

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷

A01N 63/02

C07K 14/435

C12N 15/86

(45) 공고일자 2000년04월15일

(11) 등록번호 10-0253766

(24) 등록일자 2000년01월26일

| | | | |
|-------------|---|-------------|---------------|
| (21) 출원번호 | 10-1997-0707953 | (65) 공개번호 | 특1999-0008424 |
| (22) 출원일자 | 1997년11월07일 | (43) 공개일자 | 1999년01월25일 |
| 번역문제출일자 | 1997년11월07일 | | |
| (86) 국제출원번호 | PCT/US 96/06076 | (87) 국제공개번호 | WO 96/36221 |
| (86) 국제출원일자 | 1996년04월30일 | (87) 국제공개일자 | 1996년11월21일 |
| (81) 지정국 | AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 북한 | | |

(30) 우선권주장 08/435,040 1995년05월08일 미국(US)

(73) 특허권자 더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 린다 에스. 스티븐슨

미국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층

(72) 발명자 행콕, 브루스, 디.

미국, 캘리포니아 95616, 데이비스, 체사피케 베이 애비뉴 3134
허만, 라파엘이스라엘, 키리야트 비알릭 27, 하게펜 스트리트 31
모스크워츠, 하임

이스라엘, 예루살렘 96704, 아파트 7, 과테말라 스트리트 15

(74) 대리인 박경재

심사관 : 최규환**(54) 복합 독소로의 곤충 조절****요약**

본 발명은 나비목과와 같은 해충을 죽이는 속도를 가속화시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 적어도 하나의 재조합 미생물로부터 발현된 적어도 2개의 다른 곤충 독소로 해충 또는 그들의 소재지를 처리하는 것을 포함한다. 같은 결합부위에서 서로 상충되지 않으며 약학적으로 다른 독소쌍이 상승적인 조절을 제공하는 것으로 발견되었다. 바람직한 살충성 미생물은 바쿠로바이러스이다.

영세서

발명의 분야

본 발명은 일반적으로 곤충을 조절하는데 있어서 곤충독소의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 살충 속도를 증대시키기 위해 상승적인 조합으로 곤충-선택성 독소를 발현하는 살충성 재조합 미생물에 관한 것이다.

본 발명은 미구 농무부에 의해 허가 번호 제 91-37302-6185 하에서 정부지원으로 행해졌다. 미국 정부는 본 발명에 특정 권리(특허)를 갖는다.

배경기술

나비목의 밤나방과는 속 *Heliothis*, *Heticoverpa*, *Spodoptera* 및 *Trichoplusia*와 같은 몇몇 가장 파괴적인 농업 해충을 포함한다. 예를들면, 이 과에 포함된 것은 담배 모충(*Heliothis Virescens*), 면화 모충(*Helicoverpa zea*), 면화 일벌레(*Alabama argillacea*), 반점 야도충(*Amathes niarum*), 유리모양 야도충(*Crymodes devastator*), 청동 야도충(*Nephelodes emmedon/a*), 풀(fall) 행렬 구더기(*Laphygma frugiperda*), 사탕무 행렬 구더기(*Spodoptera exigua*) 및 얼룩진 야도충(*Peridroma saucia*)이 있다.

살충제에 대한 밤나방과(및 다른 것들)과 같은 농업 해충의 저항성은 환경과 인간 건강을 위협하게 한다. 살충제 저항성의 문제는 해충 저항성을 극복하기 위해 보다 비-선택적이고 독성 화합물을 사용하게 한다. 이것은 파괴적이고 불완전한 순환을 생성한다.

선택적인 천연 독소가 곤충 조절에 사용하기 위해 제안되어 왔다. 이러한 독소로는 독성 동물의 몸체에서 특정 선(glandular) 조직에서 생성된 물질을 포함한다. 독액은 비록 독성 전달의 다른 수단이 알려져 있지만 독성 동물을 마비시키거나 죽이기 위해 찔러서 관통시키는 장치의 도움에 의해 동물의 먹이 또는 적의 몸체 내로 유입될 수 있다. 예를 들면, 전갈은 독액 내에 많은 단백질 또는 신경독소를 함유하는데 이들은 독성으로서 흥분 계통에 작용한다. 곤충들 가운데에서 곤충조절에 사용하기 위해 제시된 특정 독소는 전갈 *Buthus eupeus* 및 *Androctonus australis*로부터의 *Bacillus thuringiensis*, *Leiurus quinqustriatus hebraeus*, *Leiurus quinqustriatus quinqustriatus* 및 진드기 *Pyemotes tritici*로부터의 독소이다.

전갈속 아과에 속하는 전갈로부터 유도된 독소는 축색돌기의 소듐 도전성을 변화시키는 4개 주요 그룹의 폴리펩티드 신경독소를 갖는다. 전갈 신경독소 중 한 그룹은 소듐 채널 비활성의 저하 또는 차단으로 인해 작용 전위의 극단적인 연장을 통해 선택적으로 포유동물에 영향을 미치는 α -독소이다(캐테럴(Catterall), *Science*, 223: 653-661(1984); 로채트(Rochat) 등, *Advances in Cytopharmacology*, pp 325-334(1979)). 독소의 제 2그룹인, β -독소는 소듐 채널 활성에 영향을 미친다(Couraud and Jover in *Handbook of Natural Toxins* (Tu.A.Ed.) 2권, pp659-678(1984) 뉴욕: Marcel Dekker). 신경독소의 제 3그룹은 소듐전류의 억제로 인한 실질적인 작용 전위의 차단에 의해 곤충에서 점진적으로 증가하는 무기력한 마비를 유발하는, 진정작용이 있는 곤충 선택적 독소이다(레스터(Lester) 등, *Biochem. Biophys. Acta*, 701:370-381(1982); 줄로트킨(Zlotkin) 등, *Arch. Biochem. Biophys.*, 240:877-887(1985)). 신경독소의 제 4그룹은 소듐 피크 전류의 증가와 이것의 불활성의 전압 의존성 저하로 인한 모터 신경에서의 반복적인 격통 유발로 곤충의 즉각적인(녹다운) 경련성 마비를 일으키는, 흥분성 곤충 선택 독소이다(왈터(walther) 등, *J. Insect Physiol.*, 22:1187-1194(1976); 펠헤이트(Pelhate) 등, *J. Physiol.*, 30:318-319(1981)).

전갈과 진드기 독소 이외에 다른 곤충-선택적 독소는 달팽이, 거미 및 다른 절지동물로부터 독액에서 확인되어 왔다. [줄로트킨의 검토 참조, *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 10권, 15장, pp 499-541(1985)] 브라코니 말벌의 독액은 나비목과의 유충에 매우 독성이 있다. 브라코니드의 독액 *Bracon hebetor*는 곤충 신경근육 접합부에서 흥분성 글루타민성 전달의 전시냅스성의 방해를 유도하므로서 나비목과의 유충에서 이완된 마비를 일으킨다(피크(Piek) 등, *Comp. Biochem. Physiol.*, 72C:303-309(1982)). 단생 말벌의 독액은 다른 목의 많은 곤충과 거미에 독성에 있다. (라트메이어(Rathmeyer), *Z. Verge. Physiol.*, 45:453-462(1962)). 이러한 독액의 예는 신경근육 전달의 전시냅스성 차단으로 인하여 실재적으로 곤충에 이완된 마비를 유도하는 *Philanthus triangulum*의 독액이다. (메이(May) 등., *Insect Physiol.*, 25:285-691(1979)). 검정색 과부거미의 독액, *Latrodectus mactans*는 포유동물이 아닌 곤충에게만 신경독소인 성분과 반대의 선택성을 갖는 다른 성분을 함유한다(프리츠(Fritz) 등, *Nature*, 238:486-487(1980); 오른베르그(Ornberg) 등, *Toxicon*, 14:329-333(1976)).

보다 최근에, 기본구조와 전기 생리학적 효과에서 α 독소를 강하게 재수집하는 Lqh α IT로 명명된 독소가 독액 *L. quinquestratus hebraeus*로부터 분리되었는데 주로 곤충에 영향을 미치는 것으로 나타났다(에이탄(Eitan) 등., *Biochemistry*, 29(1990), pp 5941-5947).

독액 동물의 독액은 먹이의 흥분 계통에 있는 다른 표적 부위에 영향을 미치는 다양한 독액을 포함한다. 나비목과 유충에 대한 독소 및 그들 각각의 천연 독액의 활성도를 비교한 데이터를 기초로 할 때 천연독액의 효능은 하나의 독소 단독의 활성도에 의해 설명될 수 없음이 명백하다. 천연독액의 보다 높은 효능은 같은 이온 채널상의 다른 표적 부위(표3, 트레이너(Trainer) 등, *JBC*, 268, 17114-17119 (1993)), 같은 흥분 세포상의 다른 이온 채널(올리베라(Oliviera) 등, *Science*, 249, 257-263 (1990)), 및/또는 인접한 흥분 세포(신경 및/또는 근육)상의 다른 결합부위(올리베라 등, *Science*, 249, 257-263(1990))에 영향을 미치는 독액에서 다른 독소들 사이의 조합과 관련 있을 수 있다.

진정효과가 있으며 흥분성인 곤충-선택적 독소는 그 결합부위에서 α 곤충 독소와 경쟁하지 않는다(고든(Gordon)과 줄로트킨, *FEBS Lett.*, 315(1993), pp 125-128). 메뚜기 또는 바퀴벌레 신경막과는 대조적으로 흥분성 독소는 나비목과 유충의 신경막에 있는 그들의 결합 부위로부터의 진정효과가 있는 독소로 치환되지 않는다(고든 등, *Biochemistry*, 31(1992), pp 7622-7628; 모스크워프(Moskowitz) 등, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24(1994), pp 13-19).

최근에, Baculoviridae과로부터의 핵 다면성바이러스종 바이러스 *Autographa californica* (AcNPV)는 곤충-선택적 독소를 발현하므로서 살충 속도를 증가시키기 위해 유전적으로 변성되어 왔다. 곤충-병원성 바이러스로 곤충-선택적인 독소의 유도는 1990년 12월 19일에 출원된 미국 출원 제 07/629,603의 일부 계속 출원인 1994년 4월 15일에 출원된 미국 출원 제 08/229,417에 기술된 바와 같이 곤충 숙주를 죽이는 시간을 감소시켰다.

1993년 11월 30일 토말스키(Tomalski) 등에게 허여된 미국 특허 제 5,266,317호는 곤충 육식 진드기의 곤충-특이적 마비성 신경독소를 발현하는 재조합 바쿠로바이러스(baculoviruses)의 사용을 기술하고 있다. 1993년 1월 5일 바튼(Bartron) 등에게 허여된 미국 특허 제 5,177,308호는 전갈 유도 곤충-특이적 독소 및/또는 토양 거주 미생물 독소를 발현하는 전이유전자 식물을 만드는데 있어서 다른 접근 방식을 택한다. 이와동시 계류중인 출원으로, 1994년 7월 5일에 함모크(Hammock)와 맥컷чен(McCutchen)에 의해 출원된 제 08/279,956호는 재조합 바이러스와 유기성 살충제의 상승적인 조합으로의 곤충 조절을 기술하고 있다.

곤충 해충 집단을 조절하기 위해 재조합 방법을 사용하는, 상기와 같은 새로 나타난 도구는 피레드로이드(Pyrethroid)와 같은 유기성 살충제에 대한 저항성을 갖는 해충의 광범위한 규모의 존재가 실질적으로 농작물 손실을 일으키기 시작했기 때문에 특히 유망하다. 면화 단독에서는, pyr-R *Heliothis* 종의 존재가 매년 수백만 달러의 손실을 가져가기 시작했다. 사실상, 몇몇 경우에서 피레드로이드 살충제는 면화에서 *Heliothis* 유충의 만연을 조절하는데 완전히 실패했고 이는 농작물의 완전한 파괴를 가져왔다.

발명의 요약

본 발명의 하나의 목적으로는, 유전적으로 처리된 살충성 미생물을 사용하는 다양한 해충을 조절하기 위

한 방법이 제공된다. 본 발명에 따라 조절되는 해충은 예를들면 곤충, 진드기 및 선충류 그룹이다. 따라서 본 발명은 *Lepidoptera* 뿐만 아니라 다른 목 및 *Noctuidae* 뿐만 아니라 다른 과에도 적용 가능하다. 그러한 해충은 하나 이상의 재조합 미생물에 의해 발현된 독소의 상승적인 조합으로 처리(또는 그들의 소재지가 처리) 된다.

예를들면, 본 발명의 방법은 제 1 신경독소를 발현하는 제 1 재조합 병원균(pathogen)과 제 2 신경독소를 발현하는 제 2 재조합 병원균의 조합을 사용하거나 다수의 (제 1 및 제 2와 같은) 신경독소를 발현하는 단일 재조합 바이러스를 사용할 수 있다. 본 발명의 방법은 바이러스로 살충 속도를 가속화시킨다.

도연의 간단한 설명

도 1은 본 발명을 실시하는데 바람직한 독소 중 하나인 *LqhIV*의 합성유전자의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO:1을 도시한 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 곤충과 같은 해충을 처리하기 위해 유전적으로 처리된 살충성 미생물을 조합하여 사용하는 것에 관한 것이다. 재조합 바쿠로바이러스가 바람직한 미생물의 예로서 전체에 걸쳐 사용될 수 있음에도 불구하고 본 발명은 재조합 전달 시스템과 같이 다양한 미생물을 실시될 수 있다. 따라서 본 발명에 유용한 미생물으로는 바쿠로바이러스, 진균류 및 박테리아와 같은 DNA와 RNA 바이러스를 포함한다.

40개 목에서 핵 다면성바이러스종 바이러스가 곤충으로부터 분리되었다. (예를들면, *Atlas of Invertebrate Viruses*, 아담스와 보나미, 편집자, CRC Press, Inc., 1991 참조). 감염 면화씨벌레, *Heliooverpa zea*, 담배모충, *Heliothis virescens*, Douglas 전나무 덤불 나방, *Orgia pseudotsugata*, 짚시나방, *Lymantria dispar*, alfalfa 자벌레, *Autographa californica*, 유럽 소나무 파리, *Neodiprion Sertifer*, 사과 나방, *Laspeyresia pomonella*를 포함하는 다양한 바쿠로바이러스가 살충제로서 인정되었고 곤충 종의 이러한 모든 바쿠로바이러스가 본 발명을 실시하는데 적당하다.

수많은 진균류는 곤충을 감염시킬 수 있다. 이러한 진균류의 계놈 내로 곤충-선택적 독소의 유입은 살충제로서의 효능을 강화시킨다. 예를들면, *Beauvaria bassiana*와 *Beauvaria brougniartii*는 광범위한 숙주 범위를 가지며 미생물성 살충제용 후보로 제안되어 왔다(밀러(Miller) 등의 검토, *Science*, 219:715-721, 1983참조).

곤충조절제로서 고려되어 온 박테리아 (*Bacillus thuringiensis* 이외에)로는 *Bacillus popilliae*, *B. lentimorbus*, 및 *B. sphaericus*를 포함한다. 살충제로서의 그들의 효능은 그들의 계놈 내로 곤충-선택적 독소의 유입을 통해 그들의 효능을 개선시키므로 강화될 수 있다.

본 발명의 실시는 곤충 조절에 있어서 상승적으로 작용하는 두 독소를 조합하여 사용하는 것을 포함한다. 이러한 두 독소는 두 독소 유전자가 유입된 단일 재조합 미생물에 의해 발현되거나, 계놈내로 각 곤충 독소를 엔코딩하는 유전자를 클론하므로서 작제된 두 개의 재조합 미생물을 제조하므로서 실행될 수 있다. 선택된 독소 쌍의 조합은 몇 가지 방법에 의해 결정된다. 하기에 기술되는 바와같이 (실시예 6의 스크리닝 기술에 의해 기술된 바와 같이) 같은 세포성 채널(전형적으로 소듐 채널)에서 작용하지만 겹치지 않는 부위에서 작용하는 독소가 바람직하게 선택되는데 이는 하기에서 더 설명된다.

상기에서 언급된 바와 같이, 본 발명을 실행하는데 바람직한 살충성 미생물은 바쿠로바이러스이다. "바쿠로바이러스"는 핵 다면성바이러스종 바이러스(NPV)와 같은 *Baculoviridae*과의 어떤 바쿠로바이러스를 의미한다. 바쿠로바이러스는 단지 절지동물만을 감염시키는, 거대 그룹의 진화론적으로 관련된 바이러스들이다 : 실제로 어떤 바쿠로바이러스는 오직 상업적으로 중요한 농업과 임업 수확물의 해충인 곤충을 감염시키는 반면에 다른 것들은 다른 곤충 해충을 특이적으로 감염시키는 것으로 알려져 있다. 바쿠로바이러스는 오직 절지동물만 감염시키기 때문에 인간, 식물 또는 환경에 어떤 위험도 없어 보인다.

Baculoviridae 이외에 적당한 DNA 바이러스 중에는 *Melolontha Melanotha EPV*, *Amsacta moorei EPV*, *Locusta migratoria EPV*, *Melanoplus sanguinipes EPV*, *Schistocerca gregaria EPV*, *Aedes aegypti EPV* 및 *Chironomus luridus EPV*와 같은 entomopox 바이러스(EPV)가 있다. 다른 적당한 DNA 바이러스는 과립증 바이러스(GV)이다. 적당한 RNA 바이러스로는 togaviruses, flaviviruses, picornaviruses, cytoplasmic polyhedrosis 바이러스(CPV) 등을 포함한다. 이중 사슬 DNA 바이러스 *Eubaculovirinae*의 아과는 두 개의 속, NPV들과 GV들을 포함하는데 이들은 그들의 일생에서 교합체를 생성하기 때문에 생물학적 조절에 특히 유용하다. GV들의 예로는 *Cydia pomonella* GV (코들링(Coddling) 나방 GV), *Pieris brassicae* GV, *Trichoplusia ni* GV, *Artogeia rapae* GV 및 *Plodia interpunctella* GV (인도 옥수수가루 나방)를 포함한다.

본 발명을 실시하기에 적당한 바쿠로바이러스는 교합되거나 비-교합될 수 있다. 핵 다면성바이러스종 바이러스("NPV")는 "교합"된 하나의 바쿠로바이러스 아-군이다. 즉, NPV군의 특징적인 특성은 많은 비리온이 "교합체"로 언급된 결정성 단백질 매트릭스에 내재된다는 것이다. NPV들의 예로는 *Lymantria dispar* NPV(짚시 나방 NPV), *Autographa californica* MNPV, *Anagasta falcifera* NPV(셀러리 자벌레 NPV), *Spodoptera littoralis* NPV, *Spodoptera frugiperda* NPV, *Heliothis armigera* NPV, *Mamestra brassicae* NPV, *Choristoneura fumiferana* NPV, *Trichoplusia ni* NPV, *Helioverpa zea* NPV 및 *Rachiplusia ou* NPV를 포함한다. 본 분야의 사용에서 교합된 바이러스는 바이러스 폴리헤드린 코트(coat)가 내재된 감염성 뉴클레오판시드(nucleocapsids)에 대한 보호를 제공하기 때문에 그들의 보다 큰 안정성으로 인하여 바람직하다.

예시적인 것들 중 본 발명을 실시하는데 유용한 바쿠로바이러스는 *Anagasta falcifera*, *Anticarsia gemmatalis*, *Buzura suppressaria*, *Cydia pomonella*, *Helioverpa zea*, *Heliothis armigera*, *Manestia brassicae*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis* 및 *Spodoptera litura*가 있다. 본 발명을 실시하는데 특히 유용한 "NPV"바쿠로바이러스는 *Autographa californica*로부터의 핵 다

면성바이러스증 바이러스인 AcNPV이다. *Autographa californica*는 *Spodoptera*, *Trichoplusia* 및 *Heliothis* 속내의 다양한 주요 해충 종이 이 바이러스에 감염되기 때문에 특히 흥미롭다.

발현된 살충성 독소는 특히 전갈 독소, 말벌 독소, 달팽이 독소, 진드기 독소 또는 거미 독소와 같은, 절지동물 또는 다른 무척추동물 독소로부터 유도되거나 유사한 신경독소이다. 유용한 전갈 독소는 예를들면 *Androctonus australis*로부터의 AaIT이다. 줄로트킨 등, *Biochimie*, 53, 1073-1078(1971). 유용한 달팽이 독액은 달팽이 *Conus querciones*로부터의 것으로서 이 동물은 입으로 전달되고 이중 어떤 개별적인 독소는 곤충을 포함하는 절지동물에 대해 선택적인 것으로 나타났다. 예를들면, 올리베라 등, "Diversity of *Conus Neuropeptides", Science, 249:257-263(1990) 참조. 곤충의 단계적인 일생에서 정상적으로 나타나는 펩티드조차 살충성 독소로서 작용할 수 있고 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 예를들면, 미숙 호르몬 에스테라제("JHE")의 속성한 외관은 숙주곤충에서 미숙 호르몬 역ガ를 감소시키는데 이것은 전형적으로 해충곤충의 성장단계, 예정된 번데기 단계 및 죽음단계의 피할 수 없는 종말을 가져온다. JHE의 아미노산 서열은 알려져 있고 유전자는 클론되었다. 본 발명의 바람직한 실시에는 참고로 여기에 도입된 함모크 등에 의한, 1994년 2월 17일에 공고된 WO 94/03588에 기술된 바와 같이, 미숙 호르몬 에스테라제(JHE) 돌연변이를 발현하는 재조합 미생물과 이러한 JHE 돌연변이를 제조 또는 제거하기 위한 예시적인 방법, 몇 가지 유용한 JHE 돌연변이, 곤충을 조절하는데 사용하기 위한 재조합 발현 벡터(JHE 또는 돌연변이 된 JHE 코딩 서열을 갖는)를 포함한다.*

함모크 등의 WO 94/03588에 기술된 2개의 돌연변이체는 29좌와 522좌에 있는 JHE의 정상적인 라이신이 부위-지향성 돌연변이 유발에 의해 아르기닌으로 변화된 2종 라이신 돌연변이체(K29R, K522R)이다. 기술된 또 다른 돌연변이체는 세린201이 글라이신으로 대체되었는데 "S201G"로 명명되었다. 촉매적으로 불충분한 JHE의 S201G 돌연변이체의 살충성 활성도는 전갈독소(AcNPV로 처리될 때)대한 시험 곤충의 50% 사망시간과 유사했다. 따라서, 일반적으로 독성이 아닌, 자연적으로 발생하는 JHE 곤충 단백질은 독성제제에 대한 부위-지향성 돌연변이 유발(또는 다른것)과 같은 수단에 의해 변성될 수 있다. 아미노산 잔기 변화 이외에, 다른 JHE 돌연변이체가 분비경로로 들어가서 글리코실화되어 세포로 방출되도록 새로 만들어진 단백질에 대한 신호 서열인 N-말단 19 아미노산을 삭제하므로서 제조될 수 있다.

JHE와 같이 *Androctonus australis* (AaIT)로부터의 흥분성 독소의 아미노산 서열이 결정되어 서열이 공고 되었으며(다른본(Darbon)1982), AaIT 유전자는 클론되어 곤충조절을 위해 발현 벡터 내로 삽입되었다.(발명자 벨라가제(Belagaje) 등의 1992년 7월 9일에 공고된 WO92/11363 참조). AaIT 독소는 곤충에 독성을 나타내는 반면에 등각류와 포유동물에는 비-독성이다.

본 발명을 실시하기 위한 또 다른 적당한 독소는 포유류의 소듐 채널상의 α -독소의 효과와 매우 유사한 방법으로 곤충 소듐 채널에 영향을 미친다. 이 신경독소는 노랑색 전갈 *Leiurus quinquestriatus hebraeus*로부터 유도되었는데 여기에서는 Lqh α IT로 불린다. 이 독소의 검정과 정제는 에이탄(Eitan) 등에 의해 공고된 "소듐전류 비활성화에 영향을 미치는 곤충마비성의 전갈 독액 신경독소 : 정제, 기본구조 및 작용형태" *Biochemistry*, 29:5941-5947(1990)에 기술되었다. 본 발명을 실시하기 위한 두 개의 바람직한 독소는 분리 및 정제된 형태에 있어서 신규한데 하기에서 보다 충분히 기술될 것이다. 간단히, 이 두 독소는 "LqhIV"와 "LqhVI"로 명명된다. 이러한 두 독소는 자연 형태로 혼합물에서 많은 개별독소를 함유하는, *L.quinquestriatus hebraeus*의 독액에서 발생한다. LqhIV 독소는 극히 효능있는 나비독과 독소로 나비독과 독소로 나비독과 유충에 주입되었을 때 다른 전갈 독소와 긍정적인 협동성을 나타내고 포유동물에는 독성을 갖지 않거나 약한 독성을 갖는다. LqhIV 독소에 대한 합성 유전자는 도 1, SEQ ID NO : 1에 예시되었다.

따라서, 이러한 두 개의 바람직한 독소에 대한 유전자는 합성될 수 있다(펩티드 서열 크기가 DNA를 합성 가능하도록 충분히 작기 때문에). 선택적으로, 유전자는 클론될 수 있다. 코딩 서열은 하기예 더 예시되는 바와같이 전달 벡터 내로 클론될 수 있다.

본 발명자들은 곤충-선택적인 신경독소의 살충 활성이 조합하여 사용할 때 5-10배 증가되는 검정파리 유충과 *Heliothis* 유충에서의 독소 AaIT와 Lqh α IT의 상승적인 조합으로 본 발명의 목적을 입증했다. 본 발명을 설명하는 다른 조합과 실험의 상세한 사항은 하기예 보다 충분히 설명될 것이다.

*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*로부터의 억울성의 곤충독소인 LqqIT2와 같은 다양한 다른 전갈 독소(예를들면 Buthoid 전갈)도 상승적인 조합을 위해 사용될 수 있다. 신경독소를 얻기 위해 사용된 정제방법은 줄로트킨 등의, *Archives of Biochem. Biophys.*, 20:877-887(1985)에 의해 공개되었다.

BjIT2는 또 다른 억울성의 곤충독소로서 *Buthotus Judacius*로부터의 것이다. 정제는 레스터(Lester) 등의, *Biochim. Biophys. Acta*, 701: 370-381 (1982)에 공개되었다. BjIT2는 15좌에서 아미노산 서열이 다른 두 개의 이소형태로 존재한다. 형태 1은 이 자리에 이소루신인 반면에 형태 2는 발린이다.

LqhIT₂는 역상 HPLC를 사용하여 정제된 *Leiurus quinquestriatus hebraeus*로부터의 또 다른 억울성 곤충독소이다. chactoid 전갈, *Scorpio maurus palmatus*의 독액으로부터 정제된 다른 독소들도 사용될 수 있다. 예를들면, chactoid 전갈, *Scorpio maurus palmatus*로부터의 SmpIT2는 억울성의 곤충 독소이다. 이것의 정제는 라자로비치(Lazarovici) 등, *J.Biol. Chem.*, 257:8397-8404(1984)에 기술되어 있다. chactoid 전갈, *Scorpio maurus palmatus*의 독액으로부터 정제된 다른 독소는 SmpCT2와 SmpCT3 및 갑각류 독소로서, 이들의 정제는 라자로비치의, ph. D. 논문 (1980), Hebrew대학, Jerusalem, "전갈 *Scorpio maurus palmatus* (Scorpionidae)의 독액 조성물과 작용에 대한 연구"에 기술되어 있다.

표 1은 그들의 정제와 특성화에 대한 인용문헌과 함께 본 발명을 실시하기 위한 몇몇 바람직한 독소의 리스트이다.

[표 1]

| 예시적인 독소 | 참고 문헌 |
|----------------------|---|
| AaIT | 줄로트킨 등, <i>Biochim.</i> , 53, 1075 – 1078 (1971). |
| AaIT ₁ | 로렛(Loret) 등, <i>Biochem.</i> , 29, 1492 – 1501 (1990). |
| AaIT ₂ | 로렛 등, <i>Biochem.</i> , 29, 1492 – 1501 (1990). |
| LqqIT ₁ | 줄로트킨 등, <i>Arch. f Biochem. & Biophys.</i> , 240, 787 – 887 (1985). |
| BjIT ₁ | 레스터 등, <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 701, 370 – 387 (1982). |
| LqhIT ₂ | 줄로트킨 등, <i>Biochem.</i> , 30, 4814 – 4821, (1991). |
| LqqIT ₂ | 줄로트킨 등, <i>Arch. f Biochem. & Biophys.</i> , 240, 877 – 887 (1985). |
| BjIT ₂ | 레스터 등, <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 701, 370 – 387 (1982). |
| Lah α IT | 에이탄 등, <i>Biochem.</i> , 29, 5941 – 5947 (1990). |
| TS _{VII} | 베치스(Bechis) 등, <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> , 122, 1146 – 1153 (1984). |
| 진드기 독소 | 토말스키 등, <i>Toxicon</i> , 27, 1151 – 1167 (1989). |
| α -conotoxins | 그레이 등, <i>JBC</i> , 256, 4734 – 4740 (1981); 그레이 등, <i>Biochem.</i> , 23, 2796 – 2802 (1984). |
| μ -conotoxins | 크루즈(Cruz) 등, <i>JBC</i> , 260, 9280 – 9288 (1989); 크루즈 등, <i>Biochem.</i> , 28, 3437 – 3442 (1989). |
| chlorotoxin | 데빈 등, <i>Am. J. Physiol.</i> , 264, 361 – 369 (1993). |
| ω -conotoxins | 올리베라 등, <i>Biochem.</i> , 23, 5087 – 5090 (1984); 리베라 등, <i>JBC</i> , 262, 1194 – 1198 (1987). |
| PLTX1 | 브랜튼(Branton) 등, <i>Soc. Neurosci. Abs.</i> , 12, 176 (1986). |
| PLTX2 | 브랜튼 등, <i>Soc. Neurosci. Abs.</i> , 12, 176 (1986). |
| PLTX3 | 브랜튼 등, <i>Soc. Neurosci. Abs.</i> , 12, 176 (1986). |

| | |
|-----------------------|--|
| Ag1 | 케르(Kerr) 등, <i>Soc. Neurosci. Abs.</i> , 13, 182 (1987); 스기모리(Sugimori) 등, <i>Soc. Neurosci. Abs.</i> , 13, 228 (1987). |
| Ag2 | 케르 등, <i>Soc. Neurosci. Abs.</i> , 13, 182 (1987); 잭슨 등, <i>Soc. Neurosci. Abs.</i> , 13, 1078 (1987). |
| ω -Agatoxin | 아담스 등, <i>JBC</i> , 265, 861 – 867 (1990). |
| μ -Agatoxin | 아담스 등, <i>JBC</i> , 265, 861 – 867 (1990). |
| Hol | 보우어(Bowers) 등, <i>PNAS</i> , 84, 3506 – 3510 (1987). |
| α -Laterotoxin | 그라소 등, in <i>Neurotoxins in Neurochemistry</i> , ed. Dolly, 67 – 79 (1988). |
| Steatoda toxin | 카발리에리 등, <i>Toxicon</i> , 25, 965 – 974 (1987). |
| Bom III | 바르가스(Vargas) 등, <i>Eur. J. Biochem.</i> , 162, 589 – 599 (1987). |

표 1의 예시적인 독소가 정제될 수 있게 하는 많은 유기체에 대한 cDNA 라이브러리는 질베르베르그(Zilberberg)등(1992), *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22(2), 199–203 (*Leiurus quinquestriatus hebraeus*) ; 구레비츠(Gurevitz) 등 (1990) *Fews Lett.*, 269(1), 229–332 (*Buthus judaicus*) ; 보우기스(Bougis) 등 (1989), *JBC*, 264(32), 19259–19256 (*Androctonus australis*) ; 마틴-유클레어(Martin-Enclaire) 등(1992) *Fews. Lett.*, 302(3), 220–222 (*Tityus serrulatus*) ; 우드워드(Woodward)등 (1990) *EMBO J.*, 9(4), 1015–1020 (*Connus textile*) ; 및 칼리지(Collelge)등(1992) *Toxicon*, 30(9), 1111–11116 (*Conus geographus*)에 기술된 바와같이 입수가능하다. 다른 것들의 경우 실시예 7에 예시된 것과 동일한 방법으로 독소를 코딩하는 합성 유전자를 작제 할 수 있다.

상기에 언급된 바와 같이, 본 발명을 실시하는데 사용하기에 위한 적당한 두 독소는 그들의 분리되고 정제된 형태에 있어서 신규하다. 이들중 하나는 "LqhIV"로 명명된 것으로서 SEQ ID NO: 2: GVRDAYIADD KNCVYT CGAN SYCNECTKN GAESGYCQWF GKYGNAWCW1 KLPDKVPIRI PGKCR로 도시된 아미노산 서열을 갖는다. SEQ ID NO:2의 65 아미노산 펩티드는 실시예 5에서 더 기술된다.

"LqhVI"로 명명된 또다른 신규 독소는 SEQ ID NO: 3: GVRDGYIAQP ENCVYHCFPG SPGCOTLCKG DGASSGHCGF KEGHGLACWC NDLPDKVGII VEGEKCH로 나타나는 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 67 아미노산 펩티드 역시 실시예 5에서 더 기술된다.

표 1에 있는 바람직한 독소 또는 SEQ ID NOS :2 및 3과 같은 독소는 먼저 다른 약물학적 특성을 갖는 독소를 실험 조합을 하므로서 가장 쉽게 상승 조합을 형성하도록 선택될 수 있다. 예를들면, AaIT는 흥분성 곤충 독소인 반면에 LqhIT₂는 진정작용이 있는 독소이다. 단순한 결합 프로토콜(예를들면, 메뚜기 *Locusta migratoria* 막 소낭과 AaIT, BjIT₁ 및 BjIT₂에 대한 골돈 등의, *Biochim. Biophys. Acta*, 778, 349–358 (1984) 참조)로 같은 채널이지만 특정 해당 곤충에 대해서는 중복되지 않는 부위에서 활성도를 스크린한

다. 본 기술분야에서 알려진 바와 같이, 이것은 다양한 곤충 신경세포막 사이의 변이성 때문이다. 예를 들면, 몇 가지 최근 자료는 메뚜기 또는 바퀴벌레 신경세포 막과 다르게 *Lepidopterous* 유충 신경막이 진정효과가 있는 곤충독소와 흥분성의 곤충독소를 동시에 결합할 수 있다고 보고하고 있다.

AaIT와 Lqh α IT의 상승적인 조합의 상기한 예에서는 *Heliothis* 유충에 대해서 보다 검정파리 유충에 대한 조합이 2배 상승 효능이 있다. 반대로, AaIT와 LqhIT₂의 조합에서는 *Heliothis* 유충에 적용될 때 상승적인 조합(5배 효능)이 되지만 검정파리 유충에 적용될 때는 각각의 독소 자체와 관련한 효능의 증가는 없다.

독소의 이러한 조합은 곤충군에서 선택성을 높이기 위해 사용될 수 있다.

곤충을 조절할 목적으로 바쿠로바이러스와 같은 재조합 미생물을 제조하기 위해서는 분비 신호 서열이 바람직하게 포함된다. 분비 신호 서열은 박테리아, 이스트, 진균류 또는 동물과 식물을 모두 포함하는 고도의 진핵세포 (예를들면, 웃슨(Watson)의 *Nucl. Ac. Res.*, 12: 5145-5164 (1984) 참조)의 단백질로부터 유도될 수 있다. 보다 바람직한 것은 곤충 기원 단백질, 예를들면 *Hyalophora cecropia*로부터의 cecropin B의 것들 (반 호프스텐(van Hofsten)등의 PANS, 82: 2240-2243 (1985))과 *Manduca sexta*로부터의 부화호르몬 (호로디스키 등, PANS, 86: 8123-8127 (1989))으로부터의 단백질의 분비 신호 서열이다. 또한 바람직한 것은 mRNA, cDNA 또는 게놈 DNA의 분석에 의해 결정될 수 있는 전갈 독소와 자연적으로 조합된 분비 신호 서열이다. 보다 바람직한 것은 AaIT의 천연 분비 신호 서열이다(보기스(Bougis)등, *J. Biol. Chem.*, 264: 19259-19265 (1989)).

재조합 미생물의 독소는 독소의 관능성 유도체로서 발현될 수 있다. 독소의 "관능성 유도체"는 사실상 독소의 생리학적 활성과 유사한 생리학적 활성(관능적 또는 구조적)을 갖는 화합물이다. "관능성 유도체"라는 용어는 분자의 "단편", "변종", "동족체" 또는 "화학적 유도체"를 포함하는 것을 의미한다. 독소와 같은 분자의 "단편"은 분자의 폴리펩티드 부분을 의미한다. 독소와 같은 분자의 "변종"은 구조와 기능에 있어서 전체 분자 또는 그 단편과 거의 유사한 분자를 의미한다. 두 분자가 거의 유사한 구조를 갖거나 두 분자가 유사한 생리학적 활성을 소유한다면 한 분자는 다른 분자와 "거의 유사한" 것으로 말할 수 있다. 따라서, 두 분자가 유사한 활성을 갖는다면 비록 분자들 중 하나가 다른 것에서 발견되지 않거나 아미노산 잔기의 서열이 동일하지 않을지라도 여기에 사용된 용어인 변종으로 간주된다. 독소와 같은 분자의 "동족체"는 기능에 있어서 전체 분자 또는 그 단편과 거의 유사한 분자를 의미한다. 여기에 사용된 분자는 정상적으로 분자의 일부가 아닌 추가의 화학적 분자(moieties)를 포함할 때 또 다른 분자의 "화학적 유도체"로 언급된다.

이러한 분자(moieties)는 분자의 용해도, 흡착, 생리학적 반감기 등을 개선 시킬 수 있다. 이러한 효과를 매개할 수 있는 분자들이 레밍頓(Remington)의 *Pharmaceutical Science* (1980)에 기술되어 있다. 이러한 분자(moieties)를 분자(molecule)에 결합하기 위한 과정은 본 기술분야에 잘 알려져 있다.

독소(또는 독소들)의 발현은 일반적으로 RNA 합성의 개시를 지시하기에 충분한 프로모터 부위를 포함한다. 하나의 바쿠로바이러스 프로모터 유전자는 폴리헤드린을 코팅하는 것으로서 이는 비록 예를들면 p10과 같은 다른 프로모터와 하이브리드 프로모터 서열이 사용될 수 있지만 폴리헤드린 단백질이 알려진 가장 잘 발현된 진핵 생물 유전자 중 하나이기 때문이다.

한 독소를 발현하는 재조합 바쿠로바이러스는 본 기술분야에서 현재 알려진 프로토콜에 의해 제조될 수 있다 (예를들면 토말스키 등의 미국 특허 5,266,317, 곤충-기생 진드기로부터 신경독소를 예증; 맥커瑱 등 *Bio/Technology*, 9, 848-852 (1991)와 마에다(Maeda) 등, "재조합 바쿠로바이러스에 의해 발현된 곤충-특이적 신경독소의 살충 효과", *Virology*, 184, 777-780 (1991), AaIT를 발현하는 재조합 바쿠로바이러스의 구조 설명).

두 개의 다른 독소를 발현할 수 있는 단일 바쿠로바이러스의 프로토콜에 있어서, 제조는 적절한 변형으로 벨라예프(Belayev)와 로이(Roy)의 *Nucleic Acid Research*, 21:5, 1219-1223 (1993); 왕(Wang)등, *Gene*, 100, 131-137 (1991)과 동일하다. 실시예 1은 그러한 동일한 프로토콜을 설명한다.

실시예

실시예 1

두 개의 곤충 독소 유전자는 표준 분자 클로닝 기술을 사용하여 Pac UW51P2와 같은 전달 벡터로 클론될 수 있다. 이러한 전달 벡터는 폴리헤드론 유전자 프로모터의 상류이지만 반대방향으로 나란히 삽입된 AcNPV p10 프로모터와 SV 40 전사 종결 신호를 함유하는 *Autographa californica* (AcNPV) 폴리에드론 메뚜기계 벡터이다. 이것은 폴리헤드론 프로모터의 조절하에서 Bam HI 부위에 있는 하나의 외부 유전자 코딩부위와 p10 프로모터의 조절하에서 BgIII 코딩 부위에 있는 제 2 외부 유전자 코딩 부위의 삽입을 용이하게 한다. 따라서, 최종 재조합 바이러스는 두 개의 외부 단백질을 발현한다. 따라서 제조된 재조합 AcNPV는 칼슘 침전에 의해 재조합 플라즈미드와 함께 동시 형질전환된 *Spodoptera frugiperda* 세포(Sf2 1)를 번식시키므로서 분리될 수 있다. 폴리헤드론-감염 세포는 확인되어 후감염 및 스크리닝에 의해 정제된 재조합 바이러스 혈소판이 수집될 수 있다. 재조합 바이러스의 정제는 표준 프로토콜에 의해 4°C와 -80°C에서 번식 및 저장된 순수한 재조합체인 결과물을 가져올 수 있다. 표준 프로토콜은 예를들면 오레일리(O'Reilly), 밀러(Miller) 및 럭코우(Luckow)의 *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*에 기술되어 있다.

실시예 2

두 개의 다른 곤충과 쥐에 대한 4개의 다른 곤충 독소의 활성을 측정했다(하나가 포유동물에 영향을 거의 끼치지 않는 곤충 독소를 사용하기에 바람직하기 때문에). 이들은 각각의 천연 독액으로부터 입증된 방법에 의해 정제되었다. 쥐와 검정파리 나비목과의 유충에 대한 그들의 독성이 리드(Reed) 및 뮤엔크(Muench) (1938)의 방법에 따라 측정되었다.

표 2는 50퍼센트 최종시점에서 곤충과 쥐에 대한 독소의 활성도를 제시한 것이다(마비량 또는 치사량은

각각 PU₅₀, LD₅₀). 검정파리 유충에 대한 독소의 PU₅₀ 수치는 이미 공개된 결과에 따른 것이다(줄로트킨 등, *Biochim.*, 53, 1075-1078 (1971); 에이탄 등, *Biochem.*, 29, 5941-5947 (1990)). *Heliothis virescens*의 나비목과 유충에 대한 이들 독소의 독성은 *Spodoptera littoralis*의 유충에 대한 그들의 독성과 비교된다. LqhαIT는 쥐(스위스 웨스터)에 대해 높은 독성을 나타냈지만 다른 독소는 포유동물에 어떤 독성도 나타내지 않았다(포유류 독소 AaHII의 LD₅₀ - 0.018μg/20g b.w는 대조적으로 피하로 주입된 3μg/g b.w는 어떤 효과도 없었다(델리마(Delima) 등, (1986)). LqhIV는 지금까지 전갈 독액으로부터 분리된 가장 효능있는 나비목과 독소인 반면에 독소 LqhVI는 약한 포유동물 독성을 가지므로 독소 LqhIV와 LqhVI는 상당히 흥미롭다.

[표 2]

| 독 소 | <i>Sarcophaga falculata</i> 유충에 대한 PU ₅₀ (μg/100mg b.w) ^a | <i>Heliothis virescens</i> 유충에 대한 PU ₅₀ (μg/100mg b.w) ^b | 스위스 웨스터 쥐에 대한 LD ₅₀ (μg/20g b.w) ^c |
|--------------------|---|--|--|
| AaIT | 0.0025 | 2.5 | >60 |
| LqhIT ₃ | 0.050 | 2.5 | >60 |
| LqhIT ₂ | 0.025 | 2.5 | >60 |
| LqhαIT | 0.0025 | 2.5 | 8.0 |
| LqhIV | 0.1 | 0.5 | 12 |
| LqhVI | 0.006 | 3.0 | >60 |

a. 25-40 검정파리 유충 각각의 세 복제물에 독소 중 각 하나를 주입하고 PU₅₀을 측정했다. 흥분성 독소 AaIT, LqhVI와 LqhIT₃의 PU₅₀을 주입후 즉시 수축 마비로 측정했다. 진정작용이 있는 독소 LqhIT₂의 PU₅₀은 주입 5분 후에 이완 마비로 측정했다. α곤충 독소 LqhαIT와 LqhIV의 PU₅₀을 주입후 5분 후에 까지 지연되고 유지된 위축 마비로 측정했다.

b. 25-40 나비목과 유충의 각각의 세 복제물에 독소 중 하나를 주입하고 PU₅₀을 주입 24시간 후에 원상태로 전화될 때 이동 또는 복귀 능력이 없는 것에 대해 측정했다.

c. 8마리 쥐의 두 복제물에 피하 주사하고 쥐에 대한 LD₅₀을 주입 24시간 후에 측정했다.

실시예 3

독소의 조합물을 동시 주입하고 독성을 표 3에 요약된 바와 같이 측정했다. 독소 조합물은 각 독소와 그들의 학석액의 1 PU₅₀ 유니트에 상당하는 양을 포함했다. 같은 결합 부위에서 서로 상충하지 않고 약물학적으로 다른 독소 쌍은 상승적이었다. 표 3에 도시된 바와 같이, 협조 정도는 독소 조합물에 좌우될 뿐만 아니라 시험 동물에도 좌우된다.

[표 3]

| 독 소 | <i>Sarcophaga falculata</i> 유충에 대한 PU ₅₀ (μg/100mg b.w) ^a | <i>Heliothis virescens</i> 유충에 대한 PU ₅₀ (μg/100mg b.w) ^b | 스위스 웨스터 쥐에 대한 LD ₅₀ (μg/20g b.w) ^c |
|--------------------|--|---|---|
| | 용량 효능변화* | 용량 효능변화* | 용량 효능변화* |
| AaIT | 0.0025(AaIT) 0.5X | 0.25(AaIT) 5X | 60(AaIT) 효과없음 |
| + | | + | + |
| LqhIT ₂ | 0.025(LqhIT ₂) | 0.25(LqhIT ₂) | 60(LqhIT ₂) |
| AaIT | 0.000125 10X | 0.25(AaIT) 5X | 60(AaIT) 8.0 |
| + | (AaIT) | + | + |
| LqhαIT | 0.000125 (LqhαIT) | 0.25(LqhαIT) | 8.0(LqhαIT) |
| LqhIT ₃ | 측정되지 않음 | 0.25(LqhIT ₃) 5X | 60(LqhIT ₃) 효과없음 |
| + | | + | + |
| LqhIT ₂ | | 0.25(LqhIT ₂) | 60(LqhIT ₂) |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------|----|---------------------------|----|-------------------------|-----|
| LqhIT ₃ | 0.005(LqhIT ₃) | 5X | 0.25(LqhIT ₃) | 5X | 60(LqhIT ₃) | 8.0 |
| + | | | + | | + | |
| Lqhα IT | 0.00025 (Lqhα IT) | | 0.25(Lqhα IT) | | 8.0(LqhIT) | |

a. 25-40 검정파리 유충 각각의 복제물에 독소 조합물을 주입하고 PU₅₀ 주입 후 1분내에 유충의 빠른 수축으로 측정했다.

b. 25-40 나비목과 유충의 세 복제물에 독소의 조합물을 주입하고 PU₅₀을 다 주입 후 24시간후에 측정했다. 시 전환될 때 이동 또는 복귀할 능력이 없는 것에 대해 측정했다. PU₅₀을

c. 8마리 쥐의 두 복제물에 피하 주사하고 쥐에 대한 LD₅₀을 주입 24시간 후에 측정했다.

★ 효능은 각 독소 단독의 PU₅₀과 비교했을때 효과를 일으킨 독소 단백질의 (다양한 희석액에서 독소의 1:1비가 사용됨)으로 평가했다.

표 3에서 설명한 바와 같이, 큰 효능을 갖는 조합은 효능증가 보다 큰 용량-응답성이었다. 따라서, 이를 조합들을 살충 속도를 상승시키는데 본 발명의 바람직한 실시예를 설명한다.

실시예 4

본 발명을 실시함에 있어서, 조절되는 해충은 이러한 조합을 발현하는 재조합 바쿠로바이러스로 처리(및/또는 그들의 소재지 처리)된다. 본 실시예에서, 두 개의 다른 독소를 발현하는 두 개 바이러스의 조합된 적용은 각각의 바이러스 그 자체의 적용과 비교할 때 숙주 곤충을 죽이는 시간을 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서, 표 4에 도시된 바와 같이 재조합체 AcLqhα IT와 재조합체 AcAaIT의 조합된 적용은 실질적으로 죽이는 시간을 감소시켰다.

[표 4]

| 재조합체 적용 | LT ₁₀ | LT ₅₀ | LT ₉₀ |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| AcLqhα IT (단독) | 62 | 73 | 87 |
| AcAaIT (단독) | 55 | 68 | 82 |
| AcAaIT +AcLqhα IT | 45 | 60 | 80 |
| (조합, 본 발명의 실시예) | | | |

치사 시간(LT's)은 AcAaIT(10000 PIB's), AcLqhα IT(10000 PIB's) 및 AcAaIT(5000 PIB's)와 AcLqhα IT(5000 PIB's)의 조합된 적용에 대한 제 3영(齡) *H. Virescens* 유충의 반응에 기초하여 유도되었다. 디아이어트의 작은 플러그를 미세적정판의 개별적인 웰에 위치시키고 각각의 바이러스 중 어떤것으로 접종된다. *H. Virescens*의 제 3영 유충을 판에 첨가하여 27°C로 유지했다. 사망률을 5-10 간격으로 기록했다. LT를 프로빗(Probit) 분석 프로그램으로 분석했다.

따라서, 표 4의 데이터는 치사시간 (LT)까지 나타난 죽음 속도의 연구이고 동일한 접근은 주요한 경제적 중요성이 될 수 있는 치사량을 측정한데 사용될 수 있다. 예를들면, 유충의 50%가 죽는 치사시간을 이용하여 본 발명 방법의 실시에서 독소의 조합물이 개개의 재조합체의 적용에 대하여 숙주 유충을 죽이기 위해 요구되는 시간에서 대략 12-18% 감소를 제공한다는 것을 알 수 있다. 재조합 AcAaIT로의 처리가 야생형 AcNPV와 비교할 때 숙주 유충을 죽이는데 요구되는 시간을 약 40% 감소시킨다는 것을 고려할 때 사실상 곤충 성장 피해를 감소시킨다는 것을 알 수 있고 본 발명의 실시에 의해 식물이 매우 적게 손상된다는 것을 알 수 있다. 또한 재조합 미생물로 감염된 유충은 마비 증상을 보이기 시작하고 죽음 수시간전에 성장을 멈추는데 이는 본 발명 방법의 실제적인 살충 효과를 증가시킨다.

실시예 5

LqhIV와 LqhVI의 정제

전갈 *L. quinquestriatus hebraeus*의 독액을 시그마(Sigma)(USA)로부터 입수했다.

동결 건조된 *L. quinquestriatus hebraeus* 독액(50mg)은 pH = 6.4의 10mM암모늄 아세테이트 2mL에서 혼탁하여 균질화 시켰다. 비용해성 물질을 20분 동안 27000g에서 원심분리하여 제거했다. 상청액을 수집하고 펠렛을 추가적인 pH = 6.4의 10mM 암모늄 아세테이트 2mL에 재현탁시켜 균질하게 한다음 다시 원심분리했다. 이러한 추출은 독액으로부터 추출된 단백질의 수율을 최대화하기 위해 4회 실시했다. 모든 원심분리로부터 상청액을 모아서 양이온 교환 칼럼 (10mL CM-52)에 적재하고 10mL/hr의 유속으로 pH = 6.4의 0.01-0.5M 암모늄 아세테이트의 선형 구배로 용출시켰다. 흡광도를 약 280nm에서 모니터하여 피크를 수집했다. 양이온 교환 크로마토그래피로부터의 분류물 CM-III와 CM-VI를 또한 Vydac C4 칼럼에 대하여 RD-HPLC에서 더 정제했다. LqhIV를 CM-VI로부터 하기와 같이 정제했다 : 완충액 A는 0.1% TFA를 갖는 5% ACN 이었고 완충액 B는 0.1% TFA를 갖는 95% ACN이었다. 칼럼을 완충액 A로 평형을 유지시키고 70분에 0-60%의 선형구배로 용출시켰는데 유속은 0.6mL/분 이었다. 흡광도를 214nm에서 모니터하여 피크를 수집했다. LqhVI를 CM-III로부터 하기와 같이 정제했다. 완충액 A는 0.1% HFBA를 갖는 5% ACN이었고 완충액 B는 0.1% HFBA를 갖는 95% ACN이었다. 칼럼은 완충액 A로 평형을 유지시키고 105분에 0-90%의 선형구배로 용출시켰는데 유속은 0.6mL/분으로 하였다. 흡광도는 214nm에서 모니터하여 따라서 피크를 수집했다.

용출된 분류물을 수집하여 활성(표 2) 및 순도를 시험했다.

독소의 순도

LqhIV와 LqhVI의 균질성과 순도를 유리 용액 모세관 전기영동법(Applied Biosystems Model 270A)로 시험했다. 모세관은 pH =2.9의 소듐 시트레이트 20mM로 평형을 유지시키고 샘플(0.02 mg/ml 단백질)을 2초 동안 진공을 이용하여 적재했다. 이동 완충액은 pH =2.9의 20mM 소듐 시트레이트이고 전력은 20kV였다.

서열 결정

각각의 독소 20 μ g을 입증된 방법(페르난데즈(Fernandez) 등, "단백질 화학 기술", 5권 p 215)을 사용하여 환원시키고 카르복시메틸화했다. N-말단 서열을 자동화된 에드만 분해에 의해 HP 서열 분석기를 사용하여 결정했다. 환원되고 카르복시메틸화된 LqhIV를 엔도프로티나제 Asp-N을 사용하여 소화시켜 펩티드를 생성시켰다. 소화된 펩티드의 분리를 폴리머성 칼럼을 사용하여 미세내경 HPLC(초고속미세단백질 분석기-Michrom BioResources Inc)로 수행했다. 완충액 A는 0.1% TFA를 갖는 5% ANC이었고 완충액 B는 0.1% TFA를 갖는 95% ANC이었다. 칼럼을 완충액 A로 평형을 유지하고 50분에 0~50%의 선형구배로 용출시켰는데 유속은 0.05ml/분으로 하였다. 흡광도를 214nm에서 모니터하고 피크를 수집했다. 펩티드 p2를 독소의 전체 아미노산 서열을 결정하기 위해 서열화했다.

실시예 6

결합 프로토콜

곤충 신경 막의 제조

곤충 신경 조직의 모든 해부와 제조를 하기 조성물의 냉 완충액에서 수행하였다 : 0.25M 만니톨, 10mM EDTA pH =7.4, 5mM HEPES (Tris로 pH 7.4로 조절된), 50 μ g/ml 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 1 μ M 펩스타틴 A, 1mM 아이오도 아세트아미드 및 1mM 1,10- 페난트롤린. 곤충신경조직을 해부하여 얼음 냉 완충액에서 균질하게 했으며 파편은 10분 동안 1000g으로 원심분리하여 제거했다. 상청액을 45분 동안 27,000g으로 원심분리하고 막을 수집했다(P_2). P_2 를 완충액에서 혼탁시키고 10% Ficoll(완충액에서)로 조정한 다음 75분 동안 10,000g으로 원심분리시켰다. 풍부해진 시냅토솜 분류물을 나타내는 결과적인 부류 박막을 수집했다. 저장성 배지(5mM 트리스 - HCl pH=7.4, 1mM EDTA, 50 μ g/ml 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 1 μ M 펩스타틴 A, 1mM 아이오도아세트아미드 및 1,10 - 페난트롤린)로 처리한 다음에 막 소포를 형성했다. 막 소포를 45분 동안 27,000g 원심분리 후 소량의 해부 완충액에 수집하고 사용할 때까지 -80°C에서 저장했다.

독소의 방사성요드화

독소를 캐리어-유리 Na¹²⁵I (~0.3 nmol) (Amersham)의 0.5mCi와 독소 5mg(~0.7nmol)을 사용하여 요드겐 (iodogen) (Pierce chemical Co. Rockville, MD)으로 요오드화했다. 모노요오드톡신을 Beckman Ultrapore 3 RPSC 칼럼 (4.6×75mm)을 사용하여 정제하고 분류물을 0.5ml/분의 유속으로 10~80% 용매 B (용매 A= 0.1% TFA, 용매 B= 50% ANC, 50% 2-프로판올과 0.1% TFA)의 구배로 용출시켰다. 모노요오드 톡신을 천연독소 (약 28% 용매 B)의 피크에 이어 방사 활성 단백질(약 30% 용매B)의 제 1피크로 용출했다. 방사 표시된 독소의 농도를 ¹²⁵I의 특이 방사활성성에 따라 평가했는데 2424dpm/fmol 이 모노요오드톡신과 일치했다.

결합 평가

상충적인 결합 평가를 표시된 일정농도의 독소 존재하에서 표지되지 않은 독소의 농도를 증가시키면서 평형 상태에서 수행했다. 모든 결합 평가의 분석을 반복적인 컴퓨터 프로그램 LIGAND(피.제이.문슨(P.J.Munson)과 디 로드바드(D. Rodbard), 지.에이.맥퍼슨(G.A.McPherson) 1985)을 사용하여 수행했다. 곤충막 소포를 0.13M 콜린 클로라이드, 1mM EDTA pH=7.4, 20mM HEPES/Tris pH=7.4 및 5mg/ml BSA를 함유하는 결합 배지에 혼탁시켰다. 독소와 함께 1시간 동안 배양 후 반응 혼합물을 2ml 얼음-냉 세척 완충액 (150mM 콜린 클로라이드, 2mM HEPES/Tris pH= 7.4, 1mM EDTA ph= 7.4 및 5mg/ml BSA)으로 희석하고 진공 하에서 GF/F 필터 (와트만, U.K.)로 여과한 다음에 매시간마다 세척 완충액 2ml로 필터를 2회 이상 세척했다.

실시예 7

합성 유전자의 작제 (도 1, SEQ ID NO:1)

독소의 단백질 서열을 바쿠로바이러스의 바람직한 코돈용법을 사용하여 뉴클레오티드 서열로 전환했다. 리더서열(봄박신(bombyxin), 천연 리더 또는 다른 것)의 뉴클레오티드 서열과 적당한 제한 효소 부위와 함께 독소 유전자를 옮리고 뉴클레오티드의 5 상보적인 쌍을 설계 및 합성하는데 사용했다. 이 옮리고 뉴클레오티드를 프라이머로서 외부 옮리고 뉴클레오티드를 사용하여 PCR로 인산화, 가열냉각, 배위자 결합 및 증폭시켰다. PCR 생성물은 PRC script 플라즈미드에 배위자 결합된 무딘 단부로서 정확한 서열은 서열화에 의해 확인된다. BamHI 제한 단편은 바쿠로바이러스 프로모터 (P10, 폴리헤드린 Basic, IE1등) 하에서 바쿠로바이러스 전달 벡터로 클론된 플라즈미드로부터 구했다. 유전자의 정확한 서열과 리더 서열을 함유하는 플라즈미드를 서열화에 의해 확인했다. 최종 전달 벡터와 표준과정을 사용하여 독소를 발현하는 재조합 바이러스를 작제했다.

AaIT와 LqhIV를 발현하는 바이러스의 작제

봄박신의 리더 서열과 독소LqhIV를 코팅하는 유전자를 상기와 같이 디자인하고 합성했다. 정확한 서열을 확인하고 유전자를 이미 AaIT 유전자를 함유하는 이중 발현 전달 벡터로 클론했다. 전달 벡터 pAcUW51P2는 BamHI 부위에 클론된 봄박신리터를 갖는 LqhIV 유전자 및 BgIII 부위의 두 클로닝 부위를 갖는 폴리헤드린 양성 벡터이다. Sf21 세포를 리포펙틴 과정을 사용하여 최종 전달 벡터와 감염성 바이러스 입자와 동시에 형질전환시켰다. 재조합체 바이러스는 표준 플라크(plaque) 평가로 폴리헤드린 양성 표현형으로

서 선택했다. Sf21세포를 표준과정에 따라 재조합체 바이러스 AcAaLg로 접종했다. 바이러스 감염된 세포로부터의 단백질 추출물을 15% SDS-PAGE 겔에서 분리하고 니트로셀룰로오스막에 대해 전기 용출시켰다. 막을 AaIT와 LqhIV 항체로 탐침하고 결합된 항체를 토끼 IgG HRP 콘쥬게이트를 사용하여 검출했다.

결론적으로, 유전학적으로 처리된 살충성 미생물이 본 발명에 따라 제조되어 다양한 해충을 조절하는데 사용된다. 이때, 다수의 신경독소를 발현하는 단일 재조합 바이러스를 사용할 수 있다. 독소들의 조합물은 동일한 세포성 채널(일반적인 소듐채널)이지만 겹치지 않는 부위에서 작용하는 독소를 선택하므로 결정된다. 선택적으로, 각각 다른 독소를 발현하는 두 개 (또는 그 이상) 재조합 살충 미생물을 사용할 수 있다. 다시, 몇 개의 발현된 독소는 이미 기술된 바와 같이 선택된다. 발현된 독소의 이러한 조합은 바이러스 또는 단지 "첨가적인" 기능 이상으로 바이러스에 의한 살충 속도를 가속화한다. 예를들면, 검정파리 유충과 *Heliothis* 유충 모두에서 독소 AaIT와 Lqh α IT의 치명성을 조합해서 사용할 때 5-10배 증가했다. 또한, 독소의 조합은 곤충그룹내의 선택성을 강화하는데 사용될 수 있다.

재조합 미생물의 통상적인 적용수단(스프레이, 분무(atomizing), 살포, 비산 또는 방사)이 분말, 입자, 그래뉼과 같은 제형 뿐만 아니라 폴리머 물질에서와 같은 캡슐화로 사용될 수 있다. 조성물은 일반적으로 살충성 독소의 상승적인 조합을 나타내는 재조합 미생물을 부착시키기 위해 부착을 돋는 점토, 락토즈, 지방제거된 콩 분말 등과 같은 불활성 캐리어를 포함한다.

본 발명은 바람직한 특정 실시예와 결합하여 상기에 기술되었지만 설명과 실시예는 단지 설명을 위한 것으로서 발명의 범위를 제한 하지 않으며 첨부된 청구범위에 의해 한정되는 것으로 이해되어야 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

곤충군, 진드기 및 선충류로 이루어진 해충을 조절하기 위한 방법에 있어서, 독소원이 최소한 하나의 재조합 미생물 또는 다수의 재조합 미생물들이며, 곤충세포막 채널에서 결합부위가 겹치지 않는, 최소한 2개의 다른 곤충독소로 상기 해충 및 그들의 소재지를 처리하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 독소원이 재조합 곤충 바이러스인 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 재조합 곤충 바이러스 원이 바쿠로바이러스인 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 바쿠로바이러스가 핵 다면성바이러스종 바이러스인 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 바쿠로바이러스가 *Autographa californica*, *Anagrapha falcifera*, *Anticarsia gemmatalis*, *Buzura suppressaria*, *Cydia pomonella*, *Heliocoverpa zea*, *Heliothis arrigera*, *Mariestia brassicae*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, 또는 *Spodoptera litura*로부터의 것인 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 독소가 AaIT, LqhIT₂, Lqh α IT, 및 LqhIT₃ 신경 독소의 조합인 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 독소가 JHE 돌연변이체를 포함하는 방법.

청구항 8

제 6항 또는 7항에 있어서, 해충이 *Heliothis virescens* 또는 검정파리인 방법.

청구항 9

아미노산 서열 SEQ. ID NO:1 또는 SEQ. ID NO:2를 갖는, 곤충 조절에 유용한, 실질적으로 순수한 곤충 독소.

청구항 10

감염시킨 곤충 세포에서 곤충 세포에 대한 최소한 2개의 일부 단백질 또는 이의 관능성 유도체를 발현하며, 미생물 계통은 분비 신호 서열을 제공하는 재조합 미생물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 미생물이 핵 다면성바이러스종 바이러스인 재조합 미생물.

청구항 12

제 10항 또는 11항에 있어서, 적어도 하나의 외부 단백질이 전갈 독소인 재조합 미생물.

청구항 13

제 10항에 있어서, 외부 단백질이 전갈, 말벌, 달팽이, 진드기 또는 거미 독액의 유전적 서열 코딩으로부터 유도되는 재조합 미생물.

청구항 14

제 10, 12 또는 13항에 있어서, 바쿠로바이러스가 *Autographa californica* 핵 다연성바이러스종 바이러스인 미생물.

청구항 15

곤충 세포 막 채널에서 비-중복 결합부위를 갖는 제 1 및 제 2 독액을 각각 발현하는 제 1 및 제 2 바쿠로바이러스를 포함하는 곤충 조절 조성물.

청구항 16

감염시킨 곤충세포에서 다수의 살충성 독소를 발현하는 재조합 바쿠로바이러스를 포함하는 곤충 조절 조성물.

도면

도면1

AGA TCT GGA TCC ATG AAG ATC CTC CTT GCT ATT GCC CTT ATG CTT AGC ACC GTG
TCT AGA CCT AGG TAC TTC TAG GAG GAA CGA TAA CGG GAA TAC GAA TCG TGG CAC

ATG TGG GTG AGC ACC GGC GTG CGC GAC GCC TAC ATC GCC GAC GAC AAG AAC TGC
TAC ACC CAC TCG TGG CCG CAC GCG CTG CGG ATG TAG CGG CTG CTG TTC TTG ACG

GTG TAC ACC TGC GGC GCC AAC TCT TAC TGC AAC ACC GAC TGC ACC AAG AAC GGC
CAC ATG TGG ACG CCG CGG TTG AGA ATG ACG TTG TGG CTC ACG TGG TTC TTG CCG

GCC GAC TCT GGC TAC TGC CAA TGG TTC GGC AAA TAC GGC AAC GCA TGC TGG TGC
CGG CTC AGA CCG ATG ACG GTT ACC AAG CCG TTT ATG CCG TTG CGT ACG ACC ACG

ATC AAA CTT CCC GAC AAA GTG CCC ATC CGC ATT CCC GGC AAA TGC CGC TAA GGA
TAG TTT GAA GGG CTG TTT CAC GGG TAG GCG TAA GGG CCG TTT ACG GCG ATT CCT

TCC AGA TCT GAG CTC
AGG TCT AGA CTC GAG