

57.774/SM

K I V O N A T

Inszekticid peptidek

FMC Corporation, PHILADELPHIA, Pennsylvania,
NPS Pharmaceuticals, Inc., SALT LAKE CITY, Utah,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés napja: 1992. 02. 27.

Elsőbbsége: 1991. 03. 01. (662,373)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/01503

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/15195

A találmány tárgyát képezik Diguettia pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidek. A találmány további tárgya eljárás e peptidek előállítására és inszekticidekkénti alkalmazásukra, továbbá az ilyen inszekticid hatású peptideket kódoló DNS.

P93 02463

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



57.774/SM

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1061 Budapest, Daiszfűház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

"A"

Inszehticid peptidek

FMC Corporation, PHILADELPHIA, Pennsylvania,
NPS Pharmaceuticals, Inc., SALT LAKE CITY, Utah,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók: KRAPCHO Karen Joanne, SALT LAKE CITY,
VANWAGENEN Bradford Carr, SALT LAKE CITY,
JACKSON John Randolph Hunter, SALT LAKE CITY,
Utah, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1992. 02. 27.

Elsőbbsége: 1991. 03. 01. (662,373)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/01503

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/15195

A találmány inszekticid hatású peptidekre vonatkozik. Közélebről a találmány - többek között - *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptidekre, az ilyen inszekticid hatású peptideket kódoló DNS-re, e peptidek előállításai eljárásaira és gerinctelen kártevők elpusztításának eljárásaira vonatkozik.

Az utóbbi években a lakosság mindinkább megismeri a szintetikus inszekticidek használatával járó környezeti veszélyeket és az emlősökre gyakorolt toxikus hatásokat. Ennek eredményeként ezen rovarölő szerek felhasználása gyorsan csökkent. Nem változott azonban az igény a rovarkár elleni védekezés iránt. Ez arra ösztönözte a kutatókat, hogy új eljárásokat fejlesszenek ki a rovarkárok elleni védekezésre.

A legszélesebb körben használt mikrobiális peszticidek a *Bacillus thuringiensis*ből (a továbbiakban B.t.) származnak. Ezt a baktériális szert számos fajta levélevő hernyó, japán bogár (Japanese beetle) és szúnyog irtására használják. A 4,797,279 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás olyan hibrid baktériumsejtet ismertet, amely tartalmazza a B.t. kurstaki delta-endotoxint kódoló gént és a B.t. *tenebrionis* delta-endotoxint kódoló gént, valamint ezek előállítását. A B.t. hibridek hatékonyak olyan rovarkártevőkkel szemben, amelyek fogékonyak a B.t. kurstaki törzsekre, valamint az olyan rovarkártevőkkel szemben, amelyek a B.t. *tenebrionis* törzsekre fogékonyak. Ezeknek a hibrideknek általában olyan hasznos inszekticid tulajdonságaik vannak, amelyek felülmúlják azokat, amelyeket az eredeti törzsek (szülők) fizikai elegyeinél tapasztaltak az inszekticid aktivitás szintje vagy az aktivitás spektruma vagy mindkettő tekintetében. Az ilyen mikroorganizmusokat tartalmazó inszekticid kompozíciókat

úgy alkalmazhatjuk rovarirtásra, hogy a hibrideket rovarölőszerként hatékony mennyiségben adagoljuk a rovaroknak vagy azok környezetébe.

A B.t. baktérium egy másik származékát ismerteti a 0,325,400 A1 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés. Ez a találmány egy hibridtoxin génre vonatkozik, amely toxikus a pikkelyesszárnyú lepkékre (lepidoptera). A találmány specifikusan egy olyan hibrid delta-endotoxin génre vonatkozik, amely B.t. var. kurstaki HD-73 toxin gén részt és a B.t. var. kurstaki HD-1 törzsből származó toxin gén részt tartalmaz. Ismertetik a hibrid toxin gént (DNS-t), amely a lepidoptera rovarokkal szembeni aktivitású fehérjét kódol.

A B.t. baktériumot inszekticid tulajdonságai alapján a 0,340,948 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés szerinti találmányban is felhasználták. Az a találmány olyan hibrid peszticid toxinokra vonatkozik, amelyeket egy B.t. gén rovarbél felhámsejt felismerő régiójának a diftéria toxin B láncához való fúziójával termeltek, hogy olyan hibrid B.t. toxint állítsanak elő, amely hatékony a lepidopterákkal szemben. Javasolták a hibrid B.t. gén inszertálását egy növénybe vagy klónozását egy baculovírusba abból a célból, hogy egy olyan toxint termeljenek, amelyet ki lehet nyerni. Alternatív módon a hibrid B.t. gént tartalmazó gazdát lehet rovarölőszerként felhasználni úgy, hogy közvetlenül adagolják a célba vett rovar környezetébe.

Az inszekticid hatású vegyületek kutatásában azt találták, hogy a skorpióméreg inszekticid tulajdonságokkal rendelkező vegyületek forrása lehet. Két rovarszelektív toxint, melyeket a

Leiorus quinfuestriatus quinquetriatus skorpió mérgéből izoláltak, a Zlotkin et al., "An Excitatory and a Depressant Insert Toxin from Scorpion Venom both Affect Conductance and Possess a Common Binding Site", Arch. Biochem. and Biophysics, 240: 877-887 (1985) dolgozat ismerteti. A kémiai és farmakológiai tulajdonságaira vonatkozó vizsgálatokban feltárták, hogy az egyik toxin légy lárvák gyors, serkentő, összehúzó paralízisét okozta, a másik toxin lassú, depressziós, ernyedő paralízisét idézte elő. Mindkettő nátrium konduktanciát idézett elő.

A 2,005,658 számú kanadai szabadalmi leírás olyan rovarölő hatású fehérjét ismerteti, melyet a *Leiorus quinquetriatus hebraeus* Buthinae, Buthidae skorpióból állítottak elő. A találmány szerint a mérget liofilizálták és frakciókra választották szét. Azt a frakciót, amelynek a legnagyobb a toxicitása lárvákkal szemben és a legkisebb a toxicitása egerekkel szemben, tovább tisztították, és a végterméket "LqhP35" néven azonosították.

Grishin "Toxic components from *Buthus eupeus* and *Lucosa singoriensis* venoms", Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow 117988, GSP-1, USSR közleményében a *Buthus eupeus* skorpió mérgéből izolált négy olyan toxint ismerteti, amelyek rovarokra mérgezőek. Ugyancsak ismerteti a *Lucosa singoriensis* tarantellapók mérgéből nyert toxikus komponens izolálását és jellemzőit. A nyers méreg nem volt toxikus rovarokkal szemben.

A rovarölő hatású különféle kompozíciókkal összefüggő kutatással és fejlesztéssel összhangban, a kutatók eljárásokat dolgoztak ki inszekticid hatású gének előállítására és azoknak a

célba vett kártevőkbe való bevitelére. A 4,879,236 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás eljárást ismertet egy baculovirus promoterrel összekapcsolt szelektált génnek egy baculovírus genomba való beépítésére abból a célból, hogy olyan rekombináns baculovírus expressziós vektort állítsanak elő, amely alkalmas a szelektált gén kifejezésére rovarsejtben. Az eljárás magában foglalja a baculovírus DNS hasítását abból a célból, hogy egy olyan DNS-fragmentumot hozzanak létre, amely egy polihedrin gént vagy annak egy részét tartalmazza, beleértve egy polihedrin promotert. Rekombináns transzfer vektor előállítására céljából a DNS-fragmentumot inszertálják egy klónozó hordozóba, majd egy szelektált gént inszertálnak ebbe a módosított klónozó hordozóba úgy, hogy azt a polihedrin promoter irányítja. A rekombináns transzfer vektort ezután érintkezésbe hozzák a vad típusú baculovírus DNS-sel úgy, hogy létrehozzák a szelektált gén homológ rekombinációját és inkorporációját a baculovírus genomba. Az *Autographa californica* (AcMNPV) baculovírust és összekapcsolt polihedrin promotert alkalmasnak találták egy olyan vírus expressziós vektor előállítására, amely eukarióta gazdasejtben egy szelektált gén kiemelkedően nagy mértékű expressziójára képes.

A feltalálók azt javasolják, hogy az expressziós vektort fel lehetne használni rovarkár elleni védekezésre kidolgozott rendszerben úgy, hogy szelektálnak egy gént, amely egy specifikus rovarra vagy a rovarok egy spektrumára mérgező fehérjét termel, és ezt a gént az AcMNPV expressziós vektorba klónozzák. Azt javasolják, hogy a vektort fel lehetne vinni a védeni kívánt növényre vagy állatra. A rekombináns vírus megtámadhatná a belfal sejtjeit azután, hogy a rovar lenyelte azokat, és megkezdődik

replikációja. Alternatív javaslat szerint a gént inszertálják a baculovírus genomba úgy, hogy az egyesülne a polihedrin struktúr szekvenciával oly módon, hogy a polihedron burkolat disszociálna a rovarbélben lévő lúgos közeg hatására, és a mérgező termék felszabadulna.

További eljárást ismertet inszekticid gének előállítására és bevitelükre a védeni kívánt célszervezetbe Cutler "Electroporation: Being Developed to Transform Crops: Success with Model Crop Confirmed", AG Biotech. News Vol. 7(5): 3 és 17 (1990) közleménye. Ez a dolgozat azt közli, hogy DNS-t elektroporációs kezeléssel közvetlenül be lehet vinni sarjadó pollenbe, és ezt a pollent vissza lehet vinni a virágra, hogy olyan magok alakuljanak ki, amelyek majd transzformált növényekké fejlődnek. Ezt az eljárást sikeresen alkalmazták dohány-növényekben, és sikeres lehet kukoricán és alfalfán is. Ezt az eljárást könnyebben lehet kivitelezni mint a protoplasztok elektroporációját, mert a végső cél a virágok beporzása, és "dolgoztassuk a virágokat" inkább, mint regeneráljuk a növényt. Az eljárás abban áll, hogy pollent gyűjtenek, csíráztató közegben 30-60 percen át csíráztatják, ezután a pollentömlő elkezd kihajtani a pollenszemből, hozzáadják a kívánt DNS-t a pollent tartalmazó folyadék szuszpenzióhoz, elektromos sokkot alkalmaznak, hogy kinyíljanak a pollentömlőben lévő pórusok, kimossák a feleslegben lévő DNS-t, majd az átalakított pollent egy növény bibéjére viszik fel, és megvárják, amíg kialakulnak a magok. Ez egyszerű módszer lehet bármely gén bevitelére haszonnövényekbe.

További beviteli rendszert ismertet a 4,861,595 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás. A találmány kezelt,

lényegében intakt mikróbasejtekre, mint fehérjevegyületeknek állatokba és emberekbe való beviteli rendszerére vonatkozik. A mikróbasejtek kezdetben intracellulárisan termelnek fehérjét egy homológ gén révén. A fehérjét termelő mikróbát kémiai vagy fizikai úton kezelik, míg a sejt lényegében érintetlen marad. A kezelési eljárás olyan nemproliferatív, kezelt mikróbasejtet eredményez, amelyben a sejten belüli vegyület aktivitása szignifikánsan nem csökken. Minthogy a sejt nem replikálódik, és stabil sejtfala van, amely majd lebomolhat az állati vagy emberi szervezet emésztőrendszerének kívánt szakaszában, lehetővé válik a bezárt termékek időzített vagy célzott kibocsájtása a találmány szerint. Megfelelő kezelés után magát a fehérjét termelő mikróbasejtet használják beviteli rendszerként, így a termelt vegyület tisztítása nem szükséges. Bármely fehérje, polipeptid, aminosav vagy vegyület, beleértve a rovarölő szereket is, amelyeket mikrobiális úton előállíthatnak, kiindulási anyag lehet a találmány szerint.

A DNS-technológia felhasználási lehetőségét olyan szintetikus gén inkorporációjára, amely a skorpióméregben talált neurotoxint kódol, a Carbonell et al., "Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors", Gene 73:409-418(1988) közlemény ismerteti. A cikk leírja annak lehetőségét, hogy DNS-technológiát használjanak fel egy olyan szintetikus gén inkorporációjára a baculovirus genomba a baculovirus peszticidek fejlesztése céljából, amely szintetikus gén a Buthus eupeus skorpió mérgében talált neurotoxint kódolja. Három kifejezési eljárást tanulmányoztak, melyekben a polihedron promoter alapú AcMNPV expressziós

rendszerrel használták, a toxin termelésére. A 36 kodonos gén kifejezése egyedül a toxin igen csekély termelését eredményezte. Némi sikert értek el, ha a toxinhoz egy szignál peptidet kapcsoltak. Jelentős mennyiségű fehérjét termeltek, ha a toxin gént összekapcsolták a polihedron gén N-terminusához. A termelés azonban tízszer-hússzor kevesebb volt annál, mint amit magánál a polihedronnál megfigyeltek. Úgy vélték, hogy az expresszió korlátozása nem a transzkripció szintjén, hanem a transzkripció utáni szinten - beleértve a transzlációt és a fehérjestabilitást - volt. A toxintermékek bénító hatását nem észlelték.

A 0,431,829 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés olyan transzgénikus növényeket ismertet, amelyek sejtjeikben hatékonyan fejezik ki egy ragadozó rovar rovarspecifikus toxinját elegendő mennyiségben ahhoz, hogy mérgezést okozzanak szelektív módon olyan rovaroknak, amelyek elfogyasztják a növényi sejteket. Az adott ismertetett toxint az *Androctonus australis* skorpió mérgéből izolálták.

A kutatók ugyancsak tudtak izolálni pókméregből extrahált toxinokat. Geren a "Neurotoxins and Necrotoxins of Spider Venoms", J. Toxicol.-Toxin Reviews 5(2):161-170 (1986) közleményében áttekintést ad neurotoxinokra és nekrotoxinokra vonatkozó munkákról, és felveti, hogy a pókméreg molekulák specifikus inszekticidek modelljeiként szolgálhatnak.

A 4,925 664 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti szív- és neurológiai betegségek kezelési eljárásait az *Agelenopsis aperta* és *Hololena curta* pókokból származó mérgek alkalmazásával. A toxinok specifikus kalciumcsatorna vagy serkentő aminosav receptor blokkolókként is hatékonyak, ami ro-

varok és rokon kártevők ellen alkalmazhatók.

A 0,395,357 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés az *Agelenopsis aperta* pók mérgéből izolált poliaminokat és polipeptideket ismertet. A poliaminok antagonizálják a serkentő aminosav neurotranszmittereket. A polipeptidek és az egyik poliamin blokkolják a kalciumcsatornákat különféle szervezetek élő sejtjeiben. Javasolják a kalciumcsatorna blokkolók felhasználását a gerinctelen kártevők elleni védekezésben.

A 0,374,940 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés ismerteti a *Hololena curta* pók mérgéből izolált toxinokat. A polipeptidek felhasználhatók rovarölő szerekként és gyógyszerekben is, például kalciumcsatorna és glutamát antagonistákként.

Bowers, et al., "Identification and purification of an irreversible presynaptic neurotoxin from the venom of the spider *Hololena curta*", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3506-3510 (1987) közleményükben egy fehérjeszerű neurotoxint ismertetnek, amelyet a *Hololena curta* pók mérgéből izoláltak, leírják továbbá annak neuromuszkuláris transzmissziót gátló hatását *Drosophila* lárvákban. A szerzők úgy vélik, hogy a toxin blokkolja a preszinaptikus kalciumcsatornákat a *Drosophila* mozgatóneuronokban.

Quistad et al. a "Paralytic and Isecticidal toxins from the Funnel Web Spider, *Hololena Curta*", *Toxicon* 29(3):329-336 (1991) közleményben egy peptidet és tíz curtatoxint ismertetnek, amelyeket a *Hololena curta* mérgéből tisztítással állítottak elő, leírják továbbá a hatást, ha ezeket pikkelyesszárnyú lepke (*lepidoptera*) lárvákba injektálták.

Stapleton et al. a "Curtatoxins: Neurotoxic insecticidal polipeptides isolated from the funnel-web spider *Hololena curta*", J. Biol. Chem. 265(4):2054-2059 (1990) közleményben három polipeptid neurotoxint ismertetnek, amelyeket a *Hololena curta* pók mérgéből izoláltak, leírják továbbá annak hatását az *Acheta Domestica* tücsökre.

Quicke és Usherwood "Extended Summaries Pesticides Group and Physicochemical and Biophysical Panel Symposium Novel Approaches in Agrochemical Research" Pestic. Sci. 20:315-317 (1987) közleményében leírja, hogy azok a toxinok, amelyek parazita darazsak mérgeiben és néhány kerekhálós pók (orb-web spider) mérgeiben vannak jelen, gyors bénulást okoznak, ha azokat rovarokba injektálják. A szerzők feltételezik, hogy a póktoxinok a receptor által szabályozott (gated) kationszelektív membráncsatornák blokkolói, amelyek kölcsönhatásba lépnek a sáska vázizomzatának nyitott csatornájával, amelyet a glutamát receptorok szabályoznak. A közlemény az *Argiope* és az *Araneus* pókok mérgeiben lévő kis molekulatömegű toxinokra, valamint a Joro-pók, a *Nephila clavata* méregmirigyeiből izolált toxinra vonatkozik.

Egy másik tanulmány, amely az izolált pókmérgek tulajdonságaira vonatkozik, feltárja a tölcsérpókok (funnel-web spiders) mérgeiből izolált kis molekulatömegű faktorok azon képességét, hogy reverzibilisen kötődnek a kalciumcsatornákhöz. A WO 89/07608 számú szabadalmi bejelentés leírja, hogy ezek az aktív, kis molekulatömegű faktorok reverzibilisen kötődnek a kalciumcsatornákhöz elegendő specificitással és affinitással ahhoz, hogy megszüntessék a kalcium konduktanciát a neuronokban, és lehetővé tegyék a kalciumcsatorna szerkezetek izolálását és tisztítását.

Úgy találták, hogy ezek a mérgek emlősökre toxikusak.

A póktoxinok más alkalmazásait tárgyalja Jackson és Parks "Spider Toxins: Recent Applications in Neurobiology", Ann. Rev. Neurosci. 12:405-414 (1989) közleménye. A cikk leírja, hogy nagyon heterogének a rendszertanilag különböző állatok toxinjai. A szerzők felismerték, hogy a kísérletekből a kalciumcsatornák fajtaspecifikus tulajdonságaira lehet következtetni, és a pókmérgek kalciumcsatorna antagonisták lehetnek. Azt találták, hogy a tárgyalt pókmérgek hatnak a gerincesekre. A cikk arra is rámutat, hogy a pókmérgek rovarspecifikus toxinok lehetséges forrásai a mezőgazdasági felhasználásban.

Adams et al. "Isolation and Biological Activity of Synaptic Toxins from the Venom of the Funnel Web Spider, Agelenopsis Aperta" c. cikkben, amely az Insect Neurochemistry and Neurophysiology 1986, (Borkovec és Gelman szerk., Humana Press, New Jersey, 1986) műben jelent meg, leírják, hogy olyan összetett peptid toxinokat izoláltak az Agelenopsis aperta pókból, amely antagonizálja a szinaptikus transzmissziót rovarokban.

A 4,855,405 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás egy receptor inhibitort ismertet, amelyet a Joro pók méregmirigyeiből nyertek, leírja továbbá annak előállítási eljárását. A vegyület rovarölő hatású, ha rovarok a folyékony vagy szilárd hordozóban lévő vegyülettel érintkezésbe kerülnek.

A 4,918,107 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárgya egy olyan vegyület, amely glutamát-receptor inhibitor hatású, a találmány tárgya továbbá eljárás e vegyület előállítására, valamint az e vegyületet tartalmazó inszekticid kompozíció. A vegyületet folyékony vagy szilárd hordozóanyaghoz

adagolják, diszpergálószerrel adnak hozzá, és közvetlenül adagolják a védeni kívánt növényre vagy állatra. Kis dózis hatékony inszekticidként és nagyon csekély az emlősökkel és halakkal szembeni toxicitása, továbbá a környezetre csekély a káros hatása.

A baculovírusok bioinszekticidkénti alkalmazása ugyancsak ismert. A vad típusú baculovírusok legnagyobb hiányossága bioinszekticidként az, hogy lassan hatnak. A lárvák, amelyek emésztőrendszerébe a vad típusú baculovírusok bejutnak, általában 5-7 napon belül pusztulnak el. A fertőzött lárvák ezen időnek jelentős része alatt tovább táplálkoznak, és jelentős terméskárosodás léphet fel.

Annak következtében, hogy egyes szintetikus inszekticidekkel kapcsolatban összetett problémák merülnek fel, beleértve a toxicitást, a környezeti veszélyeket, valamint a hatékonyságnak a rezisztencia miatti csökkenését, folyamatosan fennáll az igény új eljárások kidolgozására a gerinctelenek elleni védelem céljaira. Ezen új eljárások magukban foglalják géntechnológiai úton előállított olyan baculovírusok kifejlesztését is, amelyek olyan fehérjetoxinokat fejeznek ki, melyek sokkal gyorsabban tudják mozgásképtelenné tenni a gazdaszervezetet mint maga a baculovírus fertőzés.

A találmány tárgyát képezi egy új, lényegében tisztított, és *Diguetica* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid, valamint annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sói.

A találmány szerinti inszekticid hatású peptidek tudomásunk szerint nagy mértékben szelektívek a gerinctelenekre, különösen a rovarokra. Továbbá kimutattuk, hogy a találmány szerinti inszek-

ticid hatású peptidek igen hatékony inszekticidek a mezőgazdaságilag jelentős kártevőkkel szemben, és így - tudomásunk szerint jelentős hozzájárulást képviselnek a gerinctelen rovarok elleni küzdelemhez.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy új, lényegében izolált DNS szekvencia, amely lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptidet kódol.

A találmány további tárgya új, rekombináns expressziós vektor, amely egy olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptidet kódol, ahol a vektor képes kifejezni a kódoló szekvenciát transzformált sejtekben.

A találmány további tárgya új rekombináns gazdasejt, melyet lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciával végzett transzformációval vagy transzfekcióval állítunk elő oly módon, hogy lehetővé tesszük, hogy a gazdasejt kifejezze a peptidet.

A találmány tárgya továbbá új rekombináns baculovírus expressziós vektor, amely képes kifejezni lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciát egy gazdában vagy egy gazda rovarsejtben.

A találmány további tárgya új eljárás lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid előállítására, valamint az eljárással előállított peptid. Az eljárás a következő lépésekből áll: rekombináns gazdasejteket tenyésztünk, ahol a gazdasejtbe transzformált vagy transzfektált rekombináns expressziós vektornak a lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciája van, és ez a

vektor képes kifejezni a fenti kódoló szekvenciát transzformált sejtekben; majd kinyerjük az inszekticid hatású peptidet a rekombináns gazdasejt-tenyészetből.

