

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533809

(P2004-533809A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 B O 3 O
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00		2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027		4 B O 2 4
A O 1 N 63/00	A O 1 N 63/00	A	4 B O 5 O
C 1 2 N 1/15	A O 1 N 63/00	C	4 B O 6 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 102 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-561508 (P2002-561508)  
 (86) (22) 出願日 平成14年2月1日 (2002.2.1)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月29日 (2003.7.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2002/000101  
 (87) 国際公開番号 W02002/060940  
 (87) 国際公開日 平成14年8月8日 (2002.8.8)  
 (31) 優先権主張番号 PR 2821  
 (32) 優先日 平成13年2月1日 (2001.2.1)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 591269435  
 コモンウェルス サイエнтиフィック  
 アンド インダストリアル リサーチ オ  
 ーガニゼーション  
 COMMONWEALTH SCIENT  
 IFIC AND INDUSTRIAL  
 RESEARCH ORGANIZAT  
 ION  
 オーストラリア国 2601 オーストラ  
 リアン キャピタル テリトリー キャン  
 ベル ライムストーン アベニュー 番地  
 なし  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幼若ホルモンエステラーゼ

## (57) 【要約】

本発明は、節足動物集団を制御する方法の開発における幼若ホルモンエステラーゼの使用に関する。本発明の節足動物制御剤を同定する方法は、キイロシヨウジョウバエ (*D. melanogaster*) 幼若ホルモンエステラーゼをコードするcDNAのクローニングおよび特性決定に基づく。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

節足動物制御剤を同定する方法であって、

a) 幼若ホルモンエステラーゼ活性をもち配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるポリペプチドを候補薬剤に曝すこと、及び

b) ポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性をモジュレートする候補薬剤の能力を評価することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 2】

薬剤がポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性を抑制する、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

薬剤がポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性を増強する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

ポリペプチドは長さが少なくとも 300 個のアミノ酸である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

節足動物制御剤を同定する方法であって、

a) 配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるポリペプチドをポリペプチドと結合する結合パートナー及び候補薬剤に曝すこと、ならびに

b) ポリペプチドと結合する結合パートナーと競合する候補薬剤の能力を評価することを含んでなる前記方法。

20

## 【請求項 6】

結合パートナーが検出可能なように標識されている、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

結合パートナーが幼若ホルモンである、請求項 5 または請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

節足動物制御剤を同定する方法であって、

(a) 幼若ホルモンエステラーゼをもち配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるポリペプチドの 3 次元構造を規定する原子座標を決定すること；

(b) ステップ (a) で得た原子座標による合理的な薬物設計を実施することにより候補化合物を選択し、ここで前記選択はコンピューターモデルと関連して実施すること；及び

(c) 前記ポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性をモジュレートする候補化合物の能力を決定することを含んでなる前記方法。

30

## 【請求項 9】

幼若ホルモンエステラーゼをもち配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるポリペプチドの結晶。

## 【請求項 10】

節足動物制御剤設計の方法であって、請求項 9 に記載の結晶の構造座標を利用して、ある化合物をポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性をモジュレートするその能力についてコンピューターにより評価することを含んでなる前記方法。

40

## 【請求項 11】

節足動物制御剤を同定する方法であって、

a) 幼若ホルモンエステラーゼ活性をもち配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、候補薬剤に前記ポリヌクレオチドが発現される条件下で曝すこと、及び

b) ポリヌクレオチドが産生するポリペプチドのレベルをモジュレートする候補薬剤の能力を評価することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 12】

薬剤がポリペプチドの産生を抑制する、請求項 11 に記載の方法。

50

## 【請求項 13】

節足動物制御剤を同定する方法であって、

- a) 配列番号 4 と少なくとも 90% 同一であるポリヌクレオチドを候補薬剤に曝すこと、及び
- b) ポリヌクレオチドとハイブリダイズする及び/またはポリヌクレオチドを切断する候補薬剤の能力を評価することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 14】

幼若ホルモンエステラーゼ活性を有する実質的に精製されたポリペプチドであって、

- (i) 配列番号 1 の配列を含んでなるポリペプチド；または
- (ii) (i) と少なくとも 90% 同一である配列を有するポリペプチド；からなる群から選択され、

ここで長さが 600 個以下の残基である、前記ポリペプチド。

10

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載の実質的に精製されたポリペプチドであって、(i) と少なくとも 95% 同一である配列を有する前記ポリペプチド。

## 【請求項 16】

請求項 14 に記載の実質的に精製されたポリペプチドであって、(i) と少なくとも 99% 同一である配列を有する前記ポリペプチド。

## 【請求項 17】

請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の実質的に精製されたポリペプチドであって、長さが少なくとも 300 個のアミノ酸である前記ポリペプチド。

20

## 【請求項 18】

単離されたポリヌクレオチドであって、請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 19】

請求項 18 に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、

- (i) 配列番号 3 に示されるヌクレオチドの配列；
- (ii) 配列番号 4 に示されるヌクレオチドの配列；または
- (iii) (i) もしくは (ii) と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列から選択される配列を有する前記ポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 20】

請求項 19 に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、1660 個未満のヌクレオチドを有する前記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 21】

請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチド。

## 【請求項 22】

触媒ドメインを含んでなる、請求項 21 に記載のアンチセンスポリヌクレオチド。

## 【請求項 23】

請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、2 本鎖 RNA (dsRNA) 分子。

40

## 【請求項 24】

請求項 23 に記載の dsRNA 分子であって、dsRNA 分子が単一のオープンリーディングフレームによりコードされかつ得られる dsRNA 分子の 1 つの末端にステムループ構造を有する前記 dsRNA 分子。

## 【請求項 25】

少なくとも 1 つの他のポリペプチド配列と融合した請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含んでなる、融合タンパク質

## 【請求項 26】

請求項 25 に記載の融合タンパク質であって、少なくとも 1 つの他のポリペプチドは請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの安定性を増強するポリペプチド、請

50

請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに対する免疫応答を増強する免疫賦活剤として作用するポリペプチド、及び融合タンパク質の精製を助けるポリペプチドからなる群から選択される、前記融合タンパク質。

【請求項 27】

請求項 25 または請求項 26 に記載の融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項 18 ~ 20 または 27 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 29】

ポリヌクレオチドがプロモーターと機能しうる形で連結されている、請求項 28 に記載のベクター。

10

【請求項 30】

請求項 21 または 22 に記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 31】

アンチセンスポリヌクレオチドがプロモーターと機能しうる形で連結されている請求項 30 に記載のベクター。

【請求項 32】

発現すると請求項 23 または 24 に記載の RNA 分子を形成するオープンリーディングフレームを含んでなるベクター。

20

【請求項 33】

dsRNA 分子がプロモーターと機能しうる形で連結されている、請求項 32 に記載のベクター。

【請求項 34】

ベクターがプラスミドまたはウイルスである、請求項 28 ~ 33 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 35】

ウイルスベクターがバキュロウイルスである請求項 34 のベクター。

【請求項 36】

ベクターがカプソイドである、請求項 28 ~ 33 のいずれか 1 項に記載のベクター。

30

【請求項 37】

請求項 28 ~ 36 のいずれか 1 項に記載のベクターを用いて形質転換したまたはトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項 38】

細菌細胞である、請求項 37 に記載の宿主細胞。

【請求項 39】

節足動物細胞である、請求項 37 に記載の宿主細胞。

【請求項 40】

昆虫細胞である、請求項 37 に記載の宿主細胞。

【請求項 41】

請求項 18 ~ 20 または 27 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを用いて形質転換されているトランスジェニック植物であって、前記ポリヌクレオチドを発現する前記植物。

40

【請求項 42】

請求項 21 または請求項 22 に記載のアンチセンスポリヌクレオチドを用いて形質転換されてるトランスジェニック植物であって、前記アンチセンスポリヌクレオチドを発現する前記植物。

【請求項 43】

発現すると請求項 23 または請求項 24 に記載の dsRNA 分子を形成するオープンリーディングフレームを用いて形質転換されているトランスジェニック植物であって、前記 dsRNA

50

分子を産生する前記植物。

【請求項 4 4】

請求項 1 8 ~ 2 0 または 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを用いて形質転換されてるトランスジェニック非ヒト動物であって、前記ポリヌクレオチドを発現する前記動物。

【請求項 4 5】

請求項 2 1 または請求項 2 2 に記載のアンチセンスポリヌクレオチドを用いて形質転換されてるトランスジェニック非ヒト動物であって、前記アンチセンスポリヌクレオチドを発現する前記動物。

【請求項 4 6】

発現すると請求項 2 3 または請求項 2 4 に記載の dsRNA 分子を形成するオープンリーディングフレームを用いて形質転換されているトランスジェニック非ヒト動物であって、前記 dsRNA 分子を産生する前記動物。

【請求項 4 7】

節足動物制御組成物であって、請求項 1 ~ 8 または 1 0 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の同定された薬剤及び農業上許容される担体を含んでなる前記組成物。

【請求項 4 8】

節足動物制御組成物であって、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド及び農業上許容される担体を含んでなる前記組成物。

【請求項 4 9】

節足動物制御組成物であって、請求項 2 8 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載のベクター及び農業上許容される担体を含んでなる前記組成物。

【請求項 5 0】

節足動物集団を制御する方法であって、節足動物集団のメンバーを請求項 4 7 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の節足動物制御組成物に曝すことを含んでなる前記方法。

【請求項 5 1】

節足動物が昆虫である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを調製する方法であって、請求項 2 9 に記載のベクターを用いて形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞を、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現が可能となる条件下で培養し、そして発現したポリペプチドを回収することを含んでなる前記方法。

【請求項 5 3】

節足動物制御剤を同定するキットであって、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、及び幼若ホルモンエステラーゼ活性を決定する手段を含んでなる前記キット。

【請求項 5 4】

節足動物制御剤を同定するキットであって、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、及びポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性を決定する手段を含んでなる前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般的に、節足動物集団を制御する方法の開発における幼若ホルモンエステラーゼの利用に関する。特に、本発明は、幼若ホルモンエステラーゼの産生及び/または活性をモジュレートする節足動物制御剤を同定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

10

20

30

40

50

幼若ホルモン (JH) は、節足動物ホルモンの複数の重要なクラスの 1 つであり、その相互作用によって発生及び生殖を調節する (Riddiford、1993 の総説を参照)。最もよく知られる特徴的な JH の役割は、エクジソンとの相互作用を介する幼生から蛹への移行の調節である。JH はまた、様々な他のプロセスにおいても役割を果たし、卵産生、雌雄両方の性腺刺激ホルモン発生、カースト決定及び休眠が挙げられる。JH 系は、昆虫において最もよく理解されているが、この系の重要な態様は全ての節足動物に共通しているようである (Cussnerら、1991)。

#### 【0003】

JH の最も一般的な型は、JHIII ( (2E,6E)-10,11-エポキシ-3,7,11-トリメチル-2,6-ドデカジエン酸メチル) であり、今まで研究された全昆虫目に見出されている (Schooleyら、1984)。鱗翅目 (Lepidopteran) 及び双翅目 (Dipteran) は他の昆虫と異なり、JHIII に加えて他の型の JH を有する。これらの JH は JHIII に類似し、わずかに異なるのは酸部分の置換基である。全てがメタノールのエステルであり、10(R),11-エポキシド基及び2,3-二重結合を有する。鱗翅目は JH0、JH1、JH2 及び4-メチル JH1 型の JH を有するのに対して、JH11 ビスエポキシド (JHB<sub>3</sub>) (JHIII の6,7二重結合が6S,7Sエポキシド基により置換えられている) は高等双翅目にだけ見出されている (Schooleyら、1984; Richardら、1989)。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) においては、JHIII は少数であり、JHB<sub>3</sub> が幼若ホルモンの主要な型である。

#### 【0004】

JH 力価の調節は合成と分解との間のバランスにより行われるが、隔離 (sequestration) 及び分泌 (secretion) などの他の機構も関与しうる。JH の 2 つの主要分解経路は、JH エステラーゼ (JHE) 及び JH エポキシド加水分解酵素 (JHEH) によるエステル及びエポキシド基の加水分解である。最終齢幼生鱗翅目の血リンパ中の JH 分解が最も徹底して研究されていて、その分解は JHE を経由して起こる。この期間の重要な特徴として、血リンパ中の JHE にはプレ遊走 (pre-wandering) ピーク及びプレ蛹化 (pre-pupation) ピークが一般的に存在し、これは血リンパの JH 力価と逆の相関にある。

#### 【0005】

双翅目においては、幼生 JH 加水分解酵素は血リンパ及びその他の組織内に見出され、JHE と JHEH の全活性への相対的寄与は種間で変わる。最終齢後期に JH 分解活性は最小値となるが、囲蛹殻 (puparium) 形成直後に可溶の循環 JHE 活性は高レベルとなり、蛹化 (pupation) 前に、恐らく全生物から JH を除去し清澄化する。この JHE は活性は低下するものの、蛹期 (pupal stage) を通して保持される。成体において低レベルの JHE と JHEH が見出され、サブ細胞分布は様々であるが、恐らく、特定組織の JH シグナルをモジュレートするかまたはその作用部位に到達した後に JH シグナルを消すのであろう。

#### 【0006】

メトプレン (methoprene)、ヒドロプレン (hydroprene) 及びピリプロキシフェン (pyriproxifen) などの、JH 代謝を破壊するジュブノイド (juvenoid) 殺虫剤が開発されている。しかし、JH シグナル伝達系を破壊するのに利用しうるさらなる薬剤に対するニーズがある。

#### 【発明の開示】

#### 【0007】

##### 発明の概要

本発明者らはキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 由来の幼若ホルモンエステラーゼを同定した。このエステラーゼの知識は、節足動物の発生及び/または生殖を破壊する節足動物制御剤を同定するスクリーニング方法を設計するのに利用することができる、そしてその故に、節足動物集団を制御する手段を提供するものである。

#### 【0008】

一態様においては、本発明は節足動物制御剤を同定する方法であって、

a) 幼若ホルモンエステラーゼをもちかつ配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるポリペプチドを、候補薬剤に曝すこと、及び

10

20

30

40

50

b)ポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性をモジュレートする候補薬剤の能力を評価することを含んでなる前記方法を提供する。

【0009】

一実施形態においては、薬剤はポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性を抑制する。他の実施形態においては、薬剤はポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性を増強する。

【0010】

本発明の一例では、ポリペプチドを用いて人工エステラーゼ基質、酢酸 $\alpha$ -ナフチルを加水分解して $\alpha$ -ナフトールを得て、これをファストブルーBN (Fast Blue BN) などのある特定のジアゾ染料と反応させた後に235nmもしくは可視波長の吸収変化により検出してもよい (Campbellら、1998)。候補薬剤をかかるとアッセイに用いて、それが適当な節足動物制御剤であるかどうかを決定することができる。

10

【0011】

特に好ましい実施形態においては、節足動物制御剤はポリペプチドと直接結合する。

【0012】

好ましくは、ポリペプチドは長さが少なくとも300個のアミノ酸である。

【0013】

好ましくは、幼若ホルモンエステラーゼ活性は、JH0、JH1、JH11、JH111及びJHB<sub>3</sub>からなる群から選択される幼若ホルモンを加水分解する能力である。さらに好ましくは、幼若ホルモンエステラーゼ活性は、JH111及びJHB<sub>3</sub>からなる群から選択される幼若ホルモンを加水分解する能力である。

20

【0014】

他の態様においては、本発明は節足動物制御剤を同定する方法であって、

a)配列番号1と少なくとも90%同一であるポリペプチドを、ポリペプチドと結合する結合パートナー及び候補薬剤に曝すこと、及び

b)ポリペプチドとの結合に対して結合パートナーと競合する候補薬剤の能力を評価すること

を含んでなる前記方法を提供する。

【0015】

好ましくは、結合パートナーに検出可能な標識を付ける。

30

【0016】

好ましくは、結合パートナーは幼若ホルモンである。

【0017】

好ましくは、ポリペプチドは幼若ホルモンエステラーゼ活性を有する。

【0018】

In silico技術を用いて節足動物制御剤を同定してもよい。

【0019】

従って、さらなる態様においては、本発明は節足動物制御剤を同定する方法であって、

(a)幼若ホルモンエステラーゼ活性をもちかつ配列番号1と少なくとも90%同一であるポリペプチドの三次元構造を規定する原子座標を決定すること；

40

(b)ステップ(a)で得た原子座標を用いて合理的な薬物設計を実施することにより候補化合物を選択し、ここで前記選択はコンピューターモデルを用いて実施すること；及び

(c)ポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性をモジュレートする候補化合物の能力を決定することを含んでなる前記方法を提供する。

【0020】

他の態様においては、本発明は、幼若ホルモンエステラーゼ活性をもちかつ配列番号1と少なくとも90%同一であるポリペプチドの結晶を提供する。

【0021】

さらに他の態様においては、本発明は、節足動物制御剤を設計する方法であって、ポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性をモジュレートするその能力について、本発明の

50

結晶の構造座標を利用してコンピューターにより化合物を評価することを含んでなる前記方法を提供する。

【0022】

他の態様においては、本発明は、節足動物制御剤を同定する方法であって、

a) 幼若ホルモンエステラーゼ活性をもちかつ配列番号1と少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドが発現しうる条件下で候補薬剤に曝すこと、及び

b) ポリヌクレオチドが産生したポリペプチドのレベルをモジュレートする候補薬剤の能力を評価することを含んでなる前記方法を提供する。

【0023】

一実施形態においては、薬剤はポリペプチドの産生を抑制する。

【0024】

他の態様においては、本発明は、節足動物制御剤を同定する方法であって、

a) 配列番号4と少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドを、候補薬剤に曝すこと、及び

b) ポリヌクレオチドとハイブリダイズする及び/またはポリヌクレオチドを切断する候補薬剤の能力を評価することを含んでなる前記方法を提供する。

【0025】

本発明の節足動物制御剤を同定する方法は、好ましくは、リード化合物として開発される候補化合物を選択するステップをさらに含んでなる。その上さらに、本発明の節足動物制御剤を同定する方法は、好ましくは、節足動物制御剤を農業上許容される担体を含んでなる節足動物制御組成物に製剤することをさらに含んでなる。

【0026】

他の態様においては、本発明は、幼若ホルモンエステラーゼ活性を有する実質的に精製されたポリペプチドであって、

(i) 配列番号1の配列を含んでなるポリペプチド；または

(ii) (i)と少なくとも90%同一である配列を有するポリペプチド：からなる群から選択され、

ここで長さが600個以下の残基である、前記ポリペプチドを提供する。

【0027】

好ましくは、ポリペプチドは(i)と少なくとも95%同一である配列を有する。さらに好ましくは、ポリペプチドは(i)と少なくとも99%同一である配列を有する。

【0028】

さらに、ポリペプチドは長さが少なくとも300個のアミノ酸であることが好ましい。

【0029】

他の態様においては、本発明は、幼若ホルモンエステラーゼ活性を有する実質的に精製されたポリペプチドであり、

(i) 配列番号1の配列を含んでなるポリペプチド；または

(ii) (i)と少なくとも31%同一であるポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドであり、

ここで長さが600個以下の残基である、前記ポリペプチドを提供する。

【0030】

好ましくは、ポリペプチドは、(i)と少なくとも40%同一であり、さらに好ましくは少なくとも50%同一であり、さらに好ましくは少なくとも60%同一であり、さらに好ましくは少なくとも70%同一であり、さらに好ましくは少なくとも80%同一であり、そしてなおさらに好ましくは(i)と少なくとも90%同一である。

【0031】

好ましくは、ポリペプチドは長さが少なくとも300個のアミノ酸である。

【0032】

他の態様においては、本発明は、本発明によるポリペプチドをコードするポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドを提供する。

【0033】

一実施形態においては、ポリヌクレオチドは、

(i)配列番号3に示したヌクレオチド配列；

(ii)配列番号4に示したヌクレオチド配列；または

(iii)高ストリンジェンシーの条件下で(i)または(ii)とハイブリダイズする配列

から選択される配列を有する。

【0034】

好ましくは、ポリヌクレオチドは1660個未満のヌクレオチドである配列を有する。しかし、ポリヌクレオチドは長さが1000個未満またはさらに500個未満のヌクレオチドであつてもよい。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは長さが少なくとも18個のヌクレオチドである。

10

【0035】

さらなる態様においては、本発明は、高ストリンジェントな条件下で本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチドを提供する。

【0036】

好ましくは、アンチセンスポリヌクレオチドは触媒ドメインを含んでなる。従つて、アンチセンスポリヌクレオチドは触媒酵素でありうる。好ましくは、触媒酵素は、リボザイム及びデオキシリボザイムからなる群から選択される。

【0037】

他の態様においては、本発明は、本発明によるポリヌクレオチドを含んでなる2本鎖RNA(dsRNA)分子を提供する。

20

【0038】

好ましくは、dsRNAは単一のオープンリーディングフレームによりコードされかつ得られるdsRNA分子は分子の一端にステムループ(stem loop)構造を有する。

【0039】

さらに他の態様においては、本発明は、少なくとも1つの他のポリペプチド配列と融合した本発明によるポリペプチドを含んでなる融合タンパク質を提供する。

【0040】

好ましくは、前記少なくとも1つの他のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの安定性を増強するポリペプチド、本発明のポリペプチドに対する免疫応答を増強する免疫賦活薬として作用するポリペプチド、融合タンパク質の精製を助けるポリペプチドからなる群から選択される。

30

【0041】

他の態様においては、本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0042】

さらなる態様においては、本発明は、本発明によるポリヌクレオチドを含んでなるベクターを提供する。

【0043】

好ましくは、ポリヌクレオチドはプロモーターと機能しうる形で連結されている。

40

【0044】

さらなる態様においては、本発明は、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを含んでなるベクターを提供する。

