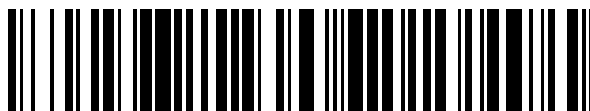


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 629**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/76 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09150098 .3**

96 Fecha de presentación: **31.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **2050815**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **GEN DE STREPTOMYCES AVEMITILIS QUE DIRIGE LA PROPORCIÓN DE AVERMECTINAS B2:B1.**

30 Prioridad:
12.02.2002 US 356222 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.02.2012

73 Titular/es:
**PFIZER PRODUCTS INC.
EASTERN POINT ROAD
GROTON, CT 06340, US**

72 Inventor/es:
**Stutzman-Engwall, Kim, Jonelle;
Gustafsson, Claes, Eric, Daniel;
Krebber, Anke;
Raillard, Sun, Ai;
Minshull, Jeremy, Stephen;
Kim, Seran y
Chen, Yan**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 373 629 T3

DESCRIPCIÓN

Gen de *Streptomyces avermitilis* que dirige la proporción de avermectinas B2:B1

1. Campo de la invención

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

2. Antecedentes de la invención

2.1. Avermectinas

Las especies de *Streptomyces* producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios, incluyendo las avermectinas, que comprenden una serie de ocho lactonas macrocíclicas de dieciséis miembros relacionadas que tienen potente actividad antihelmíntica e insecticida. Los ocho compuestos diferentes pero estrechamente 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 designaciones "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 avermectina, tal como doramectina, se reconoce que tiene la actividad antiparasitaria y pesticida más eficaz y, por lo tanto, es la avermectina más deseable comercialmente.

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

Una combinación tanto de mejora de cepa por mutagénesis aleatoria como del 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 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (mutantes deficientes en *bkd*) sólo pueden producir avermectinas cuando las fermentaciones se complementan con ácidos grasos. La exploración y aislamiento de mutantes deficientes en actividad de deshidrogenasa de cadena ramificada (por ejemplo, *S. avermitilis*, ATCC 53567) se describen en la Patente Europea (EP) 276103. La fermentación de dichos mutantes en presencia de ácidos grasos suministrados exógenamente da como resultado la producción de sólo las cuatro avermectinas correspondientes al ácido graso empleado. Por lo tanto, la complementación 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 complementación de las fermentaciones con ácido isobutírico da como resultado la producción de las avermectinas naturales A1b, A2b, B1b y B2b; y la complementación de las fermentaciones con ácido ciclopentanocarboxílico da como resultado la producción de las cuatro nuevas ciclopentilavermectinas A1, A2, B1 y B2.

Si se complementan con otros ácidos grasos, se producen nuevas avermectinas. Por exploración de más de 800 precursores potenciales, se han identificado más de 60 otras nuevas avermectinas. (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 actividad 5-O-metiltransferasa producen esencialmente sólo las avermectinas de análogos B. Por consiguiente, los mutantes de *S. avermitilis* que carecen de actividad tanto de 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada como de 5-O-metiltransferasa producen sólo las avermectinas B correspondientes al ácido graso empleado para complementar la fermentación. Por lo tanto, la complementación de dichos dobles mutantes con ácido S-(+)-2-metilbutírico da como resultado la producción de solamente las avermectinas naturales B1a y B2a, mientras que la complementación con ácido isobutírico o ácido ciclopentanocarboxílico da como resultado la producción de las avermectinas naturales B1b y B2b o las nuevas ciclopentil avermectinas B1 y B2, respectivamente. La complementación de la cepa doble mutante con ácido ciclohexano carboxílico es un procedimiento preferido para producir la nueva avermectina comercialmente importante, ciclohexilavermectina B1 (doramectina). El aislamiento y las características de dichos dobles mutantes, por ejemplo, *S. avermitilis* (ATCC 53692), se describen en el documento EP 276103.

2.2. Genes implicados en la biosíntesis de avermectina

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 con el grupo de genes de policétido sintasa de *Streptomyces* (PKS) (véase Hopwood y Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 37-66). Por lo tanto, una

estrategia para clonar genes en una ruta biosintética ha sido aislar un gen de resistencia farmacológica y después ensayar regiones adyacentes del cromosoma para otros genes relacionados con la biosíntesis de ese antibiótico particular. Otra estrategia para clonar genes implicados en la biosíntesis de metabolitos importantes ha sido la complementación de mutantes. Por ejemplo, porciones de una genoteca de ADN de un organismo capaz de producir un metabolito particular se introducen en un mutante no productor y los transformantes se exploran para determinar la producción del metabolito. Además, la hibridación de una genoteca usando sondas derivadas de otras especies de *Streptomyces* se ha usado para identificar y clonar genes en rutas biosintéticas.

Los genes implicados en la biosíntesis de avermectina (genes *ave*), como los genes necesarios para la biosíntesis de otros metabolitos secundarios de *Streptomyces* (por ejemplo, PKS), se encuentran agrupados en el cromosoma. Varios genes *ave* se han clonado con éxito usando vectores para complementar los mutantes de *S. avermitilis* bloqueados en la biosíntesis de avermectina. La clonación de dichos genes se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 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 de C22,23 (*aveC*) en un fragmento *Bam*HI de 4,82 kb de *S. avermitilis*, así como mutaciones en el gen *aveC* que dan como resultado la producción de un productor de B2a de un solo componente. Puesto que la ivermectina, un potente compuesto antihelmíntico, puede producirse químicamente a partir de la avermectina B2a, dicho productor de un solo componente de avermectina B2a se considera particularmente útil para la producción comercial de ivermectina.

La Patente de Estados Unidos Nº 6.248.579 para Stutzman-Engwall y col., expedida el 19 de junio de 2001, describe ciertas mutaciones en el gen *aveC* de *Streptomyces avermitilis* que conducen a una reducción en la proporción de ciclohexil B2:ciclohexil B1 hasta aproximadamente 0,75:1.

La Publicación PCT WO 01/12821 por Pfizer Products Inc., publicada el 22 de febrero de 2001 describe ciertas mutaciones adicionales en el gen *aveC* de *Streptomyces avermitilis* que conducen a reducciones adicionales en la proporción de ciclohexil B2:ciclohexil B1 hasta 0,40:1.

La identificación de mutaciones o combinaciones de mutaciones adicionales en el gen *aveC* que minimicen adicionalmente la complejidad de la producción de avermectina, tales como, por ejemplo, mutaciones que disminuyan adicionalmente la proporción de avermectinas B2:B1, debería simplificar la producción y purificación de avermectinas comercialmente importantes.

3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que de otro modo es la misma que el alelo de *aveC* de *Streptomyces avermitilis*, la secuencia codificante del producto génico *AveC* de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID Nº: 1), o una variante de la misma que incluye uno o más cambios silentes en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético, pero comprendiendo además dicha secuencia de nucleótidos mutaciones que codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2, de modo que células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 en las que el alelo de *aveC* de tipo silvestre se ha inactivado y que expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada son capaces de producir una proporción de avermectinas de clase 2:1 que está reducida en comparación con la proporción producida por células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 que expresan en su lugar solamente el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en la que cuando las avermectinas de clase 2:1 son avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1, la proporción de avermectinas de clase 2:1 es de 0,2:1 o menos, y en la que las combinaciones de sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones tanto en D48 como en G179, y en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:

(ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;

(ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;

(aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;

(ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;

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

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

(au) D48E, A89T, L136P, G179S;

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

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

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

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

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

(ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;

(bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;

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

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

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

La presente invención proporciona además un vector recombinante que comprende una molécula polinucleotídica de la presente invención.

10 La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende una molécula polinucleotídica o un vector recombinante de la presente invención. En una realización preferida, la célula huésped es una célula de *Streptomyces*. En una realización más preferida, la célula huésped es una célula de *Streptomyces avermitilis*.

La presente invención proporciona además un procedimiento para generar una cepa de *Streptomyces avermitilis*, que comprende (i) mutar el alelo de *aveC* en una célula de una cepa de *S. avermitilis*, dando como resultado dicha mutación una combinación de sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC, o (ii) introducir en una célula de una cepa de *S. avermitilis* un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo que codifica un producto génico AveC que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos, en la que las células que comprenden el alelo de *aveC* mutado o la variante degenerada son capaces de producir avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 en una proporción de 0,2:1 o menos, y en la que las combinaciones de sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones tanto en D48 como en G179, en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:

(ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;

(ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;

(aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;

25 (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;

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

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

(au) D48E, A89T, L136P, G179S;

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

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

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

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

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

(ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;

35 (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;

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

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

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

La presente invención proporciona además una célula de una especie de *Streptomyces* que comprende un alelo de *aveC* de *S. avermitilis* mutado, o una variante degenerada del mismo que codifica un producto génico AveC que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

(ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;

- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
 (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
 (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
 5 (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
 (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
 (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
 (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
 (ax) D48E, A61 T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 10 (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
 (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
 (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
 (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
 (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
 15 (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; y
 (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

En una realización preferida de la misma, la célula es una célula de *Streptomyces avermitilis*.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar una cepa de células de *Streptomyces avermitilis* de la presente invención en medios de cultivo en condiciones que permitan o induzcan la producción de avermectinas a partir de las mismas, y recuperar dichas avermectinas a partir del cultivo.

La presente solicitud desvela además una composición de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 producidas por células de *Streptomyces avermitilis*, que comprende las avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 presentes en un medio de cultivo en el que se han cultivado las células, en la que la proporción de las avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 presentes en el medio de cultivo es de 0,35:1 o menos, preferentemente de aproximadamente 0,30:1 o menos, más preferentemente de aproximadamente 0,25:1 o menos, más preferentemente de aproximadamente 0,20:1. En particular, la composición de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 se produce por células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo que codifica un producto génico que da como resultado la reducción de la proporción de clase 2:1 de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 producidas por las células en comparación con células de la misma cepa de *S. avermitilis* que no expresan el alelo de *aveC* mutado pero en su lugar expresan solamente el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

4. Breve descripción de las Figuras

FIGURA 1. Secuencia de ADN (SEC ID N°: 1) que comprende la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 2).

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

FIGURA 3. Vector de reemplazo de genes 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 con *Bam*HI del grupo de genes de avermectina policétido sintasa de *S. avermitilis* con cinco clones de cósmidos solapantes identificados (es decir, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). La relación de pSE118 y pSE119 también se indica.

FIGURA 5. Análisis de HPLC de productos de fermentación producidos por cepas de *S. avermitilis*. Se realizó una cuantificación de picos por comparación con cantidades patrón de ciclohexil B1. El tiempo de retención de la ciclohexil B2 era de 7,4-7,7 min; el tiempo de retención de la ciclohexil B1 era de 11,9-12,3 min. FIG. 5A. Cepa de *S. avermitilis* SE180-11 con una ORF de *aveC* inactivada. FIG. 5B. Cepa de *S. avermitilis* SE180-11 transformada con pSE186 (ATCC 209604). FIG. 5C. Cepa de *S. avermitilis* SE180-11 transformada con pSE187. FIG. 5D. Cepa de *S. avermitilis* SE180-11 transformada con pSE188.

FIGURA 6A-M. La lista recopilada de combinaciones de sustituciones de aminoácidos codificadas por mutaciones en el alelo de *aveC* según se identificaron mediante una segunda ronda de "transposición de genes", y sus efectos sobre la proporción de producción de ciclohexil B2:ciclohexil B1. Para cada plásmido, en

la columna titulada "Mutaciones", el recuadro superior enumera las sustituciones de aminoácidos y el recuadro inferior enumera los cambios de bases de nucleótidos que dan como resultado esas sustituciones de aminoácidos. Los cambios de bases de nucleótidos entre paréntesis son cambios silentes, es decir, no dan como resultados cambios en la secuencia de aminoácidos.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la identificación y caracterización de moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican el producto génico AveC de *Streptomyces avermitilis*, la construcción de nuevas cepas de *S. avermitilis* que pueden usarse para explorar productos génicos AveC mutados para determinar su efecto sobre la producción de avermectina, y el descubrimiento de que ciertos productos génicos AveC mutados puede reducir la proporción de avermectinas B2:B1 producida por *S. avermitilis*. A modo de ejemplo, la invención se describe en las secciones a continuación para una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la secuencia codificante de producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de nucleótidos de la ORF de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1), y para moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos mutadas obtenidas a partir de la misma y variantes degeneradas de la misma. Sin embargo, los principios expuestos en la presente invención pueden aplicarse de forma análoga a otras moléculas polinucleotídicas, incluyendo genes homólogos a aveC de otras especies de *Streptomyces*, incluyendo, por ejemplo, *S. hygroscopicus* y *S. griseochromogenes*, entre otros.

5.1. Moléculas polinucleotídicas que codifican el producto génico AveC de *S. avermitilis*

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

La molécula polinucleotídica aislada de la presente invención comprende preferentemente una secuencia de nucleótidos que es la misma que la secuencia codificante de 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 N°: 1) o una porción sustancial de la misma. Como se usa en el presente documento, una "porción sustancial" de una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico AveC de *S. avermitilis* significa una molécula polinucleotídica aislada que comprende al menos aproximadamente el 70% de la secuencia completa de la ORF de aveC mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 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 de *S. avermitilis* ATCC 53692 en la que se ha inactivado el alelo nativo de aveC, da como resultado la producción de sustancialmente la misma proporción y cantidad de avermectinas que las producidas por la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 que en su lugar expresa solamente el alelo de aveC funcional de tipo silvestre nativo para la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692.

Además de la secuencia de nucleótidos de la ORF de aveC, la molécula polinucleotídica aislada de la presente invención puede comprender además secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural el gen de aveC *in situ* en *S. avermitilis*, tales como las secuencias de nucleótidos flanqueantes que se muestran en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1).

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, o una variante degenerada de la misma, basándose en la degeneración conocida del código genético.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "molécula polinucleotídica", "secuencia polinucleotídica", "secuencia codificante", "marco de lectura abierta" y "ORF" pretenden referirse a moléculas tanto de ADN como de ARN, que pueden ser monocatenarias o bicatenarias, y que pueden transcribirse y traducirse (ADN), o traducirse (ARN), en un producto génico AveC, o en un polipéptido que sea homólogo a un producto génico AveC en un sistema de expresión de célula huésped apropiado cuando se ponen bajo el control de elementos reguladores apropiados. Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias procariotas, secuencias de ADNc, secuencias de ADN genómico y secuencias de ADN y ARN sintetizadas químicamente.

La secuencia de nucleótidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) comprende cuatro codones GTG diferentes en las posiciones de pb 42, 174, 177 y 180. Como se ha descrito previamente en la Patente de Estados Unidos N° 6.248.579, se construyeron múltiples delecciones de la región 5' de la ORF de aveC (FIGURA 1; SEC ID N°: 1) para ayudar a definir cuál de estos codones podría funcionar en la ORF de aveC como sitios de inicio para la expresión de proteínas. La delección del primer sitio GTG en el pb 42 no eliminaba la actividad de AveC. La delección adicional de todos los codones GTG en las posiciones de pb 174, 177 y 180 en conjunto eliminó la actividad de AveC, indicando que esta región es necesaria para la expresión de proteína. La presente invención incluye por lo tanto 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 de producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o a la secuencia de nucleótidos de la ORF de aveC presentada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) o una

porción sustancial de la misma. El término "homólogo", cuando se usa para referirse a una molécula polinucleotídica que es homóloga a una secuencia codificante de 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 de 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 N°: 1), pero que incluye uno o más cambios silentes en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético (es decir, una variante degenerada); o (b) que hibrida con la complementaria de una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante de producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) en condiciones moderadamente rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecil sulfato sódico al 7% (SDS), EDTA 1 mM a 65°C y lavado en SSC 0,2x/SDS al 0,1% a 42°C (véase Ausubel y col. (eds.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en pág. 2.10.3) y que codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, la molécula polinucleotídica homóloga hibrida con la complementaria de la secuencia de nucleótidos codificante de producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o con la complementaria de la secuencia de nucleótidos de la ORF de aveC presentada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) o una porción sustancial de la misma en condiciones altamente rigurosas, es decir, hibridación con ADN unido a filtro NaHPO₄ 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C y lavado en SSC 0,1x/SDS al 0,1% a 68°C (véase Ausubel y col. 1989, anteriormente), y codifica un producto génico AveC funcionalmente equivalente como se ha definido anteriormente.

La actividad de un producto génico AveC y equivalentes funcionales potenciales del mismo puede determinarse mediante análisis de HPLC de los productos de fermentación, como se describe en los ejemplos a continuación. Las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que codifican equivalentes funcionales del producto génico AveC de *S. avermitilis* pueden incluir genes aveC de origen natural presentes en otras cepas de *S. avermitilis*, genes homólogos a aveC presentes en otras especies de *Streptomyces*, y alelos de aveC mutados, ya sean de origen natural u obtenidos por ingeniería genética.

La presente invención proporciona además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante de producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o a la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) o una porción sustancial de la misma. Como se usa en el presente documento, una "porción sustancial" de la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) significa un polipéptido que comprende al menos aproximadamente el 70% de la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2), y que constituye un producto génico AveC funcionalmente equivalente, como se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento para referirse a secuencias de aminoácidos que son homólogas a la secuencia de aminoácidos de un producto génico AveC de *S. avermitilis*, el término "homólogo" se refiere a un polipéptido que de otro modo tiene la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2), pero en el que uno o más restos de aminoácidos se han sustituido de forma conservativa con un resto de aminoácido diferente, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 70%, más preferentemente de al menos aproximadamente el 80%, y más preferentemente de al menos aproximadamente el 90% con el polipéptido codificado por la secuencia codificante de producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2), según se determina por cualquier algoritmo de identidad de secuencia de aminoácidos convencional, tal como el algoritmo BLASTP (GENBANK, NCBI), y en el que dicha sustitución conservativa da como resultado un producto génico funcionalmente equivalente, como se ha definido anteriormente. Se conocen bien en la técnica sustituciones de aminoácidos conservativas. Las normas para realizar dichas 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 tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en acidez o polaridad. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro grupos: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina también se clasifican en conjunto como aminoácidos aromáticos. Una o más sustituciones dentro de cualquier grupo particular, por ejemplo, de una leucina con una isoleucina o valina, o de un aspartato con un glutamato, o de una treonina con una serina, o de cualquier otro resto de aminoácido con un resto de aminoácido estructuralmente relacionado, por ejemplo, un resto de aminoácido con una acidez o polaridad similar, o con una similitud en alguna combinación de las mismas, tendrán generalmente un efecto insignificante sobre la función del polipéptido.

La producción y manipulación de las moléculas polinucleotídicas desveladas en el presente documento se incluyen la especialidad en la técnica y pueden llevarse a cabo 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. Los clones de polinucleótidos 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 expuestos en la Sección 7 a continuación. Pueden explorarse bibliotecas de ADN genómico para secuencias codificantes de aveC y de homólogos de aveC usando técnicas tales como los procedimientos expuestos en Benton y Davis, 1977, Science 196: 180, para bibliotecas de bacteriófagos y en Grunstein y Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 3961-3965 para bibliotecas de plásmidos. Las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos que se sabe que incluyen la ORF de aveC, como están presentes, por ejemplo, en el plásmido pSE186 (ATCC 209604) o en el plásmido pSE119 (descrito en la Sección 7, a continuación), pueden usarse como sondas en estos experimentos de exploración. Como alternativa, pueden sintetizarse sondas oligonucleotídicas que corresponden a secuencias de nucleótidos deducidas a partir de secuencias de aminoácidos parciales o completas del producto génico homólogo a AveC purificado.

5.2. Sistemas recombinantes

5.2.1. Vectores de clonación y expresión

La presente invención proporciona además vectores de clonación recombinantes y vectores de expresión que son útiles en la clonación o expresión de moléculas polinucleotídicas de la presente invención que comprenden, por ejemplo, la ORF de aveC de *S. avermitilis* o cualquier ORF de homólogo de aveC. En una realización no limitante, la presente invención proporciona el plásmido pSE186 (ATCC 209604), que comprende la ORF completa del gen aveC de *S. avermitilis*.

Toda la descripción siguiente en relación con la ORF de aveC de *S. avermitilis*, o una molécula polinucleotídica que comprende la ORF de aveC de *S. avermitilis* o una porción de la misma, o un producto génico AveC de *S. avermitilis*, también se refiere a alelos de aveC mutados como se describen a continuación, a menos que se indique explícitamente o por el contexto.

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

Los vectores recombinantes de la presente invención, particularmente vectores de expresión, se construyen preferentemente de modo 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 el presente documento, la expresión "elemento regulador" incluye, pero sin limitación, secuencias de nucleótidos que codifican promotores inducibles y no inducibles, potenciadores, operadores y otros elementos conocidos en la técnica que sirven para dirigir y/o regular la expresión de secuencias codificantes de polinucleótidos. Además, como se usa en el presente documento, la secuencia codificante está en "asociación operativa" con uno o más elementos reguladores, en la que los elementos reguladores regulan eficazmente y permiten la transcripción de la secuencia codificante o la traducción de su ARNm, o ambas.

Los vectores plasmídicos típicos que pueden modificarse por ingeniería genética para contener 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 muchos otros.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para construir vectores recombinantes que contienen secuencias codificantes particulares en asociación operativa con elementos reguladores apropiados, y estos pueden usarse para la práctica de la presente invención. Estos procedimientos incluyen técnicas recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis y col., 1989, anteriormente; Ausubel y col., 1989, anteriormente; Sambrook y col., 1989, anteriormente; Innis y col., 1995, anteriormente; y Erlich, 1992, anteriormente.

Los elementos reguladores de estos vectores pueden variar en su potencia y especificidades. Dependiendo del sistema de huésped/vector utilizado, puede usarse cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Los ejemplos no limitantes de regiones reguladoras de la transcripción o promotores para bacterias incluyen el promotor β -gal, el promotor de T7, el promotor TAC, los promotores derecho e izquierdo de λ , los promotores trp y lac, los promotores de fusión trp-lac y, más específicamente, para *Streptomyces*, los promotores de *ermE*, *melC* y *tipA*, etc. En una realización específica, puede generarse un vector de expresión que contiene la ORF de aveC o la ORF mutada del mismo clonada adyacente a un promotor constitutivo fuerte, tal como el promotor de *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea*. Como describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.248.579, un vector que comprende el promotor de *ermE* se transformó en *S. avermitilis*, y el análisis de HPLC posterior de los productos de

fermentación indicó un título aumentado de avermectinas producidas en comparación con la producción por la misma cepa que en su lugar expresa solamente el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

Pueden usarse vectores de expresión de proteínas de fusión para expresar una proteína de fusión de producto génico AveC. La proteína de fusión purificada puede usarse para generar antisueros 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 contribuir a la identificación o purificación del producto génico AveC expresado. Los vectores de expresión de proteínas de fusión posibles incluyen, pero sin limitación, vectores que incorporan secuencias que codifican fusiones con β -galactosidasa y *trpE*, fusiones con proteína de unión a maltosa, fusiones con glutatión-S-transferasa y fusiones con polihistidina (regiones transportadoras). En una realización alternativa, un producto génico AveC o una porción del mismo puede fusionarse con un producto génico homólogo a AveC o porción del mismo, derivado de otra especie o cepa de *Streptomyces*, tal como, por ejemplo, *S. hygroscopicus* o *S. griseochromogenes*. Dichos vectores híbridos pueden transformarse en células de *S. avermitilis* y ensayarse para determinar su efecto, por ejemplo, sobre la proporción de avermectina de clase 2:1 producida.

Las proteínas de fusión de AveC pueden modificarse por ingeniería genética para comprender una región útil para la purificación. Por ejemplo, las fusiones de AveC-proteína de unión a maltosa pueden purificarse usando resina de amilosa; las proteínas de fusión de AveC-glutatión-S-transferasa pueden purificarse usando perlas de glutatión-agarosa; y las fusiones de AveC-polihistidina pueden purificarse usando una resina de níquel divalente. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos contra una proteína o péptido transportador para purificación por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica el epítipo diana de un anticuerpo monoclonal puede introducirse por ingeniería genética en el vector de expresión en asociación operativa con los elementos reguladores y situarse de modo que el epítipo expresado se fusione con el polipéptido AveC. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica la etiqueta epitópica FLAG™ (International Biotechnologies Inc.), que es un péptido marcador hidrófilo, puede insertarse por técnicas convencionales en el vector de expresión en un punto correspondiente, por ejemplo, al extremo carboxilo terminal del polipéptido AveC. El producto de fusión de polipéptido AveC-epítipo FLAG™ expresado puede después detectarse y purificarse por afinidad usando anticuerpos anti-FLAG™ disponibles en el mercado.

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

Una secuencia señal cadena arriba de, y en fase de lectura con, la ORF de *aveC* puede introducirse por ingeniería genética en el vector de expresión por procedimientos conocidos para dirigir el tránsito y la secreción del producto génico expresado. Los ejemplos no limitantes de secuencias señal incluyen las de factor α , inmunoglobulinas, proteínas de membrana externa, penicilinas y receptores de linfocitos T, entre otras.

Para contribuir a la selección de células huésped transformadas o transfectadas con vectores de clonación o expresión de la presente invención, el vector puede modificarse por ingeniería genética para comprender además una secuencia codificante de un producto génico indicador u otro marcador de selección. Dicha secuencia codificante está preferentemente en asociación operativa con las secuencias codificantes de elementos reguladores, como se ha descrito anteriormente. Se conocen bien en la técnica genes indicadores que son útiles en la invención e incluyen los que codifican proteína verde fluorescente, luciferasa, *xyIE* y tirosinasa, entre otros. Se conocen bien en la técnica secuencias de nucleótidos que codifican marcadores de selección e incluyen las que codifican productos génicos que confieren resistencia a antibióticos o antimetabolitos, o que suministran un requisito auxotrófico. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen los que codifican la resistencia a eritromicina, tioestreptona o kanamicina, entre muchos otros.

5.2.2. 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 preferentemente células de *Streptomyces*, aunque también pueden usarse otras células procariotas o células eucariotas. Dichas células huésped transformadas incluyen típicamente, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias transformadas con ADNc de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de ADN cosmidicos, o levaduras transformadas con vectores recombinantes, entre otros.

Las moléculas polinucleotídicas de la presente invención están destinadas a funcionar en células de *Streptomyces*, pero también pueden transformarse en otras células bacterianas o eucariotas, por ejemplo, con fines de clonación o expresión. Típicamente puede usarse una cepa de *E. coli*, tal como, por ejemplo, la cepa DH5 α , disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) Rockville, MD, Estados Unidos (Nº de Acceso 31343) y de fuentes comerciales (Stratagene). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen células de levadura, aunque también

pueden utilizarse eficazmente células de mamífero o células de insecto.

El vector de expresión recombinante de la invención se introduce preferentemente, por ejemplo, se transforma o se transfecta, en una o más células huésped de un cultivo de células sustancialmente homogéneo. El vector de expresión se introduce generalmente en células huésped de acuerdo con técnicas conocidas, tales como, por ejemplo, por transformación de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, 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 transformantes puede realizarse por procedimientos convencionales, tales como por selección para células que expresen un marcador de selección, por ejemplo, resistencia a antibióticos, asociado con el vector recombinante, como se ha descrito anteriormente.

Una vez que el vector de expresión se introduce en la célula huésped, la integración y el mantenimiento de la secuencia codificante de *aveC* en el cromosoma de la célula huésped o episomalmente puede confirmarse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante análisis de hibridación de Southern, análisis con enzimas de restricción, análisis de PCR, incluyendo PCR con transcripción inversa (rt-PCR) o mediante ensayo inmunológico para detectar el producto génico esperado. Las células huésped que contienen y/o expresan la secuencia codificante de *aveC* recombinante pueden identificarse por cualquiera de al menos cuatro estrategias generales que son bien conocidas en la técnica, incluyendo: (i) hibridación de ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN antisentido; (ii) detección de la presencia de funciones de gen "marcador"; (iii) evaluación del nivel de transcripción según se mide por la expresión de transcritos de ARNm específicos de *aveC* en la célula huésped; y (iv) detección de la presencia de un producto polipeptídico maduro según se mide, por ejemplo, por inmunoensayo o por la presencia de actividad biológica de AveC (por ejemplo, la producción de proporciones y cantidades específicas de avermectinas indicativas de actividad de AveC, por ejemplo, en células huésped de *S. avermitilis*).

5.2.3. Expresión y caracterización de un producto génico AveC recombinante

Una vez que la secuencia codificante de *aveC* nativa o mutada se ha introducido de forma estable en una célula huésped apropiada, la célula huésped transformada se propaga de forma clonal y las células resultantes pueden cultivarse en condiciones que conduzcan a la producción máxima del producto génico AveC nativo o mutado. Dichas condiciones incluyen típicamente el cultivo de células a alta densidad. Cuando el vector de expresión comprende un promotor inducible, se emplean según sea necesario para inducir la expresión condiciones de inducción apropiadas tales como, por ejemplo, cambio de temperatura, agotamiento de nutrientes, adición de inductores gratuitos (por ejemplo, análogos de carbohidratos, tales como isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)), acumulación de subproductos metabólicos en exceso o similares.

Cuando el producto génico AveC expresado queda retenido en el interior de las células huésped, las células se recogen y se lisan y el producto se aísla y se purifica a partir del lisado en condiciones de extracción conocidas en la técnica para minimizar la degradación de proteína tales como, por ejemplo, a 4°C o en presencia de inhibidores de proteasas, o ambas. Cuando el producto génico AveC expresado se secreta de las células huésped, el medio de nutrientes agotado puede simplemente recogerse y el producto aislarse a partir del mismo.

El producto génico AveC expresado puede aislarse o purificarse sustancialmente a partir de lisados celulares o medio de cultivo, según sea apropiado, usando procedimientos convencionales, incluyendo, pero sin limitación, cualquier combinación de los procedimientos siguientes: precipitación con sulfato de amonio, fraccionamiento por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, centrifugación en gradiente de densidad y cromatografía de afinidad. Cuando el producto génico AveC expresado presenta actividad biológica, el aumento de la pureza de la preparación puede controlarse en cada etapa del procedimiento de purificación mediante el uso de un ensayo apropiado. Puede detectarse si el producto génico AveC expresado presenta o no actividad biológica, basándose, por ejemplo, en el tamaño o la reactividad con un anticuerpo de otro modo específico para AveC, o por la presencia de una etiqueta de fusión. Como se usa en el presente documento, un producto génico AveC está "sustancialmente purificado" cuando el producto constituye más de aproximadamente el 20% en peso de la proteína en una preparación particular. Además, como se usa en el presente documento, un producto génico AveC está "aislado" cuando el producto constituye al menos aproximadamente el 80% en peso de la proteína en una preparación particular.

La presente invención proporciona por lo tanto un producto génico AveC de *S. avermitilis* expresado de forma recombinante aislado o sustancialmente purificado, que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante de producto génico AveC del plásmido pSE186 (ATCC 209604), o la secuencia de aminoácidos de la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2) o una porción sustancial de la misma, y versiones mutadas y variantes degeneradas de la misma.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir un producto génico AveC, que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión recombinante, comprendiendo dicho vector una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico AveC, estando dicha molécula polinucleotídica en asociación operativa con uno o más elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula polinucleotídica en la célula huésped, en condiciones que conduzcan a la

producción del producto génico AveC recombinante, y recuperar el producto génico AveC del medio de cultivo.

El producto génico AveC de *S. avermitilis* expresado de forma recombinante es útil para una diversidad de fines, incluyendo para explorar compuestos que alteren la función del producto génico AveC y de este modo modulen la biosíntesis de avermectina, y para generar anticuerpos dirigidos contra el producto génico AveC.

Una vez que se ha obtenido un producto génico AveC de suficiente pureza, puede caracterizarse por procedimientos convencionales, incluyendo por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño, análisis de la secuencia de aminoácidos, actividad biológica en la producción de productos apropiados en la ruta biosintética de avermectina, etc. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del producto génico AveC puede determinarse usando técnicas de secuenciación de péptidos convencionales. El producto génico AveC puede caracterizarse adicionalmente usando análisis de hidrofiliidad (véase, por ejemplo, Hopp y Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824) o algoritmos de programas informáticos análogos para identificar regiones hidrófobas e hidrófilas del producto génico AveC. Puede llevarse a cabo un análisis estructural para identificar regiones del producto génico AveC que asuman estructuras secundarias específicas. Pueden usarse procedimientos biofísicos tales como cristalografía de rayos X (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13), modelado por ordenador (Fletterick y Zoller (eds), 1986, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y resonancia magnética nuclear (RMN) para mapear y estudiar sitios de interacción entre producto génico AveC y su sustrato. La información obtenida a partir de estos estudios puede usarse para seleccionar nuevos sitios para mutación en la ORF de aveC para contribuir a desarrollar nuevas cepas de *S. avermitilis* que tengan características de producción de avermectina más deseables.

5.3. Construcción y uso de mutantes de AveC

Un objetivo primario de la presente invención es identificar nuevas mutaciones en el alelo de aveC de *S. avermitilis* que den como resultado un cambio, y más preferentemente una reducción, en la proporción de avermectinas B2:B1. La presente invención proporciona por lo tanto moléculas polinucleotídicas útiles para producir nuevas cepas de células de *S. avermitilis* que presenten un cambio detectable en la producción de avermectina en comparación con células de la misma cepa pero que en su lugar expresen solamente el alelo de aveC de tipo silvestre. En una realización preferida, dichas moléculas polinucleotídicas son útiles para producir nuevas cepas de células de *S. avermitilis* que produzcan avermectinas en una proporción de clase 2:1 reducida en comparación con células de la misma cepa que en su lugar expresan solamente el alelo de aveC de tipo silvestre. Las células de dichas cepas también pueden comprender mutaciones adicionales para producir una cantidad aumentada de avermectinas en comparación con células de la misma cepa que en su lugar expresan solamente un único alelo de aveC de tipo silvestre.

Las mutaciones en el alelo o secuencia codificante de aveC incluyen cualquier mutación que introduzca una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos en el producto génico AveC, o que de como resultado un truncamiento del producto génico AveC, o cualquier combinación de las mismas, y que produzca el resultado deseado. Dichas secuencias de alelos de aveC mutadas pretenden incluir cualquier variante degenerada de las mismas. Por ejemplo, la presente invención proporciona una molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos del alelo de aveC o una variante degenerada de la misma, o la secuencia codificante de 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 está presente en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1) o una variante degenerada de la misma, pero que comprende además mutaciones que codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas en el producto génico AveC. En una realización no limitante, dichas sustituciones se producen en una o más posiciones de aminoácidos del producto génico AveC correspondientes a las posiciones de aminoácidos 25, 28, 35, 36, 38, 40, 41, 48, 55, 61, 78, 84, 89, 90, 99, 107, 108, 111, 120, 123, 136, 138, 139, 141, 154, 159, 163, 179, 192, 196, 198, 200, 202, 220, 228, 229, 230, 231, 234, 238, 239, 250, 252, 266, 275, 278, 289 ó 298 de la SEC ID N°: 2. Las combinaciones preferidas de posiciones de aminoácidos que se sustituirán comprenden uno o más de los restos de aminoácidos D48, A61, A89, L136, S138, A139, R163, G179, V196, A198, E238 y P289. Las combinaciones específicamente preferidas de sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones tanto en D48 como en G179 y, más específicamente, D48E y G179S. Se enumeran ejemplos específicos de combinaciones de sustituciones de aminoácidos que dan como resultado una reducción en las proporciones de ciclohexil B:ciclohexil B1 en la FIGURA 6A-J.

La presente invención proporciona por lo tanto una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que de otro modo es la misma que el alelo de aveC de *Streptomyces avermitilis*, la secuencia codificante de producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o la secuencia de nucleótidos de la ORF de aveC de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1), o una variante de la misma que incluye uno o más cambios silentes en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético, pero comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos además mutaciones que codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, de modo que células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 en las que se ha inactivado el alelo de aveC de tipo silvestre y que expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada son capaces de producir una proporción de avermectinas de clase 2:1 que está reducida en comparación con la proporción producida por células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 que en su lugar expresan solamente el alelo de aveC de tipo silvestre, en la

que cuando las avermectinas de clase 2:1 son avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1, la proporción de avermectinas de clase 2:1 es de 0,2:1 o menos, y en la que las combinaciones de sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones tanto en D48 como en G179, y en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- 10 (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- 15 (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- 20 (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; y
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

- Otras combinaciones de sustituciones de aminoácidos desveladas en la presente solicitud incluyen: la combinación de grupo (a): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE538 (véase la FIGURA 6); la combinación de grupo (b):
- 25 G40S, D48E, L136P, G179S, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE559; la combinación de grupo (c): D48E, L136P, R163Q, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE567; la combinación de grupo (d): D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE570 y pSE572; la combinación de grupo (e): D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D. Un ejemplo no
 - 30 limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE571; la combinación de grupo (f): D48E, L136P, G179S, E238D. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE501 y pSE546; la combinación de grupo (g): D48E, A61T, L136P, G179S, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE510; la combinación de grupo (h): D48E, A61T, L136P, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de
 - 35 aminoácidos es pSE512; la combinación de grupo (i): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE519; la combinación de grupo (j): D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE526; la combinación de grupo (k): D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE528;
 - 40 la combinación de grupo (l): D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE530; la combinación de grupo (m): D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE531; la combinación de grupo (n): D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE534; la combinación
 - 45 de grupo (o): Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE535; la combinación de grupo (p): D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE542; la combinación de grupo (q): D48E, L136P, G179S, R250W. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE545; la combinación de grupo (r): D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de
 - 50 aminoácidos es pSE548; la combinación de grupo (s): D48E, L136P, G179S, A198G, P289L. Un ejemplo no

limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE552; la combinación de grupo (t): D48E, F78L, A89T, L136P, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE557; la combinación de grupo (u): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE564 y pSE565; la combinación de grupo (v): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE568; la combinación de grupo (w): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE543; la combinación de grupo (x): D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE504; la combinación de grupo (y): D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE508; la combinación de grupo (z): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE511; la combinación de grupo (aa): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE520; la combinación de grupo (ab): D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE523; la combinación de grupo (ac): D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE527; la combinación de grupo (ad): D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE539; la combinación de grupo (ae): G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE540; la combinación de grupo (af): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE547; la combinación de grupo (ag): D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE550; la combinación de grupo (ah): S41G, D48E, A89T, L136P, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE558; la combinación de grupo (ai): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE563; la combinación de grupo (aj): D48E, A89T, L136P, G179S, F234S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE566; la combinación de grupo (ak): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE573 y pSE578; la combinación de grupo (al): Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE574; la combinación de grupo (am): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE575 y pSE576; la combinación de grupo (an): D48E, A89T, S138T, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE577; la combinación de grupo (ao): D48E, A89T, L136P, G179S, E238D. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE502 y pSE524; la combinación de grupo (ap): D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE503; la combinación de grupo (aq): D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE505; la combinación de grupo (ar): D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE506; la combinación de grupo (as): D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE507; la combinación de grupo (at): D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE509; la combinación de grupo (au): D48E, A89T, L136P, G179S. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE514 y pSE525; la combinación de grupo (av): D48E, A89T, V120A, L136P, G179S. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE515; la combinación de grupo (aw): D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE517; la combinación de grupo (ax): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE518; la combinación de grupo (ay): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE529 y pSE554; la combinación de grupo (az): D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE532; la combinación de grupo (ba): D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE536; la combinación de grupo (bb): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE537; la combinación de grupo (bc): D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE541; la combinación de grupo (bd): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L. Son ejemplos no limitantes de plásmidos que codifican estas sustituciones de aminoácidos pSE549 y pSE553; la combinación de grupo (be): D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica estas sustituciones de aminoácidos es pSE551.

La presente solicitud desvela además una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que de otro modo es la misma que el alelo de *aveC* de *Streptomyces avermitilis*, la secuencia codificante de

producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o la secuencia de nucleótidos de la ORF de aveC de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1), o un variante degenerada de la misma, pero comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos además mutaciones que codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; de modo que las células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 en las que se ha inactivado el alelo de aveC de tipo silvestre y que expresan una molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada son capaces de producir una proporción de avermectinas de clase 2:1 que está reducida en comparación con la proporción producida por células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 que en su lugar expresan solamente el alelo de aveC de tipo silvestre, en la que cuando las avermectinas de clase 2:1 son avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1, la proporción de avermectinas de clase 2:1 se reduce hasta aproximadamente 0,40:1 o menos, y en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:

(bf) D48E, S138T, A139T, G179S, E238D; y

(bg) Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D.

Son ejemplos no limitantes de un plásmido que codifica las sustituciones de aminoácidos de grupo (bf) pSE556 y pSE569. Un ejemplo no limitante de un plásmido que codifica las sustituciones de aminoácidos de grupo (bg) es pSE561.

La presente solicitud contempla que cualquiera de las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente puede lograrse por cualquier modificación en la secuencia de nucleótidos del alelo de aveC o una variante degenerada del mismo que dé como resultado dichas sustituciones. Por ejemplo, es posible efectuar la mayoría de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento cambiando una secuencia de codón nativo o una variante degenerada de la misma a uno cualquiera de varios codones alternativos que codifiquen la misma sustitución de aminoácido. Las diversas secuencias posibles que pueden codificar las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente serán evidentes para un experto en la materia en vista de la presente divulgación y de la degeneración conocida del código genético. Para cada combinación particular enumerada anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se consiguen mediante los cambios de nucleótidos no silentes expuestos en la FIGURA 6.

Como se usa en el presente documento, la expresión "otras combinaciones de sustituciones de aminoácidos desveladas en la presente solicitud incluyen..." o "la combinaciones de sustituciones de aminoácidos comprende la combinación de grupo....", y similares, significa que las sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC de acuerdo con la presente solicitud incluyen al menos las sustituciones que se enumeran específicamente, y pueden incluir otras sustituciones de aminoácidos, o deleciones de aminoácidos, o adiciones de aminoácidos o alguna combinación de las mismas, en las que la expresión del producto génico AveC resultante en la célula de *S. avermitilis* produce una reducción deseable en la proporción de avermectinas B2:B1.

Pueden llevarse a cabo mutaciones en el alelo de aveC o variante degenerada del mismo por cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos, incluyendo mediante el uso de PCR propensa a errores o por mutagénesis con casete. Por ejemplo, puede emplearse mutagénesis dirigida con oligonucleótidos para alterar la secuencia del alelo de aveC o la ORF de una forma definida, tal como, por ejemplo, para introducir uno o más sitios de restricción, o un codón de terminación, en regiones específicas dentro del alelo u ORF de aveC. Procedimientos tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.605.793, Patente de Estados Unidos N° 5.830.721 y Patente de Estados Unidos N° 5.837.458, que implican fragmentación aleatoria, ciclos repetidos de mutagénesis y transposición de nucleótidos, pueden usarse también para generar grandes bibliotecas de polinucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos que codifican mutaciones de aveC.

Pueden ser útiles mutaciones dirigidas, particularmente cuando sirven para alterar uno o más restos de aminoácidos conservados en el producto génico AveC. Por ejemplo, una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del producto génico AveC de *S. avermitilis* (SEC ID N°: 2) con productos génicos homólogos de AveC de *S. griseochromogenes* (SEC ID N°: 5) y *S. hygroscopicus* (SECID N°: 4), como se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.248.579, indica sitios de conservación significativa de restos de aminoácidos entre estas especies. La mutagénesis dirigida que conduce a un cambio en uno o más de estos restos de aminoácidos conservados puede ser eficaz en la producción de nuevas cepas mutantes que presenten alteraciones deseables en la producción de avermectina.

También puede ser útil la mutagénesis aleatoria, y puede llevarse a cabo exponiendo células de *S. avermitilis* a radiación ultravioleta o rayos X, o a mutagénesis química tal como *N*-metil-*N'*-nitrosoguanidina, metano sulfonato de etilo, ácido nitroso o mostazas de nitrógeno. Véase, por ejemplo, Ausubel, 1989, anteriormente, para una revisión de técnicas de mutagénesis.

Una vez se generan moléculas polinucleotídicas mutadas, se exploran para determinar si pueden modular la biosíntesis de avermectina en *S. avermitilis*. En una realización preferida, una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos mutada se ensaya por complementación de una cepa de *S. avermitilis* en la que el gen aveC se ha inactivado para dar un fondo negativo para aveC (aveC⁻). En un procedimiento no limitante, la

molécula polinucleotídica mutada se corta y empalma en un plásmido de expresión en asociación operativa con uno o más elementos reguladores, comprendiendo también preferentemente dicho plásmido uno o más genes de resistencia farmacológica para permitir la selección de células transformadas. Este vector se transforma después en células huésped *aveC* usando técnicas conocidas, y las células transformadas se seleccionan y se cultivan en medios de fermentación apropiados en condiciones que permitan o induzcan la producción de avermectina, por ejemplo, incluyendo subunidades iniciadoras apropiadas en el medio, y cultivando en condiciones óptimas para la producción de avermectina como se conocen en la técnica. Después, los productos de fermentación se analizan mediante HPLC para determinar la capacidad de la molécula polinucleotídica mutada para complementar la célula huésped. Se ejemplifican en la Sección 8.3 a continuación varios vectores plasmídicos que llevan moléculas polinucleotídicas mutadas capaces de reducir la proporción de avermectinas B2:B1, incluyendo pSE188, pSE199, pSE231, pSE239 y de pSE290 a pSE297. Se enumeran otros ejemplos de dichos vectores plasmídicos en la FIGURA 6.

Cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente de la presente invención puede llevarse a cabo usando medios de cultivo de fermentación preferentemente complementados con ácido ciclohexano carboxílico, aunque también pueden usarse otros precursores de ácidos grados apropiados, tales como uno cualquiera de los precursores de ácidos grasos enumerados en la TABLA 1, o ácido metililoláctico.

Una vez que se ha identificado una molécula polinucleotídica mutada que module la producción de avermectina en una dirección deseable, la localización de la mutación en la secuencia de nucleótidos puede determinarse. 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 análisis de la secuencia de ADN usando procedimientos conocidos. Por comparación de la secuencia de ADN del alelo de *aveC* mutado con la del alelo de *aveC* de tipo silvestre, la mutación o mutaciones responsables de la alteración en la producción de avermectina pueden determinarse. Por ejemplo, los productos génicos AveC de *S. avermitilis* que comprenden sustituciones de un solo aminoácido en cualquier de los restos 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T) o 230 (G230D) o dobles sustituciones en las posiciones 138 (S138T) y 139 (A139T o A139F), producían cambios en la función del producto génico AveC de modo que la proporción de avermectinas de clase 2:1 producidas se alteraba (véase la Sección 8, a continuación), en los que las posiciones de aminoácidos enumeradas corresponden a las presentadas en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 2). Además, se ha demostrado que cada una de las siete combinaciones de mutaciones siguientes reduce eficazmente la proporción de avermectinas de clase 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. La presente solicitud desvela cincuenta y nueve (59) combinaciones adicionales de mutaciones que se demuestra que reducen la proporción de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1, y éstas se presentan en la FIGURA 6 y algunas se enumeran en las reivindicaciones adjuntas.

Como se usan en el presente documento, las designaciones mencionadas anteriormente, tales como A139T, indican el resto de aminoácido original mediante designación por una sola letra, que en este ejemplo es alanina (A), en la posición indicada, que en este ejemplo es la posición 139 (en referencia a la SEC ID N°: 2) del polipéptido, seguido por el resto de aminoácido que sustituye al resto de aminoácido original, que en este ejemplo es treonina (T).

Como se usa en el presente documento, cuando se hace referencia a un resto de aminoácido codificado por un alelo de *aveC* en el cromosoma de *S. avermitilis*, o en un vector o molécula polinucleotídica aislada de la presente invención, como "correspondiente a" un resto de aminoácido particular de la SEC ID N°: 2, o cuando se hace referencia a una sustitución de aminoácido como que se produce en una posición particular "correspondiente a" la de un resto de aminoácido enumerado específico de la SEC ID N°: 2, esto pretende referirse al resto de aminoácido en la misma localización relativa en el producto génico AveC, que el experto en la materia puede determinar fácilmente por referencia a la secuencia de aminoácidos presentada en el presente documento como SEC ID N°: 2.

Como se usa en el presente documento, cuando se enumeran mutaciones específicas en el alelo de *aveC* que codifican mutaciones particulares como cambios de bases en posiciones de nucleótidos específicas en el alelo de *aveC* "correspondientes a" posiciones de nucleótidos particulares como se muestran en la SEC ID N°: 1, o cuando se hace referencia de otro modo a una posición de nucleótido en el alelo de *aveC* como "correspondiente a" una posición de nucleótido particular en la SEC ID N°: 1, esto pretende referirse al nucleótido en la misma localización relativa en la secuencia de nucleótidos de *aveC* o una variante degenerada de la misma, que el experto en la materia puede determinar fácilmente por referencia a la secuencia de nucleótidos presentada en el presente documento como SEC ID N°: 1.

Como se usa en el presente documento para referirse a proporciones de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1, el término "aproximadamente" se refiere al valor numérico indicado específicamente más o menos el 10% de ese valor indicado.

Una molécula polinucleotídica de la presente invención puede estar "aislada", lo que significa que está: (i) purificada en la medida en que esté sustancialmente libre de otras moléculas polinucleotídicas que tengan diferentes secuencias de nucleótidos, o (ii) presente en un entorno en el que no aparecería de forma natural, por ejemplo, cuando un alelo de *aveC* de *S. avermitilis* o una versión mutada del mismo, está presente en una célula distinta a una célula de *S. avermitilis*, o (iii) presente en una forma en la que no aparecería de forma natural, por ejemplo,

como un fragmento más corto de ADN, tal como un fragmento de restricción obtenido por digestión de un cromosoma bacteriano, que comprende predominantemente la región codificante de *aveC* o una versión mutada de la misma, con o sin cualquier secuencia reguladora asociada de la misma, o como posteriormente integrada en un fragmento heterólogo de ADN, tal como el cromosoma de una célula bacteriana (distinta de una célula de *S. avermitilis*) o el ADN de un vector tal como un plásmido o fago, o integrada en el cromosoma de *S. avermitilis* en un locus distinto del alelo de *aveC* nativo.

La presente invención proporciona además un vector recombinante que comprende una molécula polinucleotídica de la presente invención. Dicho vector recombinante puede usarse para dirigir cualquiera de las moléculas polinucleotídicas que comprenden secuencias de nucleótidos mutadas de la presente invención al sitio del alelo de *aveC* del cromosoma de *S. avermitilis* para insertar en o reemplazar la ORF de *aveC* o una porción de la misma, por ejemplo, por 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 con la presente invención también puede funcionar para modular la biosíntesis de avermectina cuando se inserta en el cromosoma de *S. avermitilis* en un sitio distinto del alelo de *aveC*, o cuando se mantiene episomalmente en células de *S. avermitilis*. Por lo tanto, la presente invención proporciona además vectores que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos mutada de la presente invención, pudiendo dichos vectores 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 no limitante, el vector es un vector de reemplazo de genes que puede usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado o variante degenerada del mismo de acuerdo con la presente invención en células de una cepa de *S. avermitilis*, generando éste nuevo nuevas cepas de *S. avermitilis*, cuyas células pueden producir avermectinas en una proporción de clase 2:1 reducida en comparación con células de la misma cepa que en su lugar expresan solamente el alelo de *aveC* de tipo silvestre. Dichos vectores de reemplazo de genes pueden construirse usando moléculas polinucleotídicas mutadas presentes en vectores de expresión proporcionados con el presente documento, tales como los vectores de expresión ejemplificados en la Sección 8 a continuación.

La presente invención proporciona además vectores que pueden usarse para insertar un alelo de *aveC* mutado o variante degenerada del mismo en células de una cepa de *S. avermitilis* para generar nuevas cepas de células que produzcan cantidades alteradas de avermectinas en comparación con células de la misma cepa que en su lugar expresan solamente el alelo de *aveC* de tipo silvestre. En una realización preferida, la cantidad de avermectinas producidas por las células se aumenta. En una realización específica aunque no limitante, dicho vector comprende un promotor fuerte como se conocen en la técnica, tal como, por ejemplo, el promotor constitutivo fuerte de *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea*, que está situado cadena arriba de y en asociación operativa con la ORF de *aveC*. Dichos vectores pueden construirse usando el alelo de *aveC* mutado del plásmido pSE189, y de acuerdo con procedimientos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.248.579.

La presente invención proporciona vectores de reemplazo de genes que son útiles para inactivar el gen *aveC* en una cepa de tipo silvestre de *S. avermitilis*. En una realización no limitante, dichos vectores de reemplazo de genes pueden construirse usando la molécula polinucleotídica mutada presente en el plásmido pSE180 (ATCC 209605) que se ejemplifica en la Sección 8.1 a continuación (FIGURA 3). La presente invención proporciona además vectores de reemplazo de genes que comprenden una molécula polinucleotídica que comprende o consiste en secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural el gen *aveC in situ* en el cromosoma de *S. avermitilis*, incluyendo, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos flanqueantes mostradas en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1), cuyos vectores pueden usarse para delecionar la ORF de *aveC* de *S. avermitilis*.

La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende una molécula polinucleotídica o vector recombinante de la presente invención. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota capaz de usarse como huésped para la molécula polinucleotídica o vector recombinante. En una realización preferida, la célula huésped es una célula bacteriana. En una realización más preferida, la célula huésped es una célula de *Streptomyces*. En una realización más preferida, la célula huésped es una célula de *Streptomyces avermitilis*.

La presente invención proporciona además un procedimiento para generar una cepa de *Streptomyces avermitilis*, que comprende (i) mutar el alelo de *aveC* en una célula de una cepa de *S. avermitilis*, dando como resultado dicha mutación una combinación de sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC o (ii) introducir en una célula de una cepa de *S. avermitilis* un alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada del mismo, que codifica un producto génico AveC que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos, en el que las células que comprenden el alelo de *aveC* mutado o variante degenerada son capaces de producir avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 en una proporción de 0,2:1 o menos, y en el que las combinaciones de sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones tanto en D48 como en G179, en el que la combinación de sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:

(ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;

(ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;

- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- 5 (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- 10 (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; y
- 15 (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

Mutando de este modo el alelo de *aveC* o introduciendo de este modo un alelo de *aveC* mutado o variante degenerada del mismo, de acuerdo con las etapas enumeradas anteriormente, se genera una nueva cepa de *S. avermitilis*.

- 20 La presente invención proporciona además una célula de una especie de *Streptomyces*, que comprende un alelo de *aveC* de *S. avermitilis* mutado o una variante degenerada del mismo, que codifica un producto génico AveC que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- 25 (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- 30 (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- 35 (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; y
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

Aunque cualquiera de las mutaciones enumeradas puede estar presente en las células de la presente invención en un elemento extracromosómico tal como un plásmido, se prefiere que dichas mutaciones estén presentes en una secuencia codificante de *aveC* integrada en el cromosoma de *S. avermitilis* y, preferentemente, aunque no necesariamente, en el sitio del alelo de *aveC* nativo.

- 5 Dichas nuevas cepas de células son útiles en la producción a gran escala de avermectinas comercialmente deseables tales como doramectina.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar las células de *S. avermitilis* de la presente invención en medios de cultivo en condiciones que permitan o induzcan la producción de avermectinas a partir de las mismas, y recuperar dichas avermectinas del cultivo. En una realización preferida, las células usadas en el procedimiento producen avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 en una proporción de aproximadamente 0,20:1 o menos.

El procedimiento de la invención proporciona una eficacia aumentada en la producción de avermectinas comercialmente valiosas, tales como doramectina.

15 La presente solicitud desvela además una composición de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 producidas por células de *Streptomyces avermitilis*, que comprende las avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 presentes en un medio de cultivo en el que las células se han cultivado, en la que la proporción de las avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 presentes en el medio de cultivo es de 0,35:1 o menos, preferentemente de aproximadamente 0,30:1 o menos, más preferentemente de aproximadamente 0,25:1 o menos, más preferentemente de aproximadamente 0,20:1 o menos. En particular, la composición de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 se produce por células de una cepa de *S. avermitilis* que expresan un alelo de *aveC* mutado o variante degenerada del mismo que codifica un producto génico que da como resultado la reducción en la proporción de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 producidas por las células en comparación con células de la misma cepa de *S. avermitilis* que no expresan el alelo de *aveC* mutado pero en su lugar expresan solamente el alelo de *aveC* de tipo silvestre.

25 Aunque se prefiere que la nueva composición de avermectina esté presente en un medio de cultivo en el que las células se han cultivado, por ejemplo, en fluido de cultivo de fermentación parcialmente o totalmente agotado, la composición de avermectina puede como alternativa purificarse parcialmente o sustancialmente a partir del fluido de cultivo por técnicas de purificación bioquímicas conocidas tales como por precipitación con sulfato de amonio, diálisis, fraccionamiento por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, etc.

Además de generar nuevas cepas de *S. avermitilis* que comprenden células que son capaces de producir proporciones reducidas de ciclohexil B2:ciclohexil B1 como se ha descrito anteriormente, la presente solicitud contempla que puedan incorporarse mutaciones adicionales en células de *S. avermitilis* para mejorar adicionalmente las características de la producción de avermectina. En una realización no limitante, las células de la presente invención pueden comprender además modificaciones para aumentar el nivel de producción de avermectinas. En una realización, dichas células pueden prepararse por (i) mutación del alelo de *aveC* en una célula de *S. avermitilis* o (ii) introducción de un alelo de *aveC* mutado o variante degenerada del mismo en células de una cepa de *S. avermitilis*, en la que la expresión del alelo mutado da como resultado un aumento la cantidad de avermectinas producidas por células de una cepa de *S. avermitilis* que expresa el alelo de *aveC* mutado en comparación con células de la misma cepa que en su lugar expresan solamente un único alelo de *aveC* de tipo silvestre, y la selección de células transformadas que produzcan avermectinas en una cantidad aumentada en comparación con la cantidad de avermectinas producidas por células de la cepa que en su lugar expresan solamente el único alelo de *aveC* de tipo silvestre. Por ejemplo, el alelo de *aveC* puede modificarse de modo que comprenda un promotor fuerte, tal como el promotor constitutivo fuerte de *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea*, insertado cadena arriba de y en asociación operativa con la ORF de *aveC*. En otra realización, pueden introducirse una o más mutaciones en los genes *aveR1* y/o *aveR2* de *S. avermitilis*, aumentando de este modo el nivel de producción de avermectina como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.197.591 para Stutzman-Engwall y col., expedida el 6 marzo de 2001.

5.4. Usos de avermectinas

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

Más específicamente, los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención son eficaces contra nematodos que infectan a seres humanos, así como los que infectan a diversas especies de

animales. Dichos nematodos incluyen parásitos gastrointestinales tales como *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Enterobius*, *Dirofilaria* y parásitos que se encuentran en la sangre u otros tejidos u órganos, tales como helmintos filarias y los estados de extracto intestinal de *Strongyloides* y *Trichinella*.

5 Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención también son útiles en el tratamiento de infecciones ectoparasitarias, incluyendo, por ejemplo, infestaciones por artrópodos de mamíferos y aves, causadas por garrapatas, ácaros, piojos, pulgas, moscardones, insectos picadores o larvas migratorias de dípteros que pueden afectar a ganado bovino y caballos, entre otros.

10 Los compuestos de avermectina producidos de acuerdo con la presente invención también son útiles como insecticidas contra plagas domésticas, tales como, por ejemplo, cucarachas, polillas de la ropa, escarabajo de alfombras y la mosca doméstica entre otras, así como plagas de insectos del grano almacenado y de plantas agrícolas, incluyendo dichas plagas arácnidos, ácaros, áfidos, orugas y ortópteros tales como langostas entre otros.

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

20 Un compuesto de avermectina producido de acuerdo con la presente invención se administra en una formulación apropiada para el uso específico deseado, la especie particular de animal huésped que se trate y el parásito o insecto implicado. Para su uso como parasitocida, un 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 como una unción dorsal continua o por inyección o como un implante. Dichas formulaciones se preparan de una forma convencional de acuerdo con la práctica veterinaria convencional. Por lo tanto, pueden prepararse cápsulas, bolos o comprimidos mezclando el principio activo con un diluyente o vehículo adecuado finamente dividido que contiene además un agente disgregante y/o aglutinante tal como almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio, etc. Una formulación de poción puede prepararse dispersando el principio activo en una solución acuosa junto con un agente dispersante o humectante, etc. Las formulaciones inyectables pueden prepararse en forma de una solución estéril, que puede contener otras sustancias tales como, por ejemplo, sales y/o glucosa suficientes para hacer que la solución sea isotónica con la sangre.

25 Dichas formulaciones variarán con respecto al peso de compuesto activo dependiendo del paciente o de la especie de animal huésped a tratar, de la gravedad y tipo de infección y del peso corporal del huésped. Generalmente, para administración oral, una dosis de compuesto activo de aproximadamente 0,001 a 10 mg por kg de paciente o peso corporal animal administrada como una sola dosis o en dosis divididas durante un periodo de 1 a 5 días será satisfactoria. Sin embargo, puede haber casos en los que estén indicados intervalos de dosificación superiores o inferiores, según se determine, por ejemplo, por un médico o veterinario, basándose en los síntomas clínicos.

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

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

40 **6. Ejemplo: Fermentación de *Streptomyces avermitilis* y análisis de avermectina B2:B1**

Las cepas que carecen de actividades tanto 5-O-metiltransferasa como 2-oxo ácido deshidrogenasa de cadena ramificada no producen avermectinas si el medio de fermentación no se complementa con ácidos grasos. Este ejemplo demuestra que en dichos mutantes puede obtenerse una amplia variedad de proporciones de avermectinas B2:B1 cuando la biosíntesis se inicia en presencia de diferentes ácidos grasos.

45 **6.1. Materiales y Procedimientos**

El *Streptomyces avermitilis* ATCC 53692 se almacena a -70°C como un caldo completo preparado en medio de siembra que consistía en: Almidón (Nadex, Laing National) - 20 g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamina 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 autoclavó a 121°C durante 25 min.

50 Se usaron dos ml de una suspensión descongelada de la preparación anterior para inocular un matraz que contenía 50 ml del mismo medio. Después de 48 h de incubación a 28°C en un agitador rotatorio a 180 rpm, se usaron 2 ml del caldo para inocular un matraz que contenía 50 ml de un medio de producción que consistía en: Almidón - 80 g; carbonato cálcico - 7 g; Pharmamedia - 5 g; hidrogenofosfato dipotásico - 1 g; sulfato de magnesio - 1 g; ácido glutámico - 0,6 g; sulfato ferroso heptahidrato - 0,01 g; sulfato de cinc - 0,001 g; sulfato de manganeso - 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 autoclavó a 121°C durante 25 min.

Diversos sustratos de ácido carboxílico (véase la TABLA 1) se disolvieron en metanol y se añadieron al caldo de fermentación 24 h 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 el caldo se centrifugó (2.500 rpm durante 2 min) y el sobrenadante se desechó. El sedimento micelial se extrajo con acetona (15 ml), después con diclorometano (30 ml), y la fase orgánica se separó, se filtró, 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 matriz de diodos de exploración ajustado a 240 nm. La columna usada era una columna Beckman Ultrasphere C-18, 5 µm, 4,6 mm x 25 cm mantenida a 40°C. Se inyectaron veinticinco µl de la solución de metanol anterior sobre la columna. La elución se realizó con un gradiente lineal de metanol-agua de 80:20 a 95:5 durante 40 min a 0,85/ml min. Se usaron dos concentraciones patrón de ciclohexil B1 para calibrar la respuesta del detector y se midieron las áreas bajo las curvas para las avermectinas B2 y B1.

6.2. Resultados

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

TABLA 1

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

Los datos presentados en la TABLA 1 demuestran un intervalo extremadamente amplio de proporciones de productos de avermectina B2:B1, indicando una diferencia considerable en los resultados de la conversión deshidratante de compuestos de clase 2 en compuestos de clase 1, dependiendo de la naturaleza de la unidad iniciadora de cadena lateral de ácido graso suministrada. Esto indica que los cambios en las proporciones de B2:B1 que se obtienen como resultado de alteraciones en la proteína AveC pueden ser específicos para sustratos particulares. Por consiguiente, la exploración para mutantes que presenten cambios en la proporción de B2:B1 obtenida con un sustrato particular tiene que realizarse en presencia de ese sustrato. Los ejemplos posteriores descritos a continuación usan ácido ciclohexanocarboxílico como sustrato de exploración. Sin embargo, este sustrato se usa simplemente para ejemplificar el potencial, y no pretende limitar la aplicabilidad de la presente invención.

7. Ejemplo: Aislamiento del gen *aveC*

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

7.1. Materiales y Procedimientos

7.1.1. Cultivo de *Streptomyces* para aislamiento de ADN

Se siguió el procedimiento siguiente para cultivar *Streptomyces*. Se aislaron colonias individuales de *S. avermitilis* ATCC 31272 (aislado de colonia individual nº 2) en YPD-6 de 1/2 potencia que contenía: Extracto de Levadura Difco - 5 g; Bacto-peptona Difco - 5 g; dextrosa - 2,5 g; MOPS - 5 g; Bacto agar Difco - 15 g. El volumen final se ajustó a 1 litro con dH₂O, el pH se ajustó a 7,0 y el medio se autoclavó a 121°C durante 25 min.

Los micelios crecidos en el medio anterior se usaron para inocular 10 ml de medio TSB (Caldo de Tripticasa Soja Difco - 30 g, en 1 litro de dH₂O, autoclavado a 121°C durante 25 min) en un tubo de 25 mm x 150 mm que se mantuvo con agitación (300 rpm) a 28°C durante 48-72 h.

7.1.2. Aislamiento de ADN cromosómico de *Streptomyces*

- 5 Se pusieron alícuotas (0,25 ml o 0,5 ml) de micelios crecidos 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 s. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 0,25 ml de tampón TSE (20 ml de sacarosa 1,5 M, 2,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 2,5 ml de EDTA 1 M, pH 8,0 y 75 ml de dH₂O que contenía lisozima 2 mg/ml. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 min con agitación, se cargaron en un instrumento de aislamiento de ácido nucleico automático AutoGen 540™ (Integrated Separation Systems, Natick, MA) y el ADN genómico se aisló usando el Ciclo 159 (programa informático del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 15 Como alternativa, se pusieron 5 ml de micelios en un tubo de 17 mm x 100 mm, las células se concentraron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min 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 min y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón TSE que contenía lisozima 2 mg/ml y se incubaron a 37°C con agitación durante 30-60 min. Después de la incubación, se añadieron 0,5 ml de dodecil sulfato sódico al 10% (SDS) y las células se incubaron a 37°C hasta completarse la lisis. El lisado se incubó a 65°C durante 10 min, se enfrió a temperatura ambiente, se dividió en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml y se extrajo 1x con 0,5 ml de fenol/cloroformo (fenol al 50% previamente equilibrado con Tris 0,5 M, pH 8,0; cloroformo al 50%). La fase acuosa se retiró y se extrajo de 2 a 5x con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó por adición de 1/10 volumen de acetato sódico 3M pH 4,8, incubación de la mezcla en hielo durante 10 min, centrifugación de la mezcla a 15.000 rpm a 5°C durante 10 min y retirada del sobrenadante a un tubo limpio al que se añadió 1 volumen de isopropanol. El sobrenadante más la mezcla de isopropanol se incubaron después en hielo durante 20 min, se centrifugaron a 15.000 rpm durante 20 min a 5°C, se retiró el sobrenadante y el sedimento de ADN se lavó 1 x con etanol al 70%. Después de secarse el sedimento, el ADN se resuspendió en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

7.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico de *Streptomyces*

- Se puso una alícuota (1,0 ml) de micelios en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 s. Se desechó el sobrenadante, 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 s y se desechó el sobrenadante. Después, las células se resuspendieron en 0,25 ml de tampón TSE que contenía lisozima 2 mg/ml y se incubaron a 37°C durante 20 min con agitación y se cargaron en el instrumento de aislamiento de ácido nucleico automático AutoGen 540™. Se aisló el ADN plasmídico usando el Ciclo 106 (programa informático del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 35 Como alternativa, se pusieron 1,5 ml de micelios en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y las células se concentraron por centrifugación a 12.000 x g durante 60 s. Se desechó el sobrenadante, 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 s y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón TSE que contenía lisozima 2 mg/ml y se incubaron a 37°C durante 15-30 min. 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 min o hasta que la solución fuera transparente. Se añadió acetato sódico (0,1 ml, 3M, pH 4,8) a la solución de ADN, que después se incubó en hielo durante 10 min. Las muestras de ADN se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min a 5°C. Se retiró el sobrenadante a un tubo limpio y se añadieron 0,2 ml de fenol:cloroformo (fenol al 50%:cloroformo al 50%) y se agitó suavemente. La solución de ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min a 5°C y la fase superior se retiró a un tubo Eppendorf limpio. Se añadió isopropanol (0,75 ml) y la solución se mezcló suavemente y después se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. La solución de ADN se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 5°C, se retiró el sobrenadante 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*

- 50 Se inoculó una sola colonia de *E. coli* transformada en 5 ml de medio de Luria-Bertani (LB) (Bacto-Tryptona - 10 g, Bacto-extracto de levadura - 5 g, y NaCl - 10 g en 1 litro de dH₂O, pH 7,0, autoclavado a 121°C durante 25 min y complementado con ampicilina 100 µg/ml). 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 de aislamiento de ácido nucleico automático AutoGen 540™ y el ADN plasmídico se aisló usando el Ciclo 3 (programa informático del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.1.5. Preparación y transformación de protoplastos de *S. avermitilis*

- 55 Se aislaron colonias individuales de *S. avermitilis* en YPD-6 de 1/2 potencia. 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 h. Se usó un ml de micelios para inocular 50 ml de medio YEME. El medio YEME contiene por litro: Extracto de Levadura Difco - 3 g; Bacto-peptona Difco - 5 g; Extracto de Malta Difco - 3 g; Sacarosa - 300 g. Después de

autoclavar a 121°C durante 25 min, se añadió lo siguiente: MgCl_2 2,5 M · 6 H_2O (autoclavado por separado 121°C durante 25 min) - 2ml; y glicina (20%) (esterilizada por filtración) - 25 ml.

Los micelios se cultivaron a 30°C durante 48-72 h y se recogieron por centrifugación en un tubo de centrífuga de 50 ml (Falcon) a 3.000 rpm durante 20 min. 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 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; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 10 H_2O - 10 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 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 de un filtro de 0,45 micrómetros.

Los micelios se sedimentaron a 3.000 rpm durante 20 min, se desechó el sobrenadante y los micelios se resuspendieron en 20 ml de tampón P que contenía lisozima 2 mg/ml. Los micelios se incubaron a 35°C durante 15 min con agitación y se comprobaron microscópicamente para determinar el grado de formación de protoplastos. Cuando se completó la formación de protoplastos, los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min. 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 min, se retiró el sobrenadante, 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 min, se retiró el sobrenadante y los protoplastos se resuspendieron en 0,1 ml de tampón P. Se añadieron de dos a 5 μg de ADN de transformación a los protoplastos, seguido inmediatamente de la adición de 0,5 ml de tampón T de trabajo. La base del tampón T contiene: PEG-1000 (Sigma) - 25 g; sacarosa - 2,5 g; H_2O - 83 ml. El pH se ajustó a 8,8 con NaOH 1 N (esterilizado por filtración) y la base de tampón T se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C. El tampón T de trabajo preparado el mismo día que se usó era base de tampón T - 8,3 ml; K_2PO_4 (4 mM) - 1,0 ml; CaCl_2 2 H_2O (5 M) - 0,2 ml; y TES (1 M, pH 8) - 05, ml. Cada componente del tampón T de trabajo se esterilizó por filtración individualmente.

En los 20 s siguientes a la adición de tampón T a los protoplastos también se añadió 1,0 ml de tampón P y los protoplastos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y los protoplastos se resuspendieron en 0,1 ml de tampón P. Los protoplastos se pusieron después en placas en medio RM14 que contiene: sacarosa 205 g; K_2SO_4 - 0,25 g; MgCl_2 6 H_2O - 10,12 g; glucosa - 10 g; Casaminoácidos Difco - 0,1 g; Extracto de Levadura Difco - 5 g; Agar de harina de avena Difco - 3 g; Bacto Agar Difco - 22 g; dH_2O - 800 ml. La solución se autoclavó a 121°C durante 25 min. Después de autoclavar, se añadieron soluciones madre estériles de lo siguientes: K_2PO_4 (0,5%) - 10 ml; CaCl_2 2 H_2O (5 M) - 5 ml; L-prolina (20%) - 15 ml; tampón MES (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml; solución de oligoelementos (igual que anteriormente) - 2 ml; solución madre de cicloheximida (25 mg/ml) - 40 ml; y NaOH 1N - 2 ml. Se dividieron en alícuotas veinticinco ml de medio RM14 por placa y las placas se secaron durante 24 h antes del uso.

Los protoplastos se incubaron en una humedad del 95% a 30°C durante 20-24 h. Para seleccionar transformantes resistentes a tioestreptona, se extendió 1 ml de tampón de revestimiento que contenía 125 μg por ml de tioestreptona uniformemente sobre las placas de regeneración de RM14. El tampón de revestimiento contiene por 100 ml: sacarosa - 10,3 g; solución de oligoelementos (igual que anteriormente) - 0,2 ml; y MES (1 M, pH 6,5) - 1 ml. Los protoplastos se incubaron en humedad al 95% a 30°C durante 7-14 días hasta que eran visibles las colonias resistentes a tioestreptona (Thio^r).

7.1.6. Transformación de protoplastos de *Streptomyces lividans*

Se usó *S. lividans* TK64 (proporcionado por el John Innes Institute, Norwich, Reino Unido) para transformaciones en algunos casos. Se describen procedimientos y composiciones para cultivo, generación de protoplastos y transformación de *S. lividans* 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 el mismo. Se aisló ADN plasmídico de transformantes de *S. lividans* como se ha descrito en la Sección 7.1.3, anterior.

7.1.7. Análisis de fermentación de cepas de *S. avermitilis*

Micelios de *S. avermitilis* cultivados en YPD-6 de 1/2 potencia durante 4-7 días se inocularon en tubos de 1 x 6 pulgadas que contenían 8 ml de medio preformado y dos perlas de vidrio de 5 mm. El medio preformado contiene: almidón soluble (es decir, almidón fino hervido o KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/l; Pharmamedia - 15 g/l; Ardamina pH - 5 g/l (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO_3 - 2 g/l; 2x bcfa ("bcfa" se refiere a ácidos grasos de cadena ramificada) que contienen una concentración final en el medio de 50 ppm de ácido 2-(+/-)-metil butírico, 60 ppm de ácido isobutírico y 20 ppm de ácido isovalérico. El pH se ajustó a 7,2 y el medio se autoclavó a 121°C durante 25 min.

El tubo se agitó en un ángulo de 17° a 215 rpm a 29°C durante 3 días. Se usó una alícuota de 2 ml del cultivo de siembra para inocular un matraz Erlenmeyer de 300 ml que contenía 25 ml de medio de producción que contiene: almidón (almidón fino hervido o KOSO) - 160 g/l; Nutrisoja (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/l; Ardamina 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;

CaCO₃ - 14 g/l; 2x bcfa (como 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 autoclavó a 121°C durante 25 min. (Como se ha explicado anteriormente, pueden utilizarse en su lugar unidades iniciadoras distintas de CHC (véase, por ejemplo, la Tabla 1)).

- 5 Después de la inoculación, el matraz se incubó a 29°C durante 12 días con agitación a 200 rpm. Después de la incubación, se retiró una muestra de 2 ml del matraz, se diluyó con 8 ml de metanol, se mezcló y la mezcla se centrifugó a 1.250 x g durante 10 min para sedimentar el residuo. El sobrenadante se ensayó después mediante HPLC usando una columna Beckman Ultrasphere ODS (25 cm x 4,6 mm DI) con un caudal de 0,75 ml/min y detección mediante absorbancia a 240 nm. La fase móvil era de metanol/agua/acetonitrilo 86/8,9/5,1.

10 **7.1.8. Aislamiento de genes de PKS de *S. avermitilis***

Se preparó una biblioteca de cósmidos de ADN cromosómico de *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) y se hibridó con una sonda de cetosintasa (KS) generada a partir de un fragmento del gen de la policétido sintasa (PKS) de *Saccharopolyspora erythraea*. Puede encontrarse una descripción detallada de la preparación de bibliotecas de cósmidos en Sambrook y col., 1989, anteriormente. Se presenta una descripción detallada de la preparación de
15 genotecas de ADN cromosómico de *Streptomyces* en Hopwood y col., 1985, anteriormente. Se identificaron clones de cósmidos que contenían regiones de hibridación con cetosintasa por hibridación con un fragmento de *NdeI/Eco47III* de 2,7 Kb de pEX26 (suministrado por cortesía del 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 SeaPlaque GTG a ~0,8% (FMC BioProducts, Rockland, ME). El fragmento de *NdeI/Eco47III* de 2,7 Kb se
20 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 de *NdeI/Eco47III* de 2,7 Kb se marcó con [α -³²P]dCTP (sal de tetra(trietilamonio) de desoxicitidina 5'-trifosfato, [alfa-³²P]) (NEN-Dupont, Boston, MA) usando el Sistema de Traducción de Mellas BRL (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizó una reacción típica en un volumen de 0,05 ml. Después de la adición de 5 µl de tampón de
25 parada, 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 exploraron aproximadamente 1.800 clones de cósmidos por hibridación de colonias. Se identificaron diez clones que hibridaban fuertemente con la sonda KS de *Sacc. erythraea*. Se cultivaron colonias de *E. coli* que contenían ADN cosmidico en medio líquido LB y se aisló el ADN cosmidico de cada cultivo en el instrumento de aislamiento de
30 ácido nucleico automático AutoGen 540™ usando el Ciclo 3 (programa informático del equipo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los análisis de mapeo con endonucleasa de restricción e hibridación de transferencia de Southern pusieron de manifiesto que cinco de los clones contenían regiones cromosómicas solapantes. Se construyó un mapa de restricción con *BamHI* genómico de *S. avermitilis* de los cinco cósmidos (es decir, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) mediante análisis de los cósmidos solapantes y de las hibridaciones (FIGURA 4).

35 **7.1.9. Identificación de ADN que module las proporciones de avermectina B2:B1 e identificación de una ORF de aveC**

Se usaron los procedimientos siguientes para ensayar los fragmentos subclonados derivados del clon cosmidico pSE66 para determinar su capacidad para modular las proporciones de avermectina B2:B1 en mutantes de AveC. Se digirió el pSE66 (5 µg) con *SacI* y *BamHI*. La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa SeaPlaque™
40 GTG al 0,8% (FMC BioProducts), se escindió un fragmento de *SacI/BamHI* de 2,9 Kb del gel después de la electroforesis y el ADN se recuperó del gel usando GELase™ (Epicentre Technologies) usando el Protocolo Rápido. Se digirieron aproximadamente 5 µg del vector lanzadera pWHM3 (Vara y col., 1989, J. Bacteriol. 171: 5872-5881) con *SacI* y *BamHI*. Aproximadamente 0,5 µg del inserto de 2,9 Kb y 0,5 µg del pWHM3 digerido se mezclaron juntos y se incubaron durante una noche con 1 unidad de ligasa (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) a 15°C en un
45 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 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para transformar células *E. coli* DH5a competentes (BRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aisló el ADN plasmídico a partir de transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto de *SacI/BamHI* de 2,9 Kb por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE119.

50 Se prepararon protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* 1100-SC38 (cepa propia del laboratorio Pfizer) y se transformaron con pSE119 como se ha descrito en la Sección 7.1.5 anterior. La cepa 1100-SC38 es un mutante que produce significativamente más de la forma de avermectina ciclohexil-B2 en comparación con la forma de avermectina ciclohexil-B1 cuando se complementa con ácido ciclohexano carboxílico (B2:B1 de aproximadamente 30:1). El pSE119 usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* se aisló de la cepa de *E. coli* GM2163
55 (obtenida del Dr. B. J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), de la cepa de *E. coli* DM1 (BRL) o de la cepa de *S. lividans* TK64. Se aislaron transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa 1100-SC38 y se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los transformantes de la cepa de *S. avermitilis* 1100-SC38 que contenían pSE119 producían una proporción alterada de avermectina ciclohexil-B2:ciclohexil-B1 de aproximadamente 3.7:1 (TABLA 2).

Habiéndose establecido que pSE119 era capaz de modular las proporciones de avermectina B2:B1 en un mutante de AveC, se secuenció el ADN del inserto. Se aislaron aproximadamente 10 µg de pSE119 usando un kit de aislamiento de ADN plasmídico (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron usando un Secuenciador de ADN Automático ABI 373A (Perkin Elmer, Foster City, CA). Los datos de secuencia se ensamblaron y se editaron usando programas del Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). La secuencia de AND y la ORF de aveC se presentan en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1).

Se construyó un nuevo plásmido denominado pSE118 de la forma siguiente. 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 de *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. Aproximadamente 5 µg del vector lanzadera pWHM3 se digirieron con *BamHI*. Aproximadamente 0,5 µg del inserto de 2,8 Kb y 0,5 µg del pWHM3 digerido se mezclaron juntos y se incubaron durante una noche con 1 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 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se usaron para transformar células *E. coli* DH5a competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto de *SphI/BamHI* de 2,8 Kb se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE118. El ADN de inserto en pSE118 y pSE119 solapa en aproximadamente 838 nucleótidos (FIGURA 4).

Se transformaron protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* 1100-SC38 con pSE118 como anteriormente. Se aislaron los transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa 1100-SC38 y se analizaron mediante análisis de HPLC de los productos de fermentación. Los transformantes de la cepa 1100-SC38 de *S. avermitilis* que contenían pSE118 no se alteraron en las proporciones de avermectina ciclohexil-B2:avermectina ciclohexil-B1 en comparación con la cepa 110-SC38 (TABLA 2).

7.1.10. Amplificación por PCR del gen aveC a partir de ADN cromosómico de *S. avermitilis*

Se aisló un fragmento de -1,2 Kb que contenía la ORF de aveC a partir de ADN cromosómico de *S. avermitilis* mediante amplificación por PCR usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos de aveC obtenida anteriormente. Los cebadores de PCR se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador hacia la derecha era: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEC ID N°: 6); y el cebador hacia la izquierda era: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEC ID N°: 7). La reacción de PCR se llevó a cabo con polimerasa Deep Vent™ (New England Biolabs) en el tampón proporcionado por el fabricante y en presencia de 300 µM de dNTP, glicerol al 10%, 200 pmol de cada cebador, 0,1 µg de molde y 2,5 unidades de enzima en un volumen final de 100 µl usando un termociclador Perkin-Elmer Cetus. El perfil térmico del primer ciclo era de 95°C durante 5 min (etapa de desnaturalización), 60°C durante 2 min (etapa de hibridación) y 72°C durante 2 min (etapa de extensión). Los 24 ciclos posteriores tenían un perfil térmico similar excepto por que la etapa de desnaturalización se acortó hasta 45 s y la etapa de hibridación se acortó hasta 1 min.

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 a partir del gel y se ligó con 25 ng de vector pCR-Blunt de extremos romos linealizado (Invitrogen) en una proporción molar de vector respecto a inserto de 1:10 siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se usó para transformar células de *E. coli* competentes One Shot™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló de transformantes resistente a ampicilina y la presencia del inserto de -1,2 Kb se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE179.

El ADN de inserto de pSE179 se aisló por digestión con *BamHI/XbaI*, se separó por electroforesis, se purificó a partir del gel y se ligó con el vector lanzadera pWHM3, que también se había digerido con *BamHI/XbaI* en una concentración de ADN total de 1 µg en una proporción molar de vector respecto a inserto de 1:5. La mezcla de ligación se usó para transformar células de *E. coli* DH5a competentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aisló ADN plasmídico a partir de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto de -1,2 Kb se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE186 (FIGURA 2, ATCC 209604), se transformó en *E. coli* DM1 y el ADN plasmídico se aisló a partir de los transformantes resistentes a ampicilina.

7.2. Resultados

Se identificó un fragmento de *SacI/BamHI* de 2,9 Kb de pSE119 que, cuando se transformó en la cepa de *S. avermitilis* 1100-SC38, alteraba significativamente la proporción de producción de avermectina B2:B1. La cepa de *S. avermitilis* 1100-SC38 tenía normalmente una proporción de B2:B1 de aproximadamente 30:1, pero cuando se transformaba con un vector que comprendía el fragmento de *SacI/BamHI* de 2,9 Kb, la proporción de avermectina B2:B1 disminuía hasta aproximadamente 3,7:1. El análisis post-fermentación de cultivos de transformantes verificó la presencia del ADN de transformación.

El fragmento de pSE119 de 2,9 Kb se secuenció y se identificó una ORF de ~0,9 Kb (FIGURA 1) (SEC ID N°: 1), que incluye un fragmento de *PstI/SphI* que se había mutado previamente en otra parte para producir productos B2 solamente (Ikeda y col., 1995, anteriormente). Una comparación de esta ORF, o de su polipéptido deducido

correspondiente, frente a bases de datos conocidas (GenEMBL, SWISS-PROT) no mostró ninguna fuerte homología con secuencias de ADN o proteína conocidas.

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

5

TABLA 2

Cepa de <i>S. avermitilis</i> (plásmido de transformación)	Nº transformantes ensayados	Prom. proporción B2:B1
1100-SC38 (ninguno)	9	30,66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31,3
1100-SC38 (pSE119)	12	3,7
1100-SC38 (pSE118)	12	30,4
1100-SC38 (pSE185)	14	27,9

8. Ejemplo: Construcción de mutantes de AveC de *S. avermitilis*

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

10

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

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

15

En el primer procedimiento, se sustituyó un fragmento de *SphI/PstI* de 640 pb interno al gen *aveC* en pSE119 (plásmido descrito en la Sección 7.1.9 anteriormente) con el gen *ermE* (para resistencia a eritromicina) de *Sacc. erythraea*. El gen *ermE* se aisló de pJ4026 (proporcionado por el John Innes Institute, Norwich, Reino Unido; véase también Bibb y col., 1985, Gene 41: 357-368) por digestión con enzimas de restricción con *BglII* y *EcoRI*, seguida por electroforesis, y se purificó a partir del gel. Este fragmento de ~1,7 Kb se ligó en pGEM7Zf (Promega) que se había digerido con *BamHI* y *EcoRI*, y la mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α competentes siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia del inserto de ~7 Kb por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE27.

20

25

El pSE118 (descrito en la Sección 7.1.9, anteriormente) se digirió con *SphI* y *BamHI*, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto de *SphI/BamHI* de ~2,8 Kb se purificó a partir del gel. Se digirió el pSE119 con *PstI* y *EcoRI*, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto de *PstI/EcoRI* de ~1,5 Kb se purificó a partir del gel. El vector lanzadera pWHM3 se digirió con *BamHI* y *EcoRI*. El pSE27 se digirió con *PstI* y *SphI*, el producto de digestión se sometió a electroforesis y el inserto de *PstI/SphI* de ~1,7 Kb se purificó a partir del gel. Los cuatro fragmentos (es decir, ~2,8 Kb, ~1,5 Kb, ~7,2 Kb, ~1,7 Kb) se ligaron juntos en una ligación de 4 vías. La mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5a competentes siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló a partir de 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).

30

35

Se transformó el pSE180 en *S. lividans* TK64 y las colonias transformadas se identificaron por resistencia a tioestreptona y eritromicina. El pSE180 se aisló de *S. lividans* y se usó para transformar protoplastos de *S. avermitilis*. Se identificaron cuatro transformantes de *S. avermitilis* resistentes a tioestreptona y los protoplastos se prepararon y se pusieron en placas en condiciones no selectivas en medios RM14. Después de que los protoplastos se hubieran regenerado, se exploraron colonias individuales para determinar la presencia de resistencia a eritromicina y la ausencia de resistencia a tioestreptona, indicando la integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y la pérdida del replicón libre. Se identificó un transformante Erm Thio^s y se denominó cepa SE180-11. Se aisló el ADN cromosómico total de la cepa SE180-11, se digirió con enzimas de restricción *BamHI*, *HindIII*, *PstI* o *SphI*, se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con la sonda de *ermE*. Estos análisis mostraron que la integración cromosómica del gen de resistencia *ermE* y la delección concomitante del fragmento de *PstI/SphI* de 640 pb se habían producido por un acontecimiento cruzado doble. El análisis de HPLC de los productos de fermentación de la cepa SE180-11 mostró que ya no se producían las avermectinas normales (FIGURA 5A).