A találmány további tárgya új transzgénikus növény, amely lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz bevive a növénynek vagy a növény ősének a sejtvonalaiba úgy, hogy a fenti DNS-szekvencia expressziójának jellegzetessége öröklődik a növény egymást követő generációi által szexuális szaporodás vagy aszexuális szaporodás révén.

A találmány további tárgya új eljárás gerinctelen kártevők elleni védelemre, melyre az jellemző, hogy a kártevőket lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid vagy annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sói hatékony mennyiségével érintkezésbe hozzuk.

A találmány további tárgya új eljárás gerinctelen kártevők elleni védelemre, melyre az jellemző, hogy a kártevőket érintkezésbe hozzuk olyan rekombináns baculovírussal, amely képes kifejezni lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid és mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sói hatékony mennyiségét.

A találmány további tárgya új inszekticid kompozíció, amely lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid vagy annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sói inszekticidként hatékony mennyiségét tartalmazza mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható hordozóanyagban.

A találmány további tárgya új antitest, amely lényegében immunreaktív a lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszek-

ticid hatású peptiddel és mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sóival.

A találmány további tárgya új eljárás a lényegében *Diguettia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid jelenlétének kimutatására a találmány szerinti antitestek alkalmazásával, melyet az jellemez, hogy kinyerjük a pókmérget; érintkezésbe hozzuk a pókmérget az antitestekkel, amelyek detektálható jelzőanyaghoz vannak kapcsolva; majd detektáljuk a peptidhez kötött jelzett antitesteket.

A találmány további tárgya új eljárás a találmány szerinti antitestek alkalmazására lényegében *Diguettia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid tisztítására, melyre az jellemző, hogy az antitestet szilárd hordozóra kapcsoljuk; a peptidet tartalmazó oldatot érintkezésbe hozzuk a szilárd hordozóhoz kapcsolt antitesttel, ahol az oldatban jelenlévő peptid az antitesthez kapcsolódik; eltávolítjuk a szilárd hordozóra kapcsolt antitesthez kapcsolt peptidet; majd a peptidet összegyűjtjük és tisztítjuk.

A találmány további tárgya új DNS-próba, amely a lényegében *Diguettia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciából származik.

A találmány további tárgya új eljárás lényegében *Diguettia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló nukleinsav jelenlétének kimutatására, melyre az jellemző, hogy kinyerjük a pók nukleinsavakat; a nukleinsavakat érintkeztetjük a találmány szerinti DNS-próbával, és detektáljuk a nukleinsavhoz kötött próbát.

Az 1. ábra a teljes *Diguettia canities* méreg RP HPLC eredményét mutatja be 0,1% TFA acetonitrilre vonatkoztatott gradiens

alkalmazásával, mutatva a komponensek három csoportját, amelyeket "mace"-ban teszteltünk. A 2. frakció képviseli a TBW-aktív komponenseket.

A 2. ábra a DK 9.2 frakcióval végzett vizsgálatokat mutatja, a DK 9.2-t 1 μ M-nál teszteltük szinaptikus transzmisszió (kiváltott populációs spike) a Schaffer kollaterális-CA1 piramis sejteken lévő szinapszisoknál a patkány hippocampusz szeleteken. A bemutatott adatok az időben átlagolt populációs spike regisztrátumokat reprezentálják (a) 5 perc alatt a DK 9.2 adagolást megelőzően és (b) a DK 9.2 adagolást követő 15-20 perces intervallumban. Ezek a regisztrátumok megegyeznek, ami azt jelzi, hogy ennél a koncentrációnál a DK 9.2-nek nem volt olyan aktivitása a patkány központi idegrendszerére, amit ki lehet mutatni ezzel a vizsgálattal.

A 3. ábra a p^{WR9} - a pre DK 9.2-t kódoló gént hordozó baculovírus transzfer vektor - térképe.

A 4. ábra egy folyamatos vírus (be)táplálási vizsgálat, ahol a vírust újszülött gyapottok bagolylepkébe (tobacco budworm) visszük be (1000,000 PIB/g táplálék).

Az 5. ábra mutatja be a TTX azon képességét, hogy megakadályozza vagy megfordítja a DK 9.2 frakció által kiválasztott burstingekeket.

A. Definíciók

A leírásban a "lényegében Diguetia pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid" meghatározás olyan inszekticid hatású peptidekre, valamint a peptidek inszekticid hatású fragmenseire vonatkozik, amelyek bármely forrásból származnak, ugyanakkor

lényegében izolálhatók lettek volna Diguetiákból a szakember számára ismert bármely eljárással. Ilyen források lehetnek például a rekombináns eljárással termelt inszekticid hatású peptidek.

A leírásban az "expressziós vektor" meghatározás olyan vektorokra vonatkozik, amelyek képesek a bennük lévő DNS-szekvenciák kifejezésére, ahol az ilyen szekvenciák operábilisan (működési egységben) vannak kapcsolva más szekvenciákhoz, amelyek képesek az ő kifejezésükre. Ez magában foglalja, bár nincs mindig explicite kinyilvánítva, hogy ezeknek az expressziós vektoroknak replikálhatóknak kell lenniük a gazdaszervezetekben akár episzómákként akár a kromoszóma DNS integráns részeként. Természetesen a replikálhatóság hiánya ténylegesen működésképtelenné (inoperábilissá) teszi őket. Összegezve, az "expressziós vektor" egy funkcionális definíciót jelent, és e meghatározásba beleértendő bármely DNS-szekvencia, amely képes a benne tárolt meghatározott DNS-kód kifejezésére, amint a meghatározást az adott szekvenciára alkalmazzuk. Általában a rekombináns DNS-technikában alkalmazható expressziós vektorok gyakran "plazmidok" formájában vannak, amik olyan gyűrűs kétfonalas DNS molekulákat jelentenek, amelyek vektor formájukban nem kapcsolódnak a kromoszómához. A "plazmid" és "vektor" elnevezéseket egymással felcserélhetően használjuk, mivel a plazmid a vektor leggyakrabban használt formája. A találmány azonban magában foglalja az expressziós vektorok olyan más formáit is, amelyek egyenértékű funkciót töltenek be, és amelyek a szakember számára ismertté váltak.

A "rekombinás gazdasejtek" olyan sejteket jelentenek, amelyek rekombináns DNS-eljárásokkal létrehozott vektorokkal vannak

transzformálva.

A Diguetidae pókok családja jelenleg egyetlen genusból, a *Diguetia* genusból áll. *Diguetia* fajok általában az Egyesült Államok délnyugati részein (beleértve Kaliforniát) és Mexikóban találhatók. Ezek a kis pókok kiterjedt, szabálytalan hálót szőnek számos fajta növényen és cserjén, így kaktuszokon is. A különféle *Diguetia* specieszek, mint a legtöbb pók, általános ragadozók, azonnal elfogyasztják a legtöbb típusú rovarzsákmányt, amellyel szembekerülnek.

Bár a találmányt nem kívánjuk bármely elméleti következtésre korlátozni, azok a szokatlan tünetek, amelyeket akkor tapasztalunk, ha a találmány szerinti inszekticid hatású peptideket rovarokba injektáljuk, nagyon hasonlítanak ahhoz a szimptomához, amelyeket akkor észlelünk, ha veratridint, egy Na^+ -csatorna aktiváló alkaloida vegyületet vagy a Buthidae családba és a *Buthus* genuszba tartozó skorpiók toxinjait - ismert preszinaptikus Na^+ -csatorna aktivátorokat - injektálunk rovarokba. Úgy véljük, hogy ezek az inszekticid hatású peptidek az izom- és/vagy az idegmembránok részleges depolarizációját okozhatják, esetleg hatva a Na^+ - vagy K^+ -csatornákra. Közelebbről feltételezzük, hogy ezek az inszekticid hatású peptidek ismétlődő burst kisüléseket indukálnak azokban az idegekben, amelyek érzékenyek tetrodotoxin általi blokkolásra. Így esetleg az idegmembránok feszültségérzékeny nátriumcsatornái ezen peptidek hatáshelyei.

B. A peptidek izolálása *Diguetia* méregből

A pókmérget bármely ismert módszerrel eltávolíthatjuk a *Diguetiákból*, úgymint a pókmirigy eltávolításával a fejtorból. A

pókméreg és az izolált toxinok szennyeződésének elkerülésére azonban a pókmérget előnyösen úgy nyerjük, hogy a pókokat elektromosan stimuláljuk, így előidézzük a méreg kibocsátását, majd ezt követően szivatást végzünk, hogy összegyűjtsük a kibocsájtott mérget, és megakadályozzuk a méregnek a testnedvekkel (visszafo-lyással vagy hemolimfával) való elszennyeződését, amint azt a 4,925,664 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti.

Ha a pókmérget elektromos fejési technikával kinyertük, peptid (toxin) komponenseire frakcionálhatjuk nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) vagy géliszűrési kromatográfia vagy más alkalmas frakcionáló eljárás alkalmazásával. Ezeken felül gyakran kívánatos, hogy a pókméreg végső frakcionálását HPLC-vel végezzük.

Így a pók elektromos fejési eljárását géliszűrési kromatográfiával és/vagy nagyteljesítményű (nagynyomású) folyadékkromatográfiával és más rokon eljárásokkal, úgymint hidrofób kölcsönhatás kromatográfiával együttesen alkalmazva lényegében tisztított póktoxinokat nyerhetünk. Más egyenértékű eljárásokat azonban ugyancsak alkalmazhatunk a találmány tárgykörén belül póktoxinok izolálására. Az így izolált toxinokat aminosav szekvenciájukra és inszekticid aktivitásukra nézve ismert eljárásokkal vizsgálhatjuk.

C. Inszekticid hatású peptidek

A találmány tárgyat képezik - az egyik aspektus értelmében - a lényegében *Diguetia* pókméregből tisztított és izolálható inszekticid hatású peptidek és azok inszekticid hatású fragmensei,

valamint ezek mezőgazdaságilag vagy kertészetiileg elfogadható sói.

Ha egy inszekticidként hatásos, peptidtartalmú frakciót a leírás szerint izoláltunk és tisztítottunk, az aminosav szekven-
ciát bármely ismert módon meghatározhatjuk, úgymint N-terminális
aminosav szekvenálással és automata aminosav szekvencia analizá-
torral.

A kinyilvánításból érthető, hogy várhatóan további inszek-
ticid hatású peptidek tartoznak a találmány tárgykörébe. Vagyis
úgy véljük, hogy más inszekticid hatású peptidek is izolálhatók
a Diguetiákból a leírásban részletezett három peptiden felül. A
továbbiak a Diguetiákból izolálható inszekticid hatású fehérjék
családjára vonatkoznak. Úgy tűnik, hogy a Diguetiákból izolált
inszekticid hatású peptidek családjának tagjai a következő közös
jellemzőkkel rendelkeznek.

1) nagyság: mindegyik molekula tömege a körülbelül 6200 és
körülbelül 7200 dalton tartományban van, és körülbelül 55 - kö-
rülbelül 65 aminosav hosszúságú láncot képez;

2) megtartott amino-terminus: a SEQ ID NO: 1, 3 és 5 azono-
sítási jel szerint definiált peptidek első öt aminosavja mege-
gyezik;

3) a SEQ ID NO: 1, 3 és 5 azonosítási jel szerint definiált
peptidek szekvencia homológiája több mint 40%;

4) a SEQ ID NO: 1, 3 és 5 azonosítási jel szerint definiált
peptideknek körülbelül 7 vagy 8 ciszteincsoportja van;

5) a gének csoportosulása: úgy tűnik, hogy ezen toxinok
közül több mint egynek a génjei a genomális DNS együtt elhelyez-
kedő szakaszait képezi, azt jelezve, hogy ezek a gének mind
egyetlen ősgéntől származhattak.

Speciálisabban három inszekticid hatású peptidet izoláltunk és jellemeztünk. Először a DK 9.2 jelűt izoláltuk, és úgy találtuk, hogy aminosav szekvenciája - az izolált cDNS-ből lefordítva - a SEQ ID NO: 1 azonosítási jelű szekvenciának felel meg. A tömegspektrometriás adatok két izozimra utalnak, amelyek konzervatív szubsztitúciót tartalmaznak a 26-helyzetben. Az egyik izozim treonint tartalmaz a 26-helyzetben, és a másik glutamint a 26-helyzetben. A glutamint tartalmazó izozim mintegy 27 atom tömeg egységgel nagyobb mint a treonint tartalmazó izozim. A továbbiakban a DK 9.2-re vonatkozó bármely hivatkozás úgy tekintendő mint az egyik és/vagy mindkét izozimra vonatkozó referencia. A DK 9.2 frakciót mintegy 6371-6397 dalton molekulatömeg jellemzi tömegspektrometriás meghatározás szerint, továbbá egyetlen csúcskénti vándorlás fordított fázisú HPLC vizsgálatban. Második frakcióként a DK 11 jelű frakciót izoláltuk, és mintegy 6700 vagy mintegy 6740 dalton molekulatömeggel jellemeztük tömegspektrometriás meghatározás szerint, a frakció fordított fázisú HPLC meghatározásban egyetlen csúcsként vándorol. Közelebbről ezt az aktív HPLC frakciót úgy azonosítottuk az izolált cDNS-ből lefordítva, hogy a SEQ ID NO: 3 azonosítási jelű aminosavszekvenciája van. Végül ennek az inszekticid hatású fehérjecsaládnak a harmadik tagját, a DK 12 jelű frakciót izoláltuk és jellemeztük mintegy 7100 vagy mintegy 7080 dalton molekulatömeggel tömegspektrometriás meghatározás szerint, és úgy találtuk, hogy a frakció fordított fázisú HPLC meghatározásban egyetlen csúcsként vándorol. Közelebbről kísérletileg kimutattuk, hogy ennek az aktív frakciónak az aminosavszekvenciája a SEQ ID NO: 5 azonosítási jelű szekvenciának felel meg. A három izolált peptid, amely megfelel a

SEQ ID NO: 1, 3 és 5 azonosítási jelű szekvenciának, lényegében azonos inszekticid aktivitással rendelkezik. Várható, hogy más peptidek, amelyek mintegy 55-60 aminosavból állnak és szekvencia homológiájuk a SEQ ID NO: 1, 3 vagy 5 jelű szekvenciákkal 40%-nál nagyobb, és közelítőleg 7 vagy 8 ciszteincsoportot tartalmaznak, lényegében azonos inszekticid aktivitást mutatnak. Ilyen peptidek létezhetnek a természetben vagy rekombináns DNS-technológiai eljárásokkal a szakember számára ismert módon előállíthatók. Az ilyen peptideket, akár természetesen fordulnak elő, akár rekombináns eljárással állítjuk elő őket, úgy tekintjük, hogy a találmány tárgykörébe tartoznak.

D. A találmány szerinti inszekticid hatású peptidek kódoló szekvenciáinak azonosítása

A találmány egy másik aspektusa szerint a találmány tárgyát képezi valamely, lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló, lényegében izolált DNS-szekvencia.

A fentiekben leírt módon kapott parciális aminosavszekvencia adatok alkalmazásával izolálhatók és azonosíthatók azok a gének, amelyek felelősek a pókból izolálható fehérjék termeléséért. Számos módszer áll rendelkezésre valamely peptid termeléséért felelős gén kinyerésére. Példaképpen említjük Fuqua, S. et al., "A simple PCR method for detection and cloning low abundant transcript", *Biotechnology*, vol. 9, No. 2 (1990 aug.); Frohman, M.A., "RACE: Rapid amplification of cDNA ends", *PCR protocols*, szerk. Innis et al., Academic Press, San Diego, CA, (1990) közleményeket, valamint a 4,703,008 számú, "DNA Sequences

Encoding Erythroprotein" című amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást, ez utóbbira referenciaként hivatkozunk.

Röviden összefoglalva, egy olyan DNS-molekulát szintetizálunk, amely a meghatározott aminosavszekvenciát kódolja vagy amely a komplementer DNS-fonalat képviseli egy olyan DNS-molekula számára, amely a meghatározott aminosavszekvenciát kódolja. Ezt a szintetikus DNS-molekulát ezután felhasználhatjuk a DNS-szekvencia homológia vizsgálatára olyan sejtklónokban, amelyek rekombináns DNS-molekulákat tartalmaznak, és e rekombináns DNS-molekulák részben olyan DNS-szekvenciákból állanak, amelyek egy szervezet úgymint egy pók genomiális DNS-éből származnak, vagy egy szervezet, úgymint egy pók szöveteiből vagy sejtjeiből izolált mRNS-molekula cDNS kópiáiból származnak. Általában tizenöt (15) vagy több nukleotidból álló DNS-molekulák szükségesek egy homológ DNS egyedi azonosításához, ez a szám legalább öt (5) aminosav egyedi meghatározását igényli a szekvenciában. Mebecsülhetjük, hogy a különböző DNS-molekulák száma, amelyek a meghatározott aminosavszekvenciát kódolják, igen nagy lehet, mivel minden aminosavat legfeljebb hat (6) egyedi bázissorrendű trinukleotid DNS-szekvencia vagy kodon kódolhat. Ezért gyakorlatilag lehetetlen, hogy minden lehetséges szintetikus DNS-próbát különállóan teszteljünk, és számos ilyen DNS-molekula pooljait használjuk együttesen próbaként. Az ilyen poolok előállítására, amelyeket "degenerált" próbáknak neveznek, jól ismert a szakember számára. Az is megbecsülhető, hogy míg a próbaelegyen csak egy DNS-molekulának lesz pontosan homológ szekvenciája a kérdéses génnek, a poolban lévő számos szintetikus DNS-molekula lehet képes az adott gén egyedi azonosítására, mivel csak nagyfokú homológia szükséges. Ezért a

kérdéses gént sikeresen izolálhatjuk olyan szintetikus DNS-próba poolokkal, amelyek nem tartalmazznak minden lehetséges DNS-próba szekvenciát. Általában olyan kodonoknak, amelyeket ritkán hasznosít a szervezet, nem kell képviselve lenniük a próbapoolban. Ténylegesen előállíthatunk egy egyetlen szekvenciájú DNS-próbát úgy, hogy az csak azokat a DNS kodonokat tartalmazza, amelyeket a leggyakrabban hasznosít a szervezet mindegyik aminosavra nézve, bár felbecsülhető, hogy ez a megközelítés nem mindig sikeres.

A génszekvencia azonosítására szolgáló egyik eljárás szerint a polimeráz láncreakciót (Polymerase Chain Reaction, PCR) alkalmazzuk. Lásd például a 4,683,195 és a 4,683,202 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, amelyek teljes terjedelmükben referenciaként szerepelnek a leírásban. Lényegében a PCR lehetővé teszi egy kiválasztott DNS-szekvencia előállítását, ha a szekvencia két terminális része ismert. Primereket, vagy oligonukleotid próbákat nyerünk, amelyek megfelelnek a kérdéses szekvencia mindkét végének. A PCR alkalmazásával ezután előállítjuk a DNS-szekvencia központi részét.

Egy ilyen PCR-t alkalmazó módszer szerint egy egyedi pókmérget kódoló gén előállítására RNS-t izolálunk a pókból, és tisztítjuk. Ezután egy dezoxi-timidilát-farkú oligonukleotidot használunk primerként, hogy fordítva átírjuk a pók RNS-t cDNS-sé. Egy szintetikus DNS-molekulát vagy szintetikus DNS-molekulák elegyét készítjük el ezután, amint azt a degenerált próbáknál a fentiekben leírtuk. Ezt tudja kódolni a méregfehérje aminoterminális aminosavszekvenciáját, amint azt előzetesen meghatároztuk. Ezt a DNS-elegyet együttesen használjuk a dezoxitimidilát farkú oligonukleotiddal a PCR reakció megindítására. Mivel a PCR reakció megin-

dításához használt szintetikus DNS-elegy specifikus a kivánt mRNS-re nézve, csak a kivánt cDNS fog ténylegesen amplifikálódni. A keletkezett termék egy olyan amplifikált cDNS-t képvisel, amely számos ismert klónozó vektor bármelyikéhez ligálható. Ennek nem ellentmondva megbecsülhető, hogy peptidek "családjai" fordulhatnak elő pókmérgekben, amelyek aminosavszekvenciája hasonló, és hogy ilyen esetekben vegyes oligonukleotid primer szekvenciák alkalmazása egy vagy több olyan rokon cDNS-molekula amplifikációját eredményezi, amely ezeket a rokon peptideket kódolja. A rokon peptideket kódoló gének ugyancsak a találmány tárgyát képezik, minthogy a rokon peptideknek ugyancsak hasznos inszekticid aktivitása van.

Végül az előállított cDNS-szekvenciát megfelelő vektorba klónozzuk szokásos eljárásokkal, majd analizálhatjuk és meghatározhatjuk a nukleotid bázisszekvenciát. Azokat a DNS-szekvenciákat, amelyek inszekticid hatású fehérjéket kódolnak, például a SEQ ID NO: 2 és 4 azonosítási jelű szekvenciák mutatják be. Ezeknek a PCR termékeknek a közvetlen aminosav transzlációja kimutatja, hogy ezek megfeleltek az érett fehérjét kódoló teljes szekvenciának.

Az érett DK 9.2-t kódoló cDNS-en felül a DK 9.2-t kódoló szekvenciával ellentétes irányú cDNS-szekvenciát klónozzuk és meghatározzuk a bázissorrendet (SEQ ID NO: 7). A teljes mRNS transzlációja kimutatta, hogy a DK 9.2 prekursor fehérjeként szintetizálódik, amely egy szignál peptidből, propeptidből és az érett toxinból áll. Úgy véljük, hogy a szignál peptid funkciója lényeges a szintetizált polipeptid szekréciójának az elérésében. Valamely szignál szekvencia fontos szerepet játszik egy újonnan

szintetizált fehérje megfelelő lokalizációjának a biztosításában. Általában "topogén szignálokat" biztosítanak [Blobel, G. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 77, 1496-1500 (1980)], amelyek különféle rendeltetési helyekre juttatják célba a kapcsolt fehérjeszekvenciát a sejten belül vagy azon kívül. Ez különösen fontos olyan elválasztott (szekretált) fehérjék esetén, amelyeknek a sejteken kívül van a célhelye. Ez hasznos a rekombináns fehérje előállításban is, mivel könnyebb lehet egy kifejezett fehérjét a sejten kívüli közegből tisztítani mint lízisnek alávetni a sejteket és egy teljes sejtextraktumból tisztítani. Feltételezzük, hogy a DK 9.2 prekursor fehérjéjét kódoló cDNS által kódolt szignál peptid 17 aminosavból áll a következő szekvencia szerint:

Met-Lys-Val-Phe-Val-Val-Leu-Leu-Cys-
-Leu-Ser-Leu-Ala-Ala-Val-Tyr-Ala

A szingál peptiden felül a DK 9.2-t kódoló szekvenciától felfelé (ellentétes irányban) lévő mRNS transzlációja egy propeptidet mutatott ki. A propeptidszekvencia funkciója ismeretlen. A propeptid egy 21 aminosavból álló peptid, amely szekvenciája a következő

-Leu-Glu-Glu-Arg-Leu-Asp-Lys-Asp-Ala-Asp-Ile-
-Met-Leu-Asp-Ser-Pro-Ala-Asp-Met-Glu-Arg-

Ezek a prekursor peptidek vagy prepro szekvenciák nagymértékben hozzájárulnak a DK 9.2 vagy más rekombináns fehérjék stabilitásához, expressziójához és összehajtogatódásához (folding) in vivo és/vagy in vitro expresszió során. Az is várható, hogy ezek a szekvenciák vagy ezek részei hasznosnak bizonyulhatnak más molekulák expressziójában, például egy gén felépítésben. A találmány részeként adatokat szolgáltatunk annak bizonyítására, hogy

más szignál és/vagy propeptid szekvenciákat alkalmazhatunk a rekombináns DK 9.2 kifejezésére.

E. Rekombináns expresszió

A találmány további tárgya rekombináns expressziós vektor, amely egy olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely a lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptideket kódol. A vektor képes a kódoló szekvencia kifejezésére transzformált sejtekben. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik olyan rekombináns gazdasejtek, amelyek lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciával vannak transzformálva vagy transzfektálva oly módon, hogy a gazdasejt ki tudja fejezni a peptidet.

A kívánt fehérjét kódoló megfelelő DNS-szekvencia biztosítása lehetővé teszi a fehérje előállítását a szakember számára már ismert rekombináns eljárások alkalmazásával. A kódoló szekvenciát megkaphatjuk egy natív fehérjeforrásból származó cDNS vagy genom-szekvencia visszaírásából (retrieving) vagy előállítjuk szintetikusan a gén nukleotid szekvenciájából meghatározott pontos aminosav szekvencia felhasználásával. Ha a kódoló DNS-t szintetikusan állítjuk elő, kihasználhatjuk a tervezett gazda ismert kodon preferenciáit.

A szükséges kontrollszekvenciákat, úgymint promotereket és előnyösen erősítőszekvenciákat (enhancereket) és terminációs kontrollelemeket tartalmazó expressziós rendszerek könnyen hozzáférhetők és ismertek számos gazda esetére. Lásd pl. Sambrock et al., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989).

így a kívánt fehérjét elő lehet állítani mind prokarióta mind eukarióta rendszerekben, ami sok fehérje esetében a termelt formák spektrumát eredményezi.

A legközönségesebben használt prokarióta rendszer az *E. coli* marad, bár várható, hogy más rendszerek, úgymint a *B. subtilis* és a *Pseudomonas* szintén használhatók. A prokarióta rendszerek esetén alkalmas kontrollszekvenciák magukban foglalják mind a konstitutív mind az indukálható promotereket beleértve a lac promotert, a trp promotert, hibrid promotereket, úgymint a tac promotert, a lambda fág P1 promotert. Általában az idegen fehérjét ezekben a gazdasejtekben mint fúziós vagy mint érlelt fehérjét állíthatjuk elő. Ha a kívánt szekvenciákat érlelt fehérjékként állítjuk elő, a termelt szekvenciát megelőzheti egy metionincsoport, amely nincs szükségszerűen hatékonyan eltávolítva. Ennek megfelelően e bejelentésben igényelt peptideket és fehérjét megelőzheti egy N-terminális Met, ha azokat baktériumokban állítjuk elő. Előállíthatunk továbbá olyan konstrukciókat, melyekben a peptidet kódoló szekvenciát megelőzi egy működési egységben lévő (operábilis) szignál peptid, ami a fehérje szekrécióját eredményezi. Ha prokarióta sejtekben termelünk ebben a tekintetben, a szignál szekvenciát a szekréciót követően eltávolítjuk.

Számos eukarióta gazdasejt is rendelkezésre áll már rekombináns idegen fehérje előállítására. Mint a baktériumoknál, eukarióta gazdasejteket transzformálhatunk olyan expressziós rendszerekkel, amelyek a kívánt fehérjét közvetlenül termelik, de általánosabban szignál szekvenciák állnak rendelkezésre a fehérjeszekréció megvalósítására. Az eukarióta rendszerek további

előnye, hogy képesek olyan intronokat előállítani, amelyek a magasabbrendű szervezetek fehérjéit kódoló genomiális szekvenciákban fordulhatnak elő. Az eukarióta rendszerek számos átalakító (processzáló) mechanizmussal is rendelkeznek, amelyek például glikozilezést, egyes aminosavcsoportok oxidációját vagy származékká alakítását, konformációs szabályozást, stb. eredményeznek.

A közönségesen használt eukarióta rendszerek közé tartoznak az élesztők, rovarsejtek, emlőssejtek, madársejtek és magasabbrendű növények sejtei. Ez a felsorolás nem teljes. Hozzáférhetők olyan alkalmas promoterek, amelyek kompatibilisak és operábilisak mindezen gazdasejtekben való alkalmazásra, hozzáférhetők továbbá terminációs szekvenciák és erősítőszekvenciák is, mint például a baculovírus polihedrin promoter. Mint a fentiekben, a promoterek konstitutívak vagy indukálhatók lehetnek. Például emlős rendszerekben az MTII promoter nehézfémionok adagolásával indukálható.

A kívánt gazdasejt számára alkalmas kifejező rendszerek létrehozásának részletei a szakember számára ismertek. A fehérje rekombináns előállítása céljából az őt kódoló DNS-t megfelelően ligáljuk a kiválasztott kifejező rendszerben, majd a rendszert transzformáljuk a kompatibilis gazdasejtbe, amelyet azután tenyésztünk, és olyan körülmények között tartunk fenn, amelyek között az idegen gén kifejeződik. A találmány szerinti, így előállított inszekticid hatású fehérjét a tenyészetből vagy a sejtek lízisével vagy a tápközegből nyerjük ki megfelelően megválasztott és ismert eljárásokkal.

Feltételezzük, hogy a primer aminosav-szekvencia kisebb módosításai olyan fehérjéket eredményeznek, amelyek lényegében

egyenértékű vagy megnövelt aktivitásúak a leírásban példaképpen bemutatott fehérjékhez viszonyítva. Ezek a módosítások lehetnek előre megtervezettek, így létrejöhetnek hely irányította mutagenézis révén, vagy lehetnek esetlegesek, úgymint kialakulhatnak az olyan gazdasejtekben végbemenő mutációk révén, amely sejtek a találmány szerinti peptideket termelik. Mindezen módosulások a találmány tárgykörébe tartoznak, amíg az inszekticid aktivitás megmarad. Egy fehérjében végbemenő "mutáció" megváltoztatja annak primer szerkezetét (a közönségesen előforduló vagy specifikusan leírt fehérjére vonatkoztatva) a fehérjét kódoló DNS nukleotidszekvenciájában létrejött változások következtében. Ezek a mutációk specifikusan magukban foglalják az allél variánsokat. Egy fehérje primer szerkezetében deléciók, addíciók vagy szubsztitúciók eredményezhetnek mutációs változásokat. A "deléciót" olyan polipeptidként határozhatjuk meg, amelyből egy vagy több láncon belüli aminosavcsoport hiányzik. Az "addíciót" olyan polipeptidként határozhatjuk meg, amelynek a láncán belül egy vagy több további aminosavcsoport van a vad típushoz viszonyítva. A "szubsztitúciót" egy vagy több aminosavcsoportnak más csoportokkal való helyettesítése eredményezi. A fehérje "fragmens" olyan polipeptid, amely olyan primer aminosavszekvenciából áll, amely azon fehérje primer szekvenciájának egy részével azonos, amelyre a polipeptid vonatkozik.

Előnyösek azok a "szubsztitúciók", amelyek konzervatívak, vagyis ahol egy csoportot egy azonos általános típusú másik csoporttal helyettesítünk. Jól ismert, hogy a természetben előforduló aminosavakat savas, bázikus, semleges és poláris vagy semleges és nempoláros és/vagy aromás alosztályokba sorolhatjuk.

Általában előnyös, ha a natív formától eltérő kódolt peptidek kódjai olyan aminosavak szubsztituált kodonjait tartalmazzák, amelyek ugyanabba a csoportba tartoznak mint az az aminosav, amelyet helyettesítenek.

Így általában a Lys, Arg és His bázisos aminosavak egymással felcserélhetők; az Asp és Glu savas aminosavak felcserélhetők; a Ser, Thr, Cys, Gln és Asn semleges poláros aminosavak felcserélhetők; a Gly, Ala, Val, Ile és Leu nempoláros alifás aminosavak egymásra nézve konzervatívok (de méreteik miatt a Gly és az Ala közelebb állnak egymáshoz és a Val, Ile és Leu közelebb állnak egymáshoz), továbbá a Phe, Trp és Tyr aromás aminosavak egymással felcserélhetők.

Míg a Pro nempoláros semleges aminosav, nehézségeket okoz konformációs hatásai miatt, és a Pro-val végzett szubsztitúció vagy a Pro helyettesítése nem előnyös, kivéve ha azonos vagy hasonló konformációt eredményez. A konzervatív módon cserélhető poláros aminosavak közé tartozik a Ser, Thr, Gln és Asn; valamint kisebb mértékben a Met. Ezen felül, bár különböző kategóriákba vannak besorolva, az Ala, Gly és Ser egymás között felcserélhetőnek látszik, és a Cys ezen felül beleillik ebbe a csoportba vagy besorolható a poláros semleges aminosavak közé. Különböző csoportokba tartozó aminosavak kodonjaival végzett néhány helyettesítés szintén hasznos lehet.

Minthogy a találmány szerinti fehérjék rekombináns anyagai rendelkezésre állnak, ezeket a fehérjéket előállíthatjuk rekombináns eljárásokkal valamint automata aminosavsztetizátorokkal. Minthogy különféle gazdasejtek számos poszt-transzlációs jellemzőt eredményeznek, a természetesen előforduló fehérjékre nézve is

különféle módosulatokat kapunk. Egy "módosított" fehérje a transzláció utáni olyan történések eredményeként különbözik a módosítatlan fehérjétől, amelyek megváltoztatják a glikozilézési, amidálási vagy lipidálási sémát vagy a fehérje primer szekunder vagy terciér szerkezetét. A "módosított" fehérjék természetesen a találmány szerint igényelt oltalmi körébe tartoznak.

Meg kell továbbá jegyeznünk, hogy ha a leírásban szereplő fehérjéket, úgymint a SEQ ID NO: 1 jelű fehérjét szintetikusan állítjuk elő, olyan aminosavakkal is végezhetünk szubsztitúciókat, amelyet a gén nem kódol. Az alternatív csoportok közé tartoznak például a $H_2N(CH_2)_nCOOH$ általános képletű ω -aminosavak, amelyekben n értéke 2-6. Ezek neutrális, nem-poláros aminosavak, mint a szarkozin (Sar), terc-butil-alanin (t-BuAla), terc-butil-glicin (t-BuGly), N-metil-izoleucin (N-MeIle) és norleucin (Nleu). Fenil-glicin helyettesítheti például a Trp-t, Tyr-t vagy Phe egy aromás semleges aminosavat; a citrullin (Cit) és metionin-szulfoxid (MSO) polárisak de neutrálisak, a ciklohexil-alanin (Cha) semleges és nempoláros, a ciszteinsav (Cya) savas, és az ornitin (Orn) bázikus. A prolincsoportok konformációt meghatározó tulajdonságait úgy érhetjük el, ha ezek közül egyet vagy többet hidroxiprolinnal (Hyp) helyettesítünk.

F. Transzgénikus növények

A találmány további tárgyát képezik az olyan transzgénikus növények, amelyek lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmaznak bevive a növény sejtvonalaiba úgy, hogy a DNS-szekvencia expresz-

sziójának jellegzetessége öröklődik a növény egymást követő generációi által szexuális szaporodás vagy aszexuális szaporodás révén.

A találmány szerinti inszekticid hatású peptideket kódoló géneket géntechnológiai eljárásokkal vihetjük be a növényekbe, ami várhatóan hasznos módja a rovarkártevők elleni védelemnek, minthogy a növényi sejt termeli a peptidet. Ezért lehetséges olyan növény előállítása, amely jobban tűri a rovarkártevőket mint a természetes változat.

Az inszekticid hatású peptid gént kódoló régió, amelyet a növény transzformálására használunk, a gén teljes hossza vagy parciális aktív szakasza lehet. Szükséges azonban, hogy a peptidet kódoló genetikai szekvencia ki legyen fejezve, és termelődjék funkcionális peptidként a létrehozott növényi sejtben. Úgy véljük, hogy mind a genomiális DNS-ből, mind a cDNS-ből származó DNS, valamint szintetikus DNS - melyek inszekticid hatású peptidet kódolnak - használható transzformációra. Továbbá felépíthetünk géneket parciálisan cDNS-klónból, parciálisan genomiális klónból és parciálisan szintetikus génből és ezek különféle kombinációiból. Ezen felül a peptid gént kódoló DNS tartalmazhat olyan részeket, amelyek különféle, az izolált peptid forrásától eltérő specieszekből származnak.

Úgy véljük továbbá, hogy az inszekticid hatású peptidet kombinálhatjuk más vegyülettel vagy vegyületekkel, hogy nem várt inszekticid tulajdonságokat hozzunk létre a transzformált növényben, amely a vegyületeket kifejező, kiméra géneket tartalmaz. Ezen más vegyületek lehetnek proteáz inhibitorok például, amelyek orálisan toxikusak rovarokra vagy a *Bacillus thuringiensis*ből

származó polipeptidek. A *B. thuringiensis* fehérje változásokat idéz elő a rovarbél sejtmembránjának kálium permeabilitásában, és feltételezhetően kis pórusokat hoz létre a membránban. Más pórusképző fehérjéket is alkalmazhatunk az inszekticid hatású peptidekkel kombinációban. Az ilyen pórusképző fehérjékre példák a magaininok, a cecropinok, az atticínok, a melittin, gramicidin S, nátriumcsatorna fehérjék és szintetikus fragmensek, a *Staphylococcus aureus* α -toxinja, az apolipoproteinek és fragmenseik, az alamethicin és számos szintetikus amphipathikus peptid. A lektinek, amelyek a sejtmembránokhoz kötődnek, és növelik az endocitózist, a fehérjék egy másik olyan osztályába tartoznak, amelyet a találmány szerinti inszekticid hatású peptidekkel kombinációban használhatunk arra, hogy genetikailag módosítsunk növényeket rovarokkal szembeni rezisztencia érdekében.

A peptid gén promotere várhatóan felhasználható a kimérés genetikai szekvencia kifejezésében, azonban várhatóan más promoterek is hasznosak lehetnek. Hatékony növényi promoterek, amelyek hasznosak lehetnek, a túltermelő promoterek. Egy ilyen promoterek, működési egységben lévő (operábilis) kötésben a peptidre vonatkozó genetikai szekvenciával, képesnek kell lennie a peptid kifejezésének elősegítésére úgy, hogy a transzformált növénynek nagyobb legyen a tűrőképessége a rovarkártevőkkel szemben. Azok a túltermelő növényi promoterek, amelyek várhatóan felhasználhatók a találmány szerint, ismertek.

A kimérés genetikai szekvencia - amely egy promoterhez operábilisan kötött inszekticid hatású peptid génjét tartalmazza - egy alkalmas klónozó vektorba ligálható a kívánt növény transzformációja érdekében. Általában olyan plazmid vagy vírus (bakte-

riofág) vektorokat használunk, amelyek a gazdasejttel kompatibilis specieszből származó replikációs és kontroll szekvenciákat tartalmaznak. A klónozó vektor tipikusan egy replikációs origót, valamint olyan specifikus géneket hordoz, amelyek képesek fenotípusos szelekciós markereket létrehozni a transzformált gazdasejtekben, tipikusan antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát. A transzformáló vektorokat ezen fenotípusos szelekciós markerek révén szelektálhatjuk a gazdasejtekben való transzformáció után.

A várhatóan hasznos gazdasejtek közé tartoznak a prokarióták, beleértve a baktérium gazdasejtek, úgymint az *E. coli*, *Salmonella typhimurium* és *Serratia marcescens*; valamint az eukarióta gazdasejtek, úgymint élesztők vagy fonalas gombák.

A klónozó vektort és a vektorral transzformált gazdasejtet általában felhasználjuk arra, hogy növeljük a vektor kópiaszámát. A megnövelt kópiaszámmal a peptid gént tartalmazó vektorokat izolálhatjuk, és például felhasználhatjuk arra, hogy a leírásban megadott genetikai szekvenciákat bevigyük a növényi vagy más gazdasejtekbe.

Az idegen géneket kifejező növények előállítási eljárásai ismertek. Növényi szöveteket transzformálhatunk például növények, növényi szövetek vagy sejtek *A. tumefaciens*-sel végzett közvetlen fertőzésével vagy együttes tenyésztésével; exogén DNS-nek protoplasztokba való közvetlen génátvitelével; PEG-gel inkubálva; mikroinjektálással és mikrolövedék bombázással.

Igazoltunk egy olyan eljárást, amely szerint dohányban elektroporációval végeztek transzformációt, az eljárást az *Ag Biotechnology News*, Vol. 7 p. 3 és 17. (1990. szept/okt.) közlemény ismerteti. Az eljárás szerint növényi protoplasztokat keze-

lünk elektroporációval az inszekticid hatású peptid genetikai konstrukciót tartalmazó plazmidok jelenlétében. Nagy térerősségű elektromos impulzusok reverzibilisen permeábilissá teszik a membránokat lehetővé téve a plazmidok bevitelét. Az elektroporációval kezelt növényi protoplasztok újjáalakítják a sejtfalat, osztódnak, és növényi callust képeznek. Az expresszált inszekticid hatású peptiddel transzformált növényi sejteket a fenotípusos markerek felhasználásával szelektálhatjuk, amint azt a fentiekben leírtuk. Az exogén DNS-t bármely formában hozzáadhatjuk a protoplasztokhoz, ilyen például a csupasz lineáris, gyűrűs vagy szuperpriál DNS, a liposzómába zárt DNS, szferoplasztokban lévő DNS, más növényi protoplasztokban lévő DNS, sókkal képzett DNS-komplex és hasonló.

Minden olyan növényi sejtet, amelyet *Agrobacterium*mal lehet transzformálni és a teljes növényeket, amelyeket a transzformált sejtekből regeneráltunk, szintén transzformálhatunk a találmány szerint, hogy transzformált teljes növényeket állítsunk elő, amelyek tartalmazzák az átvitt, inszekticid hatású peptid gént. Rizsnövényben végzett transzformációt igazolt D.M. Raineri et al., "Agrobacterium-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.)", *Biotechnology*, Vol 8., pp. 33-38 (1990. január) közleménye.

Egy másik eljárás az inszekticid hatású peptid génnek növényi sejtbe való bevitelére növényi sejtnek olyan *A. tumefaciens*-szel végzett fertőzése, amely az inszekticid hatású peptid génnel transzformálva van. Megfelelő körülmények között - amelyek ismeretek - tenyésztjük a növényi sejteket, hogy hajtások és gyökerek alakuljanak ki, és később transzformált növényé fejlődjenek. Az

inszekticid hatású peptid genetikus szekvenciát bevihetjük a megfelelő növényi sejtekbe például az *A. tumefaciens* Ti plazmidjával. A Ti plazmidot az *A. tumefaciens*ssel végzett fertőzés útján visszük át a növényi sejtekre és az stabilan integrálódik a növényi genomba.

A Ti plazmidoknak két olyan régiója van, amelyek feltételezhetően esszenciálisak a transzformált sejtek termelésére. Ezek egyike, amelyet transzfer DNS-nek (tDNS) neveznek, tumorképződést indukál. A másik, a virulens régiónak nevezett régió, esszenciális a tumorképződéshez de a tumor fenntartásához nem. A tDNS-régió - amely átvivődik a növényi genomba - megnövelhetjük a méretét egy enzim genetikai szekvenciájának az inszertálásával, anélkül, hogy ez a transzferáló képességét befolyásolná. Ha a tumort okozó géneket eltávolítjuk, úgyhogy ezek már nem lépnek kölcsönhatásba, a módosított Ti plazmidot ezt követően vektorként használhatjuk a találmány szerinti génkonstrukcióknak megfelelő növényi sejtekbe való átvitelére.

A genetikai anyagot polietilén-glikol (PEG) alkalmazásával is bevihetjük a növényi sejtbe. A PEG csapadék komplexet képez a genetikai anyaggal, amelyet a sejt felvesz.

DNS-t átvihetünk növényi sejtekbe izolált protoplasztokba, tenyésztett sejtekbe és szövetekbe való injektálással is, továbbá a növénykezdemények és növények merisztémaszöveibe való injektálással. Transzgénikus növényeket és azok utódait ismert, szokásos eljárásokkal nyerünk.

Egy másik eljárás idegen DNS-szekvenciáknak növényi sejtekbe való bevitelére abban áll, hogy a DNS-t olyan részecskékhez kapcsoljuk, amelyeket azután erő alkalmazásával beviszünk a növényi

sejtekbe egy belövőszerkezet ("génágyú") használatával. Bármilyen növényi szövetet vagy szervet használhatunk célanyagként az eljárásban, ezek közé tartoznak az embriók, aprikális és más merisztémák, rügyek, szomatikus és szexuális szövetek in vivo és in vitro, a célanyagok azonban nem korlátozódnak ezekre. A transzgénikus sejteket és kalluszokat ismert eljárásokkal szelektáljuk ezt követően. A megcélzott sejteket szokásos, ismert eljárásokkal indukáljuk, hogy szomatikus embriókat vagy regenerált hajtásokat képezzenek transzgénikus növények létrehozására. A megfelelő eljárást a felhasznált növényfajta szerint választhatjuk meg. Transzgénikus kukoricanövényeket állítottak elő úgy, hogy nagysebességű mikrolövedékeket használtak géneknek embriogén sejtekbe való bevitelére, ld. "Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants", Biotechnology, Vol. 8. pp. 833-838 (1990. szept.).

A regenerált növény lehet kimér a beépült idegen DNS-re való tekintettel. Ha az idegen DNS-t tartalmazó sejtek akár mikrospórákká, akár makrospórákká fejlődnek, az integrált DNS átvivődik a szexuálisan létrejött utódokra. Ha az idegen DNS-t tartalmazó sejtek a növény szomatikus sejtjei, nem-kiméra transzgénikus növényeket állítunk elő a vegetatív (aszexuális) szaporítás szokásos eljárásaival akár in vivo a rügyekből és dugványokból (szárdarabokból), akár in vitro a szokásos ismert eljárások szerint. Az eljárásokat a felhasznált növényfajtának megfelelően választhatjuk meg.

A növényi sejt vagy a növény transzformációja után azokat a növényi sejteket vagy növényeket, amelyeket úgy transzformáltunk, hogy a peptid kifejeződik, egy megfelelő fenotípusos markerrel

szelektálhatjuk. A fenotípusos markerek közé tartozik - többek között - az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia. Ismertek más fenotípusos markerek is, amelyek alkalmazhatók a találmány szerinti eljárásban.

A különböző transzformációs rendszerek változatossága miatt elvben minden típusú növényt transzformálhatunk úgy, hogy kifejezzen egy, a találmány szerinti inszekticid hatású peptidet.

Mind több bizonyíték van arra, hogy gyakorlatilag minden növény regenerálható tenyésztett sejtekből vagy szövetekből, így - többek között - a főbb gabonafajták, a cukornád, a cukorrépa, a gyapot, gyümölcsfák és más fák, a hüvelyesek és a zöldségfélék. Korlátozott ismereteink vannak jelenleg arról, hogy ezek a növények mind transzformálhatók-e *Agrobacterium*mal. Azok a fajok, amelyek az *Agrobacterium* természetes növénygazdái, transzformálhatók lehetnek *in vitro*. Az egyszikű növények, és különösen a gabonafélék és fűfélék az *Agrobacterium*nak nem természetes gazdái. Az arra irányuló kísérletek, hogy *Agrobacterium* alkalmazásával transzformálják ezeket, eddig sikertelenek voltak. Mind több bizonyíték van már arra, hogy bizonyos egyszikűek transzformálhatók *Agrobacterium*mal. Új kísérleti megközelítések alapján ismertté vált, hogy gabonafajták és fűfajták is transzformálhatók lehetnek.

Az *Agrobacterium*mal transzformálható további növényfajok közé tartoznak a következők: *Ipomoea*, *Passiflora*, *Cyclamen*, *Malus*, *Prunus*, *Rosa*, *Rubus*, *Populus*, *Santalum*, *Allium*, *Lilium*, *Narcissus*, *Ananas*, *Arachis*, *Phaseolus* és *Pisum*.

A regeneráció a növények fajtája szerint változik, de általában először egy szuszpenziót állítunk elő az inszekticid hatású

peptid gén többszörös kópiáit tartalmazó transzformált protoplasztokból. Ezután embrióképződést indukálhatunk a protoplaszt szuszpenzióból a természetes embriókénti érés és csírázás stádiumáig. A táptalaj általában különböző aminosavakat és hormonokat tartalmaz. A hajtások és gyökerek normális esetben szimultán fejlődnek. A hatékony regenerálás a táptalajtól, a genotípustól és a tenyészet előéletétől függ. Ha ezt a három változót szabályozni tudjuk, a regenerálás teljesen reprodukálható és megismételhető.

A transzformált növényi sejtekből kifejlődött növényekből önmegtermékenyítéssel beltenyésztett növényeket termelhetünk. A beltenyésztett növény olyan magokat terem, amelyek tartalmazzák az inszekticid hatású peptid génjét. Ezeket a magokat elültethetjük, hogy olyan növényeket termeljünk, amelyek kifejezik az inszekticid hatású peptidet. A beltenyészteteket például felhasználhatjuk rovarirtó hibridek kifejlesztésére. Ebben az eljárásban egy rovarirtó beltenyészet vonalat keresztezünk egy másik beltenyészet vonallal a hibrid előállítására céljából.

Diploid növények esetén tipikusan az egyik szülőt transzformáljuk az inszekticid hatású peptid (toxin) genetikai szekvenciával, és a másik szülő vad típusú. A szülők keresztezése után az első generációs hibridek (F_1) 1/2 toxin/vad típus:1/2 toxin/vad típus megosztást mutatnak. Ezekből az első generációs hibridekből (F_1) termeljük önmegtermékenyítéssel a második generációs hibrideket (F_2). Az F_2 hibridek genetikai megoszlása 1/4 toxin/toxin:1/2 toxin/vad típus:1/4 vad típus/vad típus. A toxin/toxin genetikai felépítésű F_2 hibrideket választjuk ki rovarirtó növényekként.

A leírásban a variáns olyan fenotípusos változásokat jelent, amelyek stabilak és öröklődők, beleértve azokat az öröklődő változatokat, amelyek szexuálisan vivődnek át a növények utódaira, feltéve, hogy a variáns még kifejez egy, a találmány szerinti inszekticid hatású peptidet. A leírásban a mutáns olyan módosulást jelent, amely a környezeti tényezők, úgymint sugárzás eredménye vagy olyan genetikai módosulás eredménye, amelyben egy jellemző vonás meiotikusan vivődik át az öröklés jól ismert törvényei szerint. A mutáns növénynek azonban még ki kell fejeznie a találmány szerinti peptidet.

Általában az ideális inszekticid hatású fehérje, amelyet egy transzgénikus növényben való kifejezésre kiválasztottunk, olyan, amelyet a célba nem vett rovarokkal és a gerincesekkel szembeni veszélytelenség jellemez. Az expressziós rendszereket úgy választjuk meg, hogy az expresszió mértéke lehetővé tegye az inszekticidkénti hatékonyságot. Így annak a technikai kivitelezhetősége, hogy olyan transzgénikus, mezőgazdaságilag jelentős növényeket nyerjünk, várhatóan egy további fegyvert ad a farmerek kezébe, hogy azt egy integrált kártevőkezelési rendszerben alkalmazzák termények rovarkárának csökkentésére környezetvédelmi szempontból megbízható módon.

G. A peptidek alkalmazása inszekticidekként

A találmány szerinti inszekticid hatású peptidek gerinctelen kártevők, úgymint a Liepoptera rendbe tartozó kártevők elleni küzdelemben használhatók úgy, hogy a kártevőket érintkezésbe hozzuk a találmány szerinti valamely peptid hatékony mennyiségével. Alkalmas módon rovarok az előnyben részesített kártevők.

Ismertek az eljárások kártevőknek valamely peptiddel való érintkeztetésére a kártevők elleni küzdelemben. Például szintetikusan kapszulázhatjuk a fehérjét a kártevőbe való orális bevitel céljából. A találmány szerinti fehérjéket kifejező rekombináns gazdasejteket, úgymint *Pseudomonas fluorescens*-t, hővel elpusztíthatjuk, és a kártevőknek adagolhatjuk orális bevitel és kiirtás céljából.

Természetesen azokat a módszereket, amelyekkel a találmány szerinti fehérjéket használjuk gerinctelen kártevők elpusztítására, más kártevőirtási módszerekkel kombinációban is alkalmazhatjuk. Például a fentiekben leírt transzgénikus növényeket és *E. colit* géntechnológiai úton átalakíthatjuk úgy, hogy más gerinctelen toxinokat fejezzenek ki a kiirtandó kártevő típusától és más lényeges változóktól függően.

Ezért előállíthatunk olyan inszekticid kompozíciókat, amelyek a találmány szerinti valamely peptid és mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sója inszekticidként hatékony mennyiségét tartalmazzák mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható hordozóanyagban.

H. Az inszekticid hatású peptidekkel szembeni antitestek

A találmány további tárgyát képezik a találmány szerinti inszekticid hatású peptidekkel szembeni antitestek. A leírás következő részében hivatkozunk az immunológiában jártas szakember számára ismert különböző eljárásokra a leírásban ismertetett antitestekkel reaktív peptidek detektálására és tisztítására.

Az antitest "képes megkötni" egy molekulát, ha képes specifikusan reagálni a molekulával, hogy ezáltal a molekulát az anti-

testhez kösse. Az "epitóp" elnevezés egy peptid antigén azon részére vonatkozik, amelyet egy antitest fel tud ismerni, és meg tud kötni. Egy antigénnek egy vagy egynél több epitópja lehet. Az "antigén" képes arra indukálni egy állati szervezetet, hogy olyan antitestet termeljen, amely az adott antigén egy epitópjához képes kötődni. A fentiekben hivatkozott specifikus reakció azt jelenti, hogy az antigén igen szelektív módon lép reakcióba a neki megfelelő antitesttel és nem lép reakcióba azzal a sokféle antitesttel, amelyek termelését más antigének előidézhetnék.

Az "antitest" (Ab) vagy "monoklonális antitest" (Mab) kifejezés a leírásban olyan intakt molekulákra vagy azok fragmentumaikra (úgy mint például Fab és $F(ab')_2$ fragmensekre) vonatkozik, amelyek képesek egy antigént megkötni. A Fab és a $F(ab')_2$ fragmenseknek hiányzik az intakt antitestek Fc fragmense, gyorsabban ürülnek a keringésből és kisebb mértékű lehet nonspecifikus szövetkötésük egy rovar antitestre nézve.

A találmány szerinti antitesteket a számos eljárás bármelyikével előállíthatjuk. Az ilyen antitestek előállítási eljárásai jól ismertek és a szakirodalomban teljes mértékben ismertettek vannak. Lásd pl. a Sambrook et al., "Molecular Cloning a laboratory manual", második kiadás, Cold Spring Harbor Press, Vol. 3, Ch. 18 (1989). Például olyan sejteket, amelyek kifejezik az inszekticid hatású peptidet vagy annak egy fragmensét, beadhatunk egy állatnak abból a célból, hogy poliklonális antitesteket tartalmazó szérumok termelését indukáljuk, amelyek képesek megkötni az inszekticid hatású peptidet. Általában egy inszekticid hatású peptidfragmenst állítunk elő és tisztítjuk, hogy lényegében megszabadítsuk a természetes szennyezőktől, vagy szinteti-

zálunk egy inszekticid hatású peptidfragmenst ismert módon. Akár a tisztított fragmenst akár a szintetizált fragmenst, akár a tisztított természetes fragmens és/vagy szintetizált fragmens kombinációját bevihetjük egy állatba abból a célból, hogy nagyobb fajlagos aktivitású poliklonális antiszérumokat termeljünk.

Monoklonális antitesteket az ismert hibridóma eljárással állíthatunk elő. Az ilyen eljárások általában magukban foglalják egy állat immunizálását egy inszekticid hatású peptid antigénnel. Az ilyen állatok splenocitáit extraháljuk és fuzionáljuk egy megfelelő mieloma sejtvonallal. Bármilyen alkalmas mieloma sejtvonat használható a találmány szerint. Fúzió után a keletkezett hibridóma sejteket szelektíven tartjuk fenn alkalmas táptalajban, majd korlátozó higítással klónozzuk. Az ilyen szelekcióval nyert hibridómia sejteket ezután vizsgáljuk, hogy azonosítsuk a klónokat, amelyek kiválasztják az inszekticid hatású peptid antigén megkötésére képes antitesteket.

Ha a peptidforrás nem tiszta, a hibridóma sejteknek csak egy része termel a peptid megkötésére képes antitesteket (a többi hibridóma sejt olyan antitestet termel, amely a peptid szennyezőit képes megkötni). Ennélfogva szükséges lehet a hibridóma sejtek screenelése azokra nézve, amelyek olyan antitesteket képesek kiválasztani, amelyek képesek a peptid megkötésére. Ilyen screenelést előnyösen úgy végzünk, hogy peptid-(vagy mérge) mintát a hibridóma sejtek mindegyik csoportjából szekretált monoklonális antitest jelenlétében inkubálunk és azonosítunk bármely hibridóma sejtet, amely olyan antitestet szekretál, amely képes semlegesíteni vagy csökkenteni a mérge rovarokat megbénító képességét. Ha egy ilyen hibridóma sejtet azonosítottunk, ismert módszerekkel

klónozással szaporíthatjuk a peptidspecifikus antitest termelése céljából.

Ahhoz, hogy egy nativ vagy rekombináns rovarszelektív toxint antitest affinitás kromatográfiával tisztítsunk, olyan antitestet kell alkalmaznunk, amely képes megkötni az inszekticid hatású peptidet. Egy ilyen antitest általában monoklonális antitest. Ha kinyertünk egy peptidspecifikus monoklonális antitestet, immobilizálhatjuk úgy, hogy egy szilárd hordozóhoz kapcsoljuk, és felhasználhatjuk természetes méregből vagy más forrásokból származó peptid tisztítására immunaffinitás kromatográfia alkalmazásával a szakember számára jól ismert módszerekkel összhangban. Ilyen módszerekkel nagyfokú tisztaságot érhetünk el, és ezáltal olyan peptidet állíthatunk elő, amely lényegében nem tartalmaz természetes szennyezőanyagokat. A leírásban a "lényegében természetes szennyezőanyagot nem tartalmazó" peptidről akkor van szó, ha az olyan formában van jelen, amely mentes az olyan vegyületektől, amelyekhez természetes vagy normális módon társul (vagyis más fehérjéktől, lipidektől, szénhidrátoktól, stb.).

Ha a peptidet megtisztítottuk, felhasználhatjuk egy állat (úgy mint egér vagy nyúl) immunizálására abból a célból, hogy kiváltsuk a peptidspecifikus poliklonális antitest termelődését.

Alkalmas méretű, általában 10-50 nukleotidból álló DNS-próbákat állíthatunk elő a lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptideket kódoló DNS-szekvenciákból. Ilyen próbákat alkalmazhatunk a lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatástú peptidet kódoló DNS jelenlétének kimutatására úgy, hogy a mérget érintkeztetjük a DNS-próbával és detektáljuk a DNS-hez konjugált próbát a szakember számára ismert

módon.

I. Géntechnikai úton előállított inszekticid mikróbák

Az inszekticid hatású peptidek önmagukban vagy más rovar-toxinokkal kombinációban várhatóan felhasználhatók arra, hogy mikrobáknak, úgymint baculovírusoknak és hibrid baktériumoknak toxikus tulajdonságot adjanak vagy növeljék azok toxikus tulajdonságát.

Számos olyan baculovírust regisztráltak már több országban, amelyeket peszticidként használnak. Ezek közé tartoznak azok, amelyek megfertőzik a *Heliothis virescens*-t (gyapottok bagolylepkét), az *Orgyia pseudotsugata*-t (vörösfenyő kisszövőmolyt), a *Lymantia dispar*-t (közönséges gyapjasepkét), az *Autographa californica*-t (lucerna aranybagolylepkét), a *Neodiprion sertifer*-t (fenyőrontó darazsat), és a *Lamprocyrtia pomonella*-t (almamolyt). Legalább egy inszektiszelektív toxin bevietele a genomba várhatóan szignifikánsan megnöveli az ilyen peszticidek hatékonyságát.

A találmány szerinti alkalmazásra különösen alkalmas rekombináns expressziós vektor várhatóan egy baculovírus expressziós vektor, úgymint olyan típusú, mint amelyet a 4,879,236 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismertet, amely leírás e bejelentés tekintetében teljes terjedelmében referenciaként szerepel. További referencia: Carbonell et al. "Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors" *Gene*, 73:409-418 (1988). A vektor várhatóan olyan rendszerben hasznos, melyben egy, a lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciát baculovírusba klónoztunk, úgymint *Autographa californica* (AcMNPV) expressziós vektor-

ba, amint azt a 4,879,236 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás és Miller et al., Science, 219, 715-721 (1983) közleménye ismerteti. A rekombináns expreszszációs vektorú vírust ezután felvihetjük a növényre vagy az állatra, amelynek a rovar egy kártevője, és ha a vírus a kártevő emésztőrendszerébe jut, a rekombináns vírus megtámadja a bélfal sejtjeit, és replikálódni kezd. A replikáció során az inszekticid hatású fehérje génje kifejeződik, ami rövidebb idő alatt vezet a rovar megbénításához vagy elpusztításához, mintha a rovarba a vad típusú AcMNPV vírus jutott volna be.

Egy várhatóan ugyancsak hasznos hibrid vírust ismertet a 0,340,948 számú európai szabadalmi bejelentés. A találmány szerinti DNS-t kifejező hibrid vírus várhatóan olyan vírust eredményez, amelynek megváltozott rovargazda hatásterülete van. Például fúziós fehérjéket kifejezhetünk egy olyan hibrid gén egyetlen polipeptid termékeként, amely hibrid gén a találmány szerinti DNS-ből és egy specifikus rovar bélsejt felismerő fehérjéből áll, hogy az inszekticid hatású peptidet a gazda rovar célanyaghoz irányítsuk.

Különbéle prokarióta és eukarióta mikrobákat transzformálhatunk abból a célból, hogy kifejezzünk egy inszekticid hatású proteint kódoló hibrid toxin gént olyan módszerrel, amelyet a 0,325,400 számú európai szabadalmi bejelentés ismertet.

Olyan hibrid baktériumsejtek, amelyeknek a találmány szerinti fehérjét kódoló gént tartalmazó plazmidjük van, várhatóan felhasználhatók a találmány szerinti eljárásban. A rovarokat úgy pusztítjuk el, hogy a hibrideket felvisszük a rovarokra. Lásd például a 4,797,279 számú amerikai egyesült államokbeli szaba-

dalmi leírást, amely teljes terjedelmében referenciaként szerepel a bejelentés tekintetében.

A következő közlemények más olyan példákat ismertetnek baculovírusok alkalmazására, amelyek megfelelőek a találmány szerinti felhasználásra: Tomalski et al., "Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene", Nature, 352:82-85 (1991), valamint Stewart et al., "Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene", Nature, 352:85-88 (1991); McCutchen, et al., "Development of a recombinant Baculovirus expressing an insect selective Neurotoxin: Potential for Pest Control", Biotechnology, 9:848-351 (1991).

J. Kereszthibridizáció: DNS-szekvenciák mint rokon vegyületek próbái

Alkalmas méretű DNS-próbákat származtathatunk a találmány szerinti DNS-szekvenciákból. Ezeket a próbákat a találmány szerinti inszekticid hatású peptideket kódoló nukleinsavak jelenlétének kimutatására használhatjuk más forrásokból származó nukleinsavakkal végzett hibridizációval. Olyan oligonukleotid próbákkal végzett screenelés, amely próbák kódolják a szignál szekvenciát, a cDNS-fragmenseket vagy akár a teljes cDNS-t csökkentett szigorúságú (reduced stringency) körülmények között, lehetővé teszi, hogy hozzáférjünk más aktív peptidekhez, amelyek funkcionálisan homológok a leírásban szereplő toxincsaláddal. Azonos genusba tartozó, de eltérő speciesű pókok, rokon genusba tartozó pókok, és azonos genusba tartozó, de különböző helyről származó pókok olyan nukleinsavak forrásai, amelyek jó jelöltek a

találmány szerinti DNS-szekvenciából származtatott nukleotid póbakkal végzett kereszthibridizációra. A források felsorolása azonban nem korlátozó jellegű.

K. Az A promoter szekvencia azonosítása

A találmány további tárgya olyan promoter szekvencia, amely a DK 9.2 szintézisét szabályozza a pókokban. A DK 9.2-t kódoló gén szerkezetét úgy vizsgáltuk, hogy egy genomkönyvtárat screeneltünk érlelt toxin cDNS-sel mint próbával. A genomiai DNS analízise a transzkripció kezdetétől (feltételezhetően a cDNA 5'-végétől) felfelé kimutatta egy vélelmezett promoter jelenlétét. A promoter régió 421 bázispárjának DNS-szekvenciáját a SEQ ID NO: 8 azonosítási jellel ellátva mutatjuk be. Ez a vélelmezett promoter sok olyan esszenciális kontrollszignált tartalmaz, amelyek általában jelen vannak a transzláció kiinduló helyétől közvetlenül felfelé. (A promoter kontrollszignálokra vonatkozó áttekintés: McKnight et al., 1982. Transcriptional Control Signals of an Eucaryotic Protein-Coding Gene. Science 217:316.) Egy kanonikus TATA box van a javasolt transzkripciós kiindulási helytől számított -30 helyzetben, és fontosnak tűnik az RNS-szintézis kiinduló helyének a szabályozásában. Tovább felfelé (visszafelé) két disztális palindrómás szekvencia van, amelyek egyike tartalmazza a consensus CAAT boxot, amelyről feltételezhető, hogy fontos az RNS polimeráz II enzim kötése szempontjából. Vélhetőleg ez a promoter, vagy e promoter régiói hasznosak számos gén transzkripciójában és expressziójában növényi, állati vagy bakteriális sejtek, például rekombináns konstrukciók esetén.

Példák

A következő példákat adjuk meg a találmány tárgyát képező kompozíciók és eljárások bemutatására, ezek azonban nem korlátozzák az igényelt oltalmi kört.

Anyagok és módszerek

Pókokat azonosításukkal együtt a Spider Pharm, Inc. of Black Canyon City, AZ cégtől szereztünk be. *Diguettia canities* pókokból kinyertük a mérget olyan módszerrel, amely biztosítja, hogy megelőzzük a méreg elszennyeződését a testnedvekkel (visszafolyással vagy hemolimfával).

Toxinok tisztítása - A nyers mérget (-80°C -on tároljuk) megolvasztjuk, alaposan összekeverjük és 0,1%-os trifluor-ecet-savban (TFA) oldjuk kromatografálást megelőzően. A nyers mérget fordított fázisú folyadékkromatográfiával (RPLC) frakcionáljuk Beckman System Gold 126 oldószer és 168 fotodióda-rendszer dektor modulok alkalmazásával. Acetonitrilt vagy izopropanolt használunk TFA-val kombinációban mint ionpár képző reagenst. A következő oszlopokat használjuk tisztításra azonos mátrixú védőoszlopokkal: Dynamax 300 A RP C_{18} oszlop (25 cm x 4,6 mm belső átmérő, 5 μm részecske), valamint Vydac 300 A C_{18} félpreparatív oszlop (25 cm x 10 mm belső átmérő, 5 μm részecskeméret). A csúcs detektálást 220 nm-en végezzük, és GILSON 208 mikro-frakciószedővel gyűjtjük a frakciókat. Minden frakciót liofilizálunk (száraz állapotig) a frakcionálást követően, és -80°C -on tárolunk.

Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FAB-MS) - A tömegspektrumokat a University of Illinois VG készülékein vettük fel ZAB-SE tömegspektrométer készülékeken standard FAB körülmények

között (Xenon gáz, feloldás 1000, gyorsító feszültség 8 kV, forrás hőmérséklet 40°C). A mintákat (körülbelül 1 µg) 25% vizes TFA-t (1,0%) tartalmazó 4 µl tioglicerinben analizáltuk.

1. példa

Inszekticid peptidet tartalmazó frakciók kezdeti frakcionálása és azonosítása Diguetia canities teljes méregből

25 µl liofilizált teljes mérget, melyet Diguetia canitiesből az előbb leírtak szerint nyerünk 0,1%-os trifluor-ecetsavban (TFA) oldunk, majd fordított fázisú folyadékkromatográfiával frakcionálunk félpreatatív Vydac RPC₁₈ oszlopon, az eluálást 3,5 ml/perc áramlási sebességgel végezzük. Lineáris eluálószer gradienst alkalmazunk, 85:15 arányú vizes 0,1% TFA:50% acetonitril, 0,1% TFA eleggyel kezdünk és körülbelül 50:50 arányú eleggyel fejezzük be 180 perc múlva.