【0045】

好ましくは、アンチセンスポリヌクレオチドはプロモーターと機能しうる形で連結されている。

【0046】

さらなる態様においては、本発明は、発現すると本発明によるdsRNA分子を形成するオープンリーディングフレームを含んでなるベクターを提供する。

50

## 【 0 0 4 7 】

好ましくは、dsRNA分子はプロモーターと機能しうる形で連結されている。

## 【 0 0 4 8 】

さらに好ましい実施形態においては、本発明のベクターはプラスミドまたはウイルスである。さらに好ましくは、ウイルスベクターはバキュロウイルスである。

## 【 0 0 4 9 】

特に好ましい実施形態においては、ベクターはカプソイド ( capsoid ) である。

## 【 0 0 5 0 】

他の実施形態においては、本発明は、本発明によるベクターを用いて形質転換したかまたはトランスフェクトした宿主細胞を提供する。

10

一実施形態においては、宿主細胞は細菌細胞である。他の実施形態においては、宿主細胞は節足動物細胞、さらに好ましくは昆虫細胞である。

## 【 0 0 5 1 】

他の態様においては、本発明は、本発明によるポリヌクレオチドを用いて形質転換されているトランスジェニック植物であって、前記ポリヌクレオチドを発現することを特徴とする前記植物を提供する。

## 【 0 0 5 2 】

他の態様においては、本発明は、本発明によるアンチセンスポリヌクレオチドを用いて形質転換されている植物であって、前記アンチセンスポリヌクレオチドを発現することを特徴とする前記植物を提供する。

20

## 【 0 0 5 3 】

他の態様においては、本発明は、発現すると本発明によるdsRNA分子を形成するオープンリーディングフレームを用いて形質転換されているトランスジェニック植物であって、dsRNA分子を産生することを特徴とする前記植物を提供する。

## 【 0 0 5 4 】

多数の節足動物は生存動物、例えば蚊及びヒツジキンバエ ( *Lucilia cuprina* ) の幼生を食するので、本発明は、本発明の分子を用いて形質転換された非ヒト動物を提供する。

## 【 0 0 5 5 】

従って、他の態様においては、本発明はトランスジェニック非ヒト動物であって、本発明によるポリヌクレオチドを用いて形質転換されていて、ポリヌクレオチドを発現することを特徴とする前記動物を提供する。

30

## 【 0 0 5 6 】

他の態様においては、本発明はトランスジェニック非ヒト動物であって、本発明によるアンチセンスポリヌクレオチドを用いて形質転換されていて、アンチセンスポリヌクレオチドを発現することを特徴とする前記動物を提供する。

## 【 0 0 5 7 】

他の態様においては、本発明はトランスジェニック非ヒト動物であって、発現すると本発明によるdsRNA分子を形成するオープンリーディングフレームを用いて形質転換されていて、dsRNA分子を産生することを特徴とする前記動物を提供する。

## 【 0 0 5 8 】

他の態様においては、本発明は節足動物制御組成物であって、本発明により同定された薬剤及び農業上許容される担体を含んでなる前記組成物を提供する。

40

## 【 0 0 5 9 】

他の態様においては、本発明は節足動物制御組成物であって、本発明によるポリペプチド及び農業上許容される担体を含んでなる前記組成物を提供する。

## 【 0 0 6 0 】

他の態様においては、本発明は節足動物制御組成物であって、本発明によるベクター及び農業上許容される担体を含んでなる前記組成物を提供する。

## 【 0 0 6 1 】

他の態様においては、本発明は節足動物集団を制御する方法であって、節足動物集団のメ

50

ンバーを本発明による節足動物制御組成物に曝すことを含んでなる前記方法を提供する。

【0062】

好ましくは、節足動物は昆虫である。

【0063】

他の態様においては、本発明は、本発明によるポリペプチドを調製する方法であって、本発明のポリヌクレオチドをコードするベクターを用いて形質転換するかもしくはトランスフェクトした宿主細胞を、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を与える条件下で培養すること及び発現したポリペプチドを回収することを含んでなる前記方法を提供する。

【0064】

本プロセスは、コードされたポリペプチドの商業上利用しうる量を生産するために使用することができる。

【0065】

他の態様においては、本発明は、節足動物制御剤を同定するキットであって、本発明によるポリペプチド及び幼若ホルモンエステラーゼ活性を決定する手段を含んでなる前記キットを提供する。

【0066】

他の態様においては、本発明は、節足動物制御剤を同定するキットであって、本発明によるポリヌクレオチド及びポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドの幼若ホルモンエステラーゼ活性を決定する手段を含んでなる前記キットを提供する。

【0067】

本発明の多数の他の態様においては、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、dsRNA分子、ベクター、宿主細胞及び節足動物制御剤を多数の方法に使用して、節足動物集団を制御することができる。

【0068】

本明細書を通して使用される用語「含んでなる(原型)(comprise)」、「含んでなる(単数)(comprises)」及び「含んでなる(進行形)(comprising)」は、明記した成分もしくは特性または成分もしくは特性の群の包含を、さらなる成分もしくは特性または成分もしくは特性の群を包含してまたは包含せずに参照することを意図する。

【0069】

本発明を以下に、次の限定されるものでない例を使いかつ添付図を参照して説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0070】

#### 発明の詳細な説明

##### 一般技術

特に断わらない限り、本発明に使用した組換えDNA技術は、当技術分野で周知の標準技術である。かかる技術を記載しかつ説明する文献としては、J. Perbal, 「分子クローニングの実用的手引き(A Practical Guide to Molecular Cloning)」, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrookら, 「分子クローニング: 研究室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T.A. Brown(編者), 「基本的分子生物学: 実用的手法(Essential Molecular Biology: A Practical Approach)」, Volumes 1及び2, IRL Press (1991)、D.M. Glover及びB.D. Hames(編者), 「DNAクローニング: 実用的手法(DNA Cloning: A Practical Approach)」, Volumes 1-4, IRL Press (1995及び1996)、ならびにF. M. Ausubelら(編者), 「分子生物学の現行プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までの全改定版を含む)が挙げられ、これらは本明細書に参照により組み入れられる。

【0071】

##### 節足動物制御剤及びそのスクリーニング方法

本発明の方法を利用して同定される節足動物制御剤を使い、幼若ホルモンエステラーゼ活

10

20

30

40

50

性を破壊して節足動物を死に到らしめるかまたは少なくとも繁殖速度もしくは摂食速度を低下させることができる。例えば、発生中に、JHEが抑制されるとJH力価の増加と致命的な脱皮のブロッキングを生じる一方、JHEが不適当に発現されるとJH力価の低下と早期脱皮を生じる。従って、JHエステラーゼ活性もしくはレベルを増強もしくは抑制する作用剤は、節足動物集団を制御するために利用することができる。

**【0072】**

本明細書に使用される「リード化合物 (lead compound)」は、最終的には、例えば、節足動物害虫集団を制御する作用剤として、組成物に製剤して販売することを目標として、試験にかけられる節足動物制御剤である。リード化合物を、節足動物、さらに好ましくは昆虫に曝すと、その節足動物内のJHエステラーゼ活性を破壊して繁殖速度の低下、死、摂食速度の低下などをもたらす。

10

**【0073】**

既知のスクリーニング技術を用いて、本発明のJHエステラーゼの活性または産生をモジュレートする節足動物制御剤を同定することができる。例えば、JHエステラーゼを用いて人工基質を加水分解し、検出可能なシグナルを得ることができる。先に記載したように、一例は酢酸-pナフチルの加水分解であり、それにより得られる-pナフトールはファストブルー-BN (Fast Blue BN) などのある特定のジアゾ染料との反応後に、235nmもしくは可視波長での吸光度の変化により検出することができる (Campbellら、1998)。候補作用剤をかけるアッセイに組み入れて、それらが適当な節足動物制御剤であるか否かを決定することができる。多数の可能性があるインヒビターをスクリーニングする多数の反応を、様々な溶液を移送しかつそれぞれのウェルの吸光度を測定するロボットを用いて、マイクロタイタートレイにおいて自動的に実施することができる。

20

**【0074】**

アゴニスト/アンタゴニストをスクリーニングする他の方法は、ポリペプチドと結合パートナー (そのポリペプチドと結合することができる) とを混合し、それらのお互いの結合を、可能性があるアゴニスト/アンタゴニストの存在または不在のもとで測定することを含む。ポリペプチドまたは結合パートナーは、放射性同位体、蛍光団及び発色団からなる群から選択されるものなどの既知の標識を利用して検出可能なように標識してもよい。最も好ましくは、結合パートナーは標識した幼若ホルモンである。この結合アッセイはELISAプレートアッセイの形態であってもよい。当業者に知られている他の結合フォーマットも存在しており、それらは共沈降、遠心分離及び表面プラズモン共鳴が挙げられる。

30

**【0075】**

1つの可能性があるアンタゴニストは、ポリペプチドの幼若ホルモン結合部位と結合して幼若ホルモンへの接近ができないようにする小分子である。小分子の例は、限定されるものでないが、小ペプチド、ペプチド様分子、植物二次代謝物または合成有機化学物質が挙げられる。

**【0076】**

本明細書に記載したように、適当なアンチセンスポリヌクレオチド及びdsRNA分子を、JHエステラーゼをコードする本発明のポリヌクレオチドの配列に基づいて設計することができる。かかるアンチセンスポリヌクレオチド及びdsRNA分子は、アンチセンスポリヌクレオチドまたはdsRNA分子により形質転換されている節足動物細胞からのJHエステラーゼの産生を抑制する節足動物制御剤として利用することができる。

40

**【0077】**

またかかるアンチセンスポリヌクレオチド及びdsRNA分子を、本発明の方法を用いて、節足動物制御剤としての利用についてスクリーニングすることもできる。例えば、JHエステラーゼをコードする本発明のポリヌクレオチドを細胞系もしくは無細胞発現系で発現させてJHエステラーゼを産生させることができる。JHエステラーゼをコードする本発明のポリヌクレオチドの配列に基づいて設計した候補アンチセンスポリヌクレオチド及びdsRNA分子を前記系に組み込み、それによるJHエステラーゼmRNAレベルまたはJHエステラーゼポリペプチドレベルもしくは活性に対する影響を当技術分野で知られる技術を用いて容易に測

50

定することができる。

【0078】

幼若ホルモンエステラーゼ活性の適当なインヒビターは、タンパク質の活性部位に直接相互作用し、それによって通常はエステラーゼの活性部位と結合するかさもなくば相互作用するかあるいはそれを修飾することにより、エステラーゼの活性を抑制する化合物である。幼若ホルモンエステラーゼインヒビターはまた、そのタンパク質の他の領域と相互作用してエステラーゼ活性を抑制してもよく、例えば、アロステリック相互作用によって抑制してもよい。

【0079】

本発明の方法により同定した節足動物制御剤を適用するための有効量及び投与計画は、当業者が周知する技術を用いて容易に決定することができる。 10

【0080】

本発明の方法により同定される一部の節足動物制御剤はまた、JH系の他の分子と相互作用することもできる。例えば、一部の節足動物制御剤は、少なくとも部分的に、JH結合タンパク質、JH受容体及び/またはJHEHなどのJH分解酵素に作用することができる。

【0081】

節足動物制御剤スクリーニング用のファージライブラリー

ファージライブラリーを構築して、それを宿主大腸菌 (*E. coli*) に感染させるとほぼ1~15個のアミノ酸の無作為ペプチド配列を産生することができる。具体的には、ファージライブラリーを、許容大腸菌 (*E. coli*) と低融点LB寒天中において低希釈率で混合し、次いでこれをLB寒天プレートの上に注いでもよい。プレートを37℃にてある一定時間インキュベートした後、大腸菌 (*E. coli*) のローン (lawn) に、活性ファージの増殖と大腸菌 (*E. coli*) の溶菌を示す小さい透明なプラークが形成される。乾いたフィルターを寒天プレート上に置くことにより、これらのファージの代表をナイロンフィルターに吸収させることができる。このフィルターに方向性をマーキングし、フィルターを取り外し、そして洗浄溶液中に漬け、残りの吸収部位を全てブロックする。次いでフィルターを、例えば、放射標識した本発明のポリペプチド (例えば、配列番号1を含んでなるアミノ酸配列を有するポリペプチド) を含有する、溶液に漬けてもよい。ある規定したインキュベーション期間の後、フィルターを十分洗浄し、オートラジオグラフィ用に現像してもよい。これにより、放射性ポリペプチドと結合するファージを含有するプラークの検出が可能になる。これらのファージをさらにクローニングし、次いで前のようにJHエステラーゼと結合するそれらの能力を再試験することができる。ファージが精製されれば、ファージに含有される結合配列を標準DNA配列決定技術により決定することができる。DNA配列が判明すると、これらの配列に相当する合成ペプチドを作製することができる。 20 30

【0082】

有効なペプチドを、*in vivo*モデルで使用するため及び最終的にはJHエステラーゼ活性を破壊する節足動物制御剤として利用するために、大量に合成することができる。合成ペプチド生産は比較的労力がかからず、製造や品質管理が容易であり、従って大量の所望の産物をむしろ安価に生産できることは強調されるべきである。

【0083】

タンパク質構造に基づく節足動物制御剤の設計

本発明のポリペプチドの結晶は様々な技術により成長させることができ、回分結晶化、蒸気拡散 (液滴静置 (sitting drop) または液滴吊り下げ (hanging drop) のいずれかによる) 及び微少透析が挙げられる。複数の事例においては、X線品質の結晶を得るには結晶のシーディングが必要でありうる。その場合、標準的な結晶のマイクロシーディング及び/またはマクロシーディングを利用してよい。結晶が成長すれば、標準技術を用いてX線回折データを取ることができる。

【0084】

本発明のポリペプチドの3次元構造が一度決定されると、可能性があるアンタゴニストまたはアゴニストを、GRAM、DOCK、またはAUTODOCK (Dunbrackら、1997) などのドッキング 40 50

プログラムを利用するコンピューターモデリングを用いて検証することができる。この方法は、可能性のあるリガンドとJHエステラーゼとのコンピューターフィッティングを行って、その可能性のあるリガンドの形状及び化学構造がいかにか巧くJHエステラーゼ活性を補完するかまたは妨害するかを確認することを含む。コンピュータープログラムはまた、本発明のポリペプチドに対するリガンドの引力、反発力、及び立体障害を評価するのに利用することもできる。一般的に、これらの物性はより強い結合定数と一致するので、フィットが強いほど（例えば、立体障害が小さいほど、及び/または引力が大きいほど）、可能性のある節足動物制御剤は強力であろう。さらに、可能性のある節足動物制御剤の設計における特異性が高いほど、恐らく節足動物制御剤は他のタンパク質を妨害しないであろう。これは他のタンパク質との望ましくない相互作用による副作用の可能性を最小限に抑えるであろう。

10

**【0085】**

最初に、先に記載した組換えバクテリオファージにより作製した無作為ペプチドライブラリーまたは化学ライブラリーをスクリーニングすることにより、可能性のある化合物を得ることができる。次いで、この方法で選択した化合物を、1以上の期待できる可能性のある化合物が同定されるまで、コンピューターモデリングプログラムにより体系的に改変することができる。

**【0086】**

作製される本質的に無作為な化学的改変は無数でありかつその化学的改変のいずれかが有用な節足動物制御剤となりうるのに対して、かかるコンピューターモデリングは合理的な化学的改変の有限数の選択を可能にする。それぞれの化学的改変はさらなる化学的ステップを要するが、それらのステップは、有限数の化合物を合成する上では無理なく実行できるが、可能性のある改変物を全て合成する必要があるとなれば、直ちに気が遠くなるような作業となる。従って、3次元構造及びコンピューターモデリングを利用することにより、多数のこれらの化合物をコンピューターモニタースクリーン上で高速スクリーニングして、膨大な数の化合物の手間がかかる合成をすることなく、少数のそれらしい候補を決定することができる。

20

**【0087】**

有望な節足動物制御剤を、いずれであってもよい標準結合アッセイにかけてそのJHエステラーゼ活性に対する効果を試験することができる。

30

**【0088】**

本明細書に記載した節足動物制御剤スクリーニングアッセイの全てに対して、節足動物制御剤の構造のさらなる洗練が一般的に必要であり、これは特定の節足動物制御剤スクリーニングアッセイにより与えられるいずれか及び/または全てのステップの逐次的反復によって行うことができる。

**【0089】****ポリペプチド**

「実質的に精製された」により、本発明者らは、それがその天然状態に関連している脂質、核酸、他のポリペプチド、及び他の夾雑分子から分離されたポリペプチドを意味する。

**【0090】**

ポリペプチドの%同一性は、GAP (Needleman及びWunsch, 1970) 分析 (GCG program) により、ギャップ作成ペナルティ (gap creation penalty) = 5、及びギャップ拡張ペナルティ (gap extension penalty) = 0.3を用いて決定する。問合せ配列 (query sequence) は長さが少なくとも15個のアミノ酸であり、GAP分析は少なくとも15個のアミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。さらに好ましくは、問合せ配列は長さが少なくとも50個のアミノ酸であり、GAP分析は少なくとも50個のアミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。なお、さらに好ましくは、問合せ配列は長さが少なくとも100個のアミノ酸であり、GAP分析は少なくとも100個のアミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。さらに好ましくは、問合せ配列は長さが少なくとも250個のアミノ酸であり、GAP分析は少なくとも250個のアミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。な

40

50

お、さらに好ましくは、問合せ配列は長さが少なくとも500個のアミノ酸であり、GAP分析は少なくとも500個のアミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。

【0091】

本明細書に使用される、本発明のポリペプチドの「生物学的に活性な断片」は、JHエステラーゼ活性を有するポリペプチドの一部である。

【0092】

本発明のポリペプチドは、天然のもの（例えば、配列番号1もしくは2）もしくは突然変異体及び/またはそれらの断片のいずれかであってもよい。

【0093】

アミノ酸配列突然変異体は、適当なヌクレオチド変化をDNA中に導入するかまたは所望のポリペプチドの *in vitro* 合成により調製することができる。かかる突然変異体は、例えば、アミノ酸配列内の残基の欠失、挿入または置換が挙げられる。最終タンパク質産物が所望の特性を有する限り、欠失、挿入または置換の組合せを生成させて最終構築物に到達することができる。

10

【0094】

アミノ酸配列突然変異体を設計する上で、突然変異部位の位置と突然変異の性質は改変する特性に依存する。突然変異部位は、個々にまたは順次、例えば、(1)最初に保存アミノ酸を選択して置換して、次いで得られた結果に基づいてさらなる基を選択して置換すること、(2)標的残基を欠失させること、または、(3)所定の部位に隣接して他の残基を挿入することにより、改変することができる。

20

【0095】

アミノ酸配列欠失は、一般的に、約1~30個の残基、さらに好ましくは約1~10個の残基、そして典型的には約1~5個の連続残基の範囲である。

【0096】

置換突然変異体は、そのポリペプチド分子中の少なくとも1個のアミノ酸残基が除去されてその場所に異なる残基が挿入されている。置換突然変異誘発のための最も重要な部位としては、活性及び/または結合部位として同定された部位が挙げられる。他の重要な部位は、様々な種から得られる特定の残基が同一である部位である。これらの位置は生物学的活性にとって重要でありうる。これらの部位、特に少なくとも3つの他の同一に保存された部位の配列内に該当する部位は、比較的保存された方法で置換されることが好ましい。

30

【0097】

Hammockと共同発明者らは、JHEの二重リシン突然変異体（K29R、K522R）及び触媒セリン突然変異体（S201G）が、JHEを発現する組換えバキュロウイルスの、ヘリオチス・ビレセンス（*Heliothis virescens*）及びトリコプルシア・ニ（*Trichoplusia ni*）の両方を死滅させる能力を増強することを示している（米国特許第5,643,776号）。2個のリシン除去がユビキチン及びリソソーム経路によるJHEタンパク質の特異的分解を阻止するのにおそらく重要であり、触媒セリンの除去は、不活性酵素を産生し、それがJHと結合してそれを隔離することにより致死率を恐らく高めるであろう。Hammockと共同発明者らは、その上さらに、JHE酵素を原形質膜にターゲティングするシグナル配列を除去することにより、JHE

40

を発現する組換えバキュロウイルスの殺虫活性を改良している（米国特許第5,674,485号）。非グリコシル化JHEはその結果、バキュロウイルス感染細胞の細胞質内に蓄積する。類似の突然変異を、配列番号1として示したポリペプチドについて実施することができる。

【表1】

元来の残基	置換例
Ala (A)	val ; leu ; ile
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln ; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn ; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro
His (H)	asn ; gln
Ile (I)	leu ; val ; ala ; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン ; ile ; val ; met ; ala ; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu ; phe
Phe (F)	leu ; val ; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp ; phe
Val (V)	ile ; leu ; met ; phe ala ; ノルロイシン

10

20

30

40

50

## 【0098】

さらに、もし所望であれば、非天然アミノ酸または化学アミノ酸類似体を本発明のポリペプチド中に置換もしくは付加として導入することができる。かかるアミノ酸は、限定されるものでないが、通常のアミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、6-アミノヘキササン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 $\beta$ -アラニン、フルオロ-アミノ酸、 $\alpha$ -メチルアミノ酸などのデザイナー・アミノ酸、C- $\alpha$ -メチルアミノ酸、N- $\alpha$ -メチルアミノ酸、及び一般的なアミノ酸類似体が挙げられる。

## 【0099】

本発明の範囲内に含まれるのはまた、合成の際または合成後に、例えばビオチン化、ベンジル化、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク分解切断、抗体分子もしくは他の細胞リガンドとの連結などにより、様々に修飾された本発明のポリペプチドである。これらの修飾は、本発明のポリペプチドの安定性及び/または生物活性を増加するのに役立つ。

## 【0100】

本発明のポリペプチドは様々な方法で生産することができ、天然タンパク質の生産と回収、組換えタンパク質の生産と回収、及びタンパク質の化学合成が挙げられる。一実施形態においては、単離された本発明のポリペプチドは、ポリペプチドを発現しうる細胞をその

ポリペプチドを産生するのに有効な条件下で培養しさらにそのポリペプチドを回収することにより生産する。培養する好ましい細胞は本発明の組換え細胞である。効果的な培養条件は、限定されるものでないが、タンパク質産生を可能にする有効な培地、バイオリアクター、温度、pH及び酸素条件が挙げられる。有効な培地は、本発明のポリペプチドを産生するために細胞を培養するいずれであってもよい培地を意味する。かかる培地は典型的には、同化可能な炭素、窒素及びリン酸供給源、ならびに適当な塩類、ミネラル、金属及びビタミンなどの他の栄養素を有する水性培地が挙げられる。本発明の細胞は、通常の発酵バイオリアクター、振とうフラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュ、及びペトリ皿中で培養することができる。培養は、組換え細胞に適当な温度、pH及び酸素含量で実施することができる。かかる培養条件は当業者の技術の範囲内である。

10

#### 【0101】

##### ポリヌクレオチド

「単離されたポリヌクレオチド」により、本発明者らは、それがその天然状態で随伴するかまたは連結しているポリヌクレオチド配列から分離されたポリヌクレオチドを意味する。さらに、本明細書において用語「ポリヌクレオチド」は用語「核酸分子」と互換的に使用される。

#### 【0102】

ポリヌクレオチドの%同一性は、GAP (Needleman及びWunsch、1970) 分析 (GCG program) により、ギャップ生成ペナルティ = 5、及びギャップ拡張ペナルティ = 0.3を用いて決定する。問合せ配列は長さが少なくとも45個のヌクレオチドであり、GAP分析は少なくとも45個のヌクレオチドの領域にわたって2つの配列をアラインする。好ましくは、問合せ配列は長さが少なくとも150個のヌクレオチドであり、GAP分析は少なくとも150個のヌクレオチドの領域にわたって2つの配列をアラインする。さらに好ましくは、問合せ配列は長さが少なくとも300個のヌクレオチドであり、GAP分析は少なくとも300個のヌクレオチドの領域にわたって2つの配列をアラインする。

20

#### 【0103】

本発明のポリヌクレオチド配列は、高ストリンジェンシー条件下で配列番号3または配列番号4に示した配列とハイブリダイズすることができる。特に、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、高ストリンジェンシー条件下で配列番号3または配列番号4に示した配列とハイブリダイズすることができる。本明細書で使用される高ストリンジェンシー条件は、次の通りである；(1)洗浄には低イオン強度および高温、例えば0.015M NaCl/0.0015M クエン酸ナトリウム/0.1% NaDodSO<sub>4</sub>、50 を用いる；(2)ハイブリダイゼーションには、ホルムアミドなどの変性剤、例えば、50% (vol/vol)ホルムアミドとともに0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドン、50mMリン酸ナトリウムバッファー pH6.5とともに750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウム、を42 にて用いる；または(3)50%ホルムアミド、5 x SSC (0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH6.8)、0.1% ピロリン酸ナトリウム、5 x デンハルト液 (Denhardt's solution)、超音波処理したサケ精子DNA (50 g/ml)、0.1% SDS及び10% 硫酸デキストランを42 にて用い、次いで0.2 x SSC及び0.1% SDS中で処理する。

30

#### 【0104】

配列番号3もしくは配列番号4またはそれらの部分とハイブリダイズしうるポリヌクレオチドは、ヌクレオチド残基の欠失、挿入、または置換である1以上の突然変異を有していてもよい。突然変異体は、天然 (すなわち天然供給源から単離された) または合成 (例えば、その核酸に位置指定突然変異誘発を施すことによって得られた) のいずれであってもよい。従って、本発明のポリヌクレオチドは天然または組換え体のいずれであってもよいことは明らかである。

40

#### 【0105】

本発明のオリゴヌクレオチドは、RNA、DNA、またはそのいずれかの誘導體であってもよい。かかるオリゴヌクレオチドの最小サイズは、オリゴヌクレオチドと本発明の核酸分子上の相補配列との間で安定なハイブリッドを形成するのに必要とされるサイズである。本発

50

明は、例えば、核酸分子を同定するためのプローブ、核酸分子を産生するためのプライマー、または幼若ホルモンエステラーゼタンパク質産生もしくは活性を抑制するための節足動物制御剤として利用することができるオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンス、3本鎖形成、リボザイム及び/またはRNA薬に基づく試薬）を含む。プローブとして利用される本発明のオリゴヌクレオチドは、典型的には、放射性同位体、酵素、ビオチン、蛍光分子または化学発光分子などの標識が結合されている。

【0106】

#### 触媒核酸

用語「触媒核酸」は、個別の基質を特異的に認識してこの基質の化学的改変を触媒するDNA分子もしくはDNAを含有する分子（当技術分野では「デオキシリボザイム」とも呼ぶ）またはRNAもしくはRNAを含有する分子（当技術分野では「リボザイム」とも呼ぶ）を意味する。触媒核酸の核酸塩基はA、C、G、T及びU、ならびにその誘導体でありうる。これらの塩基の誘導体は当技術分野では周知である。

10

【0107】

典型的には、触媒核酸は標的核酸を特異的に認識するためのアンチセンス配列、及び核酸切断酵素活性（本明細書では「触媒ドメイン」とも呼ぶ）を含有する。本発明において特に有用なリボザイムの型はハンマーヘッドリボザイム（Haseloff及びGerlach、1988；Perlemanら、1992）及びヘアピンリボザイム（Shippyら、1999）である。

【0108】

本発明のリボザイム及びそのリボザイムをコードするDNAは、当技術分野で周知の方法を用いて化学合成することができる。リボザイムはまた、RNAポリメラーゼプロモーター、例えば、T7 RNAポリメラーゼもしくはSP6 RNAポリメラーゼのプロモーターと機能しうる形で連結されたDNA分子（転写されると、RNA分子を生じる）から調製することができる。従って、本発明により提供されるのは、本発明のリボザイムをコードする核酸分子、すなわちDNAまたはcDNAでもある。ベクターがDNA分子と機能しうる形で連結されたRNAポリメラーゼプロモーターも含有する場合、リボザイムを、RNAポリメラーゼとヌクレオチドとのin vitroインキュベーションにより生成することができる。別の実施形態においては、DNAを発現カセットまたは転写カセット中に挿入することができる。合成後、RNA分子を、リボザイムを安定化する能力を有するDNA分子とのライゲーションにより改変してリボヌクレアーゼ（RNase）に対して耐性を与えることができる。あるいは、リボザイムを、リボソーム送達系で利用するためにホスホチオ類似体に改変することができる。この改変はリボザイムにエンドヌクレアーゼ活性に対する耐性も与える。

20

30

【0109】

#### dsRNA

dsRNAは、特定のタンパク質の産生を特異的に抑制するために特に有用である。理論によって限定されることは望まないが、Dougherty及びParks（1995）は、dsRNAを用いてタンパク質産生を抑制することができる機構のモデルを提供している。このモデルは最近、Waterhouseら（1998）により改変されかつ拡張されている。この技術は目的の遺伝子のmRNA、この場合は本発明の第1、第2または第3の態様によるポリペプチドをコードするmRNA、と本質的に同一である配列を含有するdsRNA分子の存在に依存するものである。好都合なのは、組換えベクターまたは宿主細胞において、dsRNAが、センス配列とアンチセンス配列が無関係な配列とフランキングしている単一のオープンリーディングフレームとして生成させることができることであり、これによりセンス配列とアンチセンス配列がハイブリダイズして、ループ構造を形成する無関係な配列を有したdsRNA分子を形成することができる。本発明に適切なdsRNA分子の設計及び産生は、特にDougherty及びParks（1995）、Waterhouseら（1998）、WO 99/32619、WO 99/53050、WO 99/49029、及びWO 01/34815を考慮すれば、十分、当業者の実施可能な範囲内である。

40

【0110】

#### 組換えベクター

本発明の一実施形態は、核酸分子を宿主細胞中に送達することができる任意のベクター中

50

に挿入された、少なくとも1個の単離された本発明の核酸分子を含む組換えベクターが挙げられる。かかるベクターは、異種核酸配列、すなわち自然に本発明の核酸分子と隣接して見出されることはなく、かつ好ましくは本発明の核酸分子が誘導された種以外の種から誘導された核酸配列、を含有する。ベクターはRNAまたはDNAのいずれであってもよく、原核生物または真核生物のいずれのものであってもよく、典型的にはウイルスまたはプラスミドである。

#### 【0111】

組換えベクターの1つのタイプとしては、発現ベクターと機能しうる形で連結された本発明の核酸分子を含む。「機能しうる形で連結された」との表現は、宿主細胞中に形質転換された場合に核酸分子が発現されうる様式での核酸分子の発現ベクター中への挿入を意味する。本明細書で使用される発現ベクターは、宿主細胞を形質転換しかつ所与の核酸分子を発現することができるDNAまたはRNAベクターである。好ましくは、発現ベクターはまた、宿主細胞内で複製することもできる。発現ベクターは原核生物または真核生物のいずれのものであってもよく、典型的にはウイルスまたはプラスミドである。本発明の発現ベクターは、細菌、真菌、内部寄生虫、節足動物、その他の動物、及び植物の細胞を含む本発明の組換え細胞内で機能する（すなわち、遺伝子発現を指令する）、全てのベクターを包含する。本発明の好ましい発現ベクターは、細菌、酵母、節足動物及び哺乳類の細胞内でそしてさらに好ましくは本明細書に開示した細胞型において、遺伝子発現を指令することができる。

10

#### 【0112】

特に、本発明の発現ベクターは、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点などの調節配列、及び組換え細胞と適合しかつ本発明の核酸分子の発現を制御するその他の調節配列を含有する。特に、本発明の組換え分子は転写制御配列を含む。転写制御配列は、転写の開始、伸長及び終結を制御する配列である。特に、重要な転写制御配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーター及びリプレッサー配列などの転写開始を制御する配列である。好適な転写制御配列は本発明の少なくとも1つの組換え細胞内で機能しうる全ての転写制御配列を包含する。当業者には様々なかかる転写制御配列は周知である。好ましい転写制御配列は、細菌、酵母、節足動物及び哺乳類の細胞で機能する転写制御配列、例えば、限定されるものでないが、*tac*、*lac*、*trp*、*trc*、*oxy-pro*、*omp/lpp*、*rrnB*、バクテリオファージ、バクテリオファージT7、T71ac、バクテリオファージT3、バクテリオファージSP6、バクテリオファージSP01、メタロチオネイン、 $\lambda$ -接合因子、ピチア (*Pichia*) アルコールオキシダーゼ、ウイルスサブゲノムプロモーター（シンドビスウイルス (*Sindbis virus*) サブゲノムプロモーターなど）、抗生物質耐性遺伝子、バキュロウイルス、ヘリオチス・ゼア (*Heliothis zea*) 昆虫ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、ラクーンボックスウイルス (*raccoon poxvirus*)、他のボックスウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス（中初期プロモーター (*intermediate early promotor*) など）、サルウイルス40、レトロウイルス、アクチン、レトロウイルス長末端反復配列、ラウス肉腫ウイルス、熱ショック、リン酸及び硝酸塩転写制御配列ならびに原核生物細胞もしくは真核生物細胞の遺伝子発現を制御することができる他の配列、を包含する。さらなる好適な転写制御配列は、組織特異的プロモーター及びエンハンサーならびにリンホカイン誘導プロモーター（例えば、インターフェロンもしくはインターロイキンにより誘導しうるプロモーター）が挙げられる。本発明の転写制御配列はまた、節足動物に天然に随伴する天然の転写制御配列も包含する。

20

30

40

#### 【0113】

本発明の組換え分子はまた、(a)発現された本発明のポリペプチドがそのポリペプチドを産生する細胞から分泌されるようにする分泌シグナル（すなわち、シグナルセグメント核酸配列）を含有してもよいし、及び/または(b)本発明の核酸分子を融合タンパク質として発現させる融合配列を含有してもよい。適当なシグナルセグメントの例は、本発明のタンパク質の分泌を指令することができるいずれかのシグナルセグメントが挙げられる。好ましいシグナルセグメントは、限定されるものでないが、組織プラスミノゲンアクチベーター

50

ター (t-PA)、インターフェロン、インターロイキン、成長ホルモン、組織適合性及びウイルスエンベロープ糖タンパク質シグナルセグメント、ならびに天然シグナル配列が挙げられる。融合セグメント核酸によりコードされた好適な融合セグメントを本明細書に開示した。さらに、本発明の核酸分子を、ユビキチン融合セグメントなどの、コードされたタンパク質をプロテオソームに連結させる融合セグメントと接合することができる。組換え分子はまた、本発明の核酸分子の核酸配列周辺及び/または核酸配列内の介在配列及び/または非翻訳配列を含んでもよい。

#### 【0114】

既知の節足動物に特異的なウイルス系を用いて、本発明の分子を送達することができる。これらは、バキュロウイルスなどの大きなDNAウイルスから小さいRNAウイルスまで様々でありうる。野生型ウイルスは一般的に節足動物により摂取される。ウイルス表面のタンパク質は節足動物の消化管の細胞に結合してウイルス内容物の細胞中への侵入を引き起こす。次いで、ウイルスの核酸は2つの仕事を果たす。第1に、ウイルスの核酸は、元来のウイルスと同一でありさらに多くのウイルスを構築するのに必要であるウイルスタンパク質をコードしており、さらに第2には、新しいウイルス中への組込みのためにその核酸のさらなるコピーを産生する。ウイルスを目的のタンパク質を産生するベクターとして改変する場合に、何らかの追加の核酸をウイルス核酸中に挿入し、その際ウイルスの元来の核酸の一部と置換してもよいまたは置き換えなくてもよい。毒素をコードする核酸を挿入する部位は、ウイルス感染した細胞内でその核酸が(もし必要であれば)転写されかつ所要のタンパク質に翻訳されうることを保証するように選択する。タンパク質を豊富に発現するには、核酸中の適当なプロモーター部位などの他の改変を必要とすることがありうる。一般的に、改変したウイルスが標的節足動物の多数の細胞に感染し、これらの全ての細胞内でタンパク質が豊富に発現することが意図される。一般的にはまた、該タンパク質の発現が節足動物に対するウイルス感染の有害な効果を加速させるかまたは増強することも意図される。JHE発現の場合、ウイルスに感染した節足動物はウイルス感染と内分泌破壊との両方を受けて死に至るに違いない。かかるウイルスを、作物植物(または節足動物の攻撃から保護することを所望する他の物質)上にスプレーするかまたは撒布し、節足動物が作物を食し始めると節足動物により摂取されるように製剤化することができる。

#### 【0115】

ウイルスから誘導されるベクター系も知られている。一例は、カプソイド系(Hanzlikら、1999; WO 97/46666)である。カプソイド系は小RNAウイルスに基づくが、節足動物の細胞内で複製しない点がウイルスと異なる。小RNAウイルスは、1もしくは数個のRNA分子と、それが結合する、そのRNAがコードするカプシドタンパク質とからなる。カプシドタンパク質の分子は、RNAを封入して保護する規則正しい幾何学構造に組み立てられる。前記タンパク質はまた、節足動物の消化管の細胞と結合する機能を与え、ウイルスRNAを消化管細胞へ侵入させる。細胞内で、RNAのさらなるコピーが作られ、これらが発現されてさらに多くのウイルスタンパク質を作る。RNAとタンパク質は新しいウイルス粒子をアセンブルして、他の細胞と節足動物に感染することができる。カプソイド系は、タンパク質を節足動物腸細胞へ送達する野生型ウイルスの一部の機能を利用するものだが、ウイルス感染を持続するために要する全機能を有するものではない。カプソイド系はまた、他の場所で生産されて作物にスプレーされる必要があるというより、むしろトランスジェニック植物により生産されるようにするという特徴を有する。植物は、植物がカプシドタンパク質を生産するようにする遺伝子によって形質転換される。トランスジェニック植物はまた、ウイルス様粒子を産生するカプシドタンパク質に関連する必要な配列を含有するRNA分子も生産する。節足動物は、植物を食する際に、ウイルス様粒子を摂取する。カプシドタンパク質は節足動物の消化管細胞と結合し、RNAが細胞に侵入する。そのRNAをメッセンジャーRNAと似せるように遺伝子操作して、細胞がそのメッセージをタンパク質に翻訳するようにしてもよい。

#### 【0116】

カプソイド系の一変形は、目的のタンパク質とカプシドタンパク質を単一遺伝子からの融

10

20

30

40

50

合産物として発現するトランスジェニック植物である。送達されるのは、対応するRNAではなくタンパク質である。JHEなどの非保護タンパク質を節足動物に単純に給餌することは、タンパク質が通常の消化管処理により恐らく消化されることから、恐らく有効ではない。カプシドタンパク質ドメインはウイルス様構造に組み立てられ、毒素タンパク質ドメインをウイルス様構造のルーメン内での消化から保護される。毒素タンパク質は、カプシドドメインが消化管細胞と結合した後にのみ曝される。ウイルス様構造と標的細胞膜との融合により、毒素ドメインは腸内消化から保護されたまま残った細胞の側に提示される。カプソイドの摂取により、腸を内張りする多数の細胞が活性JHEを含有するようになり、この活性JHEは上記のようにJH減弱に作用することが期待される。

【0117】

10

#### 宿主細胞

他の本発明の実施形態は、1以上の本発明の組換え分子を用いて形質転換された宿主細胞を含む組換え細胞が挙げられる。細胞への核酸分子の形質転換は、核酸分子を細胞中に挿入しうるいずれの方法により達成してもよい。形質転換技術は、限定されるものでないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、及びプロトプラスト融合が挙げられる。組換え細胞は単細胞のままでもよいしまたは組織、器官もしくは多細胞生物に成長させてもよい。形質転換された本発明の核酸分子は染色体外に残ってもよいし、または形質転換された(すなわち、組換え)細胞の染色体内の1以上の部位に、それらの発現される能力が保持される様式で組み込まれてもよい。

20

【0118】

形質転換するのに好適な宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドを用いて形質転換することができるいずれの細胞であってもよい。宿主細胞は、形質転換されてない細胞または少なくとも1つの核酸分子(例えば、1以上の本発明のタンパク質をコードする核酸分子)を用いて既に形質転換された細胞のいずれであってもよい。本発明の宿主細胞は、内因的に(すなわち、天然に)本発明のタンパク質を生産することができるものでもよいし、または少なくとも1つの本発明の核酸分子を用いて形質転換された後にかかるタンパク質を生産することができるものでもよい。本発明の宿主細胞は、少なくとも1つの本発明のタンパク質を生産することができるいずれの細胞であってもよく、細菌、真菌(酵母を含む)、寄生虫、他の節足動物、他の動物及び植物の細胞が含まれる。好ましい宿主細胞は、細菌、ミコバクテリア、酵母、節足動物及び哺乳類の細胞が挙げられる。さらに好ましい宿主細胞は、サルモネラ属(*Salmonella*)、エシエリキア属(*Escherichia*)、バチルス属(*Bacillus*)、リステリア属(*Listeria*)、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)、スポドプテラ属(*Spodoptera*)、ミコバクテリア属(*Mycobacteria*)、トリコプルシア属(*Trichoplusia*)、BHK(ベビーハムスター腎)細胞、MDCK細胞(イヌヘルペスウイルス培養用の正常イヌ腎細胞系)、CRFK細胞s(ネコヘルペスウイルス培養用の正常ネコ腎細胞系)、CV-1細胞(例えば、ラクーンポックスウイルスを培養するために用いるアフリカモンキー腎細胞系)、COS(例えば、COS-7)細胞、及びVero細胞が挙げられる。特に好ましい宿主細胞は、*E. coli* K-12誘導体を含む大腸菌(*E. coli*)；チフス菌(*Salmonella typhi*)；弱毒株を含むネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)；スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)菌；トリコプルシア・ニ(*Trichoplusia ni*)菌；BHK細胞；MDCK細胞s；CRFK細胞；CV-1細胞；COS細胞；Vero細胞；及び非腫瘍形成マウス筋芽細胞G8細胞(例えば、ATCC CRL 1246)である。さらなる適当な哺乳類細胞宿主は、他の腎細胞系、他の繊維芽細胞系(例えば、ヒト、マウスまたはニワトリ胚繊維芽細胞系)、骨髄腫細胞系、チャイニーズハムスター卵巣細胞、マウスNIH/3T3細胞、LMTK細胞及び/またはHeLa細胞が挙げられる。

30

40

【0119】

組換えDNA技術を使用して、形質転換されたポリペプチド分子の発現を遺伝子操作により改善することができ、例えば、宿主細胞内のポリペプチド分子のコピー数、これらのポリペプチド分子が転写される効率、得られる転写物が翻訳される効率、及び翻訳後修飾の効

50

率を改善することができる。本発明のポリペプチド分子の発現を増加するのに有用な組換え技術は、限定されるものでないが、ポリペプチド分子を高コピー数プラスミドに機能しうる形で連結すること、ポリペプチド分子の1以上の宿主細胞染色体への組み込み、ベクター安定配列のプラスミドへの付加、転写制御シグナル（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）の置換または改変、翻訳制御シグナル（例えば、リボソーム結合部位、シャイン・ダルガーノ配列）の置換または改変、宿主細胞のコドン使用に対応するように本発明のポリペプチド分子を改変すること、及び転写物を不安定化する配列の欠失が挙げられる。発現される本発明の組換えタンパク質の活性は、かかるタンパク質をコードするポリペプチド分子を断片化、改変、または誘導体化することにより改良することができる。

10

【0120】

#### トランスジェニック植物

用語「植物」は、植物全体、植物器官（例えば、葉、茎、根その他）、種子、植物細胞などを意味する。本発明の実施において利用を意図する植物は単子葉植物と双子葉植物の両方を含む。双子葉植物の例としては、ワタ、トウモロコシ、トマト、タバコ、ジャガイモ、マメ、ダイズなどが挙げられる。

【0121】

本発明の文脈で定義したトランスジェニック植物としては、所望の植物もしくは植物器官において本発明の少なくとも1つのタンパク質の生産を生じるかまたは増強するように、組換えDNA技術を用いて遺伝的に改変されている植物（ならびに前記植物の部分及び細胞）及びそれらの子孫が挙げられる。

20

【0122】

本発明のポリペプチドは、トランスジェニック植物において発生の全段階にわたって構成的に発現しうる。植物もしくは植物器官の利用に依存して、タンパク質を段階特異的な方法で発現してもよい。さらにその利用に依存して、タンパク質を組織特異的に発現してもよい。

【0123】

植物種の選択は、意図する植物またはその部分の利用及び形質転換に対する植物種の受け入れ能力により決定する。

【0124】

植物中で目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現が起こることが知られるかまたは見出されている調節配列は、本発明に利用することができる。利用する調節配列の選択は、目的の標的作物及び/または標的器官に依存する。かかる調節配列は、植物もしくは植物ウイルスから取得するかまたは化学合成することができる。当業者はかかる調節配列を周知している。

30

【0125】

ターミネーター配列及びポリアデニル化シグナルなどの他の調節配列は、植物においてかかる機能を果たすいずれの配列も含み、その選択は、当業者には明白であろう。かかる配列の一例は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のノバリンシンターゼ (nos) 遺伝子の3'フランキング領域である。

40

【0126】

目的のタンパク質をコードするDNA配列を含有する発現構築物を標的植物中に導入するには、複数の技術を利用することができる。かかる技術としては、限定されるものでないが、カルシウム/ポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション及びマイクロインジェクションまたは（コーティングされた）粒子ボンバードメントを用いるプロトプラストの形質転換が挙げられる。これらのいわゆる直接DNA形質転換法に加えて、ウイルス及び細菌ベクター（例えば、アグロバクテリウム属由来）などのベクターに関わる形質転換系が広く利用できる。選択及び/またはスクリーニングの後、形質転換されているプロトプラスト、細胞または植物部分を、当技術分野で公知の方法を利用して植物全体に再生することができる。形質転換及び/または再生技術の選択は、本発明にとって決定的ではない

50

。

【0127】

トランスジェニック非ヒト動物

トランスジェニック動物を生産する技術は当技術分野で周知である。この主題についての有用な一般的教科書は、Houdebineの「トランスジェニック動物 作製と用途 (Transgenic animals - Generation and Use)」(Harwood Academic、1997)である。

【0128】

異種DNAを、例えば受精した哺乳類卵中に導入してもよい。例えば、全能性または多能性幹細胞を、マイクロインジェクション、リン酸カルシウムを介する沈降、リボソーム融合、レトロウイルス感染または他の手段により形質転換することができ、次いで形質転換した細胞を胚中に導入し、そして次いでその胚をトランスジェニック動物に発生させる。非常に好ましい方法では、発生胚を所望のDNAを含有するレトロウイルスを用いて感染し、感染胚からトランスジェニック動物を生産する。しかし、最も好ましい方法では、適当なDNAを、好ましくは単細胞段階の、胚の前核または細胞質中に同時注入し、そして胚を成熟トランスジェニック動物に発生させる。

10

【0129】

トランスジェニック動物を生産するために利用する他の方法は、標準の方法により前核段階卵に核酸をマイクロインジェクションすることを含む。注入された卵は、次いで培養した後、偽妊娠受給者の卵管中に移す。

【0130】

トランスジェニック動物はまた、核導入技術により生産してもよい。この方法を利用すると、ドナー動物由来の繊維芽細胞を、レギュレーターの制御下で目的の結合ドメインまたは結合パートナーのコード配列を組み込んでいるプラスミドを用いて、安定してトランスフェクトする。次いで、安定なトランスフェクタントを除核卵細胞と融合し、培養し、そして雌性受給者中に移す。

20

【0131】

組成物及び農業上許容される担体

本明細書に使用される「節足動物制御組成物」は、本発明の節足動物制御剤を含んでなる製剤であり、該組成物を節足動物に曝すとJHエステラーゼ活性が破壊される。

【0132】

農業上好適な及び/または環境上許容される節足動物制御用の組成物は当技術分野で知られている。植物及び/または動物の節足動物害虫の制御に用いる農業組成物は、農業上の利用、特に圃場における分散に適していなければならない。同様に、節足動物害虫の制御用組成物は、好ましくは環境上許容されるものである。農業組成物は、適当な固形または、さらに好ましくは、液状担体に加えて、粘着及び接着剤、乳化及び湿潤剤を含んでもよいが、節足動物摂食またはいずれかの節足動物制御剤機能を阻止する成分を含んではならない。節足動物制御剤を紫外線不活化から保護する成分または昆虫病原体の効力及び/または毒性を増加するアジュバントの役割を果たす成分を加えることも所望されうる。節足動物害虫制御用の農業組成物はまた、節足動物摂食を刺激する作用剤を含んでもよい。

30

【0133】

一実施形態においては、本発明の組成物は、外寄生を予防する目的でかかる組成物を投与することにより植物または動物を節足動物外寄生から保護するために使用することができる。かかる投与は経口(動物の場合)であっても、または環境への適用(例えば、噴霧)によってもよい。他の実施形態においては、ヒツジキンバエ(L. cuprina)などの節足動物が、本発明の組成物を投与しておいた宿主動物の血中に存在する組成物またはその産物を摂取してもよい。

40

【0134】

本発明の組成物はまた、賦形剤を含む。本明細書では、賦形剤はまた、「農業上許容される担体」とも呼ばれる。賦形剤は、処理される動物、植物または環境が耐え得るいずれの物質であってもよい。かかる賦形剤の例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキ

50

ストロース溶液、ハンク溶液 (Hank's solution)、及び他の生理学的な平衡塩類水溶液が挙げられる。また固定油、ゴマ油、オレイン酸エチル、またはトリグリセリドなどの非水性ビヒクルを使用してもよい。他の有用な製剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの増粘剤を含有する懸濁液が挙げられる。賦形剤はまた、等張性及び化学安定性を増強する物質などの少量の添加剤を含有してもよい。バッファの例としては、リン酸バッファ、重炭酸バッファ及びトリス (Tris) バッファが挙げられるのに対して、保存剤の例としては、チメロサルまたはオクレゾール、ホルマリン及びベンジルアルコールが挙げられる。標準製剤は、注射可能な液体または注射用懸濁液もしくは溶液として好適な液中に取り込みうる固体のいずれかであってもよい。従って、非液状製剤においては、賦形剤は、デキストロース、ヒト血清アルブミン、イヌ血清アルブミン、ネコ血清アルブミン、保存剤などを含んでもよく、これに無菌の水または生理食塩水を加えた後に投与してもよい。

10

## 【0135】

本発明の一実施形態においては、組成物は担体を含んでもよい。担体としては、処理された動物、植物または環境における組成物の半減期を増加する化合物が挙げられる。好適な担体としては、限定されるものでないが、ポリマーの制御放出ビヒクル、生物分解性移植片、リボソーム、細菌、ウイルス、他の細胞、油、エステル及びグリコールが挙げられる。

## 【0136】

本発明の一実施形態は、本発明の組成物を動物、植物または環境中に徐々に放出することができる制御放出製剤である。本明細書に使用される、制御放出製剤は、制御放出ビヒクル中に本発明の組成物を含んでなる。好適な制御放出ビヒクルとしては、限定されるものでないが、生体適合性ポリマー、他のポリマーマトリックス、カプセル、マイクロカプセル、微粒子、ポーラス調製物、浸透圧ポンプ、拡散デバイス、リボソーム、リボスフェア、及び経皮送達系が挙げられる。他の本発明の制御放出製剤としては、投与すると固体またはゲルを *in situ* 形成する液体が挙げられる。好ましい制御放出製剤は生物分解性 (すなわち、生物可蝕性 (bioerodible)) である。

20

## 【0137】

好ましい本発明の制御放出製剤は、本発明の組成物を、例えば環境、または動物の血液中に一定速度で十分放出して、節足動物外寄生に対して保護するのに有効な組成物の用量レベルを達成することができる。組成物は好ましくは、約1~約12ヶ月の期間にわたって放出される。好ましい本発明の制御放出製剤は、好ましくは少なくとも約1ヶ月、さらに好ましくは少なくとも約3ヶ月、なおさらに好ましくは少なくとも約6ヶ月、それよりなおさらに好ましくは少なくとも約9ヶ月、そしてそれよりなおさらに好ましくは少なくとも約12ヶ月の間、処置の効果を与えることができる。

30

## 【0138】

節足動物害虫を制御する有効な組成物を生産するために要求されるであろう節足動物制御剤の濃度は、生物のタイプ及び組成物の製剤に依存しうる。組成物内の節足動物制御剤の有効濃度は、当業者は理解しうるように、実験的に容易に決定することができる。例えば、ウイルスの有効濃度は、当技術分野で公知の技術を用いて容易に決定することができる。

40

## 【0139】

本発明の組成物を動物に有効な方法で投与するための許容されるプロトコルは、個々の用量サイズ、用量数、用量投与の頻度、及び投与様式を含む。当業者はかかるプロトコルの決定を実施することができる。好適な単一用量は、1回以上好適な期間にわたり投与すると、動物を節足動物の外寄生から保護できる用量である。例えば、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは節足動物制御剤を含んでなる好ましい組成物の単一用量は、動物体重1キログラム当たり、前記組成物の約1マイクログラム~約10ミリグラムである。最初の投与後約2週間~数年間、ブースターを投与してもよい。好ましい投与スケジュールは、動物の体重1キログラム当たり組成物の約10 $\mu$ g~約1mgを、約2週間~約12ヶ月の期間

50

にわたり、約1~約2回投与するスケジュールである。投与様式としては、限定されるものでないが、皮下、皮内、静脈内、鼻腔内、口内、経皮、眼内、及び筋肉内経路が挙げられる。

【0140】

#### キット

本発明はまた、節足動物のエステラーゼ活性を抑制できる化合物を同定する試験キットも含む。かかる試験キットは、エステラーゼ活性を有する本発明に係るポリペプチド、及び推定抑制化合物の存在下での(すなわち、その効果を受けることによる)エステラーゼ活性の抑制の程度を決定する手段を含む。かかる化合物はまた、宿主動物、植物または環境において実質的に無毒であるものを同定するために、スクリーニングすることもできる。

10

【実施例】

【0141】

#### 実施例：

##### 実施例1 キイロシヨウジョウバエ (*D. melanogaster*) JHEの精製

#### 方法

キイロシヨウジョウバエ (*D. melanogaster*) 株12I11.2を、蛹殻形成後 $12 \pm 6$ 時間に採集して $-70^\circ\text{C}$ で保存した。

【0142】

キイロシヨウジョウバエ (*D. melanogaster*) の100gを、氷上で10mM KOH/酢酸バッファー、pH4.5の500ml及びフェニルチオウレアの数ミリグラムとともに、ソルボール (Sorvall) プレンダー内でホモジナイズした。ホモジネートを、13,000gで、4分、20分間の遠心分離により清澄化し、次いでグラスウールを通して濾過した。この溶液のpHを、10%グリセロールを含有する100mMリン酸ナトリウムバッファー、pH7.0の等容積を加えて上昇させた。

20

【0143】

固体硫酸アンモニウムを適量に加えて30~60%硫酸アンモニウムカットを作り、得られるペレットを、10%グリセロールを含有する100mMリン酸ナトリウムバッファー、pH7.0に再懸濁して最終容積52mlとした。

【0144】

氷/水スラリー内で激しく攪拌しながら、アセトン(0%)を再懸濁した硫酸アンモニウムペレットに徐々に加え、最終濃度40%(v/v)にした。次いで溶液を、9000gにて15分間、0%で遠心分離した。上清を一夜、4%にて10%グリセロールを含有する10mMイミダゾール/HClバッファー、pH7.0の3lに対して透析した。透析チューブ中のこの物質をアクアシド(aquacide) III (Calbiochem 17852)を用いて50ml未満に濃縮し、過剰の水を除去した。

30

【0145】

アセトン上清の等電点電気泳動(IEF)を、ロトフォー (Rotofor) 装置 (Biorad) を用いて実施した。両性電解質 (Pharmalyte pH5-6, Pharmacia) と10%グリセロールの3mlをアセトン上清に加えて、全容積を50ml、ロトフォー泳動チャンバー (focusing chamber) の容積とした。不凍液を $-8^\circ\text{C}$ で装置を通して循環し、泳動チャンバーの温度をほぼ $2^\circ\text{C}$ とした。サンプルを12wで4時間泳動し、その間、電圧を300から880vへ上昇した。20個の2.5ml画分を採集して、それらのタンパク質含量、pH及びJHE活性を測定した。JHE活性を含有する画分 (pH5.35~6.12) を、泳動チャンバーを満たすのに十分な10%グリセロールとともにロトフォーに戻した。これらをさらに4時間再泳動し、その間、電圧を1600から1900vへ上昇した。次いで画分を採集して上記のようにアッセイした。JHEを含有する画分 (pH5.29~5.56) をプールし、セントリプレップ30 (Centriprep30) 限外濾過デバイス (Amicon) を用いて $0.22 \mu\text{m}$ 膜を通して濾過し、0.5mlに濃縮した。

40

【0146】

前のステップからの濃縮物質を0.1Mイミダゾール/HCl (pH7.0まで)、10%グリセロール、1mMジチオトレイトールを用いて5mlに希釈した。それを、予め同じバッファーを用いて

50

平衡化したファーマシア (Pharmacia) 「Mono Q HR5/5」クロマトグラフィカラムに供給した。カラムをバッファー6mlを用いて洗浄し、イミダゾールバッファー中の0~500mM NaClの20ml直線勾配により0.5ml/分の流速で溶出した。勾配溶出物を1mlの画分で採集した。

#### 【0147】

JHEを含有する「Mono Qカラム」(265~335mM NaCl)からの画分を、セントリコン30 (Centricon 30) 限外濾過デバイス (Amicon) を用いて約100 $\mu$ lに濃縮し、予め上記イミダゾールバッファーの2カラム容積を用いて平衡化したファーマシア (Pharmacia) 「Superose 6」30mlゲル濾過カラムに供給した。カラムをイミダゾールバッファーを用いて0.5ml/分の流速で溶出して1mlの画分を採集した。JHE活性を含有する2画分(ほぼ16.5ml溶出容積)を20 で一夜保存し、次いでSDS-PAGE及び銀染色により純度を評価した。次いでPAGEゲルをPromegaゲル乾燥フィルムのシート間に入れて室温で保存乾燥した。

10

#### 【0148】

JHE活性用の放射測定分配アッセイ (radiometric partition assay) (Hammock及びRoe, 1985) を用いて、JHEの精製をモニターした。分配アッセイは、酵素を鎖標識した<sup>3</sup>H-JHIIIとインキュベートし、それが加水分解されて<sup>3</sup>H-JHIII酸を生じることから成る。反応を有機溶媒を加えて停止すると、有機溶媒はJHIIIを抽出するがJHIII酸産物は水相に残る。液体シンチレーション計数を用いて水相の<sup>3</sup>H量を測定することにより、反応物を定量する。Hammock及びRoe (1985) の方法との唯一の相違は反応容積が半分の100 $\mu$ lであり、0.5mg/ml BSA (Sigma) が含まれかつバッファーは100mMリン酸ナトリウム、pH8.0であったことであった。溶液のタンパク質含量は、Bradford (1976) の方法により、Bioradタンパク質アッセイキットを用い、BSAを標準として測定した。

20

#### 【0149】

##### 結果

最終のゲル濾過クロマトグラフィ分離からの2画分をSDS-PAGEにより分離し、銀染色 (Bio Rad、銀染色キット) してタンパク質を見えるようにした。1つの画分(画分6)は実質的に純粋なJHEを含有したので酵素の $k_{cat}$ を評価するのに用いた(下記参照)のに対して、他の画分(画分7)は他の反応速度論的実験に用いた(実施例2を参照)。画分のアリコート含有するSDS-PAGEゲルをPromegaゲル乾燥フィルムのシート間に入れて乾燥し、JHEを含有するバンドを切除してペプチドマスフィンガープリントをとるまで(実施例3を参照)、室温で保存した。

30

#### 【0150】

##### 実施例2 JHEの反応速度論的分析

##### 方法

本発明者らが報じるJHIIIに対するJHE ( $k_{cat}$ ) の1モル当たり反応速度は、最終分離ステップ直後に、均質であると思われた画分(画分6)を用いて計算した。計算は、SDS-PAGE上の移動度から評価した酵素の分子量(66kDa)、画分6のJHE活性、及び画分6のタンパク質含量を用いた。画分7のアリコートは他の反応速度論的パラメーターを計算するのに用いた。この画分は、JHE活性を有しなかった未同定のタンパク質を含有した。幸いにも定数 $k_M$  及び $k_i$  は活性酵素の絶対量に依存しないので、未同定のタンパク質の存在を無視し得た。

40

#### 【0151】

抑制のタイプと抑制定数 ( $k_i$ ) を、JHの3つの型に対して決定した。アッセイは、<sup>3</sup>H-JHIII濃度を変化させ、可能性のあるインヒビターを複数のアッセイに含ませ、そしてアッセイチューブを2%ポリエチレングリコール (「Carbowax」Compound 4000、Union Carbide) を用いて前処理してJH (及びその類似体) のガラスへの吸着を最小化した点を除くと上記の通りであった。JHI (5、10、及び15 $\mu$ M)、JHB<sub>3</sub> (3、5、及び8 $\mu$ M) またはメチルフルネソアート (MF) (6、12及び18 $\mu$ M) の全ての組合せに対して、<sup>3</sup>H-JHIII加水分解のインヒビターとしてのアッセイを実施した (0.0555、0.0715、0.1、0.1665、0.5 $\mu$ M; 3871cpm/pmol)。JHIIIは1 $\mu$ l エタノールに入れてアッセイ溶液に加えたが、抑制するJHは

50

、MF及びJHIの場合は1 $\mu$ lジメチルスルホキシド、またはJHB<sub>3</sub>の場合はエタノールに入れて加えた。反応はまた、それぞれのJHIII濃度にて溶媒を加えるだけでも実施した。反応は、JHE(画分7を5mg/ml BSA中に1/20希釈した)の3 $\mu$ lを加えて開始した。これらの実験に対するインキュベーション時間は20分間で、その間、最大で基質の20%が消費され、反応速度は直線であった。それぞれの抑制実験はまた、JHEによるJHIIIの加水分解に対する $k_M$ の評価も与えた。それぞれのインヒビターに対して、実験を3回繰返して、3つのデータセットを与えた。抑制のタイプをグラフにより決定した後に、それぞれのデータセットの適当な速度式(この場合は競合抑制)との総括的フィットを、Cleland(1979)の適当なコンピュータプログラムを用いて実施した。次いで、それぞれのデータセットから抑制定数の重み付け平均及び標準誤差を計算した。

10

【0152】

結果

JHIIIは、キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)由来のJHEにより徐々に加水分解される( $k_{cat} = 0.60 \text{sec}^{-1}$ )が、反応に対するミカエリス定数が非常に低い( $K_M = 89 \pm 12 \text{nM}$ )ので、得られる特異性定数(specificity constant)( $k_{CAT}/K_M = 6.8 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ )は非常に高く、理論的拡散律速最高値のほぼ $10^8 \sim 10^9 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ に近づく。

【0153】

JHの3つの自然型(JHI、メチルファルネソアート及びJHB<sub>3</sub>)はそれぞれJHIII加水分解の競合抑制を示し、それらが基質、JHIIIと同じ部位と結合しかつ抑制定数( $k_i$ )はJHEのこれらの化合物に対する結合アフィニティの尺度と解釈しうることを示した。JHIII(89 $\pm$ 12nM)とJHB<sub>3</sub>(1.2 $\pm$ 0.4 $\mu$ M)は、メチルファルネソアート(3.33 $\pm$ 0.36 $\mu$ M)またはJHI(3.34 $\pm$ 0.47 $\mu$ M)より強く結合し、前の2化合物が高等双翅目に見出されるJHの主要形態であることと一致する。しかし、本発明者らは、 $k_i$ を決定するために用いたJHB<sub>3</sub>が4つの可能な立体異性体のラセミ体であったことに注目する。本発明者らは、以下に、自然の立体異性体(6S,7S,10R)の結合アフィニティは3つの非自然異性体より大きいことを示す。従って、6S,7S,10R JHB<sub>3</sub>に対する $k_i$ は1.2 $\mu$ Mより低い。

20

【0154】

JHIII加水分解の抑制を、単一の固定濃度において、ある範囲の自然形態のJH及びJH類似体によっても分析した。この実験は、絶対値よりむしろ相対的結合アフィニティを示した。ほとんど全てのJHIIIまたはJHB<sub>3</sub>の構造からのずれは、JHEとの結合アフィニティの有意な低下を示した(図1)。分子の全体サイズが重要であり、JHIとJHIIにおいて見られるメチルからエチル側鎖への変化などのサイズの小さい増加、またはメチルエステル部分のサイズの増加ですら、結合を低下させる。共役2E,3二重結合及び10R,11エポキシドは両方ともJHEとの結合を促進し、昆虫JHにおいて一般的に存在するこれらの特徴と一致する。さらに、JHEはJHB<sub>3</sub>の自然の6S,7S,10R立体異性体との優先的結合を示す。JHB<sub>3</sub>の高いアフィニティ結合は、このJHの形態が高等双翅目においてのみ見出されているので、恐らく高等双翅目由来のJHEにとってユニークであると思われる。

30

【0155】

実施例3 キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*) JHEのペプチド・マスフィンガープリント

40

方法

JHEバンドを、Promegaゲル乾燥フィルムシートの中に保存しておいた銀染色SDS-PAGEゲルからカットした。2つのJHEバンドを別々に次の通り処理して2つのペプチド・マスフィンガープリントを得た。バンドを10 $\mu$ lの水を用いて再水和し、フィルムを除去した。タンパク質のインゲル(in-gel)消化を、いずれかのシステイン残基の還元とカルバミドメチル化により実施した。ゲル片を、2.8mMジチオトレイトールを含む重炭酸アンモニウム溶液(160 $\mu$ l, 100mM)とともに30分間、60 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。ヨードアセトアミド(10 $\mu$ l, 最終濃度5.9mM)を加えて、反応物をさらに30分間、室温にて暗所で保持した。ゲル片を2回、50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸を用いて洗浄し、真空下で乾燥し、トリプシン(Promega配列決定品質)150ngを含む重炭酸アンモニウム(100mM)10

50

μlを用いて再水和し、一夜、37℃にてインキュベートし、次いで音波処理水浴内で50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸を用いて2回抽出した。それぞれのゲル片に対して、抽出物をプールし、真空遠心分離機内で乾燥し、マトリックス溶液(α-シアノ,4-ヒドロキシ,桂皮酸10 mg/mlを含む50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸)2 μl中に再溶解し、ボイジャー・エリート(Voyager Elite)MALDI-TOF質量分析計(Perseptive Biosystems)のサンプルプレート上で乾燥した。ウシ血清アルブミン(927.4940及び2045.0285)のトリプシン消化物中のペプチドをJHE消化物の近接外側較正に使用した。トリプシン自己分解ペプチド(842.5)及びヒトケラチン由来の複数のペプチドの質量を排除した後、ProFoundソフトウェア(Version 4.8.5, Rockefeller University)を利用して、JHE消化物からの質量表を使ってNCBInrデータベース(29/3/2000、ショウジョウバエ(*Drosophila*)のみ)を検索した。最良の対合配列からの最大及び最小質量を用いて質量スペクトルの内部較正を行い、検索を繰り返して30ppmの質量許容度とした。

10

20

30

40

50

【0156】

結果

トリプシン消化ペプチドを、精製キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)JHEのSDS-PAGEゲルからの2つのJHEバンドから回収した。2つのゲルからのペプチド質量スペクトルは実質的に同一であり、その1つを図2に示す。ただ1つのキイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)(CG8425)由来の予想遺伝子産物だけが、掲げた質量表と密接に対合した( $Z=2.36$ ,  $p<0.05$ )。その遺伝子はカルボキシルエステラーゼ様配列を有することが同定されていたが、その幼若ホルモンエステラーゼとしての機能は同定されていなかった。

【0157】

実施例4 キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)JHE cDNAの単離と配列決定方法

JHE遺伝子のmRNA配列を、cDNA末端の3'及び5'高速増幅(RACE)を用いて決定した。プライマーは、3'と5'-RACEが重複産物、従ってJHE遺伝子の完全cDNA配列を生じうるように選んだ。ポリアデニル化RNAは、ピークJHE活性となるよう上記のように加齢したキイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)前蛹、株12I11.2の全体ホモジネートから単離した(Campbellら、1992)。前蛹ほぼ50mgから、クイックプレップ(QuickPrep)ミクロmRNA精製キット(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて、精製mRNAの3.4 μgを得た。このmRNA(1 μg)を、5'RACEシステム(Gibco BRL)用のテンプレートとして使用した。2つのアンチセンスプライマー(5'-GTT-CTG-ATC-CTT-TAG-GCC-3')(配列番号5)及び(5'-GGC-CAA-AGT-TAC-CAG-ACA-TCA-3')(配列番号6)を、ネステッド(nested)PCR用に、予想キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)cDNA配列CG8425から設計し、GeneWorksにより合成した。5'RACE産物をpGem-T Easyベクター系(Promega)を用いてクローニングし、pUC/M13フォワード及びリバース・ユニバーサルベクタープライマー(Bresatec)を用いて配列決定した。

【0158】

3'RACE用に、第1鎖cDNAを、キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)前蛹mRNA 1 μgから、Promega技術資料No.502に従って、AMV逆転写酵素(Promega)及びポリTアダプタープライマー(5'-GCG-GCC-GCT-TGA-ATT-CCC-ACT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T-3')(配列番号7)0.48 μgを用い、新鮮なDTT(最終濃度20mM)を加えて合成した。cDNAの第2鎖合成及びPCR増幅は、アダプタープライマー(5'-GCG-GCC-GCT-TGA-ATT-CCC-AC-3')(配列番号8)及びCG8425由来のプライマー(5'-GTT-GTC-TAC-GGC-GAT-GAG-3')(配列番号9)の50 pmol、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTPミックス、1X Taq DNAポリメラーゼ反応バッファー及び10u Taq DNAポリメラーゼ(Gibco BRL)ならびに第1鎖cDNA/mRNA混合物の1:20希釈液1 μlを含む全容積50 μlを使用した。次の増幅条件を用いた：最初の変性については94℃にて3分間、続いて94℃にて45秒間、50℃にて1分間、及び72℃にて2分間の40サイクル。最後の伸張条件は、72℃にて7分間とした。第2のPCRのヘミネステッド(hemi-nested)ラウンドは、第1反応混合物(QAIクイックPCR精製キット、Qiagenを用いて精製した)1 μl、

アダプタープライマー及び他のCG8425由来のプライマー（5'-CGC-ACT-ACC-TGT-AAT-GGT-C TA-3'）（配列番号10）のそれぞれ50pmolを用いて実施した。条件と他の試薬は、アニーリングを57℃にて実施したことを除くと、上記の通りであった。ゲル精製産物（QAIクイックPCR精製キット、Qiagen）をpSTBlue-1ベクター（完全プラントクローニングキット、Novagen）中にクローニングし、そして配列決定した。全てのインキュベーション及びPCRサイクリングはGeneAmp PCRシステム9700または2400（PerkinElmer）のいずれかで実施した。配列決定はABI Prism BigDyeターミネーター法（Perkin-Elmer）により実施した。

【0159】

#### 結果

キイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）JHEをコードするオープンリーディングフレーム、及びその翻訳物を図3に示す。単離したキイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）JHE cDNAは、ショウジョウバエ（*Drosophila*）ゲノムプロジェクトの予想産物CG8425（Adamsら、2000）と複数の共通の配列を共有する。cDNAは、第5番目の予想イントロンが除去されていなかった（その代わりに予想プライス部位の直後にインフレーム停止コドンと続いてポリアデニル化シグナルとポリAテイルが存在する）ことを除くと、予想CG8425産物であることを確認する。

【0160】

本発明のJHEに見出されたカルボキシルエステラーゼの保存された特徴としては、Ser213、His471及びGlu346からなる触媒トライアド（catalytic triad）が挙げられる。また、全ての触媒活性セリンエステラーゼの活性部位に見出されて本質的な機能を有すると提案されるさらなるSer（JHEの239）も保存されている。推定オキシアニオンホール（oxyanion hole）残基（Gly132、Gly133及びAla214）が保存され、またジスルフィド結合を形成する一対のCys残基（90と108）、及び塩架橋を形成する残基（Arg67とGlu106、Arg163とAsp185）も保存されている。予想シグナルペプチド（Ala20後に切断）があり、JHEが前蛹の血リンパ中に分泌されることと一致する。

【0161】

キイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）JHEは、鱗翅目ヘリオチス・ヴィレセンス（*Heliothis virescens*）及びコリストニューラ・フミフェラナ（*Choristoneura fumiferana*）（Fengら、1999）由来のJHEの全長配列全体と29%同一性を示す。これは、一般的にカルボキシルエステラーゼ間で見出される同一性の程度よりほんの僅かに大きい。

【0162】

複数の鱗翅目（lepidopterans）及び2種の鞘翅目（coleopterans）からのJHEの全cDNAもしくは部分的cDNAまたはアミノ酸配列は入手可能である（Hanzlikら、1989；Thomasら、2000）が、キイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）またはいずれかの他の双翅目からは入手されていない。本発明のJHEは、少なくとも2つの状況において、*H. virescens*（*H. virescens*）JHEに優先して利用しうる。第1に、本発明のJHEは、異なるJH形態間の異なる結合優先スペクトルの結果として、非鱗翅目の昆虫、特に高等双翅目においてJHを分解するのにより有効でありうる。キイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）JHEは、JHIIIについて鱗翅目JHEと類似の反応速度論を示すが、これはまた、高等双翅目にとって明らかにユニークなJHの形態であるJHB<sub>3</sub>に対しても良い結合アフィニティを示す。キイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）酵素は進化してJHB<sub>3</sub>を効率的に加水分解すると仮定するのは納得できる。第2に、もし本発明のJHEの構造が鱗翅目酵素から十分異なっていてJHEを除去する特定の機構による認識を避けられるのであれば、本発明のJHEは鱗翅目においてさらに有効でありうる。

【0163】

#### 実施例5 JHEのin vitro発現

##### 方法

キイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）からRNAを実施例4に記載の通り単離した。JHE cDNAは、それぞれBamHIおよびXbaI制限酵素部位（下線部）ならびに後者については

10

20

30

40

50

さらに停止コドン（下線部）を含有するオリゴヌクレオチド、JheRTPCR.F2（5' CGCGGATC CGCGATGCTACAACCTGCTGCTTCT 3'）（配列番号11）及びJheRTPCR.R2（5' GCTCTAGAGCTTATT ACTTTTCGTTGAGTATAT 3'）（配列番号12）を用いてRNAから増幅した。JHE cDNAの増幅は、PLATINUM Taqキット（Life Technologies）によるSUPERScript ワンステップRT-PCRを利用した。50  $\mu$ l 反応物は次を含有した（最終濃度）；1 x 反応ミックス、200ngキイロシヨウジヨウバエ（*D. melanogaster*）前蛹RNA、0.2  $\mu$ M JheRTPCR.F2、0.2  $\mu$ M JheRTPCR.R2、1  $\mu$ l RT/PLATINUM Taqミックス。次の増幅サイクルを使用した；50 にて30分間、94 にて2分間、続いて94 にて15秒間、48 にて30秒間、72 にて2分間の35サイクル、仕上げとして72 にて10分間の最終増幅ステップ。

#### 【0164】

BamHIとXbaIで消化したRT-PCR産物をアガロースゲル電気泳動及びQIAクイックPCR精製キット（QIAGEN）により精製し、次いで予めBamHIとXbaIを用いて消化したpFastBacIプラスミドのマルチクローニングサイト中にライゲートした。ライゲーションミックスをTG-1熱ショック細胞中に形質転換し、取扱説明書、BAC-To-BAC バキュロウイルス発現系（Gibco BRL LIFE TECHNOLOGIES）に従って、バクミド（bacmid）DNAを調製し単離した。

10

#### 【0165】

次の改変を加えた取扱説明書、BAC-TO-BACバキュロウイルス発現系（Gibco BRL LIFE TECHNOLOGIES）に従って上記のように調製した組換えDNAを用いて、Sf9細胞をトランスフェクトした。グレース（Grace）の細胞培地をSf-900 II無血清培地に置き換えた。溶液Aは9  $\mu$ l ミニプレップバクミド（mini-prep bacmid）DNA及び41  $\mu$ l 1xHepes緩衝化生理食塩水を含有し、溶液Bは15  $\mu$ l DOTAPトランスフェクション試薬及び35  $\mu$ l 1xHBSを含有した。最初の細胞洗浄後、細胞を、胎児ウシ血清または抗生物質を含まない1.5ml グレース細胞培地を用いて上塗りし、完全トランスフェクション混合物を加えてJHE/pFastBacIウイルス上清（初回継代）を作製し、これをトランスフェクション開始後72時間に収穫した。

20

#### 【0166】

JHE/pFastBacIウイルス上清力価を、グレース細胞培地で増殖したSf9細胞単層培養物において増幅した。25cm<sup>2</sup> フラスコに高集密（ほぼ2x10<sup>6</sup>細胞）で接種し、JHE/pFastBacIウイルス上清（初回継代）の2mlをグレース細胞培地の全3mlに加えて、27 にて72時間インキュベートした。培養物を収穫し、100gにて5分間遠心分離し、JHE/pFastBacIウイルス上清（第2回継代）を取り出した。この上清（1ml）を用いて75cm<sup>2</sup> フラスコを、グレース細胞培地の20ml中で高集密、ほぼ5x10<sup>6</sup>細胞で感染させた。75cm<sup>2</sup> 感染培養を27 にてインキュベートし、72時間後に収穫し、100gにて5分間遠心分離してJHE/pFastBacIウイルス上清（第3継代）から細胞を除去し、そしてこの力価を測定して最終発現培養物を感染するのに使用した。

30

#### 【0167】

JHE遺伝子の発現は、1.5x10<sup>6</sup>細胞/mlの濃度のSf9細胞を含有するHyQ SFX昆虫無血清培地（HyClone）の懸濁培養物10ml中で実施し、JHE/pFastBacIウイルス上清（第3継代）を5pfu/mlの感染多重度にて使用した。対照としてSf9細胞の他のフラスコを、ウイルスがJHE cDNAを用いて改変されていないことを除くと、同一の方法で調製した。懸濁培養物を27 にて振とうしながら72時間インキュベートし、次いで100gにて5分間遠心分離した。上清を-80 にて保存した。両方のフラスコからのペレット化した細胞を、800  $\mu$ lの0.1Mリン酸バッファー、pH8.0、中に1x10<sup>8</sup>細胞/mlの最終細胞密度にて再懸濁し、-80 で保存した。

40

#### 【0168】

再懸濁した細胞ペレット（10  $\mu$ l）及び上清（10  $\mu$ l）のJHE活性を、実施例1に記載したアッセイを用いて測定し、元来の10ml培養物の活性を反映するように調節した。

#### 【0169】

#### 結果

対照培養物（0.34nmol/分/10ml培養物）と比較して、JHE cDNA（15nmol/分/10ml培養物）

50

を発現する培養物においては44倍を上回るJHE活性が見出され、キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) JHE cDNAはJHE活性のあるタンパク質をコードすることを立証した。対照培養物において検出されたJHE活性のほとんどは、上清画分(0.07nmol/分/10ml培養物)よりむしろ細胞(0.27nmol/分/10ml培養物)中に存在した。対照的にJHE cDNAを発現する培養物中のJHE活性のほとんどは、細胞(0.19nmol/分/10ml培養物)よりむしろ上清(14.7nmol/分/10ml培養物)に見出された。これは、キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*) JHEがSf9細胞から分泌されることを示し、実施例4に記載した予想される分泌のシグナルペプチドと一致する。

【0170】

本明細書に含まれる先行技術の文書、議事録、物質、装置、物品などのいずれの考察も本発明の背景を提供する目的のためのものである。これらの事項のいずれもまたは全ては、本出願の各請求項の優先権主張日前に存在したものとして、先行技術基礎の部分を形成したとかまたは本発明に関連する分野の共通の一般知識であったことを示唆するものでもまたは表現するものでもない。

10

【0171】

上記の全ての刊行物は本明細書にそれらの全体が組み入れられる。

【0172】

当業者は、特定の実施形態に示した本発明に対して、広く記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、多数の変法及び/または改変をなしうることを理解するであろう。従って、本発明の実施形態は、全ての点において、説明のためであって制限するものでないと考えなければならない。

20

【0173】

参考文献：

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt R.A.ら, (2000) *Science* 287,2185-2195.
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72,248-254.
- Campbell, P.M., Healy M.J., Oakeshott J.G. (1992) *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22,665-677.
- Campbell, P.M., Oakeshott, J.G.,およびHealy, M.J. (1998) *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28,501-515.
- Cleland, W. W. (1979) *Methods Enzymol.* 63,103-138.
- Cusson. M., Yagi, K.J., Ding, Q., Duve, H., Thorpe, A., McNeil, J.N.およびTobe, S.S. (1991) *Insect Biochem.* 21,1-6.
- Dougherty W.G.およびParks, T.D. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* 7,399-405.
- Dunbrack, R.L, Jr, Gerloff, D.L., Bower, M., Chen, X., Lichtarge, O.およびCohen, F.E. (1997). *Folding and Design*, 2: R27-42.
- Feng, Q.L., Ladd, T.R., Tomkins, B.L., Sundaram, M., Sohi, S.S., Retnakaran, A., Davey, K.G.およびPalli, S.R. (1999) *Mol. Cell. Endocrinol.* 148,95-108.
- Hammock, B.D.およびRoe, R.M. (1985) *Methods Enzymol.* 111, 487-494.
- Hanzlik, T.N., Abdel-Aal, Y.A., Harshman, L.G.およびHammock, B.D. (1989) *J. Biol. Chem.* 264,12419-12425.
- Hanzlik, T.N., Christian, P.およびGordon, K. (1999) *Pesticide Outlook* 10,22-26.
- Haseloff, J.およびGerlach, W.L. (1988) *Nature* 334,585-591.
- Needleman, S.B.およびWunsch, C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48,443-453.
- Perriman, R., Delves, A.およびGerlach, W.L. (1992) *Gene* 113,157-163.
- Richard, D.S., Applebaum, S.W., Sliter, T.J., Baker, F.C., Schooley, D.A., Reuter, C.C., Henrich, V.C.およびGilbert, L.I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1421-1425.
- Riddiford, L.M. (1993) *Receptor* 3: 203-209.
- Schooley, D.A., Baker, F.C., Tsai, L.W., Miller, C.A.およびJamieson, G.C. (1984) 「無脊椎動物ホルモンの生合成、代謝及び作用機序 (Biosynthesis, Metabolism and Mod

30

40

50

e of Action of Invertebrate Hormones)」(Hoffman, J.およびPorchet, M.編)中, pp. 373-383. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Shippy, R., Lockner, R., Farnsworth, M.およびHampel, A. (1999) Mol. Biotech. 12, 117-129.

Thomas, B.A., Hinton, A.C., Moskowitz, H., Severson, T.F.およびHammock, B.D. (2000) Insect Biochem. 30, 529-540.

Waterhouse, P. M., Graham, M.W.およびWang, M.B. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 13959-13964.

【図面の簡単な説明】

【0174】

【図1】幼若ホルモン類似体によるJHIII加水分解の抑制を示す。JH類似体(10 $\mu$ M)を、<sup>3</sup>H-JHIII(56nM)及びJHEと共にインキュベートした。対照インキュベーションはJH類似体を添加しなかった(0%抑制)。抑制が大きいほど、その化合物がJHEとの結合がより強固であることを示す。(A)カルボキシル鎖のサイズが異なるJH類似体、(B)アルコール部分が異なるJH類似体、(C)10,11エポキシドが存在し(JHIIIのように)、二重結合の存在(+ )または不在(-)が異なるJH類似体、(D)10,11エポキシドが不在であり(メチルファルネソート(methyl farnesoate)のように)、二重結合の存在(+ )または不在(-)が異なるJH類似体、(E)6,7及び10,11エポキシド部分が存在または不在であることが異なるJH類似体(ラセミ)、(F)JHB<sub>3</sub>の4つの可能な立体異性体、(G)カルボキシル鎖にヒドロキシル基を運ぶ3つのJH類似体、ならびに比較のために含めたJHIII及びメチルファルネソ

10

20

アート、(H)2つの殺虫剤、ヒドロプレン(hydroprene)及びメトプレン(methoprene)、ならびに比較のために含めたJHB<sub>3</sub>及びJHB<sub>3</sub>-ジエン。

【図2】乾燥した銀染色SDS-PAGEゲルから回収した精製されたキイロショウジョウバエ(D. melanogaster) JHEのトリプシン消化物フィンガープリントを示す。CG8425遺伝子産物から予測される質量に対応するJHEに対するピークを「J」とマークした。トリプシン自己分解によるピークを「T」とマークした。

【図3】JHE cDNA配列ならびにその翻訳を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0175】

配列表のキー：

配列番号1 N末端シグナル配列を欠くキイロショウジョウバエ(D. melanogaster)幼若ホルモンエステラーゼ

配列番号2 キイロショウジョウバエ(D. melanogaster)幼若ホルモンエステラーゼ

配列番号3 キイロショウジョウバエ(D. melanogaster)幼若ホルモンエステラーゼをコードするcDNA

配列番号4 配列番号1に与えられたキイロショウジョウバエ(D. melanogaster)幼若ホルモンエステラーゼをコードするオープンリーディングフレーム

配列番号5及び6 キイロショウジョウバエ(D. melanogaster)cDNA配列に対するPCRプライマー

配列番号7 ポリTアダプタープライマー

配列番号8 3'RACE用のアダプタープライマー

配列番号9及び10 キイロショウジョウバエ(D. melanogaster)cDNA配列に対するPCRプライマー

配列番号11及び12 キイロショウジョウバエ(D. melanogaster)幼若ホルモンエステラーゼをコードするcDNAを増幅するために用いるPCRプライマー

30

40



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/060940 A1(51) International Patent Classification: C07K 14/435, C12N 15/10, A01N 63/00  
Capital Territory 2903 (AU). OAKESHOTT, John, Graham [AU/AU]; 28 Sullivan Crescent, Wannassa, Australian Capital Territory 2903 (AU).

(21) International Application Number: PCT/AU02/00101

(74) Agent: FB RICE &amp; CO; 139 Rathdowne Street, Carlton, Victoria 3053 (AU).

(22) International Filing Date: 1 February 2002 (01.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: PR 2821 1 February 2001 (01.02.2001) AU

(71) Applicant (for all designated States except US): COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION [AU/AU]; Limestone Avenue, Campbell, Australian Capital Territory 2601 (AU).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:  
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/060940 A1

(54) Title: JUVENILE HORMONE ESTERASE

(57) Abstract: The present invention relates to the use of juvenile hormone esterases in the development of strategies for controlling arthropod populations. The methods of identifying arthropod control agents of the present invention are based on the cloning and characterization of a cDNA encoding *Drosophila melanogaster* juvenile hormone esterase.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

1

## JUVENILE HORMONE ESTERASE

**Field of the Invention:**

The present invention generally relates to the use of juvenile hormone esterases in the development of strategies for controlling arthropod populations. In particular, the present invention relates to methods for identifying arthropod control agents which modulate the production and/or activity of juvenile hormone esterase.

10 **Background of the Invention:**

Juvenile hormones (JHs) are one of several important classes of arthropod hormones whose interplay regulates development and reproduction (for a review see Riddiford, 1993). The most well characterised role of JH is in the regulation of the larval-pupal transition through interaction with ecdysone. It also plays roles in various other processes including the regulation of egg production, the development of both male and female gonadotrophic hormones, caste determination and diapause. The JH system is best understood in insects but key aspects of the system may be common to all arthropods (Cusson et al., 1991).

20 The most common form of JH is JHIII (methyl (2E,6E)-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl 2,6-dodecadienoate), which is found in all insect orders so far investigated (Schooley et al., 1984). The lepidopteran and dipteran orders differ from most other insects by having other forms of JH in addition to JHIII. These are similar to JHIII, differing slightly by the substituents on the acid moiety. All are esters of methanol, have a 10(R),11 epoxide group and a 2,3 double bond. The Lepidoptera have JH0, JH1, JHII and 4-methyl JHI forms of JH, while the JHIII bisepoxide (JHB<sub>2</sub>, in which the 6,7 double bond of JHIII is replaced by a 6S,7S epoxide group) has been found only in the higher Diptera (Schooley et al., 1984; Richard et al., 1989). In *Drosophila melanogaster* JHIII is a minor and JHB<sub>2</sub> a major form of juvenile hormone.

The regulation of JH titre is achieved by a balance between synthesis and degradation, although other mechanisms such as sequestration and secretion may also contribute. The two main degradative pathways for JH are hydrolysis of the ester and epoxide groups by JH esterase (JHE) and JH epoxide hydrolase (JHEH), respectively. JH degradation has been studied most extensively in the hemolymph of final instar larval Lepidoptera, in

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

2

which degradation occurs via JHE. Key features of this period are the general occurrence of a pre-wandering peak and a pre-pupation peak of JHE in the hemolymph, which correlate inversely with haemolymph JH titre.

In Diptera, larval JH hydrolysing enzymes are found in the haemolymph and other tissues, and the relative contributions of JHE and JHEH to total activity vary among species. There is a minimum of JH degrading activity late in the final instar, but a high level of soluble, circulating JHE activity occurs soon after the formation of the puparium and before pupation, probably clearing JH from the whole organism. This JHE is retained, though declining in activity, through the pupal stage. In adults lower levels of both JHE and JHEH are found, though with different subcellular distributions, possibly modulating the JH signal in specific tissues or turning off the JH signal after it has reached its site of action.

Juvenoid insecticides have been developed, such as methoprene, hydroxypropranolol and pyriproxyfen, which disrupt JH metabolism. However, there is a need for further agents which can be used to disrupt the JH signaling system.

#### **Summary of the Invention:**

The present inventors have identified a juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. Knowledge of this esterase can be used for designing screening strategies to identify arthropod control agents for disrupting arthropod development and/or reproduction, and hence provide means for controlling arthropod populations.

In one aspect, the present invention provides a method of identifying an arthropod control agent, the method comprising

- exposing a polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1 to a candidate agent, and
- assessing the ability of the candidate agent to modulate the juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.

In one embodiment, the agent inhibits juvenile hormone esterase activity of the polypeptide. In another embodiment, the agent enhances juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.

In one example of the present invention, the polypeptide can be used to hydrolyse an artificial esterase substrate,  $\alpha$ -naphthyl acetate, yielding  $\alpha$ -naphthol which can be detected by a change of absorbance at 235 nm or at

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

3

visible wavelengths after reaction with certain diazo dyes such as Fast Blue BN (Campbell et al., 1998). Candidate agents can be included in such an assay to determine if they are suitable arthropod control agents.

In a particularly preferred embodiment, the arthropod control agent  
5 directly binds the polypeptide.

Preferably, the polypeptide is at least 300 amino acids in length.

Preferably, the juvenile hormone esterase activity is the ability to hydrolyse a juvenile hormone selected from the group consisting of: JH0, JH1, JHII, JHIII and JHB<sub>1</sub>. More preferably, the juvenile hormone esterase activity  
10 is the ability to hydrolyse a juvenile hormone selected from the group consisting of: JHIII and JHB<sub>1</sub>.

In another aspect, the present invention provides a method of identifying an arthropod control agent, the method comprising

a) exposing a polypeptide which is at least 90% identical to SEQ ID  
15 NO:1 to a binding partner which binds the polypeptide, and a candidate agent, and

b) assessing the ability of the candidate agent to compete with the binding partner for binding to the polypeptide.

Preferably, the binding partner is detectably labeled.

20 Preferably, the binding partner is juvenile hormone.

Preferably, the polypeptide has juvenile hormone esterase activity.

*In silico* techniques can also be employed to identify arthropod control agents.

Accordingly, in a further aspect the present invention provides a  
25 method of identifying an arthropod control agent, the method comprising

(a) determining the atomic coordinates defining the three-dimensional structure of a polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1;

(b) selecting a candidate compound by performing rational drug design  
30 with the atomic coordinates obtained in step (a), wherein said selecting is performed in conjunction with computer modeling; and

(c) determining the ability of the candidate compound to modulate the juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.

In another aspect, the present invention provides a crystal of a  
35 polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

4

In yet another aspect, the present invention provides a method of arthropod control agent design comprising using the structural coordinates of a crystal of the present invention to computationally evaluate a compound for its ability to modulate juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.

5 In another aspect, the present invention provides a method of

identifying an arthropod control agent, the method comprising

a) exposing a polynucleotide encoding a polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1, to a candidate agent under conditions which allow expression of the

10 polynucleotide, and

b) assessing the ability of the candidate agent to modulate levels of polypeptide produced by the polynucleotide.

In one embodiment, the agent inhibits production of the polypeptide.

In another aspect, the present invention provides a method of

15 identifying an arthropod control agent, the method comprising

a) exposing a polynucleotide which is at least 90% identical to SEQ ID NO:4 to a candidate agent, and

b) assessing the ability of the candidate agent to hybridize and/or cleave the polynucleotide.

20 The methods of identifying arthropod control agents of the present invention preferably further comprise the step of selecting a candidate compound to be developed as a lead compound. Furthermore, the methods of identifying arthropod control agents of the present invention preferably further comprise formulating the arthropod control agent in an arthropod

25 control composition comprising an agriculturally acceptable carrier.

In another aspect, the present invention provides a substantially purified polypeptide having juvenile hormone esterase activity, the polypeptide being selected from the group consisting of:

(i) a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:1; or

30 (ii) a polypeptide which has a sequence which is at least 90% identical to (i);

wherein the polypeptide is not more than 600 residues in length.

Preferably, the polypeptide has a sequence which is at least 95% identical to (i). More preferably, the polypeptide has a sequence which is at

35 least 99% identical to (i).

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

5

Further, it is preferred that the polypeptide is at least 300 amino acids in length.

In another aspect, the present invention provides a substantially purified polypeptide having juvenile hormone esterase activity, the polypeptide being selected from the group consisting of:

- (i) a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:1; or
  - (ii) a polypeptide which is at least 31% identical to (i); or
- wherein the polypeptide is not more than 600 residues in length.

Preferably, the polypeptide is at least 40% identical to (i), more preferably at least 50% identical, more preferably at least 60% identical, more preferably at least 70% identical, more preferably at least 80% identical, and even more preferably at least 90% identical to (i).

Preferably, the polypeptide is at least 300 amino acids in length.

In another aspect, the invention provides a polynucleotide encoding a polypeptide according to the present invention.

In one embodiment, the polynucleotide has a sequence selected from:

- (i) a sequence of nucleotides shown in SEQ ID NO:3;
- (ii) a sequence of nucleotides shown in SEQ ID NO:4; or
- (iii) a sequence which hybridizes to (i) or (ii) under high stringency

conditions.

Preferably, the polynucleotide has a sequence which is less than 1660 nucleotides. However, the polynucleotide can be less than 1000 or even 500 nucleotides in length. Preferably, the polynucleotides of the present invention are at least 18 nucleotides in length.

In a further aspect, the present invention provides an antisense polynucleotide which hybridizes under high stringency conditions to a polynucleotide of the present invention.

Preferably, antisense polynucleotide comprises a catalytic domain. Accordingly, the antisense polynucleotide can be a catalytic enzyme.

Preferably, the catalytic enzyme is selected from the group consisting of ribozymes and deoxyribozymes.

In another aspect, the present invention provides a double stranded RNA (dsRNA) molecule comprising a polynucleotide according to the present invention.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

6

Preferably, the dsRNA is encoded by a single open reading frame and the resulting dsRNA molecule has a stem loop structure at one end of the molecule.

In yet another aspect, the present invention provides a fusion protein comprising a polypeptide according to the present invention fused to at least one other polypeptide sequence.

Preferably, the at least one other polypeptide is selected from the group consisting of: a polypeptide that enhances the stability of the polypeptide of the present invention, a polypeptide that acts as an immunopotentiator to enhance an immune response to a polypeptide of the present invention, and a polypeptide that assists in the purification of the fusion protein.

In another aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide that encodes a fusion protein of the present invention.

In a further aspect, the present invention provides a vector comprising a polynucleotide according to the present invention.

Preferably, the polynucleotide is operably linked to a promoter.

In a further aspect, the present invention provides a vector comprising an antisense polynucleotide of the present invention.

Preferably, the antisense polynucleotide is operably linked to a promoter.

In a further aspect, the present invention provides a vector comprising an open reading frame(s) which upon expression forms a dsRNA molecule according of the present invention.

Preferably, the dsRNA molecule is operably linked to a promoter.

In a further preferred embodiment, the vector of the present invention is a plasmid or a virus. More preferably, the viral vector is a baculovirus.

In a particularly preferred embodiment, the vector is a capsid.

In another embodiment, the present invention provides a host cell transformed or transfected with the vector according to the present invention.

In one embodiment, the host cell is a bacterial cell. In another embodiment, the host cell is an arthropod cell, more preferably an insect cell.

In another aspect, the present invention provides a transgenic plant, the plant having been transformed with a polynucleotide according to the present invention, wherein the plant expresses the polynucleotide.

In another aspect, the present invention provides a transgenic plant, the plant having been transformed with an antisense polynucleotide

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

7

according to the present invention, wherein the plant expresses the antisense polynucleotide.

In another aspect, the present invention provides a transgenic plant, the plant having been transformed with open reading frame(s) which, upon  
5 expression, form a dsRNA molecule according to the present invention, wherein the plant produces the dsRNA molecule.

Since there are many arthropods which feed off live animals, for instance mosquitoes and the larvae of *Lucilia cuprina*, the present invention provides a non-human animal transformed with the molecules of the  
10 invention.

Accordingly, in another aspect, the present invention provides a transgenic non-human animal, the animal having been transformed with a polynucleotide according to the present invention, wherein the animal expresses the polynucleotide.

15 In another aspect, the present invention provides a transgenic non-human animal, the animal having been transformed with an antisense polynucleotide according to the present invention, wherein the animal expresses the antisense polynucleotide.

In another aspect, the present invention provides a transgenic non-  
20 human animal, the animal having been transformed with open reading frame(s) which, upon expression, form a dsRNA molecule according to the present invention, wherein the animal produces the dsRNA molecule.

In another aspect, the present invention provides an arthropod control composition, the composition comprising an agent identified according to the  
25 present invention, and an agriculturally acceptable carrier.

In another aspect, the present invention provides an arthropod control composition, the composition comprising a polypeptide according to the present invention, and an agriculturally acceptable carrier.

30 In another aspect, the present invention provides an arthropod control composition, the composition comprising a vector according to the present invention, and an agriculturally acceptable carrier.

In another aspect, the present invention provides a method of controlling an arthropod population, the method comprising exposing members of the arthropod population to an arthropod control composition  
35 according to the present invention.

Preferably, the arthropod is an insect.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

8

In another aspect, the present invention provides a process for preparing a polypeptide according to the present invention, the process comprising cultivating a host cell transformed or transfected with a vector encoding a polynucleotide of the present invention under conditions  
5 providing for expression of the polynucleotide encoding the polypeptide, and recovering the expressed polypeptide.

This process can be used for the production of commercially useful quantities of the encoded polypeptide.

In another aspect, the present invention provides a kit for identifying  
10 an arthropod control agent, the kit comprising a polypeptide according to the present invention, and means for determining juvenile hormone esterase activity.

In another aspect, the present invention provides a kit for identifying  
15 an arthropod control agent, the kit comprising a polynucleotide according to the present invention, and means for determining juvenile hormone esterase activity of a polypeptide encoded by the polynucleotide.

In numerous other aspects of the present invention, the polypeptides,  
polynucleotides, antisense polynucleotides, dsRNA molecules, vectors, host  
20 cells and arthropod control agents can be used in a multitude of ways to control arthropod populations.

The terms "comprise", "comprises" and "comprising" as used throughout the specification are intended to refer to the inclusion of a stated component or feature or group of components or features with or without the inclusion of a further component or feature or group of components or features.

25 The invention is hereinafter described by way of the following non-limiting examples and with reference to the accompanying figures.

**Brief Description of the Accompanying Figures:**

**Figure 1.** Inhibition of JHIII hydrolysis by juvenile hormone analogues. JH  
30 analogues (10 $\mu$ M) were incubated with <sup>3</sup>H-JHIII (56 nM) and JHE. Control incubations had no JH analogue addition (0% inhibition). Greater inhibition indicates that the compound binds more tightly to JHE. (A) JH analogues differing in the size of the carboxyl chain, (B) JH analogues differing in the alcohol moiety, (C) JH analogues with the 10,11 epoxide is present (like JHIII)  
35 differing by the presence (+) or absence (-) of double bonds, (D) JH analogues with the 10,11 epoxide absent (like methyl farnesoate) differing by the

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

9

presence (+) or absence (-) of double bonds, (E) JH analogues differing by the presence or absence of 6,7 and 10,11 epoxide moieties (racemic), (F) the four possible stereoisomers of JHB<sub>3</sub>, (G) three JH analogues carrying hydroxyl groups on the carboxyl chain, with JHIII and methylfarnesoate included for comparison, and (H) two insecticides, hydroprone and methoprene, with JHB<sub>3</sub> and JHB<sub>3</sub>-diene included for comparison.

**Figure 2.** Tryptic digest fingerprints of purified *D. melanogaster* JHE recovered from a dried, silver-stained SDS-PAGE gel. Peaks matching the masses predicted from the CG8425 gene product are marked 'J' for JHE. A peak due to trypsin autolysis is marked 'T'.

**Figure 3.** JHE cDNA sequence with its translation.

15 **Key to Sequence Listing:**

SEQ ID NO:1 - *D. melanogaster* juvenile hormone esterase lacking the N-terminal signal sequence.  
 SEQ ID NO:2 - *D. melanogaster* juvenile hormone esterase.  
 SEQ ID NO:3 - cDNA encoding *D. melanogaster* juvenile hormone esterase.  
 20 SEQ ID NO:4 - Open reading frame encoding *D. melanogaster* juvenile hormone esterase provided as SEQ ID NO:1.  
 SEQ ID NO:5 and 6 - PCR primers to *D. melanogaster* cDNA sequence.  
 SEQ ID NO:7 - Poly-T adaptor primer.  
 SEQ ID NO:8 - Adaptor primer for 3'RACE.  
 25 SEQ ID NO:9 and 10 - PCR primers to *D. melanogaster* cDNA sequence.  
 SEQ ID NO:11 and 12 - PCR primers used to amplify cDNA encoding *D. melanogaster* juvenile hormone esterase.

**Detailed Description of the Invention:**

30 **General Techniques**

Unless otherwise indicated, the recombinant DNA techniques utilized in the present invention are standard procedures, well known to those skilled in the art. Such techniques are described and explained throughout the literature in sources such as, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

10

- Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel et al. (Editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present) and are incorporated herein by reference.

Arthropod Control Agents, and Methods of Screening Therefor

- Arthropod control agents identified using the methods of the present invention can be used to disrupt juvenile hormone esterase activity resulting in the death of the arthropod or at least reduce its rate of reproduction or feeding. For instance, during development, the inhibition of JHE will result in increased JH titres and the blocking of a vital moult, whereas inappropriate expression of JHE will result in a drop in JH titre and a precocious moult. Accordingly, agents which either enhance or inhibit JH esterase activity or levels can be useful in controlling arthropod populations.

- As used herein a "lead compound" is an arthropod control agent which is subject to trials with the goal of ultimately being formulated in, for example, a composition and sold as an agent for controlling arthropod pest populations. The lead compound, when exposed to an arthropod, more preferably an insect, disrupts JH esterase activity within the arthropod leading to a reduction in reproduction rates, death, feeding rates etc.

- Known screening techniques can be used to identify arthropod control agents which modulate the activity, or production of, a JH esterase of the present invention. For instance, the JH esterase can be used to hydrolyse an artificial substrate resulting in a detectable signal. As outlined above, one example is the hydrolysis of  $\alpha$ -naphthyl acetate, yielding  $\alpha$ -naphthol which can be detected by a change of absorbance at 235 nm or at visible wavelengths after reaction with certain diazo dyes such as Fast Blue BN (Campbell et al., 1998). Candidate agents can be included in such an assay to determine if they are suitable arthropod control agents. Many reactions screening many potential inhibitors can be performed automatically in microtitre trays using robots to transfer the various solutions and measure the adsorbance of each well.

- Another method for screening for agonists/antagonists involves mixing the polypeptide with a binding partner (which is capable of binding to the

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

11

polypeptide) and measuring their binding to each other in the presence or absence of a potential agonist/antagonist. The polypeptide or the binding partner can be detectably labeled using known labels such as those selected from the group consisting of: radioisotopes, fluorophores and chromophores.

5 Most preferably, the binding partner is labeled juvenile hormone. This binding assay may be in the form of an ELISA plate assay. There are other binding formats known to those of skill in the art, including coprecipitation, centrifugation and surface plasmon resonance.

One potential antagonist is a small molecule which binds to the juvenile hormone binding site of the polypeptide, making it inaccessible to juvenile hormone. Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides, peptide-like molecules, plant secondary metabolites or synthetic organic chemicals.

As described herein, suitable antisense polynucleotide and dsRNA molecules can be designed based on the sequences of the JH esterase encoding polynucleotides of the present invention. Such antisense polynucleotide and dsRNA molecules can be used as arthropod control agents which inhibit the production of JH esterase from the cell of an arthropod which has been transformed with the antisense polynucleotide or dsRNA molecule.

Such antisense polynucleotides and dsRNA molecules can also be screened for use as an arthropod control agent using the methods of the present invention. For instance, a JH esterase encoding polynucleotide of the present invention can be expressed in a cell system, or a cell-free expression system, resulting in the production of JH esterase. Candidate antisense polynucleotides and dsRNA molecules designed based on the sequences of the JH esterase encoding polynucleotides of the present invention can be incorporated into the system and the resulting effects on JH esterase mRNA levels or JH esterase polypeptide levels or activity, can readily be measured using techniques known in the art.

Suitable inhibitors of juvenile hormone esterase activity are compounds that interact directly with a protein's active site, thereby inhibiting that esterase's activity, usually by binding to or otherwise interacting with or otherwise modifying the esterase's active site. Juvenile hormone esterase inhibitors can also interact with other regions of the protein to inhibit esterase activity, for example, by allosteric interaction.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

12

Effective amounts and dosing regimens for the application of arthropod control agents identified by the methods of the present invention can readily be determined using techniques known to those skilled in the art.

Some arthropod control agents identified by the methods of the present invention may also interact with other molecules in the JH system. For instance, some arthropod control agents may, at least partially, act on JH binding proteins, JH receptors and/or JH-degrading enzymes such as JHEH.

#### Phage Libraries for Arthropod Control Agent Screening

Phage libraries can be constructed which when infected into host *E. coli* produce random peptide sequences of approximately 10 to 15 amino acids. Specifically, the phage library can be mixed in low dilutions with permissive *E. coli* in low melting point LB agar which is then poured on top of LB agar plates. After incubating the plates at 37°C for a period of time, small clear plaques in a lawn of *E. coli* will form which represents active phage growth and lysis of the *E. coli*. A representative of these phages can be absorbed to nylon filters by placing dry filters onto the agar plates. The filters can be marked for orientation, removed, and placed in washing solutions to block any remaining absorbent sites. The filters can then be placed in a solution containing, for example, a radioactively labeled polypeptide of the present invention (e.g., a polypeptide having an amino acid sequence comprising SEQ ID NO:1). After a specified incubation period, the filters can be thoroughly washed and developed for autoradiography. This allows plaques containing the phage that bind to the radioactive polypeptide to be detected. These phages can be further cloned and then retested for their ability to bind to the JH esterase as before. Once the phages have been purified, the binding sequence contained within the phage can be determined by standard DNA sequencing techniques. Once the DNA sequence is known, synthetic peptides can be generated which represents these sequences.

The effective peptide(s) can be synthesized in large quantities for use in *in vivo* models and eventually as an arthropod control agent to disrupt JH esterase activity. It should be emphasized that synthetic peptide production is relatively non-labor intensive, easily manufactured, quality controlled and thus, large quantities of the desired product can be produced rather cheaply.

35

Protein-Structure Based Design of Arthropod Control Agents

Crystals of a polypeptide of the present invention could be grown by a number of techniques including batch crystallation, vapour diffusion (either by sitting drop or hanging drop) and by microdialysis. Seeding of the crystals in some instances could be required to obtain X-ray quality crystals. Standard micro and/or macro seeding of crystals may therefore be used. Once a crystal is grown, X-ray diffraction data can be collected using standard techniques.

Once the three-dimensional structure of a polypeptide of the present invention is determined, a potential antagonist or agonist can be examined through the use of computer modeling using a docking program such as GRAM, DOCK, or AUTODOCK (Dunbrack et al., 1997). This procedure can include computer fitting of potential ligands to the JH esterase to ascertain how well the shape and the chemical structure of the potential ligand will complement or interfere with JH esterase activity. Computer programs can also be employed to estimate the attraction, repulsion, and steric hindrance of the ligand to the polypeptide of the present invention. Generally the tighter the fit (e.g., the lower the steric hindrance, and/or the greater the attractive force) the more potent the potential arthropod control agent will be since these properties are consistent with a tighter binding constant. Furthermore, the more specificity in the design of a potential arthropod control agent the more likely that the arthropod control agent will not interfere with other proteins. This will minimize potential side-effects due to unwanted interactions with other proteins.

Initially a potential compound could be obtained, for example, by screening a random peptide library produced by a recombinant bacteriophage as described above, or a chemical library. A compound selected in this manner could be then be systematically modified by computer modeling programs until one or more promising potential compounds are identified.

Such computer modeling allows the selection of a finite number of rational chemical modifications, as opposed to the countless number of essentially random chemical modifications that could be made, and of which any one might lead to a useful arthropod control agent. Each chemical modification requires additional chemical steps, which while being reasonable for the synthesis of a finite number of compounds, quickly becomes overwhelming if all possible modifications needed to be

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

14

synthesized. Thus through the use of the three-dimensional structure and computer modeling, a large number of these compounds can be rapidly screened on the computer monitor screen, and a few likely candidates can be determined without the laborious synthesis of untold numbers of

5 compounds.

The prospective arthropod control agent can be placed into any standard binding assay to test its effect on JH esterase activity.

For all of the arthropod control agent screening assays described herein further refinements to the structure of the arthropod control agent will  
10 generally be necessary and can be made by the successive iterations of any and/or all of the steps provided by the particular arthropod control agent screening assay.

#### Polypeptides

15 By "substantially purified" we mean a polypeptide that has been separated from the lipids, nucleic acids, other polypeptides, and other contaminating molecules with which it is associated in its native state.

The % identity of a polypeptide is determined by GAP (Needleman and Wunsch, 1970) analysis (GCG program) with a gap creation penalty=5, and a  
20 gap extension penalty=0.3. The query sequence is at least 15 amino acids in length, and the GAP analysis aligns the two sequences over a region of at least 15 amino acids. More preferably, the query sequence is at least 50 amino acids in length, and the GAP analysis aligns the two sequences over a region  
25 of at least 50 amino acids. Even more preferably, the query sequence is at least 100 amino acids in length and the GAP analysis aligns the two sequences over a region of at least 100 amino acids. More preferably, the query sequence is at least 250 amino acids in length and the GAP analysis aligns the two sequences over a region of at least 250 amino acids. Even more  
30 preferably, the query sequence is at least 500 amino acids in length and the GAP analysis aligns the two sequences over a region of at least 500 amino acids.

As used herein a "biologically active fragment" of a polypeptide of the present invention is a portion of the polypeptide which has JH esterase activity.

35 Polypeptides of the present invention can either be naturally occurring (e.g. SEQ ID NO:1 or 2) or mutants and/or fragments thereof.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

15

Amino acid sequence mutants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into DNA, or by *in vitro* synthesis of the desired polypeptide. Such mutants include, for example, deletions, insertions or substitutions of residues within the amino acid sequence. A combination of deletion, insertion and substitution can be made to arrive at the final construct, provided that the final protein product possesses the desired characteristics.

In designing amino acid sequence mutants, the location of the mutation site and the nature of the mutation will depend on characteristic(s) to be modified. The sites for mutation can be modified individually or in series, e.g., by (1) substituting first with conservative amino acid choices and then with more radical selections depending upon the results achieved, (2) deleting the target residue, or (3) inserting other residues adjacent to the located site.

Amino acid sequence deletions generally range from about 1 to 30 residues, more preferably about 1 to 10 residues and typically about 1 to 5 contiguous residues.

Substitution mutants have at least one amino acid residue in the polypeptide molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include sites identified as the active and/or binding site(s). Other sites of interest are those in which particular residues obtained from various species are identical. These positions may be important for biological activity. These sites, especially those falling within a sequence of at least three other identically conserved sites, are preferably substituted in a relatively conservative manner. Such conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "exemplary substitutions".

Hammock and co-inventors have shown that a double lysine mutant (K29R, K522R) and a catalytic serine mutant (S201G) of JHE enhance the ability of recombinant baculoviruses expressing JHE to kill in both *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* (US 5,643,776). Removal of the two lysines is most likely important for preventing the specific degradation of the JHE protein by ubiquitin and lysosomal pathways; removal of the catalytic serine to produce an inactive enzyme possibly enhances lethality by binding and sequestering JH. Hammock and co-inventors have improved the insecticidal activity of recombinant baculoviruses expressing JHE even further by

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

16

removing the signal sequence that targets the JHE enzyme to the plasma membrane (US 5,674,485). Non-glycosylated JHE then accumulates in the cytoplasm of baculovirus infected cells. Similar mutations could be performed on the polypeptide provided as SEQ ID NO:1.

5

TABLE 1

Original Residue	Exemplary Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his;
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala; norleucine
Leu (L)	norleucine, ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe;
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe ala; norleucine

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

17

Furthermore, if desired, unnatural amino acids or chemical amino acid analogues can be introduced as a substitution or addition into the polypeptides of the present invention. Such amino acids include, but are not limited to, the D-isomers of the common amino acids, 2,4-diaminobutyric acid,  $\alpha$ -amino isobutyric acid, 4-aminobutyric acid, 2-aminobutyric acid, 6-amino hexanoic acid, 2-amino isobutyric acid, 3-amino propionic acid, ornithine, norleucine, norvaline, hydroxyproline, sarcosine, citrulline, homocitrulline, cysteic acid, t-butylglycine, t-butylalanine, phenylglycine, cyclohexylalanine,  $\beta$ -alanine, fluoro-amino acids, designer amino acids such as  $\beta$ -methyl amino acids, C $\alpha$ -methyl amino acids, N $\alpha$ -methyl amino acids, and amino acid analogues in general.

Also included within the scope of the invention are polypeptides of the present invention which are differentially modified during or after synthesis, e.g., by biotinylation, benzylation, glycosylation, acetylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule or other cellular ligand, etc. These modifications may serve to increase the stability and/or bioactivity of the polypeptide of the invention.

Polypeptides of the present invention can be produced in a variety of ways, including production and recovery of natural proteins, production and recovery of recombinant proteins, and chemical synthesis of the proteins. In one embodiment, an isolated polypeptide of the present invention is produced by culturing a cell capable of expressing the polypeptide under conditions effective to produce the polypeptide, and recovering the polypeptide. A preferred cell to culture is a recombinant cell of the present invention. Effective culture conditions include, but are not limited to, effective media, bioreactor, temperature, pH and oxygen conditions that permit protein production. An effective medium refers to any medium in which a cell is cultured to produce a polypeptide of the present invention. Such medium typically comprises an aqueous medium having assimilable carbon, nitrogen and phosphate sources, and appropriate salts, minerals, metals and other nutrients, such as vitamins. Cells of the present invention can be cultured in conventional fermentation bioreactors, shake flasks, test tubes, microtiter dishes, and petri plates. Culturing can be carried out at a temperature, pH and oxygen content appropriate for a recombinant cell.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

18

Such culturing conditions are within the expertise of one of ordinary skill in the art.

#### Polynucleotides

5 By "isolated polynucleotide" we mean a polynucleotide separated from the polynucleotide sequences with which it is associated or linked in its native state. Furthermore, the term "polynucleotide" is used interchangeably herein with the term "nucleic acid molecule".

10 The % identity of a polynucleotide is determined by GAP (Needleman and Wunsch, 1970) analysis (GCG program) with a gap creation penalty=5, and a gap extension penalty=0.3. The query sequence is at least 45 nucleotides in length, and the GAP analysis aligns the two sequences over a region of at least 45 nucleotides. Preferably, the query sequence is at least 150 nucleotides in length, and the GAP analysis aligns the two sequences  
15 over a region of at least 150 nucleotides. More preferably, the query sequence is at least 300 nucleotides in length and the GAP analysis aligns the two sequences over a region of at least 300 nucleotides.

A polynucleotide sequence of the present invention may hybridise under high stringency conditions to the sequence set out in SEQ ID NO:3 or  
20 SEQ ID NO: 4. In particular, an antisense polynucleotide of the present invention can hybridise under high stringency conditions to the sequence set out in SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO: 4. As used herein, high stringency conditions are those that (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example, 0.015 M NaCl/0.0015 M sodium citrate/0.1%  
25 NaDodSO<sub>4</sub>, at 50°C; (2) employ during hybridisation a denaturing agent such as formamide, for example, 50% (vol/vol) formamide with 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3)  
30 employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 g/ml), 0.1% SDS and 10% dextran sulfate at 42°C in 0.2 x SSC and 0.1% SDS.

Polynucleotides which will hybridize to SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO:  
4, or parts thereof, may possess one or more mutations which are deletions,  
35 insertions, or substitutions of nucleotide residues. Mutants can be either naturally occurring (that is to say, isolated from a natural source) or synthetic

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

19

(for example, by performing site-directed mutagenesis on the nucleic acid). It is thus apparent that polynucleotides of the invention can be either naturally occurring or recombinant.

Oligonucleotides of the present invention can be RNA, DNA, or derivatives of either. The minimum size of such oligonucleotides is the size required for the formation of a stable hybrid between an oligonucleotide and a complementary sequence on a nucleic acid molecule of the present invention. The present invention includes oligonucleotides that can be used as, for example, probes to identify nucleic acid molecules, primers to produce nucleic acid molecules or arthropod control agents to inhibit juvenile hormone esterase protein production or activity (e.g., as antisense-, triplex formation-, ribozyme- and/or RNA drug-based reagents). Oligonucleotide of the present invention used as a probe are typically conjugated with a label such as a radioisotope, an enzyme, biotin, a fluorescent molecule or a chemiluminescent molecule.

#### Catalytic Nucleic Acids

The term catalytic nucleic acid refers to a DNA molecule or DNA-containing molecule (also known in the art as a "deoxyribozyme") or an RNA or RNA-containing molecule (also known as a "ribozyme") which specifically recognizes a distinct substrate and catalyzes the chemical modification of this substrate. The nucleic acid bases in the catalytic nucleic acid can be bases A, C, G, T and U, as well as derivatives thereof. Derivatives of these bases are well known in the art.

Typically, the catalytic nucleic acid contains an antisense sequence for specific recognition of a target nucleic acid, and a nucleic acid cleaving enzymatic activity (also referred to herein as the "catalytic domain"). The types of ribozymes that are particularly useful in this invention are the hammerhead ribozymes (Haseloff and Gerlach 1988, Perriman et al., 1992) and the hairpin ribozyme (Shippy et al., 1999).

The ribozymes of this invention and DNA encoding the ribozymes can be chemically synthesized using methods well known in the art. The ribozymes can also be prepared from a DNA molecule (that upon transcription, yields an RNA molecule) operably linked to an RNA polymerase promoter, e.g., the promoter for T7 RNA polymerase or SP6 RNA polymerase. Accordingly, also provided by this invention is a nucleic acid

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

20

molecule, i.e., DNA or cDNA, coding for the ribozymes of this invention. When the vector also contains an RNA polymerase promoter operably linked to the DNA molecule, the ribozyme can be produced *in vitro* upon incubation with RNA polymerase and nucleotides. In a separate embodiment, the DNA can be inserted into an expression cassette or transcription cassette. After synthesis, the RNA molecule can be modified by ligation to a DNA molecule having the ability to stabilize the ribozyme and make it resistant to RNase. Alternatively, the ribozyme can be modified to the phosphothio analog for use in liposome delivery systems. This modification also renders the ribozyme resistant to endonuclease activity.

#### dsRNA

dsRNA is particularly useful for specifically inhibiting the production of a particular protein. Although not wishing to be limited by theory, Dougherty and Parks (1995) have provided a model for the mechanism by which dsRNA can be used to reduce protein production. This model has recently been modified and expanded by Waterhouse et al. (1998). This technology relies on the presence of dsRNA molecules that contain a sequence that is essentially identical to the mRNA of the gene of interest, in this case an mRNA encoding a polypeptide according to the first, second or third aspects of the invention. Conveniently, the dsRNA can be produced in a single open reading frame in a recombinant vector or host cell, where the sense and anti-sense sequences are flanked by an unrelated sequence which enables the sense and anti-sense sequences to hybridize to form the dsRNA molecule with the unrelated sequence forming a loop structure. The design and production of suitable dsRNA molecules for the present invention is well within the capacity of a person skilled in the art, particularly considering Dougherty and Parks (1995), Waterhouse et al. (1998), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, and WO 01/34815.

#### Recombinant Vectors

One embodiment of the present invention includes a recombinant vector, which includes at least one isolated nucleic acid molecule of the present invention, inserted into any vector capable of delivering the nucleic acid molecule into a host cell. Such a vector contains heterologous nucleic acid sequences, that is nucleic acid sequences that are not naturally found

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

21

adjacent to nucleic acid molecules of the present invention and that preferably are derived from a species other than the species from which the nucleic acid molecule(s) are derived. The vector can be either RNA or DNA, either prokaryotic or eukaryotic, and typically is a virus or a plasmid.

5 One type of recombinant vector comprises a nucleic acid molecule of the present invention operatively linked to an expression vector. The phrase operatively linked refers to insertion of a nucleic acid molecule into an expression vector in a manner such that the molecule is able to be expressed when transformed into a host cell. As used herein, an expression vector is a  
10 DNA or RNA vector that is capable of transforming a host cell and of effecting expression of a specified nucleic acid molecule. Preferably, the expression vector is also capable of replicating within the host cell. Expression vectors can be either prokaryotic or eukaryotic, and are typically viruses or plasmids. Expression vectors of the present invention include any vectors that function  
15 (i.e., direct gene expression) in recombinant cells of the present invention, including in bacterial, fungal, endoparasite, arthropod, other animal, and plant cells. Preferred expression vectors of the present invention can direct gene expression in bacterial, yeast, arthropod and mammalian cells and more preferably in the cell types disclosed herein.

20 In particular, expression vectors of the present invention contain regulatory sequences such as transcription control sequences, translation control sequences, origins of replication, and other regulatory sequences that are compatible with the recombinant cell and that control the expression of nucleic acid molecules of the present invention. In particular, recombinant  
25 molecules of the present invention include transcription control sequences. Transcription control sequences are sequences which control the initiation, elongation, and termination of transcription. Particularly important transcription control sequences are those which control transcription initiation, such as promoter, enhancer, operator and repressor sequences.  
30 Suitable transcription control sequences include any transcription control sequence that can function in at least one of the recombinant cells of the present invention. A variety of such transcription control sequences are known to those skilled in the art. Preferred transcription control sequences include those which function in bacterial, yeast, arthropod and mammalian  
35 cells, such as, but not limited to, tac, lac, trp, trc, oxy-pro, omp/lpp, rrmB, bacteriophage lambda, bacteriophage T7, T7lac, bacteriophage T3,

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

22

bacteriophage SP6, bacteriophage SP01, metallothionein, alpha-mating factor, Pichia alcohol oxidase, alphavirus subgenomic promoters (such as Sindbis virus subgenomic promoters), antibiotic resistance gene, baculovirus, *Heliothis zea* insect virus, vaccinia virus, herpesvirus, raccoon poxvirus, 5 other poxvirus, adenovirus, cytomegalovirus (such as intermediate early promoters), simian virus 40, retrovirus, actin, retroviral long terminal repeat, Rous sarcoma virus, heat shock, phosphate and nitrate transcription control sequences as well as other sequences capable of controlling gene expression in prokaryotic or eukaryotic cells. Additional suitable transcription control 10 sequences include tissue-specific promoters and enhancers as well as lymphokine-inducible promoters (e.g., promoters inducible by interferons or interleukins). Transcription control sequences of the present invention can also include naturally occurring transcription control sequences naturally associated with arthropods.

15 Recombinant molecules of the present invention may also (a) contain secretory signals (i.e., signal segment nucleic acid sequences) to enable an expressed polypeptide of the present invention to be secreted from the cell that produces the polypeptide and/or (b) contain fusion sequences which lead to the expression of nucleic acid molecules of the present invention as fusion 20 proteins. Examples of suitable signal segments include any signal segment capable of directing the secretion of a protein of the present invention. Preferred signal segments include, but are not limited to, tissue plasminogen activator (t-PA), interferon, interleukin, growth hormone, histocompatibility and viral envelope glycoprotein signal segments, as well as natural signal 25 sequences. Suitable fusion segments encoded by fusion segment nucleic acids are disclosed herein. In addition, a nucleic acid molecule of the present invention can be joined to a fusion segment that directs the encoded protein to the proteasome, such as a ubiquitin fusion segment. Recombinant molecules may also include intervening and/or untranslated sequences 30 surrounding and/or within the nucleic acid sequences of nucleic acid molecules of the present invention.

Known arthropod-specific viruses systems can be used to deliver molecules of the present invention. These can be as diverse as large DNA viruses such as the baculoviruses and small RNA viruses. Wild-type viruses 35 are generally ingested by arthropods. Proteins on the surface of the virus bind to cells of the arthropod's gut causing the contents of the virus to enter

the cells. The nucleic acid in the virus then performs two tasks. Firstly, it encodes viral proteins that are required for the assembly of more viruses identical the original virus, and secondly, more copies of the nucleic acid are produced for incorporation into the new virus. When a virus is modified as a  
5 vector for producing a protein of interest some additional nucleic acid is inserted into the virus' nucleic acid and may or may not replace some of the virus' original nucleic acid. The site of insertion of the toxin encoding nucleic acid is chosen to ensure that it will be transcribed (if necessary) and translated into the required protein in the virus infected cells. Abundant  
10 expression of the protein might require other modifications such as suitable promoter sites in the nucleic acid. It is generally intended that the modified virus would infect a large number of cells in the target arthropod with abundant expression of the protein in all those cells. It is also generally intended that the expression of the proteins hastens or otherwise enhances  
15 the detrimental effects on the arthropod of viral infection. In the case of JHE expression the virus-infected arthropod would suffer both viral infection and endocrine disruption which should prove lethal. Such viruses can be formulated to allow them to be sprayed or otherwise distributed on a crop plant (or other material one wishes to protect from arthropod attack) and  
20 ingested by arthropods when they start to feed on the crop.

Also known are vector systems that are derived from viruses. An example is the capsoid system (Hanzlik et al., 1999; WO 97/46666). The capsoid system is based on small RNA viruses but differs from viruses in that it does not replicate in the arthropod's cells. Small RNA viruses consist of  
25 one or a few RNA molecules which associate with a capsid protein encoded by that RNA. Molecules of the capsid protein assemble into regular geometric structures that enclose and protect the RNA. The same protein also provides the function of binding to cells in the gut of arthropods and causing the viral RNA to enter the gut cell. Within the cell more copies of the RNA are made  
30 and these are expressed to make more of the viral protein. The RNA and protein assemble into new virus particles that can infect other cells and arthropods. The capsoid system uses some of the functions of the wild-type virus to deliver a protein to arthropod gut cells but does not have all the functions required to sustain a viral infection. It also has features that allow  
35 it to be produced by a transgenic plant rather than needing to be produced elsewhere and sprayed on to a crop. The plant is transformed with a gene

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

24

that causes the plant to produce the capsid protein. The transgenic plant also produces an RNA molecule that contains the necessary sequences to associate with the capsid protein to produce a virus-like particle. When an arthropod feeds on the plant it ingests the virus-like particles. The capsid protein binds to the arthropod's gut cells and the RNA enters the cell. That RNA can be engineered to resemble a messenger RNA causing the cell to translate the message into a protein.

A variation of the capsid system has the transgenic plant expressing the protein of interest and the capsid protein as a fusion product from a single gene. It is the protein rather than the corresponding RNA that is delivered. Simply feeding an unprotected protein such as JHE to an arthropod is unlikely to be effective because the protein would most likely be digested by normal gut processes. The capsid protein domains assemble into virus-like structures with the toxin protein domain protected from digestion within the lumen of the virus-like structure. The toxin protein is only exposed after the capsid domains have bound to gut cells. The fusion of the virus-like structure with the target cell's membrane causes the toxin domains to be presented to the inside of the cell where they remain protected from digestion in the gut. Ingestion of capsids would cause many cells lining the gut to contain active JHE which are expected to act as a sinks for JH as described above.

#### Host cells

Another embodiment of the present invention includes a recombinant cell comprising a host cell transformed with one or more recombinant molecules of the present invention. Transformation of a nucleic acid molecule into a cell can be accomplished by any method by which a nucleic acid molecule can be inserted into the cell. Transformation techniques include, but are not limited to, transfection, electroporation, microinjection, lipofection, adsorption, and protoplast fusion. A recombinant cell may remain unicellular or may grow into a tissue, organ or a multicellular organism. Transformed nucleic acid molecules of the present invention can remain extrachromosomal or can integrate into one or more sites within a chromosome of the transformed (i.e., recombinant) cell in such a manner that their ability to be expressed is retained.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

25

Suitable host cells to transform include any cell that can be transformed with a polynucleotide of the present invention. Host cells can be either untransformed cells or cells that are already transformed with at least one nucleic acid molecule (e.g., nucleic acid molecules encoding one or more proteins of the present invention). Host cells of the present invention either can be endogenously (i.e., naturally) capable of producing proteins of the present invention or can be capable of producing such proteins after being transformed with at least one nucleic acid molecule of the present invention. Host cells of the present invention can be any cell capable of producing at least one protein of the present invention, and include bacterial, fungal (including yeast), parasite, other arthropod, other animal and plant cells. Preferred host cells include bacterial, mycobacterial, yeast, arthropod and mammalian cells. More preferred host cells include *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Spodoptera*, *Mycobacteria*, *Trichoplusia*, BHK (baby hamster kidney) cells, MDCK cells (normal dog kidney cell line for canine herpesvirus cultivation), CRFK cells (normal cat kidney cell line for feline herpesvirus cultivation), CV-1 cells (African monkey kidney cell line used, for example, to culture raccoon poxvirus), COS (e.g., COS-7) cells, and Vero cells. Particularly preferred host cells are *E. coli*, including *E. coli* K-12 derivatives; *Salmonella typhi*; *Salmonella typhimurium*, including attenuated strains; *Spodoptera frugiperda*; *Trichoplusia ni*; BHK cells; MDCK cells; CRFK cells; CV-1 cells; COS cells; Vero cells; and non-tumorigenic mouse myoblast G8 cells (e.g., ATCC CRL 1246). Additional appropriate mammalian cell hosts include other kidney cell lines, other fibroblast cell lines (e.g., human, murine or chicken embryo fibroblast cell lines), myeloma cell lines, Chinese hamster ovary cells, mouse NIH/3T3 cells, LMTK cells and/or HeLa cells.

Recombinant DNA technologies can be used to improve expression of transformed polypeptide molecules by manipulating, for example, the number of copies of the polypeptide molecules within a host cell, the efficiency with which those polypeptide molecules are transcribed, the efficiency with which the resultant transcripts are translated, and the efficiency of post-translational modifications. Recombinant techniques useful for increasing the expression of polypeptide molecules of the present invention include, but are not limited to, operatively linking polypeptide molecules to high-copy number plasmids, integration of the polypeptide molecules into one or more host cell chromosomes, addition of vector

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

26

stability sequences to plasmids, substitutions or modifications of transcription control signals (e.g., promoters, operators, enhancers), substitutions or modifications of translational control signals (e.g., ribosome binding sites, Shine-Dalgarno sequences), modification of polypeptide molecules of the present invention to correspond to the codon usage of the host cell, and the deletion of sequences that destabilize transcripts. The activity of an expressed recombinant protein of the present invention may be improved by fragmenting, modifying, or derivatizing polypeptide molecules encoding such a protein.

10

#### Transgenic Plants

The term "plant" refers to whole plants, plant organs (e.g. leaves, stems roots, etc), seeds, plant cells and the like. Plants contemplated for use in the practice of the present invention include both monocotyledons and dicotyledons. Exemplary dicotyledons include cotton, corn, tomato, tobacco, potato, bean, soybean, and the like.

Transgenic plants, as defined in the context of the present invention include plants (as well as parts and cells of said plants) and their progeny which have been genetically modified using recombinant DNA techniques to cause or enhance production of at least one protein of the present invention in the desired plant or plant organ.

The polypeptide of the present invention may be expressed constitutively in the transgenic plants during all stages of development. Depending on the use of the plant or plant organs, the proteins may be expressed in a stage-specific manner. Furthermore, depending on the use, the proteins may be expressed tissue-specifically.

The choice of the plant species is determined by the intended use of the plant or parts thereof and the amenability of the plant species to transformation.

Regulatory sequences which are known or are found to cause expression of a gene encoding a protein of interest in plants may be used in the present invention. The choice of the regulatory sequences used depends on the target crop and/or target organ of interest. Such regulatory sequences may be obtained from plants or plant viruses, or may be chemically synthesized. Such regulatory sequences are well known to those skilled in the art.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

27

Other regulatory sequences such as terminator sequences and polyadenylation signals include any such sequence functioning as such in plants, the choice of which would be obvious to the skilled addressee. An example of such sequences is the 3' flanking region of the nopaline synthase (nos) gene of *Agrobacterium tumefaciens*.

Several techniques are available for the introduction of the expression construct containing a DNA sequence encoding a protein of interest into the target plants. Such techniques include but are not limited to transformation of protoplasts using the calcium/polyethylene glycol method, electroporation and microinjection or (coated) particle bombardment. In addition to these so-called direct DNA transformation methods, transformation systems involving vectors are widely available, such as viral and bacterial vectors (e.g. from the genus *Agrobacterium*). After selection and/or screening, the protoplasts, cells or plant parts that have been transformed can be regenerated into whole plants, using methods known in the art. The choice of the transformation and/or regeneration techniques is not critical for this invention.

#### Transgenic non-human animals

Techniques for producing transgenic animals are well known in the art. A useful general textbook on this subject is Houdebine, *Transgenic animals – Generation and Use* (Harwood Academic, 1997).

Heterologous DNA can be introduced, for example, into fertilized mammalian ova. For instance, totipotent or pluripotent stem cells can be transformed by microinjection, calcium phosphate mediated precipitation, liposome fusion, retroviral infection or other means, the transformed cells are then introduced into the embryo, and the embryo then develops into a transgenic animal. In a highly preferred method, developing embryos are infected with a retrovirus containing the desired DNA, and transgenic animals produced from the infected embryo. In a most preferred method, however, the appropriate DNAs are coinjected into the pronucleus or cytoplasm of embryos, preferably at the single cell stage, and the embryos allowed to develop into mature transgenic animals.

Another method used to produce a transgenic animal involves microinjecting a nucleic acid into pro-nuclear stage eggs by standard methods. Injected eggs are then cultured before transfer into the oviducts of pseudopregnant recipients.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

28

Transgenic animals may also be produced by nuclear transfer technology. Using this method, fibroblasts from donor animals are stably transfected with a plasmid incorporating the coding sequences for a binding domain or binding partner of interest under the control of regulatory. Stable  
5 transfectants are then fused to enucleated oocytes, cultured and transferred into female recipients.

#### Compositions and Agriculturally Acceptable Carriers

As used herein, an "arthropod control composition", is a formulation  
10 which comprises an arthropod control agent of the present invention, where upon exposure of the composition to an arthropod results in the disruption of JH esterase activity.

Agriculturally suitable and/or environmentally acceptable compositions for arthropod control are known in the art. Agricultural  
15 compositions for the control of arthropod pests of plants and/or animals must be suitable for agricultural use, particularly for dispersal in fields. Similarly, compositions for the control of arthropod pests are preferably environmentally acceptable. In addition to appropriate solid or, more preferably, liquid carriers, agricultural compositions may include sticking  
20 and adhesive agents, emulsifying and wetting agents, but no components which deter arthropod feeding or any arthropod control agent functions. It may also be desirable to add components which protect the arthropod control agent from UV inactivation or components which serve as adjuvants to increase the potency and/or virulence of an entomopathogen. Agricultural  
25 compositions for arthropod pest control may also include agents which stimulate arthropod feeding.

In one embodiment, a composition of the present invention can be used to protect a plant or animal from arthropod infestation by administering such composition in order to prevent infestation. Such administration could  
30 be oral (in the case of animals), or by application to the environment (e.g., spraying). In another embodiment, an arthropod, such as a *L. cuprina*, can ingest compositions, or products thereof, present in the blood of a host animal that has been administered with a composition of the present invention.

35 Compositions of the present invention also include excipients. Excipients are also referred to herein as "agriculturally acceptable carriers".

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

29

An excipient can be any material that an animal, plant or environment to be treated can tolerate. Examples of such excipients include water, saline, Ringer's solution, dextrose solution, Hank's solution, and other aqueous physiologically balanced salt solutions. Nonaqueous vehicles, such as fixed oils, sesame oil, ethyl oleate, or triglycerides may also be used. Other useful formulations include suspensions containing viscosity enhancing agents, such as sodium carboxymethylcellulose, sorbitol, or dextran. Excipients can also contain minor amounts of additives, such as substances that enhance isotonicity and chemical stability. Examples of buffers include phosphate buffer, bicarbonate buffer and Tris buffer, while examples of preservatives include thimerosal or o-cresol, formalin and benzyl alcohol. Standard formulations can either be liquid injectables or solids which can be taken up in a suitable liquid as a suspension or solution for injection. Thus, in a non-liquid formulation, the excipient can comprise dextrose, human serum albumin, dog serum albumin, cat serum albumin, preservatives, etc., to which sterile water or saline can be added prior to administration.

In one embodiment of the present invention, a composition can include a carrier. Carriers include compounds that increase the half-life of a composition in the treated animal, plant or environment. Suitable carriers include, but are not limited to, polymeric controlled release vehicles, biodegradable implants, liposomes, bacteria, viruses, other cells, oils, esters, and glycols.

One embodiment of the present invention is a controlled release formulation that is capable of slowly releasing a composition of the present invention into an animal, plant or the environment. As used herein, a controlled release formulation comprises a composition of the present invention in a controlled release vehicle. Suitable controlled release vehicles include, but are not limited to, biocompatible polymers, other polymeric matrices, capsules, microcapsules, microparticles, bolus preparations, osmotic pumps, diffusion devices, liposomes, lipospheres, and transdermal delivery systems. Other controlled release formulations of the present invention include liquids that, upon administration, form a solid or a gel in situ. Preferred controlled release formulations are biodegradable (i.e., bioerodible).

A preferred controlled release formulation of the present invention is capable of releasing a composition of the present invention into, for example,

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

30

the environment, or the blood of an animal, at a constant rate sufficient to attain effective dose levels of the composition to protect against arthropod infestation. The composition is preferably released over a period of time ranging from about 1 to about 12 months. A preferred controlled release formulation of the present invention is capable of effecting a treatment preferably for at least about 1 month, more preferably for at least about 3 months, even more preferably for at least about 6 months, even more preferably for at least about 9 months, and even more preferably for at least about 12 months.

10 The concentration of the arthropod control agent that will be required to produce effective compositions for the control of an arthropod pest will depend on the type of organism and the formulation of the composition. The effective concentration of the arthropod control agent within the composition can readily be determined experimentally, as will be understood by the skilled artisan. For example, the effective concentration of a virus can be readily determined using techniques known to the art.

Acceptable protocols to administer compositions of the present invention to animals in an effective manner include individual dose size, number of doses, frequency of dose administration, and mode of administration. Determination of such protocols can be accomplished by those skilled in the art. A suitable single dose is a dose that is capable of protecting an animal from arthropod infestation when administered one or more times over a suitable time period. For example, a preferred single dose of a composition comprising a polypeptide, polynucleotide or arthropod control agent of the present invention is from about 1 microgram to about 10 milligrams of the composition per kilogram body weight of the animal. Boosters can be administered from about 2 weeks to several years after the original administration. A preferred administration schedule is one in which from about 10 µg to about 1 mg of the composition per kg body weight of the animal is administered from about one to about two times over a time period of from about 2 weeks to about 12 months. Modes of administration can include, but are not limited to, subcutaneous, intradermal, intravenous, intranasal, oral, transdermal, intraocular and intramuscular routes.

35

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

31

Kits

The present invention also includes a test kit to identify a compound capable of inhibiting esterase activity of an arthropod. Such a test kit includes a polypeptide according to the present invention, having esterase activity and a means for determining the extent of inhibition of esterase activity in the presence of (i.e., effected by) a putative inhibitory compound. Such compounds can also be screened to identify those that are substantially not toxic in host animals, plants or the environment.

10 Examples:

*Example 1 - Purification of D. melanogaster JHE.*

*Method*

*D. melanogaster* strain 12I11.2 were collected at 12±6 hours after the time of puparium formation and stored at -70°C.

A 100 g of *D. melanogaster* were homogenised on ice with 500 ml of 10 mM KOH/acetic acid buffer, pH4.5 and a few milligrams of phenylthiourea in a Sorvall blender. The homogenate was clarified by centrifugation at 13,000 g, 4°C for 20 minutes followed by filtration through glass wool. The pH of this solution was raised by the addition of an equal volume of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 10% glycerol.

A 30-60% ammonium sulphate cut was made by appropriate additions of solid ammonium sulphate and the resulting pellet was resuspended in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 10% glycerol to a final volume of 52 ml.

Acetone (0°C) was slowly added to the resuspended ammonium sulphate pellet with vigorous swirling in an ice/water slurry to a final concentration of 40% (v/v). The solution was then centrifuged at 9000 g for 15 minutes at 0°C. The supernatant was dialysed overnight at 4°C against 3 l of 10 mM imidazole/HCl buffer, pH 7.0 containing 10% glycerol. This material in the dialysis tubing was concentrated to less than 50 ml using aquacide III (Calbiochem 17852) to remove the excess water.

Isoelectric Focussing (IEF) of the acetone supernatant was performed using a Biorad "Rotofor" apparatus. Three ml of ampholytes (Pharmalyte pH 5-6, Pharmacia) and 10% glycerol were added to the acetone supernatant, bringing the total volume to 50 ml, the volume of the Rotofor focussing

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

32

chamber. Antifreeze solution at -8°C was circulated through the apparatus to achieve a temperature in the focussing chamber of approx. 2°C. The sample was focussed for 4 h at 12 w, during which time the voltage rose from 300 to 880 v. Twenty 2.5 ml fractions were collected and their protein content, pH and JHE activities were determined. Fractions containing JHE activity (pHs 5.35-6.12) were returned to the Rotofor with sufficient 10% glycerol to fill the focussing chamber. These were refocussed for a further 4 h, during which time the voltage rose from 1600 to 1900 v. Then fractions were collected and assayed as above. The JHE containing fractions (pHs 5.29-5.56) were pooled, filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane, and concentrated to 0.5 ml using a Centriprep 30 ultrafiltration device (Amicon).

The concentrated material from the previous step was diluted to 5ml with 0.1M imidazole/HCl to pH 7.0, 10% glycerol, 1 mM dithiothriitol. It was loaded onto a Pharmacia "Mono Q HR5/5" chromatography column previously equilibrated with the same buffer. The column was washed with 6ml of buffer and eluted with a 20ml linear gradient of 0 to 500 mM NaCl in imidazole buffer at a flow rate of 0.5 ml/min.. The gradient eluate was collected in 1 ml fractions.

The JHE containing fractions from the Mono Q column (265-335 mM NaCl) were concentrated to about 100  $\mu$ l using a Centricon 30 ultrafiltration device (Amicon) and loaded onto a Pharmacia "Superose 6" 30 ml gel filtration column previously equilibrated with two column volumes of the above imidazole buffer. The column was eluted with imidazole buffer at a flow rate of 0.5 ml/min and 1 ml fractions were collected. The two fractions containing JHE activity (around 16.5 ml elution volume) were stored at 20°C overnight then assessed for purity by SDS-PAGE and silver staining. The PAGE gels were then stored dry at room temperature between sheets of Promega gel drying film.

A radiometric partition assay for JHE activity (Hammock and Roe, 1985) was used for monitoring the purification of JHE. The partition assay consists of an incubation of the enzyme with chain-labelled  $^3$ H-JHIII which is hydrolysed to yield  $^3$ H-JHIII-acid. The reaction is stopped by the addition of organic solvent which extracts the JHIII while the JHIII-acid product remains in the aqueous phase. The reaction is quantified by determining the amount of  $^3$ H in the aqueous phase using liquid scintillation counting. The only departures from the method of Hammock and Roe (1985) were that the

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

33

reaction volume was halved to 100  $\mu$ l, 0.5 mg/ml BSA (Sigma) was included and the buffer was 100 mM sodium phosphate, pH 8.0. The protein content of solutions was determined by the method of Bradford (1976) using the Biorad Protein Assay kit, with BSA as the standard.

5

#### Results

Two fractions from the final, gel filtration chromatographic separation were separated by SDS-PAGE and silver stained (BioRad silver stain kit) to reveal the proteins. One fraction (Fr. 6) contained virtually pure JHE and was used to estimate the  $k_{cat}$  of the enzyme (see below) while the other fraction (Fr. 7) was used for other kinetic experiments (see Example 2). SDS-PAGE gels containing aliquots of the fractions were dried between sheets of Promega gel drying film and stored at room temperature until the bands containing JHE were excised for peptide mass fingerprinting (see Example 3).

15

#### Example 2 - Kinetic analysis of JHE.

##### Method

The reaction rate per mole of JHE ( $k_{cat}$ ) that we report for JHIII was calculated immediately after the final separation step using the fraction that appeared homogeneous (Fraction 6). The calculation used the enzyme's molecular weight (66 kDa) estimated from its mobility on SDS-PAGE, the JHE activity of fraction 6, and the protein content of fraction 6. Aliquots of Fr7 were used to calculate other kinetic parameters. This fraction contained an unidentified protein that did not have JHE activity. Fortunately, the constants  $k_M$  and  $k_i$  are independent of the absolute amount of active enzyme so the presence of the unidentified protein could be ignored.

The type of inhibition and inhibition constants ( $k_i$ s) were determined for three forms of JH. The assays were as described above except that the  $^3$ H-JHIII concentration was varied, potential inhibitors were included in some assays, and the assay tubes were pretreated with 2% polyethyleneglycol ("Carbowax" Compound 4000, Union Carbide) to minimise adsorption of JH (and its analogues) to the glass. Assays were performed for all combinations of JHI (5, 10, and 15  $\mu$ M), JHE<sub>2</sub> (3, 5, and 8  $\mu$ M) or methyl farnesoate (MF) (6, 12 and 18  $\mu$ M) as inhibitors of 3H-JHIII hydrolysis (0.0555, 0.0715, 0.1, 0.1665 0.5 $\mu$ M; 3871 cpm/pmol). JHIII was added to the assay solution in 1  $\mu$ l ethanol whereas the inhibiting JHs were added in 1  $\mu$ l dimethylsulphoxide in

35

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

34

the case of MF and JHI or ethanol in the case of JHB<sub>3</sub>. Reactions were also performed at each JHIII concentration with solvent additions only. Reactions were started with the addition of 3  $\mu$ l of JHE (Fr7 diluted 1/20 in 5 mg/ml BSA). Incubation times for these experiments were 20 min, during which time a maximum of 20% of the substrate was consumed and the reaction rates were linear. Each inhibition experiment also provided an estimate of the  $k_M$  for hydrolysis of JHIII by JHE. For each inhibitor the experiment was repeated three times, providing three data sets. After graphical determination of the type of inhibition, an overall fit of each set of data was made to the appropriate rate equation (in this case competitive inhibition) using the appropriate computer program of Cleland (1979). Weighted means and standard errors of the inhibition constants from each data set were then calculated.

#### 15 Results

JHIII is hydrolysed slowly by JHE from *D. melanogaster* ( $k_{cat} = 0.60 \text{ sec}^{-1}$ ) but the Michaelis constant for the reaction is very low ( $K_M = 89 \pm 12 \text{ nM}$ ) so the resulting specificity constant ( $k_{cat}/K_M = 6.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ) is very high, approaching the theoretic diffusion limited maximum of around  $10^8\text{-}10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ .

Three natural forms of JH (JHI, methyl farnesoate and JHB<sub>3</sub>) each showed competitive inhibition of JHIII hydrolysis indicating that they bind to the same site as the substrate, JHIII, and that the inhibition constants ( $k_i$ ) can be interpreted as a measure of the binding affinity of JHE for these compounds. JHIII ( $89 \pm 12 \text{ nM}$ ) and JHB<sub>3</sub> ( $1.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) are bound more tightly than methyl farnesoate ( $3.33 \pm 0.36 \mu\text{M}$ ) or JHI ( $3.34 \pm 0.47 \mu\text{M}$ ), consistent with the former two compounds being the major forms of JH found in the higher Diptera. We note however, that the JHB<sub>3</sub> used to determine the  $k_i$  was a racemate of four possible stereoisomers. Below we show that the binding affinity for the natural stereoisomer (6S,7S,10R) is greater than for the three unnatural isomers. Therefore the  $k_i$  for 6S,7S,10R JHB<sub>3</sub> is lower than  $1.2 \mu\text{M}$ .

Inhibition of JHIII hydrolysis was also analysed by a range of natural forms of JH and JH analogues at single, fixed concentrations. This experiment revealed relative binding affinities rather than absolute values. Almost all deviations from the structure of JHIII or JHB<sub>3</sub> showed significantly

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

35

reduced binding affinity to JHE (Figure 1). The overall size of the molecule is important and even small increases in the size, such as the changes from methyl to ethyl side chains found in JHI and JHII, or increases in the size of the methyl ester moiety, decrease binding. The conjugated 2E,3 double bond and the 10R,11 epoxide both promote binding to JHE, consistent with the general occurrence of these features in insect JHs. In addition, JHE shows preferential binding to the natural 6S,7S,10R stereoisomer of JHB<sub>3</sub>. High affinity binding of JHB<sub>3</sub> is likely to be unique to JHEs from higher Diptera as this form of JH has only been found in the higher Diptera.

10

*Example 3 - Peptide mass fingerprint of D. melanogaster JHE.*

*Method*

JHE bands were cut from silver-stained SDS-PAGE gels that had been stored between sheets of Promega gel drying film. The two JHE bands were processed separately as follows to obtain two peptide mass fingerprints. The bands were rehydrated with 10 $\mu$ l of water, and the film was removed. In-gel digestion of the protein was performed with reduction and carbamidomethylation of any cysteine residues. The pieces of gel were incubated with 2.8 mM dithiothreitol in ammonium bicarbonate solution (180  $\mu$ l, 100 mM) for 30 minutes at 60°C. Iodoacetamide (10  $\mu$ l, 5.9 mM final conc.) was added and the reaction was kept for a further 30 minutes at room temperature in the dark. The gel pieces were washed twice with 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid, dried under vacuum, rehydrated with 150 ng of trypsin (Promega sequencing grade) in 10  $\mu$ l ammonium bicarbonate (100 mM), incubated overnight at 37°C, then extracted twice with 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid in a sonicating water bath. For each gel piece, the extracts were pooled and dried in a vacuum centrifuge, redissolved in 2 $\mu$ l of matrix solution (10 mg/ml of  $\alpha$ -cyano, 4-hydroxy, cinnamic acid in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid), and dried on the sample plate of a Voyager Elite MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive Biosystems). Peptides in a trypsin digest of bovine serum albumin (927.4940 and 2045.0285) were used for a close external calibration of the JHE digest. The mass list from the JHE digest was used to search the NCBI nr database (29/3/2000, *Drosophila* only) using ProFound software (Version 4.8.5, Rockefeller University) after the masses of a trypsin autolysis peptide (842.5) and several peptides derived from human keratin were excluded. The largest

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

36

and smallest masses from the best matching sequence were used for internal calibration of the mass spectrum and the search was repeated with a mass tolerance of 30 ppm.

#### 5 Result

Tryptic digest peptides were recovered from two JHE bands from SDS-PAGE gels of purified *D. melanogaster* JHE. The peptide mass spectra from the two gels were virtually identical and one is shown in Figure 2. Only one predicted gene product from *D. melanogaster* (CG8425) was a close match to the submitted mass list ( $Z = 2.36$ ,  $p < 0.05$ ). That gene had been identified as having carboxylesterase-like sequences but its function as juvenile hormone esterase had not been identified.

#### Example 4 - Isolation and sequencing of *D. melanogaster* JHE cDNA.

##### 15 Method

The mRNA sequence of the JHE gene was determined using 3'- and 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). Primers were chosen so that 3'- and 5'-RACE would yield overlapping products and therefore the complete cDNA sequence of the JHE gene. Polyadenylated RNA was isolated from homogenates of whole *D. melanogaster* prepupae, strain 12I11.2, aged as above for peak JHE activity (Campbell et al., 1992). Approximately 50 mg of prepupae yielded 3.4  $\mu\text{g}$  of purified mRNA using the QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech). This mRNA (1  $\mu\text{g}$ ) was used as the template for the 5'RACE System (Gibco BRL). Two antisense primers, (5'-GTT-CTG-ATC-CIT-TAG-GCC-3') (SEQ ID NO:5) and (5'-GGC-CAA-AGT-TAC-CAG-ACA-TGA-3') (SEQ ID NO:6), were designed for nested PCR from the predicted *D. melanogaster* cDNA sequence CG8425, and synthesised by GeneWorks. The 5'RACE product was cloned using the pGem-T Easy Vector System (Promega) and sequenced with pUC/M13 forward and reverse universal vector primers (Bresatec).

For 3'RACE, first strand cDNA was synthesised from 1  $\mu\text{g}$  of *D. melanogaster* prepupal mRNA using AMV Reverse Transcriptase (Promega), and 0.48  $\mu\text{g}$  of a poly-T adaptor primer (5'-GCG-GCC-GCT-TGA-ATT-CCC-AGT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T-3') (SEQ ID NO:7) according to Promega Technical Bulletin No.502, with the addition of fresh DTT (20mM final concentration). Second strand synthesis and PCR amplification of cDNA

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

37

used 50 pmoles of adaptor primer (5'-GCG-GCC-GCT-TGