

00 58850

Radicacion
Fecha (Año)
Tramite

00058850 00000000
2328-06-34 17 07 49
022 PATENTES D

REGISTRO/ 411 PRESENTAC

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razon Social

PFIZER PRODUCTS INC

No de Identificacion

Representante Legal (Persona Juridica)

Pais de Domicilio

Departamento o Estado

Direccion

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

ESTADO DE CONNECTICUT

EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340

Ciudad

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

CARLOS R. OLARTE

Direccion

CALLE 35 No 7-25 Piso 4

Ciudad

SANTAFE DE BOGOTA

Telefono

285 14 00/570-0010

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

KIM JONELLE STUTZMAN-ENGWALL

Identificacion

Dirección

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Titulo 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) Pais

US

(32) Fecha

Agosto 12 1999

(31) No Solicitud

09/372,934

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

C 12 N 15/31

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representacion Legal cuando el solicitante sea Persona Juridica	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolizacion 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 radicacion de la solicitud posterior	
Traducción simple	☒
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios segun formato	☒
Tarjeta archivo temático segun formato	☒
Extracto para publicacion segun 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 Bogota

T P No 74 295

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion

00050050 00000000

Fecha (AMD)

2000-08-04 17 07 49

Tramite

002 PATENTES D

Folios

471

1 REGISTRO/

411 PRESENTAC

NIT 800173089-

RECIBO OFICIAL DE CAJA35,490

FECHAJUNIO 7 DE 2000

*** CONSIGNACION ***

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

*** CONCEPTO ***

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

CON SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE _____

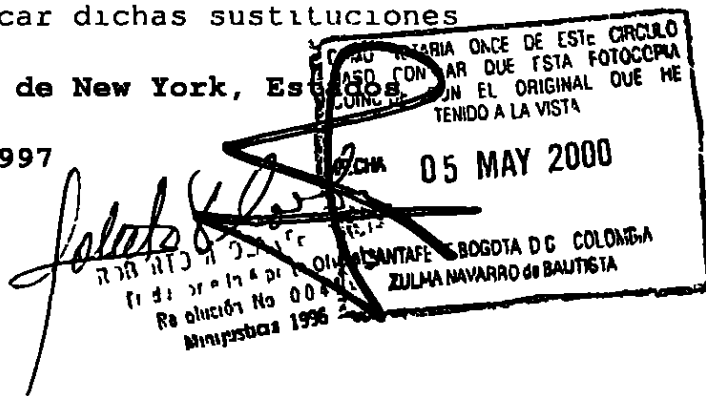
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____



Carrera 13 No 27 00 Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax 281 31 25
Santa Fe de Bogota D C Colombia

PODER

A los 8 dias del mes de Octubre de 1997



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 dias del mes de octubre de
1997

Firmado John (ilegible)

JOHN ALPHONSO

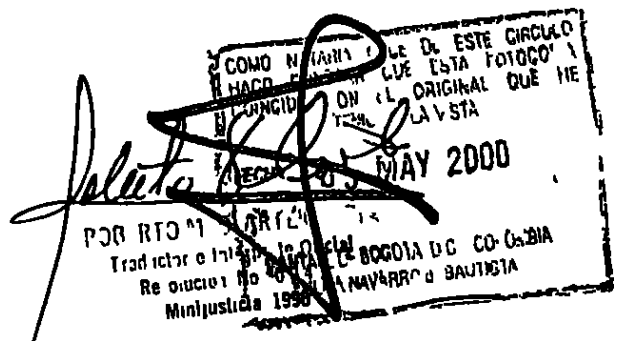
Notario Publico, Estado de Nueva York

No 30-4859888

Calificado en el Condado de Nassau

Certificado Registrado en el Condado de Nueva York

Comision expira el 19 de mayo de 1998



Raisbeck, Lara, Rodriguez
Miembros de la Firma
BAKER & MCKENZIE
Abogados
Apartado Aereo 3746
Telefono 285-1400
Santa fe de Bogota, D C
Colombia

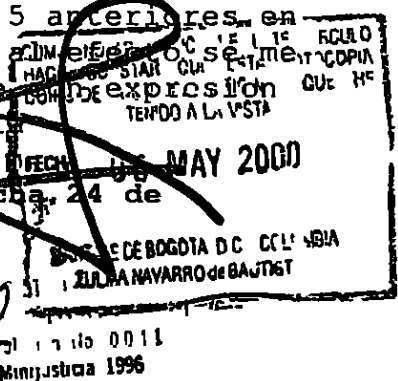
CERTIFICADO NOTARIAL

A los 8 dias 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 America**, suscribió de su puño y letra el siguiente documento que antecede
- 2 Que conozco al otorgante y que este tiene capacidad legal para el otorgamiento
- 3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de **Vicepresidente** 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** esta legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se ha otorgado el poder esta comprendido entre los que constituyen su objeto social
- 5 Que el otorgante efectivamente tiene la representacion que ostenta y que esta es legitima
- 6 Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos autenticos que exhibieron y que menciono especificamente de sus fechas y de su origen o procedencia

Resolucion de Pfizer Products Inc de fecha 24 de febrero de 1997



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

Estado de Nueva York)

)b j

Condado de Nueva York)

No 21320

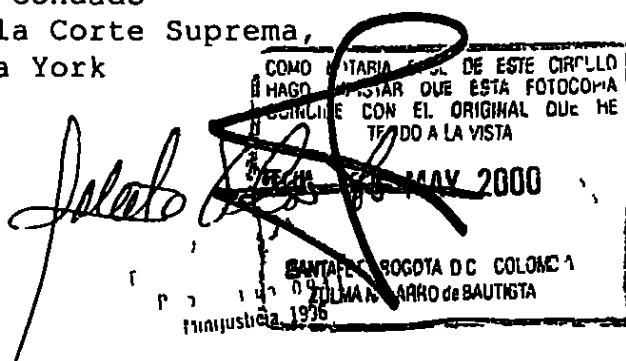
Yo, **NORMAN GOODMAN**, Funcionario del Condado y Funcionario de la Corte Suprema del Estado de Nueva York, en y para el Condado de Nueva York, una Corte de Registro, poseedor, por ley, un sello, CERTIFICO POR EL PRESENTE que

JOHN ALPHONSO

A traves de quien se ejecuto el anterior reconocimiento de prueba, y cuyo nombre esta 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



Legalizacion 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 Mejia Mejia
Cónsul de Colombia

Legalizacion No **065918** del Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia de la firma de Federico Mejia como Consul de Colombia en Nueva York, Estados Unidos de America Santa fe de Bogota, agosto 13 de 1998
Firma ilegible
Jefe de Legalizaciones

Traduccion Oficial, de un texto del idioma ingles
Traduccion Oficial realizada por **ROBERTO M OLARTE GARCIA**, Traductor e interprete oficial juramentado segun Resolucion 0041 del Ministerio de Justicia 1996 Santa fe de Bogota, agosto 13, 1998

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
98 AUG 18 AM 9 53
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

[Handwritten signature]
ROBERTO M OLARTE GARCIA
Traductor e interprete oficial juramentado
Resolución No 0041
Ministerio de Justicia 1996

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
17381322-11
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES DE LA JEFATURA

COMO NOTARIA ANTE LA EJECUCION
HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA
CORRESPONDE AL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA
FECDA 05 MAY 2000
SANTAFE DE BOGOTA D.C. COLOMBIA
ZULMA NAYARA de BAUTISTA



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

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

9

EL SUSCRITO CONSUL DE COLOMBIA

VISTOS LOS DOCUMENTOS PRESENTADOS POR LOS INTERESADOS

CERTIFICA

Que el (la) Sr (a) NORMAN GOODMAN, Clerk del Condado de New York Estados Unidos de America, certifica que JOHN ALPHONSO es Notario Publico del Estado de New York y que ejercia 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 autentico 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

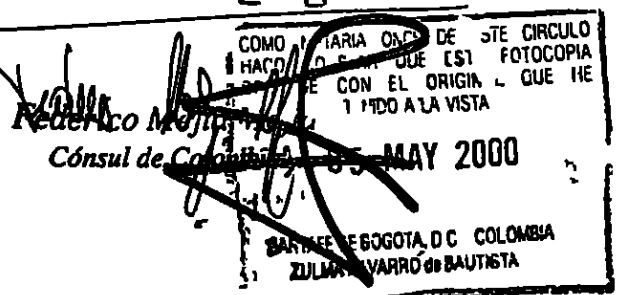
Que ha tenido a la vista los documentos probatorios de los hechos citados y constatados por el Notario Publico y el County Clerk de New York los cuales forman parte integral del presente documento

Se expide esta certificacion en concordancia con el articulo 259 delCodigo de Procedimiento Civil y 480 delCodigo de Comercio a solicitud del interesado a los 31 dias del mes de Julio de 1998

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DE LOS DOCUMENTOS ADJUNTOS

PAGADO AL PULSIO DE T BREV DE LOS CONSULADOS

VALOR CIENTO Y SEIS DOLARES US\$66.00 RECIBO No 14881



065918
816590

06590

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMLI
LAS FUNCIONES INDICADAS.

**NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO**

98 AUG 13 9 15 AM '68

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA C

DEPT. OF THE ARMY
OFFICE OF THE CHIEF OF STAFF
WASHINGTON, D. C.

State of New York
County of New York, } ss

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

John Alphonso

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, sworn and 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

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

OCT 1 1991

FEE PAID \$3.00

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

COMO NOTAR... STE CIRCULO
HAGO CONST... EST FOTOCOPIA
COINCIDE... OP GIN GU...
100 - LA VISTA
FECHA 05 MAY 2003
SANTA DE BOGOTA D.C. COLOMBIA
ZULMA NUNEZ RO DE BAUTISTA

RAISBECK LARA RODRIGUEZ & RUEDA

Members of the Firm

BAKER & MCKENZIE

ATTORNEYS AT LAW

APARTADO AEREO 3746

TELEFONO 286 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, Groton 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

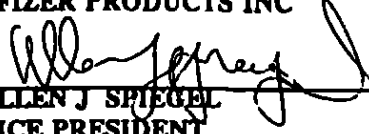
Trademark registrations, renewals, mergers, changes of name, assignments, filing and prosecution of oppositions, deposit of commercial names, changes of address
Letters Patent, mergers, changes of name, assignments, filing and prosecution of oppositions, changes of address,

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 otorgar a
**ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o
JAMES W F RAISBECK y/o
LUZ HELENA VILLAMIL y/o
CARLOS R OLARTE**

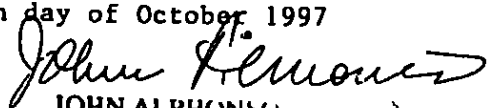
poder especial amplio y bastante para recabar de las oficinas y autoridades nacionales que correspondan, la obtención de Registro de marcas renovaciones, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, depositos de nombres comerciales, cambios de dirección, a cuyo efecto 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 para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar 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

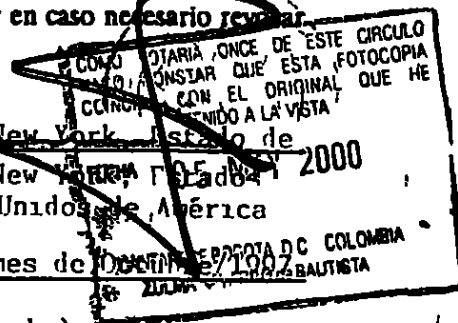
Dado y firmado en New York, Estado de
New York, Ciudad de
Unidos de América

a los 8 días del mes de OCTUBRE de 1997

State of New York)
County of New York)

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

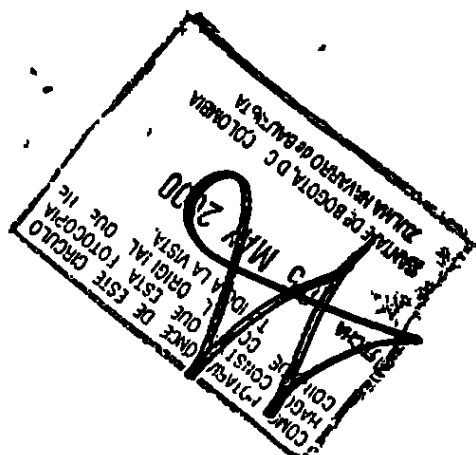

JOHN ALPHONSO
Notary Public State of New York
No 30 4859888
Qualified in Nassau County
Certificate filed in New York County
Commission Expires March 19 1998





* 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 3748

TELEFONO 285 1400

SANTAFE DE BOGOTA D C

COLOMBIA

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 8th day of October

1997 the undersigned Notary

CERTIFIES

1 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 document
as

VICE PRESIDENT

of the juridical person

Pfizer Products Inc

4 That the juridical person
Pfizer Products Inc

having its home office in Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340, United States of America,

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

5 That the grantor has 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

JOHN ALPHONSO
Notary Public, State of New York
Notary No. 584859888
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
suscrito 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
carácter de

Vice-presidente

de la persona jurídica

PFIZER PRODUCTS INC

4 Que la persona jurídica

PFIZER PRODUCTS INC

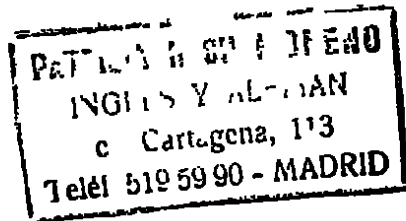
con sede en
Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340, Estados Unidos de América
está legalmente constituida que tiene existencia legal actual y que el
acto para el cual se ha otorgado el poder está comprendido entre los
que constituyen su objeto social

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

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 específicamente 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 Publico



13

A QUIENES LES SEAN PRESENTADOS ESTOS DOCUMENTOS
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
La Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

11 abril 2000

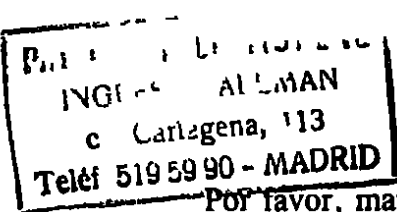
POR LA PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA MAS ADELANTE, A LA QUE LE FUE OTORGADA FECHA DE PRESENTACION AL CUMPLIR LOS REQUISITOS ESTABLECIDOS EN EL ARTICULO 111 TITULO 35 DEL CODIGO DE LOS ESTADOS UNIDOS, Y QUE OBRA EN EL REGISTRO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

NUMERO DE SOLICITUD 09/372,934

FECHA DE PRESENTACION 12 agosto 1999 /

Por delegación del
COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS

T LAWRENCE
Oficial de certificaciones



Por favor, marque cruz (+) dentro de esta casilla __

PTO/SB/05 (2/98)

Aprobado su uso por OMB 0651-0032 30 septiembre 2000

Oficina de Patentes y Marcas Departamento de comercio de los Estados Unidos

TRANSMISIÓN DE SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD

Nº de registro del abogado PC10649

Inventor nombrado en primer lugar o identificador de la solicitud

Kim J Stutzman-Engwall

Título

Uso de Streptomyces Avermitilis que dirige la relación de Avermectinas B2 B1

Enqueta de correo urgente nº EL162814127US

ELEMENTOS DE LA SOLICITUD

Vease el capítulo 600 del MPEP relativo al contenido de las solicitudes de patente de utilidad

Dirigido al Vicecomisario de Patentes, Apartado de Correos Solicitudes de Patentes
Washington DC 20231

1 X Impreso Tasa de Presentación (p ej PTO/SB/17)

(Enviar original y copia para procesamiento de la tasa)

2 X Memoria [Total páginas] 74

(Disposicion preferida a continuación)

- título descriptivo de la invención
- referencias cruzadas a solicitudes relacionadas
- declaracion referente a tasas subvencionadas I+D
- referencia en apéndice de microficha
- antecedentes de la invención
- breve resumen de la invención
- breve descripcion de los dibujos (si hubiera)
- descripción detallada
- reivindicaciones
- resumen de la invención

3 X Dibujos (35 USC 11 3) [Total páginas] 7

4 __ Declaración jurada [Total páginas] 7

a __ Otorgada nuevamente (copia u original)

b __ Copia de una solicitud anterior (37 CFR 1 63 (d))
(para continuación/divisional con casilla 17 completa)
[ver casilla nota 5 a continuacion]

1 __ SUPRESIÓN DE INVENTOR/ES

Declaracion firmada adjunta suprimiendo al inventor o inventores mencionados en la solicitud previa, véase 37 CFR 1 63(d)(2) y 1 33(b)

Incorporación Por Referencia (utilizable si se ha marcado la casilla 5b)

La divulgación completa de la solicitud previa, de la cual se facilita una copia del juramento o declaración dentro de la casilla 4b es considerada como parte de la divulgación de la solicitud acompañante y queda por la presente incorporada al presente documento por referencia

- 6 ☐ Programa de ordenador microficha (apéndice)
- 7 ☒ Aportación de nucleótidos y secuencia de aminoácido
- a ☒ Copia legible por ordenador
- b ☒ Copia en soporte papel (identica a la del ordenador)
- c ☐ Declaración verificando la identidad de las anteriores copias

ELEMENTOS QUE ACOMPAÑAN A LA SOLICITUD

- 8 ☐ Documentos de cesión (portada y documento/s)
- 9 ☐ Declaracion CFR 3 73(b) ☐ Autorizacion
(cuando hay un cesionario)
- 10 ☐ Documento de traduccion inglesa (si es preciso)
- 11 ☐ Declaración de desarrollo de información (IDS)/PTO-1449
☐ Copia de citaciones IDS
- 12 ☐ Modificación preliminar
- 13 ☒ Tarjeta de acuse de recibo (MPEP 503)
(Debe ser específicamente especificado)
- 14 ☐ *Declaración de Pequeña/s Entidad/es (PTO/SB/09-12) -
☐ Declaración presentada en solicitud anterior
Situacion si todavia corresponde y se desea
- 15 ☐ Copia certificada del documento/s de prioridad
(en el caso de que se reivindique prioridad extranjera)
- 14 ☒ Otros Reivindicación de prioridad
PCT/IB99/00130 solicitada 25 enero 1999
60/074,636 solicitada 13 febrero 1998

* **NOTA PARA LOS EPIGRAFES 1 Y 14** Para estar legitimado para pagar tasas de pequeña entidad se requiere Declaración de Pequeña Entidad (37 CFR 1 27), excepto si se basa en una solicitud anteriormente solicitada (37 CFR 128)

17 Si es una **SOLICITUD DE CONTINUACION**, marcar la casilla correspondiente y proporcionar la información requerida mas abajo y en una modificación preliminar

☐ continuacion ☐ division ☒ continuacion parcial
☐ de solicitud anterior no PCT/IB99/00130

PATRICIA KICH MORENO
ING S Y ALEMAN
c Cartagena, 113
Teléf 5155590 - MADRID

Información de solicitud anterior Examinador _____ Grupo/unidad _____

16

18 DIRECCION DE CORRESPONDENCIA

(Insertar el nº de cliente o incluir aquí etiqueta de código de barras)

_____ nº de cliente o Etiqueta de código de barras o

☒ dirección de correspondencia a continuación

Nombre Paul H Ginsburg

Dirección Pfizer Inc

235 East 42nd Street, 20th floor

Ciudad New York Estado New York Código postal 10017-5755

País Estados Unidos Teléfono (212)573-2369 Fax (212)573-1939

Nombre (letras de imprenta) Alan L Koller

Nº de registro (Agente/Apoderado) 37,371

Firma Alan L Koller Fecha 12 agosto 1999

TRANSMISION DE UTILIDAD PTO SB 05, 3/99, (1/1)

PC10649AALK 1
US 09/372,934 solicitada el 12 Agosto 1999

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

1 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y
5 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
10 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
15 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 INVENCION

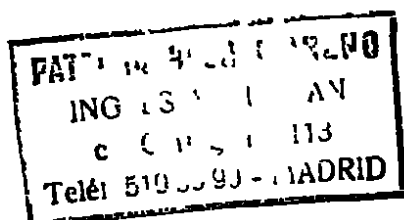
20 2 1 Avermectinas

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
25 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 hidroxilo, 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 hidroxilo 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-metilbutírico.

Una combinación de la mejora de cepas mediante



19

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 nuevas avermectinas. Mediante la selección entre más de 800

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.

5 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.*

10 *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

15 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

20 B2/B1 de avermectinas, simplificaría la producción y purificación de las avermectinas importantes desde el punto de vista comercial.

3 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una molécula

25 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

5 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

10 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.

15 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

20 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

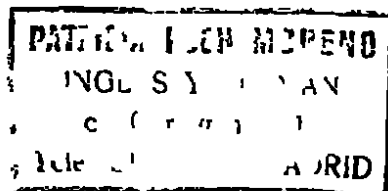
25 secuencia de aminoácidos que es homóloga a la secuencia de

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
25 mismos, que se ha purificado o aislado sustancialmente, así



26

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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

5 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
10 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
15 *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
20 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
25 de avermectinas producidas por las células de *S.*

avermittilis de la etapa (b), de tal forma que si la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S avermittilis* de la etapa (a) es diferente de la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S avermittilis* 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.

10 La presente invención proporciona además vectores recombinantes que son útiles para fabricar nuevas cepas de *S avermittilis* que tienen alterada la producción de avermectinas. Por ejemplo, la presente invención proporciona vectores que pueden usarse para dirigir
15 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 avermittilis*, para insertar o reemplazar el alelo de aveC, la ORF o una porción de la misma mediante
20 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
25 inserta en el cromosoma de *S avermittilis* 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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

A KOCH MORENO
S / LEMAN
C / 13
MADRID

34

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 un 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
5 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*
10 *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
15 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.