I/a táblázat

A Diguetia canities teljes méreg néhány frakciójának retenciós ideje

<u>Frakció</u>	<u>Retenciós idő (körülbelül perc)</u>
1	3.2
4	29.6
6	48.2
8	57.1
9	62.8
10	66.4
11	68.7
12	71.4
13	77.1
16	126.1

17

131.4

Mindegyik frakciót betöményítjük úgy, hogy liofilizáljuk az eluensből majd vízből liofilizáljuk. A maradékot -80°C -on tároljuk. Mindegyik frakciót $25\ \mu\text{l}$ pufferolt fiziológiai sóoldatban oldjuk az inszekticid hatás értékelésére. Néhány frakció inszekticid hatását *Heliothis virescens* (gyapottok bagolylepke, tobacco budworm, "TBW") rovarokkal végzett vizsgálatokkal igazoltuk (I/b táblázat).

TBW lárvákat - minden frakcióra öt-öt darabot - $3\ \mu\text{l}$ vizsgált oldattal injektálunk $50\ \mu\text{l}$ -es Hamilton-fecskendőt használva, amely egy 33-as mérőtűvel és egy PB 600-as ismétlő mikroadagolóval van ellátva. Az injektálást úgy végezzük, hogy a tűt a hasi rész oldalirányú középvonalába (a lábkezdemények egyikének közelébe) kis hajlásszögben illesztjük be annak érdekében, hogy elkerüljük a belső szervek károsodását. Az injektálást követően mindegyik rovar egy elkülönített konténerbe helyezünk, amely mesterséges táplálékot tartalmaz. A megfigyeléseket periódikusan végezzük; a bénulást az injektálást követő 24-edik órában mérjük. Átlagsúlyként $0,3\ \text{g}$ -ot számítuk a gyapottok bagolylepkékre a dózis meghatározásánál. A kontroll rovarok csoportját csak a pufferolt sóoldattal injektáljuk.

A bénulás fokozatosan alakult ki és egy kifejezett izomgörcs szakasz előzte meg. Súlyos esetekben ezek a görcsök az injekciót követő 15-30 percen belül jelentkeztek, és fokozatosan erősödtek, amíg a lárvák teljesen mozgásképtelenné váltak. A remegés néha több mint 48 órán át fennmaradt az injektálás után. Ez néha akkor is előfordult, ha szubletális dózist adagoltunk, és a lárvák esetleg felépültek. A remegés súlyossága a toxicitás legmegbízhatóbb indikátora; azok a lárvák, amelyek a teljes bénulás és/vagy

test összehúzódás állapotába jutottak, nem épültek fel.

I/b táblázat

Diguetia canities teljes méreg RPLC frakciók toxicitása TBW-re
(7,5 WVE/g rovar) **

<u>Frakció</u>	% bénulás*	% bénulás*
	<u>kezdeti</u>	<u>24 óra</u>
1	0	0
4	0	0
6	0	0
8	100	100
9	100	100
10	100	100
11	100	100
12	100	100
13	0	0
16	0	0
17	0	0
Kontroll	0	0

* A bénulást azzal az állapottal definiáljuk, amikor a rovar nem képes visszatérni eredeti helyzetébe, ha a hátára vagy az oldalára fordult.

** WVE (whole venom equivalent): teljes méreg ekvivalens bármely toxin azon mennyisége, amely normálisan jelen van a teljes, lefejt méreg egy mikroliterében: 5 WVE egy 25 µl-es elválasztásból a kinyert maradék 20%-a.

2. példa

A *Diquetia canities*ből nyert 9 jelű frakció tisztítása

A TBW-vel szemben aktív 9 jelű frakció fő komponenseit a homogenitás eléréséig tisztítjuk (mindegyik egy látható sávot ad SDS-PAGE elektroforézissel, közelítőleg a 6500 dalton molekula-tömeg tartományban) egy további kromatografálással Vydac RPC₁₈ (25 cm x 10 mm belső átmérő) oszlopon, lineáris 1,0%/min) oldószergradienst alkalmazva, ahol az oldószerek izopropanol/0,1% TFA, 3,5 ml/min-nél, a detektálást 220 nm-en végezzük.

A csúcs detektálását és a frakciószedést az 1. példában leírtak szerint végezzük. Két frakciót gyűjtünk: az elsőt 21,81 percnél eluáljuk (9.1 frakció) és a másodikat 22,39 percnél (9.2 frakció).

A 9.1 és 9.2 frakciókat az eluensből végzett liofilizálással, ezt követően vízből végzett liofilizálással töményítjük be, így kapjuk meg a 9.1 és a 9.2 maradékokat. A liofilizált frakciók tisztaságát legalább 99%-osnak becsültük. Úgy számítottuk, hogy a 9.2 maradék, melyet 25 μ l teljes méregből nyertünk, körülbelül 6 μ g tiszta fehérjét tartalmaz. A 9.2 maradékot inszekticid hatására nézve gyapottok bagolylepkével szemben az 1. példában leírtak szerint vizsgáljuk úgy, hogy mind az öt rovar 6,3 μ g maradékkal - melyet pufferolt sóoldatban oldottunk - injektálunk, és 5 rovar kontrolloként csak a pufferolt sóoldattal. A rovarokat 24 és 48 óra múlva vizsgáljuk. 24 óra múlva minden olyan rovar, amelyet a 9.2 maradék oldatával kezeltünk megbénult, és ezt követően elpusztult, míg a kontroll rovarok állapota normálisnak tűnt. Nem volt változás az injektálást követő 48 óra múlva.

A polipeptid FAB-MS analízise 6371 ± 2 molekulatömeget jelzett. Az N-terminális aminosavszekvencia analízis a 9.2 maradékra nézve egy olyan parciális aminosavszekvenciát eredményezett, amely lényegében a SEQ ID NO: 1 azonosítási jelű szekvencia 1-33. aminosavjainak felel meg.

A 9.2 Diguetia toxin LD_{50} értéke *H. virescens* (TBW) esetén körülbelül 1,0 mmol/g. A szimptómák hasonlóak azokhoz, amelyek a teljes toxin beadásával járnak, amint azt az 1. példában leírtuk.

3. példa

A Diguetia canitiesből nyert 11 jelű frakció tisztítása

A 2. példában leírtakhoz hasonló módon tisztítjuk a Diguetia canitiesből nyert teljes méregből az 1. példa szerint kapott 11 jelű mintát fordított fázisú folyadékkromatográfiával, és egy frakciót kapunk. Ezt a frakciót betöményítjük úgy, hogy liofilizáljuk az eluensből majd liofilizáljuk vízből, és így a 11-gyel jelzett maradék jeletkezik. Ennek a maradéknak az inszekticid hatását gyapottok bagolylepkén vizsgáljuk, 5,0 WVE/g mennyiséggel a 2. példában leírtak szerint. 24 óra eltelte után a 11 maradékkal kezelt rovarok 80%-a megbénult, és 48 óra múlva az ezen peptiddel kezelt rovarok 60%-a mutatott bénulást. A kontroll rovarok állapota normálisnak tűnt.

Ennek a polipeptidnek a FAB-MS analízise 6740 ± 2 molekulatömeget eredményezett. Az N-terminális aminosavszekvencia analízis a 11 maradékra olyan parciális aminosavszekvenciát adott, amely lényegében a SEQ ID NO: 3 azonosítási jelű szekvencia 1-29. aminosavjainak felel meg.

4. példa

A *Diguetia canities*ből nyert 12 jelű frakció tisztítása

A 2. példában leírtakhoz hasonló módon tisztítjuk a *Diguetia canities*ből nyert teljes méregből az 1. példa szerint kapott 12 jelű frakciót, és egy frakciót kapunk. Ezt a frakciót betöményítjük úgy, hogy liofilizáljuk az eluensből majd liofilizáljuk vízből, és így a 12-vel jelzett maradék keletkezik. Ennek a maradéknak az inszekticid hatását gyapottok bagolylepkén vizsgáljuk a 2. példában leírtak szerint. 24 óra eltelte után a 12. maradékkal keletkezett rovarok 100%-a megbénult, és 48 óra múlva 80% mutatott bénulást. A kontroll rovarok állapota normálisnak tűnt.

Ennek a polipeptidnek a FAB-MS analízise 7080 ± 2 molekula-tömeget eredményezett. Az N-terminális aminosavszekvencia-analízis a 12 maradékra olyan parciális aminosavszekvenciát adott, amely a SEQ ID NO: 5 azonosítási jelű szekvenciának felel meg.

Az anyag korlátozott mennyisége nem tette lehetővé a toxicitás pontos kalibrálását; eredményként a 9.2 maradékot 39%-kal és 67%-kal nagyobb dózisoknál (nmól/g) teszteltük mint a 11, illetve a 12 maradékot. Szándékunkban állt a dózisokat úgy megválasztani, hogy lefedjék a minimális letális dózistól a semmilyen hatást sem mutató dózsig terjedő tartományt, de ezt minden esetben nem tudtuk elérni. Az eredmények azonban azt mutatták, hogy ezeknek a peptideknek egészen hasonló a toxicitása. A 9.2 maradék talán valamivel hatékonyabb mint a többi, de a különbség valószínűleg kisebb mint egy 3-as faktor. Ezeknek a peptideknek (9.2, 11 és 12 maradék) a minimális 100%-os letális dózisa úgy tűnik, hogy a 3,0-5,0 nmól/g tartományban van. Ez kedvező a kereskedelemben kapható inszekticidekkel való összehasonlításban; a teflu-

benzuron topikális LD₅₀ (SAW) értéke például 1,0 nmól/g.

5. példa

A *Diguetia canities* méregből izolált 9.2 és 11 maradékokat kódoló gének izolálása

1. lépés: RNS izolálás

A pókokat külső forrásból gyűjtöttük, és *Diguetia canities*-ként azonosítottuk. Az élő pókokat megfagyasztottuk és a fejtort eltávolítottuk folyékony nitrogénnel hűtve. Extraháltuk az RNS-t a fejtorokból Chomczynski és Sacchi, *Analytical Biochemistry* 162, 156 (1987) eljárása szerint. Poliadenilezett messenger-RNS-t (mRNS-t) tisztítottunk oligo d(T) cellulóz (Pharmacia LKB, Svédország) kromatográfia alkalmazásával.

2. lépés: cDNS szintézis

A küldönc (messenger) RNS-t fordítottan átírtuk cDNS-sé patkány (murine) leukémia vírus reverz transzkriptázzal (Bethesda Research Laboratories, MD) a gyártó előírása szerint. A 20 µl reakcióelegy tartalmazza az enzim puffert, mint a cDNS szintézis készlet (Boehringer, Mannheim, IN) részét, továbbá 50 ng mRNS-t, 2 egység RNáz H-t, 30 ng d(T)Not I primert (Promega, Madison, WI), 1 mM minden dezoxinukleozid-trifoszfátot és 100 µg reverz transzkriptázt. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáljuk 1 órán át, majd az inkubációt 10 percen át folytatjuk 42°C-on. A reakcióelegyet etanollal kicsapjuk és 20 µl vízben reszuszpendáljuk.

3. lépés: Primer szintézis

Degenerált primer DNS-szekvencia elegyet hozunk létre, amely a SEQ ID NO: 1 azonosítási jelű szekvencia 1-8. aminosavjait kódolja néhány *Drosophila* kodon preferencia használatával a degene-

ráció csökkentésére. Ezt a primert a University of Utah, Howard Hughes Medical Institute-ban szintetizálták.

4. lépés: Amplifikáció (sokszorozás)

A DNS-nek primer által irányított enzimes amplifikációját termostabilis DNS-polimerázzal először Saikki et al., Science, 239:487 (1988) írta le. A mi esetünkben 5 μ l *Diguetia* fejtor cDNS-t használunk templátként polimeráz láncreakcióban, amelyet a Gene AmpTM DNS amplifikációs készletben (Perkin Elmer Cetus, CA) lévő reagensekkel végzünk. Az amplifikációs reakcióelegy tartalmazza az értelmes (sense) és néma (antisense) primereket 2 μ M koncentrációban, 100 μ M-t mindegyik dezoxinukleotid-trifoszfátból és 4 egység termostabilis rekombináns TaqI polimerázt. A reakciót DNA Thermal Cycler berendezésben végezzük (Perkin Elmer Cetus gyártmány). A 9.2 maradékot kódoló gén szelektív amplifikációját hasonló NH₂-terminális aminosavszekvenciájú rokon toxinok családjából szigorú temperálási (annealing) hőmérsékleten (58°C) érjük el. Ilyen körülmények között egyfonalas DNS amplifikálódik, amely körülbelül 275 bázispár hosszú, amint azt agaróz gél elektroforézissel meghatározzuk. Ha kevésbé szigorú temperálási körülményeket használunk, több mint öt amplifikált terméket mutathatunk ki agaróz gél elektroforézissel, amelyek nagysága körülbelül 200-360 bázispár tartományba van. Ezek a különféle PCR termékek, amelyeket kis szigorúságnál nyertünk valószínűleg olyan polipeptideket kódolnak, amelyek aminosavszekvenciájuk, megközelítő méretük és inszekticid hatásuk tekintetében közel állnak a 9.2 maradékhoz. Várhatóan az ilyen polipeptid közé tartoznak a 11 és 12 maradékok, mivel ezen polipeptid N-terminális szekvenciája nagyon hasonlít egymáshoz és a 9.2 maradékhoz, amint azt a SEQ ID NO: 1,

3 és 5 azonosítás jelű szekvenciák mutatják.

5. lépés: a PCR termékek klónozása

Mind a nagy szigorúságú (high stringency), mind a kis szigorúságú (low stringency) reakciók PCR-termékeit tisztítjuk, hogy eltávolítsuk a be nem épült primereket, ehhez Centricon-100 (Amicon) molekula nagyság szerinti szeparáló egységet használunk. A megmaradt termékeket ezután Not I (MBR, Milwaukee, WI), restriktációs enzimmel emésztjük, amely a lefelé haladó (3' vég) primeren belül hasít, és ragadós véget eredményez. A vektort - pKS (Stratagene, LaJolla, CA) - kétszeresen emésztjük EcoR V (US Biochemical) és Not I enzimekkel, hogy olyan helyeket hozzunk létre, amelyek irányított klónozásra specifikusak. A vektort és az inszerciós elemet (insert) ligáljuk, és átalakítjuk DH5 α F' komplexszé. Kiemelt telepeket (colony lifts) screenelünk a 32 P-vel jelzett belső próbával, és a jelölt telepeket tovább jellemezzük, a miniprep DNS szekvenálásával (US Biochemical's Sequenase Version 2.0) úgy, hogy a belső próbát használjuk primerként.

A két klón cDNS inszerciós elemeinek teljes DNS-szekvenciáját a SEQ ID NO: 2 és 4 azonosítási jelű szekvenciák mutatják be. Csak az előbbit nyertük olyan klónokban, amelyeket a szigorú PCR reakcióban nyertünk, míg mindkét típusú cDNS inszerciós elemet megtaláljuk olyan klónokban, amelyeket a kis szigorúságú PCR reakciók termékeiből nyertünk. A SEQ ID NO: 2 azonosítási jelű szekvenciával kódolt polipeptid aminosavszekvenciáját a SEQ ID NO: 1 azonosítási jelű szekvencia mutatja be. Ennek a polipeptidnek az N-terminális szekvenciája megegyezik azzal, amit a 9.2 maradékra meghatároztunk. Ennek a polipeptidnek a számított molekulatömege 6377,9 dalton. Feltételezve, hogy a natív polipep-

tídben minden cisztein intramolekuláris diszulfid kötések (cisztein) formájában van, a számított molekulatömeg 6369,7 dalton. Ezért ez a polipeptid azonosnak tűnik azzal a polipeptiddel, amelyet a 9.2 maradékból izoláltunk, és amelynek molekulatömege tömegspektrometriás meghatározás szerint 6371 ± 2 . A SEQ ID NO: 4 azonosítási jelű szekvencia által kódolt polipeptid aminosavszekvenciáját a SEQ ID NO: 3 jelű szekvencia mutatja be. Ennek a polipeptidnek az N-terminális szekvenciája azonos azzal, amit a 11 maradékra meghatároztunk. Ezért úgy tűnik, hogy ez a polipeptid ugyanolyan mint a 11 maradékban izolált polipeptid.

6. példa

Emlős toxicitás

5 μ l teljes méreg - amit az előbbieket szerint nyertünk D. canitiesből - halálos volt egerekre intraperitoneális (IP) injekció formájában három különálló tesztben. A kezelt egereket kezdetben nem lehetett megkülönböztetni a kontrollcsoporttól, amely sóoldatot kapott. Az injektálást követő mintegy 10-15 perc múlva a kezelt egerek mérsékelten hiperaktívvá váltak, jellegzetes ugráló járást mutattak; ezt koordinálatlanság, nehéz légzés és görcsök rövid periódusa követte. A halál a tünetek első megjelenésétől számítva 2 percen belül következett be.

A 9.2, a 11 és a 12 maradékokat intraperitoneálisan injektáltuk egerekbe körülbelül 4,2 mg/kg, 0.9 mg/kg, valamint 1,2 mg/kg dózisokban, és semmilyen hatást sem tapasztaltunk 24 órán belül egyik peptid esetén sem.

A 9.2 maradékból négy egér (kb. 28 g) agykamráiba injektáltunk körülbelül 30 μ g dózisban állatonként (kb. 1 mg/kg). Semmi-

lyen hatást sem tapasztaltunk 48 órán át az injekció beadása után. Egy másik egérnek (IP) 125 μg (4,2 mg/kg)-ot adtunk be a 9.2 maradékból és nem tapasztaltunk hatást.

A mérég gerincesekkel szembeni toxicitásának jellemzésére a teljes mérég fordított fázisú folyadékkromatográfiával kapott összegyűjtött frakcióit teszteltük egerekben (1. ábra). A 2 frakció tartalmazta a gyapottok bagolylepkével (TBW)-vel szembeni aktivitású komponenseket. 25 μl teljes méreggel (WVE) ekvivalens dózisoknál az 1 és 2 frakciók intraperitoneális injekciói nem voltak hatással; a 3 frakció ugyanazt a hatást idézte elő mint a teljes mérég. Ezek az eredmények az inszekticid hatékonyság és a gerincesekre gyakorolt (toxikus) aktivitás egyértelmű szétválását mutatják a *Diguetia canities* mérég komponenseiben.

7. példa

Elektrofiziológiai adatok

DK 9.2-t vizsgáltunk 1 μM -nál szinaptikus transzmisszió (kiváltott populációs spike) a Schaffer kollaterális-CA 1 piramis sejteken lévő szinapszisoknál a patkány hippocampusz szeleteken. Az adatok - amelyeket a 2. ábra mutat be - reprezentálják az idő szerint átlagolt populációs spike mérési adatokat (a) a DK 9.2 adagolást megelőző 5 percre és (b) a DK 9.2 adagolást követő 15-20 perces intervallumra. Ezek a regisztrált adatok fedik egymást, azt jelezve, hogy ennél a koncentrációnál a DK 9.2-nek nincs olyan aktivitása a patkány központi idegrendszerben (CNS-ben), amit ki lehet mutatni ebben a vizsgálatban. A vizsgálattal kimutatható különféle emlős ioncsatornákra és neurotranszmitter receptorokra gyakorolt számos hatás (T.V. Dunwiddie, The Use of In

Vitro Brain Slices in Neuropharmacology, in Electrophysiological Techniques in Pharmacology, szerk. H.M. Geller, Alan R. Liss, Inc. New York, 1986). Különösen az olyan molekulák, amelyek megakadályozzák a nátriumcsatornák inaktiválódását, úgymint bizonyos skorpió toxinok, a populációs spike válasz utolsó fázisának kifejezett szélesedését okozzák (Kaneda M., Myama Y, Ikemoto Y. és Akaike N., Scorpion toxin prolongs an inactivation phase of the voltage-dependent sodium current in rat isolated single hippocampal neurons, Brain Res. 487:192-195, 1989; Alan L. Mueller, Natural Product Sciences, Inc., publikálatlan megfigyelése). Ezzel szemben a DK 9.2 rovarpreparátumokban (házilégység) 100-szor kisebb koncentrációkban hatásos és olyan módon, ami arra utal, hogy megakadályozza a rovarok nátriumcsatornáinak az inaktiválódását.

8. példa

A DK 9.2 prekursorát kódoló, a szintézissel ellentétes irányú (upstream) cDNS-szekvenciák

Annak érdekében, hogy megkapjuk a DK 9.2-t kódoló cDNS felfelé (a szintézissel ellentétesen) irányuló szekvenciáit, egy olyan belső oligonukleotidot szintetizálunk, amely megfelel a 159-178 számú nukleinsavcsoportoknak azon DNS-szekvencia néma (antisense) szálán, amelyet a SEQ ID NO: 2 azonosítási jellel adunk meg. Ennek a primernek az 5' végén egy Eco RI restrikciós hely van. Tíz mikroliter egyfonalas mregmirigy cDNS-t farkazunk ennek 3'-végén dezoxiguanozin csoporttal terminális dezoxinukleotid transzferáz enzim (Bethesda Research Laboratories) felhasználásával. Egy 20 μ l-es reakcióelegyet, amely 14 μ enzimet és

500 μ M dGTP-t tartalmaz, 37°C-on 15 percen át inkubálunk. A mintát etanollal kicsapjuk, és 20 μ l vízzel reszuszpendáljuk.

A génspecifikus primertől felfelé lévő DNS szekvenciákat amplifikáljuk rögzített PCR eljárás felhasználásával, amely hasonló ahhoz, amelyet a szintézis irányában működő (downstream) érlelt toxin cDNS-szekvenciáknál használunk. Az amplifikációs reakcióelegy tartalmazza az értelmes primert [d(C)-farkú primert] és a néma (antisense) primert 2 μ M koncentrációban, 100 μ M-t mindegyik dezoxinukleotid trifoszfátból és 4 egység termostabilis rekombináns Taq polimerázt. A hőmérsékletprofil a következő: 2 perc 94°C-on, 2 perc 37°C-on, 1 perc 37°C-on. Ezt a ciklust kétszer megismételjük, majd átkapcsolunk egy azonos profilra, amely magában foglal egy emelt, 54°C-os temperálási hőmérsékletet a második lépésnél. Ezt a ciklust 32-szer ismételjük meg.

Az rögzített RCR 380 bp-t eredményezett, amint azt igazoltuk egy 4%-os agaróz gélen etidium-bromid jelenlétében végzett méréssel. Ezt a reakcióterméket feltöltjük a végeknél az E. coli DNS Polimeráz I vagy (Klenow) fragmensének (Molecular Biology Resources, Madison; WI) az alkalmazásával, és etanol hozzáadásával kicsapjuk. A terméket reszuszpendáljuk, és Eco RI restrikciós enzimmal emésztjük. Az emésztett fragmenst kínáljuk (kinate) 1 mM ATP jelenlétében T4 kináz enzimmal, ezt követően ligáljuk Eco RI- és Eco RV-emésztett pBluescriptsKS vektorrá. A szubklónokat kettős fonalú DNS-szekvenálással analizáljuk Sequenase 2.0 (USB) alkalmazásával.

Az érett peptid toxintól felfelé lévő régióban található cDNS szekvenciák transzlációja feltárta, hogy DK 9.2-t szintetizálhatunk mint prekursor fehérjét. A "menetiránnyal ellentétes"

(felfelé irányuló, upstream) szekvenciát a SEQ ID NO: 6 azonosítási jelű szekvencia mutatja be. A kódolt prekursor fehérje szignál szekvenciából és propeptid régióból (SEQ ID NO: 7) áll, amelyeket eltávolítunk, hogy megkapjuk az érett peptid toxint, amely a pókméregből izolálható. Úgy véljük, hogy a szignál és a propeptid szekvenciák szükségesek a DK 9.2 termelésében és elválasztásában a pókoknál.

9. példa

Rekombináns baculovírus konstrukció

Lepidoptera szignál szekvenciát [Jones et al., Molecular Cloning Regulation and Complete Sequence of a Hemocyanin-Related Juvenile Hormone-Suppressible Protein From Insect Hemolymphs, J. Biol. Chem. 265:8596 (1990)] építünk fel két szintetikus oligonukleotidból Rossi et al. [J. Biol. Chem. 257:9226 (1982)] szerint. Két 48mert tisztítunk ion-cserélő kromatográfiával. Az a két oligonukleotid a komplementer szekvencia tizenegy bázispárját osztja meg a 3'-végükön. Ha a szekvenciákat a négy dezoxiribonukleotid foszfatáz és a DNS-polimeráz I Klenow-fragmensének a jelenlétében temperáljuk, egy kettős fonalú terméket szintetizálunk. A reakciótermékeket tisztítjuk hidroxil-apatit kromatográfiával és a kettős fonalú DNS-molekulákat AatII-vel emésztjük, a restriktációs enzimeket, amelyek alkalmasak arra, hogy ezt a szekvenciát a DK 9.2 cDNS-től felfelé inszertálják, a pKS-DK9c-be klónozzuk. A szubklónokat screeneljük a szignálszekvencia inszerciójára nézve, és DNS-szekvenálással értékeljük.

A DNS-szekvenálás keretén belüli fúziót igazolt a két cDNS-szekvencia között. A teljes szintetikus génkonstrukciót kivágjuk, és klónozásra adaptáljuk pBlueBac, egy baculovírus transzfer

vektor *NheI* helyébe [Vialard, J., et al, J. Virology 64:3-50 (1990)]. Szubklónokat szekvenálunk a konstrukció korrekt inszertálásának az igazolására. A WR9 plazmid DNS-szekvenálása igazolta a szintetizált "caterspider" gén (*preDK 9.2*) beépülését a *pBlueBac* baculovírus transzfer vektorba (3. ábra). A *pBlueBac* vektor elősegíti a screenelési eljárást, mivel a mi rekombináns génünknek a baculovírusba való beépülését (inszercióját) a β -galaktozidáz ko-expressziója (együttes kifejeződése) kíséri, és ez színváltozással detektálható, ha az indikáló táptalajon tenyésztjük.

PreDK 9.2-t kódoló rekombináns baculovírusokat állítottunk elő úgy, hogy *Spodoptera frugiperda* Sf9 törzs (ATCC#CRL1711) sejteket transzfektáltunk 1 μ g *AcMNPV* vírus DNS és 2 μ g plazmid DNS elegyével Summers és Smith eljárása szerint (ld. "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures" Texas Agricultural Experiment Bulletin No. 1555, 1988). A transzfekció után négy nappal a sejt felülúszó higításait foltokként 100 mm-es lemezekre visszük fel, amely lemezeket 5×10^6 Sf9 sejtrel beoltottunk és lefedtünk agarózt tartalmazó *Blue-gal*-l (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) mint szubsztrátummal. A rekombinánsok 5-6 napon belül detektálhatók voltak halványkék színük alapján. A foltokat pasztőr pipettával felvettük, és 1 ml tápoldattal eluáltuk. Azt az eluenst használtuk T-25 lombikba oltott Sf9 sejtek újrafertőzésére. A fertőzést követő három nap múlva hat különböző izolátumból kis térfogatú felülúszót gyűjtöttünk, és vírus DNS előállítására használtuk fel. PCR amplifikáció - a polihedrin gént körülvevő régióból származó vírus specifikus primerek alkalmazásával - azt igazolta, hogy a hat vírus izolátumból öt megfelelő méretű inszertet tartalmazott és nem tartalmazott vad típusú

szennyeződést. A rekombináns vírusok beállított titerű törzsoldait állítottuk ezután elő in vivo és in vitro vizsgálatokra.

10. példa

A rekombináns DK 9.2 biológiai aktivitása

A rekombináns 9.2 maradékot (DK 9.2) szérumot tartalmazó sejttenyészet táptalajból tisztítjuk, és biológiai aktivitását lárva-állapotú TBW lárvákban teszteljük. A dózisokat a tesztoldat A₂₈₀ abszorpciós adata alapján számítjuk. 16 µ/g dózisonál a rekombináns anyag kifejezett izomgörcsöket okozott az injektálást követő 2 órán belül. A lárvák fele (hatból három) megbénult és súlyosan összezsugorodott 48 óra múlva, míg a másik három lárva még mindig gyenge vagy közepes izomgörcsöket mutatott. A 8 µ/g dózis szintén három lárvát bénított meg hat lárva közül. Az adatok igazolják, hogy a rekombináns DK 9.2 biológiailag aktív.

11. példa

Rekombináns baculovírus - In vivo teszt

A. DK. 9.2 rekombináns nukleáris polihidrózis vírus
(vACDK 9.2) biológiai aktivitása

1) Víruskészítmények titrálása

A vírus törzsoldatok titerét a plakk vizsgálati eljárással (plaque assay method) határozzuk meg (Luria et al., "General Virology", 1978, pp. 21-32; John Wiley and Sons, New York). A titert az egységnyi térfogatra számított plakk képző egység (plaque forming units, PFU) formájában fejezzük ki, míg a dózisokat PFU/lárva egységekben. Egy PFU egy érett virion (vírus) funkcionális ekvivalense olyan preparátumban, amelyben minden

virion képes sikeresen megfertőzni egy gazdasejtet (Luria et al., ibid). Például 103 gazdasejtet tud megfertőzni egy olyan vírus-készítmény minden mikrolitere, amely 106 PFU/ml (vagyis 103 PFU/ μ l) tartalmú.

2. Biológiai vizsgálatok

A DK 9.2 rekombináns nukleáris polihidrózis vírus (rNPV), vAcDK 9.2 biológiai aktivitását dózis-válasz vizsgálatok sorozatával teszteljük. Ezekben a vizsgálatokban TBW lárvákat (átlagos tömegük körülbelül 250 mg) injektálunk szövettényészet táptalajban lévő vAcDK 9.2 különböző dózisaival vagy egyedül szövettényészet táptalajjal (n = 10). Amint azt az 1. példában a toxin injektálási kísérleteknél leírtuk, a kezelt lárvákat egyedi konténerekben tartjuk, táplálékkal látjuk el, és periódikusan megfigyeljük. A II. táblázat két ilyen vírus injektálási vizsgálat egyesített eredményeit szemlélteti. 5000 PFU/lárva és ennél nagyobb dózisoknál a DK 9.2 toxicitás tipikus szimptomái (izomremegések és görcsök) a fertőzést követően körülbelül 24 óra múlva kezdtek megjelenni, és a vizsgált rovaroknak legalább a fele mozgásképtelenné vált (vagyis megbénult vagy részlegesen megbénult) 48 órán belül. A lekisebb vizsgált dózis, 50 PFU/lárva, 48 órán belül idézett elő remegéseket és görcsöket, és a lárváknak legalább 70%-át mozgásképtelenné tette 96-120 óra alatt.

B. A vAcDK 9.2 biológiai aktivitás vad típusú NPV-vel összehasonlítva

További vizsgálatokat végeztünk a vAcDK 9.2 hatékonyságának meghatározására vad típusú szülővírusának, az *Autographa californica* NPV (wt-AcMNPV) a hatékonyságával összehasonlítva. E vizsgá-

latok célja annak a meghatározása volt, hogy a vAcDK 9.2-vel megfertőzött lárvák rövidebb idő alatt válnak-e mozgásképtelenné mint az azonos dózisú wt-AcMNPV-vel megfertőzött lárvák.

1. Injektációs vizsgálatok

A vAcDK 9.2 és a wt-AcMNPV biológiai aktivitását injektációs vizsgálatok sorozatával hasonlítjuk össze. Utolsó lárvaállapotban lévő gyapottok bagolylepke (tobacco budworm, *Heliothis virescens*) lárvákat, V-betűs aranybagolylepke (cabbage looper, *Trichoplusia ni*) lárvákat és délszaki gyombagolylepke (beet armyworm, *Spodoptera exigua*) lárvákat injektálunk 5×10^5 PFU/lárva dózisban vAcDK 9.2-vel vagy wt-AcMNPV-vel; a kontroll lárvákat szövettenyészet táptalajjal injektáljuk. A III. táblázatban összefoglalt eredmények azt mutatják, hogy a vAcDK 9.2 lényegében sokkal hatékonyabb mint a wt-AcMNPV mindhárom fajta esetén.

2. Etetési vizsgálatok

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk a táplálékkal bejuttatott vAcDK 9.2 aktivitását, elő kellett állítanunk ezt a polihedrin-negatív (pol-) rekombináns orálisan fertőző formában. Ezt a vAcDK 9.2-nek a wt-AcMNPV-vel való ko-okklúziójával végezzük el, a szakirodalomban orálisan fertőző pol-rekombináns NPVs előállítására ismertetett eljárások szerint (pl. Kuroda et al., 1989, J. Virology 63(4):1677-1685 és Price et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci 86:1453-1456). SF-9 sejteket fertőzünk egyidejűleg vAcDK 9.2-vel és wt-AcMNPV-vel 10, illetve 2 fertőzési sokszorozásnál (multiplicity of infection, MOI). Egyidejűleg az SF-9 sejtek egy második csoportját egyedül wt-AcMNPV-vel fertőzzük (MOI=2). A fertőzés után öt nappal összegyűjtjük az inklúziós testeket a

sejtek összezúzásával és differenciális centrifugálással (pl. Wood, 1980, Virology 104:392-399). Az inklúziós testeket hemacitométeren megszámoljuk. Azok a sejtek, amelyek vAcDK 9.2-vel és wt-AcMNPV-vel együttesen voltak megfertőzve, kevesebb és kisebb inklúziós testeket hoztak létre mint azok, amelyeket egyedül wt-AcMNPV-vel fertőztünk meg. A polihedrális inklúzió (PIB) hozama a vegyes fertőzésből 4,6 PIB/sejt volt, míg a tiszta wt-AcMNPV-fertőzésből a hozam 33,3 PIB/sejt volt.

A ko-okkludált vAcDK 9.2 és a wt-AcMNPV biológiai hatásának vizsgálata és összehasonlítása céljából diéta inkorporációs vizsgálatot végeztünk. Vegyes vagy vad típusú PIB-et inkorporáltunk nem-agar alapú rovertáplálékba 10^5 PIB/g táplálék koncentrációban. A táplálékot kis konténerekbe osztottuk szét, amelyeket ezután újszülött TBW lárvák leptek el (1 per konténer, n=20). Kontroll lárváknak azonos mennyiségű kezeletlen táplálékot adtunk. A lárvákat hagytuk, hogy ad libitum fogyasszák a táplálékot, és periódikus megfigyeléseket végeztünk a szimptómák kialakulásának követésére. Az eredményeket a II. táblázatban foglaltuk össze. Semmilyen hatást sem észleltünk az első 48 órában, de 72 óra múlva a vegyes PIB-bel táplált lárváknak több mint 50%-a megbénult. A vad típusú vírusnak nem volt hatása eddig az időpontig. 96 óra múlva a rekombináns vírussal kezelt lárváknak több mint 90%-a megbénult míg a vad típusú vírussal kezelt lárváknak csak a 10%-a pusztult el vagy haldoklott. 120 óra múlva a rekombináns vírussal kezelt lárvák 100%-a elpusztult vagy haldoklott, míg ezzel összevetve a wt-AcMNPV-vel kezelt lárvák 75%-a volt ebben az állapotban. Így tehát az etetési vizsgálatban, úgy mint az injektációs vizsgálatokban a vAcDK 9.2-vel kezelt lárvák

szignifikánsan rövidebb idő alatt váltak mozgásképtelenné mint a wt-AcMNPV-vel kezelt lárvák.

II. táblázat

Dózis-válasz vizsgálatok TBW-n vACDK 9.2-vel

% bénulás

Dózis (PFU/lárva)	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra	120 óra
5.1×10^5	0	80	100	100	100
5.1×10^4	0	35	95	100	100
5.1×10^3	0	25	75	90	100
5.1×10^2	0	0	55	85	100
5.1×10^1	0	0	20	65	95
Kontroll	0	0	0	0	0

III. táblázat

vACDK 9.2 és wt-AcMNPV összehasonlítása gyapottok bagolylepke (TBW),
V-betűs aranybagolylepke (CL) és délszaki gyombagolylepke (BAW)
lárvába való injektálással

Kezelés	Fajta	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra	120 óra	168 óra
vACDK9.2	TBW ₂	0	0	100	100	100	100
wt-AcMNPV	TBW	0 ₃	0	0	0	0	0 ₄
kontroll	TBW	0	0	0	0	0	0
vACDK9.2	CL ₅	0	100	100	100	100	N/A
wt-AcMNPV	CL	0	0	0	0	100	N/A
kontroll	CL	0	0	0	0	0	N/A
vACDK9.2	BAW ₆	0	70	90	100	100	100
wt-AcMNPV	BAW	0	0	0	0	0	100
kontroll	BAW	0	0	0	0	0	30

1. Vírusok injektálása: 5×10^5 PFU/lárva dózisban; a kontrollt azonos térfogatú szövet-
tenyészet tápoldattal injektáltuk
2. n = 8; átlagos tömeg körülbelül 300 mg/lárva
3. 8 lárvából 2 kétségtelenül elpusztult az injekció miatti fizikai trauma következtében, ezeket a további értékelésből kizártuk
4. mortalitás a wt-AcMNPV miatt 100% volt a kilencedik napon
5. n = 10; átlagos tömeg körülbelül 165 mg/lárva
6. n = 20 vACDK 9.2-re; n = 10 wt-AcMNPV-re és kontrollra; átlagos tömeg körülbelül 200 mg/lárva

12. példa

A DK9.2-t kódoló gén promotere

A DK9.2-t kódoló gén szabályozó elemeinek az előállítására genomkönyvtárát készítettünk. DNS-t állítottunk elő pókokból Herrmann és Frischauf (in "Methods in Enzymology" Vol. 152, Academic Press, Inc. 1987, pp. 180-183) eljárását adaptálva. A DNS-t részselgesen emésztettünk Sau 3A-val, és 10%-38% szacharóz sűrűség gradiensben 2500 rpm-en 16 órán át centrifugáltuk TLS-55 rotorral (Beckman Co., Ltd.) 35-45 kb-ú összegyűjtött (pooled) DNS-frakciókat állítottunk elő Xho I-emésztett kozmid vektorba való beékelésre (inszertálásra) a parciális feltöltési (fill-in) módszert alkalmazva. A litigációs elegy egynegyedét becsomagoltuk fágreszecskekbe Gigapack goldTM (Stratagene, La Jolla, CA), és transzformáció után a pók DNS 3×10^9 bp-jét meghaladó ekvivalensét kaptuk. A könyvtárát huszonöt 150 mm-es petrilemezre vittük fel, és nylon szűrőkre helyeztük (emeltük) radiojelzett DNS-sel végzett vizsgálatra.

A *Diguetia* genomkönyvtár kiemelt telepeit sorozatokban screeneltük a DK 9.2-t kódoló radiojelzett cDNS-sel, valamint az amino-terminust, a karboxi-terminust és a belső próbát kódoló vég-jelzett oligonukleotidokkal. Egy kozmid, a cDK2, valamennyi próbával hibridizált. Eco RI-emésztett kozmid DNS egy southern foltja (southern blot) azt jelezte, hogy egy 3,0 kb fragmens hibridizálódik mind a belső, mind a C-terminális próbákkal. A cDK2 kozmid kettős fonalú szekvencálása a fentiekben azonosított három primer alkalmazásával összhangban volt a DK 9.2 génjének az izolálásával és arra a lehetőségre utalt, hogy e család más génjei lehetnek jelen a DNS ugyanazon szomszédos darabján, mivel

az amino-terminális oligonukleotid (amelynek nagy fokú a homológiája minden *Diguetia* inszekticid hatású peptiddel), több helyen indít a DNS-kozmidon.

A DK 9.2-t kódoló gén promoter régiójának az előállítása érdekében olyan oligonukleotidot szintetizáltunk, amely megfelel az értelmes szálon lévő pre/szignál szekvenciának. Az ezen primer és más génspecifikus primerjeink közötti PCR amplifikáció fel-térképezte, hogy a szignál szekvencia több mint 3000 bp az amino-terminális exontól felfelé. Ezután a néma szálon (antisense strand) lévő primert használtunk fel a genomikus DNS szekvenálására abban a régióban, amely a szignál peptidet kódoló cDNS 5'-végétől közvetlenül felfelé van.

A DNS-szekvenálás a genomikus DNS-en lévő szignál szekvenciától felfelé egy másik intronra utal, amely a kezdő metionin kodontól a -11 bp-nál van. A prekursor DK 9.2 cDNS 5'-régiójának megfelelő oligonukleotid primert szintetizáltunk, és egy PCR reakció indítására használtuk annak meghatározására, hogy milyen nagyságú közbülső szekvencia van a transzkripció és a transzlációs starthelyek között. Egy 1000 bázispárú amplifikációs termék igazolta az intron jelenlétét és tette lehetővé nagyságának becslését. A genomikus DNS szekvenálása felfelé a transzkripció starthelyig (feltételezhetően ez elvivalens a cDNS 5' végével), jelezte egy promoter jelenlétét. A promoter régió DNS-szekvenciáját a SEQ ID NO: 8 azonosítási jelű szekvencia mutatja be. Ez a vélelmezett promoter sok olyan esszenciális szabályozó szignált tartalmaz, amely más eukarióta promoterben jelen van a transzlációs starthelytől közvetlenül felfelé lévő régióban. Ez a promoter vagy e promoter szakaszai felhasználható(k) más eukari-

óta gének transzkripciójára/transzlációjára baktériumokban, vírusokban, növényekben vagy állatokban.

13. példa

A DK 9.2 hatásmódjára vonatkozó neurofiziológiai vizsgálatok

Neurofiziológia vizsgálatokat végeztünk a DK 9.2 hatásmódjának felderítésére. A rovarlárva neuromuszkuláris junkcióiból (ideg-izom áttevődéseiből) és perifériális idegéből kapott adatok azt mutatják, hogy a DK 9.2 ismétlődő burst kisüléseket indukál azokban az idegekben, amelyek érzékenyek a tetrodotoxin általi blokkolásra. Így a toxin hatásának helye valószínűleg az idegmembrán feszültségérzékeny nátriumcsatornája. További vizsgálatok azt mutatták, hogy a DK 9.2 következetesen izgatja a perifériális idegeket 10 nM-os küszöbkonzentrációnál. Ezen felül legalább 50-szer olyan hatékony mint a *Leiurus quinquestriatus* skorpió 4-es emlős toxinja.

A kísérleti állatok ebben a vizsgálatban a házilégy, *Musca domestica* harmadik lárvaállapotban lévő lárvái voltak. A lárvákat rovartüssel rögzítettük és dorsalisán (hátdoldalón) felnyitottuk mediális szagittális metszéssel. A testeket sík alakúra tűztük, és eltávolítottuk a zsigereket, hogy felszínre hozzuk a testfal izomzatot. A perifériális idegeket átmetszettük, ahol kilépnek az agyból, és az agyat eltávolítottuk. A preparátumot elárasztottuk egy rovar sóoldattal, amely a következő komponensekből áll (mM): NaCl(140), KCl(5), CaCl₂(0,75), MgCl₂(4), NaHCO₃(5) és HEPES(5) pH=7,2.

Ingerlő szívóelektródot csatlakoztatunk bármely alkalmas idegtörzshöz, hogy regisztráljuk a neuromuszkuláris transzmissziót. A stimulálás küszöbét (interküszöböt) lassan emeltük, amíg a 6 vagy 7 izomrost összehúzódását meg nem figyeltük. Ezután ezt a rostot átszúrtuk egy regisztráló intracelluláris mikroelektróddal, amely egy intracelluláris előerősítőhöz van kapcsolva, amelyet arra használunk, hogy kövesse a serkentő posztszinaptikus potenciálokat (Excitatory Post Synaptic Potentials, EPSP) válaszképpen az ideg stimulálására.

A perifériális izomrostokban fellépő növekvő elektromos aktivitás regisztrálására a szívóelektródot egy AC előerősítőhöz kapcsoltuk. A jeleket 100-szorosra erősítettük, és a kimenetet 0,3 és 1 kHz-nél szűrtük. Minden regisztrált jelet digitalizáltunk egy MacLab komputerizált műszerrendszerrel kiírás és analízis céljából.

A DK 9.2 hatásának vizsgálatára irányuló kezdeti kísérletekben a neuromuszkuláris junkció preparátumot használtuk. A perifériális idegre adott egyetlen inger egyetlen EPSP-t eredményezett a testfal izomban. DK 9.2 jelenlétében egyetlen inger az EPSP nagyfrekvenciájú kisülését eredményezte. Az inger által kiváltott kisüléseken felül spontán burst-kisülések ugyancsak megjelentek, és több percen át fennmaradtak. A burst időtartama általában egy másodpercen túl tartott, és az EPST-k frekvenciája egy burst-alatt >30 Hz volt. A burst kisülések jelenléte a testfal izomzatának élénk összehúzódását okozta, ami megnehezítette az intracelluláris méréseket, mert az elektród kilöködött az izomból a burst által előidézett kontrakció folyamán. Ezzel összhangban a legtöbb kísérletet olyan sóoldatban végeztük, amely

nagy koncentrációban (300 mM) tartalmazott szacharózt, ami elnyomja a kontakciót, de nem érinti az elektromos aktivitást. Hasonló eredményeket kaptunk akár normál akár nagy szacharóz tartalmú sóoldatokat használtunk.

A DK 9.2 kezelés után megfigyelt burst kisülések hasonlóak voltak azokhoz, amelyeket skorpió α -toxinok jelenlétében figyeltünk meg, tehát olyan fehérjék jelenlétében, amelyekről ismert, hogy kölcsönhatásba lépnek az idegmembránok feszültségérzékeny nátrium csatornáival. Ennélfogva a burst kisüléseknek blokkolhatóknak kell lenniük a specifikus nátrium csatorna blokkoló tetrodotoxin (TTX) által. A TTX azon képességét, hogy megakadályozza vagy megfordítsa a DK 9.2-indukált burstinget, az 5. ábra mutatja be. Az 5A ábra szerint az EPSP-t gyorsan blokkolta 1 μ M TTX, amely a preparátumot érzéketlenné tette az azt követő kezeléssel szemben, amit 100 nM DK 9.2-vel végeztünk. Hasonló kísérletet mutat be az 5B ábra, amely esetén burstinget idézett elő DK 9.2, és azt megfordította TTX ezt követő adagolása. Ebben a kísérletben a bursting kezdete kimozdította az elektródot az izomból, ami a preparátumok felszúrását eredményezte, amikor arra tettünk kísérletet, hogy helyreállítsuk a regisztrálást. Ha megtaláltuk az alkalmas regisztrálási helyet, a burstinget körülbelül 2 percen át követtük és a készítmény az aktivitás megszűnését mutatta a TTX-kezelést követő néhány másodpercen belül.

Annak érdekében, hogy megkerüljük az összhúzó izomból végzett intracelluláris regisztrálással együttjáró problémákat, a fenti kísérleteket megismételtük úgy, hogy extracelluláris regisztrációt végeztünk rovarlárva perifériás idegekből. Ezek a regisztrátumok növekvő szenzoros ideg aktivitásból állnak a mozgató

idegek spontán ellentétesen vezető aktiválásával együtt. 70 nM-nél a DK 9.2 növekedést okoz az ideg kisülésben, amelyre nincs hatással, ha ezt követően sóoldattal kezeljük, de gyorsan blokkolta 0,4 μ M TTX. Ezen felül TTX adagolása DK 9.2 előtt megakadályozza a bursting megjelenését.

További vizsgálatokat végeztünk a rovar idegeknek a DK 9.2-vel szembeni érzékenységének meghatározására, továbbá abból a célból, hogy összehasonlítsuk annak hatékonyságát egy standard skorpió toxinéval. DK 9.2-t teszteltünk a perifériás idegpreparátumon 1 nM-nál kezdve, és a koncentrációt mintegy ötpercenként emeltük, amíg növekedést figyeltünk meg az aktivitásban. Ebben a preparátumban 1 nM és 5 nM DK 9.2 inaktív volt, de 10 nM aktivitást idézett elő a preparátumban egy rövid késedelem után. A IV. táblázatban összefoglaljuk öt idegpreparátummal nyert eredményeinket, amely preparátumokat arra használtunk fel, hogy meghatározzuk a DK 9.2 hatékony küszöb koncentrációját a rovar idegre nézve.

IV. táblázat

DK 9.2 hatékony küszöbkoncentrációjának meghatározása

Koncentráció	Kezelések száma	Válasz száma	%
Válasz			
1 nM	2	0	0
2 nM	1	0	0
5 nM	3	1	33
10 nM	3	3	100

A kísérletek utolsó csoportja hasonló módon határozta meg a rovarideg érzékenységet a *Leiurus quinquestriatus* skorpió 4-es toxinjára szemben (LqTX4). Preparátumokat ($n = 4$) kezeltünk különböző koncentrációban LqTX4-gyel, ahol 500 nM koncentrációig nem tapasztaltunk hatást. Ez a tapasztalat összhangban van olyan korábbi vizsgálatokkal, amelyek azt mutatták, hogy az LqTX4 specifikus az emlős nátrium csatornákra. A preparátumok ezt követő kezelése DK 9.2-vel 10-30 nM-t igényelt ahhoz, hogy választ kapjunk. A DK 9.2 hatékony küszöbkoncentrációjának csekély emelkedése talán az inaktív LqTX4 általi gyenge blokkoló hatás eredménye. Ezek a kísérletek azt mutatják be, hogy a DK 9.2 legalább 50-szer aktívabb a rovar idegekre nézve mint az LqTX4.

V. táblázat

A leírásban szereplő szekvenciák azonosítása

Azonosítási szám (SEQ ID NO)	Leírás
1	A DK 9.2 aminosavszekvenciája
2	A DK 9.2-t kódoló cDNS-szekvencia
3	A DK 11 aminosavszekvenciája
4	A DK 11-et kódoló cDNS-szekvencia
5	A DK 12 aminosavszekvenciája
6	A DK 9.2-t kódoló teljes cDNS-szekvencia
7	A prekursor DK 9.2 szignál/leader szekvenciának megfelelő aminosavszekvencia
8	A DK 9.2 promoter régiójának DNS-szekvenciája

SZEKVENCIÁK

Azonosítási jel: SEQ ID NO:1:

Szekvencia jellemzők:

(A) Hossz: 56 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Topológia: ismeretlen

Szekvencia leírás: SEQ ID NO:1:

Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Val	Glu	Gly	Pro	Ala	Gly	Cys	Lys	Lys	Tyr
			5					10						15
Asp	Val	Glu	Cys	Asp	Ser	Gly	Glu	Cys	Cys	Xaa	Lys	Gln	Tyr	Leu
			20					25						30
Trp	Tyr	Lys	Trp	Arg	Pro	Leu	Asp	Cys	Arg	Cys	Leu	Lys	Ser	Gly
			35					40						45
Phe	Phe	Ser	Ser	Lys	Cys	Val	Cys	Arg	Asp	Val				
				50				55						

Azonosítási jel: SEQ ID NO:2:

Szekvencia jellemzők:

(A) Hossz: 275 bázispír

(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszerkezet: kettős

(D) Topológia: ismeretlen

Szekvencia leírás: SEQ ID NO:2:

GCC	AAG	GAC	GGC	GAC	GTC	GAG	GGG	CCT	GCG		30
Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Val	Glu	Gly	Pro	Ala		
1			5					10			

GGC TGC AAG AAA TAC GAC GTA GAG TGC GAC	60
Gly Cys Lys Lys Tyr Asp Val Glu Cys Asp	
15 20	
AGT GGA GAG TGC TGC MMS AAG CAG TAC CTG	90
Ser Gly Glu Cys Cys Xaa Lys Gln Tyr Leu	
25 30	
TGG TAC AAG TGG CGA CCC CTG GAT TGC CGA	120
Trp Tyr Lys Trp Arg Pro Leu Asp Cys Arg	
35 40	
TGC CTA AAG AGC GGT TTC TTC AGC AGC AAG	150
Cys Leu Lys Ser Gly Phe Phe Ser Ser Lys	
45 50	
TGC GTT TGC AGA GAC GTG TAGATTTGAA ATGAAATTCG	188
Cys Val Cys Arg Asp Val	
55	
TGTTCTTTTT TGTTGTAGA TGACCTAATG AAACAACTGA	228
CATGAATAAA ACAAATTGA ATGAATTGAA AAAAAAAAAA	268
AAAAAGC	275

Azonosítási jel: SEQ ID NO:3:

Szekvencia jellemzők:

(A) Hossz: 58 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: ismeretlen

Szekvencia leírás: SEQ ID NO:3:

Ala Lys Asp Gly Asp Val Lys Gly Pro Ala Gly Cys Met Lys Tyr
5 10 15

Lys	Ser	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Lys	Thr	Cys	Cys	Asp	Gln	Gln	Tyr
				20					25					30
Leu	Trp	Tyr	Lys	Trp	Arg	Asn	Leu	Ala	Cys	Arg	Cys	Phe	Thr	Val
				35					40					45
Glu	Val	Phe	Lys	Lys	Asp	Cys	Trp	Cys	Asn	Asp	Ile	Ser		
				50					55					

Azonosítási jel: SEQ ID NO:4:

Szekvencia jellemzők:

- (A) Hossz: 204 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Szálszerkezet: kettős
- (D): Topológia: ismeretlen

Szekvencia leírás: SEQ ID NO:4:

GCC	AAG	GAT	GGC	GAT	GTC	AAG	GGA	CCT	GCT	GGC	TGC	ATG	AAG	TAC	AAG
Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Val	Lys	Gly	Pro	Ala	Gly	Cys	Met	Lys	Tyr	Lys
1				5					10					15	
AGC	GGA	GAC	TGC	AGA	GGC	AAA	ACT	TGC	TGC	GAC	CAA	CAG	TAC	CTC	TGG
Ser	Gly	Asp	Cys	Arg	Gly	Lys	Thr	Cys	Cys	Asp	Gln	Gln	Tyr	Leu	Trp
				20					25					30	
TAC	AAG	TGG	CGG	AAT	CTT	GCA	TGC	AGG	TGC	TTC	ACG	GTC	GAA	GTG	TTC
Tyr	Lys	Trp	Arg	Asn	Leu	Ala	Cys	Arg	Cys	Phe	Thr	Val	Glu	Val	Phe
				35					40					45	
AAG	AAG	GAC	TGC	TGG	TGC	AAC	GAC	ATC	AGT	TAATTCCACA	TGAAGAAGTA				
Lys	Lys	Asp	Cys	Trp	Cys	Asn	Asp	Ile	Ser						
				50					55						

AGCATCTCCT

Azonosítási jel: SEQ ID NO:5:

Szekvencia jellemzők:

(A) Hossz: 62 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: ismeretlen

Szekvencia leírás: SEQ ID NO:5:

Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Phe	Glu	Gly	Pro	Pro	Gly	Xaa	Leu	Lys	Met
1				5					10					15
Gly	Glu	Leu	Xaa	Lys	Gly	Gly	Thr	Xaa	Xaa	Thr	Lys	Val	Tyr	Lys
				20					25					30
Tyr	Trp	Lys	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Cys	Leu	Gly	Lys	Asn	Asp	Gly
				35					40					45
Trp	Phe	Lys	Lys	Lys	Phe	Ile	Cys	Asp	Glu	Arg	Xaa	Asn	Pro	Xaa
				50					55					60
Xaa	Xaa													

Azonosítási jel: SEQ ID NO:6:

Szekvencia jellemzők:

(A) Hossz: 359 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszerkezet: kettős

(D) Topológia: ismeretlen

(xi) Szekvencia leírás: SEQ ID NO:6:

ATATTACAAG CCGCTCCAGT AGCCGAAGAA GCCTAAGCCA AGACCCAGG TCCGCCACA
 ATG AAG GTT TTT GTT GTA CTG TTG TGC TTG TCT6 CTG GCA GCA GTT TAC
 Met Lys Val Phe Val Val Leu Leu Cys Leu Ser Leu Ala Ala Val Tyr

```

GCC TTG GAG GAA AGA CTA GAC AAA GAC GCC GAC ATC ATG CTT GAT TCA
Ala Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys Asp Ala Asp Ile Met Leu Asp Ser
      -20                -15                -10

CCA GCC GAC ATG GAA AGA GCG AAG GAC GGT GAC GTG GAA GGG CCT GCG
Pro Ala Asp Met Glu Arg Ala Lys Asp Gly Asp Val Glu Gly Pro Ala
      -5                1                5                10

GGC TGC AAG AAA TAC GAC GTA GAG TGC GAC AGT GGA GAG TGC TGC MMS
Gly Cys Lys Lys Tyr Asp Val Glu Cys Asp Ser Gly Glu Cys Cys Xaa
                15                20                25

AAG CAG TAC CTG TGG TAC AAG TGG CGA CCC CTG GAT TGC CGA TGC CTA
Lys Gln Tyr Leu Trp Lyr Lys Trp Arg Pro Leu Asp Cys Arg Cys Leu
                30                35                40

AAG AGC GGT TTC TTC AGC AGC AAG TGC GTT TGC AGA GAC GTG
Lys Ser Gly Phe Phe Ser Ser Lys Cys Val Cys Arg Asp Val
                45                50                55

TAGATTTGAA TTCCAAC

```

Azonosítási jel: SEQ ID NO:7:

Szekvencia jellemzők

(A) Hossz: 38 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Topológia: ismeretlen

Szekvencia leírás:

```

Met Lys Val Phe Val Val Leu Leu Cys Leu Ser Leu Ala Ala
      -35                -30                -25

Val Tyr Ala Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys Asp Ala Asp Ile
                -20                -15

```

Met Leu Asp Ser Pro Ala Asp Met Glu Arg

-10

-1

Azonosítási jel: SEQ ID NO: 8:

Szekvencia jellemzők:

(A) Hossz: 421 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszerkezet: kettős

(D) Topológia: ismeretlen

Szekvencia leírás: SEQ ID NO:8:

TTTAGCAGCC CAAGGCTACA GAGCTGCCGC ACAGGTAAAC CTGAACTACA CAATGCCCCA
TGCCCACGCT CAAACCACAT ACACTCTTTC CCCAACTTTT TTTTGTGTAA AGACAGTTGT
TGCATTCTAA AAGCACGTTT TACTGCAGCT GCTCAGACTG TCTGCTGCTG GTCGAGGCAG
AGTATGTTTC CTACAGAATT CCACCGAAGC ATTGTTCGTG GTACGACGCA GTAAGCATGA
CGCTCAGTTT TTTTGAATC GGAATATGTA ATATCTGCAG CGACACTTAT TGAAATGTTT
CTCCTTCGAC AAGCAATCGC TTTATCGGAA TACCTGCATG ACATAACTGA CAAAACACAT
GTGGCTCCAG AAACAACGAA AACATTCATT CCTGTATATA AGTATCGGAG GAGTGCTGTA
T

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Lényegében tisztítót, inszekticid hatású, *Diguetia* pókméregből izolálható peptid vagy annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sója.
2. Az 1. igénypont szerinti peptid, azzal jellemezve, hogy a pókméreg *Diguetia canities*ből származik.
3. Az 1. igénypont szerinti inszekticid hatású peptid, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6371-6397 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez, valamint annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sói.
4. Az 1. igénypont szerinti inszekticid hatású peptid, melyet a SEQ ID NO:1 azonosítási jel szerint definiált szekvenciával lényegében azonos aminosavszekvencia jellemez.
5. Az 1. igénypont szerinti inszekticid hatású peptid, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6740 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez, valamint annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sói.
6. Az 1. igénypont szerinti inszekticid hatású peptid, melyet a SEQ ID NO: 3 azonosítási jel szerint definiált szekvenciával lényegében azonos aminosavszekvencia jellemez.
7. Az 1. igénypont szerinti inszekticid hatású peptid, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 7080 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű

folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez, valamint annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sói.

8. Az 1. igénypont szerinti inszekticid hatású peptid, melyet a SEQ ID NO:5 azonosítási jel szerint definiált szekvenciával lényegében azonos aminosavszekvencia jellemez.

9. Lényegében izolált DNS-szekvencia, melyet lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvencia jellemez.

10. A 9. igénypont szerinti DNS, azzal jellemezve, hogy a pókméreg *Diguetia canities*ből származik.

11. A 9. igénypont szerinti lényegében izolált DNS-szekvencia, melyet a SEQ ID NO:2 azonosítási jel szerint definiált DNS-szekvencia jellemez.

12. A 9. igénypont szerinti lényegében izolált DNS-szekvencia, melyet a SEQ ID NO:4 azonosítási jel szerint definiált DNS-szekvencia jellemez.

13. A 9. igénypont szerinti lényegében izolált DNS-szekvencia, melyet a SEQ ID NO:6 azonosítási jel szerint definiált DNS-szekvencia jellemez.

14. Rekombináns expressziós vektor, melyet lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható, inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvencia jellemez, azzal jellemezve, hogy a vektor képes kifejezni a kódoló szekvenciát transzformált sejtekben.

15. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a pókméreg *Diguetia canities*ből származik.

16. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású

peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6371-6397 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

17. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:1 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

18. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6740 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

19. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:3 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

20. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 7080 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

21. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO: 5 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

22. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:2 azonosítási jel szerint definiált szekvencia.

23. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:4 azonosítási jel szerint definiált szekvencia.

24. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:6 azonosítási jel szerint definiált szekvencia.

25. A 14. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a transzformált sejtek rovarfertőzésre érzékeny növények sejtjei.

26. Transzgénikus növény, melyet lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvencia jellemez, amely DNS-szekvenciát a növény vagy annak őse csírávonalába vittünk be olymódon, hogy a DNS-szekvencia expressziójának jellegzetességei a növény következő generációiban szexuális szaporodás vagy aszexuális szaporodás révén öröklődnek.

27. Rekombináns baculovírus expressziós vektor, amely képes kifejezni lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciát gazdában vagy gazda rovarsejtben.

28. A 27. igénypont szerinti rekombináns baculovírus expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy az expressziós vektor egy baculovírus genom - amelyet a DNS-szekvencia egy polihedrin gént inszertálva jellemez - és baculovírus polihedrin promoter transzkripciósz kontrollja alatt áll.

29. Rekombináns gazdasejt, amely DNS-szekvenciával - melyet lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvencia jellemez - transzformálva vagy

transzfektálva van olyan módon, amely lehetővé teszi, hogy a gazdasejt kifejezze a peptidet.

30. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a pókméreg *Diguetia canities*ből származik.

31. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6371-6397 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

32. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:1 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

33. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6740 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

34. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:3 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

35. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 7080 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

36. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:5 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

37. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:2 azonosítási jel szerint van definiálva.

38. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:4 azonosítási jel szerint van definiálva.

39. A 29. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtek, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:6 azonosítási jel szerint van definiálva.

40. Eljárás inszekticid hatású peptidek előállítására, azzal jellemezve, hogy

(a) rekombináns gazdasejteket tenyésztünk, azzal jellemezve, hogy a gazdasejtekbe transzformált vagy transzfektált rekombináns expressziós vektornak lényegében a *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciája van, azzal jellemezve, hogy a vektor képes kifejezni a kódoló szekvenciát transzformált sejtekben; és

(b) kinyerjük az inszekticid hatású peptidet a rekombináns gazdasejt-tenyészetből.

41. Rekombináns úton előállított peptidek, melyeket a 40. igénypont szerinti eljárással állítunk elő.

42. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6371-6397

dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

43. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:1 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

44. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 6740 dalton molekulatömeg és fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

45. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:3 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

46. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia olyan inszekticid hatású peptidet kódol, melyet tömegspektrometriás meghatározás szerint körülbelül 7080 dalton molekulatömeg és fordított fázisú folyadékkromatográfiával egyetlen csúcs mozgása jellemez.

47. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében kódolja a SEQ ID NO:2 azonosítási jel szerint definiált peptidet.

48. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:2 azonosítási jel szerint vagy definiálva.

49. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:4 azonosítási jel szerint van definiálva.

50. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a DNS-szekvencia lényegében a SEQ ID NO:6 azonosítási jel szerint van definiálva.

51. Eljárás gerinctelen kártevők elleni védekezésre, azzal jellemezve, hogy a kártevőket lényegében *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid vagy annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sója hatékony mennyiségével érintkezésbe hozzuk.

52. Az 51. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pókméreg *Diguetia canities*ből származik.

53. Az 51. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy kártevőkként rovarok ellen védekezünk.

54. Az 51. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy kártevőkként *Lepidopterák* ellen védekezünk.

55. Eljárás gerinctelen kártevők elleni védekezésre, azzal jellemezve, hogy a kártevőket érintkezésbe hozzuk olyan rekombináns baculovírus-sal, amely képes kifejezni *Diguetia* pókméregből izolálható peptid hatékony mennyiségét.

56. Inszekticid kompozíció, azzal jellemezve, hogy az 55. igénypont szerinti peptid vagy annak mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható sója inszekticidként hatékony mennyiségét mezőgazdaságilag vagy kertészetileg elfogadható hordozóanyagban tartalmazza.

57. Antitest, amely lényegében immunreaktív a *Diguetia* pókméregből izolálható peptiddel.

58. Az 57. igénypont szerinti antitest, azzal jellemezve, hogy a pókméreg *Diguetia canities*ből származik.

59. Eljárás lényegében a *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid jelenlétének kimutatására az 57. igénypont szerinti antitestek alkalmazásával, azzal jellemezve, hogy

(a) kinyerjük a pókmérget;

(b) érintkezésbe hozzuk a pókmérget az antitestekkel, amelyek detektálható jelzőanyaghoz vannak kapcsolva; és

(c) detektáljuk a peptidhez konjugált jelzett antitesteket.

60. Az 59. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pókméreg *Diguetia canities*ből származik.

61. DNS-próba, amely lényegében a *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló DNS-szekvenciából származik.

62. Eljárás lényegében a *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptidet kódoló nukleinsav jelenlétének kimutatására, azzal jellemezve, hogy

(a) kinyerjük valamely pókból a nukleinsavat;

(b) érintkeztetjük a nukleinsavat a 61. igénypont szerinti DNS-próbával; majd

(c) detektáljuk a nukleinsavhoz konjugált próbát.

63. Eljárás lényegében a *Diguetia* pókméregből izolálható inszekticid hatású peptid tisztítására az 57. igénypont szerinti antitestek alkalmazásával, azzal jellemezve, hogy

(a) az antitesteket szilárd hordozóhoz konjugáljuk;

(b) egy, a peptidet tartalmazó oldatot érintkeztetünk a szilárd hordozóhoz kapcsolt antitesttel, mimellett az oldatban lévő peptid az antitesthez kapcsolódik;

(c) eltávolítjuk a szilárd hordozóhoz konjugált antitesthez kapcsolt peptidet; és

(d) összegyűjtjük az eltávolított peptidet.

64. Prepro szekvencia, melyet olyan aminosavszekvencia jellemez, amely lényegében szekvencia homológ a SEQ ID NO:7 azonosítási jel szerint definiált aminosavszekvenciával vagy annak egy részével, azzal jellemezve, hogy a prepro szekvencia vagy annak egy része irányítja egy érlelt peptid szekrécióját és/vagy összehajtogatódását (folding).

65. Génkonstrukció - melyet olyan aminosavszekvencia jellemez, amely lényegében szekvencia homológ a SEQ ID NO:7 azonosítási jel szerint definiált aminosavszekvenciával vagy annak egy részével - működési egységben (operatively) kapcsolva egy peptidhez.

66. Promoter szekvencia, melyet olyan szekvencia jellemez, amely lényegében szekvencia homológ a SEQ ID NO:8 azonosítási jel szerint definiált szekvenciával vagy annak egy részével, azzal jellemezve, hogy a promoter szekvencia irányítja egy gén kifejezését egy rekombináns konstrukcióban.

67. Rekombináns konstrukció - melyet olyan szekvencia jellemez, amely lényegében homológ a SEQ ID NO:8 azonosítási jel szerinti szekvenciával vagy annak egy részével - működési egységben (operatively) kapcsolva a kifejezendő génhez.

68. Inszekticid hatású peptid, azzal jellemezve, hogy a peptid

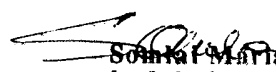
(a) körülbelül 55-körülbelül 65 aminosavból áll;

(b) több mint 40%-os szekvencia homológiájú a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 vagy SEQ ID NO:5 azonosítási jel szerint definiált szekvenciákkal; és

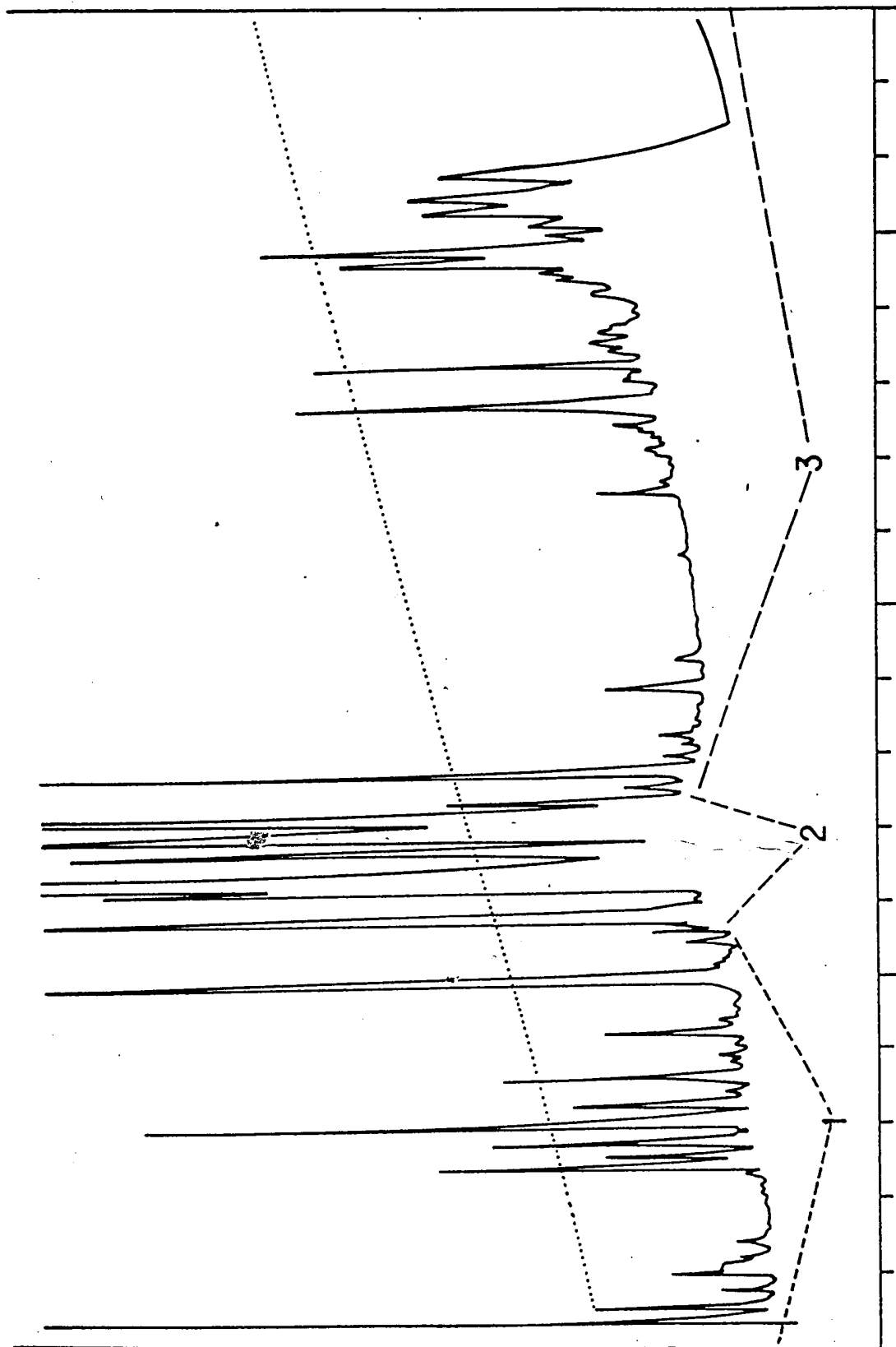
(c) közelítőleg 7 vagy 8 ciszteincsoportot tartalmaz.

69. A 68. igénypont szerinti peptid, azzal jellemezve, hogy a peptid forrása Diguetia pókméreg.

A meghatalmazott


Somlai Maria
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dózsa György u. 10.
Telefon: 153-3753, Fax: 153-3664

Bennett



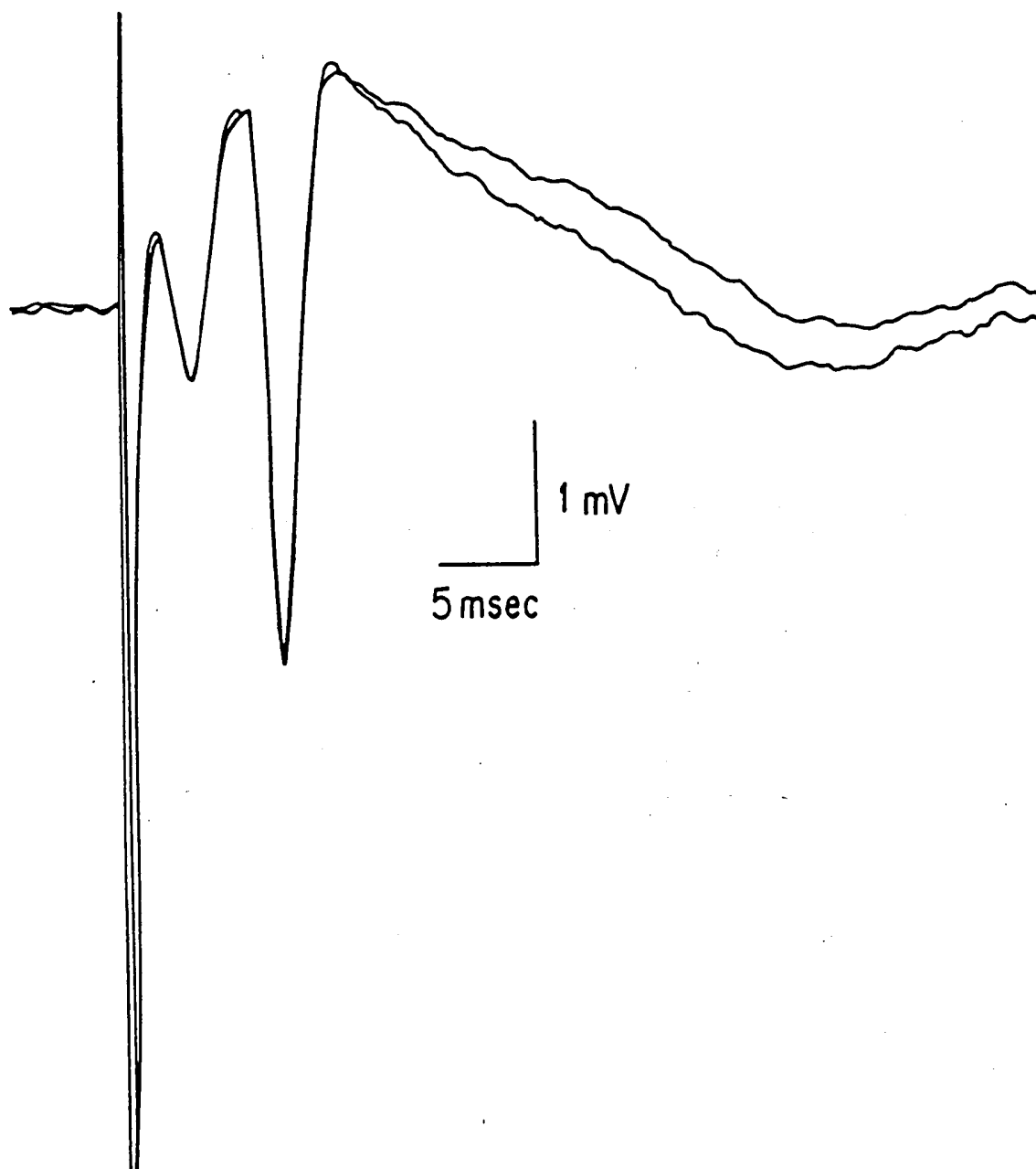
1. ÁBRA

P9302463

38180

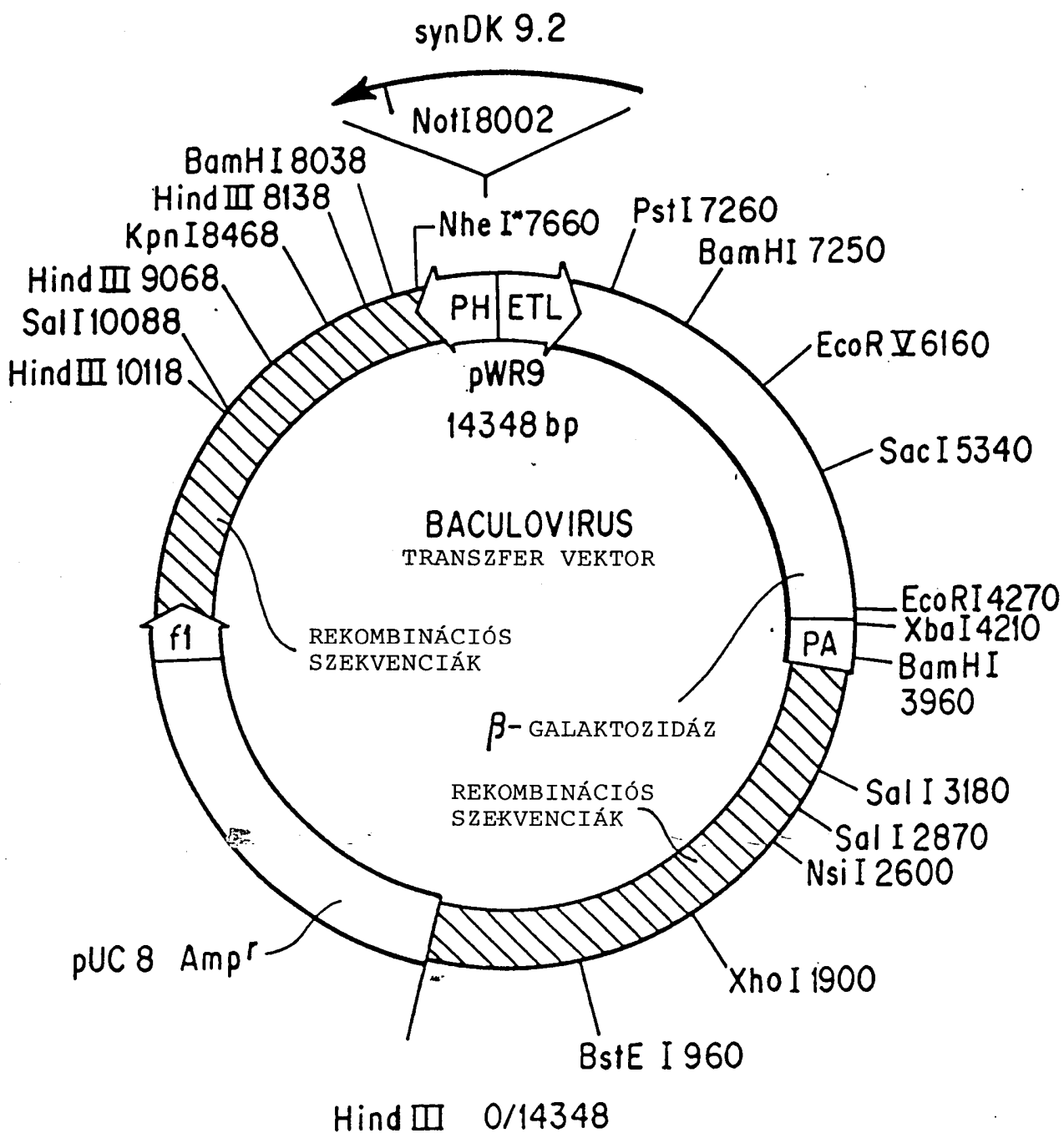
57.774/SM

6/2



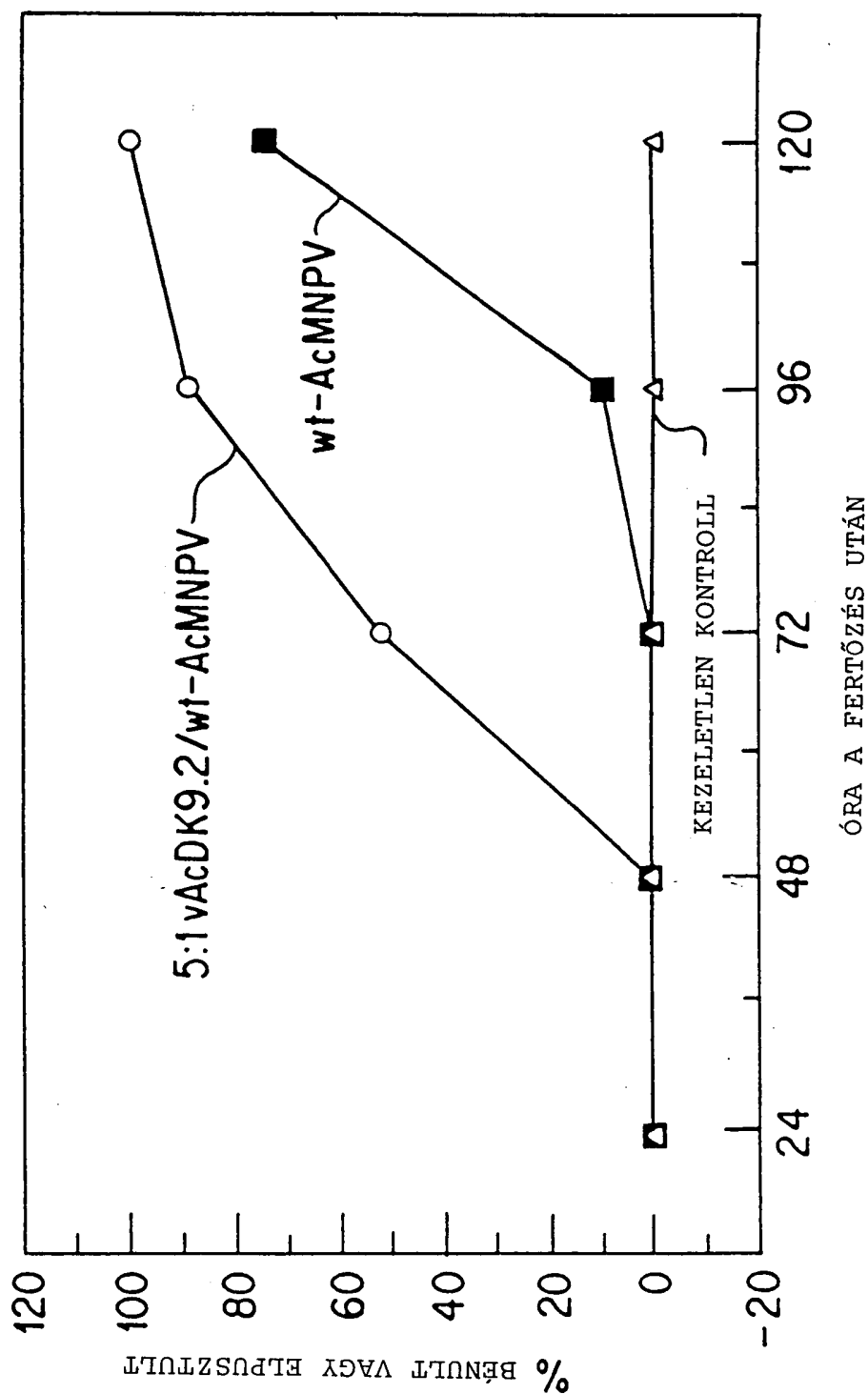
2. ÁBRA


Somlai Mária
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

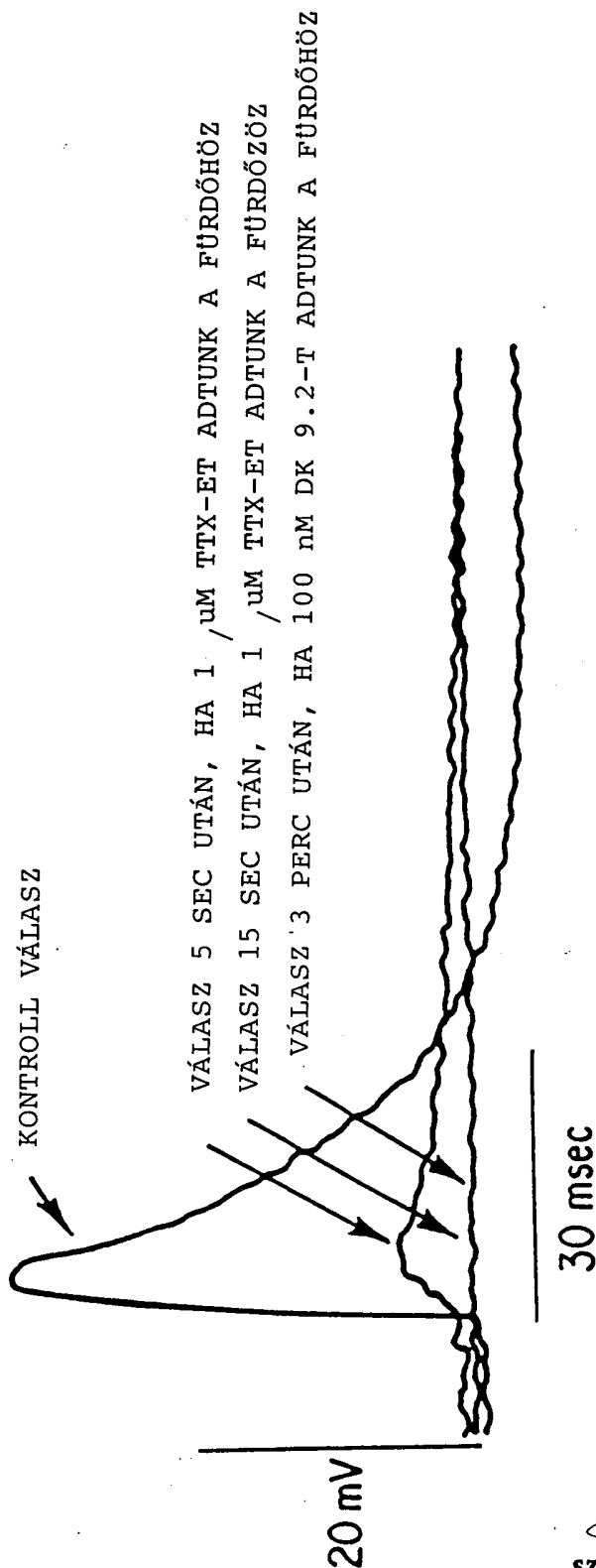


3. ÁBRA

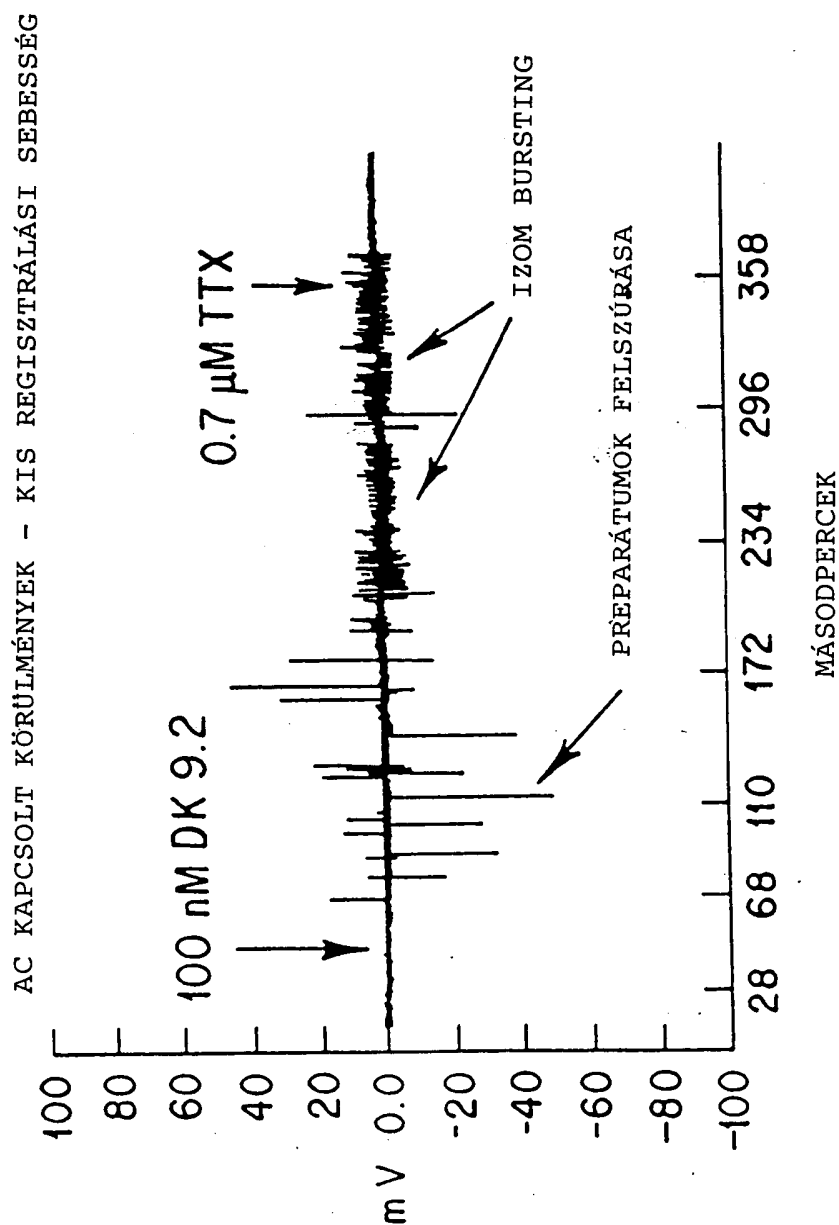
Somlai Mária
Somlai Mária
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1061 Budapest, Dacsinbáz u. 10.
 Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664



4. ÁBRA



5A. ÁBRA



5B. ÁBRA