40

45

En un segundo procedimiento para inactivar el gen *aveC*, el gen *ermE* de 1,7 Kb se eliminó del cromosoma de la

cepa de *S. avermitilis* SE180-11, dejando una delección de *PstI/SphI* de 640 pb en el gen *aveC*. Se construyó un plásmido de reemplazo de genes de la forma siguiente: el pSE180 se digirió parcialmente con *XbaI* y se purificó un fragmento de ~11,4 Kb a partir del gel. La banda de ~11,4 Kb carece del gen de resistencia *ermE* de 1,7 Kb. Después, el ADN se ligó y se transformó en células de *E. coli* DH5a. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE184, se transformó en *E. coli* DM1 y el ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina. Este plásmido se usó para transformar protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* SE180-11. Los protoplastos se prepararon a partir de transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa SE180-11 y se pusieron en placas como colonias individuales en RM14. Después de que los protoplastos se hubieran regenerado, se exploraron las colonias individuales para determinar la ausencia tanto de resistencia a eritromicina como de resistencia a tioestreptona, indicando la integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y la pérdida del replicón libre que contenía el gen *ermE*. Se identificó un transformante *Erm^S Thio^S* y se denominó SE184-1-13. El análisis de fermentación de SE184-1-13 mostró que no se producían avermectinas normales y que el SE184-1-13 tenía el mismo perfil de fermentación que el SE180-11.

En un tercer procedimiento para inactivar el gen *aveC*, se introdujo un desplazamiento de fase de lectura en el gen *aveC* cromosómico por adición de dos G después de la C en la posición de nucleótido 471 usando PCR, creando de este modo un sitio *BspE1*. La presencia del sitio *BspE1* introducido por ingeniería genética era útil en la detección del acontecimiento de reemplazo de genes. Los cebadores de PCR estaban diseñados para introducir una mutación de desplazamiento de fase de lectura en el gen *aveC* y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. El cebador hacia la derecha era: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEC ID N°: 8) y el cebador hacia la izquierda era: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEC ID N°: 9). Las condiciones de PCR eran como se han descrito 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 a partir del gel.

El plásmido de reemplazo de genes se construyó de la forma siguiente: se digirió el vector lanzadera pWHM3 con *EcoRI* y *BamHI*. El pSE119 se digirió con *BamHI* y *SphI*, el producto de digestión se sometió a electroforesis y un fragmento de ~840 pb se purificó a partir del gel. El pSE119 se digirió con *EcoRI* y *XmnI*, el producto de digestión se resolvió por electroforesis y se purificó un fragmento de ~1,7 Kb a partir del gel. Los cuatro fragmentos (es decir, ~7,2 Kb, ~840 pb, ~1,7 Kb y 388 pb) se ligaron juntos en una ligación de 4 vías. La mezcla de ligación se transformó en células *E. coli* DH5a competentes. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Este plásmido, que se denominó pSE185, se transformó en *E. coli* DM1 y el ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina. Este plásmido se usó para transformar protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* 110-SC38. Los transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa 110-SC38 se aislaron y se analizaron por análisis de HPLC de los productos de fermentación. El pSE185 no alteraba significativamente las proporciones de avermectina B2:B1 cuando se transformó en la cepa de *S. avermitilis* 110-SC38 (TABLA 2).

El pSE185 se usó para transformar protoplastos de *S. avermitilis* para generar una mutación de desplazamiento de fase de lectura en el gen *aveC* cromosómico. Los protoplastos se prepararon a partir de transformantes resistentes a tioestreptona y se sembraron en placas como colonias individuales en RM14. Después de que los protoplastos se hubieran regenerado, se exploraron las colonias individuales para determinar la ausencia de resistencia a tioestreptona. El ADN cromosómico de las colonias sensibles a tioestreptona se aisló y se exploró por PCR para determinar la presencia de la mutación de desplazamiento de fase de lectura 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 era: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEC ID N°: 10) y el cebador de PCR hacia la izquierda era: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEC ID N°: 11), y las condiciones de PCR eran como se han descrito en la Sección 7.1.10 anteriormente. El producto de PCR obtenido era de 543 pb y, cuando se digirió con *BspE1*, se observaron tres fragmentos de 368 pb, 96 pb y 79 pb, indicando la integración cromosómica del gen *aveC* inactivado y la pérdida del replicón libre.

El análisis de fermentación de mutantes de *S. avermitilis* que contenían la mutación de desplazamiento de fase de lectura en el gen *aveC* mostró que ya no se producían las avermectinas normales y que estos mutantes tenían el mismo perfil de fermentación por HPLC que las cepas SE180-11 y SE184-1-13. Se identificó un transformante *Thio^S* y se denominó cepa SDE185-5a.

Además, se produjo una mutación en el gen *aveC* que cambia la posición de nucleótido 520 de G a A, lo que da como resultado el 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 tanto: (i) la posición de nucleótido 970 de G a A, lo que cambia el aminoácido en la posición 266 de una glicina (G) a un aspartato (D), y (ii) la posición de nucleótido 996 de T a C, lo que cambia el aminoácido en la posición 275 de tirosina (Y) a histidina (H). Una cepa de *S. avermitilis* con estas mutaciones (G266D/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 *aveC* de *S. avermitilis* SE180-11, SE184-1-13 y SE185-5a y otras proporcionadas con el presente documento proporcionan herramientas de exploración para evaluar el impacto de otras mutaciones en el gen *aveC*. El pSE186, que contiene una copia de tipo silvestre del gen *aveC*, se transformó en *E. coli* DM1 y el ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina. Este ADN de pSE186 se usó para transformar protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* SE180-11. Se aislaron los transformantes resistentes a tioestreptona 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* funcional en trans era capaz de restaurar la producción normal de avermectina en la cepa SE180-11 (FIGURA 5B).

8.2. Análisis de mutaciones en el gen *aveC* que alteran las proporciones de clase B2:B1

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

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 mediante amplificación por PCR usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos de *aveC*. El cebador hacia la derecha era SEC ID N°: 6 y el cebador hacia la izquierda era SEC ID N°: 7 (véase la Sección 7.1.10, anteriormente). Las condiciones de PCR y de subclonación eran como se han descrito en la Sección 7.1.10. El análisis de la secuencia de ADN de la ORF de 1,2 Kb muestran una mutación en el gen *aveC* que cambia la posición de nucleótido 337 de C a T, lo que cambia el aminoácido en la posición 55 de serina (S) a fenilalanina (F). El gen *aveC* que contenía 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 de *S. avermitilis* SE180-11. Los transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa SE180-11 se aislaron, 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* que codifica un cambio en el resto de aminoácido 55 (S55F) era capaz de restaurar la producción de avermectina normal en la cepa SE180-11 (FIGURA 5C); sin embargo, la proporción de ciclohexil B2:ciclohexil B1 era de aproximadamente 26:1 en comparación con la cepa SE180-11 transformada con pSE186, que tenía una proporción una B2:B1 de aproximadamente 1,6:1 (TABLA 3), indicando que la mutación única (S55F) modula la cantidad de ciclohexil B2 producida respecto a ciclohexil-B1.

Se identificó otra mutación en el gen *aveC* que cambia la posición de nucleótido 862 de G a A, lo que cambia el aminoácido en la posición 230 de glicina (G) a aspartato (D). Una cepa de *S. avermitilis* que tiene esta mutación (G230D) produce avermectinas en una proporción de B2:B1 de aproximadamente 30:1.

8.3. Mutaciones que reducen la proporción de B2:B1

Se construyeron varias mutaciones que reducen la cantidad de ciclohexil B2 producida respecto a ciclohexil-B1, de la forma siguiente.

Se identificó una mutación en el gen *aveC* que cambia la posición de nucleótido 588 de G a A, lo que cambia el aminoácido en la posición 139 de alanina (A) a treonina (T). El gen *aveC* que contiene 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 de *S. avermitilis* SE180-11. Se aislaron transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes Thio^r Erm^r se analizaron mediante análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado que codifica un cambio en el resto de aminoácido 139 (A139T) era capaz de restaurar la producción de avermectina en la cepa SE180-11 (FIGURA 5D); sin embargo, la proporción de B2:B1 era de aproximadamente 0,94:1, indicando que esta mutación reduce la cantidad de ciclohexil-B2 producida respecto a ciclohexil-B1. Este resultado era inesperado porque los resultados publicados, así como los resultados de las mutaciones descritas anteriormente, han demostrado únicamente la inactivación del gen *aveC* o la producción aumentada de la forma B2 de avermectina respecto a la forma B1 (TABLA 3).

Debido a que la mutación A139T alteraba las proporciones de B2:B1 en la dirección más favorable para B1, se construyó una mutación que codificaba una treonina en lugar de una serina en la posición de aminoácido 138. Por lo tanto, el 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 *Apal* y *KpnI*, los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa y dos fragmentos de -3,8 Kb y -0,4 Kb se purificaron a partir del gel. El ADN de inserto de -1,2 Kb de pSE186 se usó como molde de PCR para introducir un cambio de una sola base en la posición de nucleótido 585. Los cebadores de PCR estaban diseñados para introducir una mutación en la posición de nucleótido 585 y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha era: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCAGAGGCGGAAATGCCCTGGCGACG-3' (SEC ID N°: 12); y el cebador de PCR hacia la izquierda era: 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEC ID N°: 13). La reacción de PCR se llevó a cabo usando un kit de PCR genómica 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 molde de ADN, GC-Melt 1,0 M

y 1 unidad de Mezcla de Polimerasa KlenTaq en un volumen final de 50 µl. El perfil térmico del primer ciclo era de 94°C durante 1 min; seguido de 25 ciclos de 94°C durante 30 s y 68°C durante 2 min; y 1 ciclo a 68°C durante 3 min. Se digirió un producto de PCR de 295 pb con *Apal* y *KpnI* para liberar un fragmento de 254 pb, que se resolvió por electroforesis y se purificó a partir del gel. Los tres fragmentos (-3,8 Kb, -0,4 Kb y 254 pb) se ligaron juntos en una

ligación de 3 vías. La mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5α competentes. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE198.

El pSE198 se digirió con *EcoRI*, se clonó en pWHM3 que se había digerido con *EcoRI* y se transformó en células *E. coli* DH5a. El ADN plasmídico se aisló a partir de 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 transformó en *E. coli* DM1, el ADN plasmídico se aisló de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE199, se usó para transformar protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* SE180-11. Se aislaron los transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes Thio^r Erm^r se analizaron mediante análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* mutado que codifica un cambio en el resto de aminoácido 138 (A138T) era capaz de restaurar la producción normal de avermectina en la cepa SE180-11; sin embargo, la proporción de B2:B1 era de 0,88:1, indicando que esta mutación reduce la cantidad de ciclohexil-B2 producida respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3). Esta proporción de B2:B1 es incluso inferior a la proporción de 0,94:1 observada con la mutación A139T producida por 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 tanto 138 como 139. El ADN de inserto de ~1,2 Kb de TSE1 86 se usó como molde de PCR. Los cebadores de PCR estaban diseñados para introducir mutaciones en las posiciones de nucleótidos 585 y 588 y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha era: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEC ID N°: 14); y el cebador de PCR hacia la izquierda era: 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEC ID N°: 15). La reacción de PCR se realizó usando las condiciones descritas inmediatamente anteriormente en la presente Sección. Se digirió un producto de PCR de 449 pb con *Apal* y *KpnI* para liberar un fragmento de 254 pb, que se resolvió por electroforesis y se purificó a partir del gel. El pSE186a se dirigió con *Apal* y *KpnI*, los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa y dos fragmentos de -3,8 Kb y -0,4 Kb se purificaron a partir del gel. Los tres fragmentos (-3,8 Kb, -0,4 Kb y 254 pb) se ligaron juntos en una ligación de 3 vías y la mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5α competentes. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE230.

El pSE230 se digirió con *EcoRI* y se clonó en pWHM3 que se había digerido con *EcoRI*, y se transformó en células de *E. coli* DH5a. El ADN plasmídico se aisló a partir de 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 transformó en *E. coli* DM1, el ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se confirmó por análisis de restricción. Este plásmido, que se denominó pSE231, se usó para transformar protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* SE180-11. Se aislaron los transformantes resistentes a tioestreptona de 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* doblemente mutado que codifica S138T/A139T era capaz de restaurar la producción normal de avermectina en la cepa SE180-11; sin embargo, la proporción de B2:B1 era de 0,84:1, mostrando que esta mutación reduce adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3), sobre 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 respecto a ciclohexil-B1. Debido a que las mutaciones S138T/A139T alteraban las proporciones de B2:B1 en la dirección más favorable para 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 de inserto de ~1,2 Kb de pSE186 se usó como molde de PCR. Los cebadores de PCR estaban diseñados para introducir mutaciones en las posiciones de nucleótidos 585 (cambiando una T a A), 588 (cambiando una G a T) y 589 (cambiando una C a T) y se suministraron por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). El cebador de PCR hacia la derecha era: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTCC-3' (SEC ID N°: 16); y el cebador de PCR hacia la izquierda era: 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEC ID N°: 15). La reacción de PCR se llevó a cabo usando un kit de PCR genómica Advantage GC (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) en el tampón proporcionado por el fabricante en presencia de dNTP 200 µM, 200 pmol de cada cebador, 50 ng de ADN de molde, acetato de Mg 1,1 mM, GC-Melt 1,0 M y 1 unidad de ADN Polimerasa Tth en un volumen final de 50 µl. El perfil térmico del primer ciclo era de 94°C durante 1 min; seguido de 25 ciclos de 94°C durante 30 s y 68°C durante 2 min; y 1 ciclo a 68°C durante 3 min. Se digirió un producto de PCR de 449 pb con *Apal* y *KpnI* para liberar un fragmento de 254 pb, que se resolvió por electroforesis y se purificó a partir del gel. Los tres fragmentos (-3,8 Kb, -0,4 Kb y 254 pb) se ligaron juntos en una ligación de 3 vías. La mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5a competentes. El ADN plasmídico se aisló a partir de transformantes resistentes a ampicilina y la presencia del inserto correcto se

confirmó por análisis de restricción. Este plásmido se denominó pSE238.

El pSE238 se digirió con *EcoRI*, se clonó en pWHM3 que se había digerido con *EcoRI* y se transformó en células de *E. coli* DH5a. El ADN plasmídico se aisló a partir de 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 transformó en *E. coli* DM1, el ADN plasmídico se aisló a partir de 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 de *S. avermitilis* SE180-11. Se aislaron los transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa SE180-11, se determinó la presencia de resistencia a eritromicina y los transformantes Thio^r Erm^r se analizaron mediante análisis de HPLC de los productos de fermentación. La presencia del gen *aveC* doblemente mutado que codifica S138T/A139F era capaz de restaurar la producción normal de avermectina en la cepa SE180-11; sin embargo, la proporción de B2:B1 era de 0,75:1, mostrando que esta mutación reducía adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida respecto a ciclohexil-B1 (TABLA 3) sobre 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 de transformación)	Nº transformantes ensayados	Conc. relativa B2	Conc. relativa B1	Prom. proporción B2:B1
SE180-11 (ninguno)	30	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	26	222	140	1,59
SE180-11 (pSE187)	12	283	11	26,3
SE180-11 (pSE188)	24	193	206	0,94
SE180-11 (pSE199)	18	155	171	0,88
SE180-11 (pSE231)	6	259	309	0,84
SE180-11 (pSE239)	20	184	242	0,75

Se construyeron mutaciones adicionales para reducir adicionalmente la cantidad de ciclohexil-B2 producida respecto a ciclohexil-B1 usando la técnica de transposición de ADN que se describe en Stemmer, 1994, Nature 370: 389-391; y Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751; y descrita adicionalmente en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; y 5.837.458.

Los plásmidos de ADN transpuesto que contenían genes *aveC* mutados se transformaron en células de *E. coli dam dcm* competentes. Se aisló el ADN plasmídico a partir de transformantes resistentes a ampicilina y se usó para transformar protoplastos de la cepa de *S. avermitilis* SE180-11. Los transformantes resistentes a tioestreptona de la cepa SE180-11 se aislaron y se exploraron para determinar la producción de avermectinas con una proporción de ciclohexil-B2:ciclohexil-B1 de 1:1 o menos. Se determinó la secuencia de ADN del ADN plasmídico de los transformantes con SE180-11 que producían avermectinas con una proporción de B2:B1 de 1:1 o menos.

Se identificaron ocho transformantes que producían cantidades reducidas de ciclohexil-B2 respecto a ciclohexil-B1. La menor proporción de B2:B1 conseguida entre estos transformantes era de 0,40:1 (TABLA 4). Se aisló ADN plasmídico a partir de cada uno de los ocho transformantes y se determinó la secuencia de ADN para identificar las mutaciones en el gen *aveC*. Las mutaciones eran las siguientes.

El 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 de aminoácido 48 de D a E y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 438 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 89 de A a T. La proporción de B2:B1 producida por células que llevan este plásmido era de 0,42:1 (TABLA 4).

El 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 de aminoácido 138 de S a T, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 139 de A a T, y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 708 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 179 de G a S. La proporción de B2:B1 producida por células que llevan este plásmido era de 0,57:1 (TABLA 4).

El pSE292 contiene las mismas cuatro mutaciones de nucleótidos que el pSE290. La proporción de B2:B1 producida por células que llevan este plásmido era de 0,40:1 (TABLA 4).

El 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 nucleótido en la posición de nucleótido 286 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 38 de Q a P, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 580 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 136 de L a P, y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 886 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 238 de E a D. La proporción de B2:B1 producida por células que llevan este plásmido era de 0,68:1 (TABLA 4).

El pSE294 contiene 6 mutaciones de nucleótidos en el nucleótido 469 de T a C, en la posición de nucleótido 585 de T a A, en la posición de nucleótido 588 de G a A, en la posición de nucleótido 708 de G a A, en la posición de nucleótido 833 de C a T y en la posición de nucleótido 1184 de G a A. Además, están deletados los nucleótidos en las posiciones 173, 174 y 175. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 469 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 99 de F a S, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 585 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 138 de S a T, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 139 de A a T y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 708 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 179 de G a S. La proporción de B2:B1 producida por células que llevan este plásmido era de 0,53:1 (TABLA 4).

El pSE295 contiene 2 mutaciones de nucleótidos en el nucleótido 588 de G a A y en el nucleótido 856 de T a C. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 139 de A a T y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 856 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 228 de M a T. La proporción de B2:B1 producida por células que llevan este plásmido era de 0,80:1 (TABLA 4).

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

El pSE297 contiene 4 mutaciones de nucleótidos en la posición de nucleótido 377 G a T, en la posición de nucleótido 588 de G a A, en la posición de nucleótido 633 de A a G y en la posición de nucleótido 1067 de A a T. El cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 588 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 139 de A a T, el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 633 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 154 de K a E y el cambio de nucleótido en la posición de nucleótido 1067 cambia el aminoácido en la posición de aminoácido 298 de Q a H. La proporción de B2:B1 producida por células que llevan este plásmido era de 0,67:1 (TABLA 4).

TABLA 4

Cepa de <i>S. avermitilis</i> (plásmido de transformación)	Nº transformantes ensayados	Conc. relativa B2	Conc. relativa B1	Prom. proporción B2:B1
SE180-11 (ninguno)	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

Se realizó una ronda adicional de transposición de ADN para reducir adicionalmente la cantidad de avermectina ciclohexil-B2 producida respecto a la avermectina ciclohexil-B1 de la forma siguiente.

Transposición semisintética

El mejor clon se transpuso usando el procedimiento descrito en la Publicación Internacional PCT WO 97/20078 por Maxygen Inc. Oligonucleótidos individuales que codifican sustituciones beneficiosas que se corresponden mejor con una proporción de B2:B1 disminuida se añadieron a la reacción de transposición en un exceso de 5 molar sobre las cadenas de molde de aveC. Cada emparejamiento erróneo de nucleótido del oligonucleótido estaba flanqueado por 20 nucleótidos de perfecta identidad para asegurar una incorporación apropiada durante la reacción de transposición. Los oligonucleótidos se adquirieron en Operon Technologies (Alameda, CA).

Cultivo HTP de *S. avermitilis*

Se escogieron clones independientes de las placas de transformación y se inocularon en 200 µl de medio R5 (Kieser, T., y col., "Practical Streptomyces Genetics", 2000, Norwich, Reino Unido, John Innes Foundation) en placas de siembra de 96 pocillos profundos y se cultivaron a 30°C con agitación. En cada pocillo se dispensó una perla de vidrio para la dispersión de micelios y la agitación del cultivo. Durante este tiempo, los cultivos alcanzaron un crecimiento uniforme y denso. Después de 4-5 días, se dispensaron 20 µl del cultivo de medio de siembra en placas de producción y el volumen restante se congeló como placas maestras a -80°C después de la adición de glicerol a la concentración final del 20%. Las placas de producción se incubaron a 30°C en humedad durante 12-14 días. La esporulación de las cepas se produjo después de 5-8 días de incubación. Las placas de producción se prepararon esencialmente como se describe en la Publicación Internacional PCT WO 99/41389 por Pfizer Inc., con la excepción de la adición de agarosa al 1% para asegurar una superficie sólida.

Extracción y exploración por IEN-EM/EM

Se añadió un total de 1 ml de acetato de etilo a cada pocillo y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recuperaron aproximadamente 750 µl de la fase de acetato de etilo, se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se puso a evaporar durante una noche. El precipitado se resuspendió en 100 µl de metanol NaCl 1 mM del que se inyectaron 5 µl de solución en un espectrómetro de masas mediante un aparato de automuestreo en un formato de 96 pocillos y se analizaron directamente en la fase de inyección de flujo sin cromatografía líquida u otra separación. Los compuestos se ionizaron mediante ionización por electronebulización y se controlaron dos canales separados en dos transiciones de EM/EM. La transición de EM/EM para ión tratado con sodio B1 es de m/z 921 a m/z 777 y para ión tratado con sodio B2 es de m/z 939 a m/z 795 en modo positivo. Se usó un espectrómetro de masas Finnigan TSQ-7000, Micromass Quattro-LC y un aparato de automuestreo Leap Technology Twin-Pal para esta exploración de alto rendimiento. La integración de los cromatogramas de B1 y B2 separados para cada localización de pocillo identificó las coincidencias.

Se identificaron cincuenta y siete (57) nuevas combinaciones de sustituciones de aminoácidos que pueden producir proporciones de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 de 0,35:1 o menos (FIGURA 6). Varias de estas mutaciones pueden producir proporciones de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 de aproximadamente 0,30:1 o menos; varias pueden producir proporciones de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 de aproximadamente 0,25:1 o menos y varias pueden producir proporciones de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 de aproximadamente 0,20:1 o menos. Se identificaron dos (2) nuevas mutaciones que pueden producir proporciones de avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 de 0,37 ó 0,38.

Depósito de materiales biológicos

Los plásmidos siguientes se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, Estados Unidos, el 29 de enero de 1998 y se les asignaron los siguientes números de acceso:

Plásmido	Nº de Acceso
plásmido pSE180	209650
plásmido pSE186	209604

La dirección actual de la Colección Americana de Cultivos Tipo es 10801 University Blvd, Manassas, VA, 20110, Estados Unidos.

El alcance de la presente invención no debe quedar limitado por la realización específica descrita en el presente documento, que está concebida como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención. De hecho, serán evidentes para los expertos en la materia diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, a partir de la descripción anterior y de los dibujos adjuntos.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> PFIZER PRODUCTS INC.
5	<120> GEN DE STREPTOMYCES AVERMITILIS QU DIRIGE LA PROPORCIÓN DE AVERMECTINAS B2:B1
	<130> PC23034A
	<140> PC23034A
10	<141> 12-02-2002
	<160> 16
	<170> PatentIn Ver. 2.1
15	<210> 1
	<211> 1229
	<212> ADN
	<213> Streptomyces avermitilis
20	<220>
	<221> CDS
	<222> (174)..(1085)
25	<400> 1

tcacgaaacc	ggacacacca	cacacacgaa	ggtgagacag	cgtgaaccca	tccgagccgc	60										
tcggcctgcc	caacgaacgt	gtagtagaca	cccgaaccgtc	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	
		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 Thr 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
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

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

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

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

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

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145
ctttgtgcat ggggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205
acactcctcg gttcagcgat catg 1229

```

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

```

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

```

```

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

```

<210> 3
 <211> 1150
 <212> ADN
 <213> Streptomyces hygrosopicus

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

<400> 3

```

gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggccgata ccgtacgcgg cctgcgg      57
gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgt gtc ggc gcg ctg gtg      105
Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
1 5 10 15
ctg gga ctt cag gtg tac gtg ttc gcc gcc tgg ctc gcc gac agc gcc      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 Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
100 105 110
gtg ttc gga gcg gtg gcc tcg tgg ggg ccg tat gtg ccc ggt tgg cag      441
Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
115 120 125

```

```

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

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

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

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

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

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

gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc 777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225 230 235 240

aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg 825
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
245 250 255

gag ggc ccg agg cca tgg gtc cgg ctg ctg gcg gtg gtg ggc 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 tcg ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac ccg ctg 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 tacccgatgt 1020
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr 310

gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cgggggtgtca tcggctcacc tgtggcgccct 1080
catgcgggtga gcgtccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacggga 1140
gcggccgggg 1150

```

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

```

Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly
20 25 30
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly 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 Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
165 170 175
Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
180 185 190
val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu
195 200 205
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
210 215 220
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225 230 235 240
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
245 250 255
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Ala Val Val Gly Gly Ala
260 265 270
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu
275 280 285
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
290 295 300
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
305 310

```

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> Streptomyces griseochromogenes

<400> 5

```

val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala val Phe Leu val Leu Gln val
1 5 10 15
Tyr val Phe Ala Arg Trp Thr Ala Asp Gly Gly Tyr His Leu Ala Asp
20 25 30
val Ser Gly Pro Asp Gly Arg Glu Pro Gly His Arg Arg Ile Ile Asp
35 40 45
val Leu Leu Pro Ala Leu Ser Met Ala Gly val val Gly Leu Ala Phe
50 55 60
Trp Leu val Arg Arg Trp Arg Ala Glu Arg Arg Leu Ser Phe Asp Ala
65 70 75 80
Leu Leu Phe Thr Gly val Leu Phe Ala Gly Trp Leu Ser Pro Leu Met
85 90 95
Asn Trp Phe His Pro val Leu Met Ala Asn Thr His val Trp Gly Ala
100 105 110
val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr val Pro Gly Trp Arg Gly Leu Pro Pro
115 120 125
Gly Lys Glu Ala Glu Leu Pro Leu val Thr Phe Ser Leu Gly Ser Thr
130 135 140

```

Val Leu Leu Gly Val Leu Gly Cys Cys Gln Val Met Ser Arg Val Arg
 145 150 155 160
 Glu Arg Trp Pro Gly Val Arg Pro Trp Gln Leu Val Gly Leu Ala Phe
 165 170 175
 Leu Thr Ala Val Ala Phe Asp Leu Ser Glu Pro Phe Ile Ser Phe Ala
 180 185 190
 Gly Val Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Thr Val Thr Leu Trp Arg
 195 200 205
 Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
 210 215

5
 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis

 10
 <400> 6
 tcacgaaacc ggacacac 18

 15
 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis

 20
 <400> 7
 catgatcgct gaaccgag 18

 25
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis

 30
 <400> 8
 ggtccggat gccgttctcg 20

 35
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis

 40
 <400> 9
 aactccggtc gactcccctt c 21

 45
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis

 50
 <400> 10
 gcaaggatac ggggactac 19

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

 <400> 11
 gaaccgaccg cctgatac 18

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

ES 2 373 629 T3

<400> 12
 gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccctggcg acg 43
 5 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis
 10 <400> 13
 ggaaccgacc gcctgataca 20
 <210> 14
 <211> 46
 15 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis
 <400> 14
 gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc 46
 20 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis
 25 <400> 15
 ggaacatcac ggcattcacc 20
 <210> 16
 30 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Streptomyces avermitilis
 <400> 16
 35 gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc 46

REIVINDICACIONES

1. Una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que de otro modo es la misma que el alelo de *aveC* de *Streptomyces avermitilis*, la secuencia codificante de producto génico AveC de *S. avermitilis* del plásmido pSE186 (ATCC 209604) o la secuencia de nucleótidos de la ORF de *aveC* de *S. avermitilis* como se presenta en la FIGURA 1 (SEC ID N°: 1), o una variante de la misma que incluye uno o más cambios silentes en la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la degeneración del código genético, pero comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos además mutaciones que codifican una combinación de sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, de modo que las células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 en las que se ha inactivado el alelo de *aveC* de tipo silvestre y que expresan la molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mutada son capaces de producir una proporción de avermectinas de clase 2:1 que está reducida en comparación con la proporción producida por células de la cepa de *S. avermitilis* ATCC 53692 que en su lugar expresan solamente el alelo de *aveC* de tipo silvestre, en la que cuando las avermectinas de clase 2:1 son avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1, la proporción de avermectinas de clase 2:1 es de 0,2:1 o menos, y en la que las combinaciones de sustituciones aminoácidos comprenden sustituciones tanto en D48 como en G179, y en la que la combinación de sustituciones de aminoácidos comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:

- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; y
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

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

3. Una célula huésped que comprende el vector recombinante de la reivindicación 2, con la condición de que dicha célula huésped no sea un organismo humano.

4. La célula huésped de la reivindicación 3, que es una célula de *Streptomyces*.

5. La célula huésped de la reivindicación 4, que es una célula de *Streptomyces avermitilis*.

6. Un procedimiento para generar una cepa de *Streptomyces avermitilis*, que comprende (i) mutar el alelo de *aveC* en una célula de una cepa de *S. avermitilis*, dando dicha mutación como resultado una combinación de sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC, o (ii) introducir en una célula de una cepa de *S. avermitilis* un alelo de *aveC* mutado o variante degenerada del mismo que codifica un producto génico AveC que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos, en el que las células que comprenden el alelo de *aveC* mutado o una variante degenerada son capaces de producir avermectinas ciclohexil B2:ciclohexil B1 en una proporción de 0,2:1 o menos, y en el que las combinaciones de sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones tanto en D48 como en G179, en el que la combinación de sustituciones de aminoácidos en el producto génico AveC comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:

- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;

- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; y
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

7. Una célula de una especie de *Streptomyces* que comprende un alelo de *aveC* de *S. avermitilis* mutado como se define en la reivindicación 1, o una variante degenerada del mismo, que codifica un producto génico AveC que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; y
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

8. La célula de la reivindicación 7, que es una célula de *Streptomyces avermitilis*.

9. Un procedimiento para producir avermectinas, que comprende cultivar una cepa de las células de *Streptomyces avermitilis* de la reivindicación 8 en medios de cultivo en condiciones que permitan o induzcan la producción de avermectinas a partir de las mismas, y recuperar dichas avermectinas a partir del cultivo.

FIG. 1

FIG. 2

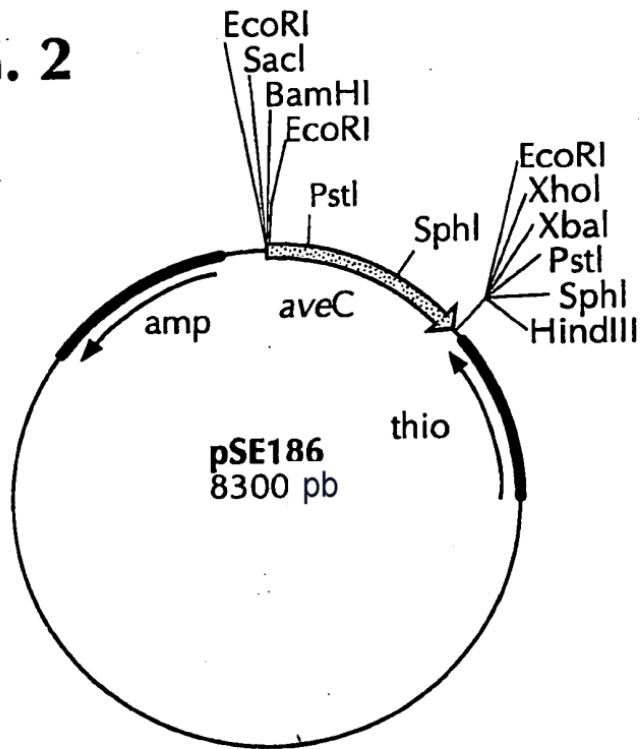
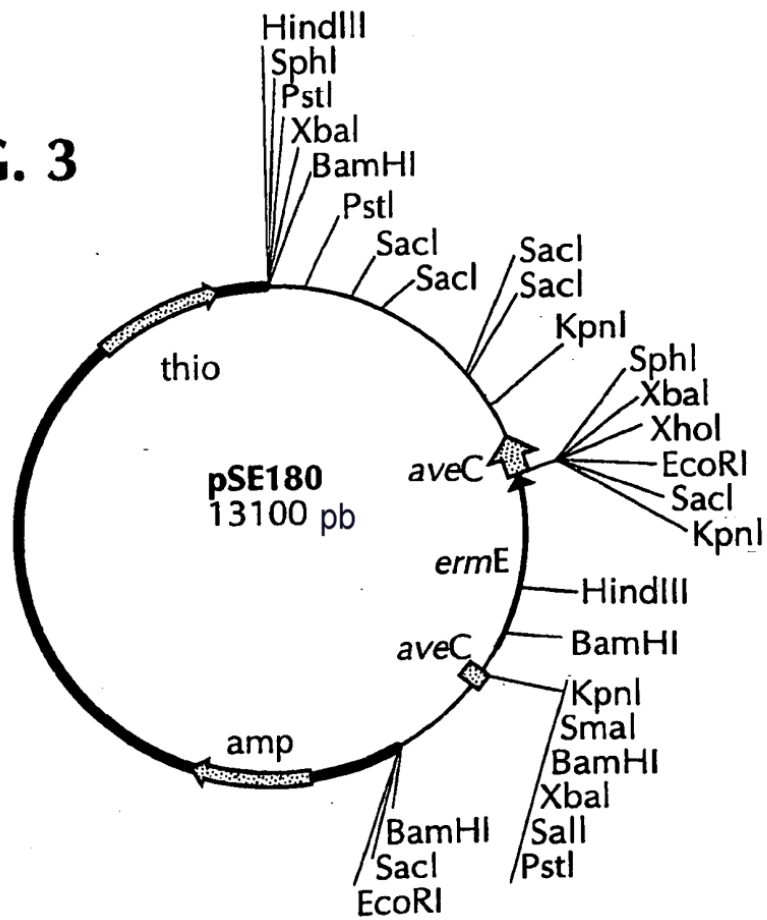


FIG. 3



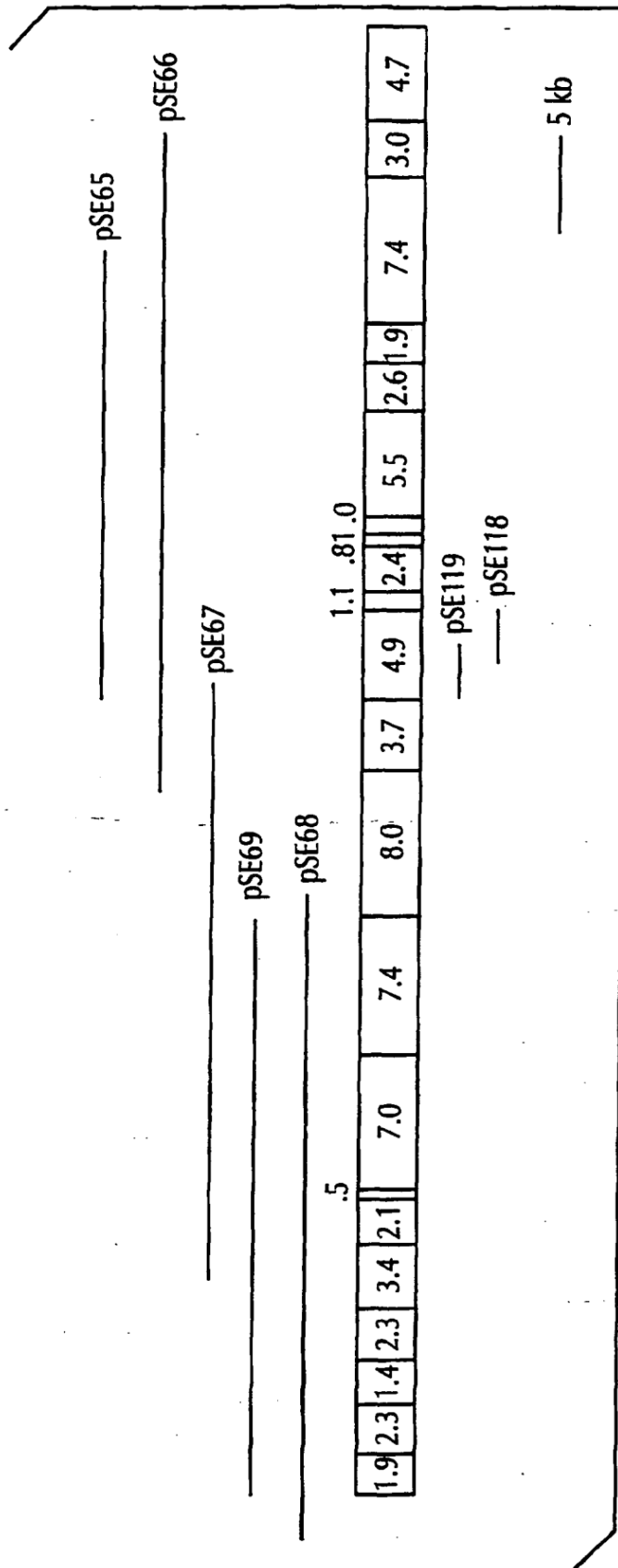


FIG. 4

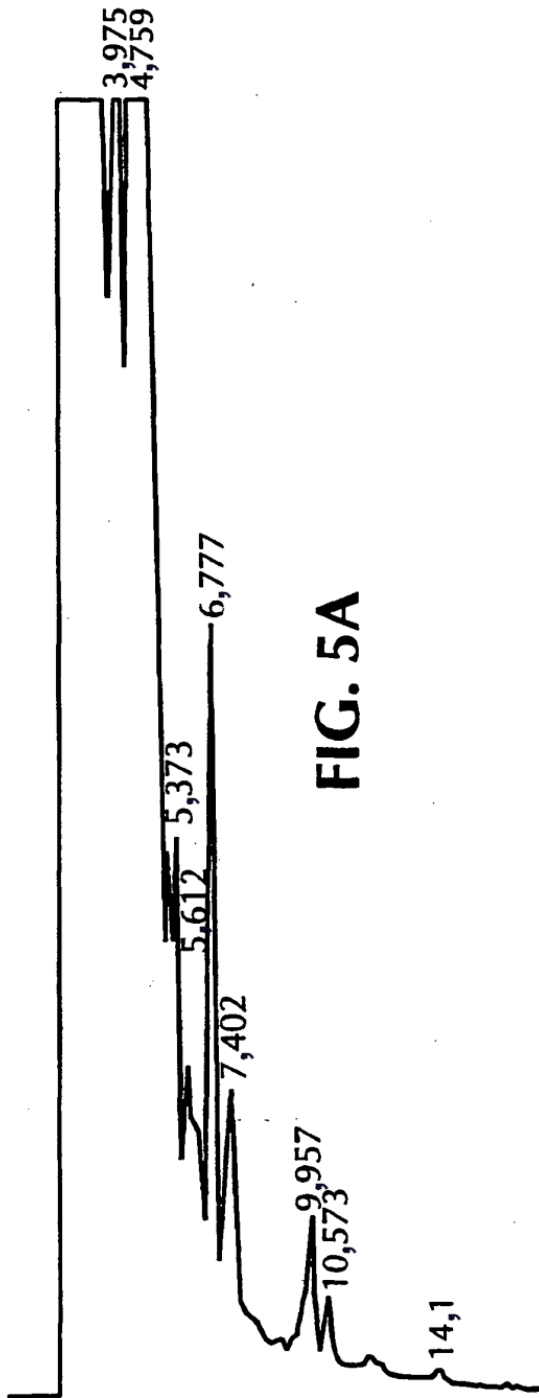


FIG. 5A

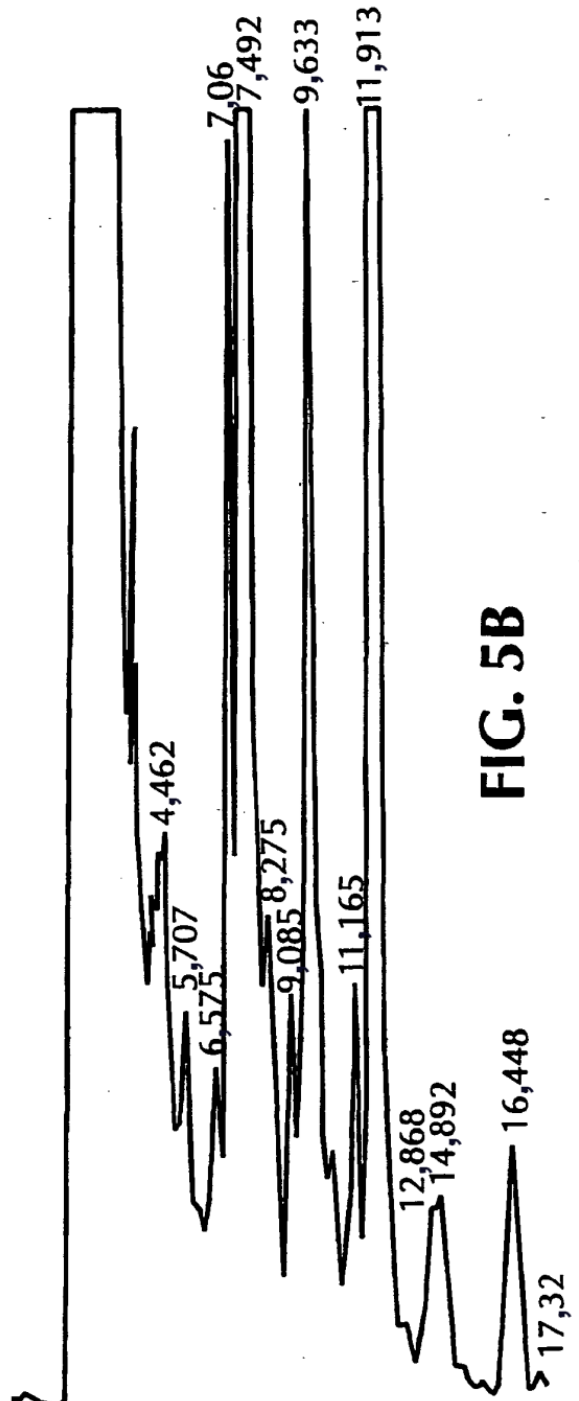


FIG. 5B

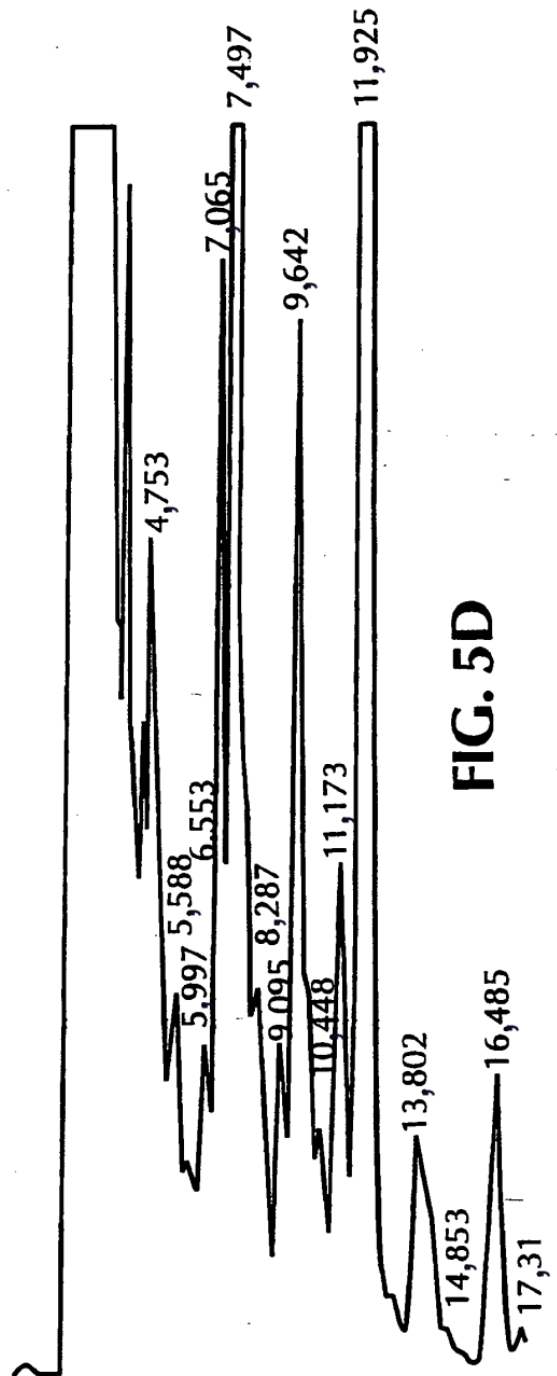
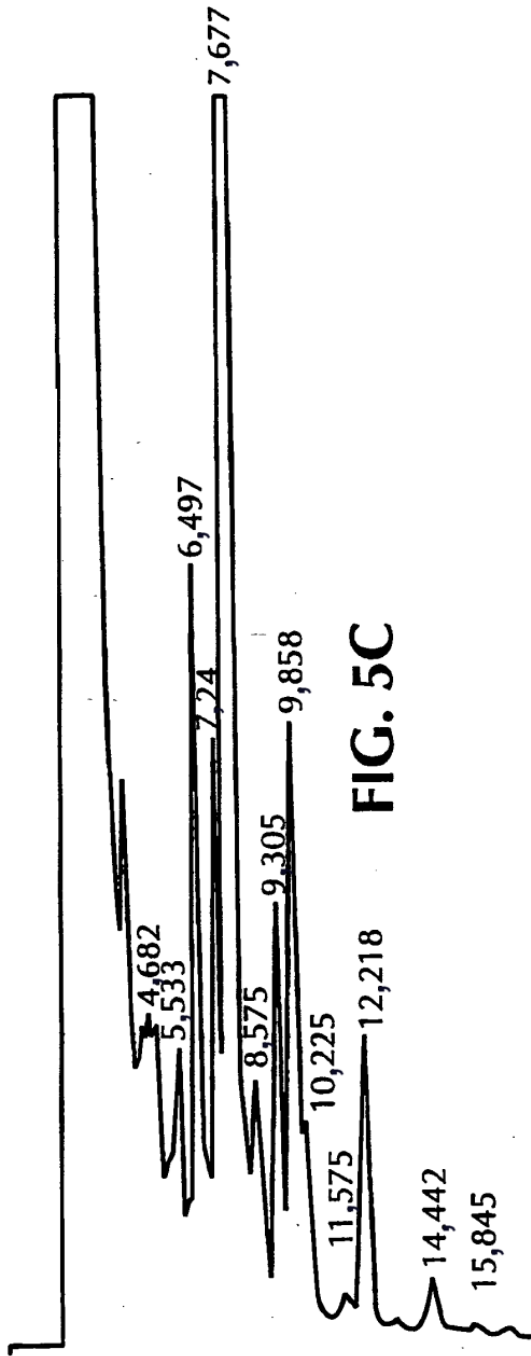


FIG. 6A

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE501	D48E, L136P, G179S, E238D	52	184	0,28
	(A132G), T317A, T580C, G708A, A887T, (A1124G)			
PSE502	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	42	204	0,2
	T317A, G438A, T580C, G708A, A887T			
pSE503	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D	32	172	0,19
	T317A, G438A, (T497C), T580C, T633C, G708A, (C775T), A887T			
PSE504	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S	44	205	0,21
	A247G, T317A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588A, T595C, T649C, G661A, G708A, (C884T)			
pSE505	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L	35	178	0,2
	T317A, G438A, T585A, G588A, A634G, G708A, T760C, A761C, C1039T			
pSE506	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	26	135	0,19
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, G589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE507	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L	18	88	0,2
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, T760C, A761C, C766G, C1039T			

FIG. 6B

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	B2/B1]
pSE508	D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D	22	91	0,24
	T317A, G438A, A441 G, T580C, G661A, G708A, A887T, (A938G)			
pSE509	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L	22	114	0,19
	(G136A), T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE510	D48E, A61T, L136P, G179S, E238D	64	211	0,30
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, A887C			
pSE511	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L	20	91	0,21
	T317A, G354A, (T416C), G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, (G775T), A887C, C1039T			
pSE512	D48E, A61T, L136P, G179S	55	88	0,29
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A			
pSE514	D48E, A89T, L136P, G179S	36	175	0,20
	(T33A), T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			
pSE515	D48E, A89T, V120A, L136P, G179S	36	189	0,19
	T317A, G438A, T532C, T580C, G708A, (T1031C)			

FIG. 6C

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE517	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D	20	99	0,20
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, C766G, A887C			
PSE518	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	11	57	0,18
	T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE519	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	40	153	0,26
	T317A, G438A, T585A, G588A, G708A			
pSE520	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	45	177	0,25
	T317A, G438A, (T497C), T585C, G588A, G708A			
pSE523	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L	37	168	0,22
	T317A, T580C, G661A, G708A, (T797C), C865T			
pSE524	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	25	137	0,18
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A, A887T			
PSE525	D48E, A89T, L136P, G179S	22	129	0,17
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			

FIG. 6D

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	[B2/B1]
pSE526	D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L,	35	135	0,26
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C777T, A887C, C1039T			
pSE527	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	31	119	0,25
	T317A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE528	D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L	50	160	0,30
	T317A, G354A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T			
pSE529	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L	26	150	0,17
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE530	D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L	37	136	0,27
	(C97T), T317A, T580C, G708A, C766G, A887C, C1039T			
pSE531	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L	27	101	0,27
	T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, C1039T			

FIG. 6E

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

FIG. 6F

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE540	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L	42	180	0,23
	G276A, T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, C1039T			
pSE541	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L	36	174	0,20
	(C266T), T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, C1039T			
pSE542	D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L	50	175	0,29
	T317A, G354A, G492A, A495G, (T497C), T580C, G708A, T747G, A887C, C1039T			
pSE543	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L	17	67	0,25
	T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T			
pSE545	D48E, L136P, G179S, R250W	37	134	0,27
	G317A, T580C, G708A, C921T			
pSE546	D48E, L136P, G179S, E238D	48	178	0,27
	G317A, T580C, G708A, A887T			
pSE547	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D	32	142	0,23
	T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C			

FIG. 6G

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

FIG. 6H

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

FIG. 6I

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE566	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S	37	154	0,24
	T317A, (C341T), G438A, (T497C), T580C, (C695T), G708A, T874C			
pSE567	D48E, L136P, R163Q, G179S, T317A, T580C, G661A, G708A	60	192	0,31
pSE568	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	48	173	0,28
	(T85C), T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, (C800T)			
pSE569	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D	59	153	0,38
	(T104C), T317A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T			
pSE570	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	73	221	0,33
	T317A, T580C, G661A, G708A, A887T			
pSE571	D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D	75	236	0,32
	(T67C), T317A, T580C, G661A, G708A, C772G, A887T			
pSE572	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	74	229	0,32
	T317A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			
pSE573	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D	39	173	0,23
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, A887T			

FIG. 6J

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE574	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	53	231	0,23
	A280G, T317A, (G359A), G438A, T580C, G708A, (T836C), A887T			
pSE575	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	49	217	0,23
	T317A, G438A, T580C, G661A, (C704T), G708A, (G965A)			
pSE576	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	44	197	0,22
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A			
pSE577	D48E, A89T, S138T, G179S	36	140	0,25
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G708A			
pSE578	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D	45	193	0,23
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			

FIG. 6K

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE582 ca	V3L, L136M	186	178	1,04
pSE583 cb	G26A, D48Y, R75W, S93N	94	88	1,07
pSE584 cc	R71L	314	293	1,07
pSE585 cd	T471, W110L, A139T	168	189	0,89
pSE586 ce	V104I, S138T, V220I, F234I	150	138	1,10
pSE587 cf	G45R, A64V, R69K	182	192	0,95
pSE588 cg	S90N	251	243	1,03
pSE589 ch	G26D, W111L, R233H	97	107	0,91
pSE590 ci	Q36R, V104I, P128S, C152W, T276A	194	171	1,13
pSE591 ci	S90N	164	147	1,12
pSE592 ck	C142Y, A302T	152	133	1,14
pSE593 cl	V2M, V56D	117	121	0,97
pSE594 cm	S41G, L87V, A139T, L206M,	122	212	0,58
pSE595 cn	A62V, A139D	150	122	1,23
pSE596 co	F176C	203	204	1,0
pSE597 cp	T149S	120	135	0,89
pSE598 cq	A64T, C142Y	105	90	1,17
pSE599 cr	A130V, C142Y, L224M, E238V, L293M	79	71	1,11
pSE600 cs	A16T, K154M, L206F	103	97	1,06

FIG. 6L

Plásmido	Mutaciones	[B2]	[B1]	[B2/B1]
pSE601 da	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, F278L, P289L	17	137	0,12
pSE602 db	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. F176C, G179S, V196A, E238D, P289L	17	87	0,19
pSE603 dc	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S. F176C, G179S, E238D, I280V	19	146	0,13
pSE604 dd	D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V	26	180	0,14
pSE605 de	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L	22	158	0,14
pSE606 df	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q	16	94	0,17
pSE607 dg	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	21	243	0,13
pSE608 dh	D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S. F176C, G179S, V196A, E238D, V285C, P289L	18	146	0,12
pSE609 di	Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	20	150	0,13
pSE610 dj	D48E, A61T, L87V, A89T, W110L,, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	14	110	0,13
pSE611 dk	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	25	184	0,14
pSE612 dl	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	132	0,12

FIG. 6M

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