20 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
25 relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por

A HALL
S Y
Calle 113
Tel 5195993 - 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

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 Ceba SE180-11 de *S avermitilis* con una ORF de aveC inactivada FIG 5B Ceba SE180-11 de *S avermitilis* transformada con pSE186 (ATCC 209604) FIG 5C Ceba SE180-11 de *S avermitilis* transformada con pSE187 FIG 5D Ceba 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 BsaAI/KpnI de 564 pb del gen homólogo de aveC de *S hygroscopicus* insertado en el sitio BsaAI/KpnI en la ORF de aveC de *S avermitilis*

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la identificación

74

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 Producto Génico AveC de *S. avermitilis*

Int. N.º 1 - 1984
VGL's Y L A 7-14
c Cartagena, 115
Teléf 516590 - 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 de *aveC* nativo, produce sustancialmente la misma relación

41
#

AGENCIA KOCH MONTE
INGLES V AL
c/ Cartagena 10
Teléf 519 5990 - MADRID

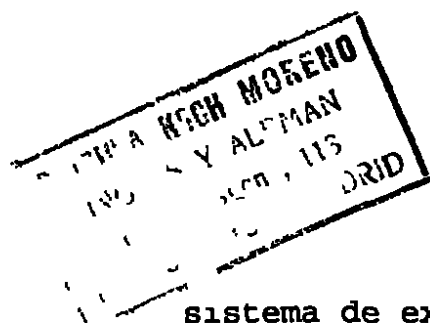
25

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*

5 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
10 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
15 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
20 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
25 génico *AveC* o un producto génico homólogo a *AveC*, en un



42
Z

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, 5 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 10 en la Sección 9 mostrada más adelante, se construyeron delecciones 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 15 sitios de iniciación para la expresión de la proteína. La delección del primer sitio GTG en el pb 42 no eliminó la actividad de AveC. Una delección 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 20 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 25 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
5 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.*
10 *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
15 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
20 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 NaHPO₄ 0,5 M, dodecil
sulfato sódico (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en
25 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 42°C (véase Ausubel y col , (eds),

L.A. ROSS POF 00
VOI S Y ALL JAN
c Cif igena, 113
Telét 515 52 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
5 anteriormente En una realización preferida, la molécula polinucleotídica homóloga híbrida 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
10 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 NaHPO₄ 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
15 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
20 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*
25 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

5 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
10 *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
15 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
20 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
25 uno o más restos de aminoácidos se han sustituido de forma

LA REX MOPINO
JLLS Y ALL AN
c Cartagena, 113
tel 519 5390 - 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
5 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
10 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
15 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
20 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,
25 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 aminoácidos 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,

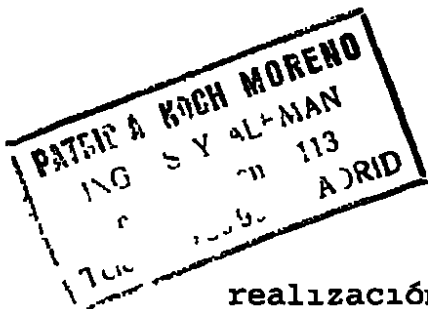
NCBI) En una realización no limitante, el producto génico
homólogo a AveC procede de *S. hygroscopicus* (descrito en la
solicitud de patente EP 0298423, depósito FERM BP-1901) y
comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO 4 o
5 una porción sustancial de la misma. Una "porción
sustancial" de 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
10 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
15 misma relación y cantidad de milbemidas 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,
20 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
25 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 híbrida 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



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
5 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
10 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
15 *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
20 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
25 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 5 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.

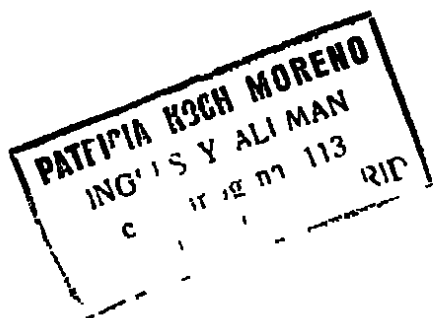
La producción y manipulación de las moléculas 10 polinucleotídicas descritas en este documento están dentro de la experiencia en la técnica y pueden realizarse de acuerdo con técnicas recombinantes descritas, por ejemplo, en Maniatis, y col , 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring 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 15 (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 20 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
5 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
10 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
15 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

20 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
25 polinucleotídicas de la presente invención que comprenden,



58

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* 5 *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* 10 *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, 15 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 20 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.

25 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
5 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,
10 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,
15 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
20 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
25 construir vectores recombinantes que contienen secuencias

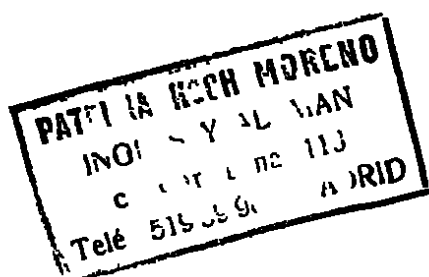
codificantes particulares en asociación operativa con
elementos reguladores apropiados, y éstos pueden usarse
para poner en práctica la presente invención. Estos
procedimientos incluyen técnicas recombinantes *in vitro*,
5 técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.
Véanse, por ejemplo, las 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
10 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
15 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
20 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
25 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

5 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, 10 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 25 representada en la FIGURA 7, se construyó un plásmido



28

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
5 transformar células de *S. avermitilis* y ensayarse para
determinar su efecto, por ejemplo, sobre la relación de
avermectinas de clases 2 y 1 producidas

Las proteínas de fusión de AveC pueden modificarse por
ingeniería genética para que comprendan una región útil
10 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
glutación-S-transferasa pueden purificarse usando perlas de
glutación-agarosa, y las fusiones de AveC-polihistidina
15 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
20 secuencia de nucleótidos que codifica para el epítipo diana
de un anticuerpo monoclonal, en el vector de expresión, en
asociación operativa con los elementos reguladores, y
situarse de forma que el epítipo expresado se fusione con
el polipéptido AveC. Por ejemplo, puede insertarse por
25 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
5 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

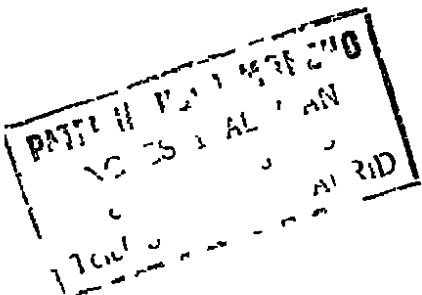
El vector de expresión que codifica la proteína de
10 fusión AveC también puede modificarse por ingeniería genética para que contenga secuencias de poliengarce que codifican sitios de escisión específicos de proteasas, de forma que el polipéptido AveC expresado pueda liberarse de la región portadora o de la molécula de fusión por
15 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
20 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
25 que proceden del factor α , inmunoglobulinas, proteínas de

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
5 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.

10 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
15 de *E. coli*, tal como, por ejemplo, la cepa DH5 α , 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
20 utilizarse eficazmente células de mamífero o células de
insectos.

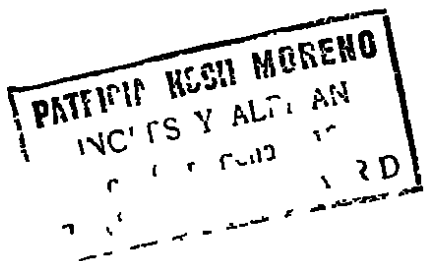
El vector de expresión recombinante de la invención
preferiblemente transforma o transfecta a una o más células
huésped de un cultivo sustancialmente homogéneo de células.
25 El vector de expresión generalmente se introduce en las



64

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 (1)

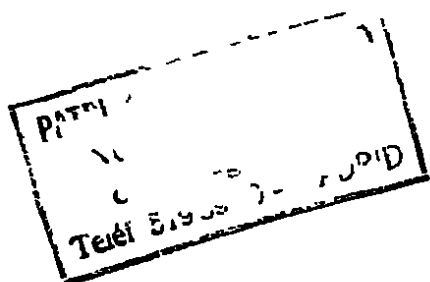


hibridación ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN antisentido, (ii) detección de la presencia de funciones de genes "marcadores", (iii) evaluación del nivel de transcripción medido por la expresión de transcritos de ARNm específico de aveC en la célula huésped, y (iv) detección de la presencia del producto polipeptídico 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

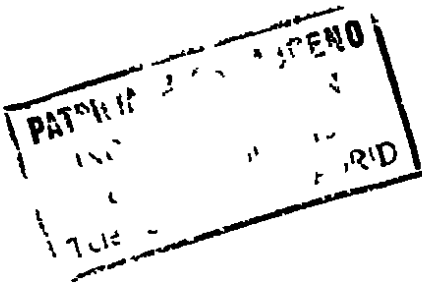


69

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

5 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
10 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

15 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
20 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
25 de la preparación en cada etapa del procedimiento de



68

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
5 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
10 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
15 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
20 misma, y homólogos del mismo

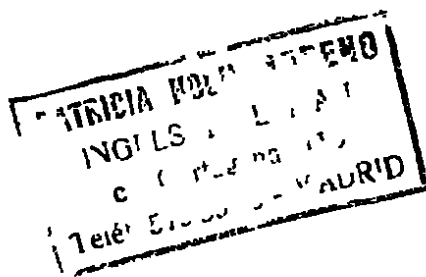
La presente invención proporciona además un producto
génico homólogo a AveC de *S. hygroscopicus* expresado de
forma recombinante, aislado o purificado sustancialmente,
que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO
25 4 o una porción sustancial de la misma, y homólogos del

mismo

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir un producto génico AveC, que comprende cultivar una célula huésped transformada con una
5 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
10 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
15 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

20 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
25 productos apropiados en la ruta biosintética de las



69

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

5 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

10 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

15 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

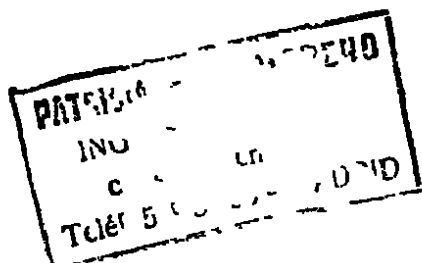
20 seleccionar nuevos sitios para la mutación en la ORF de aveC para ayudar a crear nuevas cepas de *S avermitilis* que tengan características de producción de avermectinas más deseables

5 3 Construcción y Uso de Mutantes de AveC

25 La presente invención proporciona una molécula

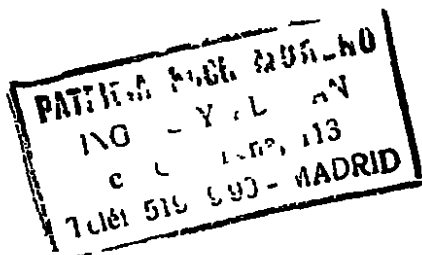
polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual que el alelo *aveC* de *S avermitilis* o una variante degenerada del mismo, a la secuencia codificante del producto génico *AveC* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o una variante degenerada de la misma, o a la secuencia 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



72

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

5 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,

10 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

15 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

20 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

25 Estados Unidos 5 837 458, que implican fragmentación

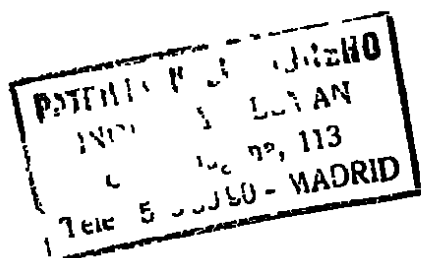
PAY 12
NOV 1981
C
Telé 5

73

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

5 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
10 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
15 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.

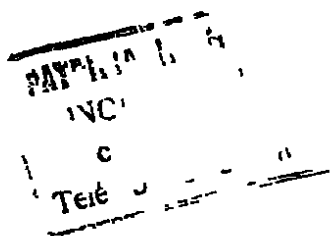
La mutagénesis aleatoria también puede ser útil y
20 puede realizarse por exposición de las células de *S. avermitilis* a la radiación ultravioleta o a rayos X, o a mutágenos químicos tales como N-metil-N'-nitrosoguanidina, etil metano sulfonato, ácido nitroso o mostazas nitrogenadas. Véase, por ejemplo,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



74

mutagénesis

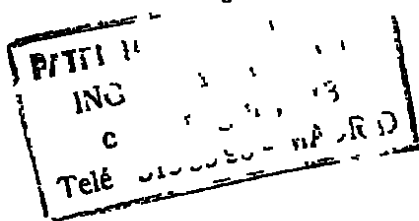
Una vez generadas las moléculas polinucleotídicas mutadas, se analizan para determinar si pueden modular la biosíntesis de avermectinas en *S. avermitilis*. En una 5 realización preferida, una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos mutada se ensaya mediante complementación de 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 10 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. 15 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 20 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 25 reducir la relación de avermectinas B2/B1, incluyendo



56

pSE188, pSE199, pSE231, pSE239 y pSE290 a pSE297

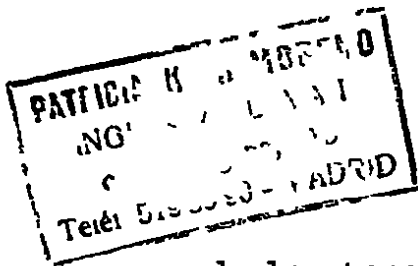
La presente invención proporciona procedimientos para identificar mutaciones de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* capaces de alterar la relación y/o cantidad de avermectinas producidas. En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar mutaciones de 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



76

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 5 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 10 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* 15 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 20 *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 25 avermectinas producidas por las células de *S avermitilis*

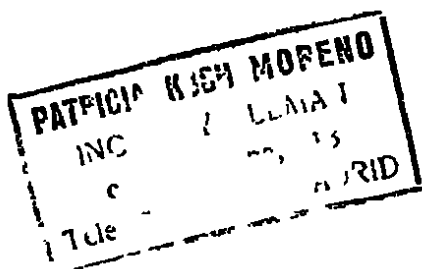


77

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



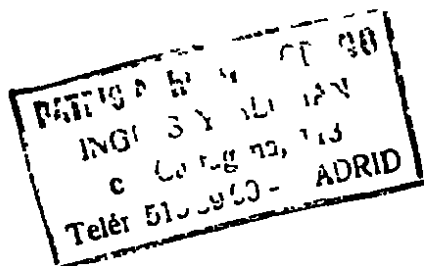
77

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
5 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
10 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
15 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)
20 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
25 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 5 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, 10 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 o 298 (véase la FIGURA 1), o cualquier combinación de las mismas

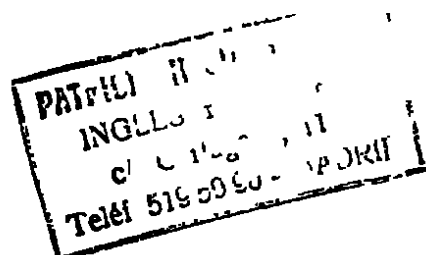
En una realización preferida, tales mutaciones codifican sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre una o más del grupo compuesto por

- 15 (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 20 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 25 reemplazado por S o por un aminoácido que es una



10

- 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,
- 5 (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
- 10 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
- 15 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,
- 20 (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
- 25 sustitución conservativa para D,



18

- (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
5 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
10 codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos,
seleccionándose la combinación de restos de aminoácidos
sustituídos entre el grupo compuesto por

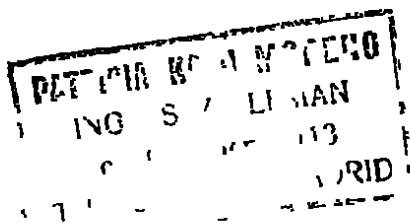
- (a) los restos de aminoácidos S138 y A139,
(b) los restos de aminoácidos D48 y A89,
15 (c) los restos de aminoácidos S138, A139 y G179,
(d) los restos de aminoácidos Q38, L136 y E238,
(e) los restos de aminoácidos F99, S138, A139 y
G179,
(f) los restos de aminoácidos A139 y M228,
20 (g) los restos 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
25 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,
- 5 (d) S138T/A139T/G179S,
- (e) Q38P/L136P/E238D,
- (f) F99S/S138T/A139T/G179S,
- (g) A139T/M228T,
- (h) G111/P289L, y
- 10 (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, 15 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 20 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 25 funcionar modulando la biosíntesis de avermectinas cuando



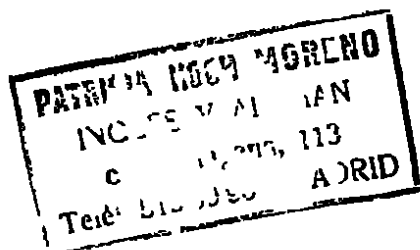
42

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 encima 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

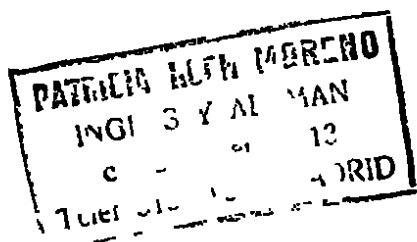
mostrada más adelante (FIGURA 3) La presente invención proporciona además vectores de reemplazo génico que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende o consta de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural al gen *aveC* in situ en el cromosoma de *S avermitilis*, incluyendo,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



86

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*



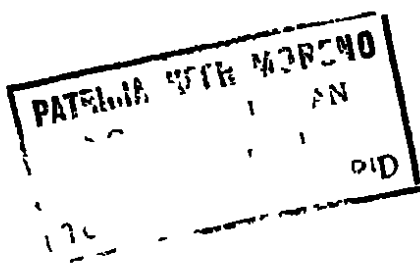
de tipo silvestre En una realización preferida, la relación alterada de avermectinas de clases 2 1 se reduce

Como se usa en este documento, cuando se dice que un resto de aminoácido codificado por un alelo de aveC en el
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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*,
5 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
10 *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
15 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*
20 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
25 preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas

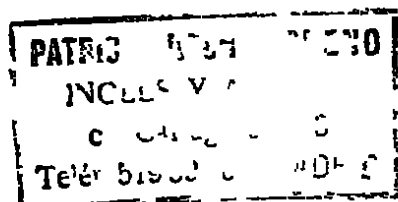


87

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 inactiva 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



26

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 una realización más preferida, la relación es

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

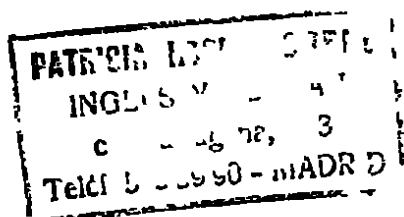
proporciona nuevas cepas de *S avermitilis* que comprenden células en las que se ha inactivado el gen *aveC*. Tales cepas son útiles para el espectro diferente de avermectinas que producen en comparación con la cepa de tipo silvestre, y en ensayos de selección de complementación como se describen en 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
5 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
10 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

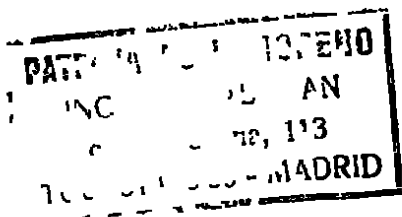
La presente invención proporciona además un
15 procedimiento para producir avermectinas, que comprende
cultivar las células de una cepa de *S avermitilis*, células
que expresan un alelo de *aveC* mutado o una construcción
genética que comprende un alelo de *aveC* que da como
resultado la producción de una cantidad alterada de
20 avermectinas producidas por las células de una cepa de *S*
avermitylis 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
25 el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en un medio de cultivo



76

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

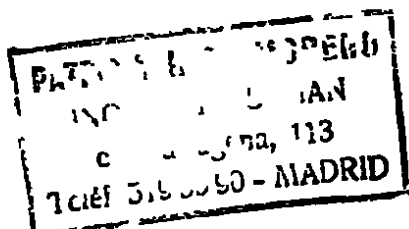


purificación, tales como precipitación con sulfato amónico, diálisis, fraccionamiento por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, etc

5 4 Usos de las Avermectinas

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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*, 5 *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*.

10 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, 15 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 20 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 25 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

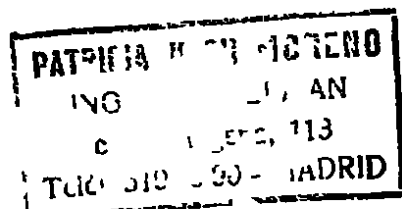
- 5 Un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención se administra en una formulación apropiada para el uso específico pretendido, la especie particular de animal huésped a tratar y el parásito o insecto implicado Para uso como un parasiticida, un
- 10 compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede administrarse 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
- 15 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
- 20 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
- 25 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
5 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
10 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,
15 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
20 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,
25 de acuerdo con la práctica agrícola convencional



102

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

Las cepas que carecen de las actividades de 2-oxo
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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, 5 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 10 (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 15 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- 20 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 25 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

5

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

PATRICIA N. 3103110
ING. ES Y ALUMIN
C. C. Ingenio, 113
Telé 519 59 60 - MADRID

TABLA 1

	Sustrato	Tiempo de Retención de HPLC (min)		Relación
		B2	B1	
5	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
10	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
15	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

105

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 5 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 10 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 adelante usan ácido 15 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

20 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 25 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
5 *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
10 - 15 g El volumen final se ajustó a 1 litro con H₂O
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
15 Broth - 30 g, en 1 litro de H₂O 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

20 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
25 resuspendieron en 0,25 ml de tampón TSE (20 ml de sacarosa

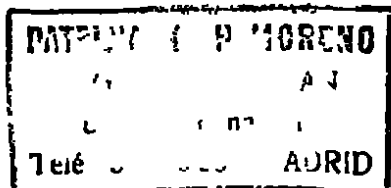
1,5 M, 2,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 2,5 ml de EDTA 1 M, pH 8,0 y 75 ml de H₂O destilada) que contenía 2 mg/ml de lisozima. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos con agitación, se cargaron en un instrumento automático de aislamiento de ácidos nucleicos AutoGen 540™ (Integrated Separation 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 5 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 10 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 ml) de micelio en tubos de 15 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 20 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 25 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

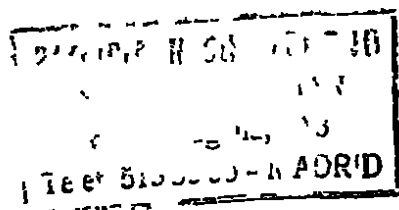
minutos a 5°C, el sobrenadante se retiró y el sedimento de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en tampón TE

7 1 4 Aislamiento de ADN Plasmídico de *E. coli*

5 Se inoculó una colonia de *E. coli* transformada individual en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) (Bacto-Tryptona - 10 g, Extracto de Bacto levadura - 5 g, y NaCl - 10 g en 1 litro de H₂O destilada, pH 7,0, esterilizado en autoclave a 121°C durante 25 minutos y suplementado con 100
10 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
15 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
20 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
25 Extracto de Levadura de Difco - 3 g, Bacto-peptona de Difco



112

- 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 $MgCl_2$ 6 H_2O 2,5 M
(esterilizado por separado en un autoclave a 121°C durante
5 25 min) - 2 ml, y glicina (20%) (esterilizado por
filtración) - 25 ml

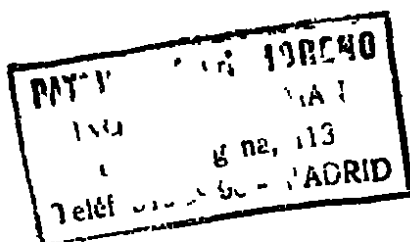
Los micelios se desarrollaron a 30°C durante 48-72
horas y se recogieron por centrifugación en un tubo de
centrífuga de 50 ml (Falcon) a 3 000 rpm durante 20
10 minutos El sobrenadante se desechó y los micelios se
resuspendieron en tampón P, que contiene sacarosa - 205 g,
 K_2SO_4 - 0,25 g, $MgCl_2$ 6 H_2O - 2,02 g, H_2O - 600 ml, K_2PO_4
(0,5%) - 10 ml, solución de oligoelementos* - 20 ml, $CaCl_2$
2 H_2O (3,68%) - 100 ml, y tampón MES (1,0 M, pH 6,5) - 10
15 ml (* La solución de oligoelementos contiene por litro
 $ZnCl_2$ - 40 mg, $FeCl_3$ 6 H_2O - 200 mg, $CuCl_2$ 2 H_2O - 10 mg,
 $MnCl_2$ 4 H_2O - 10 mg, $Na_2B_4O_7$ 10 H_2O - 10 mg, $(NH_4)_6MO_7O_{24}$
4 H_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
20 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
25 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 1×10^9 protoplastos en viales criogénicos de 2,0 ml (Nalgene).

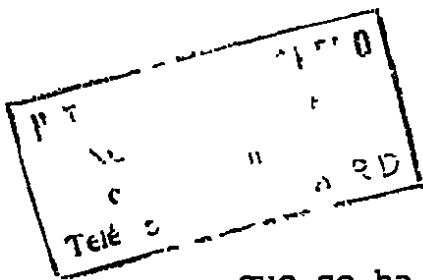
Un vial que contenía 1×10^9 protoplastos se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y los protoplastos se resuspendieron en 0,1 ml de tampón P. Se añadieron de 2 a 5 μ g de ADN transformante a los protoplastos, seguido inmediatamente por la adición de 0,5 ml de tampón T de trabajo. La base de tampón T contiene PEG-1000 (Sigma) - 25 g, sacarosa - 2,5 g, H₂O - 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, K₂PO₄ (4 mM) - 1,0 ml, CaCl₂ 2H₂O (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



115

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 tlostrepton (Thio^r)

5 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
10 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
15 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*

20 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
25 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-(+/-)-
5 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
10 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, $\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 2 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -
15 0,02 g/l, MnCl_2 - 0,002 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 g/l, CaCO_3
- 14 g/l, 2x bcfa (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
20 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
25 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 5 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 10 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 15 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/Eco47III* de 2,7 kb 20 procedente de pEX26 (suministrado amablemente por el Dr P Leadlay, Cambridge, Reino Unido) Se digirieron aproximadamente 5 ng de pEX26 usando *NdeI* y *Eco47III* La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa GTG SeaPlaque al 0,8% (FMC BioProducts, Rockland, ME) El 25 fragmento *NdeI/Eco47III* 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 NdeI/Eco47III de 2,7 kb se marcó con [α -³²P]dCTP (desoxicitidina 5'-trifosfato, sal de tetra(trietilamonio), [alfa-³²P]-) (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 μ l 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 *Saccharomyces 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)

5 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
10 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
15 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
20 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
25 enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para

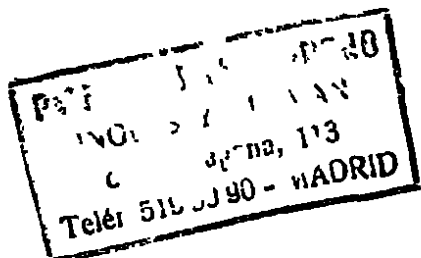
transformar células DH5 α de *E coli* competentes (BRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto 5 *SacI/BamHI* de 2,9 kb por análisis de restricción Este plásmido se denominó pSE119

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 10 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 15 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- 20 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)

25 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
5 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
10 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 *SphI* y *BamHI*. La mezcla
de reacción se cargó en un gel de agarosa SeaPlaque GTG al
15 0,8% (FMC BioProducts), se escindió un fragmento *SphI/BamHI*
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 *SphI* y *BamHI*. Se
20 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
25 la mezcla de ligación a 70°C durante 10 minutos, se



enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para transformar células DH5 α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se
5 confirmó la presencia del inserto *SphI/BamHI* 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 tiosstrepton 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
15 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***

20 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
25 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 5 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 10 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 15 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 como pCR-Blunt linealizado (Invitrogen) en una 20 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 25 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
5 identificó una ORF de ~ 0,9 kb (FIGURA 1) (SEC ID NO 1)
que incluye un fragmento *Pst*I/*Sph*I 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
10 conocidas (GenEMBL, SWISS-PROT) no mostró ninguna homología
fuerte con el ADN o las secuencias proteicas conocidas

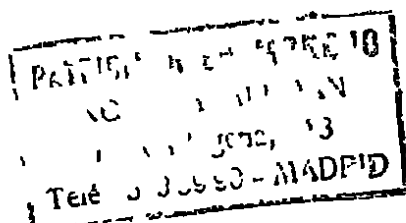
La TABLA 2 presenta el análisis de fermentación de la
cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* transformada con diversos
plásmidos

15

TABLA 2

Cepa de <i>S. avermitilis</i> (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

20



126

8 EJEMPLO CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE

AveC DE *S. AVERMITILIS*

Este ejemplo describe la construcción de varios
5 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,
10 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

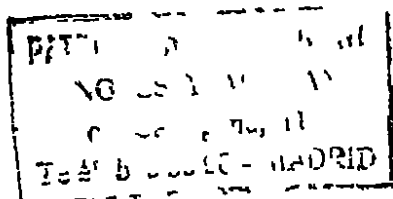
8 1 Inactivación del Gen aveC de *S. avermitilis*

15 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
SphI/PstI de 640 pb interno al gen aveC en pSE119 (plásmido
20 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
25 restricción, con *BglII* y *EcoRI*, seguido por electroforesis,

y se purificó del gel Este fragmento de ~ 1,7 kb se ligó a pGEM7Zf (Promega) que se había digerido con BamHI y EcoRI 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 SphI y BamHI, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto SphI/BamHI de ~ 2,8 kb se purificó del gel pSE119 se digirió con PstI y EcoRI, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto PstI/EcoRI de ~ 1,5 kb se purificó del gel El vector lanzadera pWHM3 se digirió con BamHI y EcoRI pSE27 se digirió con PstI y SphI, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto PstI/SphI 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



128

denominó pSE180 (FIGURA 3, ATCC 209605)

pSE180 se utilizó para transformar TK64 de *S. lividans* y las colonias transformadas se identificaron por resistencia a tiosstrepton 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 tiosstrepton 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 tiosstrepton, 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 delección 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 5 *PstI/SphI* de 640 pb en el gen *aveC*. Se construyó un plásmido de reemplazo génico como se indica a continuación: se digirió parcialmente pSE180 con *XbaI* 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 10 ADN se ligó y transformó a células DH5 α 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* 15 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 tiosstrepton de la cepa SE180- 20 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 tiosstrepton, indicando integración cromosómica del gen *aveC* 25 inactivado y pérdida del replicón libre que contenía el gen

ermE Se identificó un transformante Erm^r Thio^r 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 *BspE*I. La presencia del sitio *BspE*I, 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
25 con *EcoRI* y *BamHI* pSE119 se digirió con *BamHI* y *SphI*, el

producto de digestión se sometió a electroforesis y se purificó un fragmento de ~ 840 pb del gel pSE119 se digirió con *EcoRI* y *XmnI*, el producto de digestión se resolvió por electroforesis y se purificó un fragmento de 5 ~ 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 DH5 α de *E. coli* competentes. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes 10 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 15 ampicilina. Este plásmido se usó para transformar protoplastos de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis*. Los transformantes resistentes a tiosstrepton de la cepa 1100-SC38 se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. pSE185 no alteraba 20 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 25 fase en el gen *aveC* cromosómico. Se prepararon protoplastos

a partir de transformantes resistentes a tiosstrepton 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 tiosstrepton. Se aisló el ADN cromosómico a partir de las colonias sensibles a tiosstrepton 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 *BspE1*, 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⁺ 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
5 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)

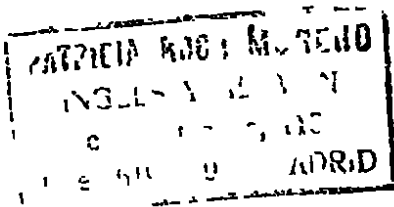
8.2 **Análisis de Mutaciones en el Gen *aveC* que Alteran**
10 **las Relaciones de Clases B2.B1**

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
15 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
20 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
25 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
5 (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 tiosstrepton de la cepa SE180-11, se determinó
10 la presencia de resistencia a eritromicina y se analizaron
los transformantes $\text{Thio}^r \text{Erm}^r$ 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
15 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)
20 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)
25 Una cepa de *S. avermitilis* que tiene esta mutación (G230D)



136

produce avermectinas en una relación B2 B1 de aproximadamente 30 1

8 3 Mutaciones que Reducen la Relación B2 B1

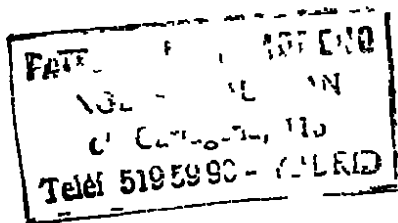
Se construyeron varias mutaciones que reducían la cantidad de ciclohexil-B2 producida con respecto a ciclohexil-B1, como se indica a continuación

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)

10 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 tiosstrepton de la cepa SE180-11, se determinó
15 la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $\text{Thio}^r \text{Erm}^r$ 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
20 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
25 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 *EcoRI* y se clonó en pGEM3Zf (Promega) que se había digerido con *EcoRI*. Este plásmido, que se denominó pSE186a, se digirió con *ApaI* y *KpnI*, 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'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCTGGCGACG-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 (Clontech 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



138

1,0 M y una unidad de Klen Taq Polymerase Mix en un volumen final de 50 μ l. 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 DH5 α 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 pSE199, se usó para transformar protoplastos de la

cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiosstrepton 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'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEC ID NO 14), y el cebador de PCR hacia la izquierda fue 5'-GGAACATCACGGCATTTCACC-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 *ApaI* y *KpnI* para liberar un fragmento de 254 pb
que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel
pSE186a se digirió con *ApaI* y *KpnI*, los fragmentos de ADN
5 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 DH5 α *E coli*
10 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 *EcoRI*, se clonó en pWHM3 que se
15 había digerido con *EcoRI* y se utilizó para transformar
células DH5 α 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
20 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
25 cepa SE180-11 de *S avermitilis* Se aislaron los

transformantes resistentes a tiosstrepton 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 PCR hacia la derecha fue 5' -

GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3' (SEC ID NO 25), y el cebador de PCR hacia la izquierda fue 5'-GGAACATCACGGCATTTCACC-3' (SEC ID NO 15) La reacción de PCR se realizó usando un equipo de PCR genómico Advantage GC 5 (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) en tampón proporcionado por el fabricante en presencia de dNTP 200 μ M, 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 μ l El perfil térmico del primer ciclo fue de 94°C durante 1 minuto, seguido por 25 10 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 *ApaI* y *KpnI* para liberar un fragmento de 254 pb, que se resolvió por electroforesis y 15 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 DH5 α de *E coli* competentes Se aisló ADN plasmídico a partir de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia 20 del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción Este plásmido se denominó pSE238

pSE238 se digirió con *EcoRI*, se clonó en pWHM3, que se había digerido con *EcoRI*, y se utilizó para transformar células DH5 α de *E coli* El ADN plasmídico se aisló de los 25 transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del

11/3

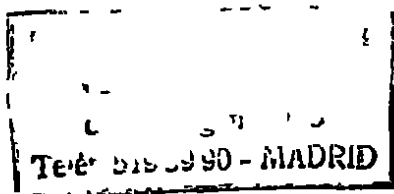
inserto correcto se confirmó por análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este ADN plasmídico se utilizó para transformar DM1 de *E. coli*, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. 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 tiosstrepton 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 <i>S. avermitilis</i> (plásmido transformante)	No de transformantes ensayados	Conc Relativa de B2	Conc Relativa de B1	Relación media B2:B1
5	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
10	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*



145

avermililis SE aislaron los transformantes resistentes a tiosstrepton 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

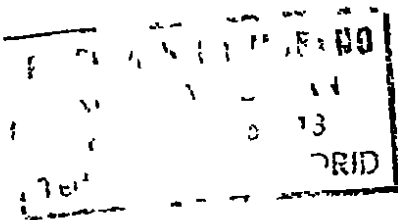
Se identificaron ocho transformantes que producían cantidades reducidas de ciclohexil-B2 con respecto a ciclohexil-B1 La menor relación B2 B1 conseguida entre estos transformantes fue de 04 1 (TABLA 4) El ADN plasmídico se aisló de cada uno de los ocho transformantes y la secuencia de ADN se determinó 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



147

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)

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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)

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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

5	Cepas de <i>S. avermitilis</i> (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 (pWHM)	4	0	0	0
	SE180 11 (pSE290)	4	87	208	0 42
	SE180 11 (pSE291)	4	106	185	0 57
10	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
15	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.

5 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) (D1F2), 5'-

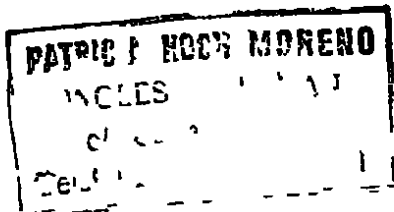
10 CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEC ID NO 18) (D1F3), y 5'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEC ID NO 19) (D2F2). Los cebadores hacia la izquierda fueron 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEC ID NO 20), 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEC ID NO 21), y 5'-AGGAGTGTGGTGGTCTGGA-3' (SEC ID NO 22). La

15 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

20 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™

25 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El



151

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 tiosstrepton 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 5 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 10 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

15	Cepa de <i>S. avermitilis</i> (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
20	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

25 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
5 hibridó una biblioteca de cósmidos de ADN genómico de *S. hygrosopicus* (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
10 un fragmento *KpnI* 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
15 homóloga a *aveC* de *S. hygrosopicus*.

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
20 fuertemente. Se aisló el ADN cromosómico de estos cósmidos y se identificó un fragmento *PstI* 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
25 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*

10

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 *KpnI/BamHI* en el sitio *KpnI/BamHI* de pWHM3 (véase Ward y col, 1986, Mol Gen Genet 203 468-478) pSE186 se digirió con *BamHI* e *HindIII*, 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 *BamHI* e *HindIII*. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5 α 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 tiosstrepton de la cepa 1100-5 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 10 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).

15 pSE189 también se utilizó para transformar protoplastos de una cepa de *S. avermitilis* de tipo silvestre. Los transformantes resistentes a tiosstrepton se aislaron y analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Las avermectinas totales producidas por el 20 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

5	Cepa de <i>S. avermitilis</i> (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
10	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
15	tipo silvestre (pSE189)	5	545	345	1.071	1.58

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

20 Se construyó un plásmido híbrido denominado pSE350 que contiene una porción de 564 pb del homólogo de *aveC* de *S. hygrosopicus* 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 (25 *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'-CTTCAGGTGTACGTGTTTCG-3' (SEC ID NO 23) y el cebador hacia la izquierda 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEC ID NO 24) (suministrado por Genosys Biotechnologies), usando las 5 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 15 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 20 transformar células DH5 α 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 25 inserto de 1,2 kb, que después se unió con pWHM3 que se

había digerido con *HindIII* y *XbaI*. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5 α de *E. coli* competentes, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto
5 correcto se confirmó mediante análisis de restricción usando *HindIII* y *AvaI*. 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
10 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 tiosstrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de eritromicina y
15 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
20 7)

TABLA 7

5	Cepa de <i>S. avermitilis</i> (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 (pMEN3)	8	0	0	0
	SE180 11 (pSE350)	16	233	2	109

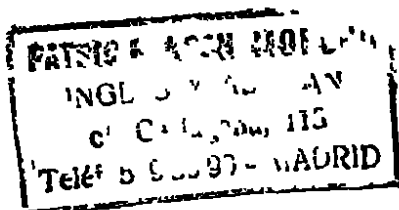
DEPÓSITO DE MATERIALES BIOLÓGICOS

El siguiente material biológico se depositó en la
10 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

	<u>Plásmido</u>	<u>No. de Acceso</u>
	plásmido pSE180	209605
15	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
20 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
25 invención, además de las mostradas y descritas en este



160

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.

REIVINDICACIONES

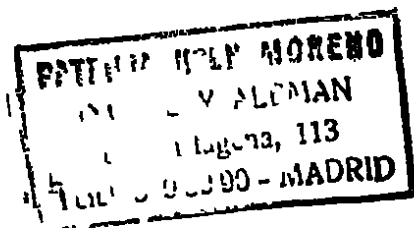
1 Una molécula polinucleotídica aislada que
comprende la ORF completa de *aveC* de *S. avermitilis* o una
porción sustancial de la misma, molécula polinucleotídica
5 aislada que carece de la siguiente ORF completa que está
localizada cadena abajo de la ORF de *aveC* *in situ* en el
cromosoma de *S. avermitilis*

2 La molécula polinucleotídica aislada de la
10 reivindicación 1, que comprende una secuencia de
nucleótidos que es la misma 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 *aveC* de la FIGURA 1 (SEC ID NO 1)
15 o una porción sustancial de la misma

3 La molécula polinucleotídica aislada de la
reivindicación 2, que comprende además secuencias de
nucleótidos que flanquean de forma natural el gen *aveC* *in*
situ en *S. avermitilis*

20 4 Una molécula polinucleotídica aislada, que
comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO 1,
o una variante degenerada de la misma

5 Una molécula polinucleotídica aislada, que
comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la
25 secuencia codificante del producto génico *AveC* de *S.*



162

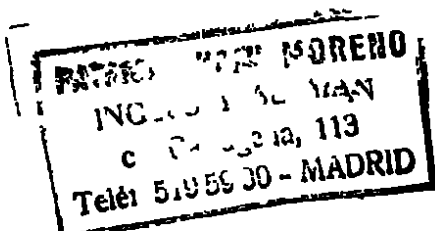
146

avermittilis 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)

6 Una molécula polinucleotídica aislada que consta
5 de una secuencia de nucleótidos que es una porción sustancial de (a) una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que es igual que la secuencia codificante del producto génico *AveC* de *S* *avermittilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que es
10 igual que la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de la FIGURA 1 (SEC ID NO 1), o (b) una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia codificante del producto génico *AveC* de *S* *avermittilis* del plásmido pSE186 (ATCC
15 209604), o a la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID NO 1)

7 Una molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO 3 o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia
20 de nucleótidos de la SEC ID NO 3

8 Una molécula polinucleotídica aislada que consta de una secuencia de nucleótidos que es una porción sustancial de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO 3 o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la
25 secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO 3



163

9 Una molécula de oligonucleótido que hibrida en condiciones muy rigurosas con una molécula de polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO 1) o la SEC ID NO 3, o con una 5 molécula de polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos de la FIGURA 1 (SEC ID NO 1) o de la SEC ID NO 3

10 La molécula de oligonucleótido de la 10 reivindicación 9, que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la Figura 1 (SEC ID NO 1) o a la SEC ID NO 3, o a 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 de 15 la SEC ID NO 3

11 Un vector recombinante que comprende una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo compuesto por

(a) una secuencia de nucleótidos que es igual a la 20 secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o que es igual a la secuencia de nucleótidos de la ORF de aveC de la FIGURA 1 (SEC ID NO 1),

25 (b) una secuencia de nucleótidos que es homóloga a

- la secuencia codificante del producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o que es homóloga a la secuencia de nucleótidos de la ORF de aveC de la FIGURA 1
- 5 (SEC ID NO 1), y
- (c) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO 3, o una secuencia de nucleótidos que es homóloga a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO 3
- 12 El vector de la reivindicación 11, que comprende
- 10 además una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más elementos reguladores, en asociación operativa con la secuencia codificante del vector de la reivindicación 11
- 13 El vector de la reivindicación 12, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un
- 15 marcador selectivo
- 14 El vector de la reivindicación 13, que es el plásmido pSE186 (ATCC 209604)
- 15 Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 11
- 20 16 La célula huésped de la reivindicación 15, que es *Streptomyces avermitilis* o *Streptomyces hygroscopicus*
- 17 Un producto génico AveC aislado de *S. avermitilis* que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico
- 25 AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604),

o codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO 1, o que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO 2

18 Un producto génico AveC aislado de *S*
5 *hygroscopicus* que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO 4

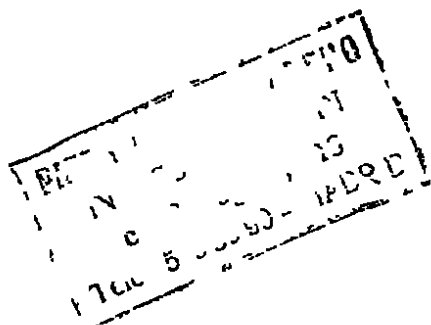
19 Un procedimiento para producir un producto génico AveC recombinante u homólogo de AveC, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 15 en
10 condiciones que conducen a la producción del producto génico AveC recombinante u homólogo de AveC, y recuperar el producto génico AveC recombinante u homólogo de AveC del cultivo celular

20 Una molécula polinucleotídica aislada que
15 comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual al alelo de *aveC* de *S. avermitilis* o 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* de *S. avermitilis* como se
20 presenta en la FIGURA 1 (SEC ID NO 1), pero que es una secuencia de nucleótidos 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 de *aveC* de tipo silvestre y que expresan la molécula
25 polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos

mutada, produce una relación o cantidad diferente de avermectinas que las producidas por las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre

5 21 Una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual que una variante degenerada del alelo de *aveC* de *S. avermitilis* o de la secuencia codificante del producto génico *AveC* de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC
10 209604) 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), pero que es una secuencia de nucleótidos 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
15 inactivado el alelo de *aveC* de tipo silvestre y que expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada, produce una relación o cantidad diferente de avermectinas que las producidas por las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en
20 su lugar expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre

 22 La molécula polinucleotídica de la reivindicación 20, que modula la producción de avermectinas de tal forma que las células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* en las que se ha inactivado el alelo de *aveC* de tipo silvestre
25 y que expresan la molécula polinucleotídica, producen



79/

1

LISTA DE SECUENCIAS

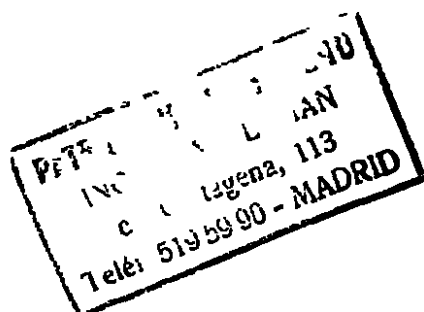
<110> Stutzman-Engwall, Kim J
McArthur, Hamish
5 Kato, Yoshihiro
<120> GEN DE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE LA
RELACIÓN DE AVERMECTINAS B2 B1
<130> PC10649
<140> PC10649
10 <141> 1999-08-12
<150> 60/074 636
<151> 1998-02-13
<150> PCT/IB99/00130
<151> 1999-01-25
15 <160> 25
<170> PatentIn Ver 2 0
<210> 1
<211> 1229
<212> ADN
20 <213> Streptomyces avermitilis
<220>
<221> CDS
<222> (174) (1085)
<400> 1

PATRICIA FELI MENO
1961 3 Y L MAN
13
ADRID

191

2

tcacgaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaacca tccgagccgc 60
tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgtatgccacg ctctcaccgc 120
aggccggcct gaacaggtca ggagcgtgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176
Val
1
gtg gtg tgg gcc ggg gtc ggc ctg ctg ttt ctg gcc ctg cag gcg tac 224
Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala Tyr
5 10 15
gtg ttc agc cgc tgg gcg gcc gac ggt ggc tac cgg ctg atc gag acg 272
Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu Thr



20	25	30	
gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg			320
Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val			
35	40	45	
gtc tat ccc gtg att tcc gtc gtc tgc atc acc gcc gcg gcg gcg tgg			368
Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala Trp			
50	55	60	65
ctc ttc cgg agg tgc cgt gtc gaa cga cgg ctg ctg ttc gac gcc ctt			416
Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala Leu			
70	75	80	
ctc ttc ctc ggg ctg ctg ttc gcg agc tgg cag agc ccg ctc atg aac			464
Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met Asn			
85	90	95	
tgg ttc cat tcc gtt ctc gtc tcc aac gcg agt gtg tgg ggc gcg gtg			512
Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala Val			
100	105	110	
ggg tcc tgg ggt ccg tat gtg ccc gcc 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	
gag gag gcg gaa atg ccg ctg gcg tcc gcc tcc gtc tgc atg tcc gct			608
Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys-Met Ser Ala			
130	135	140	145
ctg atc gtc acc 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 gcc ctg gtc			848
Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu Val			

PATRICIA R. VICTREPO
INCL-3 13
c 13
1e18 13
A DR

170

4

210	215	220	225
tgc tgc atg ctg ggc tgc ctg cgc ttc ttc cgc gac gaa cgc gat gag	896		
Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp Glu			
230	235	240	
tgc tgg gtg gaa cgg gga gcc tgg cgg ttg ccg caa cgg gca gcg aac	944		
Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala Asn			
245	250	255	
tgg gcg cgt ttc ctc gcc gtg gtc ggt ggg gtg aat gcc gtg atg ttc	992		
Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met Phe			
260	265	270	
ctc tac acc tgt ttc cat atc ctc ctg tcc ctc gtc ggt gga cag ccg	1040		
Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln Pro			
275	280	285	
ccc gac caa ctg ccg gac tcc ttc caa gcg ccg gcc gct tac tga	1085		
Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr			
290	295	300	
gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc	1145		
ctttgtgcat ggggtggacgg ggaacacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc	1205		
acactcctcg gttcagcgat catg	1229		

<210> 2
<211> 303
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis
5 <400> 2

PATRICIA MARY MORENO
19 3 1 AN
113
113000-MADRID

171

5

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

5

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 H. M. MENDO
INC. S. V. L. L. C.
c. Cartagena, 113
Teléf 5195560 - MADRID

6

172

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

5

10

15

20

25

<210> 3

PATRICIA H. J. MOTEHO
INGLES V. ALMAN
c. C. - eng. 113
Tel. 512 5536 - MADRID

7

<211> 1150
<212> ADN
<213> Streptomyces hygroscopicus
<220>
5 <221> CDS
<222> (58) (990)
<400> 3

10

15

20

25

17

PATRICIA S. MONTANO
INCLUC Y EL HAN
C. C. LECTURA 13
Teléf 515 5593 - AURID

771

8

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	

PATRÓN DE 15000
 INDI S V A L A N
 13
 MADRID

571

ggc 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	
gag 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 ggc 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 tgc ggc ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc ggc 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 ggc 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 agc cca tgg gtc cgg ctg ctg ggc gtg gtg ggc ggc gcc	873
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala	
260 265 270	
aac atc agc atc gcc ctc tac acc ggc gca cac ggc gca cac atc ctg	921
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu	
275 280 285	
ttc tgc ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc	969
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe	
290 295 300	
cgt ccg ggc gcc ggc tac tga gaccgcccgc accacccacg taccgatgt	1020
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr	
305 310	
gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tggctcacc tgtggcgctt	1080
catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacggg	1140
gcggccgggg	1150

PATRICIA ISAB MORENO
INGRIS V ALLMAN
c. Cartagena, 113
Tel: 513390 - MADRID

<210> 4 10
<211> 310
<212> PRT
<213> Streptomyces hygrosopicus
5 <400> 4

176



10

15



20

25

PATRICIA KCH MORENO
 vgl S V ALLMAN
 c Canageta, 1'3
 Telef 5195990 - MADRID

177

11

	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			
5	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	
10	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			
15	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			
20	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				

25

PATRICIA FULP
 INGLIS Y ALEMAN
 c Cartagena, 113
 Telef 5195990 - MADRID

178

12

	Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg	
	225	235 240
	Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro	
	245	250 255
5	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
10	Arg Pro Ala Ala Gly Tyr	
	305	310
	<210>	5
	<211>	215
	<212>	PRT
	<213>	Streptomyces griseochromogenes
15	<400>	5

20

25

PATRICIA REER '13'EMO
INGLES I. LLAN
c. Cartagena, 113
Tel. 5195990 - MADRID

13

179

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

5

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

10

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

15

PATRICIA KLEN H3PENO
INGI'S Y OLL AN
(Loma, 113
ADRID

180

14

	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	
5	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	
10	210 215	
	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Streptomyces avermitilis	
15	<400> 6	
	tcacgaaacc ggacacac	18
	<210> 7	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Streptomyces avermitilis	
	<400> 7	
	catgatcgct gaaccgag	18
25	<210> 8	
	<211> 20	

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALFAMAN
c. Cartagena, 113
Tel. 197590 - MADRID

15

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 8

gggtccggat gccgttctcg

20

5

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

10 <400> 9

aactccggtc gactccctt c

21

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

15 <400> 10

gcaaggatac ggggactac

19

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

20 <400> 11

gaaccgaccg cctgatac

18

<210> 12

<211> 43

<212> ADN

PATRICIA KOCH MORENO
INGENIERO EN CIENCIAS DE LA VIDA
c/ Cartagena, 113
Teléf 516 59 90 - MADRID

16

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 12

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gcccctggcg acg

43

<210> 13

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13

ggaaccgacc gcctgatata

20

<210> 14

<211> 46

10 <212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 14

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc

46

<210> 15

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 15

ggaacatcac ggcattcacc

20

<210> 16

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 16

182

PATRICIA P. M. AGUIRRE
INGENIERA Y QUÍMICA
C. Aragón, 113
Tel. 516.5990 - MADRID

17

aacccatccg agccgctc

18

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

5 <400> 17

tcggcctgcc aacgaac

17

<210> 18

<211> 18

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

10 <400> 18

ccaacgaacg tgtagtag

18

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

15 <400> 19

tgcaggcgta cgtgttcagc

20

<210> 20

<211> 17

<212> ADN

<213> Streptomyces avermitilis

20 <400> 20

catgatcgct gaaccga

17

<210> 21

183

<211> 20
<212> ADN
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 21

catgatecgt gaaccgagga

20

5 <210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 22

aggagtgtgg tgcgtctgga

20

10 <210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 23

cttcagggtgt acgtgttcg

19

15 <210> 24
<211> 18
<212> ADN
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 24

20 gaactgggtac cagtgcgc

18

<210> 25
<211> 46
<212> ADN

F. J. L. M. MORENO
INGL S Y ALL 14N
C Cartagena, 113
10 29 50 - MADRID

19

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 25

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc

46

185

FIG. 2

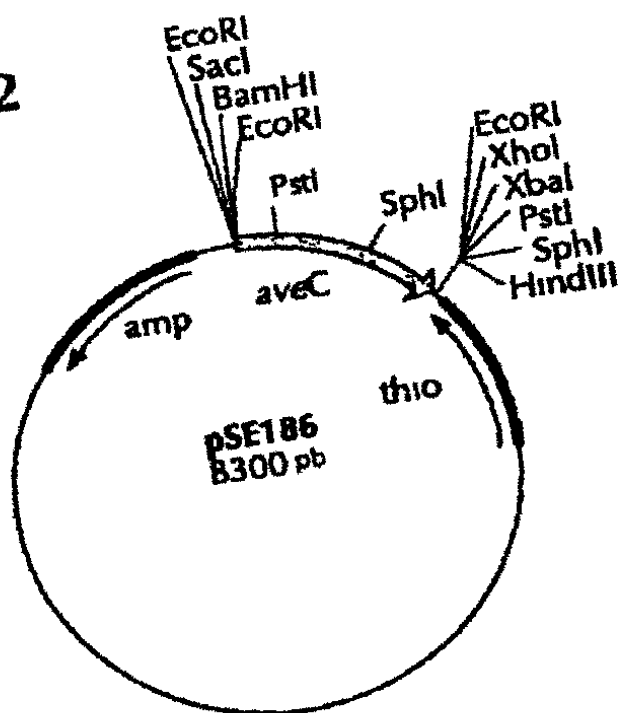
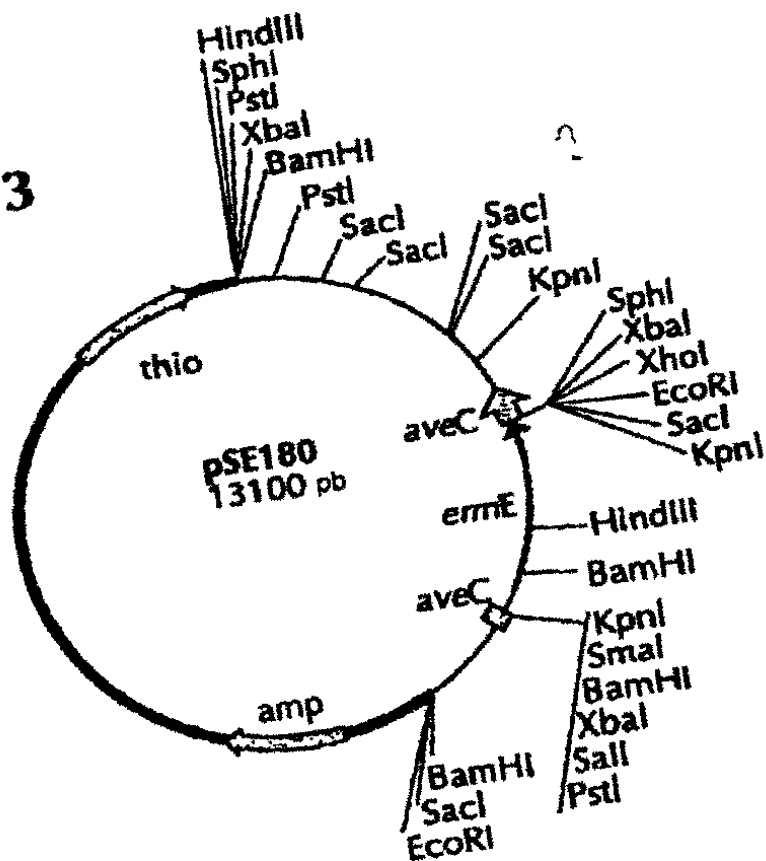


FIG. 3



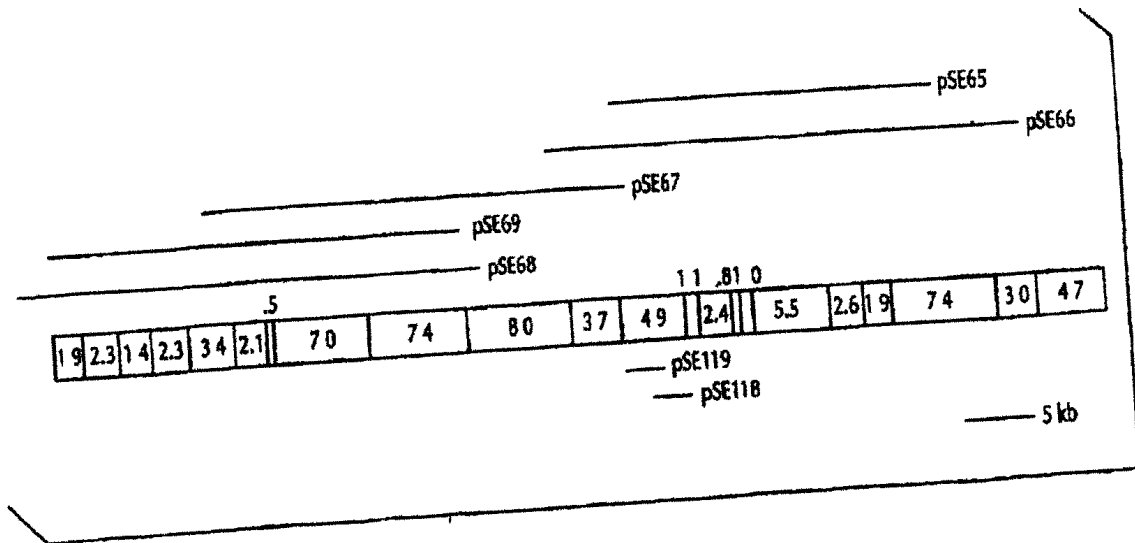
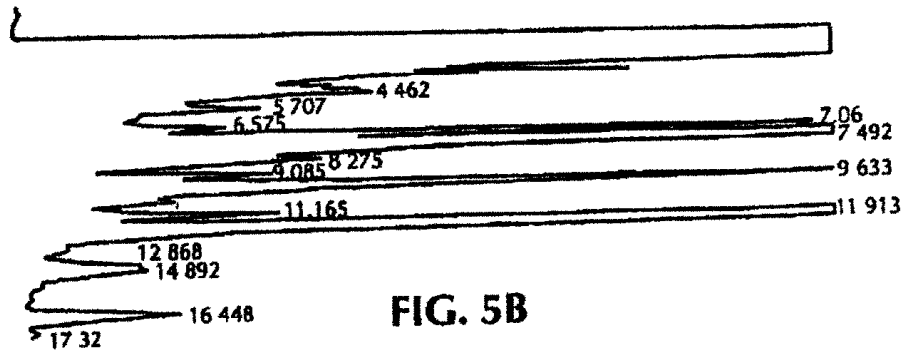
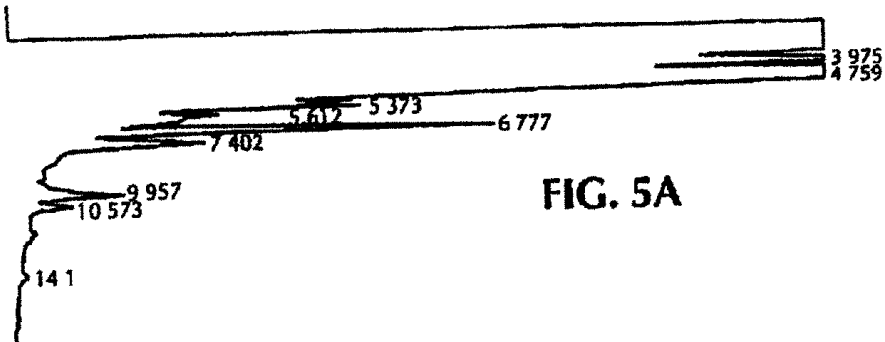


FIG. 4



PATRICIA REYES MORENO
INGENIERA DE SISTEMAS
C. Cartagena, 113
Tel: 51959 80 - MADRID

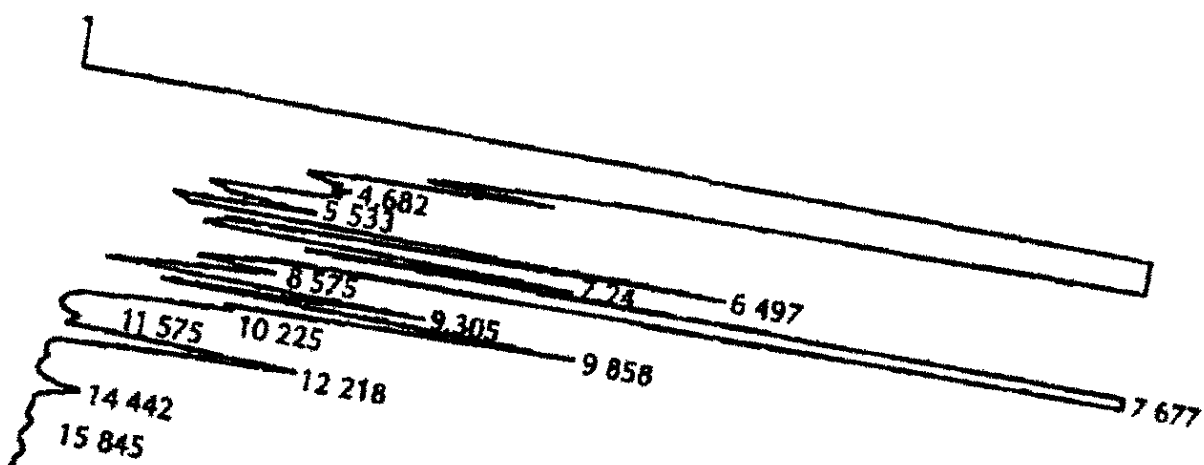


FIG. 5C

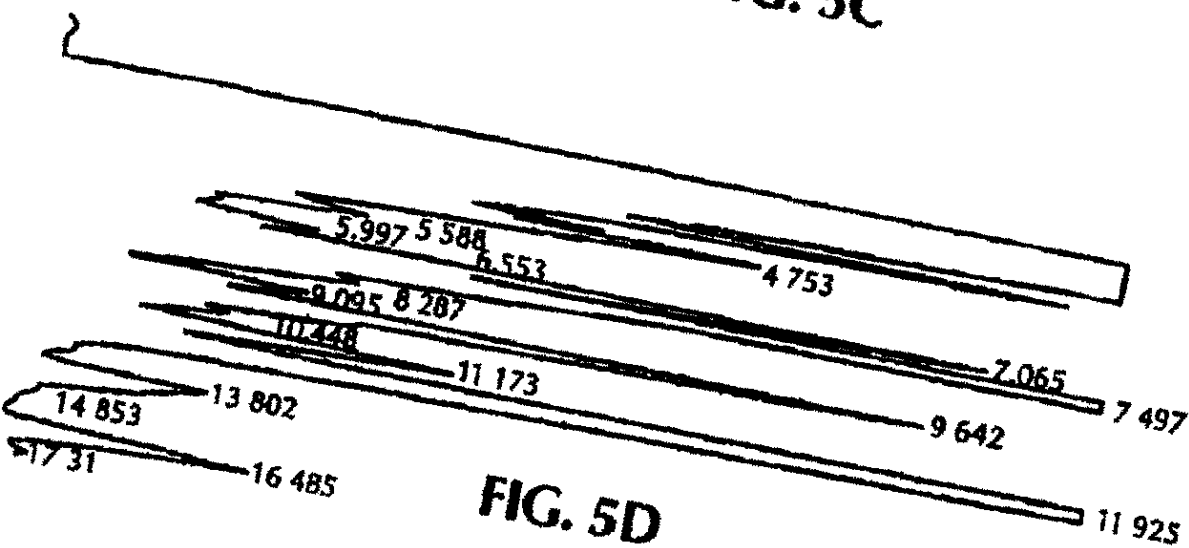


FIG. 5D

190

161

161

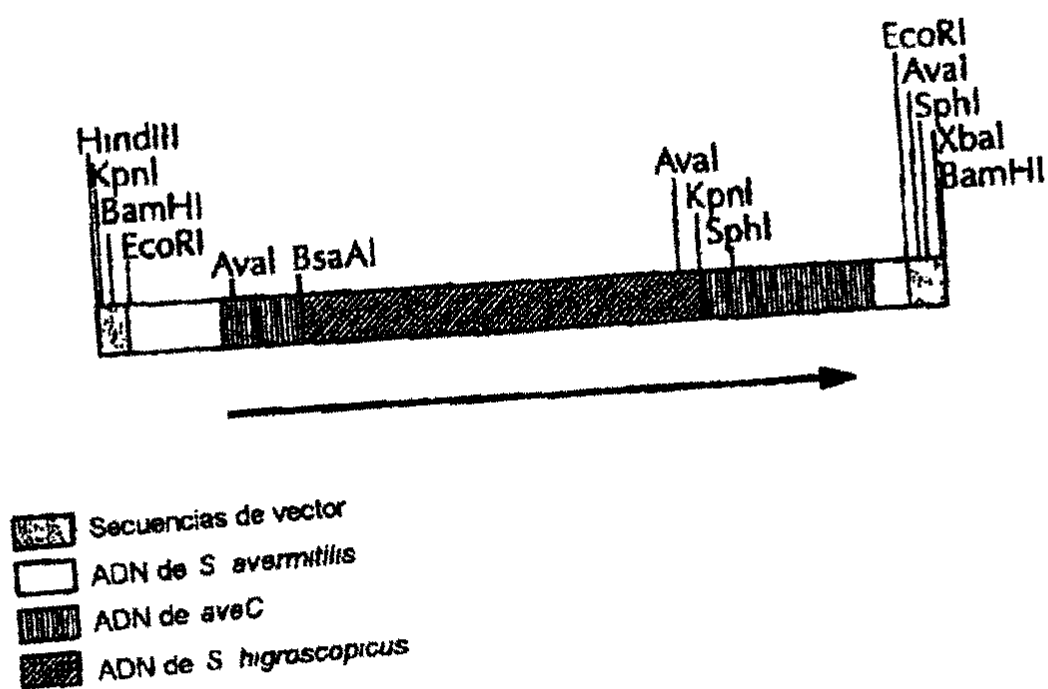


FIG. 7

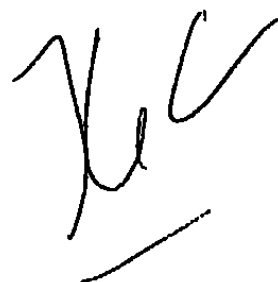
193

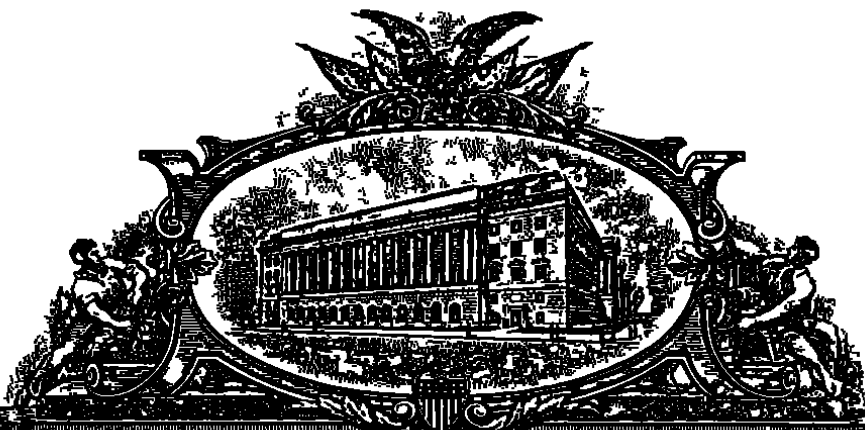
PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c/ Cartagena 113
Teléf 519.5996 - MADRID

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
INGLÉS Y ALEMÁN
c/ Cartagena 113
Teléf 519.5996 - MADRID





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 11, 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 09/372,934

FILING DATE August 12, 1999



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

T. Lawrence

**T. LAWRENCE
Certifying Officer**

195

A

7/2

PTO/SB/05 (2/99)

Approved for use through 08/30/2000 OMB 0651-0032

Patent and Trademark Office U S DEPARTMENT OF COMMERCE

Please type a plus sign (+) inside this box →



UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL

Attorney Docket No

PC10649

First Named Inventor or Application Identifier

Kim J Stutzman-Engwell

Title

Streptomyces avermectin gene directing the ratio of B2 B1
avermectins

Express Mail Label No.

EL162814127US

(Only for new nonprovisional applications under 37 C.F.R. §1.53(b))

APPLICATION ELEMENTS

See MPEP chapter 800 concerning utility patent application contents.

☒ *Fee Transmittal Form (e.g. PTO/SB/17)

(Submit an original, and a duplicate for fee processing)

☒ Specification [Total Pages 74]

(preferred arrangement set forth below)

Descriptive title of the invention

Cross References to Related Applications

Statement Regarding Fed sponsored R&D

Reference in Microfiche Appendix

Background of the invention

Brief Summary of the invention

Brief Description of the Drawings (if filed)

Detailed Description

Claim(s)

Abstract of the Disclosure

3 ☒ Drawing(s) (35 U.S.C. 113) [Total sheets 7]

4 ☐ Oath or Declaration [Total pages]

a. ☐ Newly executed (original or copy)

b. ☐ Copy from a prior application (37 CFR
§1.63(d))
(for continuation/divisional with Box 17 completed)
[Note Box 5 below]

L ☐ DELETION OF INVENTOR(S)

Signed statement attached deleting
inventor(s) named in the prior application
see 37 C.F.R. §§1.63(d)(2) and 1.33(b)

5 ☐ Incorporation By Reference (useable if Box 4b is checked)

The entire disclosure of the prior application from which a
copy of the oath or declaration is supplied under Box 4b is
considered to be part of the disclosure of the accompanying
application and is hereby incorporated by reference therein

ADDRESS TO

Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, DC 20231

6 ☐ Microfiche Computer Program (Appendix)

7 Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Submission
(if applicable all necessary)

a ☒ Computer Readable Copy

b ☒ Paper Copy (identical to computer copy) 13 pages

c. ☐ Statement verifying identity of above copies

ACCOMPANYING APPLICATION PARTS

8 ☐ Assignment Papers (cover sheet & document(s))

9 ☐ 37 C.F.R. §1.73(b) Statement ☐ Power of Attorney
(when there is an assignee)

10 ☐ English Translation Document (if applicable)

11 ☐ Information Disclosure ☐ Copies of IDS
Statement (IDS) PTO-1449 Citations

12 ☐ Preliminary Amendment

13 ☒ Return Receipt Postcard (MPEP 503)
(Should be specifically itemized)

14 ☐ *Small Entity ☐ Statement filed in prior application,
Statement(s) Status still proper and desired
(PTO/SB/09-12)

15 ☐ Certified Copy of Priority Document(s)
(if foreign priority is claimed)

14 ☒ Other Priority Claim

PCT/IB99/00130 filed 01/25/99

60/074 636 filed 02/13/98

*NOTE FOR ITEMS 1 & 14: IN ORDER TO BE ENTITLED TO PAY SMALL ENTITY
FEES, A SMALL ENTITY STATEMENT IS REQUIRED (37 C.F.R. § 1.37), EXCEPT
IF ONE FILED IN A PRIOR APPLICATION IS RELIED UPON (37 C.F.R. § 1.39).

17 If a CONTINUING APPLICATION check appropriate box and supply the requisite information below and in a preliminary amendment:

☐ Continuation

☐ Divisional

☒ Continuation-in-part (CIP)

of prior application No PCT/IB99/00130

Prior application information

Examiner

Group/Art Unit:

18 CORRESPONDENCE ADDRESS

☐ Customer Number or Bar Code Label

(Insert Customer No. or Attach bar code label here)

or ☒ Correspondence address below

Name Paul H Ginsburg

Address Pfizer Inc

Address 235 East 42nd Street, 20th Floor

City New York

State

New York

Zip Code

10017-5765

Country United States Of America

Telephone

(212)573-2369

Fax

(212)573-1939

NAME (Print/Type) Alan L. Koller

Registration No. (Attorney/Agent)

37,371

Signature

Alan L. Koller

Date

August 12, 1999

STREPTOMYCES AVERMITILIS GENE
DIRECTING THE RATIO OF B2 B1 AVERMECTINS

This application is a continuation in-part of PCT/IB99/00130 filed January 25 1999 which claims priority from U S provisional application 60/074 636 filed February 13 1998

5

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.

15

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-C23 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.

30

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.

35

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.

EXPRESS MAIL NO. EL162814127US

09372934-081299

Mutants of *S. avermitilis* that are deficient in branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (bkd 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.

- 5 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.
- 15
- 20
- 25

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
- 30

metabolites has been complementation of mutants. For example, portions of a DNA library 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.

09372934.001299

0937294-081745

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

09372934.081299

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
5 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
10 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 53892 in which the wild-type aveC
allele has been inactivated and that express the polynucleotide molecule comprising the
15 mutated nucleotide sequence produce a different ratio or amount of avermectins than are
produced by cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53892 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
20 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
25 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
30 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 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

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

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

209
2

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 *armE* 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 584 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 polynucleotide 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

206
207

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

5 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
10 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
15 inactivated results in the production of substantially the same rate 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
20 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
25 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
30 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

09372934, 09372934

207
\$

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 NaHPO₄, 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. 1 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 NaHPO₄, 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.

0937294-081209

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

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 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
- 30 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

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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

5 i.e. hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO₄, 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

10 stringent conditions i.e. hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO₄, 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*

15 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

20 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.

25 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

30 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

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
- 5 *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.
- 10 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
- 15 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.
- 20 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
- 25 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
- 30 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 209804) 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

6.2.1 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 209804) 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

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 *tpa*, 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

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
5 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 chimerc 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*
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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

00372934-081299

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
 5 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 *xyfE* and tyrosinase among others Nucleotide sequences encoding selectable markers are well
 10 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

5 2 2 Transformation Of Host Cells

The present invention further provides transformed host cells comprising a
 15 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
 20 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
 25 the DH5 α 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
 30 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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

063729-1062/EG0

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
5 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
10 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)
15 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

20 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
25 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
30 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

gene product can be determined using standard peptide sequencing techniques. The AveC gene product can be further characterized using hydrophobicity 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.

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.

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.

5 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
10 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.
15 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.

20 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
25 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
30 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.

5 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
10 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
15 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.

20 Any of the aforementioned methods for identifying mutations are 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 be used.

Once a mutated polynucleotide molecule that modulates avermectin production in a
25 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
30 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.

222
223

(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

09372934.00199
662T80-4E62/E60

223
F
27

- (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
- 5 (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
- 10 (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

- 15 (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
- 20 (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

25 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
- 30 (e) Q38P/L136P/E238D
- (f) F99S/S138T/A139T/G179S
- (g) A139T/M228T
- (h) G111V/P289L and
- (i) A139T/K154E/Q298H

09372934.081299
662180-4E624E60

5 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.

15 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.

25 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 *arnE* 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.

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 296 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

09372934.061259

09372934.081299

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

227

09372934-081299

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.

5 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
10 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
15 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
20 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, 88, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, or 298 of SEQ ID
25 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,
30 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

228
228

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.

- 5 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

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
5 *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
10 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
15 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 ectoparasitocides 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
20 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*
30 *Necator* *Ascaris* *Strongyloides* *Trichinella* *Capillaria* *Trichuris* *Enterobius* *Dirofilaria* and

09372934-081299

parasites that are found in the blood or other tissues or organs such as filarial worms and the extract intestinal states of *Strongylodes* 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
5 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
10 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

15 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
20 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
25 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
30 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 Arginine 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 (2500 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

09372934-08199
662180-4E62/E60

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
5 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

10 The HPLC retention times observed for the B2 and B1 avermectins, and the 2:1 ratios are shown in TABLE 1

TABLE 1

Substrate	HPLC Retention Time (min)		Ratio
	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	18.8	29.0	15.0

15 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

001799-4E624F60

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-8 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 dH₂O. 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 dH₂O, 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 dH₂O) 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 room temperature, 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).

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 room temperature 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 Luna-Bertani (LB) medium (Bacto-Tryptone - 10 g Bacto-yeast extract - 5 g and NaCl - 10 g in 1 liter dH₂O 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 MgCl₂ 6H₂O (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 K₂SO₄ - 0.25 g MgCl₂ 6H₂O - 2.02 g H₂O - 600 ml K₂PO₄ (0.5%) - 10 ml trace element solution - 20 ml CaCl₂ 2H₂O (3.68%) - 100 ml and MES buffer (1.0 M pH 6.5) - 10 ml (*Trace element solution contains per liter ZnCl₂ - 40 mg FeCl₃ 6H₂O - 200 mg CuCl₂ 2H₂O - 10 mg MnCl₂ 4H₂O - 10 mg Na₂B₄O₇ 10H₂O - 10 mg (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ 4H₂O - 10 mg) 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 1×10^9 protoplasts were distributed to 2.0 ml cryogenic vials (Nalgene)

- 5 A vial containing 1×10^9 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 μ g 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
- 10 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
- 15 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
- 20 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (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
- 25 thiostrepton resistant transformants 1 ml of overlay buffer containing 125 μ g 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.

30 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

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) - 180 g/L, Nutrisoy (Archer Daniels Midland Decatur IL) - 10 g/L, Ardamine pH - 10 g/L, K_2HPO_4 - 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.02 g/L, MnCl_2 - 0.002 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.002 g/L, CaCO_3 - 14 g/L, 2x bcfa (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 *Nde*I/*Eco*47III fragment from pEX26 (kindly supplied by Dr P. Leadley, Cambridge, UK). Approximately 5 ng of pEX26 were digested

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 *Nde*I/*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 *Nde*I/*Eco*47III fragment was labeled with [α -³²P]dCTP (deoxycytidine 5'-triphosphate tetra (triethylammonium) salt, [α -³²P]-) (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 μ l 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).

7.1.8 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 μ g) 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 *Sac*I/*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 μ g of the shuttle vector pWHM3 (Vara et al. 1988, J. Bacteriol. 171:5872-5881) was digested with *Sac*I and *Bam*HI. About 0.5 μ g of the 2.9 Kb insert and 0.5 μ g 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 μ l according to supplier's instructions. After incubation, 5 μ l of the ligation mixture was incubated at 70°C for 10 min, cooled to room temperature and used to transform competent *E. coli* DH5 α cells (BRL) according to manufacturer's instructions.

0372934-081299

240
未

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 room temperature 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

09372934-084299

244
249

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

242
2/12

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

5 A 2.9 Kb *SacI/BamHI* 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/BamHI* fragment, the ratio of B2/B1 avermectin decreased to about 3/7.1. Post-fermentation analysis of transformant
10 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/SphI* 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
15 (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

20

<i>S. avermitilis</i> 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

25 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

00372934-041290
062180-4362/550

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

5 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* DH5 α 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, ~1.5 Kb, ~7.2 Kb, ~1.7 Kb) were ligated together in a 4-way ligation. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5 α 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).

30 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

0937247. 051605

244
245
246

chromosomal integration of the inactivated *aveC* gene and loss of the free replicon. One *Erm^r* Thio^r 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* DH5 α 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^r* Thio^r 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 Gs 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

245

09372934.081295

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 *EcoRI* and *BamHI*. pSE119 was digested with *BamHI* and *SphI*; the digest was electrophoresed and a ~840 bp fragment was purified from the gel. pSE119 was digested with *EcoRI* and *XmnI*; 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* DH5 α 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 *BspE1*, three fragments of 388 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⁺ transformant was identified and designated as strain SE185-5a.

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⁺ Err^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).

287

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 Emr^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 Emr^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 *EcoRI* and cloned into pGEM3Zf (Promega) which had been digested with *EcoRI*. This plasmid which was designated as

09372934-081299

248

pSE186a was digested with *Apal* and *KpnI* 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'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCAGGCGGAAATGCCCCTGGCGACG-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 (Clontech 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 285 bp was digested with *Apal* and *KpnI* 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 *EcoRI* cloned into pWHM3 which had been digested with *EcoRI* 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 Err^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.

09372034.031294

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'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID NO 14) and the leftward PCR primer was 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-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 *Apal* and *KpnI* to release a 254 bp fragment which was resolved by electrophoresis and purified from the gel. pSE186a was digested with *Apal* and *KpnI*, 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* DH5 α 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 *EcoRI*, cloned into pWHM3 which had been digested with *EcoRI* and transformed into *E. coli* DH5 α 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-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGC TGCGCAGTTC-3 (SEQ ID NO 25) and the leftward PCR primer was 5
5 GGAACATCACGGCATTACAC-3 (SEQ ID NO 15) The PCR reaction was carried out using an Advantage GC genomic PCR kit (Clontech 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
10 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 *Apal* and *KpnI* 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
15 transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis This plasmid was designated as pSE238

pSE238 was digested with *EcoRI* cloned into pWHM3 which had been digested with *EcoRI* 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
20 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
25 resistance was determined and Thio^r Err^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
30 transformation of strain SE180-11 with pSE188 pSE199 or pSE231 as described above

09372934-081299

251
252

TABLE 3

<i>S. avermitilis</i> 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 0.4:1 (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).

09372934.061299

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 888 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 888 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

253
15
25

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).

10

TABLE 4

<i>S. avermitilis</i> 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.

254
255

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'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID NO 19) (D2F2). The leftward primers were 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID NO 20), 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-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 *aveC* expression. The results indicate that the GTG codon at position 42 can be eliminated without affecting *aveC* expression, since pSE194, pSE195, and pSE196, each of which lack the GTG site at

09372934-081269

255
254

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)

5

TABLE 5

<i>S. avermitilis</i> 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

10 EXAMPLE CLONING OF *aveC* HOMOLOGS FROM
S. HYGROSCOPICUS AND *S. GRISEOCHROMOGENES*

15

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 *KpnI* 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.

20

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 *PstI* 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

067180-1E62/E60

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. hygrosopicus* and *S. gneseochromogenes* 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 (pSE119)	9	239	50 3	357	4 7
1100-SC38 (pSE189)	16	546	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

5

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-CTTCAGGTGTACGTGTTTCG-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 *Hind*III 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 *Hind*III and *Bsa*AI, the fragments separated by electrophoresis in a 1% agarose gel and a ~0 2 Kb *Bsa*AI/*Hind*III fragment isolated from the gel The ~4 5 Kb *Hind*III/*Kpn*I fragment, the ~0 2 Kb *Bsa*AI/*Hind*III 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* DH5 α cells Plasmid DNA was isolated from

0672934-081299

ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis using *KpnI* and *AvaI*. This plasmid was digested with *HindIII* and *XbaI* to release the 1.2 Kb insert which was then ligated with pWHM3 which had been digested with *HindIII* and *XbaI*. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5 α cells, 5 plasmid DNA was isolated from ampicillin resistant transformants and the presence of the correct insert was confirmed by restriction analysis using *HindIII* and *AvaI*. 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 10 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).

15

TABLE 7

<i>S. avermitilis</i> 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

259
2/2

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

5

<u>Plasmid</u>	<u>Accession No</u>
plasmid pSE180	209605
plasmid pSE186	209604

10 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
15 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

09372434.081299

WHAT IS CLAIMED IS

- 1 An isolated polynucleotide molecule comprising the complete *aveC* ORF of *S avermitilis* which isolated polynucleotide molecule lacks the next complete ORF that is located downstream from the *aveC* ORF *in situ* in the *S avermitilis* chromosome
- 5 2 The isolated polynucleotide molecule of claim 1 comprising 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)
- 10 3 The isolated polynucleotide molecule of claim 2 further comprising nucleotide sequences that naturally flank the *aveC* gene *in situ* in *S avermitilis*
- 4 An isolated polynucleotide molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO 1 or a degenerate variant thereof
- 5 An isolated polynucleotide molecule comprising 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)
- 15 6 An isolated polynucleotide molecule consisting of a nucleotide sequence that is a substantial portion of (a) a polynucleotide molecule comprising 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 (b) a polynucleotide molecule comprising 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)
- 20 7 An isolated polynucleotide molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO 3 or a nucleotide sequence that is homologous to the nucleotide sequence of SEQ ID NO 3
- 25 8 An isolated polynucleotide molecule consisting of a nucleotide sequence that is a substantial portion of the nucleotide sequence of SEQ ID NO 3 or a nucleotide sequence that is homologous to the nucleotide sequence of SEQ ID NO 3
- 30 9 An oligonucleotide molecule that hybridizes under highly stringent conditions 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 that is the complement of the nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO 1) or SEQ ID NO 3

10 The oligonucleotide molecule of claim 9 which is complementary to the nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO 1) or SEQ ID NO 3 or to a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence that is the complement of the nucleotide sequence of FIGURE 1 (SEQ ID NO 1) or SEQ ID NO 3

5 11 A recombinant vector comprising a polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of

- 10 (a) 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)
- (b) a nucleotide sequence that is homologous to the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or that is homologous to the nucleotide sequence of the aveC ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO 1) and
- 15 (c) the nucleotide sequence of SEQ ID NO 3 or a nucleotide sequence that is homologous to the nucleotide sequence of SEQ ID NO 3

20 12 The vector of claim 11 further comprising a nucleotide sequence encoding one or more regulatory elements in operative association with the coding sequence of the vector of claim 11

13 The vector of claim 12 further comprising a nucleotide sequence encoding a selectable marker

14 The vector of claim 13 which is plasmid pSE186 (ATCC 209604)

15 A host cell comprising the vector of claim 11

25 16 The host cell of claim 15 which is *Streptomyces avermitilis* or *Streptomyces hygroscopicus*

30 17 An isolated *S. avermitilis* AveC gene product having an amino acid sequence encoded by the *S. avermitilis* AveC gene product-encoding nucleotide sequence of plasmid pSE186 (ATCC 209604) or encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO 1 or having the amino acid sequence of SEQ ID NO 2

18 An isolated *S. hygroscopicus* AveC-homolog gene product having the amino acid sequence of SEQ ID NO 4

19 A method for producing a recombinant AveC or AveC-homolog gene product, comprising culturing the host cell of claim 15 under conditions conducive to the production of

the recombinant AveC or AveC-homolog gene product, and recovering the AveC or AveC-homolog gene product from the cell culture

20 An isolated 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 the nucleotide sequence of the aveC ORF of *S. avermitilis* as presented in FIGURE 1 (SEQ ID NO 1) but which nucleotide sequence further comprises one or more mutations 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 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.

21 An isolated polynucleotide molecule comprising a nucleotide sequence that is otherwise the same as a degenerate variant of the *S. avermitilis* aveC allele or the 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) but which nucleotide sequence further comprises one or more mutations 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 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.

22 The polynucleotide molecule of claim 20 which modulates avermectin production 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 produce avermectins in a reduced class 2:1 ratio compared to cells of *S. avermitilis* strain ATCC 53692 that instead express only the wild type aveC allele.

23 The polynucleotide molecule of claim 20 wherein the mutation to the *S. avermitilis* aveC ORF encodes a substitution at one or more amino acid residues of the AveC gene product corresponding to amino acid positions in SEQ ID NO 2 selected from the group consisting of amino acid residues 55, 138, 139, 230, 266 and 275.

24 The polynucleotide molecule of claim 22 wherein the class 2:1 avermectins are cyclohexyl B2, cyclohexyl B1, avermectins.

25 The polynucleotide molecule of claim 24 wherein the reduced ratio of cyclohexyl B2, cyclohexyl B1 is a ratio selected from the group consisting of less than 1:6, 1: about 0.94:1, about 0.88:1, and about 0.84:1.

26 The polynucleotide molecule of claim 20 wherein the mutation to the *S. avermitilis* *aveC* ORF encodes one or more of the following amino acid substitutions at one or more positions corresponding to the following positions of the AveC gene product of SEQ ID NO 2

- 5 (a) at residue 139 from alanine to threonine
- (b) at residue 138 from serine to threonine
- (c) at residue 138 from serine to threonine and at residue 139 from alanine to threonine
- (d) at residue 55 from serine to phenylalanine
- 10 (e) at residue 230 from glycine to aspartate
- (f) at residue 268 from glycine to aspartate and at residue 275 from tyrosine to histidine

27 The polynucleotide molecule of claim 24 wherein the reduced ratio of cyclohexyl B2 cyclohexyl B1 is a ratio of about 0.75:1

15 28 The polynucleotide molecule of claim 20 wherein the mutation to the *S. avermitilis* *aveC* ORF encodes amino acid substitutions at residue 138 from serine to threonine and at residue 139 from alanine to phenylalanine corresponding to the amino acid positions of the AveC gene product of SEQ ID NO.2

20 29 The polynucleotide molecule of claim 20 comprising an *aveC* allele that has been inactivated by insertion into said nucleotide sequence of a heterologous nucleotide sequence

30 The polynucleotide molecule of claim 20 comprising an *aveC* allele that has been inactivated by deleting a 640 bp *PstI/SphI* fragment from the *aveC* ORF as shown in FIGURE 1 (SEQ ID NO 1)

25 31 The polynucleotide molecule of claim 20 comprising an *aveC* allele that has been inactivated by introducing a frameshift mutation therein

32 The polynucleotide molecule of claim 20 comprising an *aveC* allele that has been inactivated by introducing a termination codon into the ORF

30 33 The polynucleotide molecule of claim 20 comprising a strong promoter in operative association with the *S. avermitilis* *aveC* allele

34 The polynucleotide molecule of claim 33 wherein the strong promoter is the *ermE* promoter from *Saccharopolyspora erythraea*

35 A gene replacement vector comprising a polynucleotide molecule comprising one or more nucleotide sequences which flank the *aveC* ORF *in situ* in the *S. avermitilis* chromosome

36 A recombinant vector comprising the polynucleotide molecule of 20

5 37 The recombinant vector of claim 36 which vector is pSE180 (ATCC 209605)

38 A host *Streptomyces* cell comprising the recombinant vector of claim 37

39 A method for identifying mutations of the *aveC* ORF capable of altering the class 2:1 ratio of avermectins produced by cells of *S. avermitilis* 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 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

10
15
20

40 The method of claim 39 wherein the class 2:1 ratio of avermectins is reduced by the mutation

41 A method for identifying mutations of the *aveC* ORF or genetic constructs comprising the *aveC* ORF capable of altering the amount of avermectins produced by cells of *S. avermitilis* 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)

25
30

265
262

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

42 The method of claim 41 wherein the amount of avermectins produced is increased by the mutation

43 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

- (a) transforming cells of a strain of *S. avermitilis* with a polynucleotide molecule 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 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 only the wild-type *aveC* allele or
- (b) transforming cells of a strain of *S. avermitilis* with a polynucleotide molecule capable of introducing a mutation into the *aveC* allele of such cells wherein the mutated *aveC* allele 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 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

44 The method of claim 43 in which cells of the novel strain produce avermectins in a reduced class 2:1 ratio compared to cells of the same *S. avermitilis* strain that instead express only the wild-type *aveC* allele

45 The method of claim 43 wherein the class 2:1 avermectins are cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 avermectins

46 The method of claim 45 wherein the reduced ratio of cyclohexyl B2:cyclohexyl B1 is a ratio selected from the group consisting of less than 1:6, 1: about 0.94, 1: about 0.88, 1: and about 0.84, 1:

09372934, 081299

266
267

47 The method of claim 43 wherein the mutation to the *S. avermitilis* aveC ORF encodes an amino acid substitution at one or more positions corresponding to the following positions of the AveC gene product of SEQ ID NO 2 residue 139 residue 138 residue 55 residue 230 residue 266 or residue 275

5 48 The method of claim 43 wherein the mutation to the *S. avermitilis* aveC ORF encodes one or more of the following amino acid substitutions at one or more positions corresponding to the following positions of the AveC gene product of SEQ ID NO 2

- (a) at residue 139 from alanine to threonine
- (b) at residue 138 from serine to threonine
- 10 (c) at residue 138 from serine to threonine and at residue 139 from alanine to threonine
- (d) at residue 55 from serine to phenylalanine
- (e) at residue 230 from glycine to aspartate or
- 15 (f) at residue 266 from glycine to aspartate and at residue 275 from tyrosine to histidine

49 The method of claim 45 wherein the reduced ratio of cyclohexyl B2 cyclohexyl B1 is about 0.75:1

50 The method of claim 43 wherein the mutation to the *S. avermitilis* aveC ORF encodes amino acid substitutions at residue 138 from serine to threonine and at residue 139 from alanine to phenylalanine corresponding to the amino acid positions of the AveC gene product of SEQ ID NO 2

51 A strain of *Streptomyces avermitilis* comprising cells which comprise a mutated aveC allele which cells produce a different ratio or amount of avermectins than that produced by cells of the same *S. avermitilis* strain which only comprise the wild-type aveC allele

25 52 The strain of claim 51 the cells of which produce a reduced class 2:1 ratio of avermectins compared to cells of the same strain that instead comprise only the wild-type aveC allele

53 The strain of claim 51 wherein the mutated aveC allele encodes a substitution at one or more amino acid residues of the AveC gene product corresponding to amino acid positions in SEQ ID NO 2 selected from the group consisting of amino acid residues 55 138 139 230 266 and 275

54 The strain of claim 52 wherein the class 2:1 avermectins are cyclohexyl B2 cyclohexyl B1 avermectins.

09372934.081299

267
268

55 The strain of claim 54 wherein the reduced ratio of cyclohexyl B2 cyclohexyl B1 is a ratio selected from the group consisting of less than 1 6 1 about 0 94 1 about 0 88 1 and about 0 84 1

56 The strain of claim 51 wherein the mutation to the *S avermitilis* aveC ORF encodes one or more of the following amino acid substitutions at one or more positions corresponding to the following positions of the AveC gene product of SEQ ID NO 2

- (a) at residue 139 from alanine to threonine
- (b) at residue 138 from serine to threonine
- (c) at residue 138 from serine to threonine and at residue 139 from alanine to threonine
- (d) at residue 55 from serine to phenylalanine
- (e) at residue 230 from glycine to aspartate or
- (f) at residue 266 from glycine to aspartate and at residue 275 from tyrosine to histidine

57 The strain of claim 54 wherein the reduced ratio of cyclohexyl B2 cyclohexyl B1 is about 0 75 1

58 The strain of claim 51 wherein the mutation to the *S avermitilis* aveC ORF encodes amino acid substitutions at residue 138 from serine to threonine and at residue 139 from alanine to phenylalanine corresponding to the amino acid positions of the AveC gene product of SEQ ID NO 2

59 The strain of claim 51 the cells of which comprise an aveC allele that has been inactivated by insertion into said nucleotide sequence of a heterologous nucleotide sequence

60 The strain of claim 51 the cells of which comprise an aveC allele that has been inactivated by deleting a 640 bp *Pst*I/*Sph*I fragment from the aveC ORF of FIGURE 1 (SEQ ID NO 1)

61 The strain of claim 51 the cells of which comprise an aveC allele that has been inactivated by introducing therein a frameshift mutation

62 The strain of claim 51 the cells of which comprise an aveC allele that has been inactivated by introducing a termination codon within the ORF

63 The strain of claim 51 the cells of which comprise a strong promoter in operative association with the *S avermitilis* aveC ORF

64 The strain of claim 63 wherein the strong promoter is the *ermE* promoter from *Saccharopolyspora erythraea*

09372934.081299

65 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
5 *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

66 The process of claim 65 wherein the class 2:1 ratio is reduced by the mutation

67 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
10 *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 a wild-type *aveC* allele in culture media under conditions
15 that permit or induce the production of avermectins therefrom, and recovering said avermectins from the culture

68 The process of claim 67 wherein the amount of avermectins produced is increased by expression of the mutated *aveC* allele or genetic construct.

69 A composition of avermectins produced by cells of a strain of *S. avermitilis*, which
20 cells express a mutated *aveC* allele that encodes a gene product that reduces the class 2:1 ratio of avermectins produced by the cells compared to cells of the same strain which do not express the mutated *aveC* allele but instead express only the wild-type *aveC* allele wherein the avermectins are produced in such a reduced class 2:1 ratio

269
272

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 *aveC* gene has been inactivated or mutated so as to change the ratio or amount of class 2.1 avermectins produced.

09372934.081299

270
167
277

SEQUENCE LISTING

<110> Stutzman-Engwall Kim J
McArthur Hamish
Katoh, Yoshihiro

<120> STREPTOMYCES AVERMITILIS GENE DIRECTING THE RATIO OF
B2 B1 AVERMECTINS

<130> PC10649

<140> PC10649

<141> 1999-08-12

<150> 60/074,636

<151> 1998-02-13

<150> PCT/IB99/00130

<151> 1999-01-25

<160> 25

<170> PatentIn Ver 2 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

tgggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcaccgc 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgctgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176
Val
1

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

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

09372934-081229

271
272

09372934.081499

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 tgc gcc tcc gtc tgc atg tgc 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			

272
643

210 215 220 225

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

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

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

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

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

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

ctttgtgcat ggggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

acactcctcg gttcagcgat catg 1229

<210> 2
<211> 303
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2
Val Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

09372934-081299

273
472

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> DNA

09372934-081299

274
6/16

<213> Streptomyces hygroscopicus

<220>

<221> CDS

<222> (58) (990)

<400> 3

gtcgaacgaag 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

275
278

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 tcc 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 tcc ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc 969
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
290 295 300

cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccggc accaccacg taccgatgt 1020
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
305 310

gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgct 1080

catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggtcctt gggctccacg accatacggg 1140

gcggccgggg 1150

09372934.081249

1276
HK

<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

09372934.081299

277
278

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

09372934.081299

278
H2

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

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

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

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

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

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

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

<400> 6
tcacgaaacc ggacacac 18

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

<400> 7
catgatcgct gaaccgag 18

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

<400> 8
ggttccggat gccgttctcg 20

<210> 9

662180-HE624E60

279
R

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

<400> 9
aactccggtc gactcccctt c 21

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

<400> 10
gcaaggatac ggggactac 19

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

<400> 11
gaaccgaccg cctgatac 18

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

<400> 12
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gcccctggcg acg 43

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13
ggaaccgacc gcctgatata 20

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

09372934.081299

09372934.081299
662180-42624560

<400> 14
gggggCGggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc 46

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

<400> 15
ggaacatcac ggcattcacc 20

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

<400> 16
aaccatccg agccgctc 18

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

<400> 17
tcggcctgcc aacgaac 17

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

<400> 18
ccaacgaacg tgtagtag 18

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 19
tgcaggcgta cgtgttcagc 20

281
272

<210> 20
<211> 17
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 20
catgatcgct gaaccga 17

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 21
catgatcgct gaaccgagga 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 22
aggagtgtgg tgcgtctgga 20

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 23
cttcaggtgt acgtgttcg 19

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

<400> 24
gaactggtac cagtgcc 18

<210> 25

09372934-08199
662180-4862/EE60

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

<400> 25
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc 46

09372934.081299

284
582

FIG. 2

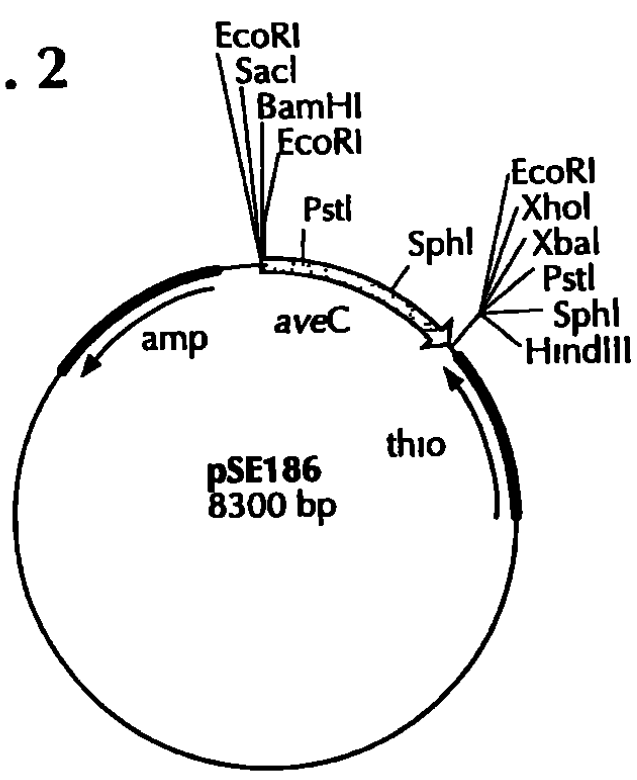
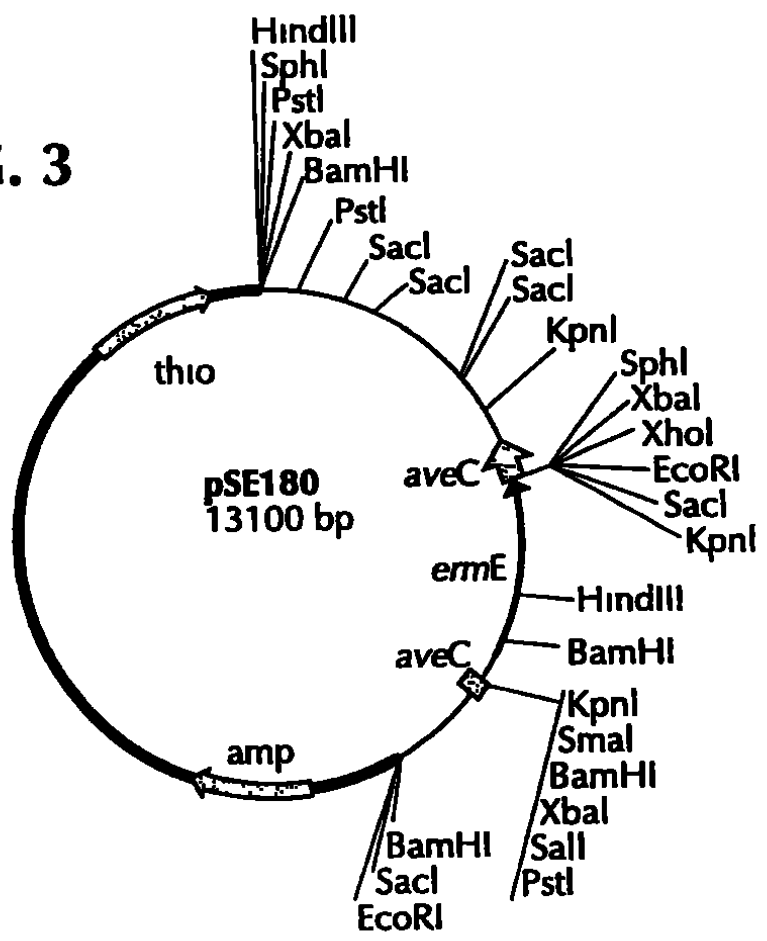


FIG. 3



09372934.081299

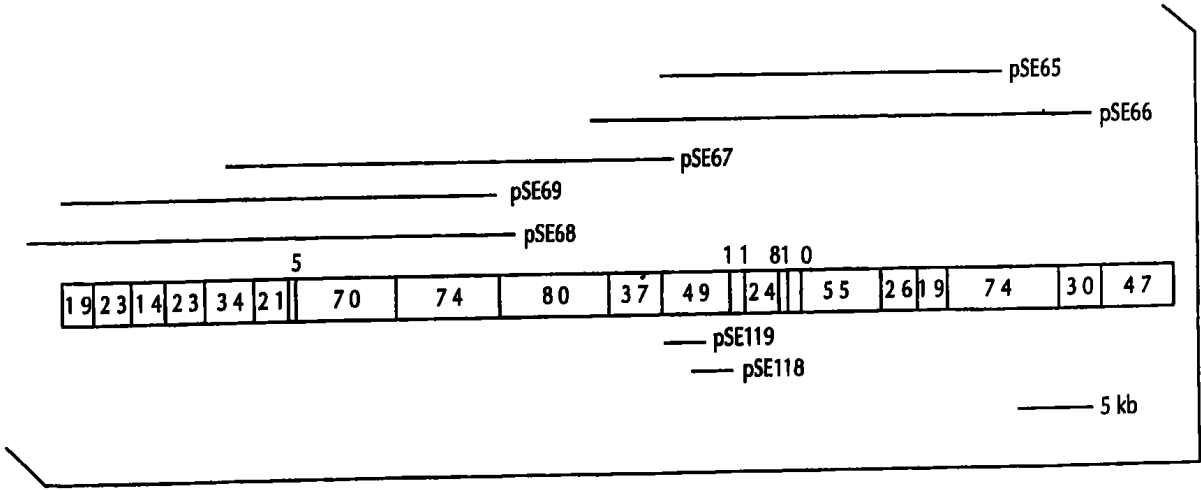
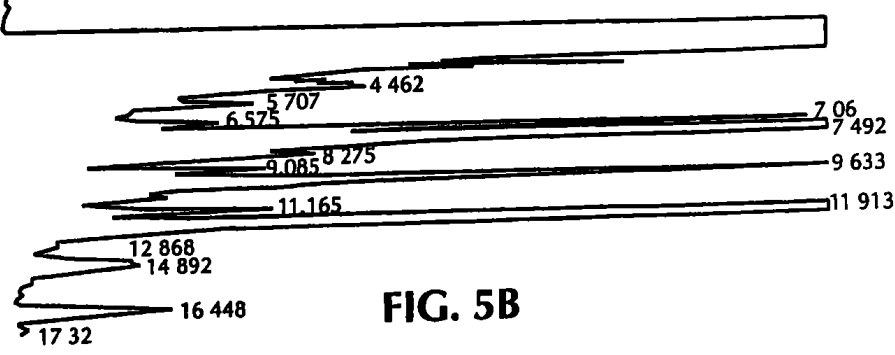
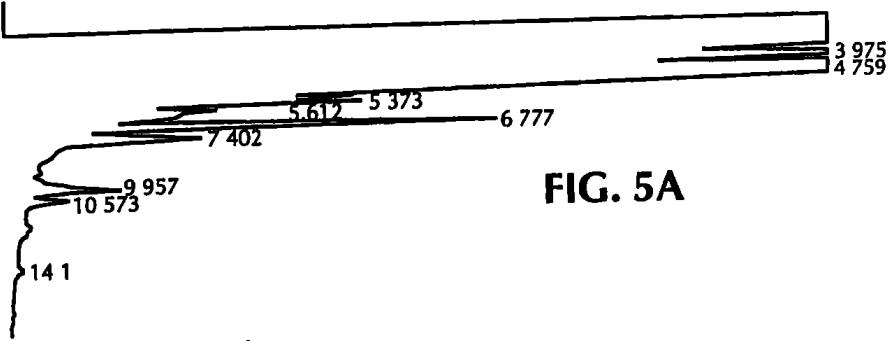


FIG. 4

286 582



286
287 982

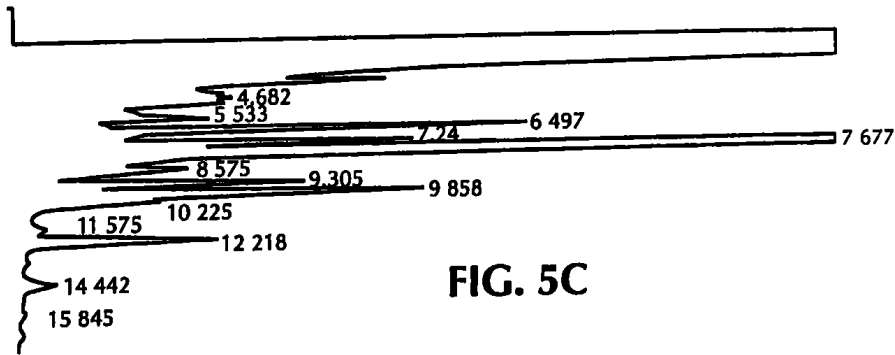


FIG. 5C

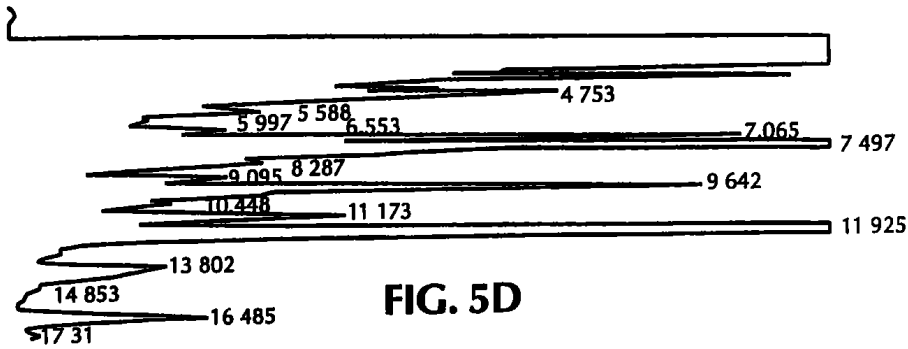


FIG. 5D

287

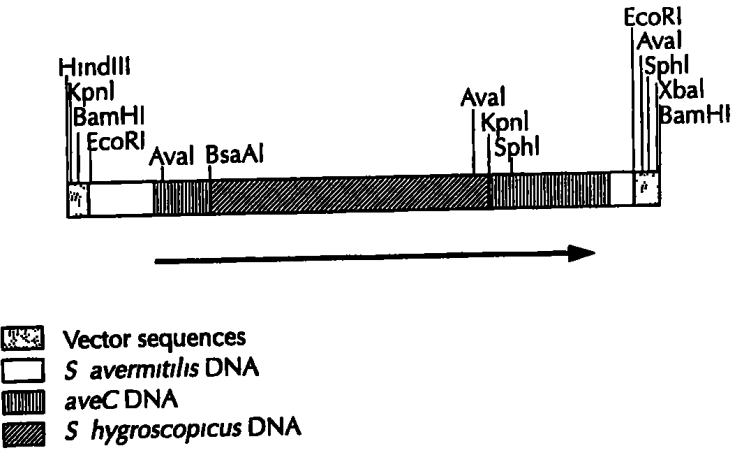


FIG. 7

279 289

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

1 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y
5 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
10 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
15 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 INVENCION

20 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
25 una potente actividad antihelmíntica e insecticida. Los

291
662

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 hidroxilo, 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 hidroxilo 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-metilbutírico

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

precusores 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-metiltransferasa 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.

5 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*

10 *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

15 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

20 B2/B1 de avermectinas, simplificaría la producción y purificación de las avermectinas importantes desde el punto de vista comercial.

3 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una molécula

25 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
5 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
10 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.

15 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
20 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
25 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

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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

5 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

10 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*

15 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

20 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

25 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

- 5 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
- 10 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
- 15 *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
- 20 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
- 25 de avermectinas producidas por las células de *S.*

avermittilis de la etapa (b), de tal forma que si la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S avermittilis* de la etapa (a) es diferente de la cantidad de avermectinas producidas por las células de *S avermittilis* 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.

10 La presente invención proporciona además vectores recombinantes que son útiles para fabricar nuevas cepas de *S avermittilis* que tienen alterada la producción de avermectinas. Por ejemplo, la presente invención proporciona vectores que pueden usarse para dirigir
15 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 avermittilis*, para insertar o reemplazar el alelo de *aveC*, la ORF o una porción de la misma mediante
20 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
25 inserta en el cromosoma de *S avermittilis* 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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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
5 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
10 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
15 *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
20 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
25 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 un 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
5 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*
10 *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
15 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

20 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
25 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

311
37

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 Ceba SE180-11 de *S avermitilis* con una ORF de aveC inactivada FIG 5B Ceba SE180-11 de *S avermitilis* transformada con pSE186 (ATCC 209604) FIG 5C Ceba SE180-11 de *S avermitilis* transformada con pSE187 FIG 5D Ceba 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 BsaAI/KpnI de 564 pb del gen homólogo de aveC de *S hygroscopicus* insertado en el sitio BsaAI/KpnI en la ORF de aveC de *S avermitilis*

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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
5 seleccionar los productos génicos AveC mutados con respecto a su efecto sobre la producción de avermectinas, y al descubrimiento de que ciertos productos génicos AveC mutados pueden reducir la relación de avermectinas B2 B1 producidas por *S. avermitilis*. A modo de ejemplo, la invención se
10 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
15 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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 de *aveC* nativo, produce sustancialmente la misma relación

314
✱

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*

5 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
10 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
15 la misma

Como se usa en este documento, los términos "molécula polinucleotídica", "secuenciapolinucleotídica", "secuencia codificante", "fase de lectura abierta" y "ORF", pretenden hacer referencia tanto a las moléculas de ADN como a las
20 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
25 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, 5 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 10 en la Sección 9 mostrada más adelante, se construyeron delecciones 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 15 delección del primer sitio GTG en el pb 42 no eliminó la actividad de AveC. Una delección 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 20 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 25 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 NaHPO₄ 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),

317
/K

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
5 anteriormente En una realización preferida, la molécula polinucleotídica homóloga híbrida 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
10 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 NaHPO₄ 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
15 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
20 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*
25 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

5 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
10 *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
15 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
20 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
25 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 aminoácidos 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. hygrosopicus* (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. hygrosopicus* 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. hygrosopicus* que expresa en su lugar sólo el alelo homólogo a aveC funcional, de tipo silvestre, nativo en la cepa FERM BP-1901 de *S. hygrosopicus*. En una realización no limitante, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención que codifica el producto génico homólogo a AveC de *S. hygrosopicus* 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 NaHPO₄ 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 híbrida 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

324
226

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
5 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

10 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
15 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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 *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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 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

20 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
25 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*
5 *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*
10 *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,
15 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
20 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

25 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*,
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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

5 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

10 *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,

15 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

20 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

25 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 y 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-poli-histidina 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 epítipo diana de un anticuerpo monoclonal, en el vector de expresión, en asociación operativa con los elementos reguladores, y situarse de forma que el epítipo expresado se fusione con el polipéptido AveC. Por ejemplo, puede insertarse por técnicas convencionales una secuencia de nucleótidos que

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

El vector de expresión que codifica la proteína de
10 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
15 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
20 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
25 que proceden del factor α , inmunoglobulinas, proteínas de

la membrana externa, penicilinasas 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, tiosstrepton 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.

10 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
15 de *E. coli*, tal como, por ejemplo, la cepa DH5 α , 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
20 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.
25 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 son bien conocidos en la técnica, incluyendo (1)

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 inductores innecesarios (por ejemplo, análogos de

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

5 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
10 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

15 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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 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

20 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
25 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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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
5 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,
10 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
15 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
20 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
25 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

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
5 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
10 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.
15 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
20 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
25 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 5 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, 10 179, 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

- 15 (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 20 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 25 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,
- 5 (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
10 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
15 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,
- 20 (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
25 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
5 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
10 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,
15 (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,
20 (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
25 2 1 de acuerdo con la presente invención se seleccionan

355
257

entre una o más del grupo compuesto por

- (a) S138T/A139T,
- (b) S138T/A139F,
- (c) D48E/A89T,
- 5 (d) S138T/A139T/G179S,
- (e) Q38P/L136P/E238D,
- (f) F99S/S138T/A139T/G179S,
- (g) A139T/M228T,
- (h) G111/P289L, y
- 10 (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,

15 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

20 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

25 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
5 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

10 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.*
15 *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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 *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
20 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
25 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 deleccionar la ORF de *aveC* de *S avermitilis*

10 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

15 *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

20 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

25 *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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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*,
5 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
10 *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
15 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*
20 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
25 preferida, se aumenta la cantidad de avermectinas

362
76

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 inactiva 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 específica 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
5 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
10 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
15 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
20 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*

25 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
5 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
10 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
15 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
20 avermectinas producidas por las células de una cepa de *S*
avermilis 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
25 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

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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*,
5 *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*.

10 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,
15 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
20 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
25 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

5 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
10 compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención puede administrarse 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
15 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
20 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
25 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
5 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
10 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,
15 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
20 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,
25 de acuerdo con la práctica agrícola convencional

375
377

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

Las cepas que carecen de las actividades de 2-oxo
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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

5

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

	Sustrato	Tiempo de Retención de HPLC (min)		Relación
		B2	B1	B2 B1
5	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
10	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
15	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 adelante 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
5 *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
10 - 15 g El volumen final se ajustó a 1 litro con H₂O
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
15 Broth - 30 g, en 1 litro de H₂O 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

20 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
25 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 H₂O 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
5 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
10 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 ml) de micelio en tubos de
15 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
20 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
25 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*

5 Se inoculó una colonia de *E. coli* transformada individual en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) (Bacto-Tryptona - 10 g, Extracto de Bacto levadura - 5 g, y NaCl - 10 g en 1 litro de H₂O destilada, pH 7,0, esterilizado en autoclave a 121°C durante 25 minutos y suplementado con 100
10 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
15 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
20 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
25 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 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 M
(esterilizado por separado en un autoclave a 121°C durante
5 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
10 minutos El sobrenadante se desechó y los micelios se
resuspendieron en tampón P, que contiene sacarosa - 205 g,
 K_2SO_4 - 0,25 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 2,02 g, H_2O - 600 ml, K_2PO_4
(0,5%) - 10 ml, solución de oligoelementos* - 20 ml, CaCl_2
 $2\text{H}_2\text{O}$ (3,68%) - 100 ml, y tampón MES (1,0 M, pH 6,5) - 10
15 ml (* La solución de oligoelementos contiene por litro
 ZnCl_2 - 40 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 200 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 10 mg,
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 10 mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ - 10 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{14}$
 $4\text{H}_2\text{O}$ - 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
20 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
25 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 1×10^9 protoplastos en viales criogénicos de 2,0 ml (Nalgene).

10 Un vial que contenía 1×10^9 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 μ g de ADN transformante a los protoplastos, seguido inmediatamente por la adición de
15 0,5 ml de tampón T de trabajo. La base de tampón T contiene PEG-1000 (Sigma) - 25 g, sacarosa - 2,5 g, H₂O - 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,
20 hecho el mismo día del uso, era base de tampón T - 8,3 ml, K₂PO₄ (4 mM) - 1,0 ml, CaCl₂ 2H₂O (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
25 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 tiosstrepton, se extendió uniformemente 1 ml de tampón de recubrimiento que contenía 125 μg x ml de tiosstrepton 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 tiosstrepton (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

20 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
25 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-(+/-)-
5 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
10 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, $\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 2 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -
15 0,02 g/l, MnCl_2 - 0,002 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 g/l, CaCO_3 - 14 g/l, 2x bcfa (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
20 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
25 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
5 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
10 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
15 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/Eco47III* de 2,7 kb
20 procedente de pEX26 (suministrado amablemente por el Dr P Leadlay, Cambridge, Reino Unido) Se digirieron aproximadamente 5 ng de pEX26 usando *NdeI* y *Eco47III* La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa GTG SeaPlaque al 0,8% (FMC BioProducts, Rockland, ME) El
25 fragmento *NdeI/Eco47III* 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 *NdeI/Eco47III* de 2,7 kb se marcó con [α -³²P]dCTP (desoxicitidina 5'-trifosfato, sal de tetra(trietilamonio), [alfa-³²P]-) (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 μ l 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 *Saccharomyces 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)

5 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
10 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
15 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
20 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
25 enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para

transformar células DH5 α 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
5 *SacI/BamHI* 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
10 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
15 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 tiosstrepton de la cepa 1100-
20 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)

25 Habiendo establecido que pSE119 era capaz de modular

394
396

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 *SphI* y *BamHI*. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa SeaPlaque GTG al 0,8% (FMC BioProducts), se escindió un fragmento *SphI/BamHI* 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 *SphI* y *BamHI*. 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 DH5 α de *E. coli* competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y se
5 confirmó la presencia del inserto *SphI/BamHI* 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 tiosstrepton 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
15 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***

20 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
25 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
5 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
10 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
15 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 como pCR-Blunt linealizado (Invitrogen) en una
20 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
25 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
5 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
10 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

15 TABLA 2

	Cepa de <i>S. avermitilis</i> (plásmido transformante)	No de Transformantes Ensayados	Relación Media de B2 B1
	1100-SC38 (ninguno)	9	30,66
	1100-SC38 (pWHM3)	21	31,3
20	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
5 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,
10 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*

15 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
SphI/PstI de 640 pb interno al gen aveC en pSE119 (plásmido
20 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
25 restricción, con *BglII* y *EcoRI*, 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 DH5 α 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 DH5 α 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 tiosstrepton y eritromicina pSE180 se aisló
 5 de *S. lividans* y se usó para transformar protoplastos de *S. avermitilis*. Se identificaron cuatro transformantes de *S. avermitilis* resistentes a tiosstrepton y los protoplastos se prepararon y cultivaron en placas en condiciones no selectivas en medio RM14. Después de regenerar los
 10 protoplastos, se seleccionaron colonias individuales con respecto a la presencia de resistencia a eritromicina y la ausencia de resistencia a tiosstrepton, indicando la integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y la pérdida del replicón libre. Se identificó un transformante
 15 *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
 20 sonda *ermE*. Estos análisis demostraron que la integración cromosómica del gen de resistencia *ermE* y la delección 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-
 25 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 *PstI/SphI* de 640 pb en el gen *aveC*. Se construyó un plásmido de reemplazo génico como se indica a continuación: se digirió parcialmente pSE180 con *XbaI* 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 DH5 α 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 tiosstrepton 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 tiosstrepton, indicando integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y pérdida del replicón libre que contenía el gen

ermE Se identificó un transformante *Erm^r Thio^r* 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 *BspE1*. La presencia del sitio *BspE1*, 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 *SphI* 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 *EcoRI* y *BamHI*. pSE119 se digirió con *BamHI* y *SphI*, el

producto de digestión se sometió a electroforesis y se purificó un fragmento de ~ 840 pb del gel pSE119 se digirió con *EcoRI* y *XmnI*, 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 DH5 α 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 tiosstrepton 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 tiosstrepton. Se aisló el ADN cromosómico a partir de las colonias sensibles a tiosstrepton 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 *BspE1*, 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 Th10^a 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

407
1407

protoplastos de la cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiosstrepton 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
5 (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 tiosstrepton de la cepa SE180-11, se determinó
10 la presencia de resistencia a eritromicina y se analizaron
los transformantes $\text{Thio}^r \text{Erm}^r$ 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
15 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)
20 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)
25 Una cepa de *S. avermitilis* que tiene esta mutación (G230D)

409
77

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 tiosstrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes $\text{Thio}^r \text{Erm}^r$ 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
5 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 *EcoRI* y se clonó en pGEM3Zf (Promega) que se había digerido con *EcoRI*. Este plásmido, que se denominó pSE186a, se
10 digirió con *ApaI* y *KpnI*, 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
15 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'-
GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCTGGCGACG-3' (SEC ID NO
20 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 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) en tampón proporcionado por el fabricante en presencia de dNTP 200
25 μ M, 200 pmol de cada cebador, 50 ng de ADN molde, GC-Melt

411
#3

1,0 M y una unidad de Klen Taq Polymerase Mix en un volumen final de 50 μ l. 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 DH5 α 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 pSE199, se usó para transformar protoplastos de la

cepa SE180-11 de *S. avermitilis*. Se aislaron los transformantes resistentes a tiosstrepton 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'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEC ID NO 14), y el cebador de PCR hacia la izquierda fue 5'-GGAACATCACGGCATTCAACC-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
digerió con *ApaI* y *KpnI* para liberar un fragmento de 254 pb
que se resolvió por electroforesis y se purificó del gel
pSE186a se digirió con *ApaI* y *KpnI*, los fragmentos de ADN
5 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*
10 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 *EcoRI*, se clonó en pWHM3 que se
15 había digerido con *EcoRI* 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
20 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
25 cepa SE180-11 de *S avermitilis* Se aislaron los

transformantes resistentes a tiosstrepton 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 PCR hacia la derecha fue 5' -

GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3' (SEC ID NO 25), y el cebador de PCR hacia la izquierda fue 5'-GGAACATCACGGCATTTCACC-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 μ M, 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 μ l 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 DH5 α 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 DH5 α 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 tiosstrepton 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.

417
7

TABLA 3

	Cepa de <i>S. avermitilis</i> (plásmido transformante)	No de transformantes ensayados	Conc Relativa de B2	Conc Relativa de B1	Relación media B2 B1
5	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
10	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
15 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
20 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
25 para transformar protoplastos de la cepa SE180-11 de *S*

avermittilis SE aislaron los transformantes resistentes a tiosstrepton 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 0,4 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)

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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)

5 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
10 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
15 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
20 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
25 cambia el aminoácido en la posición AA 298 de Q a H La

422
424

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

TABLA 4

5	Cepa de <i>S. avermitilis</i> (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
10	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
15	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

423
5/14

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) (D1F2), 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEC ID NO 18) (D1F3), y 5'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-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'-AGGAGTGTGGTTCGTCTGGA-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 tiosstrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia

425
174

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 <i>S. avermitilis</i> (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 (pMHM3)	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
5 hibridó una biblioteca de cósmidos de ADN genómico de *S. hygrosopicus* (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
10 un fragmento *KpnI* 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
15 homóloga a *aveC* de *S. hygrosopicus*.

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 cosmidicos que hibridaban
20 fuertemente. Se aisló el ADN cromosómico de estos cósmidos y se identificó un fragmento *PstI* 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
25 FIGURA 6 se presenta una secuencia de aminoácidos parcial

427
427

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*
10 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 *KpnI/BamHI* en el sitio *KpnI/BamHI* de pWHM3 (véase Ward y col , 1986, Mol Gen Genet 203 468-478) pSE186 se digirió con *BamHI* e *HindIII*, 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 *BamHI* e *HindIII*. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5 α 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 tiosstrepton 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 tiosstrepton 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).

429
127

TABLA 6

	Cepa de <i>S. avermitilis</i> (plásmido transformante)	No. de Transformantes Ensayados	[B2] Relativa	[B1] Relativa	Avermectinas totales Relativas	Relación Media de B2 B1
5	1100-SC38	6	155	4.8	176	33.9
	1100 SC38 (pSE119)	9	239	50.3	357	4.7
10	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
15	tipo silvestre (pSE189)	5	545	345	1.071	1.58

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

20 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
25 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'-CTTCAGGTGTACGTGTTTCG-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 DH5 α 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

431
277

había digerido con *Hind*III y *Xba*I La mezcla de ligación se usó para transformar células DH5 α de *E coli* competentes, el ADN plasmídico se aisló de los transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto
5 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
10 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 tiosstrepton de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de eritromicina y
15 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
20 7)

TABLA 7

5

Cepa de <i>S. avermitilis</i> (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
10 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

<u>Plásmido</u>	<u>No. de Acceso</u>
plásmido pSE180	209605
15 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
20 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
25 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

5 1 Una molécula polinucleotídica que comprende una
secuencia de nucleótidos que por lo demás es igual a una
variante degenerada del alelo de *aveC* de *S. avermitilis*, la
secuencia codificante del producto génico AveC del plásmido
pSE186 (ATCC 209604) o la secuencia de nucleótidos de la
10 ORF de *aveC* de *S. avermitilis* presentada en la FIGURA 1
(SEC ID NO 1), pero comprendiendo además la secuencia de
nucleótidos una o más mutaciones tales 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
15 molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de
nucleótidos mutada, producen una relación de avermectinas
de clases 2:1 que es reducida en comparación con la
relación de avermectinas de clases 2:1 producidas por
células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su
20 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 1,
en la que una o más mutaciones en la secuencia de
nucleótidos codifican una sustitución en uno o más restos
de aminoácidos del producto génico AveC que corresponden a
5 las posiciones de aminoácido en la SEC ID NO 2
seleccionadas entre los restos de aminoácidos 138 y 139
- 4 Un vector recombinante que comprende la molécula
polinucleotídica de la reivindicación 1
- 10 5 Una célula huésped de *Streptomyces* que comprende la
molécula polinucleotídica de la reivindicación 1 o el
vector recombinante de la reivindicación 4
- 15 6 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
20 aveC de *S. avermitilis* presentada en la FIGURA 1 (SEC ID
NO 1), o una variante degenerada de la misma, pero
comprendiendo además dicha secuencia de nucleótidos al
menos una primera mutación que codifica una sustitución de
aminoácido de serina a treonina en el resto de aminoácido
25 del producto génico AveC que corresponde a la posición de

aminoácido 138 en la SEC ID NO 2, y una segunda mutación que codifica una sustitución de aminoácido de alanina a fenilalanina en el resto aminoácido del producto génico AveC que corresponde a la posición de aminoácido 139 en la
5 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
10 que es reducida en comparación con la relación de avermectinas de clases 2 1 producidas por células de la cepa ATCC 53692 de *S. avermitilis* que en su lugar expresan sólo el alelo de aveC de tipo silvestre

15 7 La molécula polinucleotídica de la reivindicación 6, en la que las avermectinas de clase 2 1 son ciclohexil B2 ciclohexil B1 avermectinas

8 La molécula polinucleotídica de la reivindicación 7,
20 en la que la relación reducida de ciclohexil B2 ciclohexil B1 es de aproximadamente 0,75 1 o menor

9 Un vector recombinante capaz de mutar el alelo de aveC de *Streptomyces avermitilis* mediante la introducción de al
25 menos una mutación seleccionada entre una primera mutación

437
2/6/7

que codifica una sustitución de aminoácido de serina a treonina en un resto de aminoácido del producto génico AveC que corresponde a la posición de aminoácido 138 en la SEC ID NO 2 y una segunda mutación que codifica una sustitución de aminoácido de alanina a fenilalanina en un resto de aminoácido del producto génico AveC que corresponde a la posición de aminoácido 139 en la SEC ID NO 2, que comprende una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica tal mutación

10

10 El vector recombinante de la reivindicación 9, que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 6

15 11 Una célula huésped de *Streptomyces* que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 6 o el vector recombinante de la reivindicación 10

12 Un procedimiento para obtener una nueva cepa de *S avermitilis* que comprende células que expresan un alelo de aveC mutado y que produce una relación reducida de avermectinas de clases 2 1 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, que comprende

25 (a) transformar células de una cepa de *S*

avermittilis con una molécula polinucleotídica que lleva un alelo de *aveC* mutado, o una variante degenerada del mismo, que codifica un producto génico que tiene al menos una primera sustitución de aminoácido de serina a treonina en un resto de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 138 en la SEC ID NO 2 y una segunda mutación que codifica una sustitución de aminoácido de alanina a fenilalanina en un resto de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 139 en la SEC ID NO 2, ocasionando la expresión del producto génico resultante una reducción de la relación de avermectinas de clases 2 1 producidas por las células de una cepa de *S. avermittilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado o la variante degenerada del mismo 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 reducida de clases 2 1 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, o

(b) transformar células de una cepa de *S avermitilis* con una o más moléculas polinucleotídicas capaces de introducir una o más mutaciones en el alelo de *aveC* de forma que

5 tales células transformadas codifican un producto génico *AveC* que tiene al menos una primera sustitución de aminoácido de serina a treonina en un resto de aminoácido que

10 corresponde a la posición de aminoácido 138 en la SEC ID NO 2 y una segunda mutación que codifica una sustitución de aminoácido de alanina a fenilalanina en un resto aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 139

15 en la SEC ID NO 2, ocasionando la expresión del producto génico una reducción de la relación de avermectinas de clases 2 1 producidas por células de una cepa de *S avermitilis* que expresan el alelo de *aveC* mutado en comparación con células de la misma cepa que en su lugar

20 expresan sólo el alelo de *aveC* de tipo silvestre, y seleccionar las células transformadas que producen avermectinas en una relación reducida de clases 2 1 en comparación con la relación de clases 2 1 producida por

25 células de la cepa que en su lugar expresan sólo

el alelo de aveC de tipo silvestre

13 El procedimiento de la reivindicación 12, en el que
las avermectinas de clases 2 1 son ciclohexil B2
5 ciclohexil B1 avermectinas

14 El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la
relación reducida de ciclohexil B2 ciclohexil B1 es de
aproximadamente 0,75 1 o menor
10

15 Una célula de *Streptomyces avermitilis* que comprende
un alelo de aveC mutado que comprende una primera mutación
que codifica una sustitución de aminoácido de serina a
treonina en el resto de aminoácido correspondiente a la
15 posición de aminoácido 138 en la SEC ID NO 2 y una segunda
mutación que codifica una sustitución de aminoácido de
alanina a fenilalanina en un resto de aminoácido que
corresponde a la posición de aminoácido 139 en la SEC ID
NO 2

20

16 La célula de la reivindicación 15, que produce una
relación reducida de avermectinas de clases 2 1 en
comparación con una célula de la misma cepa de *Streptomyces*
avermitilis que en su lugar comprende sólo el alelo de aveC
25 de tipo silvestre

17 La célula de la reivindicación 16, en la que las avermectinas de clases 2 1 son ciclohexil B2 ciclohexil B1 avermectinas

5 18 La célula de la reivindicación 17, en la que la relación reducida de ciclohexil B2 ciclohexil B1 es de aproximadamente 0,75 1 o menor

19 Un procedimiento para producir avermectinas, que
10 comprende cultivar células de la reivindicación 15 en medio de cultivo en condiciones que permiten o inducen la producción de avermectinas en dicho medio y recuperar dichas avermectinas del cultivo

15 20 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 0,75 1 o menor en el medio en el que se han cultivado las células

20

21 Una composición de ciclohexil B2 ciclohexil B1 avermectinas producida por células de una cepa de *Streptomyces avermitilis* que expresan un alelo de aveC mutado que codifica un producto génico que ocasiona la
25 reducción de la relación de clases 2 1 de ciclohexil

B2 ciclohexil B1 avermectinas producidas por las células en comparación con 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, 5 comprendiendo la composición las ciclohexil B2 ciclohexil B1 avermectinas en una relación de aproximadamente 0,75 1 o menor en el medio en el que se han cultivado las células

443
S
H
A

RESUMEN

La presente invención se refiere a moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico AveC, moléculas
5 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
10 gen aveC se ha inactivado o mutado para cambiar la relación o cantidad de avermectinas de clases 2 1 producidas

444
7776

1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PFIZER PRODUCTS INC
<120> GEN DE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE LA
5 RELACIÓN DE AVERMECTINAS B2 B1
<130> PC10649A
<140> PC10649
<141> 1999-08-12
<150> 60/074,636
10 <151> 1998-02-13
<150> PCT/IB99/00130
<151> 1999-01-25
<160> 25
<170> PatentIn Ver 2 1
15 <210> 1
<211> 1229
<212> ADN
<213> Streptomyces avermitilis
<220>
20 <221> CDS
<222> (174) (1085)
<400> 1

25

445
4/11/11

	tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaacca tccgagccgc	60
	tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcaccgc	120
	aggccggcct gaacaggtca ggagrgctgc cccgtgaact gctgctgttg ccg gtg	176
		Val
		1
5	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 gcc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg	320
10	Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val	
	35 40 45	

446
8/17/77

3

	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	
5	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	
10	ggc tcc tgg ggt ccg tat gtg ccc gcc tgg cag ggg gcg gcc ctc 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 tgc gcc tcc gtc tgc atg tgc 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 ctg 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	
15	cgc cgg ccg gca tgg cgg acc tgg ccg ctg gtc ctg gcc gtc ttc ttc	704
	Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe Phe	
	165 170 175	
	atc gcc 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 gcc	800
	Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser Gly	
	195 200 205	
20	gag tgg tac cag ttc ccc gtg tat cag gcg gtc ggt tcc gcc 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 gcc tgc ctg cgc ttc ttc cgc gac gaa cgc gat gag	896
	Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp Glu	
	230 235 240	

25

447
6114

4

```

    tct 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

5    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

    qttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

10    ctttctgcat gqgtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

    acactcctcg gttcagcgat catg                                     1225
```

```

    <210>      2
    <211>     303
15  <212>     PRT
    <213>     Streptomyces avermitilis
    <400>      2
```

20

25

5

	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	Cly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gly	Ser	Lys	Asp	Thr	Gly	Thr	Thr	Asp
			35					40					45			
5	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			
10	Gly	Ala	Glu	Ala	Glu	Met	Pro	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Val	Lys	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
15	Phe	Ile	Gly	Leu	Val	Leu	Gly	Leu	Ser	Glu	Pro	Leu	Pro	Ser	Ala	Ser
			180						185					190		
	Cly	Ile	Ser	Val	Trp	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Glu	Val	Thr	Leu	Trp	Ser
			195				200						205			
	Cly	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		
20	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

25 <211> 1150

<212> ADN

449
X
157

<213> Streptomyces hygroscopicus
<220>
<221> CDS
<222> (58) (990)
5 <400> 3

qtcgacqaaq accgqccgga ggccgctcggc cgggcccata ccgtacgcgg cctgcgg 57

gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgt gtc ggc gcg c'g 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
10 20 25 30

tac cgc atc gag aag gca 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 ytg gtg gga gcg gtg 249

450
25

	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	
5	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	aac	393
	Ser	Pro	Leu	Met	Asn	Trp	Ile	Asn	Pro	Val	Leu	Ala	Ser	Asn	Val	Asn	
					100			105						110			
	gtg	ttc	gga	jcg	gtg	gcc	tcg	tgg	ggg	ccg	tac	gtg	ccc	ggg	agg	cag	441
	Val	Phe	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Trp	Gly	Pro	Tyr	Val	Pro	Gly	Trp	Gln	
10			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
	Leu	Phe	Met	Thr	Ala	Met	Met	Ala	Ala	Val	Ala	Cys	Gly	Lys	Gly	Met	
	145					150					155					160	
15	gct	ctt	gcc	gac	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		
	gcc	ctc	ggc	ttt	ctg	ctc	gtc	gtg	ctc	ctc	gac	atc	gcc	gag	ctg	ctg	633
	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Glu	Pro	Leu	
				180					185					190			
	atc	ttc	ttc	gcg	ggc	gtc	ttc	gtg	tgg	acc	cgg	gta	gtg	ccc	gag	ctg	681
	Val	Ser	Phe	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Trp	Thr	Arg	Ala	Val	Pro	Glu	Leu	
20				195				200					205				
	acc	atc	tgg	agt	ggg	cac	tgg	tac	cag	ttc	ccg	ctg	tac	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	ggc	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		
25	aac	cgg	cgc	ggc	gaa	acg	tgt	ctg	gag	tcc	ggg	gcg	gcc	ctc	cta	ccg	825

451
JF

```

Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
      245                      250                      255

gag gac 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 qcc 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 ccg ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc 969
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
      290                      295                      300

cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccggc accaccacg taccacatgt 1020
Arg Pro Ala Ala Glv Tyr
305                      310

gcgcgatgtg cc-gatgcgc ctgatgtacc cggcgtgtca tcggctcacc tgtggcgcc 1080

-atgcgggtga g-gctccgc tcgtccct gt tccggctccct gggctccacg accatacgga 1140

gcggccgggg                      1150
```

- <210> 4
- 15 <211> 310
- <212> PRT
- <213> Streptomyces hygroscopicus
- <400> 4

20

25

9

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
 5 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 Glu
 115 120 125
 10
 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
 15 180 185 190
 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
 20 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 Phe Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
 290 295 300
 Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
 305 310
 25
 <210> 5

453
5

10

<211> 215
<212> PRT
<213> Streptomyces griseochromogenes
<400> 5

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
10 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

15

20

25

454
75

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

5 Va 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

10 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

15 Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

- <210> 6
- <211> 18
- <212> ADN
- 20 <213> Streptomyces avermitilis
- <400> 6

tcacgaattc ggacacac 18

- <210> 7
- <211> 18
- 25 <212> ADN
- <213> Streptomyces avermitilis

455
457

	<400>	7	
		catgatcgct gaaccgag	18
	<210>	8	
	<211>	20	
5	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	8	
		ggtrrrgggt gccgttctcg	2
	<210>	9	
10	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	9	
		aactccgggt. gaetccccct c	21
15	<210>	10	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	10	
20		graaggatac ggggactac	19
	<210>	11	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
25	<400>	11	
		gaaccgaccg cctgatac	18

456
457

13

	<210>	12	
	<211>	43	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
5	<400>	12	
		gggggcgggc cggggtgagg aggcggaaat gccctggcg acg	43
	<210>	13	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
10	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	13	
		qgaaccgacc gcctgataca	20
	<210>	14	
	<211>	46	
15	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	14	
		gggggcgggc cggggtgagg aggcggaaat gccgctggcg acgacc	46
	<210>	15	
20	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	15	
		qgaacatcac ggcattcacc	20
25	<210>	16	
	<211>	18	

457
654

	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	16	
		aaacccatccg agtcgctc	18
5	<210>	17	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	17	
10		tcggcctgcc aacgaac	17
	<210>	18	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	
15	<400>	18	
		ccaacgaacg tgragtag	18
	<210>	19	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
20	<213>	Streptomyces avermitilis	
	<400>	19	
		tgcaggcgta cgtgttcagc	20
	<210>	20	
	<211>	17	
25	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces avermitilis	

15

	<400>	20		
			catgacgcgt gaaccga	17
	<210>	21		
	<211>	20		
5	<212>	ADN		
	<213>	Streptomyces avermitilis		
	<400>	21		
			catgacgcgt gaaccgagga	21
	<210>	22		
10	<211>	20		
	<212>	ADN		
	<213>	Streptomyces avermitilis		
	<400>	22		
			aagagtgctgg tgcctctgga	20
15	<210>	23		
	<211>	19		
	<212>	ADN		
	<213>	Streptomyces avermitilis		
	<400>	23		
20			cttcagggtgt acgtgttcg	19
	<210>	24		
	<211>	18		
	<212>	ADN		
	<213>	Streptomyces avermitilis		
25	<400>	24		
			gaactggrac cagtgcgc	14

	<210>	25
	<211>	46
	<212>	ADN
	<213>	Streptomyces avermitilis
5	<400>	25

qqqggcgggc ccgggigcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc 46

FIG. 2

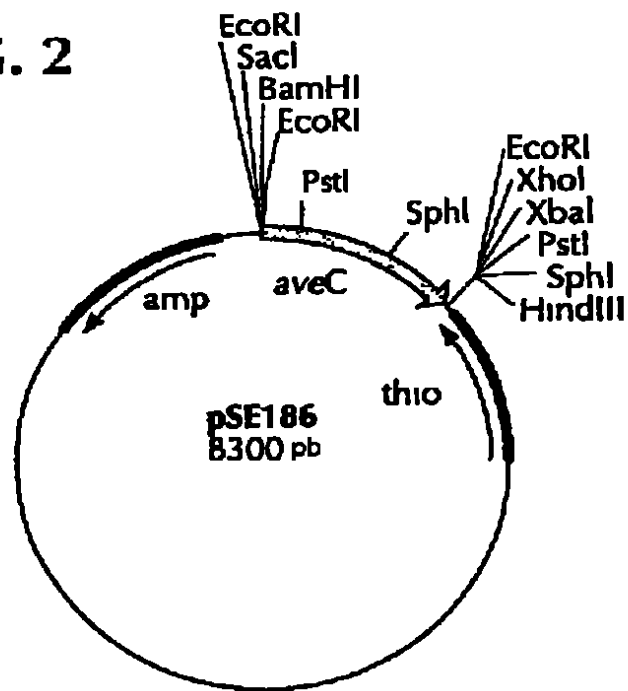
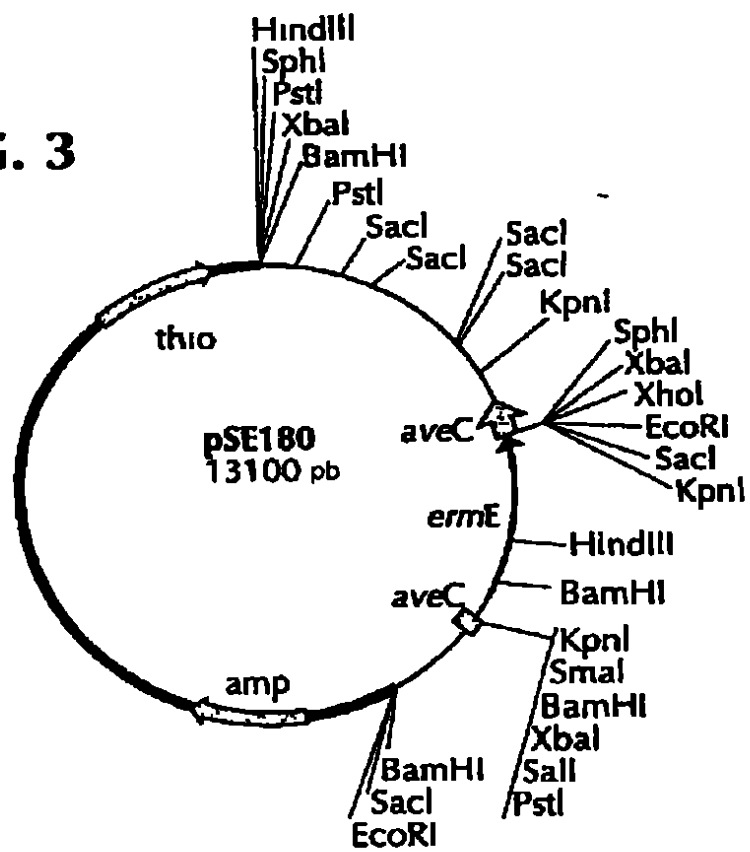


FIG. 3



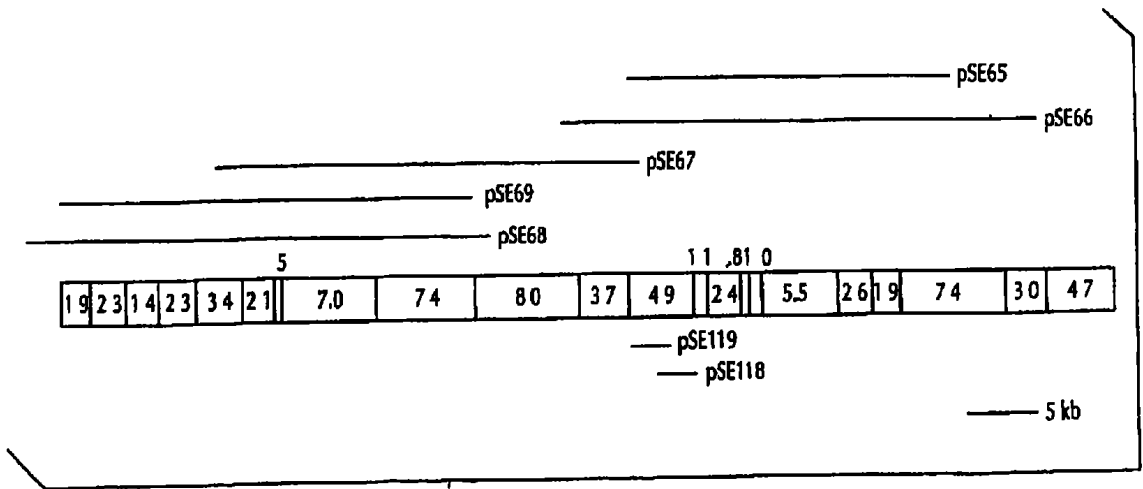
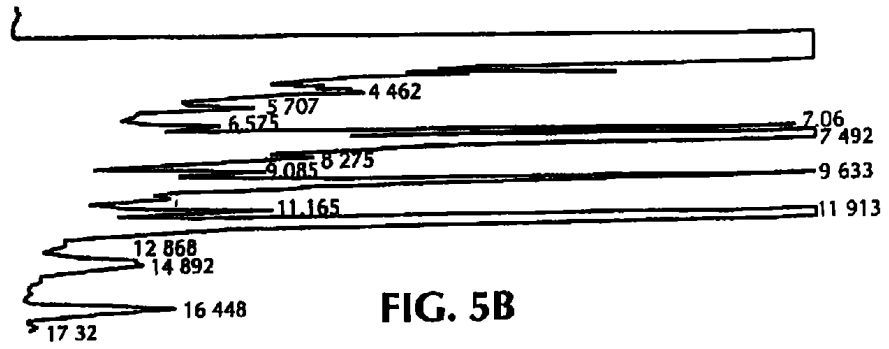
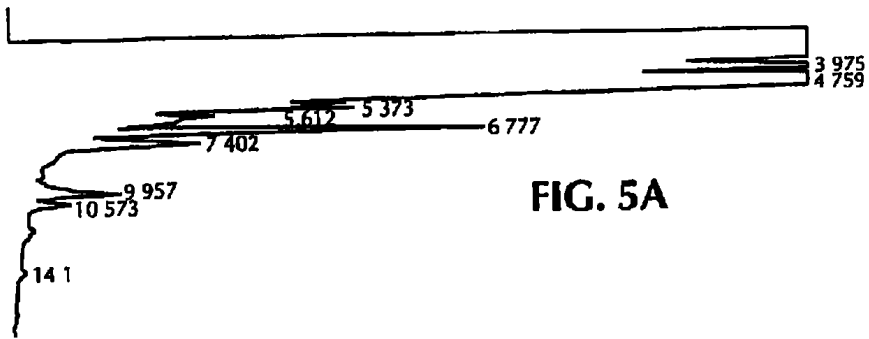


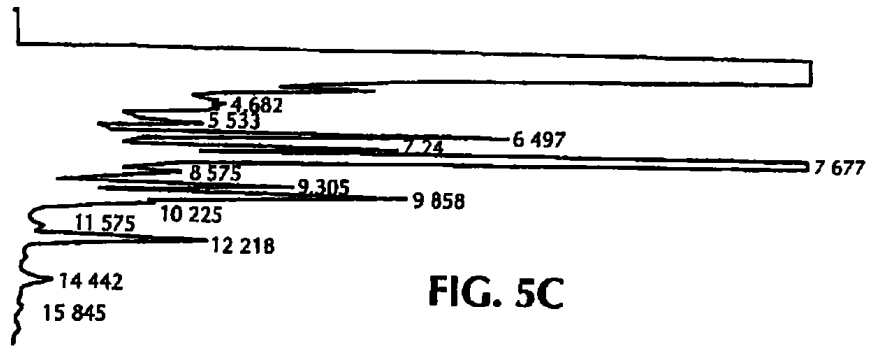
FIG. 4

462
7/7

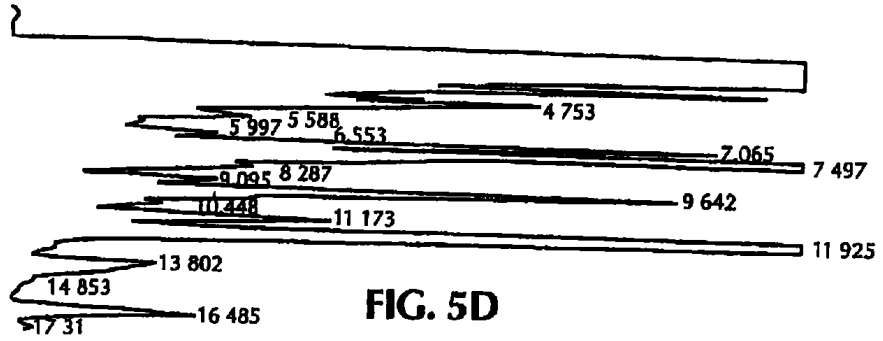


4/7

463
465



5/7



464
476

465
467

FIG. 6

```
S ave
S gr1
S hyg
Cons
1
S ave VVNAGVGLL FLALQAYVFS RNAADGGYRL IETAGQGQGG SKDTGTTDVV 50
S gr1 VIGHAALGAV FLVLQVYVFA RNTADGGYHL ADVSGPDGRE PGHHRIDVL
S hyg VTLWACVUAL VLGLQVYVFA AMLADSGYR TEKASPARGG GDSERIADV L
Cons V--WA-vGal FL-LQvYVfa rN-ADgGYrl ie-agp--gg ----r--DVl

51
S ave YFVISVVCIT AAAANLFRRC RVERRLFDA LLPLQLLFAS WQSPLNNWFH 100
S gr1 LPALSMAGVV GLAPMLVHRM RAERRLSPDA LLPTGVLFAG WLSPLNNWFH
S hyg IPLLSVVGAV VLAVCLYRRC RARRRLTFDA SLFIGLLSAS WQSPLNNWFH
Cons -P-lSvvg-v -lA-wL-RRC RarRRL-FDA lLF-GlLFas WqSPLNNWfh

101
S ave SVLVSNASVM GAVGSHGPIV PGWQAGPGA BAEMPLASAS VCHSALIVTV 150
S gr1 PVLNANTHVH GAVGSHGPIV PGWRGLPPGK EAEPLVTPS LGSTVLLGVL
S hyg PVLASNWNVF GAVASGPIV PGWQAGAHQ EAEPLATLS ICMTAMMAAV
Cons pVL-sN--Vw GAVgSHGPIV PGWqGagpg- EAEPLat-S -cmtal---v

151
S ave LCKALGWIK ARBPARTWR LVLAVFFIGI VLGLSEPLPS ASGISVWARA 200
S gr1 GCCQVMSKVR ERNPGVRPWQ LVGLAFLTAV AFDLSEPFIS FAGVSVWARA
S hyg ACGKGMGLAA ARWPRLGFLR LLALGFLLVV LLDIAEPLVS FAGVSVWTRA
Cons -C-k-mg--- aRwP--rpxz Lv-l-F1--v -ldlsePl-S faGvSVWara

201
S ave LPEVTIWSGE WYQFFVYQAV GSGLVCCMLG SLRFFRDERD ESWVERGAWR 250
S gr1 LPTVTLWRGA WYRAR-----
S hyg VPELTIWSGE WYQFFLYQMV ASALPGASLG AARHPRNRRG ETCLESGAAL
Cons lPevTlWbG- WYqfp-yq-v -s-l----lg --r-fr--r e---e-ga--

251
S ave LPQRAANMAR FLAVVGGVMA VMFLYT C PHILLSLVGG QPPDQLPDSF 300
S gr1 -----
S hyg LPESPRPWVR LLAVVGGANI SLALYTGANG AHILFSLMDG APPDRLPDFF
Cons lp-----w-r -lavvgg-a ---lyt--- -hll-sl--g -ppd-lp--f

301
S ave QAFAAY*
S gr1 -----
S hyg RPAAGY*
Cons ---a-y
```

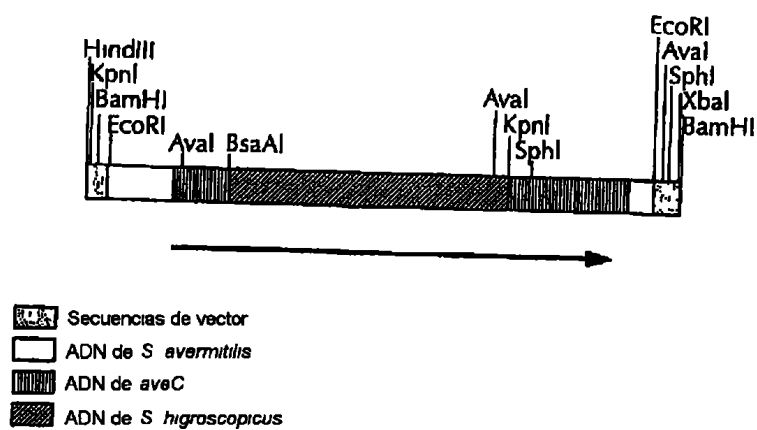


FIG. 7

468 996

47
467



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación 00050050 00000000
Fecha (AMD) 2008-08-04 17:07:49
Tramite 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia 2626 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Comercio
INDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- Nombre e identificación del Solicitante 1 ☐
- Nombre e identificación del Inventor 1 ☐
- Título o nombre de la Invención 1 ☐
- Descripción 38 ☐
- Reivindicaciones 436 ☐
- Resumen 471 ☐
- Comprobante de Pago 3 ☐

COMPLETA ☐

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 ☐

ASD
Firma Responsable

Fecha _____

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 00-58850

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 ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art 14-a)

SI ☒ 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 ☒ 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 ☒ NO ☐ EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris

SI ☒ 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 ☒ 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 SIC)

SI ☐ NO ☒ 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 conceptua que esta solicitud

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente

Santafé de Bogotá, D C , 8 de Agosto del 2000

EXAMINADOR JURIDICO
202022

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
PRIMER EXAMEN DE FORMA.**

Radicación No 00-58850

Concepto Técnico No 1739

Clasificación Internacional de Patentes C12N 15/31

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art 21 de la Decision 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art 8, Art 13-a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Art 13-a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art 13-e)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art 13-b)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art 13-c)
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art 14-c junto con el literal d) del Art 4 del (Dto 117 del 94)
- SI ☒ 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 ☒ 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 ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94
- SI ☒ 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 ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P 104) en forma correcta (Art 14-c junto con el literal b) del Art 4 del Dto 117 del 94)
- SI ☒ 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 ☒ 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

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-58850

AUTO 2703

DISPONE

ARTICULO PRIMERO Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele 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, advirtiéndolo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D C , a los 07 NOV 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D C , 08 NOV 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO 27-12-00

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ☐ NO ☐

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

202022

Se deslacen los
folios 476 a 488
Por lo que corresponde al
Ex p 00-52850