285-1400
Santa fe de Bogotá, D.C.
Colombia

PODER

La abajo firmante **PFIZER PRODUCTS INC.**, una sociedad constituida bajo las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, domiciliada en **Eastern Point Road**, Groton **Connecticut 06340, Estados Unidos de América**, declara por el presente otorgar a **ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o JAMES W.F. RAISBECK y/o LUZ HELENA VILLAMIL y/o CARLOS R. OLARTE** poder especial amplio y bastante para recabar de las oficinas y autoridades nacionales que correspondan, la obtención de: **Registro de marcas, renovaciones, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, depósitos de nombres comerciales, cambios de dirección registro de patentes de invención, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, cambios de dirección**, a cuyo efecto los faculta para dar ante dichas autoridades, todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede a los expresados mandatarios poder bastante par recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quien vayan a representar a la compañía judicial y estrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de las marcas se presentaren y hacer cuanto fuere necesario, ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en **Nueva York, Estado de New York, Estados Unidos de América.**
A los 8 días del mes de Octubre de 1997

Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Minjusticia 1996

PFIZER PRODUCTS INC.
(Firma ilegible)
ALLEN J. SPIEGEL
Vicepresidente

Estado de nueva York)
Condado de nueva York)

SUSCRITO Y JURADO ante mí a los 8 días del mes de octubre de 1997.
Firmado John (ilegible)
JOHN ALPHONSO
Notario Público, Estado de Nueva York
No. 30-4859888
Calificado en el Condado de Nassau
Certificado Registrado en el Condado de Nueva York
Comisión expira el 19 de mayo de 1998

Raisbeck, Lara, Rodríguez
Miembros de la Firma
BAKER & McKENZIE
Abogados
Apartado Aéreo 3746
Teléfono : 285-1400
Santa fe de Bogotá, D.C.
Colombia

CERTIFICADO NOTARIAL

A los 8 días del mes de Octubre de 1997, el suscrito Notario

DA FE

1. Que **ALLEN J. SPIEGEL**, mayor y domiciliado en **Nueva York, Estado de New York, Estados Unidos de América**, suscribió de su puño y letra el siguiente documento que antecede

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de **Vicepresidente** de la persona jurídica **PFIZER PRODUCTS INC.**

4. Que la persona jurídica **PFIZER PRODUCTS INC.** con sede en **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América** está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se ha otorgado el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que el otorgante efectivamente tiene la representación que ostenta y que está es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y [illegible] los siguientes documentos auténticos que [illegible] exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

   Resolución de Pfizer Products Inc. de fecha 24 de febrero de 1997.

[illegible] COMO ANTE LOS QUE ESTA [illegible] DE ESTE [illegible] NOTARIA [illegible]

JOSE ROBERTO MOZARTE CADENA
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Minjusticia 1998

Firmado John (ilegible)
JOHN ALPHONSO
El Notario Público
Notario Público, Estado de Nueva York
No. 30-4859888
Calificado en el Condado de Nassau
Certificado Registrado en el Condado de Nueva York
Comisión expira el 19 de mayo de 1998-08-13

Estado de Nueva York)
)b.j.
Condado de Nueva York) No.**21320**

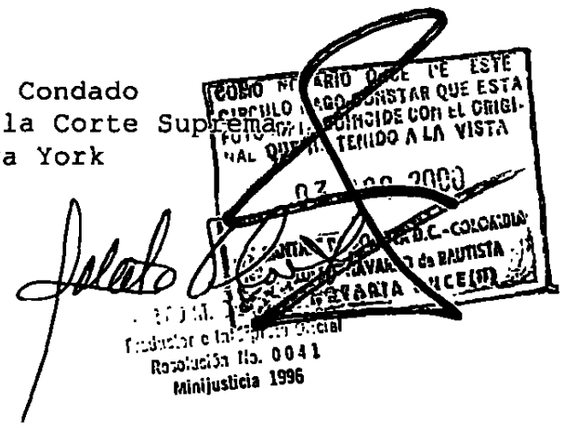
Yo, **NORMAN GOODMAN**, Funcionario del Condado y Funcionario de la Corte Suprema del Estado de Nueva York, en y para el Condado de Nueva York, una Corte de Registro, poseedor, por ley, un sello, CERTIFICO POR EL PRESENTE que

JOHN ALPHONSO

A través de quién se ejecutó el anterior reconocimiento de prueba, y cuyo nombre está suscrito en el mismo, era en el momento de ejecutar dicha prueba, un NOTARIO PUBLICO residente en el Estado de Nueva York, debidamente comisionada juramentada y autorizada por las leyes de dicho Estado, para tomar tales reconocimiento de prueba de escrituras y de otros instrumentos por escrito para ser registrados en dicho estado, y para tomar juramentos o afirmaciones en dicho Condado; que he comparado la firma de dicho NOTARIO PUBLICO con el ejemplar de su firma del archivo de mi oficina y creo firmemente que la firma del anterior certificado original es genuina.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, fijo mi firma y sello este **14 de octubre de 1997.**

Firma ilegible
Funcionario del Condado
Funcionario de la Corte Suprema
Condado de Nueva York



Legalización No. **148381** del Consulado de Colombia en Nueva York de la firma de Norman Goodman como Funcionario del Condado de Nueva York. Julio 31 de 1997.
Firma ilegible
Federico Mejía Mejía
Cónsul de Colombia

Legalización No. **065918** del Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia de la firma de Federico Mejía como Cónsul de Colombia en Nueva York, Estados Unidos de América. Santa fe de Bogotá, agosto 13 de 1998.
Firma ilegible
Jefe de Legalizaciones

Traducción Oficial, de un texto del idioma inglés.
Traducción Oficial realizada por **ROBERTO M. OLARTE GARCIA**, Traductor e intérprete oficial juramentado según Resolución 0041 del Ministerio de Justicia 1996. Santa fe de Bogotá, agosto 13, 1998.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
98 AUG 13 AM 9:53
JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

ROBERTO M. OLARTE GARCIA
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Minijusticia 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO ADJUNTO
LAS FUNCIONES INDICADAS

CIRCULO NOTARIAL ONCE DE ESTE CIRCULO HACE CONSTAR QUE ESTA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HA TENIDO A LA VISTA
03 AGO 2000
SANTAFE DE BOGOTA D.C. - COLOMBIA
ZULMA NAVARRO de CASTILLO
NOTARIA ONCE (E)

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

10 EAST 46TH STREET, NUEVA YORK, NY 10017
TEL. (212) 370-0004 FAX (212) 972-1725

EL SUSCRITO CONSUL DE COLOMBIA

VISTOS LOS DOCUMENTOS PRESENTADOS POR LOS INTERESADOS

C E R T I F I C A :

Que el (la) Sr.(a) **NORMAN GOODMAN, Clerk del Condado de New York Estados Unidos de América, certifica que JOHN ALPHONSO es Notario Público del Estado de New York y que ejercía en la fecha las funciones allí expresadas y que la firma y sellos que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.**

Que el notario citado autenticó el documento adjunto firmado por ALLEN J. SPIEGEL en su calidad de VICEPRESIDENTE de la firma PFIZER PRODUCTS, INC., compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de su país y cumple con su objeto social de acuerdo con las mismas.

Que ha tenido a la vistalos documentos probatorios de los hechos citados y constatados por el Notario Público y el County Clerk de New york, los cuales forman parte integral del presente documento.

Se expide esta certificación en concordancia con el artículo 259 del Código de Procedimiento Civil y 480 del Código de Comercio a solicitud del interesado a los 31 días del mes de Julio de 1998.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DE LOS DOCUMENTOS ADJUNTOS.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES

VALOR CINCUENTA Y SEIS DOLARES US$56.00 RECIBO No. 14881

Roberto Moreno
Cónsul de Colombia

SANTAFE DE BOGOTA D.C. - COLOMBIA
ZULIMA CARVAJAL de SAAVEDRA
NOTARIA

PFIZER PRODUCTS INC.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

065918

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 AUG 13 AM 9:15

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

State of New York
County of New York, } ss.:

NEW YORK

21320

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, [illegible] qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

COMO PODRA[illegible] ONCE ESTE CIRCULO HA[illegible] COMPRAR QUE ESTA FOTOCOPIA [illegible] IDE CON EL ORIGI- NAL QUE [illegible] IDO A LA VISTA

2000

DE BOGOTA COLOMBIA
BAUTISTA
NOTARIA O[illegible]E(S)

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

OCT 14 1997

FEE PAID $3.00

County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

RAISBECK, LARA, RODRIGUEZ & RUEDA
Members of the Firm
BAKER & McKENZIE
ATTORNEYS AT LAW
APARTADO AEREO 3748
TELEFONO: 288-1400
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.
COLOMBIA

POWER OF ATTORNEY

The undersigned, **PFIZER PRODUCTS INC.**, a corporation organized under the laws of **the State of Connecticut, United States of America, located in Eastern Point Road, Connecticut 06340, United States of America,** declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA ORDOÑEZ and/or
JAMES W.F. RAISBECK and/or
LUZ HELENA VILLAMIL and/or
CARLOS R. OLARTE

a full and sufficient power of attorney to apply to the proper national officers and authorities for the issue of:

Trademark registrations, renewals, mergers, changes of name, assignments, filing and prosecution of oppositions, deposit of commercial names, changes of address.
Letters Patent, mergers, changes of name, assignments, filing and prosecution of oppositions, changes of address,

to which end it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the objects stated, to file petitions, prepare descriptions, make protests, declarations, appeals and objections, pay imposts, apply for certifications, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. To the said mandatories sufficient power is granted hereby to receive notifications for and on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the marks, and to do everything that may be required, before administrative or judicial officers of any class, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions if necessary.

Done and subscribed in New York, New York, USA

Dated 08 October 1997

PFIZER PRODUCTS INC.

ALLEN J. SPIEGEL
VICE PRESIDENT

PODER

La abajo firmada

PFIZER PRODUCTS INC.

domicilada en
Eastern Point Road, Groton
Connecticut 06340,
Estados Unidos de América.

declara por el presente otrogar a
ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o
JAMES W. F. RAISBECK y/o
LUZ HELENA VILLAMIL y/o
CARLOS R. OLARTE

poder especial amplio y bastante para recabar de las oficinas y autoridades nacionales que correspondan, la obtención de: Registro de marcas renovaciones, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, depositos de nombres comercia-
les, cambios de dirección. continua atras
a cuyo efecto los faculta para dar ante dichas autoridades, todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede a los expresados mandatarios poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otrogar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de las marcas se presentaren y hacer cuanto fuere necesario, ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en New York, Estado de New York, Estados Unidos de América.

a los 8 días del mes de Octubre, 1997

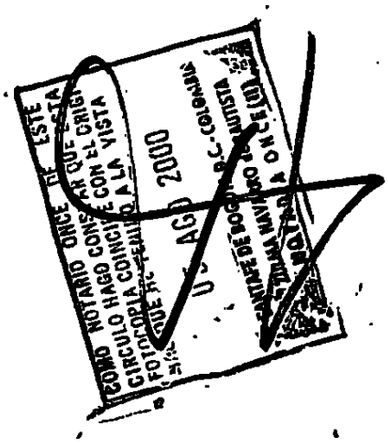
State of New York)
County of New York)

SUBSCRIBED AND SWORN to before me this 8th day of October 1997.

JOHN ALPHONSO
Notary Public, State of New York
No. 30-4859888
Qualified in Nassau County
Certificate filed in New York County
Commission Expires May 19, 1998

✱ Continuación...

Registro de Patentes de Invención, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, cambios de dirección.



RAISBECK, LARA, RODRIGUEZ & RUEDA
Members of the Firm
BAKER & McKENZIE
ATTORNEYS AT LAW
APARTADO AEREO 3746
TELEFONO: 285-1400
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.
COLOMBIA

6

12

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 8th day of October

1997 , the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That ALLEN J. SPIEGEL

of legal age and domiciled in New York, New York, United States of America,

set his hand on the foregoing document

2. That the grantor is to me personally know and that he/she has legal capacity to execute the instrument

3. That the grantor has executed the foregoing docuemnt as

VICE PRESIDENT

of the juridical person

PFIZER PRODUCTS. INC.

4. That the juridical person
PFIZER PRODUCTS INC.

having its home office in E: :tern Point Road, Groton, Connecticut 06340, 'nited States of America,

is duly organized, has present existence and that the purposes for which the power of attorney is ç within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor ha in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Resolution of Pfizer Products Inc. dated 24 February 1997.

JOHN ALPHONSO
Notary Public, State of New York
No. 30-4859888
Qualified in Nassau County
Certificate filed in New York County
Commission Expires May 19, 1998

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 8 dias del mes de Octubre

de 19 97 ,el suscrito Notario

DA FE

1. Que ALLEN J. SPIEGEL

mayor y domiciliado en
New York, Estado de New York, Estados Unidos de América.
suscribio de su puño y letra el documento que antecede

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácte de:

Vice-presidente

de la persona juridica

PFIZER PRODUCTS INC.

4. Que la persona juridica

PFIZER PRODUCTS INC.

con sede en
Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de America
está legalmente constituida, que tiene capacidad legal actual y que el acto para el cual se ha otorgado el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social; la traducción a la vista

03 AGO 2000

SANTAFE DE BOGOTA D.C. COLOMBIA

5. Que el otorgante efectivamente tiene la representación que ostenta y que esta es legitima

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono especificamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Resolución de Pfizer Products Inc, de fecha 24 de febrero de 1997.

El Notario Público

PATRICIA HOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Telél. 519 59 90 - MADRID

A QUIENES LES SEAN PRESENTADOS ESTOS DOCUMENTOS:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

La Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

3 abril 2000

POR LA PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA MAS ADELANTE, A LA QUE LE FUE OTORGADA FECHA DE PRESENTACION AL CUMPLIR LOS REQUISITOS ESTABLECIDOS EN EL ARTICULO 111 TITULO 35 DEL CODIGO DE LOS ESTADOS UNIDOS, Y QUE OBRA EN EL REGISTRO DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS.

NUMERO DE SOLICITUD: 60/148,645

FECHA DE PRESENTACION: 12 agosto 1999

Por delegación del

COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS

H. PHILLIPS

Oficial de certificaciones

PATENTES INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

14

IMPRESO DE SOLICITUD PROVISIONAL

Instancia para registrar una SOLICITUD PROVISIONAL bajo CFR 37 1.53(b)(2).

N° de Archivo **PC10650** Escriba una cruz (+) en esta casilla +

2° Apellido	1er Apellido	Inicial	Residencia (ciudad y estado o país)
Stutzman-Engwall	Kim	J	Groton, CT
Chen	Yan		Redwood City, CA
Gustaffson	Claes		Redwood City, CA
Krebber	Anke		Redwood City, CA
Minshull	Jeremy		Redwood City, CA
Raillard	Sun Ai		Redwood City, CA

TITULO DE LA INVENCION (máximo 280 caracteres)

GEN DE *STREPTOMYCES AVERMITILIS* QUE DIRIGE LA RELACION DE AVERMECTINAS B2:B1

DIRECCION PARA LA CORRESPONDENCIA

Dr. Paul H. Ginsburg
Pfizer Inc.
235 East 42nd Street, 20th Floor
New York, NY 10017-5755

ESTADO **New York** Código Postal **10017-5755** País **Estados Unidos**

ANEXOS DE LA SOLICITUD (Revisar todas los aplicables)

X Descripción, 64
X Reivindicaciones, 12
X Dibujos Núm. hojas, 7
X Otros (especificar) Resumen, 1 pág. Listado de secuencias, 13 pág.
1 disquete de ordenador con listado de secuencias

FORMA DE PAGO (señalar una de las opciones)

_ Se adjunta cheque o pago en metálico para cubrir tasas solicitud provisional — IMPORTE TASAS SOLICITUD PROVISIONAL ($) $150

X El Comisionado está autorizado para cargar las tasas de solicitud en la Cuenta número 16-1445

La invención fue realizada por una agencia del Gobierno de los Estados Unidos o bajo contrato con una agencia del Gobierno de los Estados Unidos

X No

_ Sí, el nombre de la agencia del Gobierno de los Estados Unidos y el n° de contrato son:

Respetuosamente presentado,
FIRMA (ilegible) FECHA 12 agosto 1999
Allan L. Koller N° DE REGISTRO 37,371
(si procede)

_ Inventores Adicionales es especifican en las hojas adjuntas

UNICAMENTE SOLICITUD PROVISIONAL

CORREO URGENTE N° EL162814113US

Teléf. 915 86 80 - MADRID

US 60/148,645 solicitada el 12 Agosto 1999

GEN DE *STREPTOMYCES AVERMITILIS* QUE DIRIGE LA RELACIÓN DE AVERMECTINAS B2:B1

1. CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para producir avermectinas y, principalmente, se refiere al campo de la salud animal. Más particularmente, la presente invención se refiere a moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico AveC, que puede usarse para modular la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por la fermentación de cultivos de *Streptomyces avermitilis*, y a composiciones y procedimientos para seleccionar tales moléculas polinucleotídicas. La presente invención además se refiere a vectores, células huésped transformadas y nuevas cepas mutantes de *S. avermitilis* en las que el gen *aveC* se ha mutado para modular la relación de avermectinas de clase 2:1 producidas.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

2.1. Avermectinas

Las especies de *Streptomyces* producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios, incluyendo las avermectinas, que comprenden una serie de ocho lactonas macrocíclicas de dieciséis miembros relacionadas que tienen una potente actividad antihelmíntica e insecticida. Los

PATRICIA ROSH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

ocho compuestos distintos pero muy relacionados se denominan A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b. La serie "a" de compuestos se refiere a la avermectina natural en la que el sustituyente en la posición C25 es (S)-sec-butilo y la serie "b" se refiere a los compuestos en los que el sustituyente en la posición C25 es isopropilo. Las denominaciones "A" y "B" se refieren a avermectinas en las que el sustituyente en la posición C5 es metoxi e hidroxi, respectivamente. El número "1" se refiere a avermectinas en las que está presente un doble enlace en la posición C22,23 y el número "2" se refiere a avermectinas que tienen un hidrógeno en la posición C22 y un hidroxi en la posición C23. Entre las avermectinas relacionadas, el tipo B1 de avermectinas se reconoce como el que tiene la actividad antiparasitaria y pesticida más eficaz y, por lo tanto, es la avermectina más deseable desde el punto de vista comercial.

En las Patentes de Estados Unidos 4.310.519 y 4.429.042 se describen las avermectinas y su producción mediante fermentación aerobia de cepas de *S. avermitilis*. Se cree que la biosíntesis de las avermectinas naturales se inicia endógenamente a partir de los análogos del tioéster de CoA del ácido isobutírico y del ácido S-(+)-2-metil butírico.

Una combinación de la mejora de cepas mediante

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. Cartagena, 113
Telef. 519 39 95 - MADRID

mutagénesis aleatoria y el uso de ácidos grasos suministrados exógenamente, ha conducido a la producción eficaz de análogos de avermectina. Los mutantes de *S. avermitilis* que son deficientes en la 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (mutantes deficientes en bkd), sólo puede producir avermectinas cuando las fermentaciones se suplementan con ácidos grasos. En la Patente europea (EP) 276103, se describe la selección y aislamiento de mutantes deficientes en la actividad de deshidrogenasa de cadena ramificada (por ejemplo, *S. avermitilis*, ATCC 53567). La fermentación de tales mutantes en presencia de ácidos grasos suministrados exógenamente, da como resultado la producción de sólo las cuatro avermectinas que corresponden al ácido graso empleado. Así pues, la suplementación de las fermentaciones de *S. avermitilis* (ATCC 53567) con ácido S-(+)-2-metilbutírico, da como resultado la producción de las avermectinas naturales A1a, A2a, B1a y B2a; la suplementación de las fermentaciones con ácido isobutírico, da como resultado la producción de las avermectinas naturales A1b, A2b, B1b y B2b; y la suplementación de las fermentaciones con ácido ciclopentanocarboxílico da como resultado la producción de las cuatro nuevas ciclopentilavermectinas A1, A2, B1 y B2.

Si se suplementa con otros ácidos grasos, se producen nuevas avermectinas. Mediante la selección entre más de 800

PATENTES
INGENIEROS Y ABOGADOS
c. Cartagena, 110
Telef. 519 60 90 - MADRID

precursores potenciales, se han identificado más de 60 nuevas avermectinas distintas. (Véase, por ejemplo, Dutton y col., 1991, J. Antibiot. 44:357-365; y Banks y col., 1994, Roy. Soc. Chem. 147:16-26). Además, los mutantes de *S. avermitilis* deficientes en la actividad de 5-O-metiltransferasa producen esencialmente sólo las avermectinas del análogo B. Por consiguiente, los mutantes de *S. avermitilis* que carecen de las actividades de 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada y 5-O-metil-transferasa producen sólo las avermectinas B que corresponden al ácido graso empleado para suplementar la fermentación. Así pues, cuando se suplementan tales dobles mutantes con el ácido S-(+)-2-metilbutírico, se obtiene la producción sólo de las avermectinas naturales B1a y B2a, mientras que la suplementación con el ácido isobutírico o el ácido ciclopentanocarboxílico da como resultado la producción de las avermectinas naturales B1b o B2b o las nuevas ciclopentil avermectinas B1 y B2, respectivamente. La suplementación de la cepa mutante doble con ácido ciclohexano carboxílico es un procedimiento preferido para producir la nueva avermectina importante desde el punto de vista comercial, ciclohexilavermectina B1 (doramectina). En el documento EP 276103 se describe el aislamiento y las características de tales dobles mutantes, por ejemplo, *S. avermitilis* (ATCC 53692).

PAT... INGLES Y ...
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

2.2 Genes Implicados en la Biosíntesis de Avermectinas

En muchos casos, los genes implicados en la producción de metabolitos secundarios y los genes que codifican un antibiótico particular, se encuentran agrupados en el cromosoma. Tal es el caso, por ejemplo, del grupo de genes de la policeturo sintasa (PKS) de *Streptomyces* (véase Hopwood y Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:37-66). Así pues, una estrategia para clonar genes en una ruta biosintética ha sido aislar un gen de resistencia a fármacos y después ensayar las regiones adyacentes del cromosoma con respecto a otros genes relacionados con la biosíntesis de ese antibiótico particular. Otra estrategia para la clonación de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos importantes ha sido la complementación de mutantes. Por ejemplo, se introducen porciones de una biblioteca de ADN procedente de un organismo capaz de producir un metabolito particular, en un mutante no productor y se seleccionan los transformantes con respecto a la producción del metabolito. Además, se ha usado la hibridación de una biblioteca usando sondas derivadas de otras especies de *Streptomyces* para identificar y clonar genes en rutas biosintéticas.

Los genes implicados en la biosíntesis de avermectinas (genes *ave*), de la misma forma que los genes necesarios para la biosíntesis de otros metabolitos secundarios de

INGLES
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

Streptomyces (por ejemplo, PKS), se encuentran agrupados en el cromosoma. Se han clonado satisfactoriamente varios genes *ave* usando vectores para complementar mutantes de *S. avermitilis* bloqueados en la biosíntesis de avermectinas. La clonación de tales genes se describe en la Patente de Estados Unidos 5.252.474. Además, Ikeda y col., 1995, *J. Antibiot.* 48:532-534, describe la localización de una región cromosómica que implica la etapa de deshidratación C22,23 (*aveC*) en un fragmento *Bam*HI de 4,82 Kb de *S. avermitilis*, así como mutaciones en el gen *aveC* que dan como resultado la producción de un productor de B2a de un solo componente. Como la ivermectina, un potente compuesto antihelmíntico, puede producirse químicamente a partir de la avermectina B2a, tal productor de un solo componente de avermectina B2a se considera particularmente útil para la producción comercial de ivermectina.

La identificación de mutaciones en el gen *aveC* que minimizan la complejidad de la producción de avermectinas, tales como, por ejemplo, mutaciones que reducen la relación B2:B1 de avermectinas, simplificaría la producción y purificación de las avermectinas importantes desde el punto de vista comercial.

3. RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una molécula polinucleotídica aislada que comprende la ORF completa de

PATRICIA VIDAL MINERO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 60 90 - MADRID

aveC de *S. avermitilis* o una porción sustancial de la misma, molécula polinucleotídica aislada que carece de la siguiente ORF completa que se localiza cadena abajo de la ORF de aveC *in situ* en el cromosoma de *S. avermitilis*. La molécula polinucleotídica aislada de la presente invención preferiblemente comprende una secuencia de nucleótidos que es igual que la secuencia que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o es la misma que la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma. La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o una variante degenerada de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), a la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o a una porción sustancial de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es homóloga a la secuencia de

PETRALBA
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 89 90 - MADRID

aminoácidos codificada por la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:2) o una porción sustancial de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico homólogo a AveC. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus*, producto génico homólogo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:4 o una porción sustancial de la misma. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención que codifica el producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus*, comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3 o una porción sustancial de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia de nucleótidos de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO:3. La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es homólogo al producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* que tiene la secuencia

PATENTES
INGENIEROS
c/ Cartagena, 113
Telef. 519 99 90 - MADRID

de aminoácidos de la SEC ID NO: 4.

La presente invención proporciona además oligonucleótidos que hibridan con una molécula polinucleotídica que tiene la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o SEC ID NO: 3, o con una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o SEC ID NO: 3.

La presente invención proporciona además vectores de clonación y vectores de expresión recombinantes que son útiles en la clonación o expresión de un polinucleótido de la presente invención, incluyendo moléculas polinucleotídicas que comprenden la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* o una ORF homóloga de *aveC*. En una realización no limitante, la presente invención proporciona el plásmido pSE186 (ATCC 209604), que comprende la ORF entera del gen *aveC* de *S. avermitilis*. La presente invención proporciona además células huésped transformadas que comprenden una molécula polinucleotídica o un vector recombinante de la invención, y nuevas cepas o líneas celulares derivadas de las mismas.

La presente invención proporciona además un producto génico AveC expresado de forma recombinante, un producto génico homólogo a AveC o una porción sustancial de los mismos, que se ha purificado o aislado sustancialmente, así

PATENTES
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef.
MADRID
MADRID

como homólogos de los mismos. La presente invención proporciona además un procedimiento para producir un producto génico AveC recombinante, que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión recombinante, comprendiendo dicho vector de expresión recombinante una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC o un producto génico homólogo a AveC, molécula polinucleotídica que está en asociación operativa con uno o más elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula polinucleotídica en la célula huésped, en condiciones que conducen a la producción del producto génico AveC recombinante o el producto génico homólogo a AveC, y recuperar el producto génico AveC o el producto génico homólogo a AveC del cultivo de células.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual a la del alelo AveC de *S. avermitilis*, o la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o una variante degenerada de la misma, o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o una variante degenerada de la misma, pero que comprende además una o más mutaciones, de forma que las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en las que

PATRICIA ISERN MORENO
INGENIERO DE PATENTES
C/ [illegible], 113
28020 MADRID

el alelo *aveC* de tipo silvestre se ha inactivado y expresa la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada, producen una relación o cantidad diferente de avermectinas que la producida por células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. De acuerdo con la presente invención, tales moléculas polinucleotídicas pueden usarse para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que presentan un cambio detectable en la producción de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen avermectinas en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con la de la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen mayores niveles de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el gen *aveC*.

La presente invención proporciona procedimientos para

PATENTES TEMI MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 58 60 - MADRID

identificar mutaciones de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* capaces de alterar la relación y/o cantidad de avermectinas producidas. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* capaces de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas, que comprende: (a) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, y dentro de las cuales se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado; (b) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a) pero que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la misma; y (c) comparar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b); de tal forma que si la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de

PATRICIA
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 30 - MADRID

la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* capaz de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 se reduce por la mutación.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* o construcciones genéticas que comprenden la ORF de *aveC*, capaces de alterar la cantidad de avermectinas producidas, que comprende: (a) determinar la cantidad de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo *aveC* nativo, y dentro de la cual se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado o que comprende una construcción genética que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC; (b) determinar la cantidad de avermectinas producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a) pero que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* que tiene la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la misma; y (c) comparar la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) con la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S.*

PATENTES
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 93 - MADRID

avermitilis de la etapa (b); de tal forma que si la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* o una construcción genética capaz de alterar la cantidad de avermectinas. En una realización preferida, la cantidad de avermectinas producidas se aumenta por la mutación.

La presente invención proporciona además vectores recombinantes que son útiles para fabricar nuevas cepas de *S. avermitilis* que tienen alterada la producción de avermectinas. Por ejemplo, la presente invención proporciona vectores que pueden usarse para dirigir cualquiera de las moléculas polinucleotídicas que comprenden las secuencias de nucleótidos mutadas de la presente invención, al sitio del gen *aveC* del cromosoma de *S. avermitilis*, para insertar o reemplazar el alelo de *aveC*, la ORF o una porción de la misma mediante recombinación homóloga. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención proporcionada por la misma también puede actuar modulando la biosíntesis de avermectina cuando se inserta en el cromosoma de *S. avermitilis* en un sitio

PATENTES MARCAS MORENO
INGS. S.L. Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

distinto del gen *aveC*, o cuando se mantiene episomalmente en las células de *S. avermitilis*. Así pues, la presente invención también proporciona vectores que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención, vectores que pueden usarse para insertar la molécula polinucleotídica en un sitio en el cromosoma de *S. avermitilis* distinto del gen *aveC* o para que se mantenga episomalmente. En una realización preferida, la presente invención proporciona vectores de reemplazo génico que pueden usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado en el cromosoma de *S. avermitilis* para generar nuevas cepas de células que producen avermectinas en una relación reducida de clase 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre.

La presente invención proporciona además procedimientos para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado y que producen relaciones y/o cantidades alteradas de avermectinas en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo *aveC* mutado y

PATRICIA IGOR MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/ Santiagomo, 113
Teléf. 519 6690 - MADRID

que producen una relación alterada de avermectinas de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre, que comprende transformar las células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado y que codifica un producto génico que altera la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo mutado en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con la relación de clases 2:1 producida por las células de la cepa que en su lugar expresan el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas se reduce en las células de la nueva cepa.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que producen cantidades alteradas de avermectina, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende el alelo de *aveC*, cuya expresión da

PATENTES
INGENIOS
c/. Cartagena, 115
Teléf. 519 59 90 - MADRID

como resultado una cantidad alterada de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o la construcción genética en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una cantidad alterada en comparación con la cantidad de avermectinas producidas por las células de la cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la cantidad de avermectinas producidas se aumenta en las células de la nueva cepa.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células comprenden un alelo de *aveC* inactivado, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan cualquier alelo de *aveC* con un vector que inactiva el alelo de *aveC*, y seleccionar las células transformadas en las que se ha inactivado el alelo de *aveC*.

La presente invención proporciona además nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que se han transformado con cualquiera de las moléculas polinucleotídicas o vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención. En una

PATRICIA IMON DORRENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 50 80 - MADRID

realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado en lugar de o además del alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las células de la nueva cepa producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En una realización más preferida, las células de la nueva cepa producen avermectinas en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. Tales nuevas cepas son útiles en la producción a gran escala de avermectinas deseables desde el punto de vista comercial, tales como la doramectina.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan una alelo de *aveC* mutado, o una construcción genética que comprende el alelo de *aveC*, en lugar de o además del alelo de *aveC* nativo, que da como resultado la producción por las células de una cantidad alterada de avermectinas en comparación con la cantidad de avermectinas producidas por las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, las nuevas células producen una mayor cantidad de avermectinas.

PATENTES
INGENIEROS
c. Cartagena, 113
Telef. 519 89 90 - MADRID

En otra realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células en las que se ha inactivado el gen *aveC*. Tales cepas son útiles para el diferente espectro de avermectinas que producen en comparación con la cepa de tipo silvestre, y en ensayos de selección de complementación como los descritos en este documento, para determinar si la mutagénesis dirigida o aleatoria del gen *aveC* afecta a la producción de avermectinas.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto génico que altera la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado en comparación con las células de la misma cepa que no expresan el alelo de *aveC* mutado sino que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, se reduce la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células que expresan la mutación. Este procedimiento proporciona una mayor eficacia en la producción de avermectinas valiosas

PATENTES INGLES Y ESPAÑOL
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

desde el punto de vista comercial, tales como la doramectina.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende un alelo de *aveC* que da como resultado la producción de una cantidad alterada de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o una construcción genética, en comparación con las células de la misma cepa que no expresan el alelo de *aveC* mutado o la construcción genética sino que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas producidas por las células que expresan la mutación o la construcción genética.

La presente invención proporciona además una nueva composición de avermectinas producidas por una cepa de *S. avermitilis* que expresa un alelo de *aveC* mutado de la presente invención, donde las avermectinas se producen en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por

INGLES
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 00 - MADRID

células de la misma cepa de *S. avermitilis* que no expresan el alelo de *aveC* mutado sino que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. La nueva composición de avermectinas puede estar presente según se produce en el fluido de cultivo de fermentación o puede recogerse a partir de dicho fluido y puede purificarse parcial o sustancialmente a partir del mismo.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Secuencia de ADN (SEC ID NO: 1) que comprende la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID NO:2).

FIGURA 2. Vector plasmídico pSE186 (ATCC 209604) que comprende la ORF entera del gen *aveC* de *S. avermitilis*.

FIGURA 3. Vector de reemplazo génico pSE180 (ATCC 209605) que comprende el gen *ermE* de *Sacc. erythraea* insertado en la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*.

FIGURA 4. Mapa de restricción *Bam*HI del grupo de genes de la policeturo sintasa de avermectina de *S. avermitilis* con cinco clones de cósmidos solapantes identificados (es decir, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68 y pSE69). También se indica la relación de pSE118 y pSE119.

FIGURA 5. Análisis de HPLC de los productos de fermentación producidos por las cepas de *S. avermitilis*. La cuantificación de los picos se realizó por comparación con cantidades patrón de ciclohexil B1. El tiempo de retención

PATENTES EN INGLÉS Y ALEMÁN
c. Cartagena, 113
Telér. 519 59 90 - MADRID

de ciclohexil B2 fue de 7,4-7,7 minutos; el tiempo de retención de ciclohexil B1 fue de 11,9-12,3 min. FIG. 5A. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* con una ORF de *aveC* inactivada. FIG. 5B. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* transformada con pSE186 (ATCC 209604). FIG. 5C. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* transformada con pSE187. FIG. 5D. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* transformada con pSE188.

FIGURA 6. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas codificadas por la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* (SEC ID NO: 2), una ORF parcial homóloga a *aveC* de *S. griseochromogenes* (SEC ID NO: 5) y la ORF homóloga a *aveC* de *S. hygroscopicus* (SEC ID NO: 4). El resto de valina en negritas es el supuesto sitio de iniciación para la proteína. Los restos conservados se muestran en letras mayúsculas para mostrar la homología en las tres secuencias y en letras minúsculas para mostrar la homología en 2 de las 3 secuencias. Las secuencias de aminoácidos contienen aproximadamente un 50% de identidad de secuencia.

FIGURA 7. Construcción de un plásmido híbrido que contiene un fragmento *Bsa*AI/*Kpn*I de 564 pb del gen homólogo de *aveC* de *S. hygroscopicus* insertado en el sitio *Bsa*AI/*Kpn*I en la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la identificación

PATENTES JUAN MANUEL
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 99 90 - MADRID

y caracterización de moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican el producto génico AveC de *Streptomyces avermitilis*, a la construcción de nuevas cepas de *S. avermitilis* que pueden usarse para seleccionar los productos génicos AveC mutados con respecto a su efecto sobre la producción de avermectinas, y al descubrimiento de que ciertos producto génicos AveC mutados pueden reducir la relación de avermectinas B2:B1 producidas por *S. avermitilis*. A modo de ejemplo, la invención se describe en las secciones mostradas más adelante en relación con una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es igual a la secuencia que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1), y en relación con moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos mutadas derivadas de las mismas y variantes degeneradas de las mismas. Sin embargo, los principios indicados en la presente invención pueden aplicarse análogamente a otras moléculas polinucleotídicas, incluyendo genes homólogos a *aveC* de otras especies de *Streptomyces* que incluyen, por ejemplo, *S. hygroscopicus* y *S. griseochromogenes*, entre otros.

5.1. Moléculas Polinucleotídicas que Codifican el Producto Génico AveC de *S. avermitilis*

PATENTES ESPAÑOLES
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 00 - MADRID

La presente invención proporciona una molécula polinucleotídica aislada que comprende la ORF de *aveC* completa de *S. avermitilis* o una porción sustancial de la misma, molécula polinucleotídica aislada que carece de la siguiente ORF completa que está localizada cadena abajo de la ORF de *aveC in situ* en el cromosoma de *S. avermitilis*.

La molécula polinucleotídica aislada de la presente invención preferiblemente comprende una secuencia de nucleótidos que es igual que la secuencia que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que es la misma que la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma. Como se usa en este documento, una "porción sustancial" de una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* significa una molécula polinucleotídica aislada que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia completa de la ORF de *aveC* mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1), y que codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente. A este respecto, un producto génico AveC "funcionalmente equivalente" se define como un producto génico que, cuando se expresa en la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, produce sustancialmente la misma relación

PATENTES
INGENIAS
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

y cantidad de avermectinas que las producidas por la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* funcional de tipo silvestre nativo para la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis*.

Además de la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC*, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención puede comprender adicionalmente secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural el gen *aveC in situ* en *S. avermitilis*, tales como las que flanquean las secuencias de nucleótidos mostradas en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1).

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o una variante degenerada de la misma.

Como se usa en este documento, los términos "molécula polinucleotídica", "secuencia polinucleotídica", "secuencia codificante", "fase de lectura abierta" y "ORF", pretenden hacer referencia tanto a las moléculas de ADN como a las moléculas de ARN, que pueden ser de una sola cadena o de doble cadena y que pueden transcribirse y traducirse (ADN) o traducirse (ARN) en un producto génico AveC o, como se describe más adelante, en un producto génico homólogo a AveC, o en un polipéptido que es homólogo a un producto génico AveC o un producto génico homólogo a AveC, en un

PATRICIA ... INGLÉS Y AL ...AN
c/. Cartagena, 113
Telét. 519 59 90 - MADRID

sistema de expresión de células huésped apropiado, cuando se ponen bajo el control de los elementos reguladores apropiados. Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias procariotas, secuencias de ADNc, secuencias de ADN genómico y secuencias de ADN y ARN sintetizadas químicamente.

La secuencia de nucleótidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) comprende cuatro codones GTG diferentes en las posiciones de pb 42, 174, 177 y 180. Como se describe en la Sección 9 mostrada más adelante, se construyeron deleciones múltiples de la región 5' de la ORF de *aveC* (FIGURA 1; SEC ID NO: 1) para ayudar a definir cuáles de estos codones podían funcionar en la ORF de *aveC* como sitios de iniciación para la expresión de la proteína. La deleción del primer sitio GTG en el pb 42 no eliminó la actividad de AveC. Una deleción adicional de todos los codones GTG en las posiciones de pb 174, 177 y 180 eliminó totalmente la actividad de AveC, indicando que esta región es necesaria para la expresión de la proteína. Por lo tanto, la presente invención abarca ORF de *aveC* de longitud variable.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604),

PATENTES
INGLES Y SALLAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

o a la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma. El término "homólogo", cuando se usa para hacer referencia a una molécula polinucleotídica que es homóloga a una secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis*, significa una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos: (a) que codifica el mismo producto génico AveC que la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que codifica el mismo producto génico AveC que la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1), pero que incluye uno o más cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético (es decir, una variante degenerada); o (b) que hibrida con el complemento de una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), en condiciones moderadamente rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 42°C (véase Ausubel y col., (eds.),

Teléf. 519 59 90 - MADRID

1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en la pág. 2.10.3), y codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica homóloga hibrida con el complemento de la secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o con el complemento de la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma, en condiciones muy rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a un filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel y col., 1989, mencionado anteriormente), y codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente.

La actividad de un producto génico AveC y los equivalentes funcionales potenciales del mismo pueden determinarse mediante el análisis de HPLC de los productos de fermentación, como se describe en los ejemplos de más adelante. Las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican equivalentes funcionales del producto génico AveC de *S. avermitilis* incluyen genes *aveC* que se producen de forma natural

PATENTES
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

presentes en otras cepas de *S. avermitilis*, genes homólogos a *aveC* presentes en otras especies de *Streptomyces* y alelos de *aveC* mutados, se produzcan de forma natural o se obtengan por ingeniería genética.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2) o una porción sustancial de la misma. Como se usa en este documento, una "porción sustancial" de la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2) significa un polipéptido que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), y que constituye un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente.

Como se usa en este documento para hacer referencia a secuencias de aminoácidos que son homólogas a la secuencia de aminoácidos de un producto génico AveC de *S. avermitilis*, el término "homólogo" se refiere a un polipéptido que por lo demás tiene la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), pero en el que uno o más restos de aminoácidos se han sustituido de forma

c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

conservativa con un resto de aminoácido diferente, donde dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 80% y, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente un 90% con el polipéptido codificado por la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), determinada por cualquier algoritmo convencional de identidad de secuencias de aminoácidos, tal como el algoritmo BLASTP (GENBANK, NCBI), y donde tal sustitución conservativa da lugar a un producto génico funcionalmente equivalente, como se ha definido anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son bien conocidas en la técnica. Las reglas para obtener tales sustituciones incluyen las descritas por Dayhof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., Vol. 5, Sup. 3, entre otras. Más específicamente, las sustituciones de aminoácidos conservativas son las que generalmente se producen dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en acidez o polaridad. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en cuatro grupos: (1) ácidos = aspartato y glutamato; (2) básicos = lisina, arginina e histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; y (4) polares sin

PATENTIA
INGENIEROS Y ABOGADOS
c/ Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

carga = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina también se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. Uno o más reemplazos dentro de cualquier grupo particular, por ejemplo, de una leucina por una isoleucina o valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina, o de cualquier otro resto de aminoácido por un resto de aminoácido estructuralmente relacionado, por ejemplo, un resto de aminoácido con una acidez o polaridad similar o con analogías en alguna combinación de los mismos, generalmente tendrá un efecto insignificante sobre la función del polipéptido.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico homólogo a AveC. Como se usa en este documento, un "producto génico homólogo a AveC" se define como un producto génico que tiene una identidad de secuencia de aminóacidos de al menos el 50% con un producto génico AveC de *S. avermitilis* que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), determinada por cualquier algoritmo convencional de identidad de secuencias de aminoácidos, tal como el algoritmo BLASTP (GENBANK,

PATRICIA Hasé MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

NCBI). En una realización no limitante, el producto génico homólogo a AveC procede de *S. hygroscopicus* (descrito en la solicitud de patente EP 0298423; depósito FERM BP-1901) y comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 o una porción sustancial de la misma. Una "porción sustancial" de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 significa un polipéptido que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:4 y que constituye un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente. Un producto génico homólogo a AveC "funcionalmente equivalente" se define como un producto génico que, cuando se expresa en la cepa FERM BP-1901 de *S. hygroscopicus* en la que se ha inactivado el alelo homólogo a *aveC* nativo, produce sustancialmente la misma relación y cantidad de milbemicinas que las producidas por la cepa FERM BP-1901 de *S. hygroscopicus* que expresa en su lugar sólo el alelo homólogo a *aveC* funcional, de tipo silvestre, nativo en la cepa FERM BP-1901 de *S. hygroscopicus*. En una realización no limitante, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención que codifica el producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3 o una porción sustancial de la misma. A este respecto, una "porción sustancial" de la molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de

PATRICIA HOUR MORENO
INGLES Y ALEMAN
c . Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

nucleótidos de la SEC ID NO: 3 significa una molécula polinucleotídica aislada que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3 y que codifica un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente, como se acaba de definir.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia de nucleótidos de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO: 3. El término "homólogo", cuando se usa para hacer referencia a una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia codificante del producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO: 3, significa una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos: (a) que codifica el mismo producto génico que la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3, pero que incluye uno o más cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético (es decir, una variante degenerada); o (b) que hibrida con el complemento de una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4, en condiciones moderadamente rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a un filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C y lavado en 0,2 x SSC/0,1% SDS a 42°C (véase

PATRICIA ESTEN MORENO
INGENIERO Y ABOGADO
C/. Castellana, 123
Telef. 5700990 - MADRID

Ausubel y col., mencionado anteriormente), y codifica un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica homóloga hibrida con el complemento de la secuencia de nucleótidos codificante del producto génico homólogo a AveC de la SEC ID NO: 3 en condiciones muy rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido al filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C y lavado en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel y col., 1989, mencionado anteriormente), y codifica un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es homólogo al producto génico homólogo a AveC de *S. Hygroscopicus*. Como se usa en este documento para hacer referencia a polipéptidos que son homólogos al producto génico homólogo a AveC de la SEC ID NO: 4 procedente de *S. Hygroscopicus*, el término "homólogo" significa un polipéptido que, por lo demás, tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4, pero en la que se han sustituido conservativamente uno o más restos de aminoácidos por un resto de aminoácido diferente, como se ha definido anteriormente, donde dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de aminoácidos

PATRICIA ROSEN MORALES
INGLES Y ALEMAN

de al menos aproximadamente un 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 80% y, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente un 90%, con el polipéptido de la SEC ID NO: 4, determinada por cualquier algoritmo convencional de identidad de secuencias de aminoácidos, tal como el algoritmo BLASTP (GENBANK, NCBI), y donde tal sustitución conservativa produce un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente, como se ha definido anteriormente.

La presente invención proporciona además oligonucleótidos que hibridan con una molécula polinucleotídica que tiene la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o la SEC ID NO: 3, o con una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o la SEC ID NO: 3. Tales oligonucleótidos tienen una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, e hibridan con una de las moléculas polinucleotídicas mencionadas anteriormente en condiciones muy rigurosas, es decir, lavado en 6 x SSC/pirofosfato sódico al 0,5% a ~37°C para los oligos de ~ 14 bases, a ~48°C para los oligos de ~17 bases, a ~55°C para los oligos de ~20 bases y a ~60°C para los oligos de ~23 bases. En una

PATRICIA HOYOS GARCIA
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 66 90 - MADRID

realización preferida, los oligonucleótidos son complementarios a una porción de una de las moléculas polinucleotídicas mencionadas anteriormente. Estos oligonucleótidos son útiles para una diversidad de fines incluyendo para codificar o actuar como moléculas antisentido útiles en la regulación génica o como cebadores en la amplificación de moléculas polinucleotídicas que codifican *aveC* u homólogos de *aveC*.

Usando las moléculas polinucleotídicas o los oligonucleótidos descritos en este documento junto con técnicas conocidas, pueden identificarse otros genes homólogos de *aveC* en otras especies o cepas de *Streptomyces*. Por ejemplo, una molécula oligonucleotídica que comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de *S. avermitilis* de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción de la secuencia de nucleótidos de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO: 3, puede marcarse de forma detectable y usarse para rastrear una biblioteca genómica construida a partir del ADN derivado del organismo de interés. La rigurosidad de las condiciones de hibridación se selecciona basándose en la relación del organismo de referencia, en este ejemplo *S. avermitilis* o *S. hygroscopicus*, con el organismo de interés. Los requisitos para las diferentes condiciones de rigurosidad son bien conocidos para los especialistas en la técnica y tales condiciones variarán predeciblemente

PATRICIA REUN MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/ [illegible], 115
Telef. 519 [illegible] - MADRID

dependiendo de los organismos específicos de los que proceden la biblioteca y las secuencias marcadas. Preferiblemente, tales oligonucleótidos tienen una longitud de al menos aproximadamente 15 nucleótidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en los ejemplos mostrados más adelante. La amplificación de los genes homólogos puede realizarse usando estos y otros oligonucleótidos y aplicando técnicas convencionales tales como la reacción en cadena con polimerasa (PCR), aunque también pueden usarse otras técnicas de amplificación conocidas en la técnica, por ejemplo, la reacción en cadena con ligasa.

Los clones identificados como clones que contienen secuencias de nucleótidos homólogas a *aveC*, pueden ensayarse con respecto a su capacidad de codificar un producto génico homólogo a AveC funcional. Para este fin, los clones pueden someterse a análisis de secuencia para identificar una fase de lectura adecuada, así como señales de iniciación y terminación. Como alternativa o adicionalmente, la secuencia de ADN clonada puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. Puede usarse cualquiera de una diversidad de sistemas de huésped/vector como se ha descrito más adelante, incluyendo, pero sin limitación,

PATRICIA RUIZ MORENO
INGLES Y ...
c/. Cartagena, 113
Telef. 519 ... - MADRID

sistemas bacterianos tales como vectores de expresión plásmidos, bacteriófagos o cósmidos. Las células huésped apropiadas transformadas con tales vectores que comprenden secuencias codificantes homólogas a *aveC* potenciales después pueden analizarse con respecto a la actividad de tipo AveC usando procedimientos tales como análisis de HPLC de los productos de fermentación, como se describe, por ejemplo, en la Sección 7 mostrada más adelante.

La producción y manipulación de las moléculas polinucleotídicas descritas en este documento están dentro de la experiencia en la técnica y pueden realizarse de acuerdo con técnicas recombinantes descritas, por ejemplo, en Maniatis, y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, y col., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook, y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis y col. (eds.), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; y Erlich (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, Nueva York, todos los cuales se incorporan aquí por referencia. Los clones polinucleotídicos que codifican productos génicos AveC o productos génicos homólogos a AveC pueden identificarse

PATENTES MORENO
INGENIEROS
c. Carranza, 113
Teléf. 519 53 30 - MADRID

usando cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación, los procedimientos indicados en la Sección 7 mostrada más adelante. Pueden rastrearse bibliotecas de ADN genómico con respecto a las secuencias codificantes *aveC* y homólogas a *aveC* usando técnicas tales como los procedimientos indicados en Benton y Davis, 1977, Science 196:180, para bibliotecas de bacteriófagos, y en Grunstein y Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:3961-3965, para bibliotecas de plásmidos. Las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que se sabe que incluyen la ORF de *aveC*, como la presente, por ejemplo, en el plásmido pSE186 (ATCC 209604), o en el plásmido pSE199 (descrito en la Sección 7, mostrada más adelante), pueden usarse como sondas en estos experimentos de selección. Como alternativa, pueden sintetizarse sondas oligonucleotídicas que corresponden a las secuencias de nucleótidos deducidas a partir de las secuencias de aminoácidos parciales o completas del producto génico homólogo a AveC purificado.

5.2 Sistemas Recombinantes

5.2.1 Vectores de Clonación y Expresión

La presente invención proporciona además vectores de clonación y vectores de expresión recombinantes que son útiles en la clonación o expresión de moléculas polinucleotídicas de la presente invención que comprenden,

PATRICIA [illegible] RABEDO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible], 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

por ejemplo, la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* o cualquier ORF homóloga a *aveC*. En una realización no limitante, la presente invención proporciona el plásmido pSE186 (ATCC 209604), que comprende la ORF completa del gen *aveC* de *S. avermitilis*.

Toda la siguiente descripción relacionada con la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*, una molécula polinucleotídica que comprende la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* o una porción de la misma, o un producto génico AveC de *S. avermitilis*, también se refiere a homólogos de *aveC* y a productos génicos homólogos a AveC, a menos que se indique explícitamente o por el contexto.

Se ha creado una diversidad de vectores diferentes para uso específico en *Streptomyces*, incluyendo fagos, plásmidos de alto número de copias, plásmidos de bajo número de copias y vectores lanzadera de *E. coli* - *Streptomyces*, entre otros, y cualquiera de éstos puede usarse para poner en práctica la presente invención. También se han clonado varios genes de resistencia a fármacos de *Streptomyces*, y varios de estos genes se han incorporado en vectores como marcadores selectivos. Se presentan ejemplos de vectores actuales para uso en *Streptomyces*, entre otros sitios, en Hutchinson, 1980, Applied Biochem. Biotech. 16:169-190.

Los vectores recombinantes de la presente invención,

PATENTES ELZABURU MORENO
INGENIEROS Y ABOGADOS
c. Castelló, 113
Teléf. 91[illegible] MADRID

particularmente los vectores de expresión, preferiblemente se construyen de forma que la secuencia codificante para la molécula polinucleotídica de la invención esté en asociación operativa con uno o más elementos reguladores necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante para producir un polipéptido. Como se usa en este documento, el término "elemento regulador" incluye, pero sin limitación, secuencias de nucleótidos que codifican promotores inducibles y no inducibles, intensificadores, operadores y otros elementos conocidos en la técnica que sirven para dirigir y/o regular la expresión de secuencias que codifican polinucleótidos. Además, como se usa en este documento, la secuencia codificante está en "asociación operativa" con uno o más elementos reguladores, donde los elementos reguladores regulan eficazmente y permiten la transcripción de la secuencia codificante, la traducción de su ARNm o ambas cosas.

Los vectores plasmídicos típicos que pueden modificarse por ingeniería genética para que contengan una molécula polinucleotídica de la presente invención, incluyen pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega) y el vector lanzadera pWHM3 (Vara y col., 1989, J. Bact. 171:5872-5881), entre otros muchos.

En la técnica, son bien conocidos procedimientos para construir vectores recombinantes que contienen secuencias

PATENTES ZUM MORENO
INGENIERO INDUSTRIAL
c. Cedaceros, 11-3
Teléf. 519 09 30 - MADRID

codificantes particulares en asociación operativa con elementos reguladores apropiados, y éstos pueden usarse para poner en práctica la presente invención. Estos procedimientos incluyen técnicas recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis y col., 1989, mencionado anteriormente; Ausubel y col., 1989, mencionado anteriormente; Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente; Innis y col., 1995, mencionado anteriormente; y Erlich, 1992, mencionado anteriormente.

Los elementos reguladores de estos vectores pueden variar en resistencia y especificidades. Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, puede usarse cualquiera de varios elementos adecuados para la transcripción y la traducción. Los ejemplos no limitantes de las regiones reguladoras de la transcripción o promotores para bacterias incluyen el promotor β-gal, el promotor T7, el promotor TAC, los promotores λ izquierdo y derecho, promotores trp y lac, promotores de fusión trp-lac y, más específicamente para *Streptomyces*, los promotores *ermE*, *meIC*, *tipA*, etc. En una realización específica descrita en la Sección 11 mostrada más adelante, se generó un vector de expresión que contenía la ORF de *aveC* clonada adyacente al promotor *ermE* fuerte constitutivo de *Saccharopolyspora erythraea*. El vector se utilizó para transformar *S. avermitilis* y el

PATRICIA HARO NAVARRO
INGLES Y AL...
c/. Cartagena, ...
Teléf. 519 50 2... MADRID

posterior análisis de HPLC de los productos de fermentación indicó una mayor concentración de avermectinas producidas en comparación con la producción por la misma cepa pero que en su lugar expresaba el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

Pueden usarse vectores de expresión de proteínas de fusión para expresar una proteína de fusión del producto génico AveC. La proteína de fusión purificada puede usarse para activar antisuero contra el producto génico AveC, para estudiar las propiedades bioquímicas del producto génico AveC, para obtener por ingeniería genética proteínas de fusión de AveC con diferentes actividades bioquímicas o para ayudar a la identificación o purificación del producto génico AveC expresado. Los posibles vectores de expresión de proteínas de fusión incluyen, pero sin limitación, vectores que incorporan secuencias que codifican fusiones de β-galactosidasa y trpE, fusiones de proteínas de unión a maltosa, fusiones de glutatión-S-transferasa y fusiones de polihistidina (regiones portadoras). En una realización alternativa, puede fusionarse un producto génico AveC o una porción del mismo con un producto génico homólogo a AveC o a una porción del mismo, procedente de otra especie o cepa de *Streptomyces*, tal como, por ejemplo, *S. hygroscopicus* o *S. griseochromogenes*. En una realización particular descrita en la Sección 12, mostrada más adelante y representada en la FIGURA 7, se construyó un plásmido

PATENTES ELZABURU
ING. & Y. L. - S.A.
c/. Cardenal, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

quimérico que contenía una región de 564 pb de la ORF homóloga a *aveC* de *S. hygroscopicus* que reemplazaba a una región de 564 pb homóloga de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*. Tales vectores híbridos pueden utilizarse para transformar células de *S. avermitilis* y ensayarse para determinar su efecto, por ejemplo, sobre la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas.

Las proteínas de fusión de AveC pueden modificarse por ingeniería genética para que comprendan una región útil para la purificación. Por ejemplo, las proteínas de fusión AveC-proteína de unión a maltosa pueden purificarse usando resina de amilosa; las fusiones AveC-proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa pueden purificarse usando perlas de glutatión-agarosa; y las fusiones de AveC-polihistidina pueden purificarse usando una resina de níquel divalente. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos contra una proteína o péptido portador para realizar la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión. Por ejemplo, puede introducirse por ingeniería genética una secuencia de nucleótidos que codifica para el epítopo diana de un anticuerpo monoclonal, en el vector de expresión, en asociación operativa con los elementos reguladores, y situarse de forma que el epítopo expresado se fusione con el polipéptido AveC. Por ejemplo, puede insertarse por técnicas convencionales una secuencia de nucleótidos que

codifica para la marca de epítopo FLAG™ (International Biotechnologies Inc.), que es un péptido marcador hidrófilo, en el vector de expresión en un punto correspondiente, por ejemplo, al extremo carboxilo terminal del polipéptido AveC. El producto de fusión polipéptido AveC-epítopo FLAG™ después puede detectarse y purificarse por afinidad usando anticuerpos anti-FLAG™ adquiribles en el mercado.

El vector de expresión que codifica la proteína de fusión AveC también puede modificarse por ingeniería genética para que contenga secuencias de poliengarce que codifican sitios de escisión específicos de proteasas, de forma que el polipéptido AveC expresado pueda liberarse de la región portadora o de la molécula de fusión por tratamiento con una proteasa específica. Por ejemplo, el vector de la proteína de fusión puede incluir secuencias de ADN que codifican sitios de escisión por trombina o por el factor Xa, entre otros.

Mediante ingeniería genética también puede introducirse una secuencia señal cadena arriba y en la misma fase de lectura que la ORF de *aveC*, en el vector de expresión, por procedimientos conocidos, para dirigir el tráfico y la secreción del producto génico expresado. Los ejemplos no limitantes de las secuencias señal incluyen los que proceden del factor α, inmunoglobulinas, proteínas de

PATRICIA KOCH MORENO

la membrana externa, penicilinasa y receptores de células T, entre otros.

Para ayudar en la selección de las células huésped transformadas o transfectadas con los vectores de clonación o expresión de la presente invención, el vector puede modificarse por ingeniería genética para que comprenda además una secuencia codificante para un producto génico reportero u otro marcador selectivo. Tal secuencia codificante preferiblemente está en asociación operativa con las secuencias que codifican los elementos reguladores, como se ha descrito anteriormente. Los genes reporteros que son útiles en la invención son bien conocidos en la técnica e incluyen los que codifican la proteína fluorescente verde, luciferasa, *xylE* y tirosinasa, entre otras. Las secuencias de nucleótidos que codifican marcadores selectivos son bien conocidas en la técnica e incluyen las que codifican productos génicos que confieren resistencia a antibióticos o anti-metabolitos, o que proporcionan un requisito auxotrófico. Los ejemplos de tales secuencias incluyen las que codifican resistencia a eritromicina, tiostrepton o kanamicina, entre otras muchas.

5.5.2. Transformación de Células Huésped

La presente invención proporciona además células huésped transformadas que comprenden una molécula polinucleotídica o vector recombinante de la invención, y

PATRICIA HOGG MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

nuevas cepas o líneas celulares derivadas de las mismas. Las células huésped útiles en la práctica de la invención son preferiblemente células de *Streptomyces*, aunque también pueden usarse otras células procariotas o eucariotas. Tales células huésped transformadas típicamente incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con ADN recombinante de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN de cósmido, o levaduras transformadas con vectores recombinantes, entre otras.

Las moléculas polinucleotídicas de la presente invención están destinadas a actuar en células de *Streptomyces*, pero también pueden transformar a otras células bacterianas o eucariotas, por ejemplo, con fines de clonación o expresión. Típicamente, puede usarse una cepa de *E. coli*, tal como, por ejemplo, la cepa DH5α, adquirible de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (No. de Acceso 31343), y de fuentes comerciales (Stratagene). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen células de levadura, aunque también pueden utilizarse eficazmente células de mamífero o células de insectos.

El vector de expresión recombinante de la invención preferiblemente transforma o transfecta a una o más células huésped de un cultivo sustancialmente homogéneo de células. El vector de expresión generalmente se introduce en las

PATENTES
INGLES
RD

62

células huésped de acuerdo con técnicas conocidas tales como, por ejemplo, transformación de protoplastos, precipitación con fosfato cálcico, tratamiento con cloruro cálcico, microinyección, electroporación, transfección por contacto con un virus recombinado, transfección mediada por liposomas, transfección con DEAE-dextrano, transducción, conjugación o bombardeo con microproyectiles. La selección de los transformantes puede realizarse mediante procedimientos convencionales, tales como mediante la selección de células que expresan un marcador selectivo, por ejemplo, resistencia a antibióticos, asociado con el vector recombinante, como se ha descrito anteriormente.

Una vez introducido el vector de expresión en la célula huésped, la integración y mantenimiento de la secuencia codificante *aveC* en el cromosoma de la célula huésped o episomalmente puede confirmarse por técnicas convencionales, por ejemplo, mediante análisis de hibridación de Southern, análisis de enzimas de restricción, análisis de PCR, incluyendo PCR con transcriptasa inversa (rt-PCR), o mediante ensayo inmunológico para detectar el producto génico esperado. Las células huésped que contienen y/o expresan la secuencia codificante *aveC* recombinante pueden identificarse por cualquiera de al menos cuatro procedimientos generales que son bien conocidos en la técnica, incluyendo: (i)

c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

hibridación ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN antisentido; (ii) detección de la presencia de funciones de genes "marcadores"; (iii) evaluación del nivel de transcripción medido por la expresión de transcritos de ARNm específico de *aveC* en la célula huésped; y (iv) detección de la presencia del producto polipeptídico maduro medido, por ejemplo, por inmunoensayo o por la presencia de la actividad biológica de AveC (por ejemplo, la producción de relaciones y cantidades específicas de avermectinas indicativas de la actividad de AveC en, por ejemplo, células huésped de *S. avermitilis*).

5.2.3. Expresión y Caracterización de un Producto Génico AveC Recombinante

Una vez que la secuencia codificante *aveC* se ha introducido de forma estable en una célula huésped apropiada, la célula huésped transformada se propaga por clonación y las células resultantes pueden cultivarse en condiciones que conducen a la producción máxima del producto génico AveC. Tales condiciones típicamente incluyen cultivar las células hasta que se obtenga una alta densidad. Cuando el vector de expresión comprende un promotor inducible, se emplean condiciones de inducción apropiadas tales como, por ejemplo, el cambio de la temperatura, el agotamiento de nutrientes, la adición de inductores innecesarios (por ejemplo, análogos de

Telef. 519 59 90 - MADRID

carbohidratos, tales como isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG)), la acumulación de subproductos metabólicos en exceso, o similares, cuando sea necesario, para inducir la expresión.

Cuando el producto génico AveC expresado queda retenido dentro de las células huésped, las células se recogen y se lisan y el producto se aísla y purifica del lisado en condiciones de extracción conocidas en la técnica para reducir la degradación de proteínas, tales como, por ejemplo, una temperatura de 4°C, en presencia de inhibidores de proteasas, o ambas cosas. Cuando el producto génico AveC expresado se secreta por las células huésped, simplemente puede recogerse el medio nutriente agotado y el producto aislarse del mismo.

El producto génico AveC expresado puede aislarse o purificarse sustancialmente de los lisados celulares o del medio de cultivo, según sea apropiado, usando procedimientos convencionales que incluyen, pero sin limitación, cualquier combinación de los siguientes procedimientos: precipitación con sulfato amónico, fraccionamiento por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, centrifugación de densidad y cromatografía de afinidad. Cuando el producto génico AveC expresado presenta actividad biológica, puede controlarse el aumento de pureza de la preparación en cada etapa del procedimiento de

PATRICIA ROCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. Conde de Peñalver, 11
Teléf. 91[illegible] MADRID

purificación mediante el uso de un ensayo apropiado. Presente o no actividad biológica el producto génico AveC expresado, puede detectarse basándose, por ejemplo, en el tamaño o en la reactividad con un anticuerpo por lo demás específico para AveC, o por la presencia de una marca de fusión. Como se usa en este documento, un producto génico AveC está "purificado sustancialmente" cuando el producto constituye más de aproximadamente un 20% en peso de la proteína en una preparación particular. Además, como se usa en este documento, un producto génico AveC está "aislado" cuando el producto constituye al menos aproximadamente un 80% en peso de la proteína en una preparación particular.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un producto génico AveC de *S. avermitilis* expresado de forma recombinante, aislado o purificado sustancialmente, que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2) o una porción sustancial de la misma, y homólogos del mismo.

La presente invención proporciona además un producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* expresado de forma recombinante, aislado o purificado sustancialmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 o una porción sustancial de la misma, y homólogos del

Telef. 519 59 90 - MADRID

mismo.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir un producto génico AveC, que comprende cultivar una célula huésped transformada con una vector de expresión recombinante, comprendiendo dicho vector una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC, molécula polinucleotídica que está en asociación operativa con uno o más elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula polinucleotídica en la célula huésped, en condiciones que conducen a la producción del producto génico AveC recombinante, y recuperar el producto génico AveC del cultivo de células.

El producto génico AveC de *S. avermitilis* expresado de forma recombinante es útil para una diversidad de fines, incluyendo la selección de compuestos que alteran la función del producto génico AveC y, por lo tanto, modulan la biosíntesis de avermectinas, y para la activación de anticuerpos dirigidos contra el producto génico AveC.

Una vez que se ha obtenido un producto génico AveC de suficiente pureza, puede caracterizarse por procedimientos convencionales, incluyendo SDS-PAGE, cromatografía de exclusión molecular, análisis de la secuencia de aminoácidos, actividad biológica en la producción de los productos apropiados en la ruta biosintética de las

PATRICIA DIAZ MORENO
INGLES Y ALEMAN

avermectinas, *etc.* Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del producto génico AveC puede determinarse usando técnicas convencionales de secuenciación de péptidos. El producto génico AveC puede caracterizarse adicionalmente usando análisis de hidrofilia (véase, por ejemplo, Hopp y Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 78:3824), o algoritmos de software análogos, para identificar las regiones hidrófobas e hidrófilas del producto génico AveC. El análisis estructural puede realizarse para identificar regiones del producto génico AveC que asumen estructuras secundarias específicas. Pueden usarse procedimientos biofísicos tales como cristalografía de rayos X (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13), creación de modelos por ordenador (Fletterick y Zoller (eds), 1986, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y resonancia magnética nuclear (RMN), para localizar y estudiar los sitios de interacción entre el producto génico AveC y su sustrato. La información obtenida de estos estudios puede usarse para seleccionar nuevos sitios para la mutación en la ORF de *aveC* para ayudar a crear nuevas cepas de *S. avermitilis* que tengan características de producción de avermectinas más deseables.

5.3. Construcción y Uso de Mutantes de AveC

La presente invención proporciona una molécula

PATRICIA HACH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual que el alelo *aveC* de *S. avermitilis* o una variante degenerada del mismo, a la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o una variante degenerada de la misma, o a la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una variante degenerada de la misma, pero que además comprende una o más mutaciones, de forma que las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el alelo *aveC* de tipo silvestre y que expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada o la variante degenerada de la misma, producen una relación o cantidad diferente de avermectinas que la producida por las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

De acuerdo con la presente invención, tales moléculas polinucleotídicas pueden usarse para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que presentan un cambio detectable en la producción de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen avermectinas en una relación

INGLÉS Y ALEMÁN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 69 90 - MADRID

reducida de clases 2:1 en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen mayores niveles de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el gen *aveC*.

Las mutaciones en el alelo o en la secuencia codificante de *aveC* incluyen cualquier mutación que introduzca una o más deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC, que produzca el truncamiento del producto génico AveC, o cualquier combinación de las mismas, y que produzca el resultado deseado. Se pretende que tales secuencias de alelos de *aveC* mutados incluyan cualquier variante degenerada de las mismas. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas polinucleotídicas que comprenden la secuencia de nucleótidos del alelo de *aveC* o una variante degenerada de la misma, la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o una variante degenerada de la misma, o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC

PAT. INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

ID NO: 1) o una variante degenerada de la misma, pero que además comprenden una o más mutaciones que codifican la sustitución de un resto aminoácido por un resto aminoácido diferente en las posiciones seleccionadas en el producto génico AveC. En varias realizaciones no limitantes, de las que varias se ejemplifican más adelante, tales sustituciones pueden realizarse en cualquiera de las posiciones de aminoácidos del producto génico AveC que correspondan a las posiciones de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 ó 298 de la SEC ID NO: 2, o alguna combinación de las mismas.

Las mutaciones de la secuencia codificante *aveC* se realizan por cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos, incluyendo el uso de una PCR propensa a error o de mutagénesis de cassette. Por ejemplo, puede emplearse mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para alterar la secuencia del alelo o de la ORF de *aveC* de una forma definida, tal como, por ejemplo, para introducir uno o más sitios de restricción, o un codón de terminación, en regiones específicas dentro del alelo o la ORF de *aveC*. También pueden usarse procedimientos tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos 5.605.793, en la Patente de Estados Unidos 5.830.721 y en la Patente de Estados Unidos 5.837.458, que implican fragmentación

PATENTES ZEA MORENO
INGENIEROS Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 [illegible] MADRID

aleatoria, ciclos repetidos de mutagénesis y redistribución de nucleótidos, para generar grandes bibliotecas de polinucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos que codifican mutaciones de *aveC*.

Las mutaciones deseadas pueden ser útiles, particularmente cuando sirven para alterar uno o más restos aminoácidos conservados en el producto génico AveC. Por ejemplo, una comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los productos génicos AveC y los productos génicos homólogos a AveC de *S. avermitilis* (SEC ID NO: 2), *S. griseochromogenes* (SEC ID NO: 5) y *S. hygroscopicus* (SEC ID NO: 4), como se presenta en la FIGURA 6, indica sitios de conservación significativa de restos aminoácidos entre estas especies. La mutagénesis deseada que conduce a un cambio en uno o más de estos restos aminoácidos conservados puede ser particularmente eficaz para producir nuevas cepas mutantes que presentan alteraciones deseables en la producción de avermectinas.

La mutagénesis aleatoria también puede ser útil y puede realizarse por exposición de las células de *S. avermitilis* a la radiación ultravioleta o a rayos X, o a mutágenos químicos tales como N-metil-N'-nitrosoguanidina, etil metano sulfonato, ácido nitroso o mostazas nitrogenadas. Véase, por ejemplo, Ausubel, 1989, mencionado anteriormente, para una revisión de las técnicas de

PATRICIA MARCH BARRERO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 93 - MADRID

mutagénesis.

Una vez generadas las moléculas polinucleotídicas mutadas, se analizan para determinar si pueden modular la biosíntesis de avermectinas en *S. avermitilis*. En una realización preferida, una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos mutada se ensaya mediante complementación de una cepa de *S. avermitilis* en la que el gen *aveC* se ha inactivado para dar un efecto de fondo negativo a *aveC* (*aveC*$^-$). En un procedimiento no limitante, la molécula polinucleotídica mutada se ajusta a un plásmido de expresión en asociación operativa con uno o más elementos reguladores, plásmido que también comprende preferiblemente uno o más genes de resistencia a fármacos para permitir la selección de las células transformadas. Después, este vector se utiliza para transformar células huésped *aveC*$^-$ usando técnicas conocidas y las células transformadas se seleccionan y cultivan en un medio de fermentación apropiado en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas. Después, los productos de fermentación se analizan por HPLC para determinar la capacidad de la molécula polinucleotídica mutada para complementar la célula huésped. En la Sección 8.3, mostrada más adelante, se ilustran varios vectores que llevan moléculas polinucleotídicas mutadas capaces de reducir la relación de avermectinas B2:B1, incluyendo

PATRICIA HOBER MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 115
Teléf. 519 59 00 - MADRID

pSE188, pSE199, pSE231, pSE239 y pSE290 a pSE297.

La presente invención proporciona procedimientos para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* capaces de alterar la relación y/o cantidad de avermectinas producidas. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* capaces de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas, que comprende: (a) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, y en la que se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado; (b) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a), pero que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre o un alelo de *aveC* que tiene la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la misma; y (c) comparar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b); de tal forma que si la relación de avermectinas de las

PATENTES
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* capaz de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 se reduce por la mutación.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* o construcciones genéticas que comprenden la ORF de *aveC* capaces de alterar la cantidad de avermectinas producidas, que comprende: (a) determinar la cantidad de avermectinas producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, y en la que se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado o que comprende una construcción genética que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC; (b) determinar la cantidad de avermectinas producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a), pero que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre o una secuencia de nucleótidos que es homóloga al mismo; y (c) comparar la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis*

c. Cartagena, 113
Teléf. 519 89 90 - MADRID

de la etapa (a) con la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b); de tal forma que si la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* o una construcción genética capaz de alterar la cantidad de avermectinas. En una realización preferida, la cantidad de avermectinas producidas se aumenta por la mutación.

Cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente para identificar mutaciones se realiza usando un medio de cultivo de fermentación, preferiblemente suplementado con ácido ciclohexano carboxílico, aunque también pueden usarse otros precursores de ácidos grasos apropiados, tales como uno cualquiera de los precursores de ácidos grasos presentados en la TABLA 1.

Una vez que se ha identificado una molécula polinucleotídica mutada que modula la producción de avermectinas en una dirección deseable, puede determinarse la localización de la mutación en la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado, puede aislarse por PCR y someterse a un análisis de la secuencia de ADN usando procedimientos

PATRICIA HOSN MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telél. 519 59 90 - MADRID

conocidos. Comparando la secuencia de ADN del alelo de *aveC* mutado con la del alelo de *aveC* de tipo silvestre, pueden determinarse las mutaciones responsables de la alteración de la producción de avermectinas. En realizaciones específicas, aunque no limitantes de la presente invención, los productos génicos AveC de *S. avermitilis* que comprendían sustituciones de un solo aminoácido en cualquiera de los restos 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T) o 230 (G230D), o sustituciones dobles en las posiciones 138 (S138T) y 139 (A139T o A139F), produjeron cambios en la función del producto génico AveC, de tal forma que se alteró la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas (véase la Sección 8, mostrada más adelante), correspondiendo las posiciones de aminoácidos mencionadas a las presentadas en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2). Además, se ha demostrado que cada una de las siguiente siete combinaciones de mutaciones reduce eficazmente la relación de avermectinas de clases 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. Como se usa en este documento, las designaciones mencionadas anteriormente, tales como A139T, indican el resto de aminoácido original mediante una sola letra, que en este ejemplo es la alanina (A), en la posición indicada, que en este ejemplo es la posición 139

PATRICIA KOCH
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 89 90 - MADRID

(haciendo referencia a la SEC ID NO: 2) del polipéptido, seguido del resto de aminoácido que reemplaza al resto de aminoácido original, que en este ejemplo es la treonina (T). Por consiguiente, la presente invención incluye las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican los productos génicos AveC de *S. avermitilis* mutados que comprenden sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 o 298 (véase la FIGURA 1), o cualquier combinación de las mismas.

En una realización preferida, tales mutaciones codifican sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una

PATENTIA
INGLES Y
c/. Cartagena, 133
Teléf. 519 59 00 - MADRID

sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido S en la posición 138 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(h) el resto de aminoácido A en la posición 139 reemplazado por T o F o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T o F;

(i) el resto de aminoácido K en la posición 154 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(j) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(k) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(l) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

PATENTES MARK MORENO
ARGUELLO Y ALEMAN
c/ Cartagena, 113
Tel. 519 69 00 - MADRID

(m) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L;

(n) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H;

siendo las sustituciones de aminoácidos conservativas como se han definido anteriormente en la Sección 5.1.

En otra realización preferida, tales mutaciones codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos, seleccionándose la combinación de restos de aminoácidos sustituidos entre el grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos S138 y A139;

(b) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(c) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(d) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(e) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(f) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(g) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(h) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

En otra realización preferida, las combinaciones específicas de mutaciones en el alelo de *aveC* útiles para reducir eficazmente la relación de avermectinas de clases 2:1 de acuerdo con la presente invención se seleccionan

PATRICIA SAEZ PEÑALBA
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

entre una o más del grupo compuesto por:

(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) G111/P289L; y

(i) A139T/K154E/Q298H.

La presente invención proporciona además composiciones para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células contienen un alelo de *aveC* mutado que da como resultado la alteración de la producción de avermectinas. Por ejemplo, la presente invención proporciona vectores recombinantes que pueden usarse para dirigir cualquiera de las moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos mutadas de la presente invención, al sitio del gen *aveC* del cromosoma de *S. avermitilis* para insertar o reemplazar la ORF de *aveC* o una porción de la misma mediante recombinación homóloga. De acuerdo con la presente invención, sin embargo, una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención proporcionada aquí, también puede funcionar modulando la biosíntesis de avermectinas cuando

PATENTES ESPAÑOLAS
ANGLOS Y ALEMANES
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 99 - MADRID

se inserta en el cromosoma de *S. avermitilis* en un sitio distinto del gen *aveC* o cuando se mantiene episomalmente en las células de *S. avermitilis*. Así pues, la presente invención también proporciona vectores que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención, vectores que pueden usarse para insertar la molécula polinucleotídica en un sitio del cromosoma de *S. avermitilis* distinto del gen *aveC* o para mantenerse episomalmente.

En una realización preferida, la presente invención proporciona vectores de reemplazo génico que pueden usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo en células de una cepa de *S. avermitilis*, con lo que se generan nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, se reduce la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células. Tales vectores de reemplazo génico pueden construirse usando moléculas polinucleotídicas mutadas presentes en vectores de expresión proporcionados aquí, tales como, por ejemplo, pSE188, pSE199 y pSE231, vectores de expresión que se ejemplifican en la Sección 8 mostrada más adelante.

PATENTES ELZABURU
ALBERTO ALONSO
C/ Cartagena, 213
Tel. 519 59 90 - MADRID

42

En otra realización preferida, la presente invención proporciona vectores que pueden usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo en células de una cepa de *S. avermitilis* para generar nuevas cepas de células que producen cantidades alteradas de avermectinas en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas producidas por las células. En una realización específica, aunque no limitante, tal vector comprende además un promotor fuerte como se conoce en la técnica, tal como, por ejemplo, el promotor *ermE* fuerte constitutivo de *Saccharopolyspora erythraea*, que se sitúa cadena arriba y en asociación operativa con el alelo de *aveC*. Tal vector puede ser el plásmido pSE189, descrito en el Ejemplo 11 mostrado más adelante, o puede construirse mediante el uso del alelo de *aveC* mutado del plásmido pSE189.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona vectores de reemplazo génico que son útiles para inactivar el gen *aveC* en una cepa de tipo silvestre de *S. avermitilis*. En una realización no limitante, tales vectores de reemplazo génico pueden construirse usando la molécula polinucleotídica mutada presente en el plásmido pSE180 (ATCC 209605), que se ejemplifica en la Sección 8.1

PETRA ... INGENIEROS Y ALMAZ
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

mostrada más adelante (FIGURA 3). La presente invención proporciona además vectores de reemplazo génico que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende o consta de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural al gen *aveC in situ* en el cromosoma de *S. avermitilis*, incluyendo, por ejemplo, las que flanquean las secuencias de nucleótidos mostradas en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1), vectores que pueden usarse para delecionar la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*.

La presente invención proporciona además procedimientos para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado y que producen una relación y/o cantidad de avermectinas alterada en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado y que producen una relación alterada de avermectinas de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto génico que altera la

PATRICIA HOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 119
Teléf. 519 59 90 - MADRID

relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una relación de clases 2:1 alterada en comparación con la relación de clases 2:1 producida por células de la cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización más preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una nueva cepa de *S. avermitilis*, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector capaz de introducir una mutación en el alelo de *aveC* de tales células, donde la mutación del alelo de *aveC* ocasiona la sustitución en el producto génico AveC codificado de un resto de aminoácido diferente en una o más posiciones de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 ó 298 de la SEC ID NO: 2, de tal forma que las células de la cepa de *S. avermitilis* en las que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma producen una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC*

PATENTES
INGENIEROS
Cartagena, 113
28002 - MADRID

de tipo silvestre. En una realización preferida, la relación alterada de avermectinas de clases 2:1 se reduce.

Como se usa en este documento, cuando se dice que un resto de aminoácido codificado por un alelo de *aveC* en el cromosoma de *S. avermitilis*, o en un vector o molécula de polinucleótido aislada de la presente invención, "corresponde" a un resto de aminoácido particular de la SEC ID NO: 2, o cuando se dice que una sustitución de aminoácidos se produce en una posición particular "que corresponde" a la de un resto de aminoácido numerado específico de la SEC ID NO: 2, se pretende hacer referencia al resto de aminoácido en la misma localización relativa en el producto génico AveC, la cual puede determinarse rápidamente por el especialista en la técnica mediante referencia a la secuencia de aminoácidos presentada en este documento como SEC ID NO: 2.

La presente invención proporciona además procedimientos para obtener nuevas cepas en las que las mutaciones específicas en el alelo de *aveC* que codifican mutaciones particulares se mencionan como cambios de bases en posiciones de nucleótidos específicas en el alelo de *aveC* "que corresponden" a posiciones de nucleótidos particulares como se muestran en la SEC ID NO: 1. Como se ha indicado anteriormente con respecto a las posiciones de aminoácidos correspondientes, cuando se dice que una

PAT. [illegible]
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

posición de nucleótido en el alelo de *aveC* "corresponde" a una posición de nucleótido particular de la SEC ID NO: 1, se pretende hacer referencia al nucleótido en la misma localización relativa en la secuencia de nucleótidos *aveC*, la cual puede determinarse rápidamente por el especialista en la técnica mediante referencia a la secuencia de nucleótidos presentada en este documento como SEC ID NO: 1.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que producen cantidades alteradas de avermectinas, que comprende transformar las células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende el alelo de *aveC*, cuya expresión da como resultado una alteración de la cantidad de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o una construcción genética en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una cantidad alterada en comparación con la cantidad de avermectinas producidas por las células de la cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas

Tel. 519 59 90 - MADRID

producidas en las células transformadas.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células comprenden un alelo de *aveC* inactivado, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan cualquier alelo de *aveC* con un vector que inactiva el alelo de *aveC*, y seleccionar las células transformadas en las que el alelo de *aveC* se ha inactivado. En una realización preferida, aunque no limitante, se transforman las células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector de reemplazo génico que lleva un alelo de *aveC* que se inactivado por mutación o reemplazo de una porción del alelo de *aveC* con una secuencia génica heteróloga, y se seleccionan las células transformadas en las que el alelo de *aveC* nativo se ha reemplazado por el alelo de *aveC* inactivado. La inactivación del alelo de *aveC* puede determinarse por análisis de HPLC de los productos de fermentación como se describe más adelante. En una realización específica, aunque no limitante, descrita en la Sección 8.1 mostrada más adelante, el alelo de *aveC* se inactiva mediante inserción del gen *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea* en la ORF de *aveC*.

La presente invención proporciona además nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que se han transformado con cualquiera de las moléculas

PATENTES MARCAS
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 110
Teléf. 519 59 90 - MADRID

polinucleotídicas o vectores de la presente invención. En una realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo en lugar de o además del alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las células de la nueva cepa producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con la relación de avermectinas de clases 2:1 producida por las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la relación alterada de clases 2:1 producida por las nuevas células se reduce. Tales nuevas cepas son útiles en la producción a gran escala de avermectinas deseables desde el punto de vista comercial, tales como doramectina. En una realización más preferida, la presente invención proporciona células de *S. avermitilis* que comprenden cualquiera de las mutaciones o combinaciones de mutaciones mencionadas anteriormente en el alelo de *aveC* en las posiciones de nucleótidos correspondientes a las presentadas anteriormente o bien que codifican cualquiera de las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente en el producto génico AveC. Aunque tales mutaciones pueden estar presentes en tales células en un elemento extracromosómico, tal como un plásmido, se prefiere que tales mutaciones estén presentes

PATENTES INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

en el alelo de *aveC* localizado en el cromosoma de *S. avermitilis*. En una realización preferida, la presente invención proporciona una cepa de *Streptomyces avermitilis* que comprende células que tienen una mutación en el alelo de *aveC* que codifica un producto génico AveC que tiene una sustitución en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 o 298 de la SEC ID NO: 2, donde la célula produce una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por una célula de la misma cepa de *S. avermitilis* que expresa el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

Es un objetivo principal de los ensayos de selección descritos en este documento, identificar alelos mutados del gen *aveC* cuya expresión, en células de *S. avermitilis*, altere y, más particularmente, reduzca la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas. En una realización preferida, la relación de avermectinas B2:B1 producidas por las células de una nueva cepa de *S. avermitilis* de la presente invención que expresa un alelo de *aveC* mutado, o una variante degenerada del mismo, de la presente invención es aproximadamente 1,6:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 1:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es

P. GARCIA ESPINOSA
PATENTES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 89 90 - MADRID

aproximadamente 0,84:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,80:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,75:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,73:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,68:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,67:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,57:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,53:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,42:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,40:1 o menor.

En una realización específica descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación menor de 1,6:1. En una realización especifica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,94:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,88:1. En otra realización específica

PATENTES ROCA MORENO
MADRID

diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,84:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,75:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,73:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,68:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,67:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,57:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,53:1. En

PATENTES KOCH MORENO
INGENIEROS Y ABOGADOS
c/ Fuenterrabía, 113
Telef. 519 53 90 - MADRID

otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,42:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,40:1.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo, o una construcción genética que comprende un alelo de *aveC* o una variante degenerada del mismo, en lugar de o además del alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las células de la nueva cepa producen una cantidad alterada de avermectinas en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la nueva cepa produce una mayor cantidad de avermectinas. En una realización no limitante, la construcción genética comprende además un promotor fuerte, tal como el promotor *ermE* fuerte constitutivo de *Saccharopolyspora erythraea*, cadena arriba y en asociación operativa con la ORF de *aveC*.

En otra realización preferida, la presente invención

proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células en las que se ha inactivado el gen *aveC*. Tales cepas son útiles para el espectro diferente de avermectinas que producen en comparación con la cepa de tipo silvestre, y en ensayos de selección de complementación como se describen en este documento, para determinar si la mutagénesis dirigida o aleatoria del gen *aveC* afecta a la producción de avermectinas. En una realización específica descrita más adelante, se modificaron por ingeniería genética células huésped de *S. avermitilis* para que contuvieran un gen *aveC* inactivado. Por ejemplo, se generó la cepa SE180-11 descrita en los ejemplos mostrados más adelante, usando el plásmido de reemplazo génico pSE180 (ATCC 209605) (FIGURA 3), que se construyó para inactivar el gen *aveC* de *S. avermitilis* por inserción del gen de resistencia *ermE* en la región codificante de *aveC*.

La presente invención proporciona además productos génicos AveC de *S. avermitilis* mutados, expresados de forma recombinante, codificados por cualquiera de las moléculas polinucleotídicas mencionadas anteriormente de la invención, y procedimientos para prepararlos.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto

Telef. 519 69 80 - MADRID

94

génico que altera la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresa el alelo de *aveC* mutado en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas en el cultivo por las células que expresan el alelo de *aveC* mutado se reduce. Este procedimiento proporciona una mayor eficacia en la producción de avermectinas valiosas desde el punto de vista comercial, tales como la doramectina.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar las células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende un alelo de *aveC* que da como resultado la producción de una cantidad alterada de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o una construcción genética, en comparación con las células de la misma cepa que no expresan el alelo de *aveC* mutado o la construcción genética, sino que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo

PATRICIA
INGLES Y
c. Cartagena,
Teléf. 519 50 93 - MADRID

en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, aumenta la cantidad de avermectinas producidas en el cultivo por las células que expresan el alelo de *aveC* mutado, la variante degenerada o la construcción genética.

La presente invención proporciona además una nueva composición de avermectinas producidas por una cepa de *S. avermitilis* que expresa un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo, que codifica un producto génico que reduce la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o la variante degenerada en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las avermectinas de la nueva composición se producen en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. La nueva composición de avermectinas puede estar presente según se produce en el fluido de cultivo de fermentación agotado o puede recogerse del mismo. La nueva composición de avermectinas puede purificarse parcial o sustancialmente del fluido de cultivo por técnicas bioquímicas conocidas de

PATRICIA IBOR MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. Cartagena, 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

purificación, tales como precipitación con sulfato amónico, diálisis, fraccionamiento por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, etc.

5.4 Usos de las Avermectinas

Las avermectinas son agentes antiparasitarios muy activos que tienen utilidad particular como antihelmínticos, ectoparasiticidas, insecticidas y acaricidas. Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con los procedimientos de la presente invención son útiles para cualquiera de estos fines. Por ejemplo, los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención son útiles para tratar diversas enfermedades o afecciones en los seres humanos, particularmente cuando estas enfermedades o afecciones están provocadas por infecciones de parásitos, como se sabe en la técnica. Véase, por ejemplo, Ikeda y Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7): 2591-2609. Más particularmente, los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención son eficaces en el tratamiento de una diversidad de enfermedades o afecciones provocadas por endoparásitos, tales como nematodos parásitos, que pueden infectar a los seres humanos, animales domésticos, cerdos, ovejas, aves de corral, caballos o vacas.

Más específicamente, los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención, son

PATENTES
INGENIERIA
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

eficaces contra nematodos que infectan a los seres humanos, así como contra los que infectan diversas especies de animales. Tales nematodos incluyen parásitos gastrointestinales tales como *Ancylostoma, Necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Capillaria, Trichuris, Enterobius, Dirofilaria* y parásitos que se encuentran en la sangre o en otros tejidos u órganos, tales como gusanos filáricos y los estados intestinales extractos de *Strongyloides* y *Trichinella*.

Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención también son útiles en el tratamiento de infecciones por ectoparásitos, incluyendo, por ejemplo, infestaciones de mamíferos y aves provocadas por artrópodos, originadas por garrapatas, ácaros, piojos, pulgas, moscardas, insectos mordedores o larvas de dípteros migratorias que pueden afectar a las vacas y a los caballos, entre otros.

Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención también son útiles como insecticidas contra plagas domésticas tales como, por ejemplo, cucarachas, polillas, derméstidos de las alfombras y mosca doméstica, entre otras, así como plagas de insectos del grano almacenado y de plantas agrícolas, plagas que incluyen la araña roja, áfidos, orugas y ortópteros tales como langostas, entre otros.

Telef. 519 59 90 - MADRID

Los animales que pueden tratarse con los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención incluyen ovejas, vacas, caballos, ciervos, cabras, cerdos, aves, incluyendo aves de corral, perros y gatos.

Un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención se administra en una formulación apropiada para el uso específico pretendido, la especie particular de animal huésped a tratar y el parásito o insecto implicado. Para uso como un parasiticida, un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede administrase por vía oral en forma de una cápsula, bolo, comprimido o poción líquida o, como alternativa, puede administrarse en forma de una composición de vertido, de inyección o como un implante. Tales formulaciones se preparan de una forma convencional de acuerdo con la práctica veterinaria estándar. Así pues, las cápsulas, bolos o comprimidos pueden prepararse mezclando el ingrediente activo con un diluyente o vehículo finamente dividido adecuado que contiene además un agente disgregante y/o aglutinante, tal como almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio, etc. Una formulación de poción puede prepararse dispersando el ingrediente activo en una solución acuosa junto con un agente de dispersión o humectante, etc. Las formulaciones inyectables pueden prepararse en forma de una solución estéril que puede

c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

contener otras sustancias, tales como, por ejemplo, suficientes sales y/o glucosa como para hacer la solución isotónica con la sangre.

Tales formulaciones variarán con respecto al peso del compuesto activo dependiendo del paciente o especie de animal huésped a tratar, de la gravedad y tipo de infección y del peso corporal del huésped. Generalmente, para la administración oral es satisfactoria una dosis de compuesto activo de aproximadamente 0,001 a 10 mg por kg de peso corporal del paciente o del animal, administrada en forma de una sola dosis o en dosis divididas, durante un período de 1 a 5 días. Sin embargo, puede haber casos en los que estén indicadas dosis superiores o inferiores, lo que determinará, por ejemplo, un médico o veterinario, basándose en los síntomas clínicos.

Como alternativa, un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede administrarse junto con el pienso del animal y, para este fin, puede prepararse un aditivo alimentario concentrado o premezcla para mezclar con el pienso normal del animal.

Para el uso como un insecticida y para el tratamiento de plagas agrícolas, un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede aplicarse en forma de una pulverización, polvo fino, emulsión y similar, de acuerdo con la práctica agrícola convencional.

c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

180

6. EJEMPLO: FERMENTACIÓN DE *STREPTOMYCES AVERMITILIS* Y ANÁLISIS DE AVERMECTINAS B2:B1

Las cepas que carecen de las actividades de 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada y 5-O-metiltransferasa no producen avermectinas si el medio de fermentación no se suplementa con ácidos grasos. Este ejemplo demuestra que en tales mutantes, puede obtenerse un amplio intervalo de relaciones B2:B1 de avermectinas cuando la biosíntesis se inicia en presencia de diferentes ácidos grasos.

6.1 Materiales y Procedimientos

Se almacenó *Streptomyces avermitilis* ATCC 53692 a -70°C como un caldo entero preparado en medio de siembra que constaba de: Almidón (Nadex, Laing National) - 20 g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamine pH (Yeast Products Inc) - 5 g; carbonato cálcico - 1 g. El volumen final se ajustó a 1 litro con agua corriente, el pH se ajustó a 7,2 y el medio se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Se usaron 2 ml de una suspensión descongelada de la preparación anterior para inocular un matraz que contenía 50 ml del mismo medio. Después de 48 horas de incubación a 28°C en un agitador rotatorio a 180 rpm, se usaron 2 ml del caldo para inocular un matraz que contenía 50 ml de un

PATENTES
INGENIERIA
c/. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

medio de producción que constaba de: Almidón - 80 g; carbonato cálcico - 7 g; Pharmamedia - 5 g; fosfato ácido dipotásico - 1 g; sulfato de magnesio - 1 g; ácido glutámico - 0,6 g; sulfato ferroso heptahidratado - 0,01 g; sulfato de cinc - 0,001 g; y sulfato manganoso - 0,001 g. El volumen final se ajustó a 1 litro con agua corriente, el pH se ajustó a 7,2 y el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Se disolvieron diversos ácidos carboxílicos sustratos (véase la TABLA 1) en metanol y se añadieron al caldo de fermentación 24 horas después de la inoculación para dar una concentración final de 0,2 g/litro. El caldo de fermentación se incubó durante 14 días a 28°C, después se centrifugó (2.500 rpm durante 2 minutos) y se desechó el sobrenadante. El sedimento miceliano se extrajo con acetona (15 ml) y después con diclorometano (30 ml) y la fase orgánica se separó, se filtró y después se evaporó a sequedad. El residuo se recogió en metanol (1 ml) y se analizó por HPLC con un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1090A equipado con un detector de exploración de ordenación de diodos fijado a 240 nm. La columna usada fue una columna de 4,6 mm x 25 cm, 5 μm, C-18 de Beckman Ultrasphere, mantenida a 40°C. Se inyectaron 25 μl de la solución de metanol anterior en la columna. La elución se realizó con un gradiente lineal de metanol-agua de 80:20 a

PAT.
ING.
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

102

95:5 durante 40 minutos a 0,85 ml/min. Se usaron dos concentraciones patrón de ciclohexil B1 para calibrar la respuesta del detector y se midieron las áreas bajo las curvas para las avermectinas B2 y B1.

6.2 Resultados

Los tiempos de retención de HPLC observados para las avermectinas B2 y B1 y las relaciones 2:1 se muestran en la TABLA 1.

c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

TABLA 1

	Tiempo de Retención de HPLC (min)		Relación
Sustrato	**B2**	**B1**	**B2:B1**
Ácido 4-tetrahidropiran carboxílico	8,1	14,5	0,25
Ácido isobutírico	10,8	18,9	0,5
Ácido 3-furoico	7,6	14,6	0,62
Ácido S-(+)-2-metilbutírico	12,8	21,6	1,0
Ácido ciclohexanocarboxílico	16,9	26,0	1,6
Ácido 3-tiofenocarboxílico	8,8	16,0	1,8
Ácido ciclopentanocarboxílico	14,2	23,0	2,0
Ácido 3-trifluorometilbutírico	10,9	18,8	3,9
Ácido 2-metilpentanoico	14,5	24,9	4,2
Ácido cicloheptanocarboxílico	18,6	29,0	15,0

PAT...
...
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

Los datos presentados en la TABLA 1 demuestran un intervalo extremadamente amplio de relaciones de productos de avermectinas B2:B1, lo que indica una diferencia considerable en los resultados de la conversión deshidratante de los compuestos de clase 2 en compuestos de clase 1, dependiendo de la naturaleza de la cadena lateral de ácido graso de la unidad iniciadora suministrada. Esto indica que los cambios en las relaciones de B2:B1 que resultan de las alteraciones en la proteína AveC, pueden ser específicos para sustratos particulares. Por consiguiente, la selección de mutantes que presentan cambios en la relación B2:B1 obtenida con un sustrato particular necesita realizarse en presencia de ese sustrato. Los ejemplos descritos más delante usan ácido ciclohexanocarboxílico como sustrato de selección. Sin embargo, este sustrato se usa simplemente para ilustrar el potencial y no pretende limitar la aplicabilidad de la presente invención.

7. EJEMPLO: AISLAMIENTO DEL GEN *aveC*

Este ejemplo describe el aislamiento y caracterización de una región del cromosoma de *Streptomyces avermitilis* que codifica el producto génico AveC. Como se demuestra más adelante, el gen *aveC* se identificó como un gen capaz de modificar la relación entre las ciclohexil-B2 y las ciclohexil-B1 (B2:B1) avermectinas producidas.

PATENTES Y MARCAS
INGELMO
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

105

7.1 Materiales y Procedimientos

7.1.1. Crecimiento de *Streptomyces* para el Aislamiento del ADN

Se siguió el siguiente procedimiento para cultivar *Streptomyces*. Se aislaron colonias individuales de *S. avermitilis* ATCC 31272 (aislado n° 2 de colonias individuales) en YDP-6 de concentración media que contenía: Extracto de Levadura de Difco - 5 g; Bacto-peptona de Difco - 5 g; dextrosa - 2,5 g; MOPS - 5 g; y Bacto agar de Difco - 15 g. El volumen final se ajustó a 1 litro con H_2O destilada, el pH se ajustó a 7,0 y el medio se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Los micelios desarrollados en el medio anterior se usaron para inocular 10 ml de medio TSB (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g, en 1 litro de H_2O destilada, esterilizado en autoclave a 121°C durante 25 minutos) en un tubo de 25 mm x 150 mm que se mantuvo con agitación (300 rpm) a 28°C durante 48-72 horas.

7.1.2. Aislamiento de ADN Cromosómico de *Streptomyces*

Se pusieron alícuotas (de 0,25 ml a 0,5 ml) de los micelios desarrollados como se ha descrito anteriormente en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 seg. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 0,25 ml de tampón TSE (20 ml de sacarosa

PATENTES MARCAS
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

1,5 M, 2,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 2,5 ml de EDTA 1 M, pH 8,0 y 75 ml de H_2O destilada) que contenía 2 mg/ml de lisozima. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos con agitación, se cargaron en un instrumento automático de aislamiento de ácidos nucleicos AutoGen 540™ (Integrated Separation Systems, Natick, MA) y se aisló el ADN genómico usando Cycle 159 (software del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como alternativa, se pusieron 5 ml de micelio en un tubo de 17 mm x 100 mm, las células se concentraron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón TSE, se concentraron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón TSE que contenía 2 mg/ml de lisozima y se incubaron a 37°C con agitación durante 30-60 minutos. Después de la incubación, se añadieron 0,5 ml dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y las células se incubaron a 37°C hasta que se completó la lisis. El lisado se incubó a 65°C durante 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente, se dividió en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml y se extrajo 1 vez con 0,5 ml de fenol/cloroformo (50% de fenol previamente equilibrado con Tris 0,5 M, pH 8,0; 50% de cloroformo). La fase acuosa se retiró y se extrajo de 2 a 5 veces con cloroformo:alcohol isoamílico

PATENTES
INGENIERIA
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

(24:1). El ADN se precipitó mediante la adición de 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 4,8, incubación de la mezcla en hielo durante 10 minutos, centrifugación de la mezcla a 15.000 rpm a 5°C durante 10 minutos y separación del sobrenadante poniéndolo en un tubo limpio al que se añadió 1 volumen de isopropanol. La mezcla de sobrenadante más isopropanol después se incubó en hielo durante 20 minutos, se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 minutos a 5°C, el sobrenadante se retiró y el sedimento de ADN se lavó una vez con etanol al 70%. Después de secar el sedimento, el ADN se resuspendió en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

7.1.3. **Aislamiento del ADN Plasmídico de *Streptomyces***

Se puso una alícuota (1,0 m) de micelio en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en 1,0 ml de sacarosa al 10,3%, se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos y el sobrenadante se desechó. Las células después se resuspendieron en 0,25 ml de tampón TSE que contenía 2 mg/ml de lisozima, se incubaron a 37°C durante 20 minutos con agitación y se cargaron en el instrumento automático de aislamiento de ácido nucleico AutoGen 540™. El ADN plasmídico se aisló usando Cycle 106 (software del equipo)

ING. C. Cánovas, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como alternativa, se pusieron 1,5 ml de micelio en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en 1,0 ml de sacarosa al 10,3% y se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos y el sobrenadante se desechó. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón TSE que contenía 2 mg/ml de lisozima y se incubaron a 37°C durante 15-30 minutos. Después de la incubación, se añadieron 0,25 ml de SDS alcalino (NaOH 0,3 N, SDS al 2%) y las células se incubaron a 55°C durante 15-30 minutos o hasta que la solución fue transparente. Se añadió acetato sódico (0,1 ml, 3 M, pH 4,8) a la solución de ADN, la cual después se incubó en hielo durante 10 minutos. Las muestras de ADN se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 5°C. El sobrenadante se retiró a un tubo limpio, se añadieron 0,2 ml de fenol:cloroformo (50% de fenol: 50% de cloroformo) y se mezclaron suavemente. La solución de ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 5°C y la capa superior se retiró en un tubo Eppendorf limpio. Se añadió isopropanol (0,75 ml), la solución se mezcló suavemente y después se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La solución de ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 15

PATENTES E INVENTO
INGENIERIA
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

109

minutos a 5°C, el sobrenadante se retiró y el sedimento de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en tampón TE.

7.1.4. **Aislamiento de ADN Plasmídico de *E. coli***

Se inoculó una colonia de *E. coli* transformada individual en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) (Bacto-Triptona - 10 g; Extracto de Bacto levadura - 5 g; y NaCl - 10 g en 1 litro de H_2O destilada, pH 7,0, esterilizado en autoclave a 121°C durante 25 minutos y suplementado con 100 µg/ml de ampicilina). El cultivo se incubó durante una noche y se puso una alícuota de 1 ml en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Las muestras de cultivo se cargaron en el instrumento automático de aislamiento de ácidos nucleicos AutoGen 540™ y se aisló el ADN plasmídico usando el Cycle 3 (software del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.1.5. **Preparación y Transformación de Protoplastos de *S. avermitilis***

Se aislaron colonias individuales de *S. avermitilis* en YPD-6 de concentración media. Los micelios se usaron para inocular 10 ml de medio TSB en un tubo de 25 mm x 150 mm que después se incubó con agitación (300 rpm) a 28°C durante 48 horas. Se usó 1 ml de micelio para inocular 50 ml de medio YEME. El medio YEME contiene, por litro: Extracto de Levadura de Difco - 3 g; Bacto-peptona de Difco

PATRICIA RUIZ MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

- 5 g; Extracto de Malta de Difco - 3 g; Sacarosa - 300 g. Después de la esterilización en autoclave a 121°C durante 25 minutos, se añadió lo siguiente: $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 2,5 M (esterilizado por separado en un autoclave a 121°C durante 25 min) - 2 ml; y glicina (20%) (esterilizado por filtración) - 25 ml.

Los micelios se desarrollaron a 30°C durante 48-72 horas y se recogieron por centrifugación en un tubo de centrífuga de 50 ml (Falcon) a 3.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se desechó y los micelios se resuspendieron en tampón P, que contiene: sacarosa - 205 g; K_2SO_4 - 0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 2,02 g; H_2O - 600 ml; K_2PO_4 (0,5%) - 10 ml; solución de oligoelementos* - 20 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3,68%) - 100 ml; y tampón MES (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml. (* La solución de oligoelementos contiene por litro: $ZnCl_2$ - 40 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 200 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ - 10 mg; $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ - 10 mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ - 10 mg; $(NH_4)_6\ MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 10 mg). El pH se ajustó a 6,5, el volumen final se ajustó a 1 litro y el medio se filtró en caliente a través de un filtro de 0,45 micrómetros.

Los micelios se reunieron a 3.000 rpm durante 20 min., el sobrenadante se desechó y los micelios se resuspendieron en 20 ml de tampón P que contenía 2 mg/ml de lisozima. Los micelios se incubaron a 35°C durante 15 minutos con agitación y se comprobaron microscópicamente para

PATENTIA INGENIERIA
INGENIEROS Y ABOGADOS
c/ Santiago, 11
Teléf. 5[illegible] - MADRID

determinar el grado de formación de protoplastos. Cuando se completó la formación de protoplastos, los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y los protoplastos se resuspendieron en 10 ml de tampón P. Los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró, los protoplastos se resuspendieron en 2 ml de tampón P y se distribuyeron aproximadamente 1 x 10^9 protoplastos en viales criogénicos de 2,0 ml (Nalgene).

Un vial que contenía 1 x 10^9 protoplastos se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y los protoplastos se resuspendieron en 0,1 ml de tampón P. Se añadieron de 2 a 5 μg de ADN transformante a los protoplastos, seguido inmediatamente por la adición de 0,5 ml de tampón T de trabajo. La base de tampón T contiene: PEG-1000 (Sigma) - 25 g; sacarosa - 2,5 g; H_2O - 83 ml. El pH se ajustó a 8,8 con NaOH 1 N (esterilizado por filtración) y la base de tampón T se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C. El tampón T de trabajo, hecho el mismo día del uso, era base de tampón T - 8,3 ml; K_2PO_4 (4 mM) - 1,0 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 M) - 0,2 ml; y TES (1M, pH 8) - 0,5 ml. Cada componente del tampón T de trabajo se esterilizó por filtración individualmente.

Dentro de un período de 20 segundos desde la adición del tampón T a los protoplastos, también se añadió 1 ml de

PATENTES ESPAÑOLES
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

tampón P y los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y los protoplastos se resuspendieron en 0,1 ml de tampón P. Los protoplastos después se aplicaron en placas en medio RM14 que contiene: sacarosa - 205 g; K_2SO_4 - 0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 10,12 g; glucosa - 10 g; Casaminoácidos de Difco - 0,1 g; Extracto de Levadura de Difco - 5 g; Agar de Harina de Avena de Difco - 3 g; Bacto Agar de Difco - 22 g; H_2O destilada - 800 ml. La solución se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 min. Después del tratamiento en autoclave, se añadieron soluciones madre estériles de lo siguiente: K_2PO_4 (0,5 %) - 10 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 M) - 5 ml; L-prolina (20%) - 15 ml; tampón MES (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml; solución de oligoelementos (la misma que se ha descrito anteriormente) - 2 ml; solución madre de cicloheximida (25 mg/ml) - 40 ml; y NaOH 1N - 2 ml. Se aplicaron alícuotas de 25 ml de medio RM14 por placa y las placas se secaron durante 24 horas antes del uso.

Los protoplastos se incubaron con una humedad del 95% a 30°C durante 20-24 horas. Para seleccionar los transformantes resistentes a tiostrepton, se extendió uniformemente 1 ml de tampón de recubrimiento que contenía 125 μg x ml de tiostrepton sobre las placas de regeneración de RM14. Los tampones de recubrimiento contienen por 100 ml: sacarosa - 10,3 g; solución de oligoelementos (la misma

PATRICIA DE DE MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Amaniguna, 113
Telef. 51 [illegible] - MADRID

que se ha descrito anteriormente) - 0,2 ml; y MES (1 M, pH 6,5) - 1 ml. Los protoplastos se incubaron con una humedad del 95% a 30°C durante 7-14 días hasta que fueron visibles las colonias resistentes a tiostrepton (Thio^r).

7.1.6. **Transformación de Protoplastos de *Streptomyces lividans***

En algunos casos, se usó *S. lividans* TK64 (proporcionado por John Innes Institute, Norwich, Reino Unido.) para las transformaciones. Los procedimientos y composiciones para el desarrollo, la obtención de protoplastos y la transformación de *S. lividans* se describen en Hopwood y col., 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, Reino Unido y se realizaron como se describe en este documento. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes de *S. lividans* como se describe en la Sección 7.1.3 anterior.

7.1.7. **Análisis de Fermentación de Cepas de *S. avermitilis***

Se inocularon micelios de *S. avermitilis* desarrollados en YPD-6 de concentración media durante 4-7 días en tubos de 2,54 x 15,24 cm que contenían 8 ml de medio de preformación y dos perlas de vidrio de 5 mm. El medio de preformación contiene: almidón soluble (almidón hervido fino o KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/l;

PATENTES ELZABURU
INGENIERIA Y ALEMAN
... 113
... - MADRID

Pharmamedia - 15 g/l; Ardamine pH - 5 g/l (Champlain Ind., Clifton, NJ); $CaCO_3$ - 2 g/l; 2 x bcfa ("bcfa" se refiere a ácidos grasos de cadena ramificada) que contiene una concentración final en el medio de 50 ppm de ácido 2-(+/-)-metil butírico, 60 ppm de ácido isobutírico y 20 ppm de ácido isovalérico. El pH se ajustó a 7,2 y el medio se trató en un autoclave a 121°C durante 25 min.

El tubo se agitó con un ángulo de 17° a 215 rpm a 29°C durante 3 días. Se usó una alícuota de 2 ml del cultivo de siembra para inocular un matraz Erlenmeyer de 300 ml que contenía 25 ml de medio de producción que contiene: almidón (almidón hervido fino o KOSO) - 160 g/l; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/l; Ardamine pH - 10 g/l; K_2PO_4 - 2 g/l; $MgSO_4 \cdot 4\ H_2O$ - 2 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,02 g/l; $MnCl_2$ - 0,002 g/l; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,002 g/l; $CaCO_3$ - 14 g/l; 2x bcfa (como se ha indicado anteriormente); y ácido ciclohexano carboxílico (CHC) (preparado como una solución al 20% a pH 7,0) - 800 ppm. El pH se ajustó a 6,9 y el medio se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Después de la inoculación, el matraz se incubó a 29°C durante 12 días con agitación a 200 rpm. Después de la incubación, se extrajo una muestra de 2 ml del matraz, se diluyó con 8 ml de metanol, se mezcló y la mezcla se centrifugó a 1.250 x g durante 10 minutos para sedimentar

PATRICIA RUIZ MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 11
Teléf. [illegible] MADRID

los residuos. Después, el sobrenadante se ensayó por HPLC usando una columna ODS Beckman Ultrasphere (25 cm x 4,6 mm DI) con un caudal de 0,75 ml/min y detección por absorbancia a 240 nm. La fase móvil fue metanol/agua/acetonitrilo 86/8,9/5,1.

7.1.8. Aislamiento de Genes PKS de *S. avermitilis*

Se preparó una biblioteca de cósmidos del ADN cromosómico de *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) y se hibridó con una sonda de cetosintasa (KS) obtenida a partir de un fragmento del gen de la policeturo sintasa (PKS) de *Saccharopolyspora erythraea*. Puede encontrarse una descripción detallada de la preparación de bibliotecas de cósmidos en Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente. En Hopwood y col., 1985, indicado anteriormente, se presenta una descripción detallada de la preparación de bibliotecas de ADN cromosómico de *Streptomyces*. Los clones de los cósmidos que contenían regiones que hibridaban con la cetosintasa se identificaron por hibridación con un fragmento *Nde*I/*Eco*47III de 2,7 kb procedente de pEX26 (suministrado amablemente por el Dr. P. Leadlay, Cambridge, Reino Unido). Se digirieron aproximadamente 5 ng de pEX26 usando *Nde*I y *Eco*47III. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa GTG SeaPlaque al 0,8% (FMC BioProducts, Rockland, ME). El fragmento *Nde*I/*Eco*47III de 2,7 kb se escindió del gel

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

después de la electroforesis y el ADN se recuperó del gel usando GELase™ de Epicentre Technologies, usando el Protocolo Rápido. El fragmento *NdeI/Eco*47III de 2,7 kb se marcó con [α-^{32}P]dCTP (desoxicitidina 5'-trifosfato, sal de tetra(trietilamonio), [alfa-^{32}P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) usando el Sistema de Traducción con Mella BRL (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizó una reacción típica en un volumen de 0,05 ml. Después de la adición de 5 μl de tampón de detención, el ADN marcado se separó de los nucleótidos no incorporados usando una columna G-25 Sephadex Quick Spin™ (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se seleccionaron aproximadamente 1.800 clones de cósmidos por hibridación de colonias. Se identificaron 10 clones que hibridaban fuertemente con la sonda KS de *Sacc. erythraea*. Las colonias de *E. coli* que contenían el ADN del cósmido se desarrollaron en medio líquido LB y el ADN del cósmido se aisló de cada cultivo en el instrumento automático de aislamiento de ácidos nucleicos AutoGen 540™ usando el Cycle 3 (software del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mapeo con endonucleasas de restricción y los análisis de hibridación con transferencia de Southern revelaron que cinco de los clones contenían regiones cromosómicas solapantes. Se construyó un mapa de

PATENTES MARCAS MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 69 90 - MADRID

restricción *Bam*HI del genoma de *S. avermitilis* de los cinco cósmidos (es decir, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68 y pSE69) mediante análisis de los cósmidos solapantes e hibridaciones (FIGURA 4).

7.1.9. Identificación de ADN que Modula las Relaciones de Avermectinas B2:B1 e Identificación de una ORF de *aveC*

Se usaron los siguientes procedimientos para ensayar fragmentos subclonados derivados del clon cosmídico pSE66 con respecto a su capacidad de modular las relaciones de avermectinas B2:B1 en los mutantes AveC. pSE66 (5 µg) Se digirió con *Sac*I y *Bam*HI. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa SeaPlaque™ GTG al 0,8% (FMC BioProducts), se escindió un fragmento *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb del gel después de la electroforesis y el ADN se recuperó del gel usando GELase™ (Epicentre Technologies) usando el Protocolo Rápido. Se digirieron aproximadamente 5 µg del vector lanzadera pWHM3 (Vara y col., 1989, J. Bacteriol. 171:5872-5881) con *Sac*I y *Bam*HI. Se mezclaron aproximadamente 0,5 µg del inserto de 2,9 kb y 0,5 µg del pWHM3 digerido y se incubaron durante una noche con una unidad de ligasa (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) a 15°C, en un volumen total de 20 µl, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la incubación, se incubaron 5 µl de la mezcla de ligación a 70°C durante 10 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para

PATENTES ELZABURU
INGENIEROS Y ABOGADOS
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 30 - MADRID

transformar células DH5α de *E. coli* competentes (BRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE119.

Se prepararon los protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* (cepa interna de Pfizer) y se transformaron con pSE119 como se ha descrito en la sección 7.1.5 anterior. La cepa 1100-SC38 es un mutante que produce significativamente más de la forma de ciclohexil avermectina B2 que de la forma ciclohexil avermectina-B1 cuando se suplementa con ácido ciclohexano carboxílico (B2:B1 de aproximadamente 30:1). Se aisló pSE119 usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* de la cepa de *E. coli* GM2163 (Obtenida de Dr. B. J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), la cepa DM1 de *E. coli* (BRL), o la cepa TK64 de *S. lividans*. Se aislaron transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 y se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los transformantes de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* que contenían pSE119 produjeron una relación alterada de ciclohexil avermectina-B2:ciclohexil avermectina-B1 de aproximadamente 3,7:1 (TABLA 2).

Habiendo establecido que pSE119 era capaz de modular

PATRICIA HOAN MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 93 - MADRID

las relaciones de avermectinas B2:B1 en un mutante de AveC, se secuenció el inserto de ADN. Se aislaron aproximadamente 10 µg de pSE119 usando el equipo de aislamiento de ADN plasmídico (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenció usando un secuenciador de ADN automático ABI 373A (Perkin Elmer, Foster City, CA). Los datos de la secuencia se recopilaron y editaron usando programas Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). La secuencia de ADN y la ORF de *aveC* se presentan en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1).

Se construyó un nuevo plásmido, denominado pSE118, como se indica a continuación. Se digirieron aproximadamente 5 µg de pSE66 con *Sph*I y *Bam*HI. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa SeaPlaque GTG al 0,8% (FMC BioProducts), se escindió un fragmento *Sph*I/*Bam*HI de 2,8 kb del gel después de la electroforesis y el ADN se recuperó del gel usando GELase™ (Epicentre Technologies) usando el Protocolo Rápido. Se digirieron aproximadamente 5 µg del vector lanzadera pWHM3 con *Sph*I y *Bam*HI. Se mezclaron aproximadamente 0,5 µg del inserto de 2,8 kb y 0,5 µg de pWHM3 digerido y se incubaron durante una noche con una unidad de ligasa (New England Biolabs) a 15°C en un volumen total de 20 µl de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la incubación, se incubaron 5 µl de la mezcla de ligación a 70°C durante 10 minutos, se

c. Ortega y Gasset, 113
Teléf. 519 89 90 - MADRID

enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para transformar células DH5α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto *Sph*I/*Bam*HI de 2,8 kb por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE118. El ADN del inserto en pSE118 y pSE119 solapa en aproximadamente 838 nucleótidos (FIGURA 4).

Los protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* se transformaron con pSE118 como se ha indicado anteriormente. Los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los transformantes de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* que contenían pSE118 no se alteraron en las relaciones de ciclohexil avermectina-B2:ciclohexil avermectina-B1 en comparación con la cepa 1100-SC38 (TABLA 2).

7.1.10. Amplificación por PCR del Gen *aveC* a partir del ADN Cromosómico de *S. avermitilis*

Se aisló un fragmento de ~ 1,2 kb que contenía la ORF de *aveC* del ADN cromosómico de *S. avermitilis* por amplificación por PCR, usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos de *aveC* obtenida anteriormente. Los cebadores de PCR se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador hacia la

MORENO
MADRID

derecha fue: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEC ID NO: 6); y el cebador hacia la izquierda fue: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEC ID NO: 7). La reacción por PCR se realizó con polimerasa Deep Vent™ (New England Biolabs) en tampón proporcionado por el fabricante y en presencia de dNTP 300 µM, glicerol al 10%, 200 pmoles de cada cebador, 0,1 µg de molde y 2,5 unidades de enzima en un volumen final de 100 µl, usando un aparato de ciclos térmicos Perkin-Elmer Cetus. El perfil térmico del primer ciclo fue de 95°C durante 5 minutos (etapa de desnaturalización), 60°C durante 2 minutos (etapa de reasociación) y 72°C durante 2 minutos (etapa de extensión). Los 24 ciclos posteriores tuvieron un perfil térmico similar con la excepción de que la etapa de desnaturalización se acortó a 45 segundos y la etapa de reasociación se acortó a 1 minuto.

El producto de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se detectó una sola banda de ADN de ~ 1,2 kb. Este ADN se purificó del gel y se ligó a 25 ng de vector romo pCR-Blunt linealizado (Invitrogen) en una relación de vector a inserto 1:10 molar, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se usó para transformar células *E. coli* competentes One Shot™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto de ~

ADRID

1,2 kb mediante análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE179.

El ADN del inserto de pSE179 se aisló mediante digestión con *Bam*HI/*Xba*I, se separó por electroforesis, se purificó del gel y se ligó al vector lanzadera pWHM3, que también se había digerido con *Bam*HI/*Xba*I, en una concentración total de ADN de 1 μg en una relación de vector a inserto de 1:5 molar. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto de ~ 1,2 kb mediante análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE186 (FIGURA 2, ATCC 209604) se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, y el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina.

7.2. <u>Resultados</u>

Se identificó un fragmento *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb de pSE119 que, cuando se utilizaba para transformar a la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis*, alteraba significativamente la relación de producción de avermectinas B2:B1. La cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* normalmente tiene una relación B2:B1 de aproximadamente 30:1, pero cuando se transforma con un vector que comprende el fragmento *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb, la relación de avermectinas B2:B1 se reduce a aproximadamente

PATRICIA HIGH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Caragena, 115
Teléf. 519 88 99 - MADRID

3,7:1. El análisis de los cultivos de transformantes después de la fermentación verificó la presencia del ADN transformante.

Se secuenció el fragmento pSE119 de 2,9 kb y se identificó una ORF de ~ 0,9 kb (FIGURA 1) (SEC ID NO: 1) que incluye un fragmento *PstI/SphI* que previamente se había mutado para producir sólo productos B2 (Ikeda y col., 1995, mencionado anteriormente). Una comparación de esta ORF o su correspondiente polipéptido deducido, con bases de datos conocidas (GenEMBL, SWISS-PROT) no mostró ninguna homología fuerte con el ADN o las secuencias proteicas conocidas.

La TABLA 2 presenta el análisis de fermentación de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* transformada con diversos plásmidos.

TABLA 2

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	**No. de Transformantes Ensayados**	**Relación Media de B2:B1**
1100-SC38 (ninguno)	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

PATENTES E.E. SPRINGER
INGLES Y ...
...
Tel. ...

8. EJEMPLO: CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE AveC DE *S. AVERMITILIS*

Este ejemplo describe la construcción de varios mutantes diferentes de AveC de *S. avermitilis* usando las composiciones y procedimientos descritos anteriormente. Kieser y Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204:430-458 exponen una descripción general de técnicas para introducir mutaciones en un gen de *Streptomyces*. Anzai y col., 1988, J. Antibiot. XLI(2):226-233 y Stutzman-Engwall y col., 1992, J. Bacteriol. 174(1): 144-154 proporcionan una descripción más detallada. Estas referencias se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

8.1. Inactivación del Gen aveC de *S. avermitilis*

Se construyeron mutantes de AveC que contenían genes *aveC* inactivados, usando varios procedimientos, como se detalla a continuación.

En el primer procedimiento se reemplazó un fragmento *Sph*I/*Pst*I de 640 pb interno al gen *aveC* en pSE119 (plásmido descrito en la sección 7.1.9, anterior) por el gen *ermE* (para resistencia a eritromicina) de *Sacc. erythraea*. El gen *ermE* se aisló de pIJ4026 (proporcionado por John Innes Institute, Norwich, Reino Unido; véase también Bibb y col., 1985, *Gene* 41:357-368) mediante digestión con enzimas de restricción, con *Bgl*II y *Eco*RI, seguido por electroforesis,

PATENTES E MARCAS
INGENIEROS CONSULTORES
C. Claudio Coello, nº 113
Teléf. 519 89 95 - MADRID

y se purificó del gel. Este fragmento de ~ 1,7 kb se ligó a pGEM7Zf (Promega) que se había digerido con *Bam*HI y *Eco*RI y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto de ~ 1,7 kb se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE27.

pSE118 (descrito en la Sección 7.1.9 anterior) se digirió con *Sph*I y *Bam*HI, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto *Sph*I/*Bam*HI de ~ 2,8 kb se purificó del gel. pSE119 se digirió con *Pst*I y *Eco*RI, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto *Pst*I/*Eco*RI de ~ 1,5 kb se purificó del gel. El vector lanzadera pWHM3 se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI. pSE27 se digirió con *Pst*I y *Sph*I, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto *Pst*I/*Sph*I de ~ 1,7 kb se purificó del gel. Los cuatro fragmentos (es decir, de ~ 2,8 kb, ~ 1,5 kb, ~ 7,2 kb y ~ 1,7 kb) se ligaron entre sí en una ligación de cuatro vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se

PATENTES
INO
c. Ortega, 113
Teléf. 519 59 93 - MADRID

denominó pSE180 (FIGURA 3; ATCC 209605).

pSE180 se utilizó para transformar TK64 de *S. lividans* y las colonias transformadas se identificaron por resistencia a tiostrepton y eritromicina. pSE180 se aisló de *S. lividans* y se usó para transformar protoplastos de *S. avermitilis*. Se identificaron cuatro transformantes de *S. avermitilis* resistentes a tiostrepton y los protoplastos se prepararon y cultivaron en placas en condiciones no selectivas en medio RM14. Después de regenerar los protoplastos, se seleccionaron colonias individuales con respecto a la presencia de resistencia a eritromicina y la ausencia de resistencia a tiostrepton, indicando la integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y la pérdida del replicón libre. Se identificó un transformante Erm^r $Thio^s$ y se denominó cepa SE180-11. El ADN cromosómico total se aisló de la cepa SE180-11, se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Hind*II, *Pst*I o *Sph*I, se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, se transfirió a membranas de nailon y se hibridó con la sonda *ermE*. Estos análisis demostraron que la integración cromosómica del gen de resistencia *ermE* y la deleción conjunta del fragmento *Pst*I/*Sph*I de 640 pb se había producido por un acontecimiento cruzado doble. El análisis de HPLC de los productos de fermentación de la cepa SE180-11, demostró que ya no se producían avermectinas normales

PATENTES MARCAS
INGLES Y ESPAÑOL
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

(FIGURA 5A).

En un segundo procedimiento para inactivar el gen *aveC*, el gen *ermE* de 1,7 kb se retiró del cromosoma de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*, dejando una deleción *Pst*I/*Sph*I de 640 pb en el gen *aveC*. Se construyó un plásmido de reemplazo génico como se indica a continuación: se digirió parcialmente pSE180 con *Xba*I y se purificó un fragmento de ~ 11,4 kb del gel. La banda de ~ 11,4 kb carece del gen de resistencia *ermE* de 1,7 kb. Después, el ADN se ligó y transformó a células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE184, se utilizó para transformar DM1 de *E. coli* y el ADN plasmídico se aisló a partir de los transformantes resistentes a ampicilina. Este plásmido se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Los protoplastos se prepararon a partir de los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11 y se cultivaron en placas como colonias individuales en RM14. Después de regenerar los protoplastos, se seleccionaron colonias individuales con respecto a la ausencia de resistencia a eritromicina y resistencia a tiostrepton, indicando integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y pérdida del replicón libre que contenía el gen

Telef. 91 [illegible] - MADRID

ermE. Se identificó un transformante Erm^s $Thio^s$ y se denominó SE184-1-13. El análisis de fermentación de SE184-1-13 demostró que no se producían avermectinas normales y que SE184-1-13 tenía el mismo perfil de fermentación que SE180-11.

En un tercer procedimiento para inactivar el gen *aveC*, se introdujo un desplazamiento de fase en el gen *aveC* cromosómico añadiendo dos G después de la C en la posición de nucleótido 471 usando PCR, con lo que se creaba un sitio *Bsp*E1. La presencia del sitio *Bsp*E1, obtenido por ingeniería genética, era útil para detectar el acontecimiento del reemplazo génico. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir una mutación de desplazamiento de fase en el gen *aveC* y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. El cebador hacia la derecha fue: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEC ID NO: 8) y el cebador hacia la izquierda fue: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEC ID NO: 9). Las condiciones de PCR fueron como se describe en la Sección 7.1.10 anterior. El producto de PCR de 666 pb se digirió con *Sph*I para dar dos fragmentos de 278 pb y 388 pb, respectivamente. El fragmento de 388 pb se purificó del gel.

El plásmido de reemplazo génico se construyó como se indica a continuación: se digirió el vector lanzadera pWHM3 con *Eco*RI y *Bam*HI. pSE119 se digirió con *Bam*HI y *Sph*I, el

Teléf. 519 59 90 - MADRID

producto de digestión se sometió a electroforesis y se purificó un fragmento de ~ 840 pb del gel. pSE119 se digirió con *Eco*RI y *Xmn*I, el producto de digestión se resolvió por electroforesis y se purificó un fragmento de ~ 1,7 kb del gel. Los cuatro fragmentos (es decir, ~ 7,2 kb, ~ 840 pb, ~ 1,7 kb y 388 pb) se ligaron entre sí en una ligación de cuatro vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este plásmido, que se denominó pSE185, se utilizó para transformar DM1 de *E. coli* y se aisló el ADN plasmídico a partir de los transformantes resistentes a ampicilina. Este plásmido se usó para transformar protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis*. Los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. pSE185 no alteraba significativamente las relaciones de avermectinas B2:B1 cuando se utilizaba para transformar la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* (TABLA 2).

pSE185 se usó para transformar protoplastos de *S. avermitilis* para generar una mutación de desplazamiento de fase en el gen *aveC* cromosómico. Se prepararon protoplastos

PATENTES Y MARCAS
INGENIEROS
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

a partir de transformantes resistentes a tiostrepton y se cultivaron en placas como colonias individuales en RM14. Después de regenerar los protoplastos, se seleccionaron las colonias individuales con respecto a la ausencia de resistencia a tiostrepton. Se aisló el ADN cromosómico a partir de las colonias sensibles a tiostrepton y se seleccionó por PCR con respecto a la presencia de mutación de desplazamiento de fase integrada en el cromosoma. Los cebadores de PCR se diseñaron basándose en la secuencia de nucleótidos de *aveC* y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEC ID NO: 10) y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEC ID NO: 11) y las condiciones de PCR fueron como se han descrito anteriormente en la Sección 7.1.10. El producto de PCR obtenido tenía 543 pb y, cuando se digirió con *Bsp*E1, se observaron tres fragmentos de 368 pb, 96 pb y 79 pb, indicando integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y pérdida del replicón libre.

El análisis de fermentación de los mutantes de *S. avermitilis* que contenían la mutación de desplazamiento de fase en el gen de *aveC* demostró que ya no se producían avermectinas normales, y que estos mutantes tenían el mismo perfil de fermentación de HPLC que las cepas SE180-11 y SE184-1-13. Se identificó un transformante Thio^s y se

PATRICIA [illegible]
INGLÉS Y [illegible]
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

denominó cepa SE185-5a.

Además, se produjo una mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 520 de G a A, lo cual ocasiona un cambio del codón que codifica un triptófano (W) en la posición 116 a un codón de terminación. Una cepa de *S. avermitilis* con esta mutación no producía avermectinas normales y tenía el mismo perfil de fermentación que las cepas SE180-11, SE184-1-13 y SE185-5a.

Además, se produjeron mutaciones en el gen *aveC* que cambian (i) el nucleótido en posición 970 de G a A, que cambia el aminoácido en posición 256 de una glicina (G) a un aspartato (D) y (ii) el nucleótido en posición 996 de T a C, que cambia el aminoácido en posición 275 de tirosina (Y) a histidina (H). Una cepa de *S. avermitilis* con estas mutaciones (G256D/Y275H) no producía avermectinas normales y tenía el mismo perfil de fermentación que las cepas SE180-11, SE184-1-13 y SE185-5a.

Las cepas mutantes de inactivación de *S. avermitilis* SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a y otras proporcionadas en este documento, proporcionan herramientas de selección para evaluar el impacto de otras mutaciones en el gen *aveC*. pSE186, que contiene una copia de tipo silvestre del gen *aveC*, se utilizó para transformar DM1 de *E. coli* y el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina. Este ADN de pSE186 se usó para transformar

Tele... - MADRID

protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y se analizaron los transformantes $Thio^r$ Erm^r por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* funcional en trans pudo restaurar la producción normal de avermectinas en la cepa SE180-11 (FIGURA 5B).

8.2 Análisis de Mutaciones en el Gen *aveC* que Alteran las Relaciones de Clases B2:B1

Como se ha descrito anteriormente, la cepa SE180-11 de *S. avermitilis* que contenía un gen *aveC* inactivo se complementó mediante transformación con un plásmido que contenía un gen *aveC* funcional (pSE186). La cepa SE180-11 también se utilizó como cepa huésped para caracterizar otras mutaciones en el gen *aveC* como se describe más adelante.

Se aisló ADN cromosómico de la cepa 1100-SC38 y se usó como molde para la amplificación por PCR del gen *aveC*. La ORF de 1,2 kb se aisló por amplificación por PCR usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos de *aveC*. El cebador hacia la derecha fue la SEC ID NO: 6 y el cebador hacia la izquierda fue la SEC ID NO: 7 (véase la Sección 7.1.10., anterior). Las condiciones de PCR y de subclonación fueron las descritas en la sección

PATENTES
NOTAS Y MARCAS
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

7.1.10. El análisis de la secuencia de ADN de la ORF de 1,2 kb muestra una mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 337 de C a T, que cambia el aminoácido en la posición 55 de serina (S) a fenilalanina (F). El gen *aveC* que contiene la mutación S55F se subclonó en pWHM3 para producir un plásmido que se denominó pSE187 y que se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y se analizaron los transformantes $Thio^r$ Erm^r por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* que codificaba un cambio en el resto aminoácido 55 (S55F) pudo restaurar la producción normal de avermectinas en la cepa SE180-11 (FIG. 5C); sin embargo, la relación de ciclohexil B2:ciclohexil B1 fue de aproximadamente 26:1, en comparación con la cepa SE180-11 transformada con pSE186, que tenía una relación de B2:B1 de aproximadamente 1,6:1 (TABLA 3), lo que indica que la mutación sencilla (S55F) modula la cantidad de ciclohexil B2 producida con respecto a ciclohexil B1.

Se identificó otra mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 862 de G a A, que cambia el aminoácido en posición 230 de glicina (G) a aspartato (D). Una cepa de *S. avermitilis* que tiene esta mutación (G230D)

PATENTES ... INGLES Y ... - A.I
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

produce avermectinas en una relación B2:B1 de aproximadamente 30:1.

8.3 Mutaciones que Reducen la Relación B2:B1

Se construyeron varias mutaciones que reducían la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1, como se indica a continuación.

Se identificó una mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 588 de G a A, que cambia el aminoácido en posición 139 de alanina (A) a treonina (T). El gen *aveC* que contenía la mutación A139T se subclonó en pWHM3 para producir un plásmido que se denominó pSE188 y que se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $Thio^r$ Erm^r se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado que codificaba un cambio en el resto aminoácido 139 (A139T) pudo restaurar la producción de avermectinas en la cepa SE180-11 (FIGURA 5D); sin embargo, la relación B2:B1 fue de aproximadamente 0,94:1, indicando que esta mutación reduce la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1. Este resultado era inesperado porque los resultados publicados, así como los resultados de las mutaciones descritas anteriormente, solo han demostrado

PATRICIA HEIN NORBERG
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 99 - MADRID

inactivación del gen *aveC* o un aumento de la producción de la forma B2 de la avermectina con respecto a la forma B1 (TABLA 3).

Como la mutación A139T alteraba las relaciones B2:B1 en la dirección B1 más favorable, se construyó una mutación que codificaba una treonina en lugar de una serina en el aminoácido en posición 138. Así pues, pSE186 se digirió con *Eco*RI y se clonó en pGEM3Zf (Promega) que se había digerido con *Eco*RI. Este plásmido, que se denominó pSE186a, se digirió con *Apa*I y *Kpn*I, los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa, y se purificaron del gel dos fragmentos de ~ 3,8 kb y ~ 0,4 kb. El ADN del inserto de ~ 1,2 kb procedente de pSE186 se usó como molde de PCR para introducir un cambio de una sola base en el nucleótido en posición 585. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir una mutación en el nucleótido en posición 585 y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCCTGGCGACG-3' (SEC ID NO: 12); y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEC ID NO:13). La reacción de PCR se realizó usando un equipo de PCR genómico Advantage GC (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) en tampón proporcionado por el fabricante en presencia de dNTP 200 μM, 200 pmol de cada cebador, 50 ng de ADN molde, GC-Melt

PAT. LIT. KLEIN & LERNER
INGLES Y ...
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

1,0 M y una unidad de Klen Taq Polymerase Mix en un volumen final de 50 µl. El perfil térmico del primer ciclo fue de 94°C durante 1 min.; seguido por 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 68°C durante 3 minutos. Se digirió un producto PCR de 295 pb con *Apa*I y *Kpn*I para liberar un fragmento de 254 pb que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel. Los tres fragmentos (~3,8 kb, ~ 0,4 kb y 254 pb) se ligaron entre sí de una forma de tres vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5a de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE198.

pSE198 se digirió con *Eco*RI, se clonó en pWHM3 que se había digerido con *Eco*RI y se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto por análisis de restricción. Este plásmido, que se denomino pSE199, se usó para transformar protoplastos de la

PATRICIA [illegible]
INGLES Y [illegible]
c/. Cartagena, [illegible]
Teléf. 5195990 - MADRID

cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $Thio^r$ Erm^r se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado que codificaba un cambio en el resto aminoácido 138 (S138T) pudo restaurar la producción normal de avermectinas de la cepa SE180-11; sin embargo, la relación B2:B1 era de 0,88:1, lo que indica que esta mutación reduce la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3). Esta relación de B2:B1 es incluso menor que la relación de 0,94:1 observada con la mutación A139T producida por la transformación de la cepa SE180-11 con pSE188, como se ha descrito anteriormente.

Se construyó otra mutación para introducir una treonina en las posiciones de aminoácidos 138 y 139. Se usó ADN del inserto de ~ 1,2 kb de pSE186 como molde de PCR. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir mutaciones en los nucleótidos en las posiciones 585 y 588 y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEC ID NO:14); y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GGAACATCACGGCATTCACC-3' (SEC ID NO: 15). La reacción de PCR se realizó usando las condiciones que se acaban de

PATRICIA MARTINEZ
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

describir en esta Sección. Un producto PCR de 449 pb se digirió con *Apa*I y *Kpn*I para liberar un fragmento de 254 pb que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel. pSE186a se digirió con *Apa*I y *Kpn*I, los fragmentos de ADN se separaron del gel de agarosa y se purificaron dos fragmentos de ~ 3,8 kb y ~ 0,4 kb del gel. Los tres fragmentos (~3,8 kb, ~0,4 kb y 254 pb) se ligaron entre sí en una ligación de tres vías y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células de DH5α *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción. El plásmido se denominó pSE230.

pSE230 se digirió con *Eco*RI, se clonó en pWHM3 que se había digerido con *Eco*RI y se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE231, se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los

PETRONILA RUIZ MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes Thio^r Erm^r se analizaron por fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado doble que codificaba S138T/A139T pudo restaurar la producción normal de avermectinas en la cepa SE180-11; sin embargo, la relación B2:B1 era de 0,84:1, lo que demuestra que esta mutación reduce adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3), con respecto a las reducciones proporcionadas por la transformación de la cepa SE180-11 con pSE188 o pSE199, como se ha descrito anteriormente.

Se construyó otra mutación para reducir adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1. Como las mutaciones S138T/A139T alteraban las relaciones B2:B1 en la dirección más favorable a B1, se construyó una mutación para introducir una treonina en la posición de aminoácido 138 y una fenilalanina en la posición de aminoácido 139. El ADN del inserto de ~1,2 kb de pSE186 se usó como molde de PCR. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir mutaciones en las posiciones de nucleótido 585 (cambiando una T por A), 588 (cambiando una G por T) y 589 (cambiando una C por T), y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-

PATENTES MOU MORENO
ING
C
Telét.

GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3' (SEC ID NO: 25); y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GGAACATCACGGCATTCACC-3' (SEC ID NO: 15). La reacción de PCR se realizó usando un equipo de PCR genómico Advantage GC (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) en tampón proporcionado por el fabricante en presencia de dNTP 200 μM, 200 pmoles de cada cebador, 50 ng de ADN molde, acetato de Mg 1,1 mM, GC-Melt 1,0 M y 1 unidad de ADN Polimerasa Tth en un volumen final de 50 μl. El perfil térmico del primer ciclo fue de 94°C durante 1 minuto; seguido por 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 68°C durante 3 minutos. Un producto de PCR de 449 pb se digirió con *Apa*I y *Kpn*I para liberar un fragmento de 254 pb, que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel. Los tres fragmentos (~3,8 kb, ~0,4 kb y 254 pb) se ligaron entre sí en una forma de 3 vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. Se aisló ADN plasmídico a partir de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE238.

pSE238 se digirió con *Eco*RI, se clonó en pWHM3, que se había digerido con *Eco*RI, y se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del

Tel

inserto correcto se confirmó por análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE239, se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $Thio^r$ Erm^r se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* doble mutado que codificaba S138T/A139F pudo restaurar la producción normal de avermectina en la cepa SE180-11; sin embargo, la relación B2:B1 era de 0,75:1, demostrando que esta mutación reducía adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3) con respecto a las reducciones proporcionadas por la transformación de la cepa SE180-11 con pSE188, pSE199 o pSE231 como se ha descrito anteriormente.

PATRICIA HOOK MARINO
INGLES Y ALEMAN

TABLA 3

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de transformantes ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación media B2:B1
SE180-11 (ninguno)	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

Se construyeron otras mutaciones para reducir adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 usando la técnica de redistribución de ADN como se describe en Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; y Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; y como se describe adicionalmente en las Patentes de Estados Unidos 5605793, 5811238, 5830721 y 5837458.

Se utilizaron plásmidos con ADN redistribuido que contenían genes *aveC* mutados para transformar células *E. coli dam dcm* competentes. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S.*

PATRICIA MARIN MORENO
Telé...

avermitilis. SE aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11 y se seleccionaron con respecto a la producción de avermectinas con una relación de ciclohexil-B2:ciclohexil-B1 de 1:1 o menor. Se determinó la secuencia de ADN del ADN plasmídico de los transformantes SE180-11 que producían avermectinas con una relación B2:B1 de 1:1 o menor.

Se identificaron ocho transformantes que producían cantidades reducidas de ciclohexil-B2 con respecto a ciclohexil-B1. La menor relación B2:B1 conseguida entre estos transformantes fue de 04:1 (TABLA 4). El ADN plasmídico se aisló de cada uno de los ocho transformantes y la secuencia de ADN se determinó para identificar las mutaciones en el gen *aveC*. Las mutaciones son las siguientes.

pSE290 contiene 4 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 317 de T a A, en la posición de nucleótido 353 de C a A, en la posición de nucleótido 438 de G a A y en la posición de nucleótido 1155 de T a A. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 317 cambia el aminoácido en la posición AA 48 de D a E y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 438 cambia el aminoácido en la posición AA 89 de A a T. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,42:1 (TABLA 4).

pSE291 contiene 4 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 272 de G a A, en la posición de nucleótido 585 de T a A, en la posición de nucleótido 588 de G a A, y en la posición de nucleótido 708 de G a A. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 585 cambia el aminoácido en la posición AA 138 de S a T, el cambio del nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T, y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 708 cambia el aminoácido en la posición AA 179 de G a S. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,57:1 (TABLA 4).

pSE292 contiene las mismas cuatro mutaciones de nucleótidos que pSE290. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,4:1 (TABLA 4).

pSE293 contiene 6 mutaciones de nucleótidos: en el nucleótido 24 de A a G, en la posición de nucleótido 286 de A a C, en la posición de nucleótido 497 de T a C, en la posición de nucleótido 554 de C a T, en la posición de nucleótido 580 de T a C y en la posición de nucleótido 886 de A a T. El cambio de nucleótidos en la posición de nucleótido 286 cambia el aminoácido en la posición AA 38 de Q a P, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 580 cambia el aminoácido en la posición AA 136 de L a P y

PATRICIA ... INGLES Y ... MADRID

el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 886 cambia el aminoácido en la posición AA 238 de E a D. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,68:1 (TABLA 4).

pSE294 contiene 6 mutaciones de nucleótidos: en nucleótido 469 de T a C, en la posición de nucleótido 585 de T a A, en la posición de nucleótido 588 de G a A, en la posición de nucleótido 708 de G a A, en la posición de nucleótido 833 de C a T y en la posición de nucleótido 1184 de G a A. Además, los nucleótidos en la posiciones 173, 174 y 175 están delecionados. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 469 cambia el aminoácido en la posición AA 99 de F a S, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 585 cambia el aminoácido en la posición AA 138 de S a T, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 708 cambia el aminoácido de la posición AA 179 de G a S. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,53: (TABLA 4).

pSE295 contiene 2 mutaciones de nucleótidos: en el nucleótido 588 de G a A y en el nucleótido 856 de T a C. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T y el

PATRICIA HOGG MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
C [illegible] 110
[illegible] MADRID

cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 856 cambia el aminoácido en la posición AA 228 de M a T. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,80:1 (TABLA 4).

pSE296 contiene 5 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 155 de T a C, en la posición de nucleótido 505 de G a T, en la posición de nucleótido 1039 de C a T, en la posición de nucleótido 1202 de C a T y en la posición de nucleótido 1210 de T a C. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 505 cambia el aminoácido en la posición AA 111 de G a V y el cambio del nucleótido en la posición de nucleótido 1039 cambia el aminoácido en la posición AA 289 de P a L. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,73:1 (TABLA 4).

pSE297 contiene 4 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 377 de G a T, en la posición de nucleótido 588 de G a A, en la posición de nucleótido 633 de A a G y en la posición de nucleótido 1067 de A a T. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 633 cambia el aminoácido en la posición AA 154 de K a E y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 1067 cambia el aminoácido en la posición AA 298 de Q a H. La

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ESPAÑOL

relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,67:1 (TABLA 4).

TABLA 4

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de Transformantes Ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación Media de B2:B1
SE180-11(ninguno)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHMe)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	67	208	0,42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0,57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0,40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0,68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0,53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0,80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0,73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0,67

9. EJEMPLO: CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE DELECIÓN 5'

Como se ha explicado en la Sección 5.1 anterior, la secuencia de nucleótidos de *S. avermitilis* mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) comprende cuatro codones GTG diferentes en las posiciones de pb 42, 174, 177 y 180, que son sitios de iniciación potenciales. Esta sección describe la construcción de múltiples deleciones de la región 5' de la ORF de *aveC* (FIGURA 1; SEC ID NO: 1) para ayudar a definir cuáles de estos codones podrían funcionar como sitios de iniciación en la ORF de *aveC* para la expresión

PATENTES Y MARCAS
INGLES Y ALEMAN
c/ [illegible], 113
Telef. [illegible] MADRID

proteica.

Se aislaron fragmentos del gen aveC delecionados de diversas formas en el extremo 5' y se aislaron del ADN cromosómico de *S. avermitilis* por amplificación por PCR. Los cebadores se PCR se diseñaron basándose en la secuencia de ADN de *aveC* y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. Los cebadores hacia la derecha fueron 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEC ID NO: 16) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEC ID NO: 17) (DIF2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEC ID NO: 18) (D1F3); y 5'-TGCAGGCGTACGTGTTCAGC-3' (SEC ID NO: 19) (D2F2). Los cebadores hacia la izquierda fueron 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEC ID NO: 20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEC ID NO: 21); Y 5'-AGGAGTGTGGTGCGTCTGGA-3' (SEC ID NO: 22). La reacción de PCR se realizó como se ha descrito anteriormente en la Sección 8.3.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se detectaron bandas de ADN individuales de ~ 1,0 kb o ~ 1,1 kb. Los productos de PCR se purificaron del gel y se ligaron a 25 ng del vector pCR2.1 linealizado (Invitrogen) en una relación de vector a inserto de 1:10 molar siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mezclas de ligación se usaron para transformar células *E. coli* competentes One Shot™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El

PATRICIA [illegible]
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Telef. [illegible] MADRID

ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto se confirmó mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Estos plásmidos se denominaron pSE190 (obtenido con el cebador D1F1), pSE191 (obtenido con el cebador D1F2), pSE192 (obtenido con el cebador D1F3) y pSE193 (obtenido con el cebador D2F2).

Cada ADN del inserto se digirió con *Bam*HI/*Xba*I, se separó por electroforesis, se purificó del gel y se ligó por separado al vector lanzadera pWHM3, que se había digerido con *Bam*HI/*Xba*I, en una concentración total de ADN de 1 μg y en una relación de vector a inserto de 1:5 molar. Las mezclas de ligación se usaron para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto se confirmó mediante análisis de restricción. Estos plásmidos, que se denominaron pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3) y pSE197 (D2F2), se utilizaron por separado para transformar la cepa DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este ADN se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia

PATENTES
INGENIERIA Y MARCAS
c. Cartagena, 113
Telef. 519 53 90 - MADRID

de resistencia a eritromicina y se analizaron los transformantes Thio^r Erm^r por análisis de HPLC de los productos de fermentación para determinar los sitios GTG que eran necesarios para la expresión de *aveC*. Los resultados indican que el codón GTG en la posición 42 puede eliminarse sin afectar a la expresión de *aveC*, ya que pSE194, pSE195 y pSE196, careciendo del sitio GTG en la posición 42, pero conteniendo los tres sitios GTG en las posiciones 174, 177 y 180, podían restaurar la producción normal de avermectinas cuando se utilizaban para transformar SE180-11. La producción normal de avermectinas no se restauraba cuando la cepa SE180-11 se transformaba con pSE197, que carece de los cuatro sitios GTG (TABLA 5).

TABLA 5

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de Transformantes Ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación Media de B2:B1
SE180-11 (ninguno)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1,58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2,43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1,97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1,58
SE180-11 (pSE197)	12	0	0	0

10. EJEMPLO: CLONACIÓN DE HOMÓLOGOS *aveC* DE *S.*

PATENCIA KISH MORRIS
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Telef. [illegible] MADRID

HYGROSCOPICUS Y S. GRISEOCHROMOGENES

La presente invención permite identificar y clonar genes homólogos de *aveC* de otras especies que producen avermectinas o milbemicina de *Streptomyces*. Por ejemplo, se hibridó una biblioteca de cósmidos de ADN genómico de *S. hygroscopicus* (FERM BP-1901) con la sonda de *aveC* de 1,2 kb de *S. avermitilis*, descrita anteriormente. Se identificaron varios clones de cósmidos que hibridaron fuertemente. Se aisló el ADN cromosómico de estos cósmidos y se identificó un fragmento *Kpn*I de 4,9 kb que hibridaba con la sonda de *aveC*. Este ADN se secuenció y se identificó una ORF (SEC ID NO: 3) que tenía una homología significativa con la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*. En la FIGURA 6 se presenta una secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 4) deducida de la ORF homóloga a *aveC* de *S. hygroscopicus*.

Además, se hibridó una biblioteca de cósmidos del ADN genómico de *S. griseochromogenes* con la sonda de *aveC* de 1,2 kb anterior de *S. avermitilis* descrita anteriormente. Se identificaron varios clones cosmídicos que hibridaban fuertemente. Se aisló el ADN cromosómico de estos cósmidos y se identificó un fragmento *Pst*I de 5,4 kb que hibridaba con la sonda de *aveC*. Este ADN se secuenció y se identificó una ORF parcial homóloga a *aveC* que tenía una homología significativa con la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*. En la FIGURA 6 se presenta una secuencia de aminoácidos parcial

PATENTES MARCAS
INGENIEROS Y ABOGADOS
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

deducida (SEC ID NO: 5).

El análisis del ADN y de la secuencia de aminoácidos de los homólogos de *aveC* de *S. hygroscopicus* y de *S. griseochromogenes* indica que estas regiones comparten una homología significativa (identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos ~50%) tanto entre sí como con la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* y con el producto génico AveC (FIGURA 6).

11. EJEMPLO: CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO CON EL GEN *aveC* DETRÁS DEL PROMOTOR *ermE*

Se subclonó la ORF de *aveC* de 1,2 kb procedente de pSE186 en pSE34, que es el vector lanzadera pWHM3 que tiene el promotor *ermE* de 300 pb insertado como un fragmento *Kpn*I/*Bam*HI en el sitio *Kpn*I/*Bam*HI de pWHM3 (véase Ward y col., 1986, Mol. Gen. Genet. 203:468-478). pSE186 se digirió con *Bam*HI e *Hind*III, el producto de digestión se resolvió por electroforesis y el fragmento de 1,2 kb se aisló del gel de agarosa y se ligó a pSE34, que se había digerido con *Bam*HI e *Hind*III. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto de 1,2 kb se confirmó mediante análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE189, se utilizó para transformar a DM1 de *E.*

153

PATENTIA
INGENIERIA Y CONSULTORIA
C/ [illegible], 113
Teléf. 519 39 00 - MADRID

coli y el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina. Los protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* se transformaron con pSE189. Los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación.

Los transformantes de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* que contenían pSE189 se habían alterado en las relaciones de ciclohexil-B2 avermectina: ciclohexil-B1 avermectina producida (aproximadamente 3:1) en comparación con la cepa 1100-SC38 (aproximadamente 34:1), y la producción total de avermectinas aumentó aproximadamente 2,4 veces en comparación con la cepa 1100-SC38 transformada con pSE119 (TABLA 6).

pSE189 también se utilizó para transformar protoplastos de una cepa de *S. avermitilis* de tipo silvestre. Los transformantes resistentes a tiostrepton se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Las avermectinas totales producidas por el tipo silvestre de *S. avermitilis* transformado con pSE189 aumentaron aproximadamente 2,2 veces en comparación con *S. avermitilis* de tipo silvestre transformado con pSE119 (TABLA 6).

PATRICIA [illegible]
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible]ORIA

TABLA 6

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de Transformantes Ensayados	[B2] Relativa	[B1] Relativa	Avermectinas totales Relativas	Relación Media de 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
tipo silvestre	6	59	42	113	1,41
tipo silvestre (pSE119)	6	248	151	481	1,64
tipo silvestre (pSE189)	5	545	345	1.071	1,58

12. EJEMPLO: PLÁSMIDO QUIMÉRICO QUE CONTIENE SECUENCIAS DE LA ORF DE *aveC S. AVERMITILIS* Y EL HOMÓLOGO DE *aveC* DE *S. HYGROSCOPICUS*

Se construyó un plásmido híbrido denominado pSE350 que contiene una porción de 564 pb del homólogo de *aveC* de *S. hygroscopicus* reemplazando a una porción homóloga de 564 pb de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* (FIGURA 7) como se indica a continuación. Se construyó pSE350 usando un sitio de restricción *Bsa*AI que se conserva en las dos secuencias (*aveC* posición 225) y un sitio de restricción *Kpn*I que está presente en el gen *aveC* de *S. avermitilis* (*aveC* posición 810). El sitio *Kpn*I se introdujo en el ADN de *S.*

PATENTES ELZABURU
INGENIEROS
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 69 00 - MADRID

hygroscopicus por PCR usando el cebador hacia la derecha 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTCG-3' (SEC ID NO: 23) y el cebador hacia la izquierda 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEC ID NO: 24) (suministrado por Genosys Biotechnologies), usando las condiciones de PCR descritas en la Sección 7.1.10 anterior. El producto de PCR se digirió con *Bsa*AI y *Kpn*I, los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de *Bsa*AI/*Kpn*I de 564 pb se aisló del gel. pSE179 (descrito en la Sección 7.1.10 anterior) se digirió con *Kpn*I e *Hind*III, los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló un fragmento de ~ 4,5 kb del gel. pSE179 se digirió con *Hind*III y *Bsa*AI, los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló del gel un fragmento de *Bsa*AI/*Hind*III de ~ 0,2 kb. El fragmento *Hind*III/*Kpn*I de ~ 4,5 kb, el fragmento *Bsa*AI/*Hind*III de ~0,2 kb y el fragmento *Bsa*AI/*Kpn*I de 564 pb de *S. hygroscopicus* se ligaron entre sí en una ligación de 3 vías y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción usando *Kpn*I y *Ava*I. Este plásmido se digirió con *Hind*III y *Xba*I para liberar el inserto de 1,2 kb, que después se unió con pWHM3 que se

PATRICIA [illegible]
INGLES Y ALEMAN
c/. [illegible], 113
Teléf. 579 [illegible] - MADRID

había digerido con *Hind*III y *Xba*I. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción usando *Hind*III y *Ava*I. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este plásmido se denominó pSE350 y se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de eritromicina y se analizaron los transformantes $Thio^r$ Erm^r mediante análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los resultados muestran que los transformantes que contienen el plásmido híbrido de *S. avermitilis/S. hygroscopicus*, tienen una relación media B2:B1 de aproximadamente 109:1 (TABLA 7).

PATENTES ... MARCAS
INGENIEROS Y ABOGADOS
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 69 00 - MADRID

TABLA 7

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de transformantes ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación media B2:B1
SE180-11 (ninguno)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

DEPÓSITO DE MATERIALES BIOLÓGICOS

El siguiente material biológico se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) en 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, el 29 de Enero de 1998, y recibió los siguientes números de acceso:

Plásmido	No. de Acceso
plásmido pSE180	209605
plásmido pSE186	209604

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas anteriormente, se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

La presente invención no se limita en alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento, que deben considerarse simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y están dentro del alcance de la invención procedimientos y componentes funcionalmente equivalentes. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en este

PATENTES MARCAS
INGENIEROS Y ABOGADOS
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 69 96 - MADRID

documento, serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Tales modificaciones pretenden incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

PATRICIA ISERN M.
INGENIERO Y ABOGADO
c. Caballero, 11
Teléf. 519 69 50 - MADRID

REIVINDICACIONES

1. Una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual que el alelo de *aveC* de *S. avermitilis*, la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1), o una variante degenerada de la misma, pero comprendiendo además la secuencia de nucleótidos una o más mutaciones que codifican una sustitución de aminoácidos en uno o más de los restos aminoácidos 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289 ó 298 de la SEC ID NO: 2, de tal forma que las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en las que el alelo de *aveC* de tipo silvestre se ha inactivado y expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada, producen una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por células de la cepa ATCC 53692 de *S avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

2. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 1, en la que las avermectinas de clases 2:1 son ciclohexil B2: ciclohexil B1 avermectinas.

3. La molécula polinucleotídica de la reivindicación

PATENTIA HOCH N° 100
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 413 83 90 - MADRID

2, en la que la relación diferente de avermectinas de clases 2:1 es una relación reducida en comparación con la relación de clases 2:1 producida por células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

4. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,8:1 o menor.

5. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,68:1 o menor.

6. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,53:1 o menor.

7. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,42:1 o menor.

8. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,40:1 o menor.

9. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 2, en la que las sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una

PATRICIA RUIZ MORENO
INGLÉS Y [illegible]
C. [illegible]
Teléf. [illegible] MADRID

sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido K en la posición 154 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(h) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(i) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

PATENTIA
INGENIERIA Y SL
C/ ...
Telf. ...

(j) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

(k) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L;

(l) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H.

10. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 9, en la que se muta una combinación de restos de aminoácidos, y en la que la combinación se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(b) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(c) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(d) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(e) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(f) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(g) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

11. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 10, en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

PATRICIA KOCH MORENO
ING
MADRID

E91
163

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111/P289L; y

(g) A139T/K154E/Q298H.

12. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica D48E/A89T comprenden un cambio de base de T a A en la posición de nucleótido 317 y un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 438.

13. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica D48E/A89T comprenden además un cambio de base de C a A en la posición de nucleótido 353 y un cambio de base de T a A en la posición de nucleótido 1155.

14. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica S138T/A139T/G179S comprenden un cambio de base de T a A en la posición de nucleótido 585, un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 588 y un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 708.

15. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 14, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que

PATENTES MARCAS Y MODELOS
INGLES Y ESPAÑOL
C
Tele

codifica S138T/A139T/G179S comprenden además un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 272.

16. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica Q38P/L136P/E238D comprenden un cambio de base de A a C en la posición de nucleótido 286, un cambio de base de T a C en la posición de nucleótido 580 y un cambio de base de A a T en la posición de nucleótido 886.

17. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 16, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica Q38P/L136P/E238D comprenden además un cambio de base de A a G en la posición de nucleótido 24, un cambio de base de T a C en la posición de nucleótido 497 y un cambio de base de C a T en la posición de nucleótido 554.

18. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica F99S/S138T/A139T/G179S comprenden una deleción de 3 pares de bases en las posiciones de nucleótidos 173, 174 y 175, un cambio de base de T a C en la posición de nucleótido 469, un cambio de base de T a A en la posición de nucleótido 585, un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 588 y un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 708.

19. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 18, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que

codifica F99S/S138T/A139T/G179S comprenden además un cambio de base de C a T en la posición de nucleótido 833 y un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 1184.

20. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica A139T/M228T comprenden un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 588 y un cambio de base de T a C en la posición de nucleótido 856.

21. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica G111V/P289L comprenden un cambio de base de G a T en la posición de nucleótido 505 y un cambio de base de C a T en la posición de nucleótido 1039.

22. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 21, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica G111V/P289L comprenden además un cambio de base de T a C en la posición de nucleótido 155, un cambio de base de C a T en la posición de nucleótido 1202 y un cambio de base de T a C en la posición de nucleótido 1210.

23. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica A139T/K154E/Q298H comprenden un cambio de base de G a A en la posición de nucleótido 588, un cambio de base de A a G en la posición de nucleótido 633 y un cambio de base de A a T en la posición de nucleótido 1067.

PATENTES MOLNIA
INGENIEROS
c. [illegible], 113
Telef. [illegible] - MADRID

24. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 23, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica A139T/K154E/Q298H comprenden además un cambio de base de G a T en la posición de nucleótido 377.

25. Un vector recombinante que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 1.

26. Una célula huésped que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 1 o el vector recombinante de la reivindicación 25.

27. La célula huésped de la reivindicación 26, que es una célula de *Streptomyces*.

28. Un procedimiento para obtener una nueva cepa de *S. avermitilis*, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* con una molécula polinucleotídica o vector recombinante capaz de introducir una mutación en el alelo de *aveC* de tales células, donde la mutación del alelo de *aveC* da como resultado la sustitución en el producto génico AveC de un resto aminoácido diferente en una o más posiciones de aminoácido correspondientes a los restos de aminoácido 38, 48, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 238, 289 ó 298 de la SEC ID NO: 2, de tal forma que las células de la cepa de *S. avermitilis* en la que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma producen una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por células de la misma cepa de *S. avermitilis*

PATENTES MAX MORENO
INGENIERO LEMAN
C. [illegible], 113
Telef. [illegible] MADRID

que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que las avermectinas de clases 2:1 son ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas.

30. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la relación diferente de avermectinas de clases 2:1 es una relación reducida.

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en las que se ha mutado de esta forma el alelo de *aveC* es de aproximadamente 0,8:1 o menor.

32. El procedimiento de la reivindicación 30, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en las que se ha mutado de esta forma el alelo de *aveC* es de aproximadamente 0,68:1 o menor.

33. El procedimiento de la reivindicación 30, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en las que se ha mutado de esta forma el alelo de *aveC* es de aproximadamente 0,53:1 o menor.

34. El procedimiento de la reivindicación 30, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas

PATENTES E.U. MORELLO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible], 115
Tel. [illegible] MADRID

por células de la cepa de *S. avermitilis* en las que se ha mutado de esta forma el alelo de *aveC* es de aproximadamente 0,42:1 o menor.

35. El procedimiento de la reivindicación 30, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en las que se ha mutado de esta forma el alelo de *aveC* es de aproximadamente 0,40:1 o menor.

36. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que las sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una

sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido K en la posición 154 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(h) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(i) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(j) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

(k) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L; y

(l) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H;

37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que se muta el alelo de *aveC* para codificar sustituciones de aminoácidos en una combinación de posiciones de

PATENTES Y SIGNOS
INGENIEROS
c/ Orense, 11
Telef. 579 59 90 - MADRID

aminoácidos, y en el que la combinación se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(b) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(c) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(d) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(e) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(f) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(g) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

38. El procedimiento de la reivindicación 37, en el que la combinación de sustituciones de aminoácidos se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111/P289L; y

(g) A139T/K154E/Q298H.

39. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifica D48E/A89T comprende un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 317 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de

PATRICIA ROSA MORENO
INGLES Y [illegible]
C. [illegible]
Telef. [illegible]

G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 438 de la SEC ID NO:1.

40. El procedimiento de la reivindicación 39, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifica D48E/A89T comprende además un cambio de base de C a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 353 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1155 de la SEC ID NO:1.

41. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican S138T/A139T/G179S comprenden un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO: 1.

42. El procedimiento de la reivindicación 41, que comprende además introducir un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 272 de la SEC ID NO:1.

43. El procedimiento de la reivindicación 38, en el

PATRICIA KOHN MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
MADRID

que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican Q38P/L136P/E238D comprenden un cambio de base de A a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 286 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 580 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 886 de la SEC ID NO:1.

44. El procedimiento de la reivindicación 43, que comprende además introducir un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* que corresponde al nucleótido 24 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 497 de la SEC ID NO: 1, y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al 554 de la SEC ID NO:1.

45. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican F99S/S138T/A139T/G179S comprenden una deleción de 3 pares de bases en las posiciones de nucleótidos en el alelo de *aveC* correspondientes a los nucleótidos 173, 174 y 175 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al

PATENTES
INO
C/ ORENSE, 11
MADRID

nucleótido 469 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

46. El procedimiento de la reivindicación 45, que comprende además introducir un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 833 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido del alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1184 de la SEC ID NO:1.

47. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/M228T comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido del alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 856 de la SEC ID NO:1.

48. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican G111V/P289L comprenden un cambio de base de G a T en una

PATENTS

posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 505 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1039 de la SEC ID NO:1.

49. El procedimiento de la reivindicación 48, que además comprende introducir un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 155 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1202 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* que corresponde al nucleótido 1210 de la SEC ID NO:1.

50. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/K154E/Q298H comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 633 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1067 de la SEC ID NO:1.

51. El procedimiento de la reivindicación 50, que además comprende introducir un cambio de base de G a T en

PATRICIA HARO GUERRERO
INGLES Y ESPAÑOL
C/ Ortega y Gasset, 113
Teléf. 91 563 ... MADRID

una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 377 de la SEC ID NO:1.

52. Una célula de *Streptomyces avermitilis* que tiene un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto génico AveC que tiene una sustitución en una o más posiciones de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289 o 298 de la SEC ID NO:2, donde la célula produce una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por una célula de la misma cepa de *S. avermitilis* pero que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

53. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 52, en la que las avermectinas de clases 2:1 son ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas.

54. La células de *S. avermitilis* de la reivindicación 53, en la que la diferente relación de avermectinas de clases 2:1 es una relación reducida.

55. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 54, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,8:1 o menor.

56. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 54, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,68:1 o menor.

57. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación

INGLES Y ...
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 53 00 - MADRID

54, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,53:1 o menor.

58. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 54, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,42:1 o menor.

59. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 54, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,40:1 o menor.

60. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 52, en la que las sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una

PATRICIA ISBEL MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. Cartagena, 115
Tel. 91 [illegible] MADRID

sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido K en la posición 154 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(h) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(i) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(j) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

(k) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L; y

(l) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H.

61. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 60, en la que el alelo de *aveC* se muta para codificar sustituciones de aminoácidos en una combinación de

PATRICIA RAGO MARTINO
INGLES Y ...AN
c. Conde..., 11...
Telef. 519...MADRID

178

posiciones de aminoácidos, y en la que la combinación se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(b) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(c) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(d) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(e) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(f) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(g) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

62. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 61, en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111/P289L; y

(g) A139T/K154E/Q298H.

63. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 62, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican D84E/A89T comprenden un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC*

PATRICIA [illegible] RODRIGO
INGLES Y [illegible]
c/. Cartagena, [illegible]
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

correspondiente al nucleótido 317 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 438 de la SEC ID NO:1.

64. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 63, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican D48E/A89T comprenden además un cambio de base de C a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 353 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1155 de la SEC ID NO:1.

65. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 62, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican S138T/A139T/G179S comprenden un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

66. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican S138T/A139T/G179S comprenden además un cambio de

PATENTES MORENO
ADRID

base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 272 de la SEC ID NO:1.

67. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 62, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican Q38P/L136P/E238D comprenden un cambio de base de A a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 286 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 580 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 886 de la SEC ID NO:1.

68. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 67, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican Q38P/L136P/E238D comprenden además un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 24 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 497 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al 554 de la SEC ID NO:1.

69. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 62, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican F99S/S138T/A139T/G179S comprenden una deleción de

PATRICIA RUBIO MUREDO
INGLES Y ALEMAN
C. Cartagena, 113
Telef. 519 ... ADRID

3 pares de bases en posiciones de nucleótidos en el alelo de *aveC* que corresponden a los nucleótidos 173, 174 y 175 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 469 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

70. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 69, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican F99S/S138T/A139T/G179S comprenden además un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 833 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1184 de la SEC ID NO:1.

71. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 62, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifica A139T/M228T comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un

PATRICIA HOEN MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c. Cartagena, 113
Telef. 5[illegible]90 - MADRID

cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 856 de la SEC ID NO:1.

72. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 62, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican G111V/P289L comprenden un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 505 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1039 de la SEC ID NO:1.

73. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 72, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican G111V/P289L comprenden además un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 155 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1202 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1210 de la SEC ID NO:1.

74. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 62, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/K154E/Q298H comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC*

PATRICIA RUIZ MORENO
ING. AGR.
MAT. Nº
Telef.
MADRID

correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 633 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1067 de la SEC ID NO: 1

75. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 74, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/K154E/Q298H comprenden además un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 377 de la SEC ID NO:1.

76. Un procedimiento para producir avermectinas que comprende cultivar las células de la reivindicación 52 en medios de cultivo, en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas en los mismos, y recuperar dichas avermectinas del cultivo.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
C/ [illegible]
Teléf. [illegible] MADRID

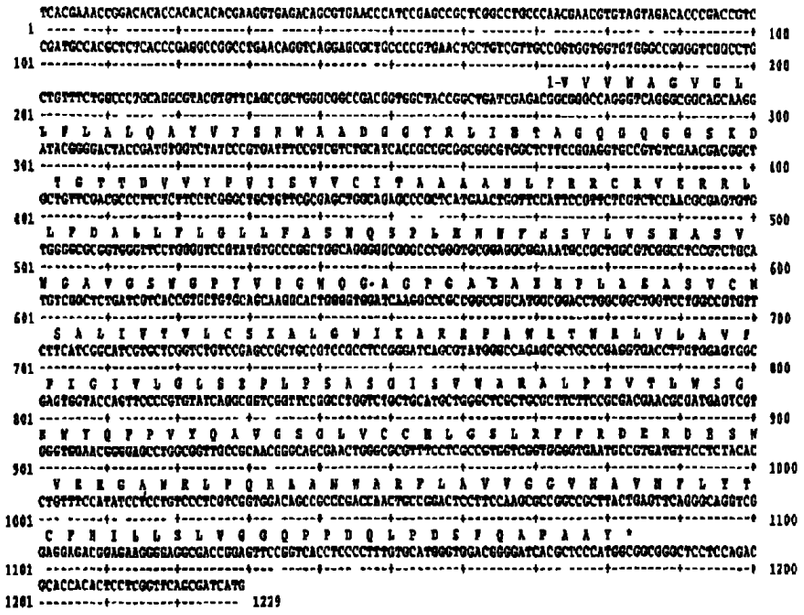
184
184

RESUMEN

La presente invención se refiere a moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico AveC, moléculas polinucleotídicas que pueden usarse para alterar la relación o cantidad de avermectinas de clases 2:1 producidas en cultivos de fermentación de *S. avermitilis*. La presente invención se refiere además a vectores, células huésped y cepas mutantes de *S. avermitilis* en las que el gen *aveC* se ha inactivado o mutado para cambiar la relación o cantidad de avermectinas de clases 2:1 producidas.

PATRICIA HERR MORENO
[illegible]

FIG.1



PATENTES ACOSTA MORENO
INGLES Y ALEMAN
c Cartagena, 113
Telef. 519 99 90 - MADRID

FIG. 2

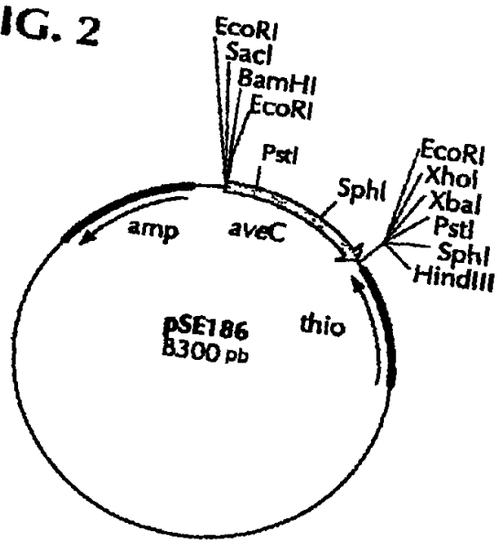
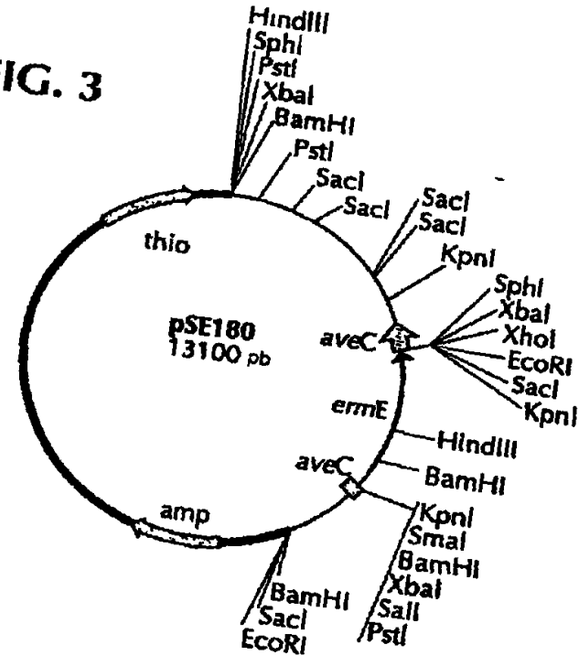


FIG. 3



127

PATENTES Y MARCAS
INCLUSA Y LISAN
c/ Cartagena, 113
Telef. 519 50 90 - MADRID

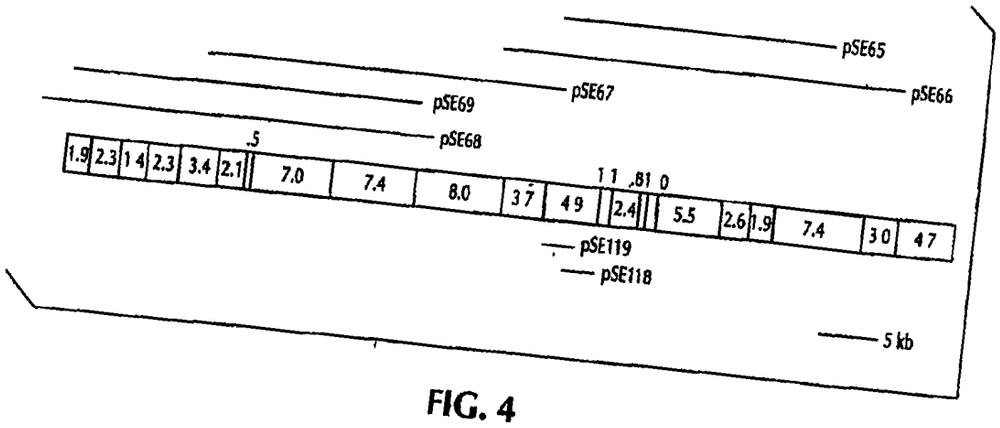


FIG. 4

187

188

PETICIÓN PEDRO MORENO
INGENIEROS Y ALEMAN
c/ [illegible], 113
Telé 519 59 90 - MADRID

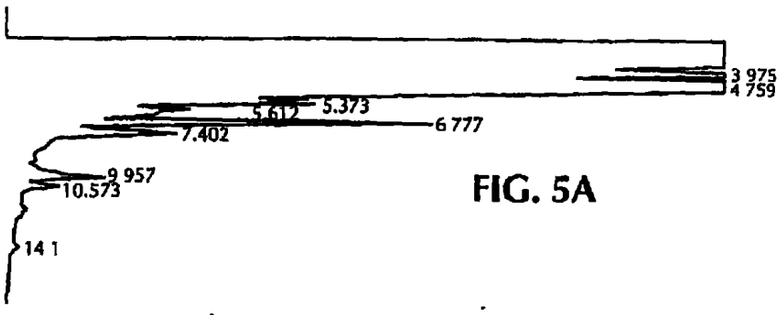


FIG. 5A

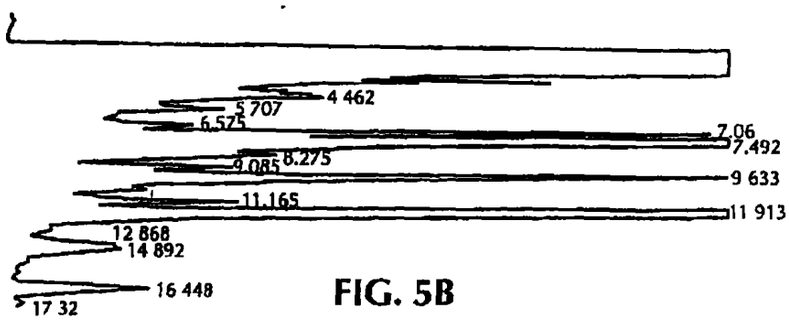


FIG. 5B

188

PETI... MORENO
...NGELES Y ALEMAN
c/ Cartagena, 113
Telef. 519 69 90 - MADRID

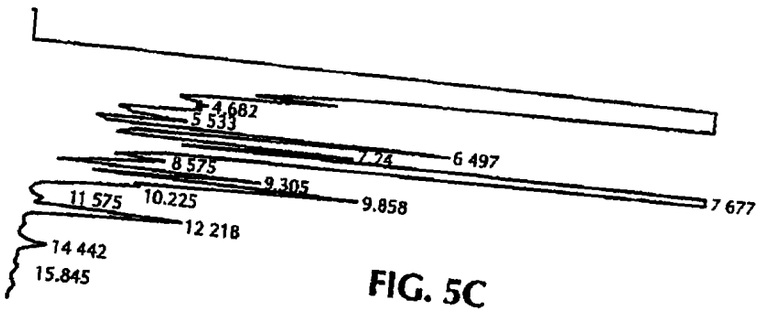


FIG. 5C

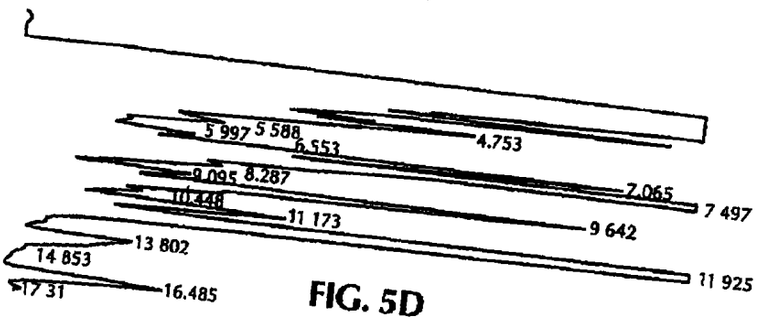


FIG. 5D

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

FIG. 6

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

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

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

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

           151                                                           200
 S. ave    LCSKALGWIK ARRPAWRTWR 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 WYQFFVYQAV GSGLVCCMLG SLRFFRDERD ESWVERGAWR
 S. gri    LPTVTLWRGA WYRAR----- ---------- ---------- ----------
 S. hyg    VPELTIWSGH WYQFPLYQMV ASALPGASLG AARHFRNRRG ETCLESGAAL
Cons       lPevTlWsG- WYqfp-yq-v -s-l----lg --r-fr--r- e---e-ga--

           251                                                           300
 S. ave    LPQRAANWAR PLAVVGGVNA VMPLYT...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
```

PATENTES ELZABURU
ING. ... V. EL AIAN
c/ Cortidgena, 113
Teléf. 91 559 90 - MADRID

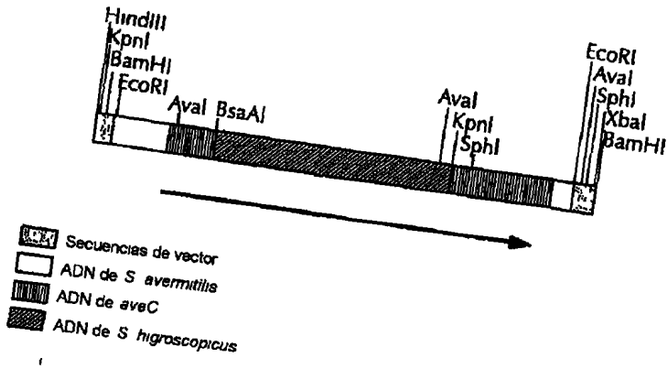


FIG. 7

PATRICIA HOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 89 90 - MADRID

192

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Stutzman-Engwall, Kim J.
Chen, Yan
Gustafsson, Claes
Krebber, Anke
Minshull, Jeremy
Raillard, Sun Ai

<120> GEN DE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE LA RELACIÓN DE AVERMECTINAS B2:B1

<130> PC10650

<140> PC10650

<141> 1999-08-12

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1229

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1085)

<400> 1

PATRICIA HACH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c . Cartagena, 113
Telét. 519 69 90 - MADRID


```
tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaaccca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcacccg 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgctgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg    176
                                                          Val
                                                           1

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

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

PATRICIA HOGH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID


```
          20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PATRICIA HOOH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID


```
210                 215                 220                 225

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

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

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

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

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

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

atttgtgcat gggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

acactcctcg gttcagcgat catg                                        1229
```

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2

PATRICIA HOGH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

Val Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala
1 5 10 15

Tyr Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu
20 25 30

Thr Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp
35 40 45

Val Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala
50 55 60

Trp Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala

PATRICIA KUCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

65 70 75 80

Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met
85 90 95

Asn Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala
100 105 110

Val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro
115 120 125

Gly Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser
130 135 140

Ala Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys
145 150 155 160

Ala Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe
165 170 175

Phe Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser
180 185 190

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

Gly Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu
210 215 220

Val Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp
225 230 235 240

Glu Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala
245 250 255

Asn Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met
260 265 270

Phe Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln
275 280 285

Pro Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr
290 295 300

<210> 3

PATRICIA ROCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

198

<211> 1150

<212> ADN

<213> Streptomyces hygroscopicus

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(990)

<400> 3

PATRICIA MAIN MORENO
INGENIERO AGRONOMO
C/ Fernando, 113
Tels. 576 ... 90 - MADRID


```
gtcgacgaag aacggccgga ggccgtcggc cgaggccgata ccgtacgcgg cctgcgg      57

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

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

tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag    201
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
         35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

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

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Telef. 519 09 90 - MADRID


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

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

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

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

gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc   777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225                 230                 235                 240

aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg   825
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
                245                 250                 255

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

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

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

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

gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcct 1080

catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga 1140

gcggccgggg                                                        1150
```

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Telef. 515 55 90 - MADRID

201

<210> 4

<211> 310

<212> PRT

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 4

PATRICIA MARIA MORENO
INGENIERO INDUSTRIAL
C/ Hermosilla, 113
Telef. 5186586 - MADRID

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

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

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

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

Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
85 90 95

Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
100 105 110

Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
115 120 125

Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser
130 135 140

Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met
145 150 155 160

Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
165 170 175

Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
180 185 190

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

Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
210 215 220

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID


```
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225                 230                 235                 240

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

Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala
            260                 265                 270

Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu
        275                 280                 285

Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
    290                 295                 300

Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
305                 310
```

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> Streptomyces griseochromogenes

<400> 5

PATRICIA HUGH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 89 90 - MADRID

Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val
1 5 10 15

Tyr Val Phe Ala Arg Trp Thr Ala Asp Gly Gly Tyr His Leu Ala Asp
20 25 30

Val Ser Gly Pro Asp Gly Arg Glu Pro Gly His Arg Arg Ile Ile Asp
35 40 45

Val Leu Leu Pro Ala Leu Ser Met Ala Gly Val Val Gly Leu Ala Phe
50 55 60

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

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

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

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

PATENTE ESPAÑOLA
INOUE Y DEL CAMPO
C. Velázquez, 113
Tels. 91 435 99 00 - MADRID

105

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

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

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

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

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

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 6

tcacgaaacc ggacacac 18

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 7

catgatcgct gaaccgag 18

<210> 8

<211> 20

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c'. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 8

ggtccggat gccgttctcg 20

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 9

aactccggtc gactccctt c 21

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 10

gcaaggatac ggggactac 19

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 11

gaaccgaccg cctgatac 18

<210> 12

<211> 43

<212> ADN

PATRICIA WOOK MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Telef. 519 09 90 - MADRID

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 12

ggggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gcccctggcg acg 43

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13

ggaaccgacc gcctgatata 20

<210> 14

<211> 46

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 14

ggggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc 46

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 15

ggaacatcac ggcattcacc 20

<210> 16

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 16

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

aacccatccg agccgctc 18

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 17

tcggcctgcc aacgaac 17

<210> 18

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 18

ccaacgaacg tgtagtag 18

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 19

tgcaggcgta cgtgttcagc 20

<210> 20

<211> 17

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 20

catgatcgct gaaccga 17

<210> 21

PATENTES HOSH MORENO
INGENIEROS Y ALEMAN
c/ Fresagena, 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 21

catgatcgct gaaccgagga 20

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 22

aggagtgtgg tgcgtctgga 20

<210> 23

<211> 19

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 23

cttcaggtgt acgtgttcg 19

<210> 24

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 24

gaactggtac cagtgccc 18

<210> 25

<211> 46

<212> ADN

PATENTES VON MOHRENU
INGENIEROS Y ABOGADOS
C/ Velazquez, 113
Telef. 91 [illegible] - MADRID

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 25

ggggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc 46

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

Doña PATRICIA KOCH MORENO, intérprete jurado de inglés y alemán, certifica que la adjunta es traducción fiel y completa al español del documento adjunto redactado en inglés.

En Madrid, a 24 JUL 2000

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

212
2

PA 229507

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 03, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: ***60/148,645***
FILING DATE: ***August 12, 1999***

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

H. PHILLIPS
Certifying Officer

Box 8Q

A/prov 2/3

744

Jc604 U.S. PTO 08/12/99

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET

Jc604 U.S. PTO 60/148645 08/12/99

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53 (b)(2).

	Docket Number	PC10650	Type a plus sign (+) inside this box
			+

INVENTOR(s)/APPLICANT(s)

LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)
Stutzman-Engwall	Kim	J	Groton, CT.
Chen	Yan		Redwood City, CA
Gustafsson	Claes		Redwood City, CA
Krebber	Anke		Redwood City, CA
Minshull	Jeremy		Redwood City, CA
Raillard	Sun Ai		Redwood City, CA

TITLE OF THE INVENTION *(280 characters max)*

Streptomyces avermitilis Gene Directing the Ratio of B2:B1 Avermectins

CORRESPONDENCE ADDRESS

Paul H. Ginsburg
Pfizer Inc
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755

ENCLOSED APPLICATION PARTS *(check all that apply)*

☒ Specification Number of Pages 64 ☒ Claim(s) Number of Pages 12

☒ Drawing(s) Number of Sheets 7 ☒ Other (specify) Abstract 1 page; Sequence Listing - 13 pages
1 computer diskette with Sequence Listing

METHOD OF PAYMENT *(check one)*

☐ A check or money order is enclosed to cover the Provisional filing fees ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge all required filing fees to, and credit any overpayment to Deposit Account Number: 16-1445. Two copies of this page are enclosed.	PROVISIONAL FILING FEE AMOUNT($)	$150.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.

☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

SIGNATURE Alan L. Koller DATE: August 12, 1999

TYPED or PRINTED NAME Alan L. Koller REGISTRATION NO: 37,371 *(if appropriate)*

☐ Additional inventors are being named on separately numbered sheets attached hereto.

EXPRESS MAIL NO. EL162814113US

Jc604 U.S. PTO 09/462780 08/12/99

214

STREPTOMYCES AVERMITILIS GENE DIRECTING THE RATIO OF B2:B1 AVERMECTINS

1. FIELD OF THE INVENTION

The present invention is directed to compositions and methods for producing avermectins, and is primarily in the field of animal health. More particularly, the present invention relates to polynucleotide molecules comprising nucleotide sequences encoding an AveC gene product, which can be used to modulate the ratio of class 2:1 avermectins produced by fermentation of cultures of *Streptomyces avermitilis*, and to compositions and methods for screening for such polynucleotide molecules. The present invention further relates to vectors, transformed host cells, and novel mutant strains of *S. avermitilis* in which the *aveC* gene has been mutated so as to modulate the ratio of class 2:1 avermectins produced.

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

2.1. Avermectins

Streptomyces species produce a wide variety of secondary metabolites, including the avermectins, which comprise a series of eight related sixteen-membered macrocyclic lactones having potent anthelmintic and insecticidal activity. The eight distinct but closely related compounds are referred to as A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a and B2b. The "a" series of compounds refers to the natural avermectin where the substituent at the C25 position is (S)-sec-butyl, and the "b" series refers to those compounds where the substituent at the C25 position is isopropyl. The designations "A" and "B" refer to avermectins where the substituent at the C5 position is methoxy and hydroxy, respectively. The numeral "1" refers to avermectins where a double bond is present at the C22,23 position, and the numeral "2" refers to avermectins having a hydrogen at the C22 position and a hydroxy at the C23 position. Among the related avermectins, the B1 type of avermectin is recognized as having the most effective antiparasitic and pesticidal activity, and is therefore the most commercially desirable avermectin.

The avermectins and their production by aerobic fermentation of strains of *S. avermitilis* are described in United States Patents 4,310,519 and 4,429,042. The biosynthesis of natural avermectins is believed to be initiated endogenously from the CoA thioester analogs of isobutyric acid and S-(+)-2-methyl butyric acid.

A combination of both strain improvement through random mutagenesis and the use of exogenously supplied fatty acids has led to the efficient production of avermectin analogs. Mutants of *S. avermitilis* that are deficient in branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (bkd

EXPRESS MAIL NO. EL162814113US

deficient mutants) can only produce avermectins when fermentations are supplemented with fatty acids. Screening and isolation of mutants deficient in branched-chain dehydrogenase activity (*e.g.*, *S. avermitilis*, ATCC 53567) are described in European Patent (EP) 276103. Fermentation of such mutants in the presence of exogenously supplied fatty acids results in production of only the four avermectins corresponding to the fatty acid employed. Thus, supplementing fermentations of *S. avermitilis* (ATCC 53567) with S-(+)-2-methylbutyric acid results in production of the natural avermectins A1a, A2a, B1a and B2a; supplementing fermentations with isobutyric acid results in production of the natural avermectins A1b, A2b, B1b, and B2b; and supplementing fermentations with cyclopentanecarboxylic acid results in the production of the four novel cyclopentylavermectins A1, A2, B1, and B2.

If supplemented with other fatty acids, novel avermectins are produced. By screening over 800 potential precursors, more than 60 other novel avermectins have been identified. (See, *e.g.*, Dutton *et al.*, 1991, J. Antibiot. 44:357-365; and Banks *et al.*, 1994, Roy. Soc. Chem. 147:16-26). In addition, mutants of *S. avermitilis* deficient in 5-O-methyltransferase activity produce essentially only the B analog avermectins. Consequently, *S. avermitilis* mutants lacking both branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and 5-O-methyltransferase activity produce only the B avermectins corresponding to the fatty acid employed to supplement the fermentation. Thus, supplementing such double mutants with S-(+)-2-methylbutyric acid results in production of only the natural avermectins B1a and B2a, while supplementing with isobutyric acid or cyclopentanecarboxylic acid results in production of the natural avermectins B1b and B2b or the novel cyclopentyl B1 and B2 avermectins, respectively. Supplementation of the double mutant strain with cyclohexane carboxylic acid is a preferred method for producing the commercially important novel avermectin, cyclohexylavermectin B1 (doramectin). The isolation and characteristics of such double mutants, *e.g.*, *S. avermitilis* (ATCC 53692), is described in EP 276103.

2.2. Genes Involved in Avermectin Biosynthesis

In many cases, genes involved in production of secondary metabolites and genes encoding a particular antibiotic are found clustered together on the chromosome. Such is the case, *e.g.*, with the *Streptomyces* polyketide synthase gene cluster (PKS) (see Hopwood and Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:37-66). Thus, one strategy for cloning genes in a biosynthetic pathway has been to isolate a drug resistance gene and then test adjacent regions of the chromosome for other genes related to the biosynthesis of that particular antibiotic. Another strategy for cloning genes involved in the biosynthesis of important metabolites has been complementation of mutants. For example, portions of a DNA library

WO 96/25495 PCT/US96/02180

from an organism capable of producing a particular metabolite are introduced into a non-producing mutant and transformants screened for production of the metabolite. Additionally, hybridization of a library using probes derived from other *Streptomyces* species has been used to identify and clone genes in biosynthetic pathways.

Genes involved in avermectin biosynthesis (*ave* genes), like the genes required for biosynthesis of other *Streptomyces* secondary metabolites (*e.g.*, PKS), are found clustered on the chromosome. A number of *ave* genes have been successfully cloned using vectors to complement *S. avermitilis* mutants blocked in avermectin biosynthesis. The cloning of such genes is described in U.S. Patent 5,252,474. In addition, Ikeda *et al.*, 1995, *J. Antibiot.* 48:532-534, describes the localization of a chromosomal region involving the C22,23 dehydration step (*aveC*) to a 4.82 Kb *Bam*HI fragment of *S. avermitilis*, as well as mutations in the *aveC* gene that result in the production of a single component B2a producer. Since ivermectin, a potent anthelmintic compound, can be produced chemically from avermectin B2a, such a single component producer of avermectin B2a is considered particularly useful for commercial production of ivermectin.

Identification of mutations in the *aveC* gene that minimize the complexity of avermectin production, such as, *e.g.*, mutations that decrease the B2:B1 ratio of avermectins, would simplify production and purification of commercially important avermectins.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides an isolated polynucleotide molecule comprising the complete *aveC* ORF of *S. avermitilis* or a substantial portion thereof, which isolated polynucleotide molecule lacks the next complete ORF that is located downstream from the aveC ORF *in situ* in the *S. avermitilis* chromosome. The isolated polynucleotide molecule of the present invention preferably comprises a nucleotide sequence that is the same as the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or that is the same as the nucleotide sequence of the *aveC* ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1), or substantial portion thereof. The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or a degenerate variant thereof.

The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule having a nucleotide sequence that is homologous to the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or to the nucleotide sequence of the *aveC* ORF presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or substantial portion thereof.

The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a polypeptide having an amino acid sequence that is homologous to the amino acid sequence encoded by the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or the amino acid sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:2) or substantial portion thereof.

The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding an AveC homolog gene product. In a preferred embodiment, the isolated polynucleotide molecule comprises a nucleotide sequence encoding the AveC homolog gene product from *S. hygroscopicus*, which homolog gene product comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or a substantial portion thereof. In a preferred embodiment, the isolated polynucleotide molecule of the present invention that encodes the *S. hygroscopicus* AveC homolog gene product comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 or a substantial portion thereof.

The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that is homologous to the *S. hygroscopicus* nucleotide sequence of SEQ ID NO:3. The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a polypeptide that is homologous to the *S. hygroscopicus* AveC homolog gene product having the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

The present invention further provides oligonucleotides that hybridize to a polynucleotide molecule having the nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or SEQ ID NO:3, or to a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence which is the complement of the nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or SEQ ID NO:3.

The present invention further provides recombinant cloning vectors and expression vectors that are useful in cloning or expressing a polynucleotide of the present invention including polynucleotide molecules comprising the *aveC* ORF of *S. avermitilis* or an *aveC* homolog ORF. In a non-limiting embodiment, the present invention provides plasmid pSE186 (ATCC 209604), which comprises the entire ORF of the *aveC* gene of *S. avermitilis*. The present invention further provides transformed host cells comprising a polynucleotide molecule or recombinant vector of the invention, and novel strains or cell lines derived therefrom.

The present invention further provides a recombinantly expressed AveC gene product or AveC homolog gene product, or a substantial portion thereof, that has been substantially purified or isolated, as well as homologs thereof. The present invention further provides a method for producing a recombinant AveC gene product, comprising culturing a host cell

transformed with a recombinant expression vector, said recombinant expression vector comprising a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence encoding an AveC gene product or AveC homolog gene product, which polynucleotide molecule is in operative association with one or more regulatory elements that control expression of the polynucleotide molecule in the host cell, under conditions conducive to the production of the recombinant AveC gene product or AveC homolog gene product, and recovering the AveC gene product or AveC homolog gene product from the cell culture.

The present invention further provides a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that is otherwise the same as the *S. avermitilis* AveC allele, or the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or a degenerate variant thereof, or the nucleotide sequence of the *aveC* ORF of *S. avermitilis* as presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or a degenerate variant thereof, but that further comprises one or more mutations, so that cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 in which the wild-type *aveC* allele has been inactivated and that express the polynucleotide molecule comprising the mutated nucleotide sequence produce a different ratio or amount of avermectins than are produced by cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 that instead express only the wild-type *aveC* allele. According to the present invention, such polynucleotide molecules can be used to produce novel strains of *S. avermitilis* that exhibit a detectable change in avermectin production compared to the same strain that instead expresses only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, such polynucleotide molecules are useful to produce novel strains of *S. avermitilis* that produce avermectins in a reduced class 2:1 ratio compared to that from the same strain that instead expresses only the wild-type *aveC* allele. In a further preferred embodiment, such polynucleotide molecules are useful to produce novel strains of *S. avermitilis* that produce increased levels of avermectins compared to the same strain that instead expresses only a single wild-type *aveC* allele. In a further preferred embodiment, such polynucleotide molecules are useful to produce novel strains of *S. avermitilis* in which the *aveC* gene has been inactivated.

The present invention provides methods for identifying mutations of the *aveC* ORF of *S. avermitilis* capable of altering the ratio and/or amount of avermectins produced. In a preferred embodiment, the present invention provides a method for identifying mutations of the *aveC* ORF capable of altering the class 2:1 ratio of avermectins produced, comprising: (a) determining the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* in which the *aveC* allele native thereto has been inactivated, and into which a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a mutated AveC gene product has been

6521830 "5014965"

introduced and is being expressed; (b) determining the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of the same strain of *S. avermitilis* as in step (a) but which instead express only the wild-type *aveC* allele or the ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or a nucleotide sequence that is homologous thereto; and (c) comparing the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) to the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b); such that if the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) is different from the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b), then a mutation of the *aveC* ORF capable of altering the class 2:1 ratio of avermectins has been identified. In a preferred embodiment, the class 2:1 ratio of avermectins is reduced by the mutation.

In a further preferred embodiment, the present invention provides a method for identifying mutations of the *aveC* ORF or genetic constructs comprising the *aveC* ORF capable of altering the amount of avermectins produced, comprising: (a) determining the amount of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* in which the *aveC* allele native thereto has been inactivated, and into which a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a mutated AveC gene product or comprising a genetic construct comprising a nucleotide sequence encoding an AveC gene product has been introduced and is being expressed; (b) determining the amount of avermectins produced by cells of the same strain of *S. avermitilis* as in step (a) but which instead express only a single *aveC* allele having the nucleotide sequence of the ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or a nucleotide sequence that is homologous thereto; and (c) comparing the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) to the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b); such that if the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) is different from the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b), then a mutation of the *aveC* ORF or a genetic construct capable of altering the amount of avermectins has been identified. In a preferred embodiment, the amount of avermectins produced is increased by the mutation.

The present invention further provides recombinant vectors that are useful for making novel strains of *S. avermitilis* having altered avermectin production. For example, the present invention provides vectors that can be used to target any of the polynucleotide molecules comprising the mutated nucleotide sequences of the present invention to the site of the *aveC* gene of the *S. avermitilis* chromosome to either insert into or replace the *aveC* allele or ORF or a portion thereof by homologous recombination. According to the present invention, however, a polynucleotide molecule comprising a mutated nucleotide sequence of the present

5621804 54994T09

invention provided herewith can also function to modulate avermectin biosynthesis when inserted into the *S. avermitilis* chromosome at a site other than at the *aveC* gene, or when maintained episomally in *S. avermitilis* cells. Thus, the present invention also provides vectors comprising a polynucleotide molecule comprising a mutated nucleotide sequence of the present invention, which vectors can be used to insert the polynucleotide molecule at a site in the *S. avermitilis* chromosome other than at the *aveC* gene, or to be maintained episomally. In a preferred embodiment, the present invention provides gene replacement vectors that can be used to insert a mutated *aveC* allele into the *S. avermitilis* chromosome to generate novel strains of cells that produce avermectins in a reduced class 2:1 ratio compared to the cells of the same strain which instead express only the wild-type *aveC* allele.

The present invention further provides methods for making novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that express a mutated *aveC* allele and that produce altered ratios and/or amounts of avermectins compared to cells of the same strain of *S. avermitilis* that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the present invention provides a method for making novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that express a mutated *aveC* allele and that produce an altered class 2:1 ratio of avermectins compared to cells of the same strain of *S. avermitilis* that instead express only a wild-type *aveC* allele, comprising transforming cells of a strain of *S. avermitilis* with a vector that carries a mutated *aveC* allele that encodes a gene product that alters the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated allele compared to cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele, and selecting transformed cells that produce avermectins in an altered class 2:1 ratio compared to the class 2:1 ratio produced by cells of the strain that instead express the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the class 2:1 ratio of avermectins produced is reduced in cells of the novel strain.

In a further preferred embodiment, the present invention provides a method for making novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that produce altered amounts of avermectin, comprising transforming cells of a strain of *S. avermitilis* with a vector that carries a mutated *aveC* allele or a genetic construct comprising the *aveC* allele, the expression of which results in an altered amount of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated *aveC* allele or genetic construct as compared to cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele, and selecting transformed cells that produce avermectins in an altered amount compared to the amount of avermectins produced by cells of the strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a

6217803 - 054845 - 04 TO 09

preferred embodiment, the amount of avermectins produced is increased in cells of the novel strain.

In a further preferred embodiment, the present invention provides a method for making novel strains of *S. avermitilis*, the cells of which comprise an inactivated *aveC* allele, comprising transforming cells of a strain of *S. avermitilis* that express any *aveC* allele with a vector that inactivates the *aveC* allele, and selecting transformed cells in which the *aveC* allele has been inactivated.

The present invention further provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that have been transformed with any of the polynucleotide molecules or vectors comprising a mutated nucleotide sequence of the present invention. In a preferred embodiment, the present invention provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells which express a mutated *aveC* allele in place of, or in addition to, the wild-type *aveC* allele, wherein the cells of the novel strain produce avermectins in an altered class 2:1 ratio compared to cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a more preferred embodiment, the cells of the novel strain produce avermectins in a reduced class 2:1 ratio compared to cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. Such novel strains are useful in the large-scale production of commercially desirable avermectins such as doramectin.

In a further preferred embodiment, the present invention provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells which express a mutated *aveC* allele, or a genetic construct comprising the *aveC* allele, in place of, or in addition to, the *aveC* allele native thereto, which results in the production by the cells of an altered amount of avermectins compared to the amount of avermectins produced by cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the novel cells produce an increased amount of avermectins.

In a further preferred embodiment, the present invention provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells in which the *aveC* gene has been inactivated. Such strains are useful both for the different spectrum of avermectins that they produce compared to the wild-type strain, and in complementation screening assays as described herein, to determine whether targeted or random mutagenesis of the *aveC* gene affects avermectin production.

The present invention further provides a process for producing avermectins, comprising culturing cells of a strain of *S. avermitilis*, which cells express a mutated *aveC* allele that encodes a gene product that alters the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated *aveC* allele compared to cells of the

same strain which do not express the mutated *aveC* allele but instead express only the wild-type *aveC* allele, in culture media under conditions that permit or induce the production of avermectins therefrom, and recovering said avermectins from the culture. In a preferred embodiment, the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells expressing the mutation is reduced. This process provides increased efficiency in the production of commercially valuable avermectins such as doramectin.

The present invention further provides a process for producing avermectins, comprising culturing cells of a strain of *S. avermitilis*, which cells express a mutated *aveC* allele or a genetic construct comprising an *aveC* allele that results in the production of an altered amount of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated *aveC* allele or genetic construct compared to cells of the same strain which do not express the mutated *aveC* allele or genetic construct but instead express only the wild-type *aveC* allele, in culture media under conditions that permit or induce the production of avermectins therefrom, and recovering said avermectins from the culture. In a preferred embodiment, the amount of avermectins produced by cells expressing the mutation or genetic construct is increased.

The present invention further provides a novel composition of avermectins produced by a strain of *S. avermitilis* expressing a mutated *aveC* allele of the present invention, wherein the avermectins are produced in a reduced class 2:1 ratio as compared to the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of the same strain of *S. avermitilis* that do not express the mutated *aveC* allele but instead express only the wild-type *aveC* allele. The novel avermectin composition can be present as produced in fermentation culture fluid, or can be harvested therefrom, and can be partially or substantially purified therefrom.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGURE 1. DNA sequence (SEQ ID NO:1) comprising the *S. avermitilis aveC* ORF, and deduced amino acid sequence (SEQ ID NO:2).

FIGURE 2. Plasmid vector pSE186 (ATCC 209604) comprising the entire ORF of the *aveC* gene of *S. avermitilis*.

FIGURE 3. Gene replacement vector pSE180 (ATCC 209605) comprising the *ermE* gene of *Sacc. erythraea* inserted into the *aveC* ORF of *S. avermitilis*.

FIGURE 4. *Bam*HI restriction map of the avermectin polyketide synthase gene cluster from *S. avermitilis* with five overlapping cosmid clones identified (*i.e.*, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). The relationship of pSE118 and pSE119 is also indicated.

FIGURE 5. HPLC analysis of fermentation products produced by *S. avermitilis* strains. Peak quantitation was performed by comparison to standard quantities of cyclohexyl B1. Cyclohexyl B2 retention time was 7.4-7.7 min; cyclohexyl B1 retention time was 11.9-12.3 min. FIG. 5A. *S. avermitilis* strain SE180-11 with an inactivated *aveC* ORF. FIG. 5B. *S. avermitilis* strain SE180-11 transformed with pSE186 (ATCC 209604). FIG. 5C. *S. avermitilis* strain SE180-11 transformed with pSE187. FIG. 5D. *S. avermitilis* strain SE180-11 transformed with pSE188.

FIGURE 6. Comparison of deduced amino acid sequences encoded by the *aveC* ORF of *S. avermitilis* (SEQ ID NO:2), an *aveC* homolog partial ORF from *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO:5), and the *aveC* homolog ORF from *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO:4). The valine residue in bold is the putative start site for the protein. Conserved residues are shown in capital letters for homology in all three sequences and in lower case letters for homology in 2 of the 3 sequences. The amino acid sequences contain approximately 50% sequence identity.

FIGURE 7. Hybrid plasmid construct containing a 564 bp *BsaAI/KpnI* fragment from the *S. hygroscopicus aveC* homolog gene inserted into the *BsaAI/KpnI* site in the *S. avermitilis aveC* ORF.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to the identification and characterization of polynucleotide molecules having nucleotide sequences that encode the AveC gene product from *Streptomyces avermitilis*, the construction of novel strains of *S. avermitilis* that can be used to screen mutated AveC gene products for their effect on avermectin production, and the discovery that certain mutated AveC gene products can reduce the ratio of B2:B1 avermectins produced by *S. avermitilis*. By way of example, the invention is described in the sections below for a polynucleotide molecule having either a nucleotide sequence that is the same as the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or the nucleotide sequence of the ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1), and for polynucleotides molecules having mutated nucleotide sequences derived therefrom and degenerate variants thereof. However, the principles set forth in the present invention can be analogously applied to other polynucleotide molecules, including *aveC* homolog genes from other *Streptomyces* species including, *e.g.*, *S. hygroscopicus* and *S. griseochromogenes*, among others.

5.1. Polynucleotide Molecules Encoding The *S. avermitilis* AveC Gene Product

The present invention provides an isolated polynucleotide molecule comprising the complete *aveC* ORF of *S. avermitilis* or a substantial portion thereof, which isolated polynucleotide molecule lacks the next complete ORF that is located downstream from the aveC ORF *in situ* in the *S. avermitilis* chromosome.

The isolated polynucleotide molecule of the present invention preferably comprises a nucleotide sequence that is the same as the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or that is the same as the nucleotide sequence of the ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or substantial portion thereof. As used herein, a "substantial portion" of an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding the *S. avermitilis* AveC gene product means an isolated polynucleotide molecule comprising at least about 70% of the complete *aveC* ORF sequence shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1), and that encodes a functionally equivalent AveC gene product. In this regard, a "functionally equivalent" AveC gene product is defined as a gene product that, when expressed in *S. avermitilis* strain ATCC 53692 in which the native *aveC* allele has been inactivated, results in the production of substantially the same ratio and amount of avermectins as produced by *S. avermitilis* strain ATCC 53692 which instead expresses only the wild-type, functional *aveC* allele native to *S. avermitilis* strain ATCC 53692.

In addition to the nucleotide sequence of the *aveC* ORF, the isolated polynucleotide molecule of the present invention can further comprise nucleotide sequences that naturally flank the *aveC* gene *in situ* in *S. avermitilis*, such as those flanking nucleotide sequences shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1).

The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or a degenerate variant thereof.

As used herein, the terms "polynucleotide molecule," "polynucleotide sequence," "coding sequence," "open-reading frame," and "ORF" are intended to refer to both DNA and RNA molecules, which can either be single-stranded or double-stranded, and that can be transcribed and translated (DNA), or translated (RNA), into an AveC gene product or, as described below, into an AveC homolog gene product, or into a polypeptide that is homologous to an AveC gene product or AveC homolog gene product in an appropriate host cell expression system when placed under the control of appropriate regulatory elements. A coding sequence can include but is not limited to prokaryotic sequences, cDNA sequences, genomic DNA sequences, and chemically synthesized DNA and RNA sequences.

The nucleotide sequence shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) comprises four different GTG codons at bp positions 42, 174, 177 and 180. As described in Section 9 below, multiple

deletions of the 5' region of the *aveC* ORF (FIGURE 1; SEQ ID NO:1) were constructed to help define which of these codons could function in the *aveC* ORF as start sites for protein expression. Deletion of the first GTG site at bp 42 did not eliminate AveC activity. Additional deletion of all of the GTG codons at bp positions 174, 177 and 180 together eliminated AveC activity, indicating that this region is necessary for protein expression. The present invention thus encompasses variable length *aveC* ORFs.

The present invention further provides a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence that is homologous to the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or to the nucleotide sequence of the *aveC* ORF presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or substantial portion thereof. The term "homologous" when used to refer to a polynucleotide molecule that is homologous to an *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence means a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence: (a) that encodes the same AveC gene product as the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or that encodes the same AveC gene product as the nucleotide sequence of the *aveC* ORF presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1), but that includes one or more silent changes to the nucleotide sequence according to the degeneracy of the genetic code (*i.e.*, a degenerate variant); or (b) that hybridizes to the complement of a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence encoded by the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or that encodes the amino acid sequence shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:2) under moderately stringent conditions, *i.e.*, hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M $NaHPO_4$, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C (see Ausubel *et al.* (eds.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3), and encodes a functionally equivalent AveC gene product as defined above. In a preferred embodiment, the homologous polynucleotide molecule hybridizes to the complement of the AveC gene product-encoding nucleotide sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or to the complement of the nucleotide sequence of the *aveC* ORF presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or substantial portion thereof under highly stringent conditions, *i.e.*, hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M $NaHPO_4$, 7% SDS, 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C (Ausubel *et al.*, 1989, above), and encodes a functionally equivalent AveC gene product as defined above.

The activity of an AveC gene product and potential functional equivalents thereof can be determined through HPLC analysis of fermentation products, as described in the examples

90148945 081205

below. Polynucleotide molecules having nucleotide sequences that encode functional equivalents of the *S. avermitilis* AveC gene product include naturally occurring *aveC* genes present in other strains of *S. avermitilis*, *aveC* homolog genes present in other species of *Streptomyces*, and mutated *aveC* alleles, whether naturally occurring or engineered.

The present invention further provides a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a polypeptide having an amino acid sequence that is homologous to the amino acid sequence encoded by the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or the amino acid sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:2) or substantial portion thereof. As used herein, a "substantial portion" of the amino acid sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:2) means a polypeptide comprising at least about 70% of the amino acid sequence shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:2), and that constitutes a functionally equivalent AveC gene product, as defined above.

As used herein to refer to amino acid sequences that are homologous to the amino acid sequence of an AveC gene product from *S. avermitilis*, the term "homologous" refers to a polypeptide which otherwise has the amino acid sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:2), but in which one or more amino acid residues has been conservatively substituted with a different amino acid residue, wherein said amino acid sequence has at least about 70%, more preferably at least about 80%, and most preferably at least about 90% amino acid sequence identity to the polypeptide encoded by the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or the amino acid sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:2) as determined by any standard amino acid sequence identity algorithm, such as the BLASTP algorithm (GENBANK, NCBI), and where such conservative substitution results in a functionally equivalent gene product, as defined above. Conservative amino acid substitutions are well known in the art. Rules for making such substitutions include those described by Dayhof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., Vol. 5, Sup. 3, among others. More specifically, conservative amino acid substitutions are those that generally take place within a family of amino acids that are related in the acidity or polarity. Genetically encoded amino acids are generally divided into four groups: (1) acidic = aspartate, glutamate; (2) basic = lysine, arginine, histidine; (3) non-polar = alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan; and (4) uncharged polar = glycine, asparagine, glutamine, cysteine, serine, threonine, tyrosine. Phenylalanine, tryptophan and tyrosine are also jointly classified as aromatic amino acids. One or more replacements within any particular group, *e.g.*, of a leucine with an isoleucine or valine, or of an aspartate with a glutamate, or of a threonine with a serine, or of any other amino acid

6621803 5th3hT09

residue with a structurally related amino acid residue, *e.g.*, an amino acid residue with similar acidity or polarity, or with similarity in some combination thereof, will generally have an insignificant effect on the function of the polypeptide.

The present invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding an AveC homolog gene product. As used herein, an "AveC homolog gene product" is defined as a gene product having at least about 50% amino acid sequence identity to an AveC gene product of *S. avermitilis* comprising the amino acid sequence encoded by the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or the amino acid sequence shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:2), as determined by any standard amino acid sequence identity algorithm, such as the BLASTP algorithm (GENBANK, NCBI). In a non-limiting embodiment the AveC homolog gene product is from *S. hygroscopicus*, (described in EP application 0298423; deposit FERM BP-1901) and comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, or a substantial portion thereof. A "substantial portion" of the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 means a polypeptide comprising at least about 70% of the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, and that constitutes a functionally equivalent AveC homolog gene product. A "functionally equivalent" AveC homolog gene product is defined as a gene product that, when expressed in *S. hygroscopicus* strain FERM BP-1901 in which the native *aveC* homolog allele has been inactivated, results in the production of substantially the same ratio and amount of milbemycins as produced by *S. hygroscopicus* strain FERM BP-1901 expressing instead only the wild-type, functional *aveC* homolog allele native to *S. hygroscopicus* strain FERM BP-1901. In a non-limiting embodiment, the isolated polynucleotide molecule of the present invention that encodes the *S. hygroscopicus* AveC homolog gene product comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 or a substantial portion thereof. In this regard, a "substantial portion" of the isolated polynucleotide molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 means an isolated polynucleotide molecule comprising at least about 70% of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, and that encodes a functionally equivalent AveC homolog gene product, as defined immediately above.

The present invention further provides a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that is homologous to the *S. hygroscopicus* nucleotide sequence of SEQ ID NO:3. The term "homologous" when used to refer to a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that is homologous to the *S. hygroscopicus* AveC homolog gene product-encoding sequence of SEQ ID NO:3 means a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence: (a) that encodes the same gene product as the nucleotide sequence of

SEQ ID NO:3, but that includes one or more silent changes to the nucleotide sequence according to the degeneracy of the genetic code (*i.e.*, a degenerate variant); or (b) that hybridizes to the complement of a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, under moderately stringent conditions, *i.e.*, hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M $NaHPO_4$, 7% SDS, 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C (see Ausubel *et al.* above), and encodes a functionally equivalent AveC homolog gene product as defined above. In a preferred embodiment, the homologous polynucleotide molecule hybridizes to the complement of the AveC homolog gene product-encoding nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, under highly stringent conditions, *i.e.*, hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M $NaHPO_4$, 7% SDS, 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C (Ausubel *et al.*, 1989, above), and encodes a functionally equivalent AveC homolog gene product as defined above.

The present invention further provides a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a polypeptide that is homologous to the *S. hygroscopicus* AveC homolog gene product. As used herein to refer to polypeptides that are homologous to the AveC homolog gene product of SEQ ID NO:4 from *S. hygroscopicus*, the term "homologous" refers to a polypeptide which otherwise has the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, but in which one or more amino acid residues has been conservatively substituted with a different amino acid residue as defined above, wherein said amino acid sequence has at least about 70%, more preferably at least about 80%, and most preferably at least about 90% amino acid sequence identity to the polypeptide of SEQ ID NO:4, as determined by any standard amino acid sequence identity algorithm, such as the BLASTP algorithm (GENBANK, NCBI), and where such conservative substitution results in a functionally equivalent AveC homolog gene product, as defined above.

The present invention further provides oligonucleotides that hybridize to a polynucleotide molecule having the nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or SEQ ID NO:3, or to a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence which is the complement of the nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or SEQ ID NO:3. Such oligonucleotides are at least about 10 nucleotides in length, and preferably from about 15 to about 30 nucleotides in length, and hybridize to one of the aforementioned polynucleotide molecules under highly stringent conditions, *i.e.*, washing in 6xSSC/0.5% sodium pyrophosphate at ~37°C for ~14-base oligos, at ~48°C for ~17-base oligos, at ~55°C for ~20-base oligos, and at ~60°C for ~23-base oligos. In a preferred embodiment, the oligonucleotides are complementary to a portion of one of the aforementioned polynucleotide

05240.5935.US.00

molecules. These oligonucleotides are useful for a variety of purposes including to encode or act as antisense molecules useful in gene regulation, or as primers in amplification of *aveC*- or *aveC* homolog-encoding polynucleotide molecules.

Additional *aveC* homolog genes can be identified in other species or strains of *Streptomyces* using the polynucleotide molecules or oligonucleotides disclosed herein in conjunction with known techniques. For example, an oligonucleotide molecule comprising a portion of the *S. avermitilis* nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or a portion of the *S. hygroscopicus* nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 can be detectably labeled and used to screen a genomic library constructed from DNA derived from the organism of interest. The stringency of the hybridization conditions is selected based on the relationship of the reference organism, in this example *S. avermitilis* or *S. hygroscopicus*, to the organism of interest. Requirements for different stringency conditions are well known to those of skill in the art, and such conditions will vary predictably depending on the specific organisms from which the library and the labeled sequences are derived. Such oligonucleotides are preferably at least about 15 nucleotides in length and include, *e.g.*, those described in the examples below. Amplification of homolog genes can be carried out using these and other oligonucleotides by applying standard techniques such as the polymerase chain reaction (PCR), although other amplification techniques known in the art, *e.g.*, the ligase chain reaction, can also be used.

Clones identified as containing *aveC* homolog nucleotide sequences can be tested for their ability to encode a functional AveC homolog gene product. For this purpose, the clones can be subjected to sequence analysis in order to identify a suitable reading frame, as well as initiation and termination signals. Alternatively or additionally, the cloned DNA sequence can be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector that contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. Any of a variety of host/vector systems can be used as described below, including but not limited to bacterial systems such as plasmid, bacteriophage, or cosmid expression vectors. Appropriate host cells transformed with such vectors comprising potential *aveC* homolog coding sequences can then be analyzed for AveC-type activity using methods such as HPLC analysis of fermentation products, as described, *e.g.*, in Section 7, below.

Production and manipulation of the polynucleotide molecules disclosed herein are within the skill in the art and can be carried out according to recombinant techniques described, *e.g.*, in Maniatis, *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, et al., 1989, Current Protocols In

Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook, *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis *et al.* (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; and Erlich (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, New York, all of which are incorporated herein by reference. Polynucleotide clones encoding AveC gene products or AveC homolog gene products can be identified using any method known in the art, including but not limited to the methods set forth in Section 7, below. Genomic DNA libraries can be screened for *aveC* and *aveC* homolog coding sequences using techniques such as the methods set forth in Benton and Davis, 1977, Science 196:180, for bacteriophage libraries, and in Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:3961-3965, for plasmid libraries. Polynucleotide molecules having nucleotide sequences known to include the aveC ORF, as present, *e.g.*, in plasmid pSE186 (ATCC 209604), or in plasmid pSE119 (described in Section 7, below), can be used as probes in these screening experiments. Alternatively, oligonucleotide probes can be synthesized that correspond to nucleotide sequences deduced from partial or complete amino acid sequences of the purified AveC homolog gene product.

5.2. Recombinant Systems

5.2.1. Cloning And Expression Vectors

The present invention further provides recombinant cloning vectors and expression vectors which are useful in cloning or expressing polynucleotide molecules of the present invention comprising, *e.g.*, the *aveC* ORF of *S. avermitilis* or any *aveC* homolog ORFs. In a non-limiting embodiment, the present invention provides plasmid pSE186 (ATCC 209604), which comprises the complete ORF of the *aveC* gene of *S. avermitilis*.

All of the following description regarding the *aveC* ORF from *S. avermitilis*, or a polynucleotide molecule comprising the *aveC* ORF from *S. avermitilis* or portion thereof, or an *S. avermitilis* AveC gene product, also refers to aveC homologs and AveC homolog gene products, unless indicated explicitly or by context.

A variety of different vectors have been developed for specific use in *Streptomyces*, including phage, high copy number plasmids, low copy number plasmids, and *E.coli-Streptomyces* shuttle vectors, among others, and any of these can be used to practice the present invention. A number of drug resistance genes have also been cloned from *Streptomyces*, and several of these genes have been incorporated into vectors as selectable markers. Examples of current vectors for use in *Streptomyces* are presented, among other places, in Hutchinson, 1980, Applied Biochem. Biotech. 16:169-190.

5621780 5498705

231

Recombinant vectors of the present invention, particularly expression vectors, are preferably constructed so that the coding sequence for the polynucleotide molecule of the invention is in operative association with one or more regulatory elements necessary for transcription and translation of the coding sequence to produce a polypeptide. As used herein, the term "regulatory element" includes but is not limited to nucleotide sequences that encode inducible and non-inducible promoters, enhancers, operators and other elements known in the art that serve to drive and/or regulate expression of polynucleotide coding sequences. Also, as used herein, the coding sequence is in "operative association" with one or more regulatory elements where the regulatory elements effectively regulate and allow for the transcription of the coding sequence or the translation of its mRNA, or both.

Typical plasmid vectors that can be engineered to contain a polynucleotide molecule of the present invention include pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega), and the shuttle vector pWHM3 (Vara *et al.*, 1989, J. Bact. 171:5872-5881), among many others.

Methods are well-known in the art for constructing recombinant vectors containing particular coding sequences in operative association with appropriate regulatory elements, and these can be used to practice the present invention. These methods include *in vitro* recombinant techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. See, *e.g.*, the techniques described in Maniatis *et al.*, 1989, above; Ausubel *et al.*, 1989, above; Sambrook *et al.*, 1989, above; Innis et al., 1995, above; and Erlich, 1992, above.

The regulatory elements of these vectors can vary in their strength and specificities. Depending on the host/vector system utilized, any of a number of suitable transcription and translation elements can be used. Non-limiting examples of transcriptional regulatory regions or promoters for bacteria include the β-gal promoter, the T7 promoter, the TAC promoter, λ left and right promoters, trp and lac promoters, trp-lac fusion promoters and, more specifically for *Streptomyces*, the promoters *ermE*, *melC*, and *tipA*, *etc.* In a specific embodiment described in Section 11 below, an expression vector was generated that contained the *aveC* ORF cloned adjacent to the strong constitutive *ermE* promoter from *Saccharopolyspora erythraea*. The vector was transformed into *S. avermitilis*, and subsequent HPLC analysis of fermentation products indicated an increased titer of avermectins produced compared to production by the same strain but which instead expresses the wild-type *aveC* allele.

Fusion protein expression vectors can be used to express an AveC gene product-fusion protein. The purified fusion protein can be used to raise antisera against the AveC gene product, to study the biochemical properties of the AveC gene product, to engineer AveC fusion proteins with different biochemical activities, or to aid in the identification or

6027805 "54384 09

purification of the expressed AveC gene product. Possible fusion protein expression vectors include but are not limited to vectors incorporating sequences that encode β-galactosidase and trpE fusions, maltose-binding protein fusions, glutathione-S-transferase fusions and polyhistidine fusions (carrier regions). In an alternative embodiment, an AveC gene product or a portion thereof can be fused to an AveC homolog gene product, or portion thereof, derived from another species or strain of *Streptomyces*, such as, *e.g.*, *S. hygroscopicus* or *S. griseochromogenes*. In a particular embodiment described in Section 12, below, and depicted in FIGURE 7, a chimeric plasmid was constructed that contains a 564 bp region of the *S. hygroscopicus aveC* homolog ORF replacing a homologous 564 bp region of the *S. avermitilis aveC* ORF. Such hybrid vectors can be transformed into *S. avermitilis* cells and tested to determine their effect, *e.g.*, on the ratio of class 2:1 avermectin produced.

AveC fusion proteins can be engineered to comprise a region useful for purification. For example, AveC-maltose-binding protein fusions can be purified using amylose resin; AveC-glutathione-S-transferase fusion proteins can be purified using glutathione-agarose beads; and AveC-polyhistidine fusions can be purified using divalent nickel resin. Alternatively, antibodies against a carrier protein or peptide can be used for affinity chromatography purification of the fusion protein. For example, a nucleotide sequence coding for the target epitope of a monoclonal antibody can be engineered into the expression vector in operative association with the regulatory elements and situated so that the expressed epitope is fused to the AveC polypeptide. For example, a nucleotide sequence coding for the FLAG™ epitope tag (International Biotechnologies Inc.), which is a hydrophilic marker peptide, can be inserted by standard techniques into the expression vector at a point corresponding, *e.g.*, to the carboxyl terminus of the AveC polypeptide. The expressed AveC polypeptide-FLAG™ epitope fusion product can then be detected and affinity-purified using commercially available anti-FLAG™ antibodies.

The expression vector encoding the AveC fusion protein can also be engineered to contain polylinker sequences that encode specific protease cleavage sites so that the expressed AveC polypeptide can be released from the carrier region or fusion partner by treatment with a specific protease. For example, the fusion protein vector can include DNA sequences encoding thrombin or factor Xa cleavage sites, among others.

A signal sequence upstream from, and in reading frame with, the *aveC* ORF can be engineered into the expression vector by known methods to direct the trafficking and secretion of the expressed gene product. Non-limiting examples of signal sequences include those

6027803 - 5948445

from α-factor, immunoglobulins, outer membrane proteins, penicillinase, and T-cell receptors, among others.

To aid in the selection of host cells transformed or transfected with cloning or expression vectors of the present invention, the vector can be engineered to further comprise a coding sequence for a reporter gene product or other selectable marker. Such a coding sequence is preferably in operative association with the regulatory element coding sequences, as described above. Reporter genes that are useful in the invention are well-known in the art and include those encoding green fluorescent protein, luciferase, *xylE*, and tyrosinase, among others. Nucleotide sequences encoding selectable markers are well known in the art, and include those that encode gene products conferring resistance to antibiotics or anti-metabolites, or that supply an auxotrophic requirement. Examples of such sequences include those that encode resistance to erythromycin, thiostrepton or kanamycin, among many others.

5014854 5 081295

5.2.2. Transformation Of Host Cells

The present invention further provides transformed host cells comprising a polynucleotide molecule or recombinant vector of the invention, and novel strains or cell lines derived therefrom. Host cells useful in the practice of the invention are preferably *Streptomyces* cells, although other prokaryotic cells or eukaryotic cells can also be used. Such transformed host cells typically include but are not limited to microorganisms, such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA vectors, or yeast transformed with recombinant vectors, among others.

The polynucleotide molecules of the present invention are intended to function in *Streptomyces* cells, but can also be transformed into other bacterial or eukaryotic cells, *e.g.*, for cloning or expression purposes. A strain of *E. coli* can typically be used, such as, *e.g.*, the DH5α strain, available from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (Accession No. 31343), and from commercial sources (Stratagene). Preferred eukaryotic host cells include yeast cells, although mammalian cells or insect cells can also be utilized effectively.

The recombinant expression vector of the invention is preferably transformed or transfected into one or more host cells of a substantially homogeneous culture of cells. The expression vector is generally introduced into host cells in accordance with known techniques, such as, *e.g.*, by protoplast transformation, calcium phosphate precipitation, calcium chloride treatment, microinjection, electroporation, transfection by contact with a recombined virus, liposome-mediated transfection, DEAE-dextran transfection, transduction, conjugation, or

microprojectile bombardment. Selection of transformants can be conducted by standard procedures, such as by selecting for cells expressing a selectable marker, *e.g.*, antibiotic resistance, associated with the recombinant vector, as described above.

Once the expression vector is introduced into the host cell, the integration and maintenance of the *aveC* coding sequence either in the host cell chromosome or episomally can be confirmed by standard techniques, *e.g.*, by Southern hybridization analysis, restriction enzyme analysis, PCR analysis, including reverse transcriptase PCR (rt-PCR), or by immunological assay to detect the expected gene product. Host cells containing and/or expressing the recombinant *aveC* coding sequence can be identified by any of at least four general approaches which are well-known in the art, including: (i) DNA-DNA, DNA-RNA, or RNA-antisense RNA hybridization; (ii) detecting the presence of "marker" gene functions; (iii) assessing the level of transcription as measured by the expression of *aveC*-specific mRNA transcripts in the host cell; and (iv) detecting the presence of mature polypeptide product as measured, *e.g.*, by immunoassay or by the presence of AveC biological activity (*e.g.*, the production of specific ratios and amounts of avermectins indicative of AveC activity in, *e.g.*, *S. avermitilis* host cells).

5.2.3. Expression And Characterization Of A Recombinant AveC Gene Product

Once the *aveC* coding sequence has been stably introduced into an appropriate host cell, the transformed host cell is clonally propagated, and the resulting cells can be grown under conditions conducive to the maximum production of the AveC gene product. Such conditions typically include growing cells to high density. Where the expression vector comprises an inducible promoter, appropriate induction conditions such as, *e.g.*, temperature shift, exhaustion of nutrients, addition of gratuitous inducers (*e.g.*, analogs of carbohydrates, such as isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)), accumulation of excess metabolic by-products, or the like, are employed as needed to induce expression.

Where the expressed AveC gene product is retained inside the host cells, the cells are harvested and lysed, and the product isolated and purified from the lysate under extraction conditions known in the art to minimize protein degradation such as, *e.g.*, at 4°C, or in the presence of protease inhibitors, or both. Where the expressed AveC gene product is secreted from the host cells, the exhausted nutrient medium can simply be collected and the product isolated therefrom.

The expressed AveC gene product can be isolated or substantially purified from cell lysates or culture medium, as appropriate, using standard methods, including but not limited

to any combination of the following methods: ammonium sulfate precipitation, size fractionation, ion exchange chromatography, HPLC, density centrifugation, and affinity chromatography. Where the expressed AveC gene product exhibits biological activity, increasing purity of the preparation can be monitored at each step of the purification procedure by use of an appropriate assay. Whether or not the expressed AveC gene product exhibits biological activity, it can be detected as based, *e.g.*, on size, or reactivity with an antibody otherwise specific for AveC, or by the presence of a fusion tag. As used herein, an AveC gene product is "substantially purified" where the product constitutes more than about 20 wt% of the protein in a particular preparation. Also, as used herein, an AveC gene product is "isolated" where the product constitutes at least about 80 wt% of the protein in a particular preparation.

The present invention thus provides a recombinantly-expressed isolated or substantially purified *S. avermitilis* AveC gene product comprising the amino acid sequence encoded by the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604), or the amino acid sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO:2) or a substantial portion thereof, and homologs thereof.

The present invention further provides a recombinantly-expressed isolated or substantially purified *S. hygroscopicus* AveC homolog gene product comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or a substantial portion thereof, and homologs thereof.

The present invention further provides a method for producing an AveC gene product, comprising culturing a host cell transformed with a recombinant expression vector, said vector comprising a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence encoding the AveC gene product, which polynucleotide molecule is in operative association with one or more regulatory elements that control expression of the polynucleotide molecule in the host cell, under conditions conducive to the production of the recombinant AveC gene product, and recovering the AveC gene product from the cell culture.

The recombinantly expressed *S. avermitilis* AveC gene product is useful for a variety of purposes, including for screening compounds that alter AveC gene product function and thereby modulate avermectin biosynthesis, and for raising antibodies directed against the AveC gene product.

Once an AveC gene product of sufficient purity has been obtained, it can be characterized by standard methods, including by SDS-PAGE, size exclusion chromatography, amino acid sequence analysis, biological activity in producing appropriate products in the avermectin biosynthetic pathway, *etc.* For example, the amino acid sequence of the AveC

6521800 - 54-934-1009

gene product can be determined using standard peptide sequencing techniques. The AveC gene product can be further characterized using hydrophilicity analysis (see, *e.g.*, Hopp and Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 78:3824), or analogous software algorithms, to identify hydrophobic and hydrophilic regions of the AveC gene product. Structural analysis can be carried out to identify regions of the AveC gene product that assume specific secondary structures. Biophysical methods such as X-ray crystallography (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13), computer modelling (Fletterick and Zoller (eds), 1986, in: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), and nuclear magnetic resonance (NMR) can be used to map and study sites of interaction between the AveC gene product and its substrate. Information obtained from these studies can be used to select new sites for mutation in the *aveC* ORF to help develop new strains of *S. avermitilis* having more desirable avermectin production characteristics .

5.3. Construction And Use Of AveC Mutants

The present invention provides a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that is otherwise the same as the *S. avermitilis aveC* allele or a degenerate variant thereof, or the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or a degenerate variant thereof, or the nucleotide sequence of the *aveC* ORF of *S. avermitilis* as presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or a degenerate variant thereof, but that further comprises one or more mutations, so that cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 in which the wild-type *aveC* allele has been inactivated and that express the polynucleotide molecule comprising the mutated nucleotide sequence or the degenerate variant thereof produce a different ratio or amount of avermectins than are produced by cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 that instead express only the wild-type *aveC* allele.

According to the present invention, such polynucleotide molecules can be used to produce novel strains of *S. avermitilis* that exhibit a detectable change in avermectin production compared to the same strain which instead expresses only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, such polynucleotide molecules are useful to produce novel strains of *S. avermitilis* that produce avermectins in a reduced class 2:1 ratio compared to the same strain which instead expresses only the wild-type *aveC* allele. In a further preferred embodiment, such polynucleotide molecules are useful to produce novel strains of *S. avermitilis* that produce increased levels of avermectins compared to the same strain which instead expresses only a single wild-type *aveC* allele. In a further preferred embodiment, such polynucleotide molecules are useful to produce novel strains of *S. avermitilis* in which the *aveC* gene has been inactivated.

960260 - 5945 - 071

Mutations to the *aveC* allele or coding sequence include any mutations that introduce one or more amino acid deletions, additions, or substitutions into the AveC gene product, or that result in truncation of the AveC gene product, or any combination thereof, and that produce the desired result. Such mutated *aveC* allele sequences are also intended to include any degenerate variants thereof. For example, the present invention provides polynucleotide molecules comprising the nucleotide sequence of the *aveC* allele or a degenerate variant thereof, or the AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or a degenerate variant thereof, or the nucleotide sequence of the *aveC* ORF of *S. avermitilis* as present in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or a degenerate variant thereof, but that further comprise one or more mutations that encode the substitution of an amino acid residue with a different amino acid residue at selected positions in the AveC gene product. In several non-limiting embodiments, several of which are exemplified below, such substitutions can be carried out at any amino acid positions of the AveC gene product which correspond to amino acid positions 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 or 298 of SEQ ID NO:2, or some combination thereof.

Mutations to the *aveC* coding sequence are carried out by any of a variety of known methods, including by use of error-prone PCR, or by cassette mutagenesis. For example, oligonucleotide-directed mutagenesis can be employed to alter the sequence of the *aveC* allele or ORF in a defined way such as, *e.g.*, to introduce one or more restriction sites, or a termination codon, into specific regions within the *aveC* allele or ORF. Methods such as those described in U.S. Patent 5,605,793, U.S. Patent 5,830,721 and U.S. Patent 5,837,458, which involve random fragmentation, repeated cycles of mutagenesis, and nucleotide shuffling, can also be used to generate large libraries of polynucleotides having nucleotide sequences encoding *aveC* mutations.

Targeted mutations can be useful, particularly where they serve to alter one or more conserved amino acid residues in the AveC gene product. For example, a comparison of deduced amino acid sequences of AveC gene products and AveC homolog gene products from *S. avermitilis* (SEQ ID NO:2), *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO:5), and *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO:4), as presented in FIGURE 6, indicates sites of significant conservation of amino acid residues between these species. Targeted mutagenesis that leads to a change in one or more of these conserved amino acid residues can be particularly effective in producing novel mutant strains that exhibit desirable alterations in avermectin production.

09/674,505 PCT/US99/08948

Random mutagenesis can also be useful, and can be carried out by exposing cells of *S. avermitilis* to ultraviolet radiation or x-rays, or to chemical mutagens such as N-methyl-N'-nitrosoguanidine, ethyl methane sulfonate, nitrous acid or nitrogen mustards. See, *e.g.*, Ausubel, 1989, above, for a review of mutagenesis techniques.

Once mutated polynucleotide molecules are generated, they are screened to determine whether they can modulate avermectin biosynthesis in *S. avermitilis*. In a preferred embodiment, a polynucleotide molecule having a mutated nucleotide sequence is tested by complementing a strain of *S. avermitilis* in which the *aveC* gene has been inactivated to give an *aveC* negative (*aveC*⁻) background. In a non-limiting method, the mutated polynucleotide molecule is spliced into an expression plasmid in operative association with one or more regulatory elements, which plasmid also preferably comprises one or more drug resistance genes to allow for selection of transformed cells. This vector is then transformed into *aveC*⁻ host cells using known techniques, and transformed cells are selected and cultured in appropriate fermentation media under conditions that permit or induce avermectin production. Fermentation products are then analyzed by HPLC to determine the ability of the mutated polynucleotide molecule to complement the host cell. Several vectors bearing mutated polynucleotide molecules capable of reducing the B2:B1 ratio of avermectins, including pSE188, pSE199, pSE231, pSE239, and pSE290 through pSE297, are exemplified in Section 8.3, below.

The present invention provides methods for identifying mutations of the *S. avermitilis* *aveC* ORF capable of altering the ratio and/or amount of avermectins produced. In a preferred embodiment, the present invention provides a method for identifying mutations of the *aveC* ORF capable of altering the class 2:1 ratio of avermectins produced, comprising: (a) determining the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* in which the *aveC* allele native thereto has been inactivated, and into which a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a mutated AveC gene product has been introduced and is being expressed; (b) determining the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of the same strain of *S. avermitilis* as in step (a) but which instead express only a wild-type *aveC* allele or an aveC allele having the nucleotide sequence of the ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) or a nucleotide sequence that is homologous thereto; and (c) comparing the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) to the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b); such that if the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) is different from the class 2:1 ratio of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b), then a

5027805 4984109

mutation of the *aveC* ORF capable of altering the class 2:1 ratio of avermectins has been identified. In a preferred embodiment, the class 2:1 ratio of avermectins is reduced by the mutation.

In a further preferred embodiment, the present invention provides a method for identifying mutations of the *aveC* ORF or genetic constructs comprising the *aveC* ORF capable of altering the amount of avermectins produced, comprising: (a) determining the amount of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* in which the *aveC* allele native thereto has been inactivated, and into which a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a mutated AveC gene product or comprising a genetic construct comprising a nucleotide sequence encoding an AveC gene product has been introduced and is being expressed; (b) determining the amount of avermectins produced by cells of the same strain of *S. avermitilis* as in step (a) but which instead express only a wild-type *aveC* allele or a nucleotide sequence that is homologous thereto; and (c) comparing the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) to the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b); such that if the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (a) is different from the amount of avermectins produced by the *S. avermitilis* cells of step (b), then a mutation of the *aveC* ORF or a genetic construct capable of altering the amount of avermectins has been identified. In a preferred embodiment, the amount of avermectins produced is increased by the mutation.

Any of the aforementioned methods for identifying mutations are be carried out using fermentation culture media preferably supplemented with cyclohexane carboxylic acid, although other appropriate fatty acid precursors, such as any one of the fatty acid precursors listed in TABLE 1, can also used.

Once a mutated polynucleotide molecule that modulates avermectin production in a desirable direction has been identified, the location of the mutation in the nucleotide sequence can be determined. For example, a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence encoding a mutated AveC gene product can be isolated by PCR and subjected to DNA sequence analysis using known methods. By comparing the DNA sequence of the mutated *aveC* allele to that of the wild-type *aveC* allele, the mutation(s) responsible for the alteration in avermectin production can be determined. In specific though non-limiting embodiments of the present invention, *S. avermitilis* AveC gene products comprising either single amino acid substitutions at any of residues 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T), or 230 (G230D), or double substitutions at positions 138 (S138T) and 139 (A139T or A139F), yielded changes in AveC gene product function such that the ratio of class 2:1 avermectins produced was altered

(see Section 8, below), wherein the recited amino acid positions correspond to those presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:2). In addition, the following seven combinations of mutations have each been shown to effectively reduce the class 2:1 ratio of avermectins: (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. As used herein, the aforementioned designations, such as A139T, indicate the original amino acid residue by single letter designation, which in this example is alanine (A), at the indicated position, which in this example is position 139 (referring to SEQ ID NO:2) of the polypeptide, followed by the amino acid residue which replaces the original amino acid residue, which in this example is threonine (T). Accordingly, polynucleotide molecules having nucleotide sequences that encode mutated *S. avermitilis* AveC gene products comprising amino acid substitutions or deletions at one or more of amino acid positions 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 or 298 (see FIGURE 1), or any combination thereof, are encompassed by the present invention.

In a preferred embodiment, such mutations encode amino acid substitutions selected from one or more of the group consisting of:

(a) amino acid residue Q at position 38 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(b) amino acid residue D at position 48 replaced by E or by an amino acid that is a conservative substitution for E;

(c) amino acid residue A at position 89 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(d) amino acid residue F at position 99 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

(e) amino acid residue G at position 111 replaced by V or by an amino acid that is a conservative substitution for V;

(f) amino acid residue L at position 136 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(g) amino acid residue S at position 138 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(h) amino acid residue A at position 139 replaced by T or F, or by an amino acid that is a conservative substitution for T or F;

(i) amino acid residue K at position 154 replaced by E or by an amino acid that is a conservative substitution for E;

(j) amino acid residue G at position 179 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

(k) amino acid residue M at position 228 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(l) amino acid residue E at position 238 replaced by D or by an amino acid that is a conservative substitution for D;

(m) amino acid residue P at position 289 replaced by L or by an amino acid that is a conservative substitution for L; and

(n) amino acid residue Q at position 298 replaced by H or by an amino acid that is a conservative substitution for H;

wherein conservative amino acid substitutions are as defined above in Section 5.1.

In a further preferred embodiment, such mutations encode a combination of amino acid substitutions, wherein the combination of amino acid residues substituted is selected from the group consisting of:

(a) amino acid residues S138 and A139;

(b) amino acid residues D48 and A89;

(c) amino acid residues S138, A139 and G179;

(d) amino acid residues Q38, L136 and E238;

(e) amino acid residues F99, S138, A139 and G179;

(f) amino acid residues A139 and M228;

(g) amino acid residues G111 and P289; and

(h) amino acid residues A139, K154 and Q298.

In a further preferred embodiment, specific combinations of mutations in the *aveC* allele useful in effectively reducing the class 2:1 ratio of avermectins according to the present invention are selected from one or more of the group consisting of:

(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; and

(i) A139T/K154E/Q298H.

05218045.1

The present invention further provides compositions for making novel strains of *S. avermitilis*, the cells of which contain a mutated *aveC* allele that results in the alteration of avermectin production. For example, the present invention provides recombinant vectors that can be used to target any of the polynucleotide molecules comprising mutated nucleotide sequences of the present invention to the site of the *aveC* gene of the *S. avermitilis* chromosome to either insert into or replace the *aveC* ORF or a portion thereof by homologous recombination. According to the present invention, however, a polynucleotide molecule comprising a mutated nucleotide sequence of the present invention provided herewith can also function to modulate avermectin biosynthesis when inserted into the *S. avermitilis* chromosome at a site other than at the *aveC* gene, or when maintained episomally in *S. avermitilis* cells. Thus, the present invention also provides vectors comprising a polynucleotide molecule comprising a mutated nucleotide sequence of the present invention, which vectors can be used to insert the polynucleotide molecule at a site in the *S. avermitilis* chromosome other than at the *aveC* gene, or to be maintained episomally.

In a preferred embodiment, the present invention provides gene replacement vectors that can be used to insert a mutated *aveC* allele or degenerate variant thereof into cells of a strain of *S. avermitilis*, thereby generating novel strains of *S. avermitilis*, the cells of which produce avermectins in an altered class 2:1 ratio compared to cells of the same strain which instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the class 2:1 ratio of avermectins produced by the cells is reduced. Such gene replacement vectors can be constructed using mutated polynucleotide molecules present in expression vectors provided herewith, such as, *e.g.*, pSE188, pSE199, and pSE231, which expression vectors are exemplified in Section 8 below.

In a further preferred embodiment, the present invention provides vectors that can be used to insert a mutated *aveC* allele or degenerate variant thereof into cells of a strain of *S. avermitilis* to generate novel strains of cells that produce altered amounts of avermectins compared to cells of the same strain which instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the amount of avermectins produced by the cells is increased. In a specific though non-limiting embodiment, such a vector further comprises a strong promoter as known in the art, such as, *e.g.*, the strong constitutive *ermE* promoter from *Saccharopolyspora erythraea*, that is situated upstream from, and in operative association with, the *aveC* allele. Such a vector can be plasmid pSE189, described in Example 11 below, or can be constructed using the mutated *aveC* allele of plasmid pSE189.

6527805 "5485705

In a further preferred embodiment, the present invention provides gene replacement vectors that are useful to inactivate the *aveC* gene in a wild-type strain of *S. avermitilis*. In a non-limiting embodiment, such gene replacement vectors can be constructed using the mutated polynucleotide molecule present in plasmid pSE180 (ATCC 209605), which is exemplified in Section 8.1, below (FIGURE 3). The present invention further provides gene replacement vectors that comprise a polynucleotide molecule comprising or consisting of nucleotide sequences that naturally flank the *aveC* gene *in situ* in the *S. avermitilis* chromosome, including, *e.g.*, those flanking nucleotide sequences shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1), which vectors can be used to delete the *S. avermitilis aveC* ORF.

The present invention further provides methods for making novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that express a mutated *aveC* allele and that produce an altered ratio and/or amount of avermectins compared to cells of the same strain of S. avermitilis that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the present invention provides a method for making novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that express a mutated *aveC* allele and that produce an altered class 2:1 ratio of avermectins compared to cells of the same strain of *S. avermitilis* that instead express only a wild-type *aveC* allele, comprising transforming cells of a strain of S. avermitilis with a vector that carries a mutated aveC allele that encodes a gene product that alters the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated *aveC* allele thereof compared to cells of the same strain that instead express only a wild-type *aveC* allele, and selecting transformed cells that produce avermectins in an altered class 2:1 ratio compared to the class 2:1 ratio produced by cells of the strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a more preferred embodiment, the present invention provides a method for making a novel strain of *S. avermitilis*, comprising transforming cells of a strain of *S. avermitilis* with a vector capable of introducing a mutation into the *aveC* allele of such cells, wherein the mutation to the *aveC* allele results in the substitution in the encoded AveC gene product of a different amino acid residue at one or more amino acid positions corresponding to amino acid residues 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 or 298 of SEQ ID NO:2, such that cells of the *S. avermitilis* strain in which the *aveC* allele has been so mutated produce a class 2:1 ratio of avermectins that is different from the ratio produced by cells of the same *S. avermitilis* strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the altered class 2:1 ratio of avermectins is reduced.

As used herein, where an amino acid residue encoded by an *aveC* allele in the *S. avermitilis* chromosome, or in a vector or isolated polynucleotide molecule of the present

invention is referred to as "corresponding to" a particular amino acid residue of SEQ ID NO:2, or where an amino acid substitution is referred to as occurring at a particular position "corresponding to" that of a specific numbered amino acid residue of SEQ ID NO:2, this is intended to refer to the amino acid residue at the same relative location in the AveC gene product, which the skilled artisan can quickly determine by reference to the amino acid sequence presented herein as SEQ ID NO:2.

The present invention further provides methods of making novel strains wherein specific mutations in the *aveC* allele encoding particular mutations are recited as base changes at specific nucleotide positions in the *aveC* allele "corresponding to" particular nucleotide positions as shown in SEQ ID NO:1. As above with regard to corresponding amino acid positions, where a nucleotide position in the *aveC* allele is referred to as "corresponding to" a particular nucleotide position in SEQ ID NO:1, this is intended to refer to the nucleotide at the same relative location in the *aveC* nucleotide sequence, which the skilled artisan can quickly determine by reference to the nucleotide sequence presented herein as SEQ ID NO:1.

In a further preferred embodiment, the present invention provides a method for making novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that produce altered amounts of avermectin, comprising transforming cells of a strain of *S. avermitilis* with a vector that carries a mutated *aveC* allele or a genetic construct comprising the aveC allele, the expression of which results in an alteration in the amount of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated aveC allele or genetic construct as compared to cells of the same strain that instead express only a single wild-type *aveC* allele, and selecting transformed cells that produce avermectins in an altered amount compared to the amount of avermectins produced by cells of the strain that instead express only the single wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the amount of avermectins produced in the transformed cells is increased.

In a further preferred embodiment, the present invention provides a method for making novel strains of *S. avermitilis*, the cells of which comprise an inactivated *aveC* allele, comprising transforming cells of a strain of *S. avermitilis* that express any *aveC* allele with a vector that inactivates the *aveC* allele, and selecting transformed cells in which the aveC allele has been inactivated. In a preferred though non-limiting embodiment, cells of a strain of *S. avermitilis* are transformed with a gene replacement vector that carries an *aveC* allele that has been inactivated by mutation or by replacement of a portion of the *aveC* allele with a heterologous gene sequence, and transformed cells are selected in which the *aveC* allele otherwise native thereto has been replaced with the inactivated *aveC* allele. Inactivation of

the *aveC* allele can be determined by HPLC analysis of fermentation products, as described below. In a specific though non-limiting embodiment described in Section 8.1 below, the *aveC* allele is inactivated by insertion of the *ermE* gene from *Saccharopolyspora erythraea* into the *aveC* ORF.

The present invention further provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells that have been transformed with any of the polynucleotide molecules or vectors of the present invention. In a preferred embodiment, the present invention provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells which express a mutated *aveC* allele or degenerate variant thereof in place of, or in addition to, the wild-type *aveC* allele, wherein the cells of the novel strain produce avermectins in an altered class 2:1 ratio compared to the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the altered class 2:1 ratio produced by the novel cells is reduced. Such novel strains are useful in the large-scale production of commercially desirable avermectins such as doramectin. In a more preferred embodiment, the present invention provides cells of *S. avermitilis* comprising any of the aforementioned mutations or combinations of mutations in the *aveC* allele at nucleotide positions corresponding to those presented hereinabove or which otherwise encode any of the aforementioned amino acid substitutions in the AveC gene product. Although such mutations can be present in such cells on an extrachromosomal element such as a plasmid, it is preferred that such mutations are present in the *aveC* allele located on the *S. avermitilis* chromosome. In a preferred embodiment, the present invention provides a strain of *Streptomyces avermitilis* comprising cells having a mutation in the *aveC* allele that encodes an AveC gene product having a substitution at one or more amino acid positions corresponding to amino acid residues 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, or 298 of SEQ ID NO:2, wherein the cell produces a class 2:1 ratio of avermectins that is different from the ratio produced by a cell of the same *S. avermitilis* strain which express the wild-type *aveC* allele.

It is a primary objective of the screening assays described herein to identify mutated alleles of the *aveC* gene the expression of which, in *S. avermitilis* cells, alters and, more particularly, reduces the ratio of class 2:1 avermectins produced. In a preferred embodiment, the ratio of B2:B1 avermectins produced by cells of a novel *S. avermitilis* strain of the present invention expressing a mutated *aveC* allele, or degenerate variant thereof, of the present invention is about 1.6:1 or less. In a more preferred embodiment, the ratio is about 1:1 or less. In a more preferred embodiment, the ratio is about 0.84:1 or less. In a more preferred embodiment, the ratio is about 0.80:1 or less. In a more preferred embodiment, the ratio is

6521803.1

about 0.75:1 or less. In a more preferred embodiment, the ratio is about 0.73:1 or less. In a more preferred embodiment, the ratio is about 0.68:1 or less. In an even more preferred embodiment, the ratio is about 0.67:1 or less. In a more preferred embodiment, the ratio is about 0.57:1 or less. In an even more preferred embodiment, the ratio is about 0.53:1 or less. In an even more preferred embodiment, the ratio is about 0.42:1 or less. In an even more preferred embodiment, the ratio is about 0.40:1 or less.

In a specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of less than 1.6:1. In a different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.94:1. In a further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.88:1. In a further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.84:1. In a still further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.75:1. In a still further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.73:1. In a still further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.68:1. In a still further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.67:1. In a still further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.57:1. In a still further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.53:1. In a still further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.42:1. In yet a further different specific embodiment described below, novel cells of the present invention produce cyclohexyl 2:cyclohexyl B1 avermectins in a ratio of about 0.40:1.

In a further preferred embodiment, the present invention provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells which express a mutated *aveC* allele or a degenerate variant thereof, or a genetic construct comprising an *aveC* allele or a degenerate variant thereof, in place of, or in addition to, the wild-type *aveC* allele, wherein the cells of the novel strain

produce an altered amount of avermectins compared to cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele. In a preferred embodiment, the novel strain produces an increased amount of avermectins. In a non-limiting embodiment, the genetic construct further comprises a strong promoter, such as the strong constitutive *ermE* promoter from *Saccharopolyspora erythraea*, upstream from and in operative association with the *aveC* ORF.

In a further preferred embodiment, the present invention provides novel strains of *S. avermitilis* comprising cells in which the *aveC* gene has been inactivated. Such strains are useful both for the different spectrum of avermectins that they produce compared to the wild-type strain, and in complementation screening assays as described herein, to determine whether targeted or random mutagenesis of the *aveC* gene affects avermectin production. In a specific embodiment described below, *S. avermitilis* host cells were genetically engineered to contain an inactivated *aveC* gene. For example, strain SE180-11, described in the examples below, was generated using the gene replacement plasmid pSE180 (ATCC 209605) (FIGURE 3), which was constructed to inactivate the *S. avermitilis aveC* gene by insertion of the *ermE* resistance gene into the *aveC* coding region.

The present invention further provides recombinantly expressed mutated *S. avermitilis* AveC gene products encoded by any of the aforementioned polynucleotide molecules of the invention, and methods of preparing the same.

The present invention further provides a process for producing avermectins, comprising culturing cells of a strain of *S. avermitilis*, which cells express a mutated *aveC* allele that encodes a gene product that alters the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated *aveC* allele compared to cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele, in culture media under conditions that permit or induce the production of avermectins therefrom, and recovering said avermectins from the culture. In a preferred embodiment, the class 2:1 ratio of avermectins produced in the culture by cells expressing the mutated *aveC* allele is reduced. This process provides increased efficiency in the production of commercially valuable avermectins such as doramectin.

The present invention further provides a process for producing avermectins, comprising culturing cells of a strain of *S. avermitilis*, which cells express a mutated *aveC* allele or a genetic construct comprising an *aveC* allele that results in the production of an altered amount of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated *aveC* allele or genetic construct compared to cells of the same strain which do not

5612803.1 05/15/03

express the mutated *aveC* allele or genetic construct but instead express only the wild-type *aveC* allele, in culture media under conditions that permit or induce the production of avermectins therefrom, and recovering said avermectins from the culture. In a preferred embodiment, the amount of avermectins produced in culture by cells expressing the mutated *aveC* allele, degenerate variant or genetic construct is increased.

The present invention further provides a novel composition of avermectins produced by a strain of *S. avermitilis* expressing a mutated *aveC* allele or degenerate variant thereof that encodes a gene product that reduces the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis* expressing the mutated *aveC* allele or degenerate variant compared to cells of the same strain that instead express only the wild-type *aveC* allele, wherein the avermectins in the novel composition are produced in a reduced class 2:1 ratio as compared to the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of the same strain of *S. avermitilis* that instead express only the wild-type *aveC* allele. The novel avermectin composition can be present as produced in exhausted fermentation culture fluid, or can be harvested therefrom. The novel avermectin composition can be partially or substantially purified from the culture fluid by known biochemical techniques of purification, such as by ammonium sulfate precipitation, dialysis, size fractionation, ion exchange chromatography, HPLC, *etc.*

5.4. Uses Of Avermectins

Avermectins are highly active antiparasitic agents having particular utility as anthelmintics, ectoparasiticides, insecticides and acaricides. Avermectin compounds produced according to the methods of the present invention are useful for any of these purposes. For example, avermectin compounds produced according to the present invention are useful to treat various diseases or conditions in humans, particularly where those diseases or conditions are caused by parasitic infections, as known in the art. See, *e.g.*, Ikeda and Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7):2591-2609. More particularly, avermectin compounds produced according to the present invention are effective in treating a variety of diseases or conditions caused by endoparasites, such as parasitic nematodes, which can infect humans, domestic animals, swine, sheep, poultry, horses or cattle.

More specifically, avermectin compounds produced according to the present invention are effective against nematodes that infect humans, as well as those that infect various species of animals. Such nematodes include gastrointestinal parasites such as *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Enterobius*, *Dirofilaria*, and

parasites that are found in the blood or other tissues or organs, such as filarial worms and the extract intestinal states of *Strongyloides* and *Trichinella*.

The avermectin compounds produced according to the present invention are also useful in treating ectoparasitic infections including, *e.g.*, arthropod infestations of mammals and birds, caused by ticks, mites, lice, fleas, blowflies, biting insects, or migrating dipterous larvae that can affect cattle and horses, among others.

The avermectin compounds produced according to the present invention are also useful as insecticides against household pests such as, *e.g.*, the cockroach, clothes moth, carpet beetle and the housefly among others, as well as insect pests of stored grain and of agricultural plants, which pests include spider mites, aphids, caterpillars, and orthopterans such as locusts, among others.

Animals that can be treated with the avermectin compounds produced according to the present invention include sheep, cattle, horses, deer, goats, swine, birds including poultry, and dogs and cats.

An avermectin compound produced according to the present invention is administered in a formulation appropriate to the specific intended use, the particular species of host animal being treated, and the parasite or insect involved. For use as a parasiticide, an avermectin compound produced according to the present invention can be administered orally in the form of a capsule, bolus, tablet or liquid drench or, alternatively, can be administered as a pour-on, or by injection, or as an implant. Such formulations are prepared in a conventional manner in accordance with standard veterinary practice. Thus, capsules, boluses or tablets can be prepared by mixing the active ingredient with a suitable finely divided diluent or carrier additionally containing a disintegrating agent and/or binder such as starch, lactose, talc, magnesium stearate, *etc.* A drench formulation can be prepared by dispersing the active ingredient in an aqueous solution together with a dispersing or wetting agent, *etc.* Injectable formulations can be prepared in the form of a sterile solution, which can contain other substances such as, *e.g.*, sufficient salts and/or glucose to make the solution isotonic with blood.

Such formulations will vary with regard to the weight of active compound depending on the patient, or species of host animal to be treated, the severity and type of infection, and the body weight of the host. Generally, for oral administration a dose of active compound of from about 0.001 to 10 mg per kg of patient or animal body weight given as a single dose or in divided doses for a period of from 1 to 5 days will be satisfactory. However, there can be

instances where higher or lower dosage ranges are indicated, as determined, *e.g.*, by a physician or veterinarian, as based on clinical symptoms.

As an alternative, an avermectin compound produced according to the present invention can be administered in combination with animal feedstuff, and for this purpose a concentrated feed additive or premix can be prepared for mixing with the normal animal feed.

For use as an insecticide, and for treating agricultural pests, an avermectin compound produced according to the present invention can be applied as a spray, dust, emulsion and the like in accordance with standard agricultural practice.

6. EXAMPLE: FERMENTATION OF *STREPTOMYCES AVERMITILIS* AND B2:B1 AVERMECTIN ANALYSIS

Strains lacking both branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and 5-O-methyltransferase activities produce no avermectins if the fermentation medium is not supplemented with fatty acids. This example demonstrates that in such mutants a wide range of B2:B1 ratios of avermectins can be obtained when biosynthesis is initiated in the presence of different fatty acids.

6.1. Materials And Methods

Streptomyces avermitilis ATCC 53692 was stored at -70°C as a whole broth prepared in seed medium consisting of: Starch (Nadex, Laing National) - 20g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamine pH (Yeast Products Inc.) - 5 g; calcium carbonate - 1 g. Final volume was adjusted to 1 liter with tap water, pH was adjusted to 7.2, and the medium was autoclaved at 121°C for 25 min.

Two ml of a thawed suspension of the above preparation was used to inoculate a flask containing 50 ml of the same medium. After 48 hrs incubation at 28°C on a rotary shaker at 180 rpm, 2 ml of the broth was used to inoculate a flask containing 50 ml of a production medium consisting of: Starch - 80 g; calcium carbonate - 7 g; Pharmamedia - 5 g; dipotassium hydrogen phosphate - 1 g; magnesium sulfate - 1 g; glutamic acid - 0.6 g; ferrous sulfate heptahydrate - 0.01 g; zinc sulfate - 0.001 g; manganous sulfate - 0.001 g. Final volume was adjusted to 1 liter with tap water, pH was adjusted to 7.2, and the medium was autoclaved at 121°C for 25 min.

Various carboxylic acid substrates (see TABLE 1) were dissolved in methanol and added to the fermentation broth 24 hrs after inoculation to give a final concentration of 0.2 g/liter. The fermentation broth was incubated for 14 days at 28°C, then the broth was centrifuged (2,500 rpm for 2 min) and the supernatant discarded. The mycelial pellet was extracted with acetone (15 ml), then with dichloromethane (30 ml), and the organic phase

separated, filtered, then evaporated to dryness. The residue was taken up in methanol (1 ml) and analyzed by HPLC with a Hewlett-Packard 1090A liquid chromatograph equipped with a scanning diode-array detector set at 240 nm. The column used was a Beckman Ultrasphere C-18, 5 μm, 4.6 mm x 25 cm column maintained at 40°C. Twenty-five μl of the above methanol solution was injected onto the column. Elution was performed with a linear gradient of methanol-water from 80:20 to 95:5 over 40 min at 0.85/ml min. Two standard concentrations of cyclohexyl B1 were used to calibrate the detector response, and the area under the curves for B2 and B1 avermectins was measured.

6.2. Results

The HPLC retention times observed for the B2 and B1 avermectins, and the 2:1 ratios, are shown in TABLE 1.

TABLE 1

	HPLC Retention Time (min)		Ratio
Substrate	B2	B1	B2:B1
4-Tetrahydropyran carboxylic acid	8.1	14.5	0.25
Isobutyric acid	10.8	18.9	0.5
3-Furoic acid	7.6	14.6	0.62
S-(+)-2-methylbutyric acid	12.8	21.6	1.0
Cyclohexanecarboxylic acid	16.9	26.0	1.6
3-Thiophenecarboxylic acid	8.8	16.0	1.8
Cyclopentanecarboxylic acid	14.2	23.0	2.0
3-Trifluoromethylbutyric acid	10.9	18.8	3.9
2-Methylpentanoic acid	14.5	24.9	4.2
Cycloheptanecarboxylic acid	18.6	29.0	15.0

The data presented in TABLE 1 demonstrates an extremely wide range of B2:B1 avermectin product ratios, indicating a considerable difference in the results of dehydrative conversion of class 2 compounds to class 1 compounds, depending on the nature of the fatty

acid side chain starter unit supplied. This indicates that changes in B2:B1 ratios resulting from alterations to the AveC protein may be specific to particular substrates. Consequently, screening for mutants exhibiting changes in the B2:B1 ratio obtained with a particular substrate needs to be done in the presence of that substrate. The subsequent examples described below use cyclohexanecarboxylic acid as the screening substrate. However, this substrate is used merely to exemplify the potential, and is not intended to limit the applicability, of the present invention.

7. EXAMPLE: ISOLATION OF THE aveC GENE

This example describes the isolation and characterization of a region of the *Streptomyces avermitilis* chromosome that encodes the AveC gene product. As demonstrated below, the *aveC* gene was identified as capable of modifying the ratio of cyclohexyl-B2 to cyclohexyl-B1 (B2:B1) avermectins produced.

7.1. Materials And Methods

7.1.1. Growth Of *Streptomyces* For DNA Isolation

The following method was followed for growing *Streptomyces*. Single colonies of *S. avermitilis* ATCC 31272 (single colony isolate #2) were isolated on 1/2 strength YPD-6 containing: Difco Yeast Extract - 5 g; Difco Bacto-peptone - 5 g; dextrose - 2.5 g; MOPS - 5 g; Difco Bacto agar - 15 g. Final volume was adjusted to 1 liter with dH_2O, pH was adjusted to 7.0, and the medium was autoclaved at 121°C for 25 min.

The mycelia grown in the above medium were used to inoculate 10 ml of TSB medium (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g, in 1 liter dH_2O, autoclaved at 121°C for 25 min) in a 25 mm x 150 mm tube which was maintained with shaking (300 rpm) at 28°C for 48-72 hrs.

7.1.2. Chromosomal DNA Isolation From *Streptomyces*

Aliquots (0.25 ml or 0.5 ml) of mycelia grown as described above were placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes and the cells concentrated by centrifugation at 12,000 x g for 60 sec. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in 0.25 ml TSE buffer (20 ml 1.5 M sucrose, 2.5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 ml 1 M EDTA, pH 8.0, and 75 ml dH_2O) containing 2 mg/ml lysozyme. The samples were incubated at 37°C for 20 min with shaking, loaded into an AutoGen 540™ automated nucleic acid isolation instrument (Integrated Separation Systems, Natick, MA), and genomic DNA isolated using Cycle 159 (equipment software) according to manufacturer's instructions.

Alternatively, 5 ml of mycelia were placed in a 17 mm x 100 mm tube, the cells concentrated by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min, and the supernatant removed. Cells were resuspended in 1 ml TSE buffer, concentrated by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min,

and the supernatant removed. Cells were resuspended in 1 ml TSE buffer containing 2 mg/ml lysozyme, and incubated at 37°C with shaking for 30-60 min. After incubation, 0.5 ml 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added and the cells incubated at 37°C until lysis was complete. The lysate was incubated at 65°C for 10 min, cooled to rm temp, split into two 1.5 ml Eppendorf tubes, and extracted 1x with 0.5 ml phenol/chloroform (50% phenol previously equilibrated with 0.5 M Tris, pH 8.0; 50% chloroform). The aqueous phase was removed and extracted 2 to 5x with chloroform:isoamyl alcohol (24:1). The DNA was precipitated by adding 1/10 volume 3M sodium acetate, pH 4.8, incubating the mixture on ice for 10 min, centrifuging the mixture at 15,000 rpm at 5°C for 10 min, and removing the supernatant to a clean tube to which 1 volume of isopropanol was added. The supernatant plus isopropanol mixture was then incubated on ice for 20 min, centrifuged at 15,000 rpm for 20 min at 5°C, the supernatant removed, and the DNA pellet washed 1x with 70% ethanol. After the pellet was dry, the DNA was resuspended in TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0).

5044854 - 0844.69

7.1.3. Plasmid DNA Isolation From *Streptomyces*

An aliquot (1.0 ml) of mycelia was placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes and the cells concentrated by centrifugation at 12,000 x g for 60 sec. The supernatant was discarded, the cells were resuspended in 1.0 ml 10.3% sucrose and concentrated by centrifugation at 12,000 x g for 60 sec, and the supernatant discarded. The cells were then resuspended in 0.25 ml TSE buffer containing 2 mg/ml lysozyme, and incubated at 37°C for 20 min with shaking and loaded into the AutoGen 540™ automated nucleic acid isolation instrument. Plasmid DNA was isolated using Cycle 106 (equipment software) according to manufacturer's instructions.

Alternatively, 1.5 ml of mycelia were placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes and the cells concentrated by centrifugation at 12,000 x g for 60 sec. The supernatant was discarded, the cells were resuspended in 1.0 ml 10.3% sucrose and concentrated by centrifugation at 12,000 x g for 60 sec, and the supernatant discarded. The cells were resuspended in 0.5 ml TSE buffer containing 2 mg/ml lysozyme, and incubated at 37°C for 15-30 min. After incubation, 0.25 ml alkaline SDS (0.3N NaOH, 2% SDS) was added and the cells incubated at 55°C for 15-30 min or until the solution was clear. Sodium acetate (0.1 ml, 3M, pH 4.8) was added to the DNA solution, which was then incubated on ice for 10 min. The DNA samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 5°C. The supernatant was removed to a clean tube, and 0.2 ml phenol:chloroform (50% phenol:50% chloroform) was added and gently mixed. The DNA solution was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 5°C and the upper layer removed to a clean Eppendorf tube. Isopropanol (0.75 ml) was added, and the solution was gently mixed and then incubated at rm temp for 20 min. The DNA solution was

centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 5°C, the supernatant removed, and the DNA pellet was washed with 70% ethanol, dried, and resuspended in TE buffer.

7.1.4. Plasmid DNA Isolation From *E. coli*

A single transformed *E. coli* colony was inoculated into 5 ml Luria-Bertani (LB) medium (Bacto-Tryptone - 10 g, Bacto-yeast extract - 5 g, and NaCl - 10 g in 1 liter dH_2O, pH 7.0, autoclaved at 121°C for 25 min, and supplemented with 100 µg/ml ampicillin). The culture was incubated overnight, and a 1 ml aliquot placed in a 1.5 ml microcentrifuge tube. The culture samples were loaded into the AutoGen 540™ automated nucleic acid isolation instrument and plasmid DNA was isolated using Cycle 3 (equipment software) according to manufacturer's instructions.

7.1.5. Preparation And Transformation Of *S. avermitilis* Protoplasts

Single colonies of *S. avermitilis* were isolated on 1/2 strength YPD-6. The mycelia were used to inoculate 10 ml of TSB medium in a 25 mm x 150 mm tube, which was then incubated with shaking (300 rpm) at 28°C for 48 hrs. One ml of mycelia was used to inoculate 50 ml YEME medium. YEME medium contains per liter: Difco Yeast Extract - 3 g; Difco Bacto-peptone - 5 g; Difco Malt Extract - 3 g; Sucrose - 300 g. After autoclaving at 121°C for 25 min, the following were added: 2.5 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (separately autoclaved at 121°C for 25 min) - 2 ml; and glycine (20%) (filter-sterilized)- 25 ml.

The mycelia were grown at 30°C for 48-72 hrs and harvested by centrifugation in a 50 ml centrifuge tube (Falcon) at 3,000 rpm for 20 min. The supernatant was discarded and the mycelia were resuspended in P buffer, which contains: sucrose - 205 g; K_2SO_4 - 0.25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 2.02 g; H_2O - 600 ml; K_2PO_4 (0.5%) - 10 ml; trace element solution* - 20 ml; $CaCl_2$ $2H_2O$ (3.68%) - 100 ml; and MES buffer (1.0 M, pH 6.5) - 10 ml. (*Trace element solution contains per liter: $ZnCl_2$ - 40 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 200 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ - 10 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 10 mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ - 10 mg; $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$ $4H_2O$ - 10 mg). The pH was adjusted to 6.5, final volume was adjusted to 1 liter, and the medium was filtered hot through a 0.45 micron filter.

The mycelia were pelleted at 3,000 rpm for 20 min, the supernatant was discarded, and the mycelia were resuspended in 20 ml P buffer containing 2 mg/ml lysozyme. The mycelia were incubated at 35°C for 15 min with shaking, and checked microscopically to determine extent of protoplast formation. When protoplast formation was complete, the protoplasts were centrifuged at 8,000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and the

protoplasts were resuspended in 10 ml P buffer. The protoplasts were centrifuged at 8,000 rpm for 10 min, the supernatant was removed, the protoplasts were resuspended in 2 ml P buffer, and approximately 1 x 10^9 protoplasts were distributed to 2.0 ml cryogenic vials (Nalgene).

A vial containing 1 x 10^9 protoplasts was centrifuged at 8,000 rpm for 10 min, the supernatant was removed, and the protoplasts were resuspended in 0.1 ml P buffer. Two to 5 µg of transforming DNA were added to the protoplasts, immediately followed by the addition of 0.5 ml working T buffer. T buffer base contains: PEG-1000 (Sigma) - 25 g; sucrose - 2.5 g; H_2O - 83 ml. The pH was adjusted to 8.8 with 1 N NaOH (filter sterilized), and the T buffer base was filter-sterilized and stored at 4°C. Working T buffer, made the same day used, was T buffer base - 8.3 ml; K_2PO_4 (4 mM) - 1.0 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 M) - 0.2 ml; and TES (1 M, pH 8) - 0.5 ml. Each component of the working T buffer was individually filter-sterilized.

Within 20 sec of adding T buffer to the protoplasts, 1.0 ml P buffer was also added and the protoplasts were centrifuged at 8,000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and the protoplasts were resuspended in 0.1 ml P buffer. The protoplasts were then plated on RM14 media, which contains: sucrose - 205 g; K_2SO_4 - 0.25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 10.12 g; glucose - 10 g; Difco Casamino Acids - 0.1 g; Difco Yeast Extract - 5 g; Difco Oatmeal Agar - 3 g; Difco Bacto Agar - 22 g; dH_2O - 800 ml. The solution was autoclaved at 121°C for 25 min. After autoclaving, sterile stocks of the following were added: K_2PO_4 (0.5%) - 10 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 M) - 5 ml; L-proline (20%) - 15 ml; MES buffer (1.0 M, pH 6.5) - 10 ml; trace element solution (same as above) - 2 ml; cycloheximide stock (25 mg/ml) - 40 ml; and 1N NaOH - 2 ml. Twenty-five ml of RM14 medium were aliquoted per plate, and plates dried for 24 hr before use.

The protoplasts were incubated in 95% humidity at 30°C for 20-24 hrs. To select thiostrepton resistant transformants, 1 ml of overlay buffer containing 125 µg per ml thiostrepton was spread evenly over the RM14 regeneration plates. Overlay buffer contains per 100 ml: sucrose - 10.3 g; trace element solution (same as above) - 0.2 ml; and MES (1 M, pH 6.5) - 1 ml. The protoplasts were incubated in 95% humidity at 30°C for 7-14 days until thiostrepton resistant (Thio^r) colonies were visible.

7.1.6. Transformation Of *Streptomyces lividans* Protoplasts

S. lividans TK64 (provided by the John Innes Institute, Norwich, U.K) was used for transformations in some cases. Methods and compositions for growing, protoplasting, and transforming *S. lividans* are described in Hopwood *et al.*, 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K., and performed

6212180 54390105

as described therein. Plasmid DNA was isolated from *S. lividans* transformants as described in Section 7.1.3, above.

7.1.7. Fermentation Analysis Of *S. avermitilis* Strains

S. avermitilis mycelia grown on 1/2 strength YPD-6 for 4-7 days were inoculated into 1 x 6 inch tubes containing 8 ml of preform medium and two 5 mm glass beads. Preform medium contains: soluble starch (either thin boiled starch or KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/L; Pharmamedia - 15 g/L; Ardamine pH - 5 g/L (Champlain Ind., Clifton, NJ); $CaCO_3$ - 2 g/L; 2x bcfa ("bcfa" refers to branched chain fatty acids) containing a final concentration in the medium of 50 ppm 2-(+/-)-methyl butyric acid, 60 ppm isobutyric acid, and 20 ppm isovaleric acid. The pH was adjusted to 7.2, and the medium was autoclaved at 121°C for 25 min.

The tube was shaken at a 17° angle at 215 rpm at 29°C for 3 days. A 2-ml aliquot of the seed culture was used to inoculate a 300 ml Erlenmeyer flask containing 25 ml of production medium which contains: starch (either thin boiled starch or KOSO) - 160 g/L; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/L; Ardamine pH - 10 g/L; K_2HPO_4 - 2 g/L; $MgSO_4.4H_2O$ - 2 g/L; $FeSO_4.7H_2O$ - 0.02 g/L; $MnCl_2$ - 0.002 g/L; $ZnSO_4.7H_2O$ - 0.002 g/L; $CaCO_3$ - 14 g/L; 2x bcfa (as above); and cyclohexane carboxylic acid (CHC) (made up as a 20% solution at pH 7.0) - 800 ppm. The pH was adjusted to 6.9, and the medium was autoclaved at 121°C for 25 min.

After inoculation, the flask was incubated at 29°C for 12 days with shaking at 200 rpm. After incubation, a 2 ml sample was withdrawn from the flask, diluted with 8 ml of methanol, mixed, and the mixture centrifuged at 1,250 x g for 10 min to pellet debris. The supernatant was then assayed by HPLC using a Beckman Ultrasphere ODS column (25 cm x 4.6 mm ID) with a flow rate of 0.75 ml/min and detection by absorbance at 240 nm. The mobile phase was 86/8.9/5.1 methanol/water/ acetonitrile.

7.1.8. Isolation Of *S. avermitilis* PKS Genes

A cosmid library of *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) chromosomal DNA was prepared and hybridized with a ketosynthase (KS) probe made from a fragment of the *Saccharopolyspora erythraea* polyketide synthase (PKS) gene. A detailed description of the preparation of cosmid libraries can be found in Sambrook *et al.*, 1989, above. A detailed description of the preparation of *Streptomyces* chromosomal DNA libraries is presented in Hopwood *et al.*, 1985, above. Cosmid clones containing ketosynthase-hybridizing regions were identified by hybridization to a 2.7 Kb *NdeI/Eco*47III fragment from pEX26 (kindly supplied by Dr. P. Leadlay, Cambridge, UK). Approximately 5 ng of pEX26 were digested

60T4S6t5 - 0S2T60

using *Nde*I and *Eco*47III. The reaction mixture was loaded on a 0.8% SeaPlaque GTG agarose gel (FMC BioProducts, Rockland, ME). The 2.7 Kb *NdeI/Eco*47III fragment was excised from the gel after electrophoresis and the DNA recovered from the gel using GELase™ from Epicentre Technologies using the Fast Protocol. The 2.7 Kb *NdeI/Eco*47III fragment was labeled with [α-^{32}P]dCTP (deoxycytidine 5'-triphosphate, tetra (triethylammonium) salt, [alpha-^{32}P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) using the BRL Nick Translation System (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) following the supplier's instructions. A typical reaction was performed in 0.05 ml volume. After addition of 5 µl Stop buffer, the labeled DNA was separated from unincorporated nucleotides using a G-25 Sephadex Quick Spin™ Column (Boehringer Mannheim) following supplier's instructions.

Approximately 1,800 cosmid clones were screened by colony hybridization. Ten clones were identified that hybridized strongly to the *Sacc. erythraea* KS probe. *E. coli* colonies containing cosmid DNA were grown in LB liquid medium and cosmid DNA was isolated from each culture in the AutoGen 540™ automated nucleic acid isolation instrument using Cycle 3 (equipment software) according to manufacturer's instructions. Restriction endonuclease mapping and Southern blot hybridization analyses revealed that five of the clones contained overlapping chromosomal regions. An *S. avermitilis* genomic *Bam*HI restriction map of the five cosmids (*i.e.*, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) was constructed by analysis of overlapping cosmids and hybridizations (FIGURE 4).

7.1.9. Identification Of DNA That Modulates Avermectin B2:B1 Ratios And Identification Of An *aveC* ORF

The following methods were used to test subcloned fragments derived from the pSE66 cosmid clone for their ability to modulate avermectin B2:B1 ratios in AveC mutants. pSE66 (5 µg) was digested with *Sac*I and *Bam*HI. The reaction mixture was loaded on a 0.8% SeaPlaque™ GTG agarose gel (FMC BioProducts), a 2.9 Kb *SacI/Bam*HI fragment was excised from the gel after electrophoresis, and the DNA was recovered from the gel using GELase™ (Epicentre Technologies) using the Fast Protocol. Approximately 5 µg of the shuttle vector pWHM3 (Vara *et al.*, 1989, J. Bacteriol. 171:5872-5881) was digested with *Sac*I and *Bam*HI. About 0.5 µg of the 2.9 Kb insert and 0.5 µg of digested pWHM3 were mixed together and incubated overnight with 1 unit of ligase (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) at 15°C, in a total volume of 20 µl, according to supplier's instructions. After incubation, 5 µl of the ligation mixture was incubated at 70°C for 10 min, cooled to rm temp, and used to transform competent *E. coli* DH5α cells (BRL) according to manufacturer's instructions.

Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the 2.9 Kb *SacI/BamHI* insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as pSE119.

Protoplasts of *S. avermitilis* strain 1100-SC38 (Pfizer in-house strain) were prepared and transformed with pSE119 as described in Section 7.1.5 above. Strain 1100-SC38 is a mutant that produces significantly more of the avermectin cyclohexyl-B2 form compared to avermectin cyclohexyl-B1 form when supplemented with cyclohexane carboxylic acid (B2:B1 of about 30:1). pSE119 used to transform *S. avermitilis* protoplasts was isolated from either *E. coli* strain GM2163 (obtained from Dr. B. J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), *E. coli* strain DM1 (BRL), or *S. lividans* strain TK64. Thiostrepton resistant transformants of strain 1100-SC38 were isolated and analyzed by HPLC analysis of fermentation products. Transformants of *S. avermitilis* strain 1100-SC38 containing pSE119 produced an altered ratio of avermectin cyclohexyl-B2:cyclohexyl-B1 of about 3.7:1 (TABLE 2).

Having established that pSE119 was able to modulate avermectin B2:B1 ratios in an AveC mutant, the insert DNA was sequenced. Approximately 10 µg of pSE119 were isolated using a plasmid DNA isolation kit (Qiagen, Valencia, CA) following manufacturer's instructions, and sequenced using an ABI 373A Automated DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). Sequence data was assembled and edited using Genetic Computer Group programs (GCG, Madison, WI). The DNA sequence and the *aveC* ORF are presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1).

A new plasmid, designated as pSE118, was constructed as follows. Approximately 5 µg of pSE66 was digested with *SphI* and *BamHI*. The reaction mixture was loaded on a 0.8% SeaPlaque GTG agarose gel (FMC BioProducts), a 2.8 Kb *SphI/BamHI* fragment was excised from the gel after electrophoresis, and the DNA was recovered from the gel using GELase™ (Epicentre Technologies) using the Fast Protocol. Approximately 5 µg of the shuttle vector pWHM3 was digested with *SphI* and *BamHI*. About 0.5 µg of the 2.8 Kb insert and 0.5 µg of digested pWHM3 were mixed together and incubated overnight with 1 unit of ligase (New England Biolabs) at 15°C in a total volume of 20 µl according to supplier's instructions. After incubation, 5 µl of the ligation mixture was incubated at 70°C for 10 min, cooled to rm temp, and used to transform competent *E. coli* DH5α cells according to manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the 2.8 Kb *SphI/BamHI* insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as

pSE118. The insert DNA in pSE118 and pSE119 overlap by approximately 838 nucleotides (FIGURE 4).

Protoplasts of *S. avermitilis* strain 1100-SC38 were transformed with pSE118 as above. Thiostrepton resistant transformants of strain 1100-SC38 were isolated and analyzed by HPLC analysis of fermentation products. Transformants of *S. avermitilis* strain 1100-SC38 containing pSE118 were not altered in the ratios of avermectin cyclohexyl-B2: avermectin cyclohexyl-B1 compared to strain 1100-SC38 (TABLE 2).

7.1.10. PCR Amplification Of The *aveC* Gene From *S. avermitilis* Chromosomal DNA

A ~1.2 Kb fragment containing the *aveC* ORF was isolated from *S. avermitilis* chromosomal DNA by PCR amplification using primers designed on the basis of the *aveC* nucleotide sequence obtained above. The PCR primers were supplied by Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). The rightward primer was: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID NO:6); and the leftward primer was: 5'- CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID NO:7). The PCR reaction was carried out with Deep Vent™ polymerase (New England Biolabs) in buffer provided by the manufacturer, and in the presence of 300 µM dNTP, 10% glycerol, 200 pmol of each primer, 0.1 µg template, and 2.5 units enzyme in a final volume of 100 µl, using a Perkin-Elmer Cetus thermal cycler. The thermal profile of the first cycle was 95°C for 5 min (denaturation step), 60°C for 2 min (annealing step), and 72°C for 2 min (extension step). The subsequent 24 cycles had a similar thermal profile except that the denaturation step was shortened to 45 sec and the annealing step was shortened to 1 min.

The PCR product was electrophoresed in a 1% agarose gel and a single DNA band of ~1.2 Kb was detected. This DNA was purified from the gel, and ligated with 25 ng of linearized, blunt pCR-Blunt vector (Invitrogen) in a 1:10 molar vector-to-insert ratio following manufacturer's instructions. The ligation mixture was used to transform One Shot™ Competent *E. coli* cells (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the ~1.2 Kb insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as pSE179.

The insert DNA from pSE179 was isolated by digestion with *Bam*HI/*Xba*I, separated by electrophoresis, purified from the gel, and ligated with shuttle vector pWHM3, which had also been digested with *Bam*HI/*Xba*I, in a total DNA concentration of 1 µg in a 1:5 molar vector-to-insert ratio. The ligation mixture was used to transform competent *E. coli* DH5α cells according to manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the ~1.2 Kb insert was confirmed by restriction

260

analysis. This plasmid, which was designated as pSE186 (FIGURE 2, ATCC 209604), was transformed into *E. coli* DM1, and plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants.

7.2. Results

A 2.9 Kb *SacI/Bam*HI fragment from pSE119 was identified that, when transformed into *S. avermitilis* strain 1100-SC38, significantly altered the ratio of B2:B1 avermectin production. *S. avermitilis* strain 1100-SC38 normally has a B2:B1 ratio of about 30:1, but when transformed with a vector comprising the 2.9 Kb *SacI/Bam*HI fragment, the ratio of B2:B1 avermectin decreased to about 3.7:1. Post-fermentation analysis of transformant cultures verified the presence of the transforming DNA.

The 2.9 Kb pSE119 fragment was sequenced and a ~0.9 Kb ORF was identified (FIGURE 1) (SEQ ID NO:1), which encompasses a *PstI/Sph*I fragment that had previously been mutated elsewhere to produce B2 products only (Ikeda *et al.*, 1995, above). A comparison of this ORF, or its corresponding deduced polypeptide, against known databases (GenEMBL, SWISS-PROT) did not show any strong homology with known DNA or protein sequences.

TABLE 2 presents the fermentation analysis of *S. avermitilis* strain 1100-SC38 transformed with various plasmids.

TABLE 2

S. avermitilis strain (transforming plasmid)	No. Transformants Tested	Avg. B2:B1 Ratio
1100-SC38 (none)	9	30.66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31.3
1100-SC38 (pSE119)	12	3.7
1100-SC38 (pSE118)	12	30.4
1100-SC38 (pSE185)	14	27.9

8. EXAMPLE: CONSTRUCTION OF *S. AVERMITILIS* AveC MUTANTS

This example describes the construction of several different *S. avermitilis* AveC mutants using the compositions and methods described above. A general description of techniques for introducing mutations into a gene in *Streptomyces* is described by Kieser and

Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204:430-458. A more detailed description is provided by Anzai *et al.*, 1988, J. Antibiot. XLI(2):226-233, and by Stutzman-Engwall *et al.*, 1992, J. Bacteriol. 174(1):144-154. These references are incorporated herein by reference in their entirety.

8.1. Inactivation Of The *S. avermitilis aveC* Gene

AveC mutants containing inactivated *aveC* genes were constructed using several methods, as detailed below.

In the first method, a 640 bp *SphI/PstI* fragment internal to the *aveC* gene in pSE119 (plasmid described in Section 7.1.9, above) was replaced with the *ermE* gene (for erythromycin resistance) from *Sacc. erythraea*. The *ermE* gene was isolated from pIJ4026 (provided by the John Innes Institute, Norwich, U.K.; see also Bibb *et al.*, 1985, *Gene* 41:357-368) by restriction enzyme digestion with *BglII* and *EcoRI*, followed by electrophoresis, and was purified from the gel. This ~1.7 Kb fragment was ligated into pGEM7Zf (Promega) which had been digested with *BamHI* and *EcoRI*, and the ligation mixture transformed into competent *E. coli* DH5α cells following manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the ~1.7 Kb insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as pSE27.

pSE118 (described in Section 7.1.9, above) was digested with *SphI* and *BamHI*, the digest electrophoresed, and the ~2.8 Kb *SphI/BamHI* insert purified from the gel. pSE119 was digested with *PstI* and *EcoRI*, the digest electrophoresed, and the ~1.5 Kb *PstI/EcoRI* insert purified from the gel. Shuttle vector pWHM3 was digested with *BamHI* and *EcoRI*. pSE27 was digested with *PstI* and *SphI*, the digest electrophoresed, and the ~1.7 Kb *PstI/SphI* insert purified from the gel. All four fragments (*i.e.*, ~2.8 Kb, ~1.5Kb, ~7.2Kb, ~1.7 Kb) were ligated together in a 4-way ligation. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5α cells following manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as pSE180 (FIGURE 3; ATCC 209605).

pSE180 was transformed into *S. lividans* TK64 and transformed colonies identified by resistance to thiostrepton and erythromycin. pSE180 was isolated from *S. lividans* and used to transform *S. avermitilis* protoplasts. Four thiostrepton resistant *S. avermitilis* transformants were identified, and protoplasts were prepared and plated under non-selective conditions on RM14 media. After the protoplasts had regenerated, single colonies were screened for the presence of erythromycin resistance and the absence of thiostrepton resistance, indicating

chromosomal integration of the inactivated *aveC* gene and loss of the free replicon. One Erm^r Thio^s transformant was identified and designated as strain SE180-11. Total chromosomal DNA was isolated from strain SE180-11, digested with restriction enzymes *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, or *Sph*I, resolved by electrophoresis on a 0.8% agarose gel, transferred to nylon membranes, and hybridized to the *ermE* probe. These analyses showed that chromosomal integration of the *ermE* resistance gene, and concomitant deletion of the 640 bp *Pst*I/*Sph*I fragment had occurred by a double crossover event. HPLC analysis of fermentation products of strain SE180-11 showed that normal avermectins were no longer produced (FIGURE 5A).

In a second method for inactivating the *aveC* gene, the 1.7 Kb *ermE* gene was removed from the chromosome of *S. avermitilis* strain SE180-11, leaving a 640 bp *Pst*I/*Sph*I deletion in the *aveC* gene. A gene replacement plasmid was constructed as follows: pSE180 was partially digested with *Xba*I and an ~11.4 Kb fragment purified from the gel. The ~11.4 Kb band lacks the 1.7 Kb *ermE* resistance gene. The DNA was then ligated and transformed into *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid, which was designated as pSE184, was transformed into *E. coli* DM1, and plasmid DNA isolated from ampicillin resistant transformants. This plasmid was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Protoplasts were prepared from thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 and were plated as single colonies on RM14. After the protoplasts had regenerated, single colonies were screened for the absence of both erythromycin resistance and thiostrepton resistance, indicating chromosomal integration of the inactivated *aveC* gene and loss of the free replicon containing the *ermE* gene. One Erm^s Thio^s transformant was identified and designated as SE184-1-13. Fermentation analysis of SE184-1-13 showed that normal avermectins were not produced and that SE184-1-13 had the same fermentation profile as SE180-11.

In a third method for inactivating the *aveC* gene, a frameshift was introduced into the chromosomal *aveC* gene by adding two G's after the C at nt position 471 using PCR, thereby creating a *Bsp*E1 site. The presence of the engineered *Bsp*E1 site was useful in detecting the gene replacement event. The PCR primers were designed to introduce a frameshift mutation into the *aveC* gene, and were supplied by Genosys Biotechnologies, Inc. The rightward primer was: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID NO:8) and the leftward primer was: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID NO:9). The PCR conditions were as described in Section 7.1.10 above. The 666 bp PCR product was digested with *Sph*I to give

6521800 - 5934409

two fragments of 278 bp and 388 bp, respectively. The 388 bp fragment was purified from the gel.

The gene replacement plasmid was constructed as follows: shuttle vector pWHM3 was digested with *Eco*RI and *Bam*HI. pSE119 was digested with *Bam*HI and *Sph*I, the digest electrophoresed, and a ~840 bp fragment was purified from the gel. pSE119 was digested with *Eco*RI and *Xmn*I, the digest was resolved by electrophoresis, and a ~1.7 Kb fragment was purified from the gel. All four fragments (*i.e.*, ~7.2 Kb, ~840 bp, ~1.7 Kb, and 388 bp) were ligated together in a 4-way ligation. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis and DNA sequence analysis. This plasmid, which was designated as pSE185, was transformed into *E. coli* DM1 and plasmid DNA isolated from ampicillin resistant transformants. This plasmid was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain 1100-SC38. Thiostrepton resistant transformants of strain 1100-SC38 were isolated and analyzed by HPLC analysis of fermentation products. pSE185 did not significantly alter the B2:B1 avermectin ratios when transformed into *S. avermitilis* strain 1100-SC38 (TABLE 2).

pSE185 was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* to generate a frameshift mutation in the chromosomal *aveC* gene. Protoplasts were prepared from thiostrepton resistant transformants and plated as single colonies on RM14. After the protoplasts had regenerated, single colonies were screened for the absence of thiostrepton resistance. Chromosomal DNA from thiostrepton sensitive colonies was isolated and screened by PCR for the presence of the frameshift mutation integrated into the chromosome. The PCR primers were designed based on the *aveC* nucleotide sequence, and were supplied by Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). The rightward PCR primer was: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO:10) and the leftward PCR primer was: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID NO:11), and the PCR conditions were as described in Section 7.1.10 above. The PCR product obtained was 543 bp and, when digested with *Bsp*E1, three fragments of 368 bp, 96 bp, and 79 bp were observed, indicating chromosomal integration of the inactivated *aveC* gene and loss of the free replicon.

Fermentation analysis of *S. avermitilis* mutants containing the frameshift mutation in the *aveC* gene showed that normal avermectins were no longer produced, and that these mutants had the same fermentation HPLC profile as strains SE180-11 and SE184-1-13. One Thio^R transformant was identified and designated as strain SE185-5a.

5,252,492 10/12/93

Additionally, a mutation in the *aveC* gene that changes nt position 520 from G to A, which results in changing the codon encoding a tryptophan (W) at position 116 to a termination codon, was produced. An *S. avermitilis* strain with this mutation did not produce normal avermectins and had the same fermentation profile as strains SE180-11, SE184-1-13, and SE185-5a.

Additionally, mutations in the *aveC* gene that change both: (i) nt position 970 from G to A, which changes the amino acid at position 266 from a glycine (G) to an aspartate (D), and (ii) nt position 996 from T to C, which changes the amino acid at position 275 from tyrosine (Y) to histidine (H), were produced. An *S. avermitilis* strain with these mutations (G256D/Y275H) did not produce normal avermectins and had the same fermentation profile as strains SE180-11, SE184-1-13, and SE185-5a.

The *S. avermitilis aveC* inactivation mutant strains SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a, and others provided herewith, provide screening tools to assess the impact of other mutations in the *aveC* gene. pSE186, which contains a wild-type copy of the *aveC* gene, was transformed into *E. coli* DM1, and plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants. This pSE186 DNA was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined, and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by HPLC analysis of fermentation products. The presence of the functional *aveC* gene *in trans* was able to restore normal avermectin production to strain SE180-11 (FIGURE 5B).

8.2. Analysis Of Mutations In The *aveC* Gene That Alter Class B2:B1 Ratios

As described above, *S. avermitilis* strain SE180-11 containing an inactive *aveC* gene was complemented by transformation with a plasmid containing a functional *aveC* gene (pSE186). Strain SE180-11 was also utilized as a host strain to characterize other mutations in the *aveC* gene, as described below.

Chromosomal DNA was isolated from strain 1100-SC38, and used as a template for PCR amplification of the *aveC* gene. The 1.2 Kb ORF was isolated by PCR amplification using primers designed on the basis of the *aveC* nucleotide sequence. The rightward primer was SEQ ID NO:6 and the leftward primer was SEQ ID NO:7 (see Section 7.1.10, above). The PCR and subcloning conditions were as described in Section 7.1.10. DNA sequence analysis of the 1.2 Kb ORF shows a mutation in the *aveC* gene that changes nt position 337 from C to T, which changes the amino acid at position 55 from serine (S) to phenylalanine (F).

The *aveC* gene containing the S55F mutation was subcloned into pWHM3 to produce a plasmid which was designated as pSE187, and which was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined, and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by HPLC analysis of fermentation products. The presence of the *aveC* gene encoding a change at amino acid residue 55 (S55F) was able to restore normal avermectin production to strain SE180-11 (Fig. 5C); however, the cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 ratio was about 26:1, as compared to strain SE180-11 transformed with pSE186, which had a ratio of B2:B1 of about 1.6:1 (TABLE 3), indicating that the single mutation (S55F) modulates the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1.

Another mutation in the *aveC* gene was identified that changes nt position 862 from G to A, which changes the amino acid at position 230 from glycine (G) to aspartate (D). An *S. avermitilis* strain having this mutation (G230D) produces avermectins at a B2:B1 ratio of about 30:1.

8.3. Mutations That Reduce The B2:B1 Ratio

Several mutations were constructed that reduce the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1, as follows.

A mutation in the *aveC* gene was identified that changes nt position 588 from G to A, which changes the amino acid at position 139 from alanine (A) to threonine (T). The *aveC* gene containing the A139T mutation was subcloned into pWHM3 to produce a plasmid which was designated pSE188, and which was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined, and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by HPLC analysis of fermentation products. The presence of the mutated *aveC* gene encoding a change at amino acid residue 139 (A139T) was able to restore avermectin production to strain SE180-11 (FIGURE 5D); however, the B2:B1 ratio was about 0.94:1, indicating that this mutation reduces the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1. This result was unexpected because published results, as well as the results of mutations described above, have only demonstrated either inactivation of the *aveC* gene or increased production of the B2 form of avermectin relative to the B1 form (TABLE 3).

Because the A139T mutation altered the B2:B1 ratios in the more favorable B1 direction, a mutation was constructed that encoded a threonine instead of a serine at amino acid position 138. Thus, pSE186 was digested with *Eco*RI and cloned into pGEM3Zf (Promega) which had been digested with *Eco*RI. This plasmid, which was designated as

6021980 - 54984109

pSE186a, was digested with *Apa*I and *Kpn*I, the DNA fragments separated on an agarose gel, and two fragments of ~3.8 Kb and ~0.4 Kb were purified from the gel. The ~1.2 Kb insert DNA from pSE186 was used as a PCR template to introduce a single base change at nt position 585. The PCR primers were designed to introduce a mutation at nt position 585, and were supplied by Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). The rightward PCR primer was: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID NO: 12); and the leftward PCR primer was: 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID NO:13). The PCR reaction was carried out using an Advantage GC genomic PCR kit (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) in buffer provided by the manufacturer in the presence of 200 µM dNTPs, 200 pmol of each primer, 50 ng template DNA, 1.0 M GC-Melt and 1 unit KlenTaq Polymerase Mix in a final volume of 50 µl. The thermal profile of the first cycle was 94°C for 1 min; followed by 25 cycles of 94°C for 30 sec and 68°C for 2 min; and 1 cycle at 68°C for 3 min. A PCR product of 295 bp was digested with *Apa*I and *Kpn*I to release a 254 bp fragment, which was resolved by electrophoresis and purified from the gel. All three fragments (~3.8 Kb, ~0.4 Kb and 254 bp) were ligated together in a 3-way ligation. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as pSE198.

pSE198 was digested with *Eco*RI, cloned into pWHM3, which had been digested with *Eco*RI, and transformed into *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis and DNA sequence analysis. This plasmid DNA was transformed into *E. coli* DM1, plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid, which was designated as pSE199, was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined, and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by HPLC analysis of fermentation products. The presence of the mutated *aveC* gene encoding a change at amino acid residue 138 (S138T) was able to restore normal avermectin production to strain SE180-11; however, the B2:B1 ratio was 0.88:1 indicating that this mutation reduces the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1 (TABLE 3). This B2:B1 ratio is even lower than the 0.94:1 ratio observed with the A139T mutation produced by transformation of strain SE180-11 with pSE188, as described above.

Another mutation was constructed to introduce a threonine at both amino acid positions 138 and 139. The ~1.2 Kb insert DNA from pSE186 was used as a PCR template. The PCR primers were designed to introduce mutations at nt positions 585 and 588, and were supplied by Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). The rightward PCR primer was: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID NO:14); and the leftward PCR primer was: 5'-GGAACATCACGGCATTCACC-3' (SEQ ID NO:15). The PCR reaction was performed using the conditions described immediately above in this Section. A PCR product of 449 bp was digested with *Apa*I and *Kpn*I to release a 254 bp fragment, which was resolved by electrophoresis and purified from the gel. pSE186a was digested with *Apa*I and *Kpn*I, the DNA fragments separated on an agarose gel, and two fragments of ~3.8 Kb and ~0.4 Kb were purified from the gel. All three fragments (~3.8 Kb, ~0.4 Kb and 254 bp) were ligated together in a 3-way ligation, and the ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as pSE230.

pSE230 was digested with *Eco*RI, cloned into pWHM3, which had been digested with *Eco*RI, and transformed into *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis and DNA sequence analysis. This plasmid DNA was transformed into *E. coli* DM1, plasmid DNA isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid, which was designated as pSE231, was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined, and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by fermentation. The presence of the double mutated *aveC* gene, encoding S138T/A139T, was able to restore normal avermectin production to strain SE180-11; however, the B2:B1 ratio was 0.84:1 showing that this mutation further reduces the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1 (TABLE 3), over the reductions provided by transformation of strain SE180-11 with pSE188 or pSE199, as described above.

Another mutation was constructed to further reduce the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1. Because the S138T/A139T mutations altered the B2:B1 ratios in the more favorable B1 direction, a mutation was constructed to introduce a threonine at amino acid position 138 and a phenylalanine at amino acid position 139. The ~1.2 Kb insert DNA from pSE186 was used as a PCR template. The PCR primers were designed to

introduce mutations at nt positions 585 (changing a T to A), 588 (changing a G to T), and 589 (changing a C to T), and were supplied by Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). The rightward PCR primer was: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGC TGGCGACGTTC-3' (SEQ ID NO:25); and the leftward PCR primer was: 5'-GGAACATCACGGCATTCACC-3' (SEQ ID NO:15). The PCR reaction was carried out using an Advantage GC genomic PCR kit (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) in buffer provided by the manufacturer in the presence of 200 μM dNTPs, 200 pmol of each primer, 50 ng template DNA, 1.1 mM Mg acetate, 1.0 M GC-Melt and 1 unit Tth DNA Polymerase in a final volume of 50 μl. The thermal profile of the first cycle was 94°C for 1 min; followed by 25 cycles of 94°C for 30 sec and 68°C for 2 min; and 1 cycle at 68°C for 3 min. A PCR product of 449 bp was digested with *Apa*I and *Kpn*I to release a 254 bp fragment, which was resolved by electrophoresis and purified from the gel. All three fragments (~3.8 Kb, ~0.4 Kb and 254 bp) were ligated together in a 3-way ligation. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid was designated as pSE238.

pSE238 was digested with *Eco*RI, cloned into pWHM3, which had been digested with *Eco*RI, and transformed into *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis and DNA sequence analysis. This plasmid DNA was transformed into *E. coli* DM1, plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid, which was designated as pSE239, was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined, and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by HPLC analysis of fermentation products. The presence of the double mutated *aveC* gene encoding S138T/A139F was able to restore normal avermectin production to strain SE180-11; however, the B2:B1 ratio was 0.75:1 showing that this mutation further reduced the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1 (TABLE 3) over the reductions provided by transformation of strain SE180-11 with pSE188, pSE199, or pSE231 as described above.

TABLE 3

S. avermitilis strain (transforming plasmid)	No. Transformants Tested	Relative B2 Conc.	Relative B1 Conc.	Avg. B2:B1 Ratio
SE180-11 (none)	30	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	26	222	140	1.59
SE180-11 (pSE187)	12	283	11	26.3
SE180-11 (pSE188)	24	193	206	0.94
SE180-11 (pSE199)	18	155	171	0.88
SE180-11 (pSE231)	6	259	309	0.84
SE180-11 (pSE239)	20	184	242	0.75

Additional mutations were constructed to further reduce the amount of cyclohexyl-B2 produced relative to cyclohexyl-B1 using the technique of DNA shuffling as described in Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; and Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; and further described in United States Patents 5605793, 5811238, 5830721, and 5837458.

DNA shuffled plasmids containing mutated *aveC* genes were transformed into competent *dam dcm E. coli* cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated and screened for the production of avermectins with a cyclohexyl-B2:cyclohexyl-B1 ratio of 1:1 or less. The DNA sequence of plasmid DNA from SE180-11 transformants producing avermectins with a B2:B1 ratio of 1:1 or less was determined.

Eight transformants were identified that produced reduced amounts of cyclohexyl-B2 relative to cyclohexyl-B1. The lowest B2:B1 ratio achieved among these transformants was 04:1 (TABLE 4). Plasmid DNA was isolated from each of the eight transformants and the DNA sequence determined to identify the mutations in the *aveC* gene. The mutations are as follows.

pSE290 contains 4 nucleotide mutations at nt position 317 from T to A, at nt position 353 from C to A, at nt position 438 from G to A, and at nt position 1155 from T to A. The nucleotide change at nt position 317 changes the amino acid at AA position 48 from D to E and the nucleotide change at nt position 438 changes the amino acid at AA position 89 from A to T. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.42:1 (TABLE 4).

pSE291 contains 4 nucleotide mutations at nt position 272 from G to A, at nt position 585 from T to A, at nt position 588 from G to A, and at nt position 708 from G to A. The nucleotide change at nt position 585 changes the amino acid at AA position 138 from S to T, the nucleotide change at nt position 588 changes the amino acid at AA position 139 from A to T, and the nucleotide change at nt position 708 changes the amino acid at AA position 179 from G to S. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.57:1 (TABLE 4).

pSE292 contains the same four nucleotide mutations as pSE290. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.40:1 (TABLE 4).

pSE293 contains 6 nucleotide mutations at nt 24 from A to G, at nt position 286 from A to C, at nt position 497 from T to C, at nt position 554 from C to T, at nt position 580 from T to C, and at nt position 886 from A to T. The nucleotide change at nt position 286 changes the amino acid at AA position 38 from Q to P, the nucleotide change at nt position 580 changes the amino acid at AA position 136 from L to P, and the nucleotide change at nt position 886 changes the amino acid at AA position 238 from E to D. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.68:1 (TABLE 4).

pSE294 contains 6 nucleotide mutations at nt 469 from T to C, at nt position 585 from T to A, at nt position 588 from G to A, at nt position 708 from G to A, at nt position 833 from C to T, and at nt position 1184 from G to A. In addition, nts at positions 173, 174, and 175 are deleted. The nucleotide change at nt position 469 changes the amino acid at AA position 99 from F to S, the nucleotide change at nt position 585 changes the amino acid at AA position 138 from S to T, the nucleotide change at nt position 588 changes the amino acid at AA position 139 from A to T, and the nucleotide change at nt position 708 changes the amino acid from AA position 179 from G to S. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.53:1 (TABLE 4).

pSE295 contains 2 nucleotide mutations at nt 588 from G to A and at nt 856 from T to C. The nucleotide change at nt position 588 changes the amino acid at AA position 139 from A to T and the nucleotide change at nt position 856 changes the amino acid at AA position 228 from M to T. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.80:1 (TABLE 4).

pSE296 contains 5 nucleotide mutations at nt position 155 from T to C, at nt position 505 from G to T, at nt position 1039 from C to T, at nt position 1202 from C to T, and at nt position 1210 from T to C. The nucleotide change at nt position 505 changes the amino acid at AA position 111 from G to V and the nucleotide change at nt position 1039 changes the

amino acid at AA position 289 from P to L. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.73:1 (TABLE 4).

pSE297 contains 4 nucleotide mutations at nt position 377 from G to T, at nt position 588 from G to A, at nt position 633 from A to G, and at nt position 1067 from A to T. The nucleotide change at nt position 588 changes the amino acid at AA position 139 from A to T, the nucleotide change at nt position 633 changes the amino acid at AA position 154 from K to E, and the nucleotide change at nt position 1067 changes the amino acid at AA position 298 from Q to H. The B2:B1 ratio produced by cells carrying this plasmid was 0.67:1 (TABLE 4).

TABLE 4

S. avermitilis strain (transforming plasmid)	No. Transformants Tested	Relative B2 Conc.	Relative B1 Conc.	Avg. B2:B1 Ratio
SE180-11 (none)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0.42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0.57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0.40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0.68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0.53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0.80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0.73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0.67

9. EXAMPLE: CONSTRUCTION OF 5' DELETION MUTANTS

As explained in Section 5.1, above, the *S. avermitilis* nucleotide sequence shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1) comprises four different GTG codons at bp positions 42, 174, 177 and 180 which are potential start sites. This section describes the construction of multiple deletions of the 5' region of the *aveC* ORF (FIGURE 1; SEQ ID NO:1) to help define which of these codons could function as start sites in the *aveC* ORF for protein expression.

5627803 "5384T09

Fragments of the *aveC* gene variously deleted at the 5' end were isolated from *S. avermitilis* chromosomal DNA by PCR amplification. The PCR primers were designed based on the *aveC* DNA sequence, and were supplied by Genosys Biotechnologies, Inc. The rightward primers were 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID NO:16) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID NO:17) (D1F2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID NO:18) (D1F3); and 5'-TGCAGGCGTACGTGTTCAGC-3' (SEQ ID NO:19) (D2F2). The leftward primers were 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID NO:20); 5'-CATGAT CGCTGAACCGAGGA-3' (SEQ ID NO:21); and 5'-AGGAGTGTGGTGCGTCTGGA-3' (SEQ. ID NO:22). The PCR reaction was carried out as described in Section 8.3, above.

The PCR products were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel and single DNA bands of either ~1.0 Kb or ~1.1 Kb were detected. The PCR products were purified from the gel and ligated with 25 ng of linearized pCR2.1 vector (Invitrogen) in a 1:10 molar vector-to-insert ratio following the manufacturer's instructions. The ligation mixtures were used to transform One Shot™ Competent *E. coli* cells (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the insert was confirmed by restriction analysis and DNA sequence analysis. These plasmids were designated as pSE190 (obtained with primer D1F1), pSE191 (obtained with primer D1F2), pSE192 (obtained with primer D1F3), and pSE193 (obtained with primer D2F2).

The insert DNAs were each digested with *Bam*HI/*Xba*I, separated by electrophoresis, purified from the gel, and separately ligated with shuttle vector pWHM3, which had been digested with *Bam*HI/*Xba*I, in a total DNA concentration of 1 µg in a 1:5 molar vector-to-insert ratio. The ligation mixtures were used to transform competent *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the insert was confirmed by restriction analysis. These plasmids, which were designated as pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3), and pSE197 (D2F2), were each separately transformed into *E. coli* strain DM1, plasmid DNA isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert confirmed by restriction analysis. This DNA was used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined, and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by HPLC analysis of fermentation products to determine which GTG sites were necessary for *ave*C expression. The results indicate that the GTG codon at position 42 can be eliminated without affecting *ave*C expression, since pSE194, pSE195, and pSE196, each of which lack the GTG site at

position 42, but which all contain the three GTG sites at positions 174, 177, and 180, were each able to restore normal avermectin production when transformed into SE180-11. Normal avermectin production was not restored when strain SE180-11 was transformed with pSE197, which lacks all four of the GTG sites (TABLE 5).

TABLE 5

S. avermitilis strain (transforming plasmid)	No. transformants tested	Relative B2 Conc.	Relative B1 Conc.	Avg. B2:B1 Ratio
SE180-11 (none)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1.58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2.43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1.97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1.58
SE180-11 (pSE197)	12	0	0	0

10. EXAMPLE: CLONING OF *aveC* HOMOLOGS FROM *S. HYGROSCOPICUS* AND *S. GRISEOCHROMOGENES*

The present invention allows *aveC* homolog genes from other avermectin- or milbemycin-producing species of *Streptomyces* to be identified and cloned. For example, a cosmid library of *S. hygroscopicus* (FERM BP-1901) genomic DNA was hybridized with the 1.2 Kb *aveC* probe from *S. avermitilis* described above. Several cosmid clones were identified that hybridized strongly. Chromosomal DNA was isolated from these cosmids, and a 4.9 Kb *Kpn*I fragment was identified that hybridized with the *aveC* probe. This DNA was sequenced and an ORF (SEQ ID NO:3) was identified having significant homology to the *aveC* ORF of *S. avermitilis*. An amino acid sequence (SEQ ID NO:4) deduced from the *S. hygroscopicus aveC* homolog ORF is presented in FIGURE 6.

In addition, a cosmid library of *S. griseochromogenes* genomic DNA was hybridized with the 1.2 Kb *aveC* probe from *S. avermitilis* described above. Several cosmid clones were identified that hybridized strongly. Chromosomal DNA was isolated from these cosmids, and a 5.4 Kb *Pst*I fragment was identified that hybridized with the *aveC* probe. This DNA was sequenced and an *aveC* homolog partial ORF was identified having significant homology to

the *aveC* ORF of *S. avermitilis*. A deduced partial amino acid sequence (SEQ ID NO:5) is presented in FIGURE 6.

DNA and amino acid sequence analysis of the *aveC* homologs from *S. hygroscopicus* and *S. griseochromogenes* indicates that these regions share significant homology (~50% sequence identity at the amino acid level) both to each other and to the *S. avermitilis aveC* ORF and AveC gene product (FIGURE 6).

11. EXAMPLE: CONSTRUCTION OF A PLASMID WITH THE *aveC* GENE BEHIND THE *ermE* PROMOTER

The 1.2 Kb *aveC* ORF from pSE186 was subcloned in pSE34, which is the shuttle vector pWHM3 having the 300 bp *ermE* promoter inserted as a *KpnI/BamHI* fragment in the *KpnI/BamHI* site of pWHM3 (see Ward *et al.*, 1986, Mol. Gen. Genet. 203:468-478). pSE186 was digested with *BamHI* and *HindIII*, the digest resolved by electrophoresis, and the 1.2 Kb fragment was isolated from the agarose gel and ligated with pSE34, which had been digested with *BamHI* and *HindIII*. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5α cells according to manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the 1.2 Kb insert was confirmed by restriction analysis. This plasmid, which was designated as pSE189, was transformed into *E. coli* DM1, and plasmid DNA isolated from ampicillin resistant transformants. Protoplasts of *S. avermitilis* strain 1100-SC38 were transformed with pSE189. Thiostrepton resistant transformants of strain 1100-SC38 were isolated and analyzed by HPLC analysis of fermentation products.

S. avermitilis strain 1100-SC38 transformants containing pSE189 were altered in the ratios of avermectin cyclohexyl-B2:avermectin cyclohexyl-B1 produced (about 3:1) compared to strain 1100-SC38 (about 34:1), and total avermectin production was increased approximately 2.4-fold compared to strain 1100-SC38 transformed with pSE119 (TABLE 6).

pSE189 was also transformed into protoplasts of a wild-type *S. avermitilis* strain. Thiostrepton resistant transformants were isolated and analyzed by HPLC analysis of fermentation products. Total avermectins produced by *S. avermitilis* wild-type transformed with pSE189 were increased approximately 2.2-fold compared to wild-type *S. avermitilis* transformed with pSE119 (TABLE 6).

TABLE 6

S. avermitilis strain (transforming plasmid)	No. Trans-formants Tested	Relative [B2]	Relative [B1]	Relative Total Avermectins	Avg. B2:B1 Ratio

S. avermitilis strain (transforming plasmid)	No. Trans-formants Tested	Relative [B2]	Relative [B1]	Relative Total Avermectins	Avg. B2:B1 Ratio
1100-SC38	6	155	4.8	176	33.9
1100-SC38 (pSE118)	9	239	50.3	357	4.7
1100-SC38 (pSE189)	16	548	166	849	3.3
wild type	6	59	42	113	1.41
wild type (pSE119)	6	248	151	481	1.64
wild type (pSE189)	5	545	345	1,071	1.58

05280 "5T534T05

12. EXAMPLE: CHIMERIC PLASMID CONTAINING SEQUENCES FROM BOTH *S. AVERMITILIS aveC* ORF AND *S. HYGROSCOPICUS aveC* HOMOLOG

A hybrid plasmid designated as pSE350 was constructed that contains a 564 bp portion of the *S. hygroscopicus aveC* homolog replacing a 564 bp homologous portion of the *S. avermitilis aveC* ORF (FIGURE 7), as follows. pSE350 was constructed using a *Bsa*AI restriction site that is conserved in both sequences (*aveC* position 225), and a *Kpn*I restriction site that is present in the *S. avermitilis aveC* gene (*aveC* position 810). The *Kpn*I site was introduced into the *S. hygroscopicus* DNA by PCR using the rightward primer 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTCG-3' (SEQ ID NO:23) and the leftward primer 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEQ ID NO:24) (supplied by Genosys Biotechnologies) using PCR conditions described in Section 7.1.10, above. The PCR product was digested with *Bsa*AI and *Kpn*I, the fragments were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel, and the 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment was isolated from the gel. pSE179 (described in Section 7.1.10, above) was digested with *Kpn*I and *Hin*dIII, the fragments separated by electrophoresis in a 1% agarose gel, and a fragment of ~4.5 Kb was isolated from the gel. pSE179 was digested with *Hin*dIII and *Bsa*AI, the fragments separated by electrophoresis in a 1% agarose gel, and a ~0.2 Kb *Bsa*AI/*Hin*dIII fragment isolated from the gel. The ~4.5 Kb *Hin*dIII/*Kpn*I fragment, the ~0.2 Kb *Bsa*AI/*Hin*dIII fragment, and the 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment from *S. hygroscopicus* were ligated together in a 3-way ligation and the ligation mixture transformed into competent *E. coli* DH5α cells. Plasmid DNA was isolated from

ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis using *Kpn*I and *Ava*I. This plasmid was digested with *Hin*dIII and *Xba*I to release the 1.2 Kb insert, which was then ligated with pWHM3 which had been digested with *Hin*dIII and *Xba*I. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5α cells, plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis using *Hin*dIII and *Ava*I. This plasmid DNA was transformed into *E. coli* DM1, plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants, and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis and DNA sequence analysis. This plasmid was designated as pSE350 and used to transform protoplasts of *S. avermitilis* strain SE180-11. Thiostrepton resistant transformants of strain SE180-11 were isolated, the presence of erythromycin resistance was determined and Thio^r Erm^r transformants were analyzed by HPLC analysis of fermentation products. Results show that transformants containing the *S. avermitilis/S. hygroscopicus* hybrid plasmid have an average B2:B1 ratio of about 109:1 (TABLE 7).

TABLE 7

S. avermitilis strain (transforming plasmid)	No. transformants tested	Relative B2 Conc.	Relative B1 Conc.	Avg. B2:B1 Ratio
SE180-11 (none)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIALS

The following biological material was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) at 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, on January 29, 1998, and was assigned the following accession numbers:

Plasmid	Accession No.
plasmid pSE180	209605
plasmid pSE186	209604

All patents, patent applications, and publications cited above are incorporated herein by reference in their entirety.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiment described herein, which are intended as single illustrations of individual aspects of the invention, and functionally equivalent methods and components are within the scope of the invention. Indeed, various modifications of the invention, in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that is otherwise the same as the *Streptomyces avermitilis aveC* allele, the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or the nucleotide sequence of the *aveC* ORF of *S. avermitilis* as presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO:1), or a degenerate variant thereof, but which nucleotide sequence further comprises one or more mutations encoding an amino acid substitution at one or more of amino acid residues 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289, or 298 of SEQ ID NO:2, such that cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 in which the wild-type *aveC* allele has been inactivated and that express the polynucleotide molecule comprising the mutated nucleotide sequence produce a class 2:1 ratio of avermectins that is different from the ratio produced by cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 that instead express only the wild-type *aveC* allele.

2. The polynucleotide molecule of claim 1, wherein the class 2:1 avermectins are cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 avermectins.

3. The polynucleotide molecule of claim 2, wherein the different class 2:1 ratio of avermectins is a reduced ratio compared to the class 2:1 ratio produced by cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 that instead express only the wild-type *aveC* allele.

4. The polynucleotide molecule of claim 3, wherein the ratio of class 2:1 avermectins is about 0.8:1 or less.

5. The polynucleotide molecule of claim 3, wherein the ratio of class 2:1 avermectins is about 0.68:1 or less.

6. The polynucleotide molecule of claim 3, wherein the ratio of class 2:1 avermectins is about 0.53:1 or less.

7. The polynucleotide molecule of claim 3, wherein the ratio of class 2:1 avermectins is about 0.42:1 or less.

8. The polynucleotide molecule of claim 3, wherein the ratio of class 2:1 avermectins is about 0.40:1 or less.

9. The polynucleotide molecule of claim 2, wherein the amino acid substitutions are selected from one or more of the group consisting of:

(a) amino acid residue Q at position 38 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(b) amino acid residue D at position 48 replaced by E or by an amino acid that is a conservative substitution for E;

60148545.080299

(c) amino acid residue A at position 89 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(d) amino acid residue F at position 99 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

(e) amino acid residue G at position 111 replaced by V or by an amino acid that is a conservative substitution for V;

(f) amino acid residue L at position 136 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(g) amino acid residue K at position 154 replaced by E or by an amino acid that is a conservative substitution for E;

(h) amino acid residue G at position 179 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

(i) amino acid residue M at position 228 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(j) amino acid residue E at position 238 replaced by D or by an amino acid that is a conservative substitution for D;

(k) amino acid residue P at position 289 replaced by L or by an amino acid that is a conservative substitution for L; and

(l) amino acid residue Q at position 298 replaced by H or by an amino acid that is a conservative substitution for H.

10. The polynucleotide molecule of claim 9, wherein a combination of amino acid residues is mutated, and wherein the combination is selected from one or more of the group consisting of:

(a) amino acid residues D48 and A89;

(b) amino acid residues S138, A139 and G179;

(c) amino acid residues Q38, L136 and E238;

(d) amino acid residues F99, S138, A139 and G179;

(e) amino acid residues A139 and M228;

(f) amino acid residues G111 and P289; and

(g) amino acid residues A139, K154 and Q298.

11. The polynucleotide molecule of claim 10, wherein the combination of amino acid substitutions are selected from one or more of the group consisting of:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111V/P289L; and

(g) A139T/K154E/Q298H.

12. The polynucleotide molecule of claim 11, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding D48E/A89T comprise a base change from T to A at nucleotide position 317, and a base change from G to A at nucleotide position 438.

13. The polynucleotide molecule of claim 12, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding D48E/A89T further comprise a base change from C to A at nucleotide position 353, and a base change from T to A at nucleotide position 1155.

14. The polynucleotide molecule of claim 11, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding S138T/A139T/G179S comprise a base change from T to A at nucleotide position 585, a base change from G to A at nucleotide position 588, and a base change from G to A at nucleotide position 708.

15. The polynucleotide molecule of claim 14, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding S138T/A139T/G179S further comprise a base change from G to A at nucleotide position 272.

16. The polynucleotide molecule of claim 11, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding Q38P/L136P/E238D comprise a base change from A to C at nucleotide position 286, a base change from T to C at nucleotide position 580, and a base change from A to T at nucleotide position 886.

17. The polynucleotide molecule of claim 16, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding Q38P/L136P/E238D further comprise a base change from A to G at nucleotide position 24, a base change from T to C at nucleotide position 497, and a base change from C to T at nucleotide position 554.

18. The polynucleotide molecule of claim 11, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding F99S/S138T/A139T/G179S comprise a 3 base pair deletion at nucleotide positions 173, 174 and 175, a base change from T to C at nucleotide position 489, a base change from T to A at nucleotide position 585, a base change from G to A at nucleotide position 588, and a base change from G to A at nucleotide position 708.

19. The polynucleotide molecule of claim 18, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding F99S/S138T/A139T/G179S further comprise a base change from C to T at nucleotide position 833, and a base change from G to A at nucleotide position 1184.

9621804.5 08/15/09

20. The polynucleotide molecule of claim 11, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding A139T/M228T comprise a base change from G to A at nucleotide position 588, and a base change from T to C at nucleotide position 856.

21. The polynucleotide molecule of claim 11, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding G111V/P289L comprise a base change from G to T at nucleotide position 505, and a base change from C to T at nucleotide position 1039.

22. The polynucleotide molecule of claim 21, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding G111V/P289L further comprise a base change from T to C at nucleotide position 155, a base change from C to T at nucleotide position 1202, and a base change from T to C at nucleotide position 1210.

23. The polynucleotide molecule of claim 11, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding A139T/K154E/Q298H comprise a base change from G to A at nucleotide position 588, a base change from A to G at nucleotide position 633, and a base change from A to T at nucleotide position 1067.

24. The polynucleotide molecule of claim 23, wherein the mutations in the *aveC* sequence encoding A139T/K154E/Q298H further comprise a base change from G to T at nucleotide position 377.

25. A recombinant vector comprising the polynucleotide molecule of claim 1.

26. A host cell comprising the polynucleotide molecule of claim 1 or the recombinant vector of claim 25.

27. The host cell of claim 26, which is a *Streptomyces* cell.

28. A method for making a novel strain of *S. avermitilis*, comprising transforming cells of a strain of *S. avermitilis* with a polynucleotide molecule or recombinant vector capable of introducing a mutation into the *aveC* allele of such cells, wherein the mutation to the *aveC* allele results in the substitution in the AveC gene product of a different amino acid residue at one or more amino acid positions corresponding to amino acid residues 38, 48, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 238, 289 or 298 of SEQ ID NO:2, such that cells of the *S. avermitilis* strain in which the *aveC* allele has been so mutated produce a class 2:1 ratio of avermectins that is different from the ratio produced by cells of the same *S. avermitilis* strain but that instead express only the wild-type *aveC* allele.

29. The method of claim 28, wherein the class 2:1 avermectins are cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 avermectins.

30. The method of claim 29, wherein the different class 2:1 ratio of avermectins is a reduced ratio.

6627801.5h58hT09

31. The method of claim 30, wherein the ratio of class 2:1 avermectins produced by cells of the *S. avermitilis* strain in which the *aveC* allele has been so mutated is about 0.8:1 or less.

32. The method of claim 30, wherein the ratio of class 2:1 avermectins produced by cells of the *S. avermitilis* strain in which the *aveC* allele has been so mutated is about 0.68:1 or less.

33. The method of claim 30, wherein the ratio of class 2:1 avermectins produced by cells of the *S. avermitilis* strain in which the *aveC* allele has been so mutated is about 0.53:1 or less.

34. The method of claim 30, wherein the ratio of class 2:1 avermectins produced by cells of the *S. avermitilis* strain in which the *aveC* allele has been so mutated is about 0.42:1 or less.

35. The method of claim 30, wherein the ratio of class 2:1 avermectins produced by cells of the *S. avermitilis* strain in which the *aveC* allele has been so mutated is about 0.40:1 or less.

36. The method of claim 29, wherein the amino acid substitutions are selected from one or more of the group consisting of:

(a) amino acid residue Q at position 38 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(b) amino acid residue D at position 48 replaced by E or by an amind acid that is a conservative substitution for E;

(c) amino acid residue A at position 89 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(d) amino acid residue F at position 99 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

(e) amino acid residue G at position 111 replaced by V or by an amino acid that is a conservative substitution for V;

(f) amino acid residue L at position 136 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(g) amino acid residue K at position 154 replaced by E or by an amino acid that is a conservative substitution for E;

(h) amino acid residue G at position 179 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

6021200 5h98h09

(i) amino acid residue M at position 228 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(j) amino acid residue E at position 238 replaced by D or by an amino acid that is a conservative substitution for D;

(k) amino acid residue P at position 289 replaced by L or by an amino acid that is a conservative substitution for L; and

(l) amino acid residue Q at position 298 replaced by H or by an amino acid that is a conservative substitution for H.

37. The method of claim 36, wherein the *aveC* allele is mutated to encode amino acid substitutions at a combination of amino acid positions, and wherein the combination is selected from one or more of the group consisting of:

(a) amino acid residues D48 and A89;

(b) amino acid residues S138, A139 and G179;

(c) amino acid residues Q38, L136 and E238;

(d) amino acid residues F99, S138, A139 and G179;

(e) amino acid residues A139 and M228;

(f) amino acid residues G111 and P289; and

(g) amino acid residues A139, K154 and Q298.

38. The method of claim 37, wherein the combination of amino acid substitutions are selected from one or more of the group consisting of:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111V/P289L; and

(g) A139T/K154E/Q298H.

39. The method of claim 38, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding D48E/A89T comprise a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 317 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 438 of SEQ ID NO:1.

40. The method of claim 39, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding D48E/A89T further comprise a base change from C to A at a nucleotide position in the *aveC*

6021805.5v3 9874104

allele corresponding to nt 353 of SEQ ID NO:1, and a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1155 of SEQ ID NO:1.

41. The method of claim 38, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding S138T/A139T/G179S comprise a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 585 of SEQ ID NO:1, a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 708 of SEQ ID NO:1.

42. The method of claim 41, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding S138T/A139T/G179S further comprise a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 272 of SEQ ID NO:1.

43. The method molecule of claim 38, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding Q38P/L136P/E238D comprise a base change from A to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 286 of SEQ ID NO:1, a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 580 of SEQ ID NO:1, and a base change from A to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 886 of SEQ ID NO:1.

44. The method of claim 43, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding Q38P/L136P/E238D further comprise a base change from A to G at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 24 of SEQ ID NO:1, a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 497 of SEQ ID NO:1, and a base change from C to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to 554 of SEQ ID NO:1.

45. The method of claim 38, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding F99S/S138T/A139T/G179S comprise a 3 base pair deletion at nucleotide positions in the *aveC* allele corresponding to nts 173, 174 and 175 of SEQ ID NO:1, a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 469 of SEQ ID NO:1, a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 585 of SEQ ID NO:1, a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 708 of SEQ ID NO:1.

46. The method of claim 45, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding F99S/S138T/A139T/G179S further comprise a base change from C to T at a nucleotide

60218085.1

position in the *aveC* allele corresponding to nt 833 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1184 of SEQ ID NO:1.

47. The method of claim 38, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding A139T/M228T comprise a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, and a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 856 of SEQ ID NO:1.

48. The method of claim 38, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding G111V/P289L comprise a base change from G to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 505 of SEQ ID NO:1, and a base change from C to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1039 of SEQ ID NO:1.

49. The method of claim 48, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding G111V/P289L further comprise a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 155 of SEQ ID NO:1, a base change from C to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1202 of SEQ ID NO:1, and a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1210 of SEQ ID NO:1.

50. The method of claim 38, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding A139T/K154E/Q298H comprise a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, a base change from A to G at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 633 of SEQ ID NO:1, and a base change from A to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1067 of SEQ ID NO:1.

51. The method of claim 50, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding A139T/K154E/Q298H further comprise a base change from G to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 377 of SEQ ID NO:1.

52. A *Streptomyces avermitilis* cell having a mutation in the *aveC* allele that encodes an AveC gene product having a substitution at one or more amino acid positions corresponding to amino acid residues 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289, or 298 of SEQ ID NO:2, wherein the cell produces a class 2:1 ratio of avermectins that is different from the ratio produced by a cell of the same *S. avermitilis* strain but that instead expresses only the wild-type *aveC* allele.

53. The *S. avermitilis* cell of claim 52, wherein the class 2:1 avermectins are cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 avermectins.

54. The *S. avermitilis* cell of claim 53 wherein the different class 2:1 ratio of avermectins is a reduced ratio.

55. The *S. avermitilis* cell of claim 54, which produces a ratio of class 2:1 avermectins of about 0.8:1 or less.

56. The *S. avermitilis* cell of claim 54, which produces a ratio of class 2:1 avermectins of about 0.68:1 or less.

57. The *S. avermitilis* cell of claim 54, which produces a ratio of class 2:1 avermectins of about 0.53:1 or less.

58. The *S. avermitilis* cell of claim 54, which produces a ratio of class 2:1 avermectins of about 0.42:1 or less.

59. The *S. avermitilis* cell of claim 54, which produces a ratio of class 2:1 avermectins of about 0.40:1 or less.

60. The *S. avermitilis* cell of claim 52, wherein the amino acid substitutions are selected from one or more of the group consisting of:

(a) amino acid residue Q at position 38 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(b) amino acid residue D at position 48 replaced by E or by an amino acid that is a conservative substitution for E;

(c) amino acid residue A at position 89 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(d) amino acid residue F at position 99 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

(e) amino acid residue G at position 111 replaced by V or by an amino acid that is a conservative substitution for V;

(f) amino acid residue L at position 136 replaced by P or by an amino acid that is a conservative substitution for P;

(g) amino acid residue K at position 154 replaced by E or by an amino acid that is a conservative substitution for E;

(h) amino acid residue G at position 179 replaced by S or by an amino acid that is a conservative substitution for S;

(i) amino acid residue M at position 228 replaced by T or by an amino acid that is a conservative substitution for T;

(j) amino acid residue E at position 238 replaced by D or by an amino acid that is a conservative substitution for D;

287

(k) amino acid residue P at position 289 replaced by L or by an amino acid that is a conservative substitution for L; and

(l) amino acid residue Q at position 298 replaced by H or by an amino acid that is a conservative substitution for H.

61. The *S. avermitilis* cell of claim 60, wherein the *aveC* allele is mutated to encode amino acid substitutions at a combination of amino acid positions, and wherein the combination is selected from one or more of the group consisting of:

(a) amino acid residues D48 and A89;

(b) amino acid residues S138, A139 and G179;

(c) amino acid residues Q38, L136 and E238;

(d) amino acid residues F99, S138, A139 and G179;

(e) amino acid residues A139 and M228;

(f) amino acid residues G111 and P289; and

(g) amino acid residues A139, K154 and Q298.

62. The *S. avermitilis* cell of claim 61, wherein the combination of amino acid substitutions are selected from one or more of the group consisting of:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111V/P289L; and

(g) A139T/K154E/Q298H.

63. The *S. avermitilis* cell of claim 62, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding D48E/A89T comprise a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 317 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 438 of SEQ ID NO:1.

64. The *S. avermitilis* cell of claim 63, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding D48E/A89T further comprise a base change from C to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 353 of SEQ ID NO:1, and a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1155 of SEQ ID NO:1.

65. The *S. avermitilis* cell of claim 62, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding S138T/A139T/G179S comprise a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 585 of SEQ ID NO:1, a base change from G to A at a

6627880 "5h98h709

nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 708 of SEQ ID NO:1.

66. The *S. avermitilis* cell of claim 65, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding S138T/A139T/G179S further comprise a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 272 of SEQ ID NO:1.

67. The *S. avermitilis* cell of claim 62, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding Q38P/L136P/E238D comprise a base change from A to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 286 of SEQ ID NO:1, a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 580 of SEQ ID NO:1, and a base change from A to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 886 of SEQ ID NO:1.

68. The *S. avermitilis* cell of claim 67, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding Q38P/L136P/E238D further comprise a base change from A to G at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 24 of SEQ ID NO:1, a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 497 of SEQ ID NO:1, and a base change from C to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to 554 of SEQ ID NO:1.

69. The *S. avermitilis* cell of claim 62, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding F99S/S138T/A139T/G179S comprise a 3 base pair deletion at nucleotide positions in the *aveC* allele corresponding to nts 173, 174 and 175 of SEQ ID NO:1, a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 469 of SEQ ID NO:1, a base change from T to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 585 of SEQ ID NO:1, a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 708 of SEQ ID NO:1.

70. The *S. avermitilis* cell of claim 69, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding F99S/S138T/A139T/G179S further comprise a base change from C to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 833 of SEQ ID NO:1, and a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1184 of SEQ ID NO:1.

71. The *S. avermitilis* cell of claim 62, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding A139T/M228T comprise a base change from G to A at a nucleotide position in the

aveC allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, and a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 856 of SEQ ID NO:1.

72. The *S. avermitilis* cell of claim 62, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding G111V/P289L comprise a base change from G to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 505 of SEQ ID NO:1, and a base change from C to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1039 of SEQ ID NO:1.

73. The *S. avermitilis* cell of claim 72, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding G111V/P289L further comprise a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 155 of SEQ ID NO:1, a base change from C to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1202 of SEQ ID NO:1, and a base change from T to C at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1210 of SEQ ID NO:1.

74. The *S. avermitilis* cell of claim 62, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding A139T/K154E/Q298H comprise a base change from G to A at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 588 of SEQ ID NO:1, a base change from A to G at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 633 of SEQ ID NO:1, and a base change from A to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 1067 of SEQ ID NO:1.

75. The *S. avermitilis* cell of claim 74, wherein the mutations in the *aveC* allele encoding A139T/K154E/Q298H further comprise a base change from G to T at a nucleotide position in the *aveC* allele corresponding to nt 377 of SEQ ID NO:1.

76. A process for producing avermectins, comprising culturing the cells of claim 52 in culture media under conditions that permit or induce the production of avermectins therefrom, and recovering said avermectins from the culture.

ABSTRACT

The present invention relates to polynucleotide molecules comprising nucleotide sequences encoding an aveC gene product, which polynucleotide molecules can be used to alter the ratio or amount of class 2:1 avermectins produced in fermentation cultures of *S. avermitilis*. The present invention further relates to vectors, host cells, and mutant strains of *S. avermitilis* in which the *ave*C gene has been inactivated, or mutated so as to change the ratio or amount of class 2:1 avermectins produced.

662180 "Sh93hT09

FIG.1

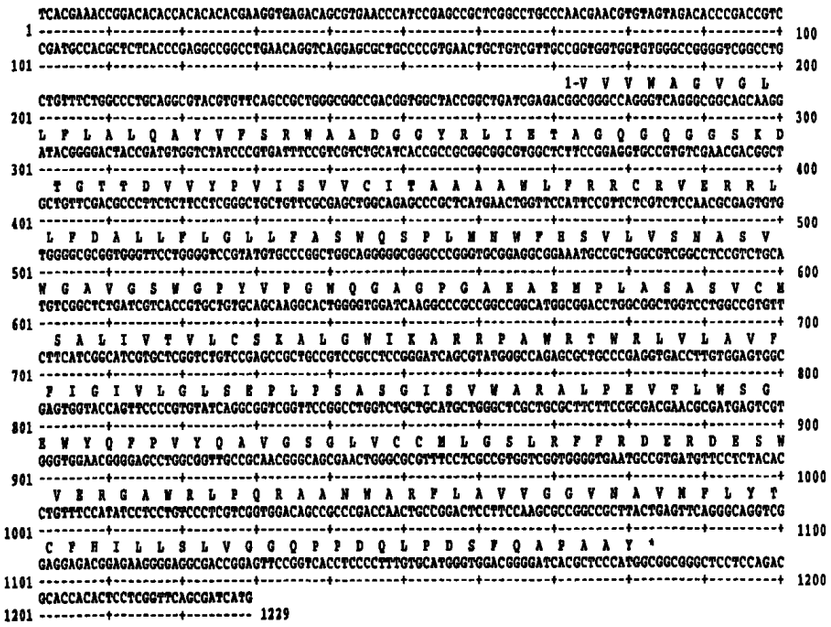

TCACGAAACCGGACACACCACACACACGAAGGTGAGACAGCGTGAACCCATCCGAGCCGCTCGGCCTGCCCAACGAACGTGTAGTAGACACCCGACCGTC
1
CGATGCCACGCTCTCACCCGAGGCCGGCCTGAACAGGTCAGGAGCGCTGCCCCGTGAACTGCTGTCGTTGCCGGTGGTGGTGTGGGCCGGGGTCGGCCTG
101
1-V V V W A G V G L
CTGTTTCTGGCCCTGCAGGCGTACGTGTTCAGCCGCTGGGCGGCCGACGGTGGCTACCGGCTGATCGAGACGGCGGGCCAGGGTCAGGGCGGCAGCAAGG
201
L F L A L Q A Y V F S R W A A D G G Y R L I E T A G Q G Q G G S K D
ATACGGGGACTACCGATGTGGTCTATCCCGTGATTTCCGTCGTCTGCATCACCGCCGCGGCGGCGTGGCTCTTCCGGAGGTGCCGTGTCGAACGACGGCT
301
T G T T D V V Y P V I S V V C I T A A A A W L F R R C R V E R R L
GCTGTTCGACGCCCTTCTCTTCCTCGGGCTGCTGTTCGCGAGCTGGCAGAGCCCGCTCATGAACTGGTTCCATTCCGTTCTCGTCTCCAACGCGAGTGTG
401
L F D A L L F L G L L F A S W Q S P L M N W F H S V L V S N A S V
TGGGGCGCGGTGGGTTCCTGGGGTCCGTATGTGCCCGGCTGGCAGGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGTCGGCCTCCGTCTGCA
501
W G A V G S W G P Y V P G W Q G A G P G A E A E M P L A S A S V C M
TGTCGGCTCTGATCGTCACCGTGCTGTGCAGCAAGGCACTGGGGTGGATCAAGGCCCGCCGGCCGGCATGGCGGACCTGGCGGCTGGTCCTGGCCGTGTT
601
S A L I V T V L C S K A L G W I K A R R P A W R T W R L V L A V F
CTTCATCGGCATCGTGCTCGGTCTGTCCGAGCCGCTGCCGTCCGCCTCCGGGATCAGCGTATGGGCCAGAGCGCTGCCCGAGGTGACCTTGTGGAGTGGC
701
F I G I V L G L S E P L P S A S G I S V W A R A L P E V T L W S G
GAGTGGTACCAGTTCCCCGTGTATCAGGCGGTCGGTTCCGGCCTGGTCTGCTGCATGCTGGGCTCGCTGCGCTTCTTCCGCGACGAACGCGATGAGTCGT
801
E W Y Q F P V Y Q A V G S G L V C C M L G S L R F F R D E R D E S W
GGGTGGAACGGGGAGCCTGGCGGTTGCCGCAACGGGCAGCGAACTGGGCGCGTTTCCTCGCCGTGGTCGGTGGGGTGAATGCCGTGATGTTCCTCTACAC
901
V E R G A W R L P Q R A A N W A R F L A V V G G V N A V N F L Y T
CTGTTTCCATATCCTCCTGTCCCTCGTCGGTGGACAGCCGCCCGACCAACTGCCGGACTCCTTCCAAGCGCCGGCCGCTTACTGAGTTCAGGGCAGGTCG
1001
C F H I L L S L V G G Q P P D Q L P D S F Q A P A A Y *
GAGGAGACGGAGAAGGGGAGGCGACCGGAGTTCCGGTCACCTCCCCTTTGTGCATGGGTGGACGGGGATCACGCTCCCATGGCGGCGGGCTCCTCCAGAC
1101
GCACCACACTCCTCGGTTCAGCGATCATG
1201 1229

FIG. 2

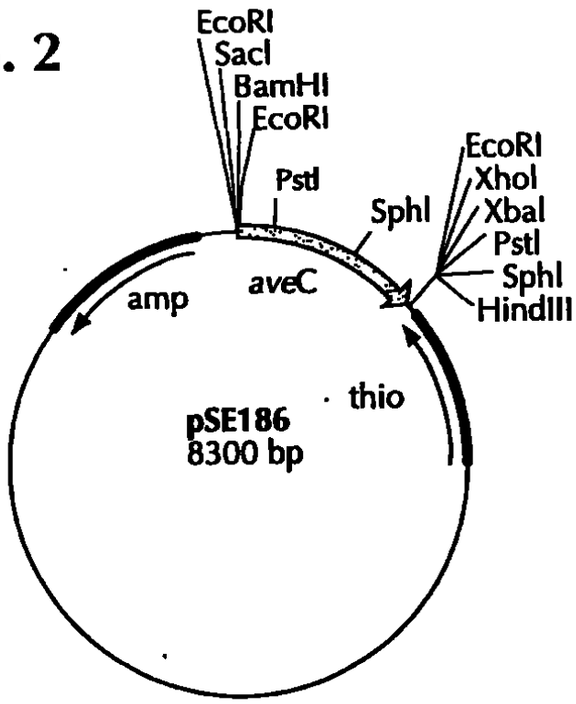
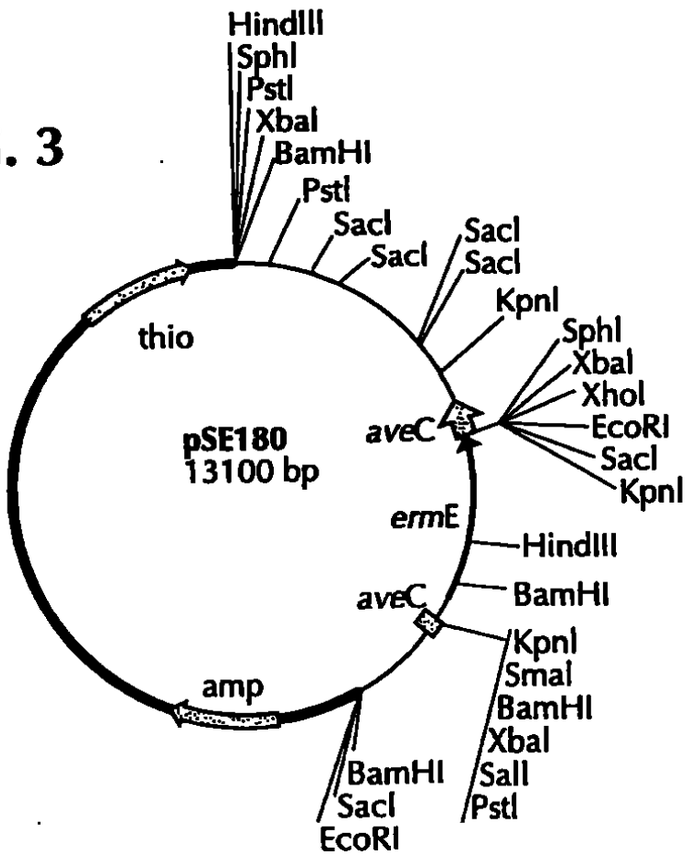

EcoRI
SacI
BamHI
EcoRI
PstI
SphI
EcoRI
XhoI
XbaI
PstI
SphI
HindIII
amp
aveC
thio
pSE186
8300 bp

FIG. 3


HindIII
SphI
PstI
XbaI
BamHI
PstI
SacI
SacI
SacI
SacI
KpnI
SphI
XbaI
XhoI
EcoRI
SacI
KpnI
thio
pSE180
13100 bp
aveC
ermE
HindIII
aveC
BamHI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
amp
BamHI
SacI
EcoRI

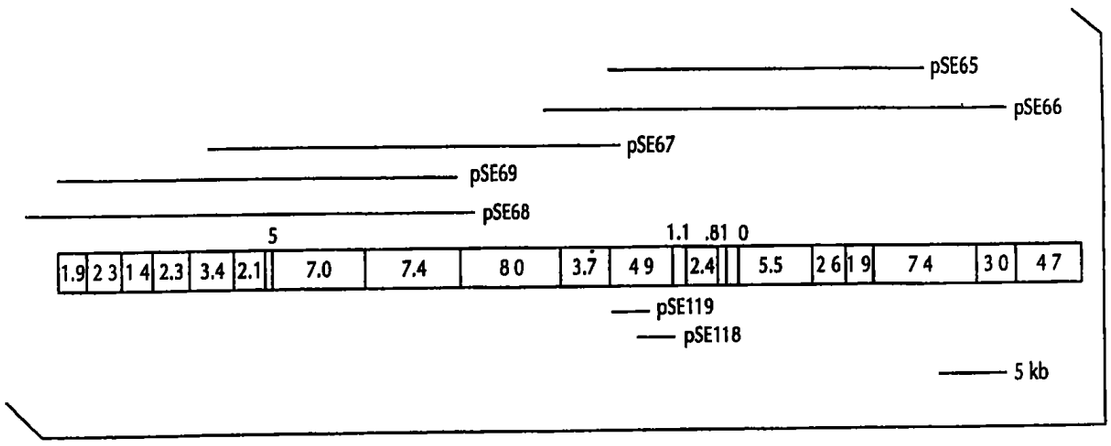

pSE65
pSE66
pSE67
pSE69
pSE68
5
1.1 .81 0
1.9 2 3 1 4 2.3 3.4 2.1 7.0 7.4 8 0 3.7 4 9 2.4 5.5 2 6 1 9 7 4 3 0 4 7
pSE119
pSE118
5 kb

FIG. 4

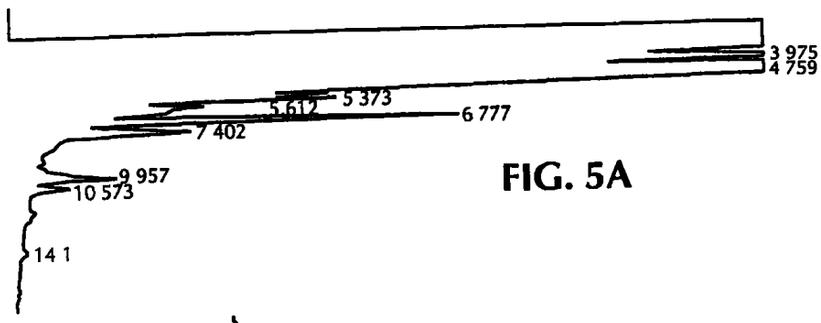

3 975
4 759
5 373
5.612
6 777
7 402
9 957
10 573
14 1

FIG. 5A

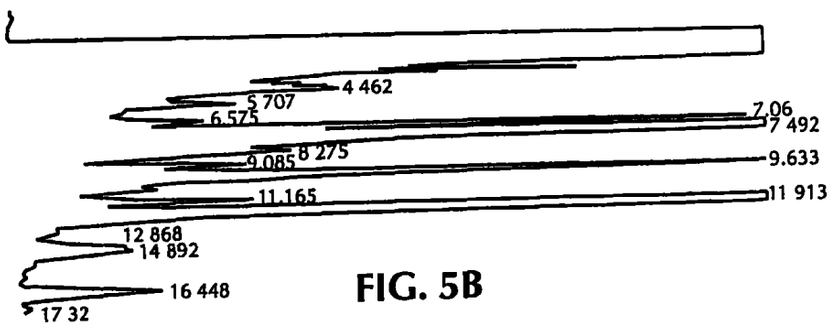

4 462
5 707
6.575
7.06
7 492
8 275
9.085
9.633
11.165
11 913
12 868
14 892
16 448
17 32

FIG. 5B

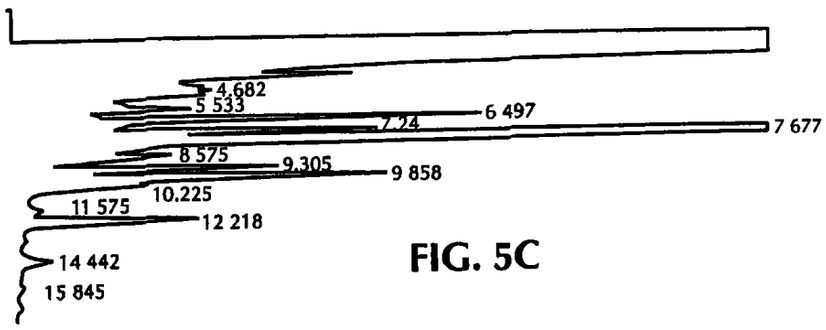

4.682
5 533
6 497
7 677
8 575
9.305
9 858
10.225
11 575
12 218
14 442
15 845

FIG. 5C

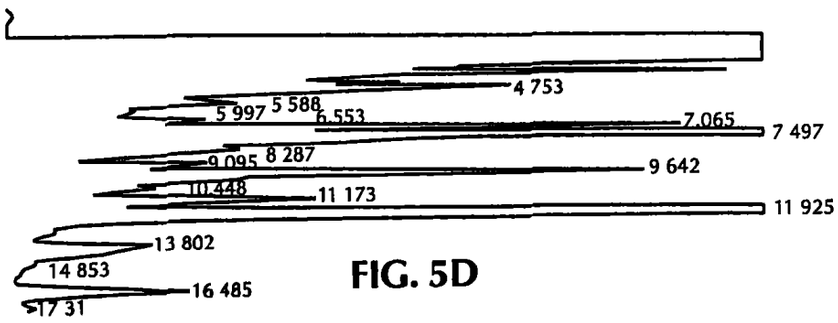

4 753
5 997
5 588
6.553
7.065
7 497
9 095
8 287
9 642
10.448
11 173
11 925
13 802
14 853
16 485
17 31

FIG. 5D

FIG. 6

```
 S  ave
 S  gri                                                        VFTLP
 S  hyg                                                        -----
Cons

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

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

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

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

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

         251                                                          300
 S  ave   LPQRAANWAR FLAVVGGVNA VMFLYT   C FHILLSLVGG QPPDQLPDSP
 S  gri   ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 S  hyg   LPEGPRPWVR LLAVVGGANI SIALYTGAHG AHILFSLMDG APPDRLPEFP
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
```

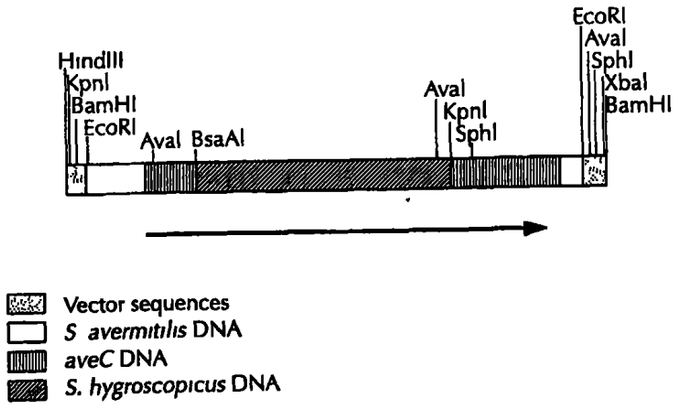

HindIII
KpnI
BamHI
EcoRI
AvaI
BsaAI
AvaI
KpnI
SphI
EcoRI
AvaI
SphI
XbaI
BamHI
Vector sequences
S avermitilis DNA
aveC DNA
S. hygroscopicus DNA

FIG. 7

SEQUENCE LISTING

<110> Stutzman-Engwall, Kim J.
Chen, Yan
Gustafsson, Claes
Krebber, Anke
Minshull, Jeremy
Raillard, Sun Ai

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

<130> PC10650

<140> PC10650
<141> 1999-08-12

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1229
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<220>
<221> CDS
<222> (174)..(1085)

<400> 1
tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaaccca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcacccg 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgctgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176
Val
1

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

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

gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg 320

6021280 - 5h98h5 - 0148h09

6621801 54984109

```
Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val
     35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

tgc tgc atg ctg ggc tcg ctg cgc ttc ttc cgc gac gaa cgc gat gag   896
```

```
Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp Glu
                230                 235                 240

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

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

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

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

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

ctttgtgcat gggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

acactcctcg gttcagcgat catg                                        1229


<210> 2
<211> 303
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2
Val Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala
  1               5                  10                  15

Tyr Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu
             20                  25                  30

Thr Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp
         35                  40                  45

Val Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala
     50                  55                  60

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

Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met
```


6014805445 08/12/09

85 90 95

Asn Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala
100 105 110

Val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro
115 120 125

Gly Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser
130 135 140

Ala Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys
145 150 155 160

Ala Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe
165 170 175

Phe Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser
180 185 190

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

Gly Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu
210 215 220

Val Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp
225 230 235 240

Glu Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala
245 250 255

Asn Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met
260 265 270

Phe Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln
275 280 285

Pro Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr
290 295 300

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

<220>

6621805 5483TD5

6501985 = 0215295

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

<400> 3
gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggccgata ccgtacgcgg cctgcgg 57

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

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

tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag 201
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

```
                165                 170                 175

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

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

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

gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc   777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225                 230                 235                 240

aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg   825
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
                245                 250                 255

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

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

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

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

gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcct 1080

catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga 1140

gcggccgggg                                                        1150


<210> 4
<211> 310
<212> PRT
```

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 4

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

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

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

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

Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu
 65                  70                  75                  80

Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
                 85                  90                  95

Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
            100                 105                 110

Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
        115                 120                 125

Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser
    130                 135                 140

Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met
145                 150                 155                 160

Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
            180                 185                 190

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

Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
    210                 215                 220

Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225                 230                 235                 240
```


6627180 "4984109

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

Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala
            260                 265                 270

Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu
        275                 280                 285

Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
    290                 295                 300

Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
305                 310
```

60270-5th9847.09

```
<210> 5
<211> 215
<212> PRT
<213> Streptomyces griseochromogenes

<400> 5
Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val
  1               5                  10                  15

Tyr Val Phe Ala Arg Trp Thr Ala Asp Gly Gly Tyr His Leu Ala Asp
             20                  25                  30

Val Ser Gly Pro Asp Gly Arg Glu Pro Gly His Arg Arg Ile Ile Asp
         35                  40                  45

Val Leu Leu Pro Ala Leu Ser Met Ala Gly Val Val Gly Leu Ala Phe
     50                  55                  60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

6021805 "0914805

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

<400> 6
tcacgaaacc ggacacac 18

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

<400> 7
catgatcgct gaaccgag 18

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

<400> 8
ggttccggat gccgttctcg 20

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

3074

<400> 9
aactccggtc gactcccctt c 21

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

<400> 10
gcaaggatac ggggactac 19

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

<400> 11
gaaccgaccg cctgatac 18

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

<400> 12
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gcccctggcg acg 43

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13
ggaaccgacc gcctgataca 20

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

<400> 14
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc 46

6621801 5h934105

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

<400> 15
ggaacatcac ggcattcacc 20

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

<400> 16
aacccatccg agccgctc 18

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

<400> 17
tcggcctgcc aacgaac 17

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

<400> 18
ccaacgaacg tgtagtag 18

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

<400> 19
tgcaggcgta cgtgttcagc 20

<210> 20

6014985.08120699

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

<400> 20
catgatcgct gaaccga 17

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

<400> 21
catgatcgct gaaccgagga 20

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

<400> 22
aggagtgtgg tgcgtctgga 20

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

<400> 23
cttcaggtgt acgtgttcg 19

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

<400> 24
gaactggtac cagtgccc 18

<210> 25
<211> 46
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

5627880 "5498709

310

<400> 25
ggggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc 46

6621780' 5h98hT09

GEN DE *STREPTOMYCES AVERMITILIS* QUE DIRIGE LA RELACIÓN DE AVERMECTINAS B2:B1

1. CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para producir avermectinas y, principalmente, se refiere al campo de la salud animal. Más particularmente, la presente invención se refiere a moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico AveC, que puede usarse para modular la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por la fermentación de cultivos de *Streptomyces avermitilis*, y a composiciones y procedimientos para seleccionar tales moléculas polinucleotídicas. La presente invención además se refiere a vectores, células huésped transformadas y nuevas cepas mutantes de *S. avermitilis* en las que el gen *aveC* se ha mutado para modular la relación de avermectinas de clase 2:1 producidas.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

2.1. Avermectinas

Las especies de *Streptomyces* producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios, incluyendo las avermectinas, que comprenden una serie de ocho lactonas macrocíclicas de dieciséis miembros relacionadas que tienen una potente actividad antihelmíntica e insecticida. Los

ocho compuestos distintos pero muy relacionados se denominan A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b. La serie "a" de compuestos se refiere a la avermectina natural en la que el sustituyente en la posición C25 es (S)-sec-butilo y la serie "b" se refiere a los compuestos en los que el sustituyente en la posición C25 es isopropilo. Las denominaciones "A" y "B" se refieren a avermectinas en las que el sustituyente en la posición C5 es metoxi e hidroxi, respectivamente. El número "1" se refiere a avermectinas en las que está presente un doble enlace en la posición C22,23 y el número "2" se refiere a avermectinas que tienen un hidrógeno en la posición C22 y un hidroxi en la posición C23. Entre las avermectinas relacionadas, el tipo B1 de avermectinas se reconoce como el que tiene la actividad antiparasitaria y pesticida más eficaz y, por lo tanto, es la avermectina más deseable desde el punto de vista comercial.

En las Patentes de Estados Unidos 4.310.519 y 4.429.042 se describen las avermectinas y su producción mediante fermentación aerobia de cepas de *S. avermitilis*. Se cree que la biosíntesis de las avermectinas naturales se inicia endógenamente a partir de los análogos del tioéster de CoA del ácido isobutírico y del ácido S-(+)-2-metil butírico.

Una combinación de la mejora de cepas mediante

mutagénesis aleatoria y el uso de ácidos grasos suministrados exógenamente, ha conducido a la producción eficaz de análogos de avermectina. Los mutantes de *S. avermitilis* que son deficientes en la 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (mutantes deficientes en bkd), sólo puede producir avermectinas cuando las fermentaciones se suplementan con ácidos grasos. En la Patente europea (EP) 276103, se describe la selección y aislamiento de mutantes deficientes en la actividad de deshidrogenasa de cadena ramificada (por ejemplo, *S. avermitilis*, ATCC 53567). La fermentación de tales mutantes en presencia de ácidos grasos suministrados exógenamente, da como resultado la producción de sólo las cuatro avermectinas que corresponden al ácido graso empleado. Así pues, la suplementación de las fermentaciones de *S. avermitilis* (ATCC 53567) con ácido S-(+)-2-metilbutírico, da como resultado la producción de las avermectinas naturales A1a, A2a, B1a y B2a; la suplementación de las fermentaciones con ácido isobutírico, da como resultado la producción de las avermectinas naturales A1b, A2b, B1b y B2b; y la suplementación de las fermentaciones con ácido ciclopentanocarboxílico da como resultado la producción de las cuatro nuevas ciclopentilavermectinas A1, A2, B1 y B2.

Si se suplementa con otros ácidos grasos, se producen nuevas avermectinas. Mediante la selección entre más de 800

precursores potenciales, se han identificado más de 60 nuevas avermectinas distintas. (Véase, por ejemplo, Dutton y col., 1991, J. Antibiot. 44:357-365; y Banks y col., 1994, Roy. Soc. Chem. 147:16-26). Además, los mutantes de *S. avermitilis* deficientes en la actividad de 5-O-metiltransferasa producen esencialmente sólo las avermectinas del análogo B. Por consiguiente, los mutantes de *S. avermitilis* que carecen de las actividades de 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada y 5-O-metil-transferasa producen sólo las avermectinas B que corresponden al ácido graso empleado para suplementar la fermentación. Así pues, cuando se suplementan tales dobles mutantes con el ácido S-(+)-2-metilbutírico, se obtiene la producción sólo de las avermectinas naturales B1a y B2a, mientras que la suplementación con el ácido isobutírico o el ácido ciclopentanocarboxílico da como resultado la producción de las avermectinas naturales B1b o B2b o las nuevas ciclopentil avermectinas B1 y B2, respectivamente. La suplementación de la cepa mutante doble con ácido ciclohexano carboxílico es un procedimiento preferido para producir la nueva avermectina importante desde el punto de vista comercial, ciclohexilavermectina B1 (doramectina). En el documento EP 276103 se describe el aislamiento y las características de tales dobles mutantes, por ejemplo, *S. avermitilis* (ATCC 53692).

2.2 Genes Implicados en la Biosíntesis de Avermectinas

En muchos casos, los genes implicados en la producción de metabolitos secundarios y los genes que codifican un antibiótico particular, se encuentran agrupados en el cromosoma. Tal es el caso, por ejemplo, del grupo de genes de la policeturo sintasa (PKS) de *Streptomyces* (véase Hopwood y Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:37-66). Así pues, una estrategia para clonar genes en una ruta biosintética ha sido aislar un gen de resistencia a fármacos y después ensayar las regiones adyacentes del cromosoma con respecto a otros genes relacionados con la biosíntesis de ese antibiótico particular. Otra estrategia para la clonación de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos importantes ha sido la complementación de mutantes. Por ejemplo, se introducen porciones de una biblioteca de ADN procedente de un organismo capaz de producir un metabolito particular, en un mutante no productor y se seleccionan los transformantes con respecto a la producción del metabolito. Además, se ha usado la hibridación de una biblioteca usando sondas derivadas de otras especies de *Streptomyces* para identificar y clonar genes en rutas biosintéticas.

Los genes implicados en la biosíntesis de avermectinas (genes *ave*), de la misma forma que los genes necesarios para la biosíntesis de otros metabolitos secundarios de

Streptomyces (por ejemplo, PKS), se encuentran agrupados en el cromosoma. Se han clonado satisfactoriamente varios genes *ave* usando vectores para complementar mutantes de *S. avermitilis* bloqueados en la biosíntesis de avermectinas. La clonación de tales genes se describe en la Patente de Estados Unidos 5.252.474. Además, Ikeda y col., 1995, *J. Antibiot.* 48:532-534, describe la localización de una región cromosómica que implica la etapa de deshidratación C22,23 (*aveC*) en un fragmento *Bam*HI de 4,82 Kb de *S. avermitilis*, así como mutaciones en el gen *aveC* que dan como resultado la producción de un productor de B2a de un solo componente. Como la ivermectina, un potente compuesto antihelmíntico, puede producirse químicamente a partir de la avermectina B2a, tal productor de un solo componente de avermectina B2a se considera particularmente útil para la producción comercial de ivermectina.

La identificación de mutaciones en el gen *aveC* que minimizan la complejidad de la producción de avermectinas, tales como, por ejemplo, mutaciones que reducen la relación B2:B1 de avermectinas, simplificaría la producción y purificación de las avermectinas importantes desde el punto de vista comercial.

3. RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una molécula polinucleotídica aislada que comprende la ORF completa de

aveC de *S. avermitilis* o una porción sustancial de la misma, molécula polinucleotídica aislada que carece de la siguiente ORF completa que se localiza cadena abajo de la ORF de aveC *in situ* en el cromosoma de *S. avermitilis*. La molécula polinucleotídica aislada de la presente invención preferiblemente comprende una secuencia de nucleótidos que es igual que la secuencia que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o es la misma que la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma. La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o una variante degenerada de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), a la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o a una porción sustancial de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es homóloga a la secuencia de

aminoácidos codificada por la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:2) o una porción sustancial de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico homólogo a AveC. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus*, producto génico homólogo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:4 o una porción sustancial de la misma. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención que codifica el producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus*, comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3 o una porción sustancial de la misma.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia de nucleótidos de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO:3. La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es homólogo al producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* que tiene la secuencia

de aminoácidos de la SEC ID NO: 4.

La presente invención proporciona además oligonucleótidos que hibridan con una molécula polinucleotídica que tiene la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o SEC ID NO: 3, o con una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o SEC ID NO: 3.

La presente invención proporciona además vectores de clonación y vectores de expresión recombinantes que son útiles en la clonación o expresión de un polinucleótido de la presente invención, incluyendo moléculas polinucleotídicas que comprenden la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* o una ORF homóloga de *aveC*. En una realización no limitante, la presente invención proporciona el plásmido pSE186 (ATCC 209604), que comprende la ORF entera del gen *aveC* de *S. avermitilis*. La presente invención proporciona además células huésped transformadas que comprenden una molécula polinucleotídica o un vector recombinante de la invención, y nuevas cepas o líneas celulares derivadas de las mismas.

La presente invención proporciona además un producto génico AveC expresado de forma recombinante, un producto génico homólogo a AveC o una porción sustancial de los mismos, que se ha purificado o aislado sustancialmente, así

como homólogos de los mismos. La presente invención proporciona además un procedimiento para producir un producto génico AveC recombinante, que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión recombinante, comprendiendo dicho vector de expresión recombinante una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC o un producto génico homólogo a AveC, molécula polinucleotídica que está en asociación operativa con uno o más elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula polinucleotídica en la célula huésped, en condiciones que conducen a la producción del producto génico AveC recombinante o el producto génico homólogo a AveC, y recuperar el producto génico AveC o el producto génico homólogo a AveC del cultivo de células.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual a la del alelo AveC de *S. avermitilis*, o la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o una variante degenerada de la misma, o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o una variante degenerada de la misma, pero que comprende además una o más mutaciones, de forma que las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en las que

el alelo *aveC* de tipo silvestre se ha inactivado y expresa la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada, producen una relación o cantidad diferente de avermectinas que la producida por células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. De acuerdo con la presente invención, tales moléculas polinucleotídicas pueden usarse para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que presentan un cambio detectable en la producción de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen avermectinas en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con la de la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen mayores niveles de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el gen *aveC*.

La presente invención proporciona procedimientos para

identificar mutaciones de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* capaces de alterar la relación y/o cantidad de avermectinas producidas. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* capaces de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas, que comprende: (a) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, y dentro de las cuales se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado; (b) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a) pero que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la misma; y (c) comparar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b); de tal forma que si la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de

la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* capaz de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 se reduce por la mutación.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* o construcciones genéticas que comprenden la ORF de *aveC*, capaces de alterar la cantidad de avermectinas producidas, que comprende: (a) determinar la cantidad de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo *aveC* nativo, y dentro de la cual se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado o que comprende una construcción genética que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC; (b) determinar la cantidad de avermectinas producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a) pero que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* que tiene la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la misma; y (c) comparar la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) con la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S.*

avermitilis de la etapa (b); de tal forma que si la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* o una construcción genética capaz de alterar la cantidad de avermectinas. En una realización preferida, la cantidad de avermectinas producidas se aumenta por la mutación.

La presente invención proporciona además vectores recombinantes que son útiles para fabricar nuevas cepas de *S. avermitilis* que tienen alterada la producción de avermectinas. Por ejemplo, la presente invención proporciona vectores que pueden usarse para dirigir cualquiera de las moléculas polinucleotídicas que comprenden las secuencias de nucleótidos mutadas de la presente invención, al sitio del gen *aveC* del cromosoma de *S. avermitilis*, para insertar o reemplazar el alelo de *aveC*, la ORF o una porción de la misma mediante recombinación homóloga. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención proporcionada por la misma también puede actuar modulando la biosíntesis de avermectina cuando se inserta en el cromosoma de *S. avermitilis* en un sitio

distinto del gen *aveC*, o cuando se mantiene episomalmente en las células de *S. avermitilis*. Así pues, la presente invención también proporciona vectores que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención, vectores que pueden usarse para insertar la molécula polinucleotídica en un sitio en el cromosoma de *S. avermitilis* distinto del gen *aveC* o para que se mantenga episomalmente. En una realización preferida, la presente invención proporciona vectores de reemplazo génico que pueden usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado en el cromosoma de *S. avermitilis* para generar nuevas cepas de células que producen avermectinas en una relación reducida de clase 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre.

La presente invención proporciona además procedimientos para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado y que producen relaciones y/o cantidades alteradas de avermectinas en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo *aveC* mutado y

que producen una relación alterada de avermectinas de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre, que comprende transformar las células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado y que codifica un producto génico que altera la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo mutado en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con la relación de clases 2:1 producida por las células de la cepa que en su lugar expresan el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas se reduce en las células de la nueva cepa.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que producen cantidades alteradas de avermectina, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende el alelo de *aveC*, cuya expresión da

como resultado una cantidad alterada de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o la construcción genética en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una cantidad alterada en comparación con la cantidad de avermectinas producidas por las células de la cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la cantidad de avermectinas producidas se aumenta en las células de la nueva cepa.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células comprenden un alelo de *aveC* inactivado, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan cualquier alelo de *aveC* con un vector que inactiva el alelo de *aveC*, y seleccionar las células transformadas en las que se ha inactivado el alelo de *aveC*.

La presente invención proporciona además nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que se han transformado con cualquiera de las moléculas polinucleotídicas o vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención. En una

realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado en lugar de o además del alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las células de la nueva cepa producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En una realización más preferida, las células de la nueva cepa producen avermectinas en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. Tales nuevas cepas son útiles en la producción a gran escala de avermectinas deseables desde el punto de vista comercial, tales como la doramectina.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan una alelo de *aveC* mutado, o una construcción genética que comprende el alelo de *aveC*, en lugar de o además del alelo de *aveC* nativo, que da como resultado la producción por las células de una cantidad alterada de avermectinas en comparación con la cantidad de avermectinas producidas por las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, las nuevas células producen una mayor cantidad de avermectinas.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células en las que se ha inactivado el gen *aveC*. Tales cepas son útiles para el diferente espectro de avermectinas que producen en comparación con la cepa de tipo silvestre, y en ensayos de selección de complementación como los descritos en este documento, para determinar si la mutagénesis dirigida o aleatoria del gen *aveC* afecta a la producción de avermectinas.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto génico que altera la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado en comparación con las células de la misma cepa que no expresan el alelo de *aveC* mutado sino que en su lugar expresan sólo el alelo *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, se reduce la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células que expresan la mutación. Este procedimiento proporciona una mayor eficacia en la producción de avermectinas valiosas

desde el punto de vista comercial, tales como la doramectina.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende un alelo de *aveC* que da como resultado la producción de una cantidad alterada de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o una construcción genética, en comparación con las células de la misma cepa que no expresan el alelo de *aveC* mutado o la construcción genética sino que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas producidas por las células que expresan la mutación o la construcción genética.

La presente invención proporciona además una nueva composición de avermectinas producidas por una cepa de *S. avermitilis* que expresa un alelo de *aveC* mutado de la presente invención, donde las avermectinas se producen en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por

células de la misma cepa de *S. avermitilis* que no expresan el alelo de *aveC* mutado sino que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. La nueva composición de avermectinas puede estar presente según se produce en el fluido de cultivo de fermentación o puede recogerse a partir de dicho fluido y puede purificarse parcial o sustancialmente a partir del mismo.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Secuencia de ADN (SEC ID NO: 1) que comprende la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID NO:2).

FIGURA 2. Vector plasmídico pSE186 (ATCC 209604) que comprende la ORF entera del gen *aveC* de *S. avermitilis*.

FIGURA 3. Vector de reemplazo génico pSE180 (ATCC 209605) que comprende el gen *ermE* de *Sacc. erythraea* insertado en la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*.

FIGURA 4. Mapa de restricción *Bam*HI del grupo de genes de la policeturo sintasa de avermectina de *S. avermitilis* con cinco clones de cósmidos solapantes identificados (es decir, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68 y pSE69). También se indica la relación de pSE118 y pSE119.

FIGURA 5. Análisis de HPLC de los productos de fermentación producidos por las cepas de *S. avermitilis*. La cuantificación de los picos se realizó por comparación con cantidades patrón de ciclohexil B1. El tiempo de retención

de ciclohexil B2 fue de 7,4-7,7 minutos; el tiempo de retención de ciclohexil B1 fue de 11,9-12,3 min. FIG. 5A. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* con una ORF de *aveC* inactivada. FIG. 5B. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* transformada con pSE186 (ATCC 209604). FIG. 5C. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* transformada con pSE187. FIG. 5D. Cepa SE180-11 de *S. avermitilis* transformada con pSE188.

FIGURA 6. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas codificadas por la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* (SEC ID NO: 2), una ORF parcial homóloga a *aveC* de *S. griseochromogenes* (SEC ID NO: 5) y la ORF homóloga a *aveC* de *S. hygroscopicus* (SEC ID NO: 4). El resto de valina en negritas es el supuesto sitio de iniciación para la proteína. Los restos conservados se muestran en letras mayúsculas para mostrar la homología en las tres secuencias y en letras minúsculas para mostrar la homología en 2 de las 3 secuencias. Las secuencias de aminoácidos contienen aproximadamente un 50% de identidad de secuencia.

FIGURA 7. Construcción de un plásmido híbrido que contiene un fragmento *Bsa*AI/*Kpn*I de 564 pb del gen homólogo de *aveC* de *S. hygroscopicus* insertado en el sitio *Bsa*AI/*Kpn*I en la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la identificación

y caracterización de moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican el producto génico AveC de *Streptomyces avermitilis*, a la construcción de nuevas cepas de *S. avermitilis* que pueden usarse para seleccionar los productos génicos AveC mutados con respecto a su efecto sobre la producción de avermectinas, y al descubrimiento de que ciertos producto génicos AveC mutados pueden reducir la relación de avermectinas B2:B1 producidas por *S. avermitilis*. A modo de ejemplo, la invención se describe en las secciones mostradas más adelante en relación con una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es igual a la secuencia que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1), y en relación con moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos mutadas derivadas de las mismas y variantes degeneradas de las mismas. Sin embargo, los principios indicados en la presente invención pueden aplicarse análogamente a otras moléculas polinucleotídicas, incluyendo genes homólogos a *aveC* de otras especies de *Streptomyces* que incluyen, por ejemplo, *S. hygroscopicus* y *S. griseochromogenes*, entre otros.

5.1. Moléculas Polinucleotídicas que Codifican el Producto Génico AveC de *S. avermitilis*

La presente invención proporciona una molécula polinucleotídica aislada que comprende la ORF de *aveC* completa de *S. avermitilis* o una porción sustancial de la misma, molécula polinucleotídica aislada que carece de la siguiente ORF completa que está localizada cadena abajo de la ORF de *aveC in situ* en el cromosoma de *S. avermitilis*.

La molécula polinucleotídica aislada de la presente invención preferiblemente comprende una secuencia de nucleótidos que es igual que la secuencia que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que es la misma que la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma. Como se usa en este documento, una "porción sustancial" de una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* significa una molécula polinucleotídica aislada que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia completa de la ORF de *aveC* mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1), y que codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente. A este respecto, un producto génico AveC "funcionalmente equivalente" se define como un producto génico que, cuando se expresa en la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, produce sustancialmente la misma relación

y cantidad de avermectinas que las producidas por la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* funcional de tipo silvestre nativo para la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis*.

Además de la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC*, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención puede comprender adicionalmente secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural el gen *aveC in situ* en *S. avermitilis*, tales como las que flanquean las secuencias de nucleótidos mostradas en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1).

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o una variante degenerada de la misma.

Como se usa en este documento, los términos "molécula polinucleotídica", "secuencia polinucleotídica", "secuencia codificante", "fase de lectura abierta" y "ORF", pretenden hacer referencia tanto a las moléculas de ADN como a las moléculas de ARN, que pueden ser de una sola cadena o de doble cadena y que pueden transcribirse y traducirse (ADN) o traducirse (ARN) en un producto génico AveC o, como se describe más adelante, en un producto génico homólogo a AveC, o en un polipéptido que es homólogo a un producto génico AveC o un producto génico homólogo a AveC, en un

sistema de expresión de células huésped apropiado, cuando se ponen bajo el control de los elementos reguladores apropiados. Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias procariotas, secuencias de ADNc, secuencias de ADN genómico y secuencias de ADN y ARN sintetizadas químicamente.

La secuencia de nucleótidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) comprende cuatro codones GTG diferentes en las posiciones de pb 42, 174, 177 y 180. Como se describe en la Sección 9 mostrada más adelante, se construyeron deleciones múltiples de la región 5' de la ORF de *aveC* (FIGURA 1; SEC ID NO: 1) para ayudar a definir cuáles de estos codones podían funcionar en la ORF de *aveC* como sitios de iniciación para la expresión de la proteína. La deleción del primer sitio GTG en el pb 42 no eliminó la actividad de AveC. Una deleción adicional de todos los codones GTG en las posiciones de pb 174, 177 y 180 eliminó totalmente la actividad de AveC, indicando que esta región es necesaria para la expresión de la proteína. Por lo tanto, la presente invención abarca ORF de *aveC* de longitud variable.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604),

o a la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma. El término "homólogo", cuando se usa para hacer referencia a una molécula polinucleotídica que es homóloga a una secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis*, significa una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos: (a) que codifica el mismo producto génico AveC que la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que codifica el mismo producto génico AveC que la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1), pero que incluye uno o más cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético (es decir, una variante degenerada); o (b) que hibrida con el complemento de una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), en condiciones moderadamente rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 42°C (véase Ausubel y col., (eds.),

1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en la pág. 2.10.3), y codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica homóloga hibrida con el complemento de la secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o con el complemento de la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción sustancial de la misma, en condiciones muy rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a un filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel y col., 1989, mencionado anteriormente), y codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente.

La actividad de un producto génico AveC y los equivalentes funcionales potenciales del mismo pueden determinarse mediante el análisis de HPLC de los productos de fermentación, como se describe en los ejemplos de más adelante. Las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican equivalentes funcionales del producto génico AveC de *S. avermitilis* incluyen genes *aveC* que se producen de forma natural

presentes en otras cepas de *S. avermitilis*, genes homólogos a *aveC* presentes en otras especies de *Streptomyces* y alelos de *aveC* mutados, se produzcan de forma natural o se obtengan por ingeniería genética.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2) o una porción sustancial de la misma. Como se usa en este documento, una "porción sustancial" de la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2) significa un polipéptido que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), y que constituye un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente.

Como se usa en este documento para hacer referencia a secuencias de aminoácidos que son homólogas a la secuencia de aminoácidos de un producto génico AveC de *S. avermitilis*, el término "homólogo" se refiere a un polipéptido que por lo demás tiene la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), pero en el que uno o más restos de aminoácidos se han sustituido de forma

conservativa con un resto de aminoácido diferente, donde dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 80% y, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente un 90% con el polipéptido codificado por la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186· (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), determinada por cualquier algoritmo convencional de identidad de secuencias de aminoácidos, tal como el algoritmo BLASTP (GENBANK, NCBI), y donde tal sustitución conservativa da lugar a un producto génico funcionalmente equivalente, como se ha definido anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son bien conocidas en la técnica. Las reglas para obtener tales sustituciones incluyen las descritas por Dayhof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., Vol. 5, Sup. 3, entre otras. Más específicamente, las sustituciones de aminoácidos conservativas son las que generalmente se producen dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en acidez o polaridad. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en cuatro grupos: (1) ácidos = aspartato y glutamato; (2) básicos = lisina, arginina e histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; y (4) polares sin

carga = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina también se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. Uno o más reemplazos dentro de cualquier grupo particular, por ejemplo, de una leucina por una isoleucina o valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina, o de cualquier otro resto de aminoácido por un resto de aminoácido estructuralmente relacionado, por ejemplo, un resto de aminoácido con una acidez o polaridad similar o con analogías en alguna combinación de los mismos, generalmente tendrá un efecto insignificante sobre la función del polipéptido.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico homólogo a AveC. Como se usa en este documento, un "producto génico homólogo a AveC" se define como un producto génico que tiene una identidad de secuencia de aminóacidos de al menos el 50% con un producto génico AveC de *S. avermitilis* que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia que codifica el producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2), determinada por cualquier algoritmo convencional de identidad de secuencias de aminoácidos, tal como el algoritmo BLASTP (GENBANK,

NCBI). En una realización no limitante, el producto génico homólogo a AveC procede de *S. hygroscopicus* (descrito en la solicitud de patente EP 0298423; depósito FERM BP-1901) y comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 o una porción sustancial de la misma. Una "porción sustancial" de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 significa un polipéptido que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:4 y que constituye un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente. Un producto génico homólogo a AveC "funcionalmente equivalente" se define como un producto génico que, cuando se expresa en la cepa FERM BP-1901 de *S. hygroscopicus* en la que se ha inactivado el alelo homólogo a *aveC* nativo, produce sustancialmente la misma relación y cantidad de milbemicinas que las producidas por la cepa FERM BP-1901 de *S. hygroscopicus* que expresa en su lugar sólo el alelo homólogo a *aveC* funcional, de tipo silvestre, nativo en la cepa FERM BP-1901 de *S. hygroscopicus*. En una realización no limitante, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención que codifica el producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3 o una porción sustancial de la misma. A este respecto, una "porción sustancial" de la molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de

nucleótidos de la SEC ID NO: 3 significa una molécula polinucleotídica aislada que comprende al menos aproximadamente un 70% de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3 y que codifica un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente, como se acaba de definir.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia de nucleótidos de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO: 3. El término "homólogo", cuando se usa para hacer referencia a una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia codificante del producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO: 3, significa una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos: (a) que codifica el mismo producto génico que la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3, pero que incluye uno o más cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético (es decir, una variante degenerada); o (b) que hibrida con el complemento de una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4, en condiciones moderadamente rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a un filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C y lavado en 0,2 x SSC/0,1% SDS a 42°C (véase

Ausubel y col., mencionado anteriormente), y codifica un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica homóloga hibrida con el complemento de la secuencia de nucleótidos codificante del producto génico homólogo a AveC de la SEC ID NO: 3 en condiciones muy rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido al filtro en $NaHPO_4$ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C y lavado en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel y col., 1989, mencionado anteriormente), y codifica un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es homólogo al producto génico homólogo a AveC de *S. Hygroscopicus*. Como se usa en este documento para hacer referencia a polipéptidos que son homólogos al producto génico homólogo a AveC de la SEC ID NO: 4 procedente de *S. Hygroscopicus*, el término "homólogo" significa un polipéptido que, por lo demás, tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4, pero en la que se han sustituido conservativamente uno o más restos de aminoácidos por un resto de aminoácido diferente, como se ha definido anteriormente, donde dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de aminoácidos

de al menos aproximadamente un 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 80% y, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente un 90%, con el polipéptido de la SEC ID NO: 4, determinada por cualquier algoritmo convencional de identidad de secuencias de aminoácidos, tal como el algoritmo BLASTP (GENBANK, NCBI), y donde tal sustitución conservativa produce un producto génico homólogo a AveC funcionalmente equivalente, como se ha definido anteriormente.

La presente invención proporciona además oligonucleótidos que hibridan con una molécula polinucleotídica que tiene la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO:1) o la SEC ID NO: 3, o con una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o la SEC ID NO: 3. Tales oligonucleótidos tienen una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, e hibridan con una de las moléculas polinucleotídicas mencionadas anteriormente en condiciones muy rigurosas, es decir, lavado en 6 x SSC/pirofosfato sódico al 0,5% a ~37°C para los oligos de ~ 14 bases, a ~48°C para los oligos de ~17 bases, a ~55°C para los oligos de ~20 bases y a ~60°C para los oligos de ~23 bases. En una

realización preferida, los oligonucleótidos son complementarios a una porción de una de las moléculas polinucleotídicas mencionadas anteriormente. Estos oligonucleótidos son útiles para una diversidad de fines incluyendo para codificar o actuar como moléculas antisentido útiles en la regulación génica o como cebadores en la amplificación de moléculas polinucleotídicas que codifican *aveC* u homólogos de *aveC*.

Usando las moléculas polinucleotídicas o los oligonucleótidos descritos en este documento junto con técnicas conocidas, pueden identificarse otros genes homólogos de *aveC* en otras especies o cepas de *Streptomyces*. Por ejemplo, una molécula oligonucleotídica que comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de *S. avermitilis* de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una porción de la secuencia de nucleótidos de *S. hygroscopicus* de la SEC ID NO: 3, puede marcarse de forma detectable y usarse para rastrear una biblioteca genómica construida a partir del ADN derivado del organismo de interés. La rigurosidad de las condiciones de hibridación se selecciona basándose en la relación del organismo de referencia, en este ejemplo *S. avermitilis* o *S. hygroscopicus*, con el organismo de interés. Los requisitos para las diferentes condiciones de rigurosidad son bien conocidos para los especialistas en la técnica y tales condiciones variarán predeciblemente

dependiendo de los organismos específicos de los que proceden la biblioteca y las secuencias marcadas. Preferiblemente, tales oligonucleótidos tienen una longitud de al menos aproximadamente 15 nucleótidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en los ejemplos mostrados más adelante. La amplificación de los genes homólogos puede realizarse usando estos y otros oligonucleótidos y aplicando técnicas convencionales tales como la reacción en cadena con polimerasa (PCR), aunque también pueden usarse otras técnicas de amplificación conocidas en la técnica, por ejemplo, la reacción en cadena con ligasa.

Los clones identificados como clones que contienen secuencias de nucleótidos homólogas a *aveC*, pueden ensayarse con respecto a su capacidad de codificar un producto génico homólogo a AveC funcional. Para este fin, los clones pueden someterse a análisis de secuencia para identificar una fase de lectura adecuada, así como señales de iniciación y terminación. Como alternativa o adicionalmente, la secuencia de ADN clonada puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. Puede usarse cualquiera de una diversidad de sistemas de huésped/vector como se ha descrito más adelante, incluyendo, pero sin limitación,

sistemas bacterianos tales como vectores de expresión plásmidos, bacteriófagos o cósmidos. Las células huésped apropiadas transformadas con tales vectores que comprenden secuencias codificantes homólogas a *aveC* potenciales después pueden analizarse con respecto a la actividad de tipo AveC usando procedimientos tales como análisis de HPLC de los productos de fermentación, como se describe, por ejemplo, en la Sección 7 mostrada más adelante.

La producción y manipulación de las moléculas polinucleotídicas descritas en este documento están dentro de la experiencia en la técnica y pueden realizarse de acuerdo con técnicas recombinantes descritas, por ejemplo, en Maniatis, y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, y col., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook, y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis y col. (eds.), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; y Erlich (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, Nueva York, todos los cuales se incorporan aquí por referencia. Los clones polinucleotídicos que codifican productos génicos AveC o productos génicos homólogos a AveC pueden identificarse

usando cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación, los procedimientos indicados en la Sección 7 mostrada más adelante. Pueden rastrearse bibliotecas de ADN genómico con respecto a las secuencias codificantes *aveC* y homólogas a *aveC* usando técnicas tales como los procedimientos indicados en Benton y Davis, 1977, Science 196:180, para bibliotecas de bacteriófagos, y en Grunstein y Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:3961-3965, para bibliotecas de plásmidos. Las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que se sabe que incluyen la ORF de *aveC*, como la presente, por ejemplo, en el plásmido pSE186 (ATCC 209604), o en el plásmido pSE199 (descrito en la Sección 7, mostrada más adelante), pueden usarse como sondas en estos experimentos de selección. Como alternativa, pueden sintetizarse sondas oligonucleotídicas que corresponden a las secuencias de nucleótidos deducidas a partir de las secuencias de aminoácidos parciales o completas del producto génico homólogo a AveC purificado.

5.2 Sistemas Recombinantes

5.2.1 Vectores de Clonación y Expresión

La presente invención proporciona además vectores de clonación y vectores de expresión recombinantes que son útiles en la clonación o expresión de moléculas polinucleotídicas de la presente invención que comprenden,

por ejemplo, la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* o cualquier ORF homóloga a *aveC*. En una realización no limitante, la presente invención proporciona el plásmido pSE186 (ATCC 209604), que comprende la ORF completa del gen *aveC* de *S. avermitilis*.

Toda la siguiente descripción relacionada con la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*, una molécula polinucleotídica que comprende la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* o una porción de la misma, o un producto génico AveC de *S. avermitilis*, también se refiere a homólogos de *aveC* y a productos génicos homólogos a AveC, a menos que se indique explícitamente o por el contexto.

Se ha creado una diversidad de vectores diferentes para uso específico en *Streptomyces*, incluyendo fagos, plásmidos de alto número de copias, plásmidos de bajo número de copias y vectores lanzadera de *E. coli* - *Streptomyces*, entre otros, y cualquiera de éstos puede usarse para poner en práctica la presente invención. También se han clonado varios genes de resistencia a fármacos de *Streptomyces*, y varios de estos genes se han incorporado en vectores como marcadores selectivos. Se presentan ejemplos de vectores actuales para uso en *Streptomyces*, entre otros sitios, en Hutchinson, 1980, Applied Biochem. Biotech. 16:169-190.

Los vectores recombinantes de la presente invención,

particularmente los vectores de expresión, preferiblemente se construyen de forma que la secuencia codificante para la molécula polinucleotídica de la invención esté en asociación operativa con uno o más elementos reguladores necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante para producir un polipéptido. Como se usa en este documento, el término "elemento regulador" incluye, pero sin limitación, secuencias de nucleótidos que codifican promotores inducibles y no inducibles, intensificadores, operadores y otros elementos conocidos en la técnica que sirven para dirigir y/o regular la expresión de secuencias que codifican polinucleótidos. Además, como se usa en este documento, la secuencia codificante está en "asociación operativa" con uno o más elementos reguladores, donde los elementos reguladores regulan eficazmente y permiten la transcripción de la secuencia codificante, la traducción de su ARNm o ambas cosas.

Los vectores plasmídicos típicos que pueden modificarse por ingeniería genética para que contengan una molécula polinucleotídica de la presente invención, incluyen pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega) y el vector lanzadera pWHM3 (Vara y col., 1989, J. Bact. 171:5872-5881), entre otros muchos.

En la técnica, son bien conocidos procedimientos para construir vectores recombinantes que contienen secuencias

codificantes particulares en asociación operativa con elementos reguladores apropiados, y éstos pueden usarse para poner en práctica la presente invención. Estos procedimientos incluyen técnicas recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis y col., 1989, mencionado anteriormente; Ausubel y col., 1989, mencionado anteriormente; Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente; Innis y col., 1995, mencionado anteriormente; y Erlich, 1992, mencionado anteriormente.

Los elementos reguladores de estos vectores pueden variar en resistencia y especificidades. Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, puede usarse cualquiera de varios elementos adecuados para la transcripción y la traducción. Los ejemplos no limitantes de las regiones reguladoras de la transcripción o promotores para bacterias incluyen el promotor β-gal, el promotor T7, el promotor TAC, los promotores λ izquierdo y derecho, promotores trp y lac, promotores de fusión trp-lac y, más específicamente para *Streptomyces*, los promotores *ermE*, *meIC*, *tipA*, etc. En una realización específica descrita en la Sección 11 mostrada más adelante, se generó un vector de expresión que contenía la ORF de *aveC* clonada adyacente al promotor *ermE* fuerte constitutivo de *Saccharopolyspora erythraea*. El vector se utilizó para transformar *S. avermitilis* y el

posterior análisis de HPLC de los productos de fermentación indicó una mayor concentración de avermectinas producidas en comparación con la producción por la misma cepa pero que en su lugar expresaba el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

Pueden usarse vectores de expresión de proteínas de fusión para expresar una proteína de fusión del producto génico AveC. La proteína de fusión purificada puede usarse para activar antisuero contra el producto génico AveC, para estudiar las propiedades bioquímicas del producto génico AveC, para obtener por ingeniería genética proteínas de fusión de AveC con diferentes actividades bioquímicas o para ayudar a la identificación o purificación del producto génico AveC expresado. Los posibles vectores de expresión de proteínas de fusión incluyen, pero sin limitación, vectores que incorporan secuencias que codifican fusiones de β-galactosidasa y trpE, fusiones de proteínas de unión a maltosa, fusiones de glutatión-S-transferasa y fusiones de polihistidina (regiones portadoras). En una realización alternativa, puede fusionarse un producto génico AveC o una porción del mismo con un producto génico homólogo a AveC o a una porción del mismo, procedente de otra especie o cepa de *Streptomyces*, tal como, por ejemplo, *S. hygroscopicus* o *S. griseochromogenes*. En una realización particular descrita en la Sección 12, mostrada más adelante y representada en la FIGURA 7, se construyó un plásmido

quimérico que contenía una región de 564 pb de la ORF homóloga a *aveC* de *S. hygroscopicus* que reemplazaba a una región de 564 pb homóloga de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*. Tales vectores híbridos pueden utilizarse para transformar células de *S. avermitilis* y ensayarse para determinar su efecto, por ejemplo, sobre la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas.

Las proteínas de fusión de AveC pueden modificarse por ingeniería genética para que comprendan una región útil para la purificación. Por ejemplo, las proteínas de fusión AveC-proteína de unión a maltosa pueden purificarse usando resina de amilosa; las fusiones AveC-proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa pueden purificarse usando perlas de glutatión-agarosa; y las fusiones de AveC-polihistidina pueden purificarse usando una resina de níquel divalente. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos contra una proteína o péptido portador para realizar la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión. Por ejemplo, puede introducirse por ingeniería genética una secuencia de nucleótidos que codifica para el epítopo diana de un anticuerpo monoclonal, en el vector de expresión, en asociación operativa con los elementos reguladores, y situarse de forma que el epítopo expresado se fusione con el polipéptido AveC. Por ejemplo, puede insertarse por técnicas convencionales una secuencia de nucleótidos que

codifica para la marca de epítopo FLAG™ (International Biotechnologies Inc.), que es un péptido marcador hidrófilo, en el vector de expresión en un punto correspondiente, por ejemplo, al extremo carboxilo terminal del polipéptido AveC. El producto de fusión polipéptido AveC-epítopo FLAG™ después puede detectarse y purificarse por afinidad usando anticuerpos anti-FLAG™ adquiribles en el mercado.

El vector de expresión que codifica la proteína de fusión AveC también puede modificarse por ingeniería genética para que contenga secuencias de poliengarce que codifican sitios de escisión específicos de proteasas, de forma que el polipéptido AveC expresado pueda liberarse de la región portadora o de la molécula de fusión por tratamiento con una proteasa específica. Por ejemplo, el vector de la proteína de fusión puede incluir secuencias de ADN que codifican sitios de escisión por trombina o por el factor Xa, entre otros.

Mediante ingeniería genética también puede introducirse una secuencia señal cadena arriba y en la misma fase de lectura que la ORF de *aveC*, en el vector de expresión, por procedimientos conocidos, para dirigir el tráfico y la secreción del producto génico expresado. Los ejemplos no limitantes de las secuencias señal incluyen los que proceden del factor α, inmunoglobulinas, proteínas de

la membrana externa, penicilinasa y receptores de células T, entre otros.

Para ayudar en la selección de las células huésped transformadas o transfectadas con los vectores de clonación o expresión de la presente invención, el vector puede modificarse por ingeniería genética para que comprenda además una secuencia codificante para un producto génico reportero u otro marcador selectivo. Tal secuencia codificante preferiblemente está en asociación operativa con las secuencias que codifican los elementos reguladores, como se ha descrito anteriormente. Los genes reporteros que son útiles en la invención son bien conocidos en la técnica e incluyen los que codifican la proteína fluorescente verde, luciferasa, *xylE* y tirosinasa, entre otras. Las secuencias de nucleótidos que codifican marcadores selectivos son bien conocidas en la técnica e incluyen las que codifican productos génicos que confieren resistencia a antibióticos o anti-metabolitos, o que proporcionan un requisito auxotrófico. Los ejemplos de tales secuencias incluyen las que codifican resistencia a eritromicina, tiostrepton o kanamicina, entre otras muchas.

5.5.2. Transformación de Células Huésped

La presente invención proporciona además células huésped transformadas que comprenden una molécula polinucleotídica o vector recombinante de la invención, y

nuevas cepas o líneas celulares derivadas de las mismas. Las células huésped útiles en la práctica de la invención son preferiblemente células de *Streptomyces*, aunque también pueden usarse otras células procariotas o eucariotas. Tales células huésped transformadas típicamente incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con ADN recombinante de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN de cósmido, o levaduras transformadas con vectores recombinantes, entre otras.

Las moléculas polinucleotídicas de la presente invención están destinadas a actuar en células de *Streptomyces*, pero también pueden transformar a otras células bacterianas o eucariotas, por ejemplo, con fines de clonación o expresión. Típicamente, puede usarse una cepa de *E. coli*, tal como, por ejemplo, la cepa DH5α, adquirible de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (No. de Acceso 31343), y de fuentes comerciales (Stratagene). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen células de levadura, aunque también pueden utilizarse eficazmente células de mamífero o células de insectos.

El vector de expresión recombinante de la invención preferiblemente transforma o transfecta a una o más células huésped de un cultivo sustancialmente homogéneo de células. El vector de expresión generalmente se introduce en las

células huésped de acuerdo con técnicas conocidas tales como, por ejemplo, transformación de protoplastos, precipitación con fosfato cálcico, tratamiento con cloruro cálcico, microinyección, electroporación, transfección por contacto con un virus recombinado, transfección mediada por liposomas, transfección con DEAE-dextrano, transducción, conjugación o bombardeo con microproyectiles. La selección de los transformantes puede realizarse mediante procedimientos convencionales, tales como mediante la selección de células que expresan un marcador selectivo, por ejemplo, resistencia a antibióticos, asociado con el vector recombinante, como se ha descrito anteriormente.

Una vez introducido el vector de expresión en la célula huésped, la integración y mantenimiento de la secuencia codificante *aveC* en el cromosoma de la célula huésped o episomalmente puede confirmarse por técnicas convencionales, por ejemplo, mediante análisis de hibridación de Southern, análisis de enzimas de restricción, análisis de PCR, incluyendo PCR con transcriptasa inversa (rt-PCR), o mediante ensayo inmunológico para detectar el producto génico esperado. Las células huésped que contienen y/o expresan la secuencia codificante *aveC* recombinante pueden identificarse por cualquiera de al menos cuatro procedimientos generales que son bien conocidos en la técnica, incluyendo: (i)

hibridación ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN antisentido; (ii) detección de la presencia de funciones de genes "marcadores"; (iii) evaluación del nivel de transcripción medido por la expresión de transcritos de ARNm específico de *aveC* en la célula huésped; y (iv) detección de la presencia del producto polipeptídico maduro medido, por ejemplo, por inmunoensayo o por la presencia de la actividad biológica de AveC (por ejemplo, la producción de relaciones y cantidades específicas de avermectinas indicativas de la actividad de AveC en, por ejemplo, células huésped de *S. avermitilis*).

5.2.3. Expresión y Caracterización de un Producto Génico AveC Recombinante

Una vez que la secuencia codificante *aveC* se ha introducido de forma estable en una célula huésped apropiada, la célula huésped transformada se propaga por clonación y las células resultantes pueden cultivarse en condiciones que conducen a la producción máxima del producto génico AveC. Tales condiciones típicamente incluyen cultivar las células hasta que se obtenga una alta densidad. Cuando el vector de expresión comprende un promotor inducible, se emplean condiciones de inducción apropiadas tales como, por ejemplo, el cambio de la temperatura, el agotamiento de nutrientes, la adición de inductores innecesarios (por ejemplo, análogos de

carbohidratos, tales como isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG)), la acumulación de subproductos metabólicos en exceso, o similares, cuando sea necesario, para inducir la expresión.

Cuando el producto génico AveC expresado queda retenido dentro de las células huésped, las células se recogen y se lisan y el producto se aísla y purifica del lisado en condiciones de extracción conocidas en la técnica para reducir la degradación de proteínas, tales como, por ejemplo, una temperatura de 4°C, en presencia de inhibidores de proteasas, o ambas cosas. Cuando el producto génico AveC expresado se secreta por las células huésped, simplemente puede recogerse el medio nutriente agotado y el producto aislarse del mismo.

El producto génico AveC expresado puede aislarse o purificarse sustancialmente de los lisados celulares o del medio de cultivo, según sea apropiado, usando procedimientos convencionales que incluyen, pero sin limitación, cualquier combinación de los siguientes procedimientos: precipitación con sulfato amónico, fraccionamiento por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, centrifugación de densidad y cromatografía de afinidad. Cuando el producto génico AveC expresado presenta actividad biológica, puede controlarse el aumento de pureza de la preparación en cada etapa del procedimiento de

purificación mediante el uso de un ensayo apropiado. Presente o no actividad biológica el producto génico AveC expresado, puede detectarse basándose, por ejemplo, en el tamaño o en la reactividad con un anticuerpo por lo demás específico para AveC, o por la presencia de una marca de fusión. Como se usa en este documento, un producto génico AveC está "purificado sustancialmente" cuando el producto constituye más de aproximadamente un 20% en peso de la proteína en una preparación particular. Además, como se usa en este documento, un producto génico AveC está "aislado" cuando el producto constituye al menos aproximadamente un 80% en peso de la proteína en una preparación particular.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un producto génico AveC de *S. avermitilis* expresado de forma recombinante, aislado o purificado sustancialmente, que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2) o una porción sustancial de la misma, y homólogos del mismo.

La presente invención proporciona además un producto génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* expresado de forma recombinante, aislado o purificado sustancialmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 o una porción sustancial de la misma, y homólogos del

mismo.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir un producto génico AveC, que comprende cultivar una célula huésped transformada con una vector de expresión recombinante, comprendiendo dicho vector una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC, molécula polinucleotídica que está en asociación operativa con uno o más elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula polinucleotídica en la célula huésped, en condiciones que conducen a la producción del producto génico AveC recombinante, y recuperar el producto génico AveC del cultivo de células.

El producto génico AveC de *S. avermitilis* expresado de forma recombinante es útil para una diversidad de fines, incluyendo la selección de compuestos que alteran la función del producto génico AveC y, por lo tanto, modulan la biosíntesis de avermectinas, y para la activación de anticuerpos dirigidos contra el producto génico AveC.

Una vez que se ha obtenido un producto génico AveC de suficiente pureza, puede caracterizarse por procedimientos convencionales, incluyendo SDS-PAGE, cromatografía de exclusión molecular, análisis de la secuencia de aminoácidos, actividad biológica en la producción de los productos apropiados en la ruta biosintética de las

avermectinas, *etc.* Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del producto génico AveC puede determinarse usando técnicas convencionales de secuenciación de péptidos. El producto génico AveC puede caracterizarse adicionalmente usando análisis de hidrofilia (véase, por ejemplo, Hopp y Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 78:3824), o algoritmos de software análogos, para identificar las regiones hidrófobas e hidrófilas del producto génico AveC. El análisis estructural puede realizarse para identificar regiones del producto génico AveC que asumen estructuras secundarias específicas. Pueden usarse procedimientos biofísicos tales como cristalografía de rayos X (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13), creación de modelos por ordenador (Fletterick y Zoller (eds), 1986, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y resonancia magnética nuclear (RMN), para localizar y estudiar los sitios de interacción entre el producto génico AveC y su sustrato. La información obtenida de estos estudios puede usarse para seleccionar nuevos sitios para la mutación en la ORF de *aveC* para ayudar a crear nuevas cepas de *S. avermitilis* que tengan características de producción de avermectinas más deseables.

5.3. Construcción y Uso de Mutantes de AveC

La presente invención proporciona una molécula

polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual que el alelo *aveC* de *S. avermitilis* o una variante degenerada del mismo, a la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o una variante degenerada de la misma, o a la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una variante degenerada de la misma, pero que además comprende una o más mutaciones, de forma que las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el alelo *aveC* de tipo silvestre y que expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada o la variante degenerada de la misma, producen una relación o cantidad diferente de avermectinas que la producida por las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

De acuerdo con la presente invención, tales moléculas polinucleotídicas pueden usarse para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que presentan un cambio detectable en la producción de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen avermectinas en una relación

reducida de clases 2:1 en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* que producen mayores niveles de avermectinas en comparación con la misma cepa que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En otra realización preferida, tales moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el gen *aveC*.

Las mutaciones en el alelo o en la secuencia codificante de *aveC* incluyen cualquier mutación que introduzca una o más deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC, que produzca el truncamiento del producto génico AveC, o cualquier combinación de las mismas, y que produzca el resultado deseado. Se pretende que tales secuencias de alelos de *aveC* mutados incluyan cualquier variante degenerada de las mismas. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas polinucleotídicas que comprenden la secuencia de nucleótidos del alelo de *aveC* o una variante degenerada de la misma, la secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o una variante degenerada de la misma, o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC

ID NO: 1) o una variante degenerada de la misma, pero que además comprenden una o más mutaciones que codifican la sustitución de un resto aminoácido por un resto aminoácido diferente en las posiciones seleccionadas en el producto génico AveC. En varias realizaciones no limitantes, de las que varias se ejemplifican más adelante, tales sustituciones pueden realizarse en cualquiera de las posiciones de aminoácidos del producto génico AveC que correspondan a las posiciones de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 ó 298 de la SEC ID NO: 2, o alguna combinación de las mismas.

Las mutaciones de la secuencia codificante *aveC* se realizan por cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos, incluyendo el uso de una PCR propensa a error o de mutagénesis de cassette. Por ejemplo, puede emplearse mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para alterar la secuencia del alelo o de la ORF de *aveC* de una forma definida, tal como, por ejemplo, para introducir uno o más sitios de restricción, o un codón de terminación, en regiones específicas dentro del alelo o la ORF de *aveC*. También pueden usarse procedimientos tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos 5.605.793, en la Patente de Estados Unidos 5.830.721 y en la Patente de Estados Unidos 5.837.458, que implican fragmentación

aleatoria, ciclos repetidos de mutagénesis y redistribución de nucleótidos, para generar grandes bibliotecas de polinucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos que codifican mutaciones de *aveC*.

Las mutaciones deseadas pueden ser útiles, particularmente cuando sirven para alterar uno o más restos aminoácidos conservados en el producto génico AveC. Por ejemplo, una comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los productos génicos AveC y los productos génicos homólogos a AveC de *S. avermitilis* (SEC ID NO: 2), *S. griseochromogenes* (SEC ID NO: 5) y *S. hygroscopicus* (SEC ID NO: 4), como se presenta en la FIGURA 6, indica sitios de conservación significativa de restos aminoácidos entre estas especies. La mutagénesis deseada que conduce a un cambio en uno o más de estos restos aminoácidos conservados puede ser particularmente eficaz para producir nuevas cepas mutantes que presentan alteraciones deseables en la producción de avermectinas.

La mutagénesis aleatoria también puede ser útil y puede realizarse por exposición de las células de *S. avermitilis* a la radiación ultravioleta o a rayos X, o a mutágenos químicos tales como N-metil-N'-nitrosoguanidina, etil metano sulfonato, ácido nitroso o mostazas nitrogenadas. Véase, por ejemplo, Ausubel, 1989, mencionado anteriormente, para una revisión de las técnicas de

mutagénesis.

Una vez generadas las moléculas polinucleotídicas mutadas, se analizan para determinar si pueden modular la biosíntesis de avermectinas en *S. avermitilis*. En una realización preferida, una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos mutada se ensaya mediante complementación de una cepa de *S. avermitilis* en la que el gen *aveC* se ha inactivado para dar un efecto de fondo negativo a *aveC* (*aveC*$^-$). En un procedimiento no limitante, la molécula polinucleotídica mutada se ajusta a un plásmido de expresión en asociación operativa con uno o más elementos reguladores, plásmido que también comprende preferiblemente uno o más genes de resistencia a fármacos para permitir la selección de las células transformadas. Después, este vector se utiliza para transformar células huésped *aveC*$^-$ usando técnicas conocidas y las células transformadas se seleccionan y cultivan en un medio de fermentación apropiado en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas. Después, los productos de fermentación se analizan por HPLC para determinar la capacidad de la molécula polinucleotídica mutada para complementar la célula huésped. En la Sección 8.3, mostrada más adelante, se ilustran varios vectores que llevan moléculas polinucleotídicas mutadas capaces de reducir la relación de avermectinas B2:B1, incluyendo

pSE188, pSE199, pSE231, pSE239 y pSE290 a pSE297.

La presente invención proporciona procedimientos para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* capaces de alterar la relación y/o cantidad de avermectinas producidas. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* capaces de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas, que comprende: (a) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, y en la que se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado; (b) determinar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a), pero que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre o un alelo de *aveC* que tiene la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la misma; y (c) comparar la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b); de tal forma que si la relación de avermectinas de las

clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* capaz de alterar la relación de avermectinas de clases 2:1. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 se reduce por la mutación.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* o construcciones genéticas que comprenden la ORF de *aveC* capaces de alterar la cantidad de avermectinas producidas, que comprende: (a) determinar la cantidad de avermectinas producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* en la que se ha inactivado el alelo de *aveC* nativo, y en la que se ha introducido y se está expresando una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado o que comprende una construcción genética que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC; (b) determinar la cantidad de avermectinas producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en la etapa (a), pero que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre o una secuencia de nucleótidos que es homóloga al mismo; y (c) comparar la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis*

de la etapa (a) con la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b); de tal forma que si la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (a) es diferente de la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S. avermitilis* de la etapa (b), entonces se ha identificado una mutación de la ORF de *aveC* o una construcción genética capaz de alterar la cantidad de avermectinas. En una realización preferida, la cantidad de avermectinas producidas se aumenta por la mutación.

Cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente para identificar mutaciones se realiza usando un medio de cultivo de fermentación, preferiblemente suplementado con ácido ciclohexano carboxílico, aunque también pueden usarse otros precursores de ácidos grasos apropiados, tales como uno cualquiera de los precursores de ácidos grasos presentados en la TABLA 1.

Una vez que se ha identificado una molécula polinucleotídica mutada que modula la producción de avermectinas en una dirección deseable, puede determinarse la localización de la mutación en la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico AveC mutado, puede aislarse por PCR y someterse a un análisis de la secuencia de ADN usando procedimientos

conocidos. Comparando la secuencia de ADN del alelo de *aveC* mutado con la del alelo de *aveC* de tipo silvestre, pueden determinarse las mutaciones responsables de la alteración de la producción de avermectinas. En realizaciones específicas, aunque no limitantes de la presente invención, los productos génicos AveC de *S. avermitilis* que comprendían sustituciones de un solo aminoácido en cualquiera de los restos 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T) o 230 (G230D), o sustituciones dobles en las posiciones 138 (S138T) y 139 (A139T o A139F), produjeron cambios en la función del producto génico AveC, de tal forma que se alteró la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas (véase la Sección 8, mostrada más adelante), correspondiendo las posiciones de aminoácidos mencionadas a las presentadas en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 2). Además, se ha demostrado que cada una de las siguiente siete combinaciones de mutaciones reduce eficazmente la relación de avermectinas de clases 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. Como se usa en este documento, las designaciones mencionadas anteriormente, tales como A139T, indican el resto de aminoácido original mediante una sola letra, que en este ejemplo es la alanina (A), en la posición indicada, que en este ejemplo es la posición 139

(haciendo referencia a la SEC ID NO: 2) del polipéptido, seguido del resto de aminoácido que reemplaza al resto de aminoácido original, que en este ejemplo es la treonina (T). Por consiguiente, la presente invención incluye las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican los productos génicos AveC de *S. avermitilis* mutados que comprenden sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 o 298 (véase la FIGURA 1), o cualquier combinación de las mismas.

En una realización preferida, tales mutaciones codifican sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una

sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido S en la posición 138 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(h) el resto de aminoácido A en la posición 139 reemplazado por T o F o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T o F;

(i) el resto de aminoácido K en la posición 154 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(j) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(k) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(l) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

(m) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L;

(n) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H;

siendo las sustituciones de aminoácidos conservativas como se han definido anteriormente en la Sección 5.1.

En otra realización preferida, tales mutaciones codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos, seleccionándose la combinación de restos de aminoácidos sustituidos entre el grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos S138 y A139;

(b) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(c) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(d) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(e) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(f) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(g) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(h) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

En otra realización preferida, las combinaciones específicas de mutaciones en el alelo de *aveC* útiles para reducir eficazmente la relación de avermectinas de clases 2:1 de acuerdo con la presente invención se seleccionan

entre una o más del grupo compuesto por:

(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) G111/P289L; y

(i) A139T/K154E/Q298H.

La presente invención proporciona además composiciones para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células contienen un alelo de *aveC* mutado que da como resultado la alteración de la producción de avermectinas. Por ejemplo, la presente invención proporciona vectores recombinantes que pueden usarse para dirigir cualquiera de las moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos mutadas de la presente invención, al sitio del gen *aveC* del cromosoma de *S. avermitilis* para insertar o reemplazar la ORF de *aveC* o una porción de la misma mediante recombinación homóloga. De acuerdo con la presente invención, sin embargo, una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención proporcionada aquí, también puede funcionar modulando la biosíntesis de avermectinas cuando

se inserta en el cromosoma de *S. avermitilis* en un sitio distinto del gen *aveC* o cuando se mantiene episomalmente en las células de *S. avermitilis*. Así pues, la presente invención también proporciona vectores que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención, vectores que pueden usarse para insertar la molécula polinucleotídica en un sitio del cromosoma de *S. avermitilis* distinto del gen *aveC* o para mantenerse episomalmente.

En una realización preferida, la presente invención proporciona vectores de reemplazo génico que pueden usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo en células de una cepa de *S. avermitilis*, con lo que se generan nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, se reduce la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células. Tales vectores de reemplazo génico pueden construirse usando moléculas polinucleotídicas mutadas presentes en vectores de expresión proporcionados aquí, tales como, por ejemplo, pSE188, pSE199 y pSE231, vectores de expresión que se ejemplifican en la Sección 8 mostrada más adelante.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona vectores que pueden usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo en células de una cepa de *S. avermitilis* para generar nuevas cepas de células que producen cantidades alteradas de avermectinas en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas producidas por las células. En una realización específica, aunque no limitante, tal vector comprende además un promotor fuerte como se conoce en la técnica, tal como, por ejemplo, el promotor *ermE* fuerte constitutivo de *Saccharopolyspora erythraea*, que se sitúa cadena arriba y en asociación operativa con el alelo de *aveC*. Tal vector puede ser el plásmido pSE189, descrito en el Ejemplo 11 mostrado más adelante, o puede construirse mediante el uso del alelo de *aveC* mutado del plásmido pSE189.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona vectores de reemplazo génico que son útiles para inactivar el gen *aveC* en una cepa de tipo silvestre de *S. avermitilis*. En una realización no limitante, tales vectores de reemplazo génico pueden construirse usando la molécula polinucleotídica mutada presente en el plásmido pSE180 (ATCC 209605), que se ejemplifica en la Sección 8.1

mostrada más adelante (FIGURA 3). La presente invención proporciona además vectores de reemplazo génico que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende o consta de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural al gen *aveC in situ* en el cromosoma de *S. avermitilis*, incluyendo, por ejemplo, las que flanquean las secuencias de nucleótidos mostradas en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1), vectores que pueden usarse para delecionar la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*.

La presente invención proporciona además procedimientos para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado y que producen una relación y/o cantidad de avermectinas alterada en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado y que producen una relación alterada de avermectinas de clases 2:1 en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto génico que altera la

relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo un alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una relación de clases 2:1 alterada en comparación con la relación de clases 2:1 producida por células de la cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización más preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una nueva cepa de *S. avermitilis*, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector capaz de introducir una mutación en el alelo de *aveC* de tales células, donde la mutación del alelo de *aveC* ocasiona la sustitución en el producto génico AveC codificado de un resto de aminoácido diferente en una o más posiciones de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 ó 298 de la SEC ID NO: 2, de tal forma que las células de la cepa de *S. avermitilis* en las que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma producen una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC*

de tipo silvestre. En una realización preferida, la relación alterada de avermectinas de clases 2:1 se reduce.

Como se usa en este documento, cuando se dice que un resto de aminoácido codificado por un alelo de *aveC* en el cromosoma de *S. avermitilis*, o en un vector o molécula de polinucleótido aislada de la presente invención, "corresponde" a un resto de aminoácido particular de la SEC ID NO: 2, o cuando se dice que una sustitución de aminoácidos se produce en una posición particular "que corresponde" a la de un resto de aminoácido numerado específico de la SEC ID NO: 2, se pretende hacer referencia al resto de aminoácido en la misma localización relativa en el producto génico AveC, la cual puede determinarse rápidamente por el especialista en la técnica mediante referencia a la secuencia de aminoácidos presentada en este documento como SEC ID NO: 2.

La presente invención proporciona además procedimientos para obtener nuevas cepas en las que las mutaciones específicas en el alelo de *aveC* que codifican mutaciones particulares se mencionan como cambios de bases en posiciones de nucleótidos específicas en el alelo de *aveC* "que corresponden" a posiciones de nucleótidos particulares como se muestran en la SEC ID NO: 1. Como se ha indicado anteriormente con respecto a las posiciones de aminoácidos correspondientes, cuando se dice que una

posición de nucleótido en el alelo de *aveC* "corresponde" a una posición de nucleótido particular de la SEC ID NO: 1, se pretende hacer referencia al nucleótido en la misma localización relativa en la secuencia de nucleótidos *aveC*, la cual puede determinarse rápidamente por el especialista en la técnica mediante referencia a la secuencia de nucleótidos presentada en este documento como SEC ID NO: 1.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que producen cantidades alteradas de avermectinas, que comprende transformar las células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector que lleva un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende el alelo de *aveC*, cuya expresión da como resultado una alteración de la cantidad de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o una construcción genética en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una cantidad alterada en comparación con la cantidad de avermectinas producidas por las células de la cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas

producidas en las células transformadas.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células comprenden un alelo de *aveC* inactivado, que comprende transformar células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan cualquier alelo de *aveC* con un vector que inactiva el alelo de *aveC*, y seleccionar las células transformadas en las que el alelo de *aveC* se ha inactivado. En una realización preferida, aunque no limitante, se transforman las células de una cepa de *S. avermitilis* con un vector de reemplazo génico que lleva un alelo de *aveC* que se inactivado por mutación o reemplazo de una porción del alelo de *aveC* con una secuencia génica heteróloga, y se seleccionan las células transformadas en las que el alelo de *aveC* nativo se ha reemplazado por el alelo de *aveC* inactivado. La inactivación del alelo de *aveC* puede determinarse por análisis de HPLC de los productos de fermentación como se describe más adelante. En una realización específica, aunque no limitante, descrita en la Sección 8.1 mostrada más adelante, el alelo de *aveC* se inactiva mediante inserción del gen *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea* en la ORF de *aveC*.

La presente invención proporciona además nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que se han transformado con cualquiera de las moléculas

polinucleotídicas o vectores de la presente invención. En una realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo en lugar de o además del alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las células de la nueva cepa producen avermectinas en una relación alterada de clases 2:1 en comparación con la relación de avermectinas de clases 2:1 producida por las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la relación alterada de clases 2:1 producida por las nuevas células se reduce. Tales nuevas cepas son útiles en la producción a gran escala de avermectinas deseables desde el punto de vista comercial, tales como doramectina. En una realización más preferida, la presente invención proporciona células de *S. avermitilis* que comprenden cualquiera de las mutaciones o combinaciones de mutaciones mencionadas anteriormente en el alelo de *aveC* en las posiciones de nucleótidos correspondientes a las presentadas anteriormente o bien que codifican cualquiera de las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente en el producto génico AveC. Aunque tales mutaciones pueden estar presentes en tales células en un elemento extracromosómico, tal como un plásmido, se prefiere que tales mutaciones estén presentes

en el alelo de *aveC* localizado en el cromosoma de *S. avermitilis*. En una realización preferida, la presente invención proporciona una cepa de *Streptomyces avermitilis* que comprende células que tienen una mutación en el alelo de *aveC* que codifica un producto génico AveC que tiene una sustitución en una o más posiciones de aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 o 298 de la SEC ID NO: 2, donde la célula produce una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por una célula de la misma cepa de *S. avermitilis* que expresa el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

Es un objetivo principal de los ensayos de selección descritos en este documento, identificar alelos mutados del gen *aveC* cuya expresión, en células de *S. avermitilis*, altere y, más particularmente, reduzca la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas. En una realización preferida, la relación de avermectinas B2:B1 producidas por las células de una nueva cepa de *S. avermitilis* de la presente invención que expresa un alelo de *aveC* mutado, o una variante degenerada del mismo, de la presente invención es aproximadamente 1,6:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 1:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es

aproximadamente 0,84:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,80:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,75:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,73:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,68:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,67:1 o menor. En una realización más preferida, la relación es aproximadamente 0,57:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,53:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,42:1 o menor. En una realización aún más preferida, la relación es aproximadamente 0,40:1 o menor.

En una realización específica descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación menor de 1,6:1. En una realización especifica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,94:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,88:1. En otra realización específica

diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,84:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,75:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,73:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,68:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,67:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,57:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,53:1. En

otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,42:1. En otra realización específica diferente descrita más adelante, las nuevas células de la presente invención producen ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,40:1.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo, o una construcción genética que comprende un alelo de *aveC* o una variante degenerada del mismo, en lugar de o además del alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las células de la nueva cepa producen una cantidad alterada de avermectinas en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la nueva cepa produce una mayor cantidad de avermectinas. En una realización no limitante, la construcción genética comprende además un promotor fuerte, tal como el promotor *ermE* fuerte constitutivo de *Saccharopolyspora erythraea*, cadena arriba y en asociación operativa con la ORF de *aveC*.

En otra realización preferida, la presente invención

proporciona nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células en las que se ha inactivado el gen *aveC*. Tales cepas son útiles para el espectro diferente de avermectinas que producen en comparación con la cepa de tipo silvestre, y en ensayos de selección de complementación como se describen en este documento, para determinar si la mutagénesis dirigida o aleatoria del gen *aveC* afecta a la producción de avermectinas. En una realización específica descrita más adelante, se modificaron por ingeniería genética células huésped de *S. avermitilis* para que contuvieran un gen *aveC* inactivado. Por ejemplo, se generó la cepa SE180-11 descrita en los ejemplos mostrados más adelante, usando el plásmido de reemplazo génico pSE180 (ATCC 209605) (FIGURA 3), que se construyó para inactivar el gen *aveC* de *S. avermitilis* por inserción del gen de resistencia *ermE* en la región codificante de *aveC*.

La presente invención proporciona además productos génicos AveC de *S. avermitilis* mutados, expresados de forma recombinante, codificados por cualquiera de las moléculas polinucleotídicas mencionadas anteriormente de la invención, y procedimientos para prepararlos.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto

génico que altera la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresa el alelo de *aveC* mutado en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas en el cultivo por las células que expresan el alelo de *aveC* mutado se reduce. Este procedimiento proporciona una mayor eficacia en la producción de avermectinas valiosas desde el punto de vista comercial, tales como la doramectina.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar las células de una cepa de *S. avermitilis*, células que expresan un alelo de *aveC* mutado o una construcción genética que comprende un alelo de *aveC* que da como resultado la producción de una cantidad alterada de avermectinas producidas por las células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o una construcción genética, en comparación con las células de la misma cepa que no expresan el alelo de *aveC* mutado o la construcción genética, sino que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo

en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, aumenta la cantidad de avermectinas producidas en el cultivo por las células que expresan el alelo de *aveC* mutado, la variante degenerada o la construcción genética.

La presente invención proporciona además una nueva composición de avermectinas producidas por una cepa de *S. avermitilis* que expresa un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo, que codifica un producto génico que reduce la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o la variante degenerada en comparación con las células de la misma cepa que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, donde las avermectinas de la nueva composición se producen en una relación reducida de clases 2:1 en comparación con la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre. La nueva composición de avermectinas puede estar presente según se produce en el fluido de cultivo de fermentación agotado o puede recogerse del mismo. La nueva composición de avermectinas puede purificarse parcial o sustancialmente del fluido de cultivo por técnicas bioquímicas conocidas de

purificación, tales como precipitación con sulfato amónico, diálisis, fraccionamiento por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, etc.

5.4 Usos de las Avermectinas

Las avermectinas son agentes antiparasitarios muy activos que tienen utilidad particular como antihelmínticos, ectoparasiticidas, insecticidas y acaricidas. Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con los procedimientos de la presente invención son útiles para cualquiera de estos fines. Por ejemplo, los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención son útiles para tratar diversas enfermedades o afecciones en los seres humanos, particularmente cuando estas enfermedades o afecciones están provocadas por infecciones de parásitos, como se sabe en la técnica. Véase, por ejemplo, Ikeda y Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7): 2591-2609. Más particularmente, los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención son eficaces en el tratamiento de una diversidad de enfermedades o afecciones provocadas por endoparásitos, tales como nematodos parásitos, que pueden infectar a los seres humanos, animales domésticos, cerdos, ovejas, aves de corral, caballos o vacas.

Más específicamente, los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención, son

eficaces contra nematodos que infectan a los seres humanos, así como contra los que infectan diversas especies de animales. Tales nematodos incluyen parásitos gastrointestinales tales como *Ancylostoma, Necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Capillaria, Trichuris, Enterobius, Dirofilaria* y parásitos que se encuentran en la sangre o en otros tejidos u órganos, tales como gusanos filáricos y los estados intestinales extractos de *Strongyloides* y *Trichinella*.

Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención también son útiles en el tratamiento de infecciones por ectoparásitos, incluyendo, por ejemplo, infestaciones de mamíferos y aves provocadas por artrópodos, originadas por garrapatas, ácaros, piojos, pulgas, moscardas, insectos mordedores o larvas de dípteros migratorias que pueden afectar a las vacas y a los caballos, entre otros.

Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención también son útiles como insecticidas contra plagas domésticas tales como, por ejemplo, cucarachas, polillas, derméstidos de las alfombras y mosca doméstica, entre otras, así como plagas de insectos del grano almacenado y de plantas agrícolas, plagas que incluyen la araña roja, áfidos, orugas y ortópteros tales como langostas, entre otros.

Los animales que pueden tratarse con los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención incluyen ovejas, vacas, caballos, ciervos, cabras, cerdos, aves, incluyendo aves de corral, perros y gatos.

Un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención se administra en una formulación apropiada para el uso específico pretendido, la especie particular de animal huésped a tratar y el parásito o insecto implicado. Para uso como un parasiticida, un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede administrase por vía oral en forma de una cápsula, bolo, comprimido o poción líquida o, como alternativa, puede administrarse en forma de una composición de vertido, de inyección o como un implante. Tales formulaciones se preparan de una forma convencional de acuerdo con la práctica veterinaria estándar. Así pues, las cápsulas, bolos o comprimidos pueden prepararse mezclando el ingrediente activo con un diluyente o vehículo finamente dividido adecuado que contiene además un agente disgregante y/o aglutinante, tal como almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio, etc. Una formulación de poción puede prepararse dispersando el ingrediente activo en una solución acuosa junto con un agente de dispersión o humectante, etc. Las formulaciones inyectables pueden prepararse en forma de una solución estéril que puede

contener otras sustancias, tales como, por ejemplo, suficientes sales y/o glucosa como para hacer la solución isotónica con la sangre.

Tales formulaciones variarán con respecto al peso del compuesto activo dependiendo del paciente o especie de animal huésped a tratar, de la gravedad y tipo de infección y del peso corporal del huésped. Generalmente, para la administración oral es satisfactoria una dosis de compuesto activo de aproximadamente 0,001 a 10 mg por kg de peso corporal del paciente o del animal, administrada en forma de una sola dosis o en dosis divididas, durante un período de 1 a 5 días. Sin embargo, puede haber casos en los que estén indicadas dosis superiores o inferiores, lo que determinará, por ejemplo, un médico o veterinario, basándose en los síntomas clínicos.

Como alternativa, un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede administrarse junto con el pienso del animal y, para este fin, puede prepararse un aditivo alimentario concentrado o premezcla para mezclar con el pienso normal del animal.

Para el uso como un insecticida y para el tratamiento de plagas agrícolas, un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede aplicarse en forma de una pulverización, polvo fino, emulsión y similar, de acuerdo con la práctica agrícola convencional.

6. EJEMPLO: FERMENTACIÓN DE *STREPTOMYCES AVERMITILIS* Y ANÁLISIS DE AVERMECTINAS B2:B1

Las cepas que carecen de las actividades de 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada y 5-O-metiltransferasa no producen avermectinas si el medio de fermentación no se suplementa con ácidos grasos. Este ejemplo demuestra que en tales mutantes, puede obtenerse un amplio intervalo de relaciones B2:B1 de avermectinas cuando la biosíntesis se inicia en presencia de diferentes ácidos grasos.

6.1 Materiales y Procedimientos

Se almacenó *Streptomyces avermitilis* ATCC 53692 a -70°C como un caldo entero preparado en medio de siembra que constaba de: Almidón (Nadex, Laing National) - 20 g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamine pH (Yeast Products Inc) - 5 g; carbonato cálcico - 1 g. El volumen final se ajustó a 1 litro con agua corriente, el pH se ajustó a 7,2 y el medio se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Se usaron 2 ml de una suspensión descongelada de la preparación anterior para inocular un matraz que contenía 50 ml del mismo medio. Después de 48 horas de incubación a 28°C en un agitador rotatorio a 180 rpm, se usaron 2 ml del caldo para inocular un matraz que contenía 50 ml de un

medio de producción que constaba de: Almidón - 80 g; carbonato cálcico - 7 g; Pharmamedia - 5 g; fosfato ácido dipotásico - 1 g; sulfato de magnesio - 1 g; ácido glutámico - 0,6 g; sulfato ferroso heptahidratado - 0,01 g; sulfato de cinc - 0,001 g; y sulfato manganoso - 0,001 g. El volumen final se ajustó a 1 litro con agua corriente, el pH se ajustó a 7,2 y el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Se disolvieron diversos ácidos carboxílicos sustratos (véase la TABLA 1) en metanol y se añadieron al caldo de fermentación 24 horas después de la inoculación para dar una concentración final de 0,2 g/litro. El caldo de fermentación se incubó durante 14 días a 28°C, después se centrifugó (2.500 rpm durante 2 minutos) y se desechó el sobrenadante. El sedimento miceliano se extrajo con acetona (15 ml) y después con diclorometano (30 ml) y la fase orgánica se separó, se filtró y después se evaporó a sequedad. El residuo se recogió en metanol (1 ml) y se analizó por HPLC con un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1090A equipado con un detector de exploración de ordenación de diodos fijado a 240 nm. La columna usada fue una columna de 4,6 mm x 25 cm, 5 μm, C-18 de Beckman Ultrasphere, mantenida a 40°C. Se inyectaron 25 μl de la solución de metanol anterior en la columna. La elución se realizó con un gradiente lineal de metanol-agua de 80:20 a

95:5 durante 40 minutos a 0,85 ml/min. Se usaron dos concentraciones patrón de ciclohexil B1 para calibrar la respuesta del detector y se midieron las áreas bajo las curvas para las avermectinas B2 y B1.

6.2 Resultados

Los tiempos de retención de HPLC observados para las avermectinas B2 y B1 y las relaciones 2:1 se muestran en la TABLA 1.

TABLA 1

	Tiempo de Retención de HPLC (min)		Relación
Sustrato	**B2**	**B1**	**B2:B1**
Ácido 4-tetrahidropiran carboxílico	8,1	14,5	0,25
Ácido isobutírico	10,8	18,9	0,5
Ácido 3-furoico	7,6	14,6	0,62
Ácido S-(+)-2-metilbutírico	12,8	21,6	1,0
Ácido ciclohexanocarboxílico	16,9	26,0	1,6
Ácido 3-tiofenocarboxílico	8,8	16,0	1,8
Ácido ciclopentanocarboxílico	14,2	23,0	2,0
Ácido 3-trifluorometilbutírico	10,9	18,8	3,9
Ácido 2-metilpentanoico	14,5	24,9	4,2
Ácido cicloheptanocarboxílico	18,6	29,0	15,0

Los datos presentados en la TABLA 1 demuestran un intervalo extremadamente amplio de relaciones de productos de avermectinas B2:B1, lo que indica una diferencia considerable en los resultados de la conversión deshidratante de los compuestos de clase 2 en compuestos de clase 1, dependiendo de la naturaleza de la cadena lateral de ácido graso de la unidad iniciadora suministrada. Esto indica que los cambios en las relaciones de B2:B1 que resultan de las alteraciones en la proteína AveC, pueden ser específicos para sustratos particulares. Por consiguiente, la selección de mutantes que presentan cambios en la relación B2:B1 obtenida con un sustrato particular necesita realizarse en presencia de ese sustrato. Los ejemplos descritos más delante usan ácido ciclohexanocarboxílico como sustrato de selección. Sin embargo, este sustrato se usa simplemente para ilustrar el potencial y no pretende limitar la aplicabilidad de la presente invención.

7. EJEMPLO: AISLAMIENTO DEL GEN *aveC*

Este ejemplo describe el aislamiento y caracterización de una región del cromosoma de *Streptomyces avermitilis* que codifica el producto génico AveC. Como se demuestra más adelante, el gen *aveC* se identificó como un gen capaz de modificar la relación entre las ciclohexil-B2 y las ciclohexil-B1 (B2:B1) avermectinas producidas.

7.1 Materiales y Procedimientos

7.1.1. Crecimiento de *Streptomyces* para el Aislamiento del ADN

Se siguió el siguiente procedimiento para cultivar *Streptomyces*. Se aislaron colonias individuales de *S. avermitilis* ATCC 31272 (aislado n° 2 de colonias individuales) en YDP-6 de concentración media que contenía: Extracto de Levadura de Difco - 5 g; Bacto-peptona de Difco - 5 g; dextrosa - 2,5 g; MOPS - 5 g; y Bacto agar de Difco - 15 g. El volumen final se ajustó a 1 litro con H_2O destilada, el pH se ajustó a 7,0 y el medio se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Los micelios desarrollados en el medio anterior se usaron para inocular 10 ml de medio TSB (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g, en 1 litro de H_2O destilada, esterilizado en autoclave a 121°C durante 25 minutos) en un tubo de 25 mm x 150 mm que se mantuvo con agitación (300 rpm) a 28°C durante 48-72 horas.

7.1.2. Aislamiento de ADN Cromosómico de *Streptomyces*

Se pusieron alícuotas (de 0,25 ml a 0,5 ml) de los micelios desarrollados como se ha descrito anteriormente en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 seg. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 0,25 ml de tampón TSE (20 ml de sacarosa

1,5 M, 2,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 2,5 ml de EDTA 1 M, pH 8,0 y 75 ml de H_2O destilada) que contenía 2 mg/ml de lisozima. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos con agitación, se cargaron en un instrumento automático de aislamiento de ácidos nucleicos AutoGen 540™ (Integrated Separation Systems, Natick, MA) y se aisló el ADN genómico usando Cycle 159 (software del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como alternativa, se pusieron 5 ml de micelio en un tubo de 17 mm x 100 mm, las células se concentraron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón TSE, se concentraron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón TSE que contenía 2 mg/ml de lisozima y se incubaron a 37°C con agitación durante 30-60 minutos. Después de la incubación, se añadieron 0,5 ml dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y las células se incubaron a 37°C hasta que se completó la lisis. El lisado se incubó a 65°C durante 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente, se dividió en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml y se extrajo 1 vez con 0,5 ml de fenol/cloroformo (50% de fenol previamente equilibrado con Tris 0,5 M, pH 8,0; 50% de cloroformo). La fase acuosa se retiró y se extrajo de 2 a 5 veces con cloroformo:alcohol isoamílico

(24:1). El ADN se precipitó mediante la adición de 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 4,8, incubación de la mezcla en hielo durante 10 minutos, centrifugación de la mezcla a 15.000 rpm a 5°C durante 10 minutos y separación del sobrenadante poniéndolo en un tubo limpio al que se añadió 1 volumen de isopropanol. La mezcla de sobrenadante más isopropanol después se incubó en hielo durante 20 minutos, se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 minutos a 5°C, el sobrenadante se retiró y el sedimento de ADN se lavó una vez con etanol al 70%. Después de secar el sedimento, el ADN se resuspendió en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

7.1.3. <u>Aislamiento del ADN Plasmídico de *Streptomyces*</u>

Se puso una alícuota (1,0 m) de micelio en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en 1,0 ml de sacarosa al 10,3%, se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos y el sobrenadante se desechó. Las células después se resuspendieron en 0,25 ml de tampón TSE que contenía 2 mg/ml de lisozima, se incubaron a 37°C durante 20 minutos con agitación y se cargaron en el instrumento automático de aislamiento de ácido nucleico AutoGen 540™. El ADN plasmídico se aisló usando Cycle 106 (software del equipo)

de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como alternativa, se pusieron 1,5 ml de micelio en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en 1,0 ml de sacarosa al 10,3% y se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 segundos y el sobrenadante se desechó. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón TSE que contenía 2 mg/ml de lisozima y se incubaron a 37°C durante 15-30 minutos. Después de la incubación, se añadieron 0,25 ml de SDS alcalino (NaOH 0,3 N, SDS al 2%) y las células se incubaron a 55°C durante 15-30 minutos o hasta que la solución fue transparente. Se añadió acetato sódico (0,1 ml, 3 M, pH 4,8) a la solución de ADN, la cual después se incubó en hielo durante 10 minutos. Las muestras de ADN se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 5°C. El sobrenadante se retiró a un tubo limpio, se añadieron 0,2 ml de fenol:cloroformo (50% de fenol: 50% de cloroformo) y se mezclaron suavemente. La solución de ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 5°C y la capa superior se retiró en un tubo Eppendorf limpio. Se añadió isopropanol (0,75 ml), la solución se mezcló suavemente y después se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La solución de ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 15

minutos a 5°C, el sobrenadante se retiró y el sedimento de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en tampón TE.

7.1.4. **Aislamiento de ADN Plasmídico de *E. coli***

Se inoculó una colonia de *E. coli* transformada individual en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) (Bacto-Triptona - 10 g; Extracto de Bacto levadura - 5 g; y NaCl - 10 g en 1 litro de H_2O destilada, pH 7,0, esterilizado en autoclave a 121°C durante 25 minutos y suplementado con 100 µg/ml de ampicilina). El cultivo se incubó durante una noche y se puso una alícuota de 1 ml en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Las muestras de cultivo se cargaron en el instrumento automático de aislamiento de ácidos nucleicos AutoGen 540™ y se aisló el ADN plasmídico usando el Cycle 3 (software del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.1.5. **Preparación y Transformación de Protoplastos de *S. avermitilis***

Se aislaron colonias individuales de *S. avermitilis* en YPD-6 de concentración media. Los micelios se usaron para inocular 10 ml de medio TSB en un tubo de 25 mm x 150 mm que después se incubó con agitación (300 rpm) a 28°C durante 48 horas. Se usó 1 ml de micelio para inocular 50 ml de medio YEME. El medio YEME contiene, por litro: Extracto de Levadura de Difco - 3 g; Bacto-peptona de Difco

- 5 g; Extracto de Malta de Difco - 3 g; Sacarosa - 300 g. Después de la esterilización en autoclave a 121°C durante 25 minutos, se añadió lo siguiente: $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 2,5 M (esterilizado por separado en un autoclave a 121°C durante 25 min) - 2 ml; y glicina (20%) (esterilizado por filtración) - 25 ml.

Los micelios se desarrollaron a 30°C durante 48-72 horas y se recogieron por centrifugación en un tubo de centrífuga de 50 ml (Falcon) a 3.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se desechó y los micelios se resuspendieron en tampón P, que contiene: sacarosa - 205 g; K_2SO_4 - 0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 2,02 g; H_2O - 600 ml; K_2PO_4 (0,5%) - 10 ml; solución de oligoelementos* - 20 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3,68%) - 100 ml; y tampón MES (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml. (* La solución de oligoelementos contiene por litro: $ZnCl_2$ - 40 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 200 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ - 10 mg; $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ - 10 mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ - 10 mg; $(NH_4)_6\ MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 10 mg). El pH se ajustó a 6,5, el volumen final se ajustó a 1 litro y el medio se filtró en caliente a través de un filtro de 0,45 micrómetros.

Los micelios se reunieron a 3.000 rpm durante 20 min., el sobrenadante se desechó y los micelios se resuspendieron en 20 ml de tampón P que contenía 2 mg/ml de lisozima. Los micelios se incubaron a 35°C durante 15 minutos con agitación y se comprobaron microscópicamente para

determinar el grado de formación de protoplastos. Cuando se completó la formación de protoplastos, los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y los protoplastos se resuspendieron en 10 ml de tampón P. Los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró, los protoplastos se resuspendieron en 2 ml de tampón P y se distribuyeron aproximadamente 1 x 10^9 protoplastos en viales criogénicos de 2,0 ml (Nalgene).

Un vial que contenía 1 x 10^9 protoplastos se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y los protoplastos se resuspendieron en 0,1 ml de tampón P. Se añadieron de 2 a 5 μg de ADN transformante a los protoplastos, seguido inmediatamente por la adición de 0,5 ml de tampón T de trabajo. La base de tampón T contiene: PEG-1000 (Sigma) - 25 g; sacarosa - 2,5 g; H_2O - 83 ml. El pH se ajustó a 8,8 con NaOH 1 N (esterilizado por filtración) y la base de tampón T se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C. El tampón T de trabajo, hecho el mismo día del uso, era base de tampón T - 8,3 ml; K_2PO_4 (4 mM) - 1,0 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 M) - 0,2 ml; y TES (1M, pH 8) - 0,5 ml. Cada componente del tampón T de trabajo se esterilizó por filtración individualmente.

Dentro de un período de 20 segundos desde la adición del tampón T a los protoplastos, también se añadió 1 ml de

tampón P y los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y los protoplastos se resuspendieron en 0,1 ml de tampón P. Los protoplastos después se aplicaron en placas en medio RM14 que contiene: sacarosa - 205 g; K_2SO_4 - 0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 10,12 g; glucosa - 10 g; Casaminoácidos de Difco - 0,1 g; Extracto de Levadura de Difco - 5 g; Agar de Harina de Avena de Difco - 3 g; Bacto Agar de Difco - 22 g; H_2O destilada - 800 ml. La solución se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 min. Después del tratamiento en autoclave, se añadieron soluciones madre estériles de lo siguiente: K_2PO_4 (0,5 %) - 10 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 M) - 5 ml; L-prolina (20%) - 15 ml; tampón MES (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml; solución de oligoelementos (la misma que se ha descrito anteriormente) - 2 ml; solución madre de cicloheximida (25 mg/ml) - 40 ml; y NaOH 1N - 2 ml. Se aplicaron alícuotas de 25 ml de medio RM14 por placa y las placas se secaron durante 24 horas antes del uso.

Los protoplastos se incubaron con una humedad del 95% a 30°C durante 20-24 horas. Para seleccionar los transformantes resistentes a tiostrepton, se extendió uniformemente 1 ml de tampón de recubrimiento que contenía 125 μg x ml de tiostrepton sobre las placas de regeneración de RM14. Los tampones de recubrimiento contienen por 100 ml: sacarosa - 10,3 g; solución de oligoelementos (la misma

que se ha descrito anteriormente) - 0,2 ml; y MES (1 M, pH 6,5) - 1 ml. Los protoplastos se incubaron con una humedad del 95% a 30°C durante 7-14 días hasta que fueron visibles las colonias resistentes a tiostrepton (Thio^r).

7.1.6. **Transformación de Protoplastos de *Streptomyces lividans***

En algunos casos, se usó *S. lividans* TK64 (proporcionado por John Innes Institute, Norwich, Reino Unido.) para las transformaciones. Los procedimientos y composiciones para el desarrollo, la obtención de protoplastos y la transformación de *S. lividans* se describen en Hopwood y col., 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, Reino Unido y se realizaron como se describe en este documento. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes de *S. lividans* como se describe en la Sección 7.1.3 anterior.

7.1.7. **Análisis de Fermentación de Cepas de *S. avermitilis***

Se inocularon micelios de *S. avermitilis* desarrollados en YPD-6 de concentración media durante 4-7 días en tubos de 2,54 x 15,24 cm que contenían 8 ml de medio de preformación y dos perlas de vidrio de 5 mm. El medio de preformación contiene: almidón soluble (almidón hervido fino o KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/l;

Pharmamedia - 15 g/l; Ardamine pH - 5 g/l (Champlain Ind., Clifton, NJ); $CaCO_3$ - 2 g/l; 2 x bcfa ("bcfa" se refiere a ácidos grasos de cadena ramificada) que contiene una concentración final en el medio de 50 ppm de ácido 2-(+/-)-metil butírico, 60 ppm de ácido isobutírico y 20 ppm de ácido isovalérico. El pH se ajustó a 7,2 y el medio se trató en un autoclave a 121°C durante 25 min.

El tubo se agitó con un ángulo de 17° a 215 rpm a 29°C durante 3 días. Se usó una alícuota de 2 ml del cultivo de siembra para inocular un matraz Erlenmeyer de 300 ml que contenía 25 ml de medio de producción que contiene: almidón (almidón hervido fino o KOSO) - 160 g/l; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/l; Ardamine pH - 10 g/l; K_2PO_4 - 2 g/l; $MgSO_4 \cdot 4\ H_2O$ - 2 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,02 g/l; $MnCl_2$ - 0,002 g/l; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,002 g/l; $CaCO_3$ - 14 g/l; 2x bcfa (como se ha indicado anteriormente); y ácido ciclohexano carboxílico (CHC) (preparado como una solución al 20% a pH 7,0) - 800 ppm. El pH se ajustó a 6,9 y el medio se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 25 minutos.

Después de la inoculación, el matraz se incubó a 29°C durante 12 días con agitación a 200 rpm. Después de la incubación, se extrajo una muestra de 2 ml del matraz, se diluyó con 8 ml de metanol, se mezcló y la mezcla se centrifugó a 1.250 x g durante 10 minutos para sedimentar

los residuos. Después, el sobrenadante se ensayó por HPLC usando una columna ODS Beckman Ultrasphere (25 cm x 4,6 mm DI) con un caudal de 0,75 ml/min y detección por absorbancia a 240 nm. La fase móvil fue metanol/agua/acetonitrilo 86/8,9/5,1.

7.1.8. **Aislamiento de Genes PKS de *S. avermitilis***

Se preparó una biblioteca de cósmidos del ADN cromosómico de *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) y se hibridó con una sonda de cetosintasa (KS) obtenida a partir de un fragmento del gen de la policeturo sintasa (PKS) de *Saccharopolyspora erythraea*. Puede encontrarse una descripción detallada de la preparación de bibliotecas de cósmidos en Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente. En Hopwood y col., 1985, indicado anteriormente, se presenta una descripción detallada de la preparación de bibliotecas de ADN cromosómico de *Streptomyces*. Los clones de los cósmidos que contenían regiones que hibridaban con la cetosintasa se identificaron por hibridación con un fragmento *NdeI*/*Eco*47III de 2,7 kb procedente de pEX26 (suministrado amablemente por el Dr. P. Leadlay, Cambridge, Reino Unido). Se digirieron aproximadamente 5 ng de pEX26 usando *Nde*I y *Eco*47III. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa GTG SeaPlaque al 0,8% (FMC BioProducts, Rockland, ME). El fragmento *Nde*I/*Eco*47III de 2,7 kb se escindió del gel

después de la electroforesis y el ADN se recuperó del gel usando GELase™ de Epicentre Technologies, usando el Protocolo Rápido. El fragmento *Nde*I/*Eco*47III de 2,7 kb se marcó con [α-^{32}P]dCTP (desoxicitidina 5'-trifosfato, sal de tetra(trietilamonio), [alfa-^{32}P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) usando el Sistema de Traducción con Mella BRL (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizó una reacción típica en un volumen de 0,05 ml. Después de la adición de 5 μl de tampón de detención, el ADN marcado se separó de los nucleótidos no incorporados usando una columna G-25 Sephadex Quick Spin™ (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se seleccionaron aproximadamente 1.800 clones de cósmidos por hibridación de colonias. Se identificaron 10 clones que hibridaban fuertemente con la sonda KS de *Sacc. erythraea*. Las colonias de *E. coli* que contenían el ADN del cósmido se desarrollaron en medio líquido LB y el ADN del cósmido se aisló de cada cultivo en el instrumento automático de aislamiento de ácidos nucleicos AutoGen 540™ usando el Cycle 3 (software del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mapeo con endonucleasas de restricción y los análisis de hibridación con transferencia de Southern revelaron que cinco de los clones contenían regiones cromosómicas solapantes. Se construyó un mapa de

restricción *Bam*HI del genoma de *S. avermitilis* de los cinco cósmidos (es decir, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68 y pSE69) mediante análisis de los cósmidos solapantes e hibridaciones (FIGURA 4).

7.1.9. Identificación de ADN que Modula las Relaciones de Avermectinas B2:B1 e Identificación de una ORF de aveC

Se usaron los siguientes procedimientos para ensayar fragmentos subclonados derivados del clon cosmídico pSE66 con respecto a su capacidad de modular las relaciones de avermectinas B2:B1 en los mutantes AveC. pSE66 (5 µg) Se digirió con *Sac*I y *Bam*HI. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa SeaPlaque™ GTG al 0,8% (FMC BioProducts), se escindió un fragmento *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb del gel después de la electroforesis y el ADN se recuperó del gel usando GELase™ (Epicentre Technologies) usando el Protocolo Rápido. Se digirieron aproximadamente 5 µg del vector lanzadera pWHM3 (Vara y col., 1989, J. Bacteriol. 171:5872-5881) con *Sac*I y *Bam*HI. Se mezclaron aproximadamente 0,5 µg del inserto de 2,9 kb y 0,5 µg del pWHM3 digerido y se incubaron durante una noche con una unidad de ligasa (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) a 15°C, en un volumen total de 20 µl, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la incubación, se incubaron 5 µl de la mezcla de ligación a 70°C durante 10 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para

transformar células DH5α de *E. coli* competentes (BRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE119.

Se prepararon los protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* (cepa interna de Pfizer) y se transformaron con pSE119 como se ha descrito en la sección 7.1.5 anterior. La cepa 1100-SC38 es un mutante que produce significativamente más de la forma de ciclohexil avermectina B2 que de la forma ciclohexil avermectina-B1 cuando se suplementa con ácido ciclohexano carboxílico (B2:B1 de aproximadamente 30:1). Se aisló pSE119 usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* de la cepa de *E. coli* GM2163 (Obtenida de Dr. B. J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), la cepa DM1 de *E. coli* (BRL), o la cepa TK64 de *S. lividans*. Se aislaron transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 y se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los transformantes de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* que contenían pSE119 produjeron una relación alterada de ciclohexil avermectina-B2:ciclohexil avermectina-B1 de aproximadamente 3,7:1 (TABLA 2).

Habiendo establecido que pSE119 era capaz de modular

las relaciones de avermectinas B2:B1 en un mutante de AveC, se secuenció el inserto de ADN. Se aislaron aproximadamente 10 µg de pSE119 usando el equipo de aislamiento de ADN plasmídico (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenció usando un secuenciador de ADN automático ABI 373A (Perkin Elmer, Foster City, CA). Los datos de la secuencia se recopilaron y editaron usando programas Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). La secuencia de ADN y la ORF de *aveC* se presentan en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1).

Se construyó un nuevo plásmido, denominado pSE118, como se indica a continuación. Se digirieron aproximadamente 5 µg de pSE66 con *Sph*I y *Bam*HI. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa SeaPlaque GTG al 0,8% (FMC BioProducts), se escindió un fragmento *Sph*I/*Bam*HI de 2,8 kb del gel después de la electroforesis y el ADN se recuperó del gel usando GELase™ (Epicentre Technologies) usando el Protocolo Rápido. Se digirieron aproximadamente 5 µg del vector lanzadera pWHM3 con *Sph*I y *Bam*HI. Se mezclaron aproximadamente 0,5 µg del inserto de 2,8 kb y 0,5 µg de pWHM3 digerido y se incubaron durante una noche con una unidad de ligasa (New England Biolabs) a 15°C en un volumen total de 20 µl de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la incubación, se incubaron 5 µl de la mezcla de ligación a 70°C durante 10 minutos, se

enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para transformar células DH5α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto *Sph*I/*Bam*HI de 2,8 kb por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE118. El ADN del inserto en pSE118 y pSE119 solapa en aproximadamente 838 nucleótidos (FIGURA 4).

Los protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* se transformaron con pSE118 como se ha indicado anteriormente. Los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los transformantes de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* que contenían pSE118 no se alteraron en las relaciones de ciclohexil avermectina-B2:ciclohexil avermectina-B1 en comparación con la cepa 1100-SC38 (TABLA 2).

7.1.10. Amplificación por PCR del Gen *aveC* a partir del ADN Cromosómico de *S. avermitilis*

Se aisló un fragmento de ~ 1,2 kb que contenía la ORF de *aveC* del ADN cromosómico de *S. avermitilis* por amplificación por PCR, usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos de *aveC* obtenida anteriormente. Los cebadores de PCR se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador hacia la

derecha fue: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEC ID NO: 6); y el cebador hacia la izquierda fue: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEC ID NO: 7). La reacción por PCR se realizó con polimerasa Deep Vent™ (New England Biolabs) en tampón proporcionado por el fabricante y en presencia de dNTP 300 μM, glicerol al 10%, 200 pmoles de cada cebador, 0,1 μg de molde y 2,5 unidades de enzima en un volumen final de 100 μl, usando un aparato de ciclos térmicos Perkin-Elmer Cetus. El perfil térmico del primer ciclo fue de 95°C durante 5 minutos (etapa de desnaturalización), 60°C durante 2 minutos (etapa de reasociación) y 72°C durante 2 minutos (etapa de extensión). Los 24 ciclos posteriores tuvieron un perfil térmico similar con la excepción de que la etapa de desnaturalización se acortó a 45 segundos y la etapa de reasociación se acortó a 1 minuto.

El producto de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se detectó una sola banda de ADN de ~ 1,2 kb. Este ADN se purificó del gel y se ligó a 25 ng de vector romo pCR-Blunt linealizado (Invitrogen) en una relación de vector a inserto 1:10 molar, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se usó para transformar células *E. coli* competentes One Shot™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto de ~

1,2 kb mediante análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE179.

El ADN del inserto de pSE179 se aisló mediante digestión con *Bam*HI/*Xba*I, se separó por electroforesis, se purificó del gel y se ligó al vector lanzadera pWHM3, que también se había digerido con *Bam*HI/*Xba*I, en una concentración total de ADN de 1 μg en una relación de vector a inserto de 1:5 molar. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto de ~ 1,2 kb mediante análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE186 (FIGURA 2, ATCC 209604) se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, y el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina.

7.2. Resultados

Se identificó un fragmento *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb de pSE119 que, cuando se utilizaba para transformar a la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis*, alteraba significativamente la relación de producción de avermectinas B2:B1. La cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* normalmente tiene una relación B2:B1 de aproximadamente 30:1, pero cuando se transforma con un vector que comprende el fragmento *Sac*I/*Bam*HI de 2,9 kb, la relación de avermectinas B2:B1 se reduce a aproximadamente

3,7:1. El análisis de los cultivos de transformantes después de la fermentación verificó la presencia del ADN transformante.

Se secuenció el fragmento pSE119 de 2,9 kb y se identificó una ORF de ~ 0,9 kb (FIGURA 1) (SEC ID NO: 1) que incluye un fragmento *PstI/SphI* que previamente se había mutado para producir sólo productos B2 (Ikeda y col., 1995, mencionado anteriormente). Una comparación de esta ORF o su correspondiente polipéptido deducido, con bases de datos conocidas (GenEMBL, SWISS-PROT) no mostró ninguna homología fuerte con el ADN o las secuencias proteicas conocidas.

La TABLA 2 presenta el análisis de fermentación de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* transformada con diversos plásmidos.

TABLA 2

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	**No. de Transformantes Ensayados**	**Relación Media de B2:B1**
1100-SC38 (ninguno)	9	30,66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31,3
1100-SC38 (pSE119)	12	3,7
1100-SC38 (pSE118)	12	30,4
1100-SC38 (pSE185)	14	27,9

8. EJEMPLO: CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE AveC DE *S. AVERMITILIS*

Este ejemplo describe la construcción de varios mutantes diferentes de AveC de *S. avermitilis* usando las composiciones y procedimientos descritos anteriormente. Kieser y Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204:430-458 exponen una descripción general de técnicas para introducir mutaciones en un gen de *Streptomyces*. Anzai y col., 1988, J. Antibiot. XLI(2):226-233 y Stutzman-Engwall y col., 1992, J. Bacteriol. 174(1): 144-154 proporcionan una descripción más detallada. Estas referencias se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

8.1. Inactivación del Gen *aveC* de *S. avermitilis*

Se construyeron mutantes de AveC que contenían genes *aveC* inactivados, usando varios procedimientos, como se detalla a continuación.

En el primer procedimiento se reemplazó un fragmento *Sph*I/*Pst*I de 640 pb interno al gen *aveC* en pSE119 (plásmido descrito en la sección 7.1.9, anterior) por el gen *ermE* (para resistencia a eritromicina) de *Sacc. erythraea*. El gen *ermE* se aisló de pIJ4026 (proporcionado por John Innes Institute, Norwich, Reino Unido; véase también Bibb y col., 1985, *Gene* 41:357-368) mediante digestión con enzimas de restricción, con *Bgl*II y *Eco*RI, seguido por electroforesis,

y se purificó del gel. Este fragmento de ~ 1,7 kb se ligó a pGEM7Zf (Promega) que se había digerido con *Bam*HI y *Eco*RI y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto de ~ 1,7 kb se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE27.

pSE118 (descrito en la Sección 7.1.9 anterior) se digirió con *Sph*I y *Bam*HI, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto *Sph*I/*Bam*HI de ~ 2,8 kb se purificó del gel. pSE119 se digirió con *Pst*I y *Eco*RI, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto *Pst*I/*Eco*RI de ~ 1,5 kb se purificó del gel. El vector lanzadera pWHM3 se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI. pSE27 se digirió con *Pst*I y *Sph*I, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto *Pst*I/*Sph*I de ~ 1,7 kb se purificó del gel. Los cuatro fragmentos (es decir, de ~ 2,8 kb, ~ 1,5 kb, ~ 7,2 kb y ~ 1,7 kb) se ligaron entre sí en una ligación de cuatro vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se

denominó pSE180 (FIGURA 3; ATCC 209605).

pSE180 se utilizó para transformar TK64 de *S. lividans* y las colonias transformadas se identificaron por resistencia a tiostrepton y eritromicina. pSE180 se aisló de *S. lividans* y se usó para transformar protoplastos de *S. avermitilis*. Se identificaron cuatro transformantes de *S. avermitilis* resistentes a tiostrepton y los protoplastos se prepararon y cultivaron en placas en condiciones no selectivas en medio RM14. Después de regenerar los protoplastos, se seleccionaron colonias individuales con respecto a la presencia de resistencia a eritromicina y la ausencia de resistencia a tiostrepton, indicando la integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y la pérdida del replicón libre. Se identificó un transformante Erm^r $Thio^s$ y se denominó cepa SE180-11. El ADN cromosómico total se aisló de la cepa SE180-11, se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Hind*II, *Pst*I o *Sph*I, se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, se transfirió a membranas de nailon y se hibridó con la sonda *ermE*. Estos análisis demostraron que la integración cromosómica del gen de resistencia *ermE* y la deleción conjunta del fragmento *Pst*I/*Sph*I de 640 pb se había producido por un acontecimiento cruzado doble. El análisis de HPLC de los productos de fermentación de la cepa SE180-11, demostró que ya no se producían avermectinas normales

(FIGURA 5A).

En un segundo procedimiento para inactivar el gen *aveC*, el gen *ermE* de 1,7 kb se retiró del cromosoma de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*, dejando una deleción *Pst*I/*Sph*I de 640 pb en el gen *aveC*. Se construyó un plásmido de reemplazo génico como se indica a continuación: se digirió parcialmente pSE180 con *Xba*I y se purificó un fragmento de ~ 11,4 kb del gel. La banda de ~ 11,4 kb carece del gen de resistencia *ermE* de 1,7 kb. Después, el ADN se ligó y transformó a células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE184, se utilizó para transformar DM1 de *E. coli* y el ADN plasmídico se aisló a partir de los transformantes resistentes a ampicilina. Este plásmido se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Los protoplastos se prepararon a partir de los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11 y se cultivaron en placas como colonias individuales en RM14. Después de regenerar los protoplastos, se seleccionaron colonias individuales con respecto a la ausencia de resistencia a eritromicina y resistencia a tiostrepton, indicando integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y pérdida del replicón libre que contenía el gen

ermE. Se identificó un transformante Erm^R Thio^S y se denominó SE184-1-13. El análisis de fermentación de SE184-1-13 demostró que no se producían avermectinas normales y que SE184-1-13 tenía el mismo perfil de fermentación que SE180-11.

En un tercer procedimiento para inactivar el gen *aveC*, se introdujo un desplazamiento de fase en el gen *aveC* cromosómico añadiendo dos G después de la C en la posición de nucleótido 471 usando PCR, con lo que se creaba un sitio *Bsp*E1. La presencia del sitio *Bsp*E1, obtenido por ingeniería genética, era útil para detectar el acontecimiento del reemplazo génico. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir una mutación de desplazamiento de fase en el gen *aveC* y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. El cebador hacia la derecha fue: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEC ID NO: 8) y el cebador hacia la izquierda fue: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEC ID NO: 9). Las condiciones de PCR fueron como se describe en la Sección 7.1.10 anterior. El producto de PCR de 666 pb se digirió con *Sph*I para dar dos fragmentos de 278 pb y 388 pb, respectivamente. El fragmento de 388 pb se purificó del gel.

El plásmido de reemplazo génico se construyó como se indica a continuación: se digirió el vector lanzadera pWHM3 con *Eco*RI y *Bam*HI. pSE119 se digirió con *Bam*HI y *Sph*I, el

producto de digestión se sometió a electroforesis y se purificó un fragmento de ~ 840 pb del gel. pSE119 se digirió con *Eco*RI y *Xmn*I, el producto de digestión se resolvió por electroforesis y se purificó un fragmento de ~ 1,7 kb del gel. Los cuatro fragmentos (es decir, ~ 7,2 kb, ~ 840 pb, ~ 1,7 kb y 388 pb) se ligaron entre sí en una ligación de cuatro vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este plásmido, que se denominó pSE185, se utilizó para transformar DM1 de *E. coli* y se aisló el ADN plasmídico a partir de los transformantes resistentes a ampicilina. Este plásmido se usó para transformar protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis*. Los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. pSE185 no alteraba significativamente las relaciones de avermectinas B2:B1 cuando se utilizaba para transformar la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* (TABLA 2).

pSE185 se usó para transformar protoplastos de *S. avermitilis* para generar una mutación de desplazamiento de fase en el gen *aveC* cromosómico. Se prepararon protoplastos

a partir de transformantes resistentes a tiostrepton y se cultivaron en placas como colonias individuales en RM14. Después de regenerar los protoplastos, se seleccionaron las colonias individuales con respecto a la ausencia de resistencia a tiostrepton. Se aisló el ADN cromosómico a partir de las colonias sensibles a tiostrepton y se seleccionó por PCR con respecto a la presencia de mutación de desplazamiento de fase integrada en el cromosoma. Los cebadores de PCR se diseñaron basándose en la secuencia de nucleótidos de *aveC* y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEC ID NO: 10) y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEC ID NO: 11) y las condiciones de PCR fueron como se han descrito anteriormente en la Sección 7.1.10. El producto de PCR obtenido tenía 543 pb y, cuando se digirió con *Bsp*E1, se observaron tres fragmentos de 368 pb, 96 pb y 79 pb, indicando integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y pérdida del replicón libre.

El análisis de fermentación de los mutantes de *S. avermitilis* que contenían la mutación de desplazamiento de fase en el gen de *aveC* demostró que ya no se producían avermectinas normales, y que estos mutantes tenían el mismo perfil de fermentación de HPLC que las cepas SE180-11 y SE184-1-13. Se identificó un transformante Thio^s y se

denominó cepa SE185-5a.

Además, se produjo una mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 520 de G a A, lo cual ocasiona un cambio del codón que codifica un triptófano (W) en la posición 116 a un codón de terminación. Una cepa de *S. avermitilis* con esta mutación no producía avermectinas normales y tenía el mismo perfil de fermentación que las cepas SE180-11, SE184-1-13 y SE185-5a.

Además, se produjeron mutaciones en el gen *aveC* que cambian (i) el nucleótido en posición 970 de G a A, que cambia el aminoácido en posición 256 de una glicina (G) a un aspartato (D) y (ii) el nucleótido en posición 996 de T a C, que cambia el aminoácido en posición 275 de tirosina (Y) a histidina (H). Una cepa de *S. avermitilis* con estas mutaciones (G256D/Y275H) no producía avermectinas normales y tenía el mismo perfil de fermentación que las cepas SE180-11, SE184-1-13 y SE185-5a.

Las cepas mutantes de inactivación de *S. avermitilis* SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a y otras proporcionadas en este documento, proporcionan herramientas de selección para evaluar el impacto de otras mutaciones en el gen *aveC*. pSE186, que contiene una copia de tipo silvestre del gen *aveC*, se utilizó para transformar DM1 de *E. coli* y el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina. Este ADN de pSE186 se usó para transformar

protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y se analizaron los transformantes $Thio^r$ Erm^r por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* funcional en trans pudo restaurar la producción normal de avermectinas en la cepa SE180-11 (FIGURA 5B).

8.2 Análisis de Mutaciones en el Gen *aveC* que Alteran las Relaciones de Clases B2:B1

Como se ha descrito anteriormente, la cepa SE180-11 de *S. avermitilis* que contenía un gen *aveC* inactivo se complementó mediante transformación con un plásmido que contenía un gen *aveC* funcional (pSE186). La cepa SE180-11 también se utilizó como cepa huésped para caracterizar otras mutaciones en el gen *aveC* como se describe más adelante.

Se aisló ADN cromosómico de la cepa 1100-SC38 y se usó como molde para la amplificación por PCR del gen *aveC*. La ORF de 1,2 kb se aisló por amplificación por PCR usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos de *aveC*. El cebador hacia la derecha fue la SEC ID NO: 6 y el cebador hacia la izquierda fue la SEC ID NO: 7 (véase la Sección 7.1.10., anterior). Las condiciones de PCR y de subclonación fueron las descritas en la sección

7.1.10. El análisis de la secuencia de ADN de la ORF de 1,2 kb muestra una mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 337 de C a T, que cambia el aminoácido en la posición 55 de serina (S) a fenilalanina (F). El gen *aveC* que contiene la mutación S55F se subclonó en pWHM3 para producir un plásmido que se denominó pSE187 y que se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y se analizaron los transformantes $Thio^r$ Erm^r por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* que codificaba un cambio en el resto aminoácido 55 (S55F) pudo restaurar la producción normal de avermectinas en la cepa SE180-11 (FIG. 5C); sin embargo, la relación de ciclohexil B2:ciclohexil B1 fue de aproximadamente 26:1, en comparación con la cepa SE180-11 transformada con pSE186, que tenía una relación de B2:B1 de aproximadamente 1,6:1 (TABLA 3), lo que indica que la mutación sencilla (S55F) modula la cantidad de ciclohexil B2 producida con respecto a ciclohexil B1.

Se identificó otra mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 862 de G a A, que cambia el aminoácido en posición 230 de glicina (G) a aspartato (D). Una cepa de *S. avermitilis* que tiene esta mutación (G230D)

produce avermectinas en una relación B2:B1 de aproximadamente 30:1.

8.3 Mutaciones que Reducen la Relación B2:B1

Se construyeron varias mutaciones que reducían la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1, como se indica a continuación.

Se identificó una mutación en el gen *aveC* que cambia el nucleótido en posición 588 de G a A, que cambia el aminoácido en posición 139 de alanina (A) a treonina (T). El gen *aveC* que contenía la mutación A139T se subclonó en pWHM3 para producir un plásmido que se denominó pSE188 y que se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $Thio^r$ Erm^r se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado que codificaba un cambio en el resto aminoácido 139 (A139T) pudo restaurar la producción de avermectinas en la cepa SE180-11 (FIGURA 5D); sin embargo, la relación B2:B1 fue de aproximadamente 0,94:1, indicando que esta mutación reduce la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1. Este resultado era inesperado porque los resultados publicados, así como los resultados de las mutaciones descritas anteriormente, solo han demostrado

inactivación del gen *aveC* o un aumento de la producción de la forma B2 de la avermectina con respecto a la forma B1 (TABLA 3).

Como la mutación A139T alteraba las relaciones B2:B1 en la dirección B1 más favorable, se construyó una mutación que codificaba una treonina en lugar de una serina en el aminoácido en posición 138. Así pues, pSE186 se digirió con *Eco*RI y se clonó en pGEM3Zf (Promega) que se había digerido con *Eco*RI. Este plásmido, que se denominó pSE186a, se digirió con *Apa*I y *Kpn*I, los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa, y se purificaron del gel dos fragmentos de ~ 3,8 kb y ~ 0,4 kb. El ADN del inserto de ~ 1,2 kb procedente de pSE186 se usó como molde de PCR para introducir un cambio de una sola base en el nucleótido en posición 585. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir una mutación en el nucleótido en posición 585 y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCCTGGCGACG-3' (SEC ID NO: 12), y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEC ID NO:13). La reacción de PCR se realizó usando un equipo de PCR genómico Advantage GC (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) en tampón proporcionado por el fabricante en presencia de dNTP 200 µM, 200 pmol de cada cebador, 50 ng de ADN molde, GC-Melt

1,0 M y una unidad de Klen Taq Polymerase Mix en un volumen final de 50 µl. El perfil térmico del primer ciclo fue de 94°C durante 1 min.; seguido por 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 68°C durante 3 minutos. Se digirió un producto PCR de 295 pb con *ApaI* y *KpnI* para liberar un fragmento de 254 pb que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel. Los tres fragmentos (~3,8 kb, ~ 0,4 kb y 254 pb) se ligaron entre sí de una forma de tres vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5a de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE198.

pSE198 se digirió con *Eco*RI, se clonó en pWHM3 que se había digerido con *Eco*RI y se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto por análisis de restricción. Este plásmido, que se denomino pSE199, se usó para transformar protoplastos de la

cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $Thio^r$ Erm^r se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado que codificaba un cambio en el resto aminoácido 138 (S138T) pudo restaurar la producción normal de avermectinas de la cepa SE180-11; sin embargo, la relación B2:B1 era de 0,88:1, lo que indica que esta mutación reduce la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3). Esta relación de B2:B1 es incluso menor que la relación de 0,94:1 observada con la mutación A139T producida por la transformación de la cepa SE180-11 con pSE188, como se ha descrito anteriormente.

Se construyó otra mutación para introducir una treonina en las posiciones de aminoácidos 138 y 139. Se usó ADN del inserto de ~ 1,2 kb de pSE186 como molde de PCR. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir mutaciones en los nucleótidos en las posiciones 585 y 588 y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEC ID NO:14); y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GGAACATCACGGCATTCACC-3' (SEC ID NO: 15). La reacción de PCR se realizó usando las condiciones que se acaban de

describir en esta Sección. Un producto PCR de 449 pb se digirió con *Apa*I y *Kpn*I para liberar un fragmento de 254 pb que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel. pSE186a se digirió con *Apa*I y *Kpn*I, los fragmentos de ADN se separaron del gel de agarosa y se purificaron dos fragmentos de ~ 3,8 kb y ~ 0,4 kb del gel. Los tres fragmentos (~3,8 kb, ~0,4 kb y 254 pb) se ligaron entre sí en una ligación de tres vías y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células de DH5α *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción. El plásmido se denominó pSE230.

pSE230 se digirió con *Eco*RI, se clonó en pWHM3 que se había digerido con *Eco*RI y se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto correcto por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE231, se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los

transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $Thio^r$ Erm^r se analizaron por fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado doble que codificaba S138T/A139T pudo restaurar la producción normal de avermectinas en la cepa SE180-11; sin embargo, la relación B2:B1 era de 0,84:1, lo que demuestra que esta mutación reduce adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3), con respecto a las reducciones proporcionadas por la transformación de la cepa SE180-11 con pSE188 o pSE199, como se ha descrito anteriormente.

Se construyó otra mutación para reducir adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1. Como las mutaciones S138T/A139T alteraban las relaciones B2:B1 en la dirección más favorable a B1, se construyó una mutación para introducir una treonina en la posición de aminoácido 138 y una fenilalanina en la posición de aminoácido 139. El ADN del inserto de ~1,2 kb de pSE186 se usó como molde de PCR. Los cebadores de PCR se diseñaron para introducir mutaciones en las posiciones de nucleótido 585 (cambiando una T por A), 588 (cambiando una G por T) y 589 (cambiando una C por T), y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha fue: 5'-

GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3' (SEC ID NO: 25); y el cebador de PCR hacia la izquierda fue: 5'-GGAACATCACGGCATTCACC-3' (SEC ID NO: 15). La reacción de PCR se realizó usando un equipo de PCR genómico Advantage GC (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) en tampón proporcionado por el fabricante en presencia de dNTP 200 μM, 200 pmoles de cada cebador, 50 ng de ADN molde, acetato de Mg 1,1 mM, GC-Melt 1,0 M y 1 unidad de ADN Polimerasa Tth en un volumen final de 50 μl. El perfil térmico del primer ciclo fue de 94°C durante 1 minuto; seguido por 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 68°C durante 3 minutos. Un producto de PCR de 449 pb se digirió con *Apa*I y *Kpn*I para liberar un fragmento de 254 pb, que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel. Los tres fragmentos (~3,8 kb, ~0,4 kb y 254 pb) se ligaron entre sí en una forma de 3 vías. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. Se aisló ADN plasmídico a partir de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE238.

pSE238 se digirió con *Eco*RI, se clonó en pWHM3, que se había digerido con *Eco*RI, y se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli*. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del

inserto correcto se confirmó por análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE239, se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $Thio^r$ Erm^r se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* doble mutado que codificaba S138T/A139F pudo restaurar la producción normal de avermectina en la cepa SE180-11; sin embargo, la relación B2:B1 era de 0,75:1, demostrando que esta mutación reducía adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3) con respecto a las reducciones proporcionadas por la transformación de la cepa SE180-11 con pSE188, pSE199 o pSE231 como se ha descrito anteriormente.

TABLA 3

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de transformantes ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación media B2:B1
SE180-11 (ninguno)	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

Se construyeron otras mutaciones para reducir adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1 usando la técnica de redistribución de ADN como se describe en Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; y Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; y como se describe adicionalmente en las Patentes de Estados Unidos 5605793, 5811238, 5830721 y 5837458.

Se utilizaron plásmidos con ADN redistribuido que contenían genes *aveC* mutados para transformar células *E. coli dam dcm* competentes. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S.*

avermitilis. SE aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11 y se seleccionaron con respecto a la producción de avermectinas con una relación de ciclohexil-B2:ciclohexil-B1 de 1:1 o menor. Se determinó la secuencia de ADN del ADN plasmídico de los transformantes SE180-11 que producían avermectinas con una relación B2:B1 de 1:1 o menor.

Se identificaron ocho transformantes que producían cantidades reducidas de ciclohexil-B2 con respecto a ciclohexil-B1. La menor relación B2:B1 conseguida entre estos transformantes fue de 04:1 (TABLA 4). El ADN plasmídico se aisló de cada uno de los ocho transformantes y la secuencia de ADN se determinó para identificar las mutaciones en el gen *aveC*. Las mutaciones son las siguientes.

pSE290 contiene 4 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 317 de T a A, en la posición de nucleótido 353 de C a A, en la posición de nucleótido 438 de G a A y en la posición de nucleótido 1155 de T a A. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 317 cambia el aminoácido en la posición AA 48 de D a E y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 438 cambia el aminoácido en la posición AA 89 de A a T. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,42:1 (TABLA 4).

pSE291 contiene 4 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 272 de G a A, en la posición de nucleótido 585 de T a A, en la posición de nucleótido 588 de G a A, y en la posición de nucleótido 708 de G a A. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 585 cambia el aminoácido en la posición AA 138 de S a T, el cambio del nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T, y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 708 cambia el aminoácido en la posición AA 179 de G a S. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,57:1 (TABLA 4).

pSE292 contiene las mismas cuatro mutaciones de nucleótidos que pSE290. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,4:1 (TABLA 4).

pSE293 contiene 6 mutaciones de nucleótidos: en el nucleótido 24 de A a G, en la posición de nucleótido 286 de A a C, en la posición de nucleótido 497 de T a C, en la posición de nucleótido 554 de C a T, en la posición de nucleótido 580 de T a C y en la posición de nucleótido 886 de A a T. El cambio de nucleótidos en la posición de nucleótido 286 cambia el aminoácido en la posición AA 38 de Q a P, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 580 cambia el aminoácido en la posición AA 136 de L a P y

el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 886 cambia el aminoácido en la posición AA 238 de E a D. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,68:1 (TABLA 4).

pSE294 contiene 6 mutaciones de nucleótidos: en nucleótido 469 de T a C, en la posición de nucleótido 585 de T a A, en la posición de nucleótido 588 de G a A, en la posición de nucleótido 708 de G a A, en la posición de nucleótido 833 de C a T y en la posición de nucleótido 1184 de G a A. Además, los nucleótidos en la posiciones 173, 174 y 175 están delecionados. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 469 cambia el aminoácido en la posición AA 99 de F a S, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 585 cambia el aminoácido en la posición AA 138 de S a T, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 708 cambia el aminoácido de la posición AA 179 de G a S. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,53: (TABLA 4).

pSE295 contiene 2 mutaciones de nucleótidos: en el nucleótido 588 de G a A y en el nucleótido 856 de T a C. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T y el

cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 856 cambia el aminoácido en la posición AA 228 de M a T. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,80:1 (TABLA 4).

pSE296 contiene 5 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 155 de T a C, en la posición de nucleótido 505 de G a T, en la posición de nucleótido 1039 de C a T, en la posición de nucleótido 1202 de C a T y en la posición de nucleótido 1210 de T a C. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 505 cambia el aminoácido en la posición AA 111 de G a V y el cambio del nucleótido en la posición de nucleótido 1039 cambia el aminoácido en la posición AA 289 de P a L. La relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,73:1 (TABLA 4).

pSE297 contiene 4 mutaciones de nucleótidos: en la posición de nucleótido 377 de G a T, en la posición de nucleótido 588 de G a A, en la posición de nucleótido 633 de A a G y en la posición de nucleótido 1067 de A a T. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición AA 139 de A a T, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 633 cambia el aminoácido en la posición AA 154 de K a E y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 1067 cambia el aminoácido en la posición AA 298 de Q a H. La

relación de B2:B1 producidas por las células que llevaban este plásmido fue de 0,67:1 (TABLA 4).

TABLA 4

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de Transformantes Ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación Media de B2:B1
SE180-11(ninguno)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHMe)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0,42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0,57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0,40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0,68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0,53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0,80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0,73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0,67

9. EJEMPLO: CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE DELECIÓN 5'

Como se ha explicado en la Sección 5.1 anterior, la secuencia de nucleótidos de *S. avermitilis* mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID NO: 1) comprende cuatro codones GTG diferentes en las posiciones de pb 42, 174, 177 y 180, que son sitios de iniciación potenciales. Esta sección describe la construcción de múltiples deleciones de la región 5' de

la ORF de *aveC* (FIGURA 1; SEC. ID NO: 1) para ayudar a definir cuáles de estos codones podrían funcionar como sitios de iniciación en la ORF de *aveC* para la expresión proteica.

Se aislaron fragmentos del gen aveC delecionados de diversas formas en el extremo 5' y se aislaron del ADN cromosómico de *S. avermitilis* por amplificación por PCR. Los cebadores se PCR se diseñaron basándose en la secuencia de ADN de *aveC* y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. Los cebadores hacia la derecha fueron 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEC ID NO: 16) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEC ID NO: 17) (DIF2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEC ID NO: 18) (D1F3); y 5'-TGCAGGCGTACGTGTTCAGC-3' (SEC ID NO: 19) (D2F2). Los cebadores hacia la izquierda fueron 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEC ID NO: 20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEC ID NO: 21); Y 5'-AGGAGTGTGGTGCGTCTGGA-3' (SEC ID NO: 22). La reacción de PCR se realizó como se ha descrito anteriormente en la Sección 8.3.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se detectaron bandas de ADN individuales de ~ 1,0 kb o ~ 1,1 kb. Los productos de PCR se purificaron del gel y se ligaron a 25 ng del vector pCR2.1 linealizado (Invitrogen) en una relación de vector a inserto de 1:10 molar siguiendo las instrucciones del

fabricante. Las mezclas de ligación se usaron para transformar células *E. coli* competentes One Shot™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto se confirmó mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Estos plásmidos se denominaron pSE190 (obtenido con el cebador D1F1), pSE191 (obtenido con el cebador D1F2), pSE192 (obtenido con el cebador D1F3) y pSE193 (obtenido con el cebador D2F2).

Cada ADN del inserto se digirió con *Bam*HI/*Xba*I, se separó por electroforesis, se purificó del gel y se ligó por separado al vector lanzadera pWHM3, que se había digerido con *Bam*HI/*Xba*I, en una concentración total de ADN de 1 μg y en una relación de vector a inserto de 1:5 molar. Las mezclas de ligación se usaron para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto se confirmó mediante análisis de restricción. Estos plásmidos, que se denominaron pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3) y pSE197 (D2F2), se utilizaron por separado para transformar la cepa DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este ADN se usó para

transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y se analizaron los transformantes $Thio^r$ Erm^r por análisis de HPLC de los productos de fermentación para determinar los sitios GTG que eran necesarios para la expresión de *aveC*. Los resultados indican que el codón GTG en la posición 42 puede eliminarse sin afectar a la expresión de *aveC*, ya que pSE194, pSE195 y pSE196, careciendo del sitio GTG en la posición 42, pero conteniendo los tres sitios GTG en las posiciones 174, 177 y 180, podían restaurar la producción normal de avermectinas cuando se utilizaban para transformar SE180-11. La producción normal de avermectinas no se restauraba cuando la cepa SE180-11 se transformaba con pSE197, que carece de los cuatro sitios GTG (TABLA 5).

TABLA 5

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de Transformantes Ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación Media de B2:B1
SE180-11 (ninguno)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1,58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2,43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1,97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1,58
SE180-11 (pSE197)	12	0	0	0

10. EJEMPLO: CLONACIÓN DE HOMÓLOGOS *aveC* DE *S. HYGROSCOPICUS* Y *S. GRISEOCHROMOGENES*

La presente invención permite identificar y clonar genes homólogos de *aveC* de otras especies que producen avermectinas o milbemicina de *Streptomyces*. Por ejemplo, se hibridó una biblioteca de cósmidos de ADN genómico de *S. hygroscopicus* (FERM BP-1901) con la sonda de *aveC* de 1,2 kb de *S. avermitilis*, descrita anteriormente. Se identificaron varios clones de cósmidos que hibridaron fuertemente. Se aisló el ADN cromosómico de estos cósmidos y se identificó un fragmento *Kpn*I de 4,9 kb que hibridaba con la sonda de *aveC*. Este ADN se secuenció y se identificó una ORF (SEC ID NO: 3) que tenía una homología significativa con la ORF de

aveC de *S. avermitilis*. En la FIGURA 6 se presenta una secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 4) deducida de la ORF homóloga a *aveC* de *S. hygroscopicus*.

Además, se hibridó una biblioteca de cósmidos del ADN genómico de *S. griseochromogenes* con la sonda de *aveC* de 1,2 kb anterior de *S. avermitilis* descrita anteriormente. Se identificaron varios clones cosmídicos que hibridaban fuertemente. Se aisló el ADN cromosómico de estos cósmidos y se identificó un fragmento *Pst*I de 5,4 kb que hibridaba con la sonda de *aveC*. Este ADN se secuenció y se identificó una ORF parcial homóloga a *aveC* que tenía una homología significativa con la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*. En la FIGURA 6 se presenta una secuencia de aminoácidos parcial deducida (SEC ID NO: 5).

El análisis del ADN y de la secuencia de aminoácidos de los homólogos de *aveC* de *S. hygroscopicus* y de *S. griseochromogenes* indica que estas regiones comparten una homología significativa (identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos ~50%) tanto entre sí como con la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* y con el producto génico AveC (FIGURA 6).

11. EJEMPLO: CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO CON EL GEN *aveC* DETRÁS DEL PROMOTOR *ermE*

Se subclonó la ORF de *aveC* de 1,2 kb procedente de pSE186 en pSE34, que es el vector lanzadera pWHM3 que tiene

el promotor *ermE* de 300 pb insertado como un fragmento *Kpn*I/*Bam*HI en el sitio *Kpn*I/*Bam*HI de pWHM3 (véase Ward y col., 1986, Mol. Gen. Genet. 203:468-478). pSE186 se digirió con *Bam*HI e *Hind*III, el producto de digestión se resolvió por electroforesis y el fragmento de 1,2 kb se aisló del gel de agarosa y se ligó a pSE34, que se había digerido con *Bam*HI e *Hind*III. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto de 1,2 kb se confirmó mediante análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE189, se utilizó para transformar a DM1 de *E. coli* y el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina. Los protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* se transformaron con pSE189. Los transformantes resistentes a tiostrepton de la cepa 1100-SC38 se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación.

Los transformantes de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* que contenían pSE189 se habían alterado en las relaciones de ciclohexil-B2 avermectina: ciclohexil-B1 avermectina producida (aproximadamente 3:1) en comparación con la cepa 1100-SC38 (aproximadamente 34:1), y la producción total de avermectinas aumentó aproximadamente

2,4 veces en comparación con la cepa 1100-SC38 transformada con pSE119 (TABLA 6).

pSE189 también se utilizó para transformar protoplastos de una cepa de *S. avermitilis* de tipo silvestre. Los transformantes resistentes a tiostrepton se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Las avermectinas totales producidas por el tipo silvestre de *S. avermitilis* transformado con pSE189 aumentaron aproximadamente 2,2 veces en comparación con *S. avermitilis* de tipo silvestre transformado con pSE119 (TABLA 6).

TABLA 6

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de Transformantes Ensayados	[B2] Relativa	[B1] Relativa	Avermectinas totales Relativas	Relación Media de 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
tipo silvestre	6	59	42	113	1,41
tipo silvestre (pSE119)	6	248	151	481	1,64
tipo silvestre (pSE189)	5	545	345	1.071	1,58

12. EJEMPLO: PLÁSMIDO QUIMÉRICO QUE CONTIENE SECUENCIAS DE LA ORF DE *aveC S. AVERMITILIS* Y EL HOMÓLOGO DE *aveC* DE *S. HYGROSCOPICUS*

Se construyó un plásmido híbrido denominado pSE350 que contiene una porción de 564 pb del homólogo de *aveC* de *S. hygroscopicus* reemplazando a una porción homóloga de 564 pb de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* (FIGURA 7) como se indica a continuación. Se construyó pSE350 usando un sitio de restricción *Bsa*AI que se conserva en las dos secuencias (*aveC* posición 225) y un sitio de restricción *Kpn*I que está presente en el gen *aveC* de *S. avermitilis* (*aveC* posición 810). El sitio *Kpn*I se introdujo en el ADN de *S. hygroscopicus* por PCR usando el cebador hacia la derecha 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTCG-3' (SEC ID NO: 23) y el cebador hacia la izquierda 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEC ID NO: 24) (suministrado por Genosys Biotechnologies), usando las condiciones de PCR descritas en la Sección 7.1.10 anterior. El producto de PCR se digirió con *Bsa*AI y *Kpn*I, los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de *Bsa*AI/*Kpn*I de 564 pb se aisló del gel. pSE179 (descrito en la Sección 7.1.10 anterior) se digirió con *Kpn*I e *Hind*III, los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló un fragmento de ~ 4,5 kb del gel. pSE179 se digirió con *Hind*III y *Bsa*AI, los fragmentos se separaron

por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló del gel un fragmento de *Bsa*AI/*Hind*III de ~ 0,2 kb. El fragmento *Hind*III/*Kpn*I de ~ 4,5 kb, el fragmento *Bsa*AI/*Hind*III de ~0,2 kb y el fragmento *Bsa*AI/*Kpn*I de 564 pb de *S. hygroscopicus* se ligaron entre sí en una ligación de 3 vías y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción usando *Kpn*I y *Ava*I. Este plásmido se digirió con *Hind*III y *Xba*I para liberar el inserto de 1,2 kb, que después se unió con pWHM3 que se había digerido con *Hind*III y *Xba*I. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5α de *E. coli* competentes, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción usando *Hind*III y *Ava*I. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este plásmido se denominó pSE350 y se usó para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiostrepton de la

cepa SE180-11, se determinó la presencia de eritromicina y se analizaron los transformantes Thio^r Erm^r mediante análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los resultados muestran que los transformantes que contienen el plásmido híbrido de *S. avermitilis/S. hygroscopicus*, tienen una relación media B2:B1 de aproximadamente 109:1 (TABLA 7).

TABLA 7

Cepa de *S. avermitilis* (plásmido transformante)	No. de transformantes ensayados	Conc. Relativa de B2	Conc. Relativa de B1	Relación media B2:B1
SE180-11 (ninguno)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

DEPÓSITO DE MATERIALES BIOLÓGICOS

El siguiente material biológico se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) en 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, el 29 de Enero de 1998, y recibió los siguientes números de acceso:

Plásmido	No. de Acceso
plásmido pSE180	209605
plásmido pSE186	209604

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas anteriormente, se incorporan aquí por

referencia en su totalidad.

La presente invención no se limita en alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento, que deben considerarse simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y están dentro del alcance de la invención procedimientos y componentes funcionalmente equivalentes. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en este documento, serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Tales modificaciones pretenden incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual al alelo de *aveC* de *S. avermitilis*, la secuencia que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO:1), o una variante degenerada de la misma, pero que comprende además una o más mutaciones que codifican una sustitución de aminoácidos en uno o más restos de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289 o 298 de la SEC ID NO:2, de tal forma que las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en las que el alelo de *aveC* de tipo silvestre se ha inactivado y expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada, producen una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

2. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 1,

en la que las avermectinas de clases 2:1 son ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas.

3. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 2, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 diferente es una relación reducida en comparación con la relación de clases 2:1 producida por células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

4. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,8:1 o menor.

5. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,68:1 o menor.

6. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,53:1 o menor.

7. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,42:1 o menor.

8. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 3, en la que la relación de avermectinas de clases 2:1 es de aproximadamente 0,40:1 o menor.

9. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 1, en la que la secuencia de nucleótidos comprende además una o más mutaciones que codifican una sustitución de aminoácidos en uno o dos restos de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos 138 y 139 de la SEC ID NO:2.

10. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 2, en la que las sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una

sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido K en la posición 154 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(h) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(i) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(j) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

(k) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L;

(l) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H.

11. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 2, en la que se muta una combinación de restos de aminoácidos, y en la que la combinación se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(b) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(c) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(d) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(e) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(f) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(g) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

12. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 11, en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111/P289L; y

(g) A139T/K154E/Q298H.

13. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12,

en la que las mutaciones en la secuencia de aveC que codifica D48E/A89T comprende un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 317 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 438 de la SEC ID NO:1.

14. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 13, que comprende además un cambio de base de C a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 353 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 1155 de la SEC ID NO:1.

15. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica S138T/A139T/G179S comprenden un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

16. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 15,

que comprende además un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 272 de la SEC ID NO:1.

17. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica Q38P/L136P/E238D comprenden un cambio de base de A a C en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 286 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 580 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 886 de la SEC ID NO:1.

18. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 17, que comprende además un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 24 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 497 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 554 de la SEC ID NO:1.

19. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que

codifica F99S/S138T/A139T/G179S comprende una deleción de 3 pares de bases en las posiciones de nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 173, 174 y 175 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 469 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO: 1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

20. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 19, que comprende además un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 833 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 1184 de la SEC ID NO:1.

21. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica A139T/M228T comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de T a C en una

posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 856 de la SEC ID NO:1.

22. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica G111V/P289L comprende un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 505 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 1039 de la SEC ID NO:1.

23. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 22, que comprende además un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 155 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 1202 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 1210 de la SEC ID NO:1.

24. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 12, en la que las mutaciones en la secuencia de *aveC* que codifica A139T/K154E/Q298H comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de A a

G en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 633 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 1067 de la SEC ID NO:1.

25. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 24, que comprende además un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido correspondiente al nucleótido 377 de la SEC ID NO:1.

26. Un vector recombinante que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 1.

27. Una célula huésped que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 1 o el vector recombinante de la reivindicación 26.

28. La célula huésped de la reivindicación 27, que es una célula de *Streptomyces*.

29. Un procedimiento para obtener una nueva cepa de *S. avermitilis*, que comprende mutar el alelo de *aveC* en células de una cepa de *S. avermitilis*, mutación que da como resultado la sustitución en el producto génico aveC de un resto aminoácido diferente en una o más posiciones de

aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos 38, 48, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 238, 289 o 298 de la SEC ID NO:2; de tal forma que las células de la cepa de *S. avermitilis* en las que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma producen una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por células de la misma cepa de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que las avermectinas de clases 2:1 son ciclohexil B2: ciclohexil B1 avermectinas.

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que la relación diferente de avermectinas de clases 2:1 es una relación reducida.

32. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en la que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma es de aproximadamente 0,8:1 o menor.

33. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por

células de la cepa de *S. avermitilis* en la que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma es de aproximadamente 0,68:1 o menor.

34. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en la que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma es de aproximadamente 0,53:1 o menor.

35. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en la que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma es de aproximadamente 0,42:1 o menor.

36. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que la relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por células de la cepa de *S. avermitilis* en la que el alelo de *aveC* se ha mutado de esta forma es de aproximadamente 0,40:1 o menor.

37. El procedimiento de la reivindicación 31, que comprende además introducir una o más mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican una sustitución de aminoácidos

en uno o los dos restos de aminoácido correspondientes a las posiciones de aminoácidos 138 y 139 de la SEC ID NO: 2.

38. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que las sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido K en la posición 154

reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(h) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(i) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(j) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

(k) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L; y

(l) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H;

39. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que se muta el alelo de *aveC* para codificar sustituciones de aminoácidos en una combinación de posiciones de aminoácidos, y en el que la combinación se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(b) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(c) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(d) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(e) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(f) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(g) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

40. El procedimiento de la reivindicación 39, en el que la combinación de sustituciones de aminoácidos se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111/P289L; y

(g) A139T/K154E/Q298H.

41. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifica D48E/A89T comprende un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 317 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 438 de la SEC ID NO:1.

42. El procedimiento de la reivindicación 41, que comprende además introducir un cambio de base de C a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 353 de la SEC ID NO:1; y un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1155 de la SEC ID NO:1.

43. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican S138T/A139T/G179S comprenden un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO: 1.

44. El procedimiento de la reivindicación 43, que comprende además introducir un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 272 de la SEC ID NO:1.

45. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que

las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican Q38P/L136P/E238D comprenden un cambio de base de A a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 286 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 580 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 886 de la SEC ID NO:1.

46. El procedimiento de la reivindicación 45, que comprende además introducir un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* que corresponde al nucleótido 24 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 497 de la SEC ID NO: 1, y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al 554 de la SEC ID NO:1.

47. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican F99S/S138T/A139T/G179S comprenden una deleción de 3 pares de bases en las posiciones de nucleótidos en el alelo de *aveC* correspondientes a los nucleótidos 173, 174 y 175 de

la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 469 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

48. El procedimiento de la reivindicación 47, que comprende además introducir un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 833 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido del alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1184 de la SEC ID NO:1.

49. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/M228T comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido del alelo de *aveC*

correspondiente al nucleótido 856 de la SEC ID NO:1.

50. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican G111V/P289L comprenden un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 505 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1039 de la SEC ID NO:1.

51. El procedimiento de la reivindicación 50, que además comprende introducir un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 155 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1202 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* que corresponde al nucleótido 1210 de la SEC ID NO:1.

52. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/K154E/Q298H comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO: 1, un

cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 633 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1067 de la SEC ID NO:1.

53. El procedimiento de la reivindicación 52, que además comprende introducir un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 377 de la SEC ID NO:1.

54. Una célula de *Streptomyces avermitilis* que tiene un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto génico AveC que tiene una sustitución en una o más posiciones de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289 o 298 de la SEC ID NO:2, donde la célula produce una relación de avermectinas de clases 2:1 que es diferente de la relación producida por una célula de la misma cepa de *S. avermitilis* pero que en su lugar expresa sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

55. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 54, en la que las avermectinas de clases 2:1 son ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas.

56. La células de *S. avermitilis* de la reivindicación 55, en la que la diferente relación de avermectinas de clases 2:1 es una relación reducida.

57. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 56, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,8:1 o menor.

58. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 56, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,68:1 o menor.

59. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 56, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,53:1 o menor.

60. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 56, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,42:1 o menor.

61. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 56, que produce una relación de avermectinas de clases 2:1 de aproximadamente 0,40:1 o menor.

62. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 55,

en la que el alelo de *aveC* codifica además una sustitución de aminoácidos en uno o los dos restos de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 138 y 139 de la SEC ID NO:2.

63. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 55, en la que las sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre una o más del grupo compuesto por:

(a) el resto de aminoácido Q en la posición 38 reemplazado por P o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para P;

(b) el resto de aminoácido D en la posición 48 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(c) el resto de aminoácido A en la posición 89 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(d) el resto de aminoácido F en la posición 99 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(e) el resto de aminoácido G en la posición 111 reemplazado por V o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para V;

(f) el resto de aminoácido L en la posición 136 reemplazado por P o por un aminoácido que es una

sustitución conservativa para P;

(g) el resto de aminoácido K en la posición 154 reemplazado por E o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para E;

(h) el resto de aminoácido G en la posición 179 reemplazado por S o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para S;

(i) el resto de aminoácido M en la posición 228 reemplazado por T o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para T;

(j) el resto de aminoácido E en la posición 238 reemplazado por D o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para D;

(k) el resto de aminoácido P en la posición 289 reemplazado por L o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para L; y

(l) el resto de aminoácido Q en la posición 298 reemplazado por H o por un aminoácido que es una sustitución conservativa para H.

64. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 55, en la que el alelo de *aveC* se muta para codificar sustituciones de aminoácidos en una combinación de posiciones de aminoácidos, y en la que la combinación se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) los restos de aminoácidos D48 y A89;

(b) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179;

(c) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238;

(d) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y G179;

(e) los restos de aminoácidos A139 y M228;

(f) los restos de aminoácidos G111 y P289; y

(g) los restos de aminoácidos A139, K154 y Q298.

65. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 64, en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos se selecciona entre una o más del grupo compuesto por:

(a) D48E/A89T;

(b) S138T/A139T/G179S;

(c) Q38P/L136P/E238D;

(d) F99S/S138T/A139T/G179S;

(e) A139T/M228T;

(f) G111/P289L; y

(g) A139T/K154E/Q298H.

66. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican D84E/A89T comprenden un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 317 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 438 de la SEC ID NO:1.

67. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 66, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican D48E/A89T comprenden además un cambio de base de C a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 353 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1155 de la SEC ID NO:1.

68. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican S138T/A139T/G179S comprenden un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

69. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 68, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican S138T/A139T/G179S comprenden además un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC*

correspondiente al nucleótido 272 de la SEC ID NO:1.

70. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican Q38P/L136P/E238D comprenden un cambio de base de A a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 286 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 580 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 886 de la SEC ID NO:1.

71. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 70, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican Q38P/L136P/E238D comprenden además un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 24 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 497 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al 554 de la SEC ID NO:1.

72. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican F99S/S138T/A139T/G179S comprenden una deleción de 3 pares de bases en posiciones de nucleótidos en el alelo de *aveC* que corresponden a los nucleótidos 173, 174 y 175 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 469 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de T a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 585 de la SEC ID NO: 1, un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 708 de la SEC ID NO:1.

73. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 72, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican F99S/S138T/A139T/G179S comprenden además un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 833 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1184 de la SEC ID NO:1.

74. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifica A139T/M228T comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 856 de la SEC ID NO:1.

75. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican G111V/P289L comprenden un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 505 de la SEC ID NO:1, y un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1039 de la SEC ID NO:1.

76. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 75, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican G111V/P289L comprenden además un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 155 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de C a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1202 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de T a C en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al

nucleótido 1210 de la SEC ID NO:1.

77. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 65, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/K154E/Q298H comprenden un cambio de base de G a A en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 588 de la SEC ID NO:1, un cambio de base de A a G en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 633 de la SEC ID NO:1 y un cambio de base de A a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 1067 de la SEC ID NO: 1

78. La célula de *S. avermitilis* de la reivindicación 77, en la que las mutaciones en el alelo de *aveC* que codifican A139T/K154E/Q298H comprenden además un cambio de base de G a T en una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* correspondiente al nucleótido 377 de la SEC ID NO:1.

79. Un procedimiento para producir avermectinas que comprende cultivar las células de la reivindicación 55 en medios de cultivo, en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas en los mismos, y recuperar dichas avermectinas del cultivo.

80. Una composición de ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas producida por células de *Streptomyces avermitilis*, que comprende las ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,68:1 o menor en un medio de cultivo en el que se han cultivado las células.

81. Una composición de ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas producida por células de una cepa de *Streptomyces avermitilis* que expresa un alelo de *aveC* mutado que codifica un producto génico que da como resultado la reducción de la relación de clases 2:1 de ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas producidas por las células en comparación con las células de la misma cepa de *S. avermitilis* que no expresan el alelo de *aveC* mutado sino que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, comprendiendo la composición las ciclohexil B2:ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,68:1 o menor en el medio de cultivo en el que se han cultivado las células.

GEN DE *STREPTOMYCES AVERMITILIS* QUE DIRIGE LA RELACIÓN DE AVERMECTINAS B2:B1

RESUMEN

La presente invención se refiere a moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico AveC, moléculas polinucleotídicas que pueden usarse para alterar la relación o cantidad de avermectinas de clases 2:1 producidas en cultivos de fermentación de *S. avermitilis*. La presente invención se refiere además a vectores, células huésped y cepas mutantes de *S. avermitilis* en las que el gen *aveC* se ha inactivado o mutado para cambiar la relación o cantidad de avermectinas de clases 2:1 producidas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PFIZER PRODUCTS INC.

<120> GEN DE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE LA RELACIÓN DE AVERMECTINAS B2:B1

<130> PC10650A

<140> PC10650A

<141> 1999-08-12

<150> 60, 148, 645

<151> 1999-08-12

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1229

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1085)

<400> 1

```
tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaaccca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcacccg 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgctgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg    176
                                                          Val
                                                           1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

ctttgtgcat gggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

acactcctcg gttcagcgat catg                                       1229
```

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 1150

<212> ADN

<213> Streptomyces hygroscopicus

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(990)

<400> 3

```
gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggccgata ccgtacgcgg cctgcgg      57

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

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

tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag    201
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
         35                  40                  45

cgg atc gcc gat gtg ctg atc ccg ctg ctg tcc gtg gtg gga gcg gtg    249
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc   777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225                 230                 235                 240

aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg   825
```

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

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

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

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

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

gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcct 1080

catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga 1140

gcggccgggg                                                        1150
```

<210> 4

<211> 310

<212> PRT

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 4

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

Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser
    130                 135                 140
Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met
145                 150                 155                 160
Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
                165                 170                 175
Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
            180                 185                 190
Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu
        195                 200                 205
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
    210                 215                 220
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225                 230                 235                 240
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
                245                 250                 255
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala
            260                 265                 270
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu
        275                 280                 285
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
    290                 295                 300
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
305                 310
```

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> Streptomyces griseochromogenes

<400> 5

Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val
1 5 10 15

Tyr Val Phe Ala Arg Trp Thr Ala Asp Gly Gly Tyr His Leu Ala Asp
20 25 30

Val Ser Gly Pro Asp Gly Arg Glu Pro Gly His Arg Arg Ile Ile Asp
35 40 45

Val Leu Leu Pro Ala Leu Ser Met Ala Gly Val Val Gly Leu Ala Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 6

tcacgaaacc ggacacac 18

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 7

catgatcgct gaaccgag 18

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 8

ggttccggat gccgttctcg 20

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 9

aactccggtc gactcccctt c 21

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 10

gcaaggatac ggggactac 19

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 11

gaaccgaccg cctgatac 18

<210> 12

<211> 43

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 12

ggggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gcccctggcg acg 43

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13

ggaaccgacc gcctgataca 20

<210> 14

<211> 46

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 14

ggggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc 46

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 15

ggaacatcac ggcattcacc 20

<210> 16

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 16

aacccatccg agccgctc 18

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 17

tcggcctgcc aacgaac 17

<210> 18

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 18

ccaacgaacg tgtagtag 18

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 19

tgcaggcgta cgtgttcagc 20

<210> 20

<211> 17

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 20

catgatcgct gaaccga 17

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 21

catgatcgct gaaccgagga 20

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 22

aggagtgtgg tgcgtctgga 20

<210> 23

<211> 19

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 23

cttcaggtgt acgtgttcg 19

<210> 24

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 24

gaactggtac cagtgccc 18

<210> 25

<211> 46

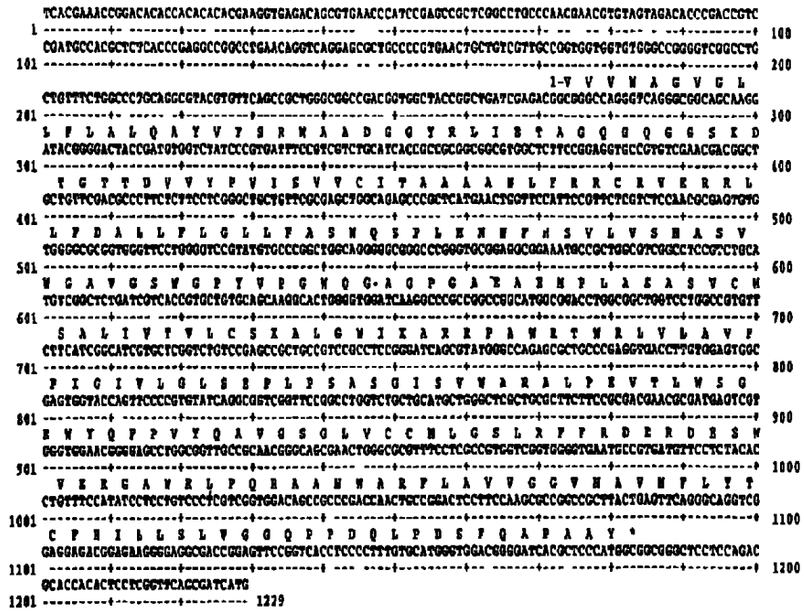
<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 25

ggggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc 46

FIG.1



504

503

FIG. 2

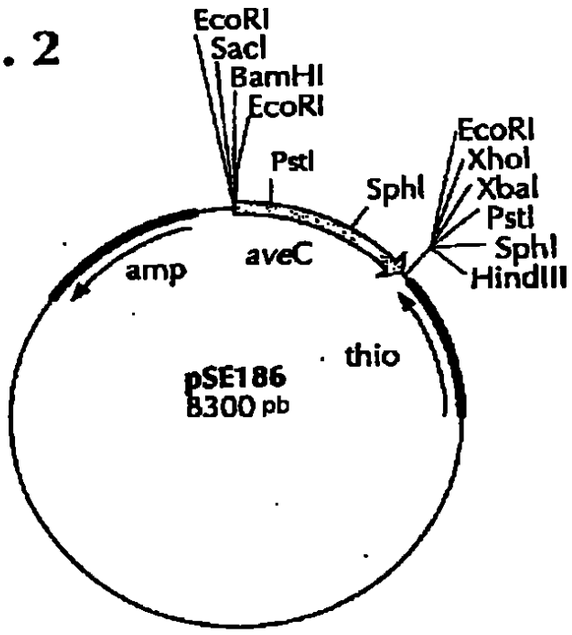
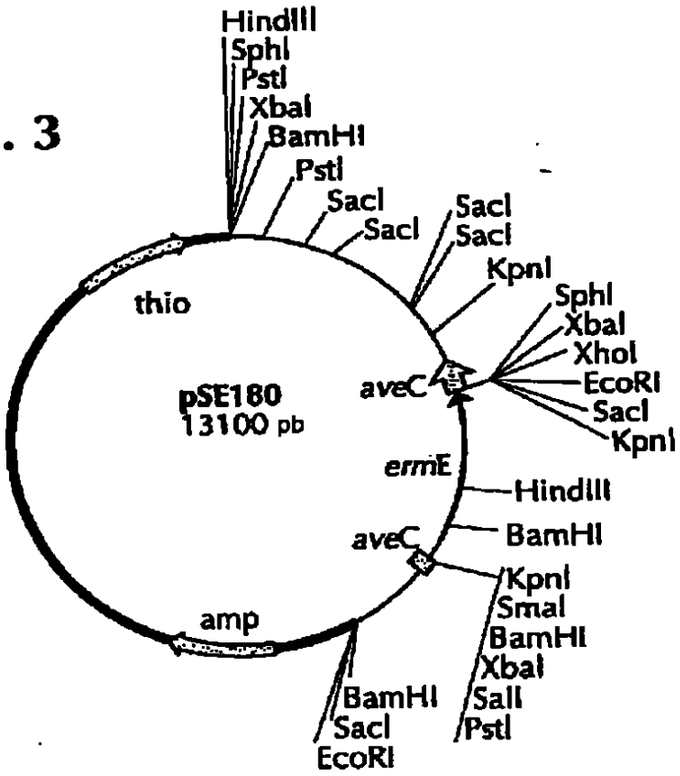


FIG. 3



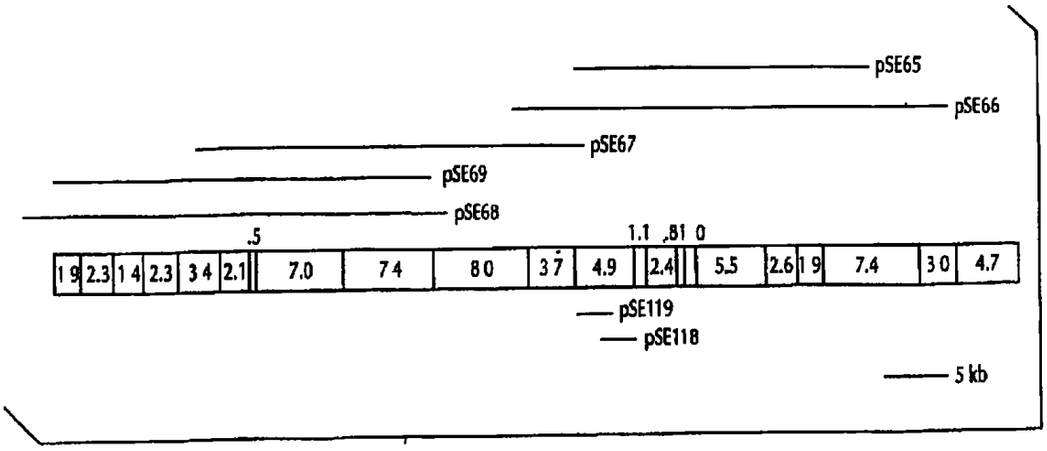

pSE65
pSE66
pSE67
pSE69
pSE68
.5
1.1
.81
0
1.9
2.3
1.4
2.3
3.4
2.1
7.0
7.4
8.0
3.7
4.9
2.4
5.5
2.6
1.9
7.4
3.0
4.7
pSE119
pSE118
5 kb

FIG. 4

505

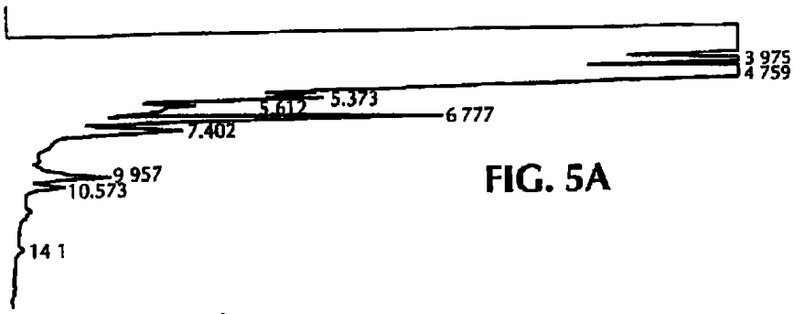


FIG. 5A

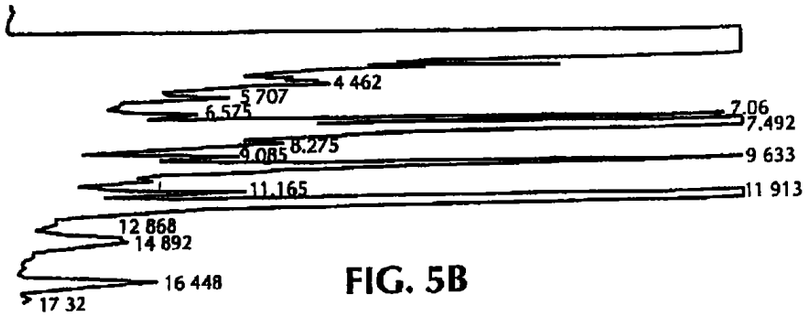


FIG. 5B

4/7

507

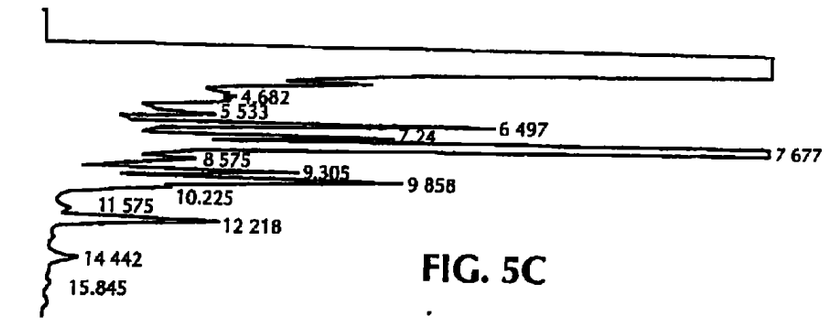

4.682
5 533
6 497
7 24
7 677
8 575
9.305
9 858
10.225
11 575
12 218
14 442
15.845

FIG. 5C

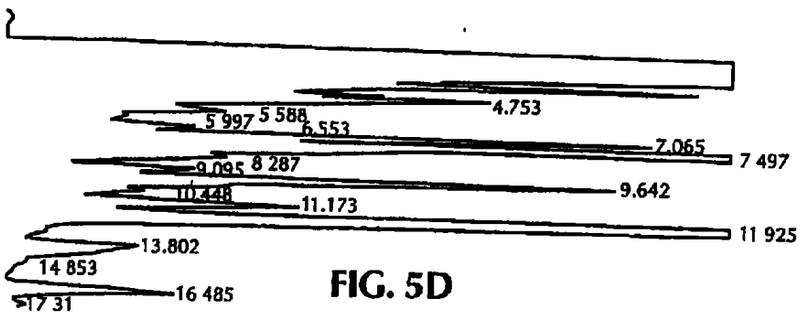
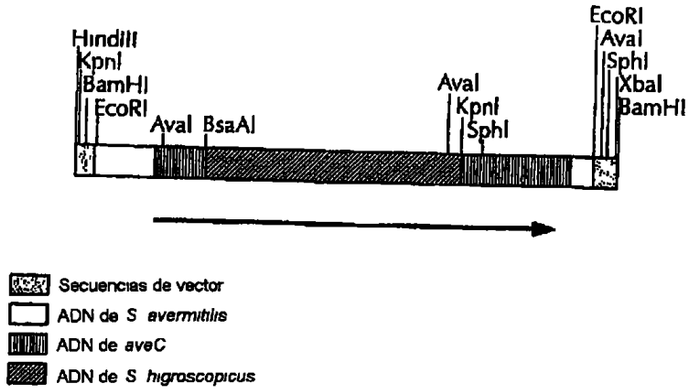

4.753
5 997
5 588
6.553
7.065
7 497
9.095
8 287
9.642
10.448
11.173
11 925
13.802
14 853
16 485
17 31

FIG. 5D

FIG. 6

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

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

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

          101                                                         150
 S. ave   SVLVSNASVW GAVGSWGPYV PGWQGAGPGA EAERPLASAS VCMSALIVTV
 S. gri   PVLMANTHVW GAVGSWGPYV PGWRGLPPGK EAELPLVTPS LGSTVLLGVL
 S. hyg   PVLASNVNVF GAVASWGPYV PGWQGAGAHQ EAELPLATLS ICMTAMMAAV
Cons      pVL-sN--Vw GAVgSWGPYV PGWqGagpg- EAElPLat-S -cmtal---v

          151                                                         200
 S. ave   LCSKALGWIK ARRPAWRTWR LVLAVFFIGI VLGLSEPLPS ASGISVWARA
 S. gri   GCCQVMSRVR ERWPGVRPWQ LVGLAFLTAV AFDLSEPFIS FAGVSVWARA
 S. hyg   ACGKGDKGLAA ARWPRLGPLR LIALGFLLVV LLDIAEPLVS FAGVSVWTRA
Cons      -C-k-sg--- aRwP--rpwr Lv-l-Fl--v -ldlsEPl-S faGvSVWaRA

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

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

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



Secuencias de vector
ADN de *S avermitilis*
ADN de *aveC*
ADN de *S higroscopicus*

FIG. 7

Se anexo folio 513
extracto de publicacion
2020-50
Enero 21 2003

D14
509

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCIÓN [X] **MODELO DE UTILIDAD** [ ]

- Nombre e identificación del Solicitante 1 [ ]
- Nombre e identificación del Inventor 1 [ ]
- Título o nombre de la Invención 1 [ ]
- Descripción 36 [ ]
- Reivindicaciones 457 [ ]
- Resumen 513 [ ]
- Comprobante de Pago [ ]

COMPLETA [X] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Nombre e identificación del peticionario [ ]
- Nombre e identificación del inventor o diseñador [ ]
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse [ ]
- Representación gráfica [ ]
- Comprobante de pago [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fech

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : [illegible] Folios: 513
Fecha (AMD): 2020-08-04 11:22:33
Tramite : 822 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-58605
Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [ ] **NO [x*]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI [x] **NO [ ]** **EXTEMPORANEAMENTE [ ]** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI [X] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [X] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de Paris; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [ ] **NO [X]** **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES: * Con el fin de reconocer personería al abogado que presenta la solicitud, es necesario que se allegue la sustitución del poder, otorgada por quien aparece como apoderado principal. Lo anterior de conformidad con el artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [ ] **NO [X]** Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [ ] **NO [X]** Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 8 de Agosto del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.
202022

511

Folio No. 516

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.
PRIMER EXAMEN DE FORMA.

Radicación No. 00-58605
Concepto Técnico No. 1738
Clasificación Internacional de Patentes: C12N 15/31.

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

SI [X] NO [ ]	Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a).
SI [X] NO [ ]	Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a)
SI [X] NO [ ]	Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e)
SI [X] NO [ ]	Contiene el titulo o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b)
SI [X] NO [ ]	Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c)
SI [X] NO [ ]	Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94).
SI [X] NO [ ]	Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3464 del 26 de diciembre de 1980)
SI [X] NO [ ]	Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d).
SI [X] NO [ ]	Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94.
SI [X] NO [ ]	Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94.
SI [X] NO [ ]	Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en f0rma correcta (Artc 14-c junto con el literal b) del 1rt. 4 del Dto. 117 del 94).
SI [X] NO [ ]	Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
SI [X] NO [ ]	**CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA.**

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:

EXAMINADOR TÉCNICO: 202016.

Bogotá, D.C., 03 de noviembre de 2000

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-58605

AUTO 2695

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiendo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 16 NOV. 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 20 NOV 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO 04-01-01

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI____ NO____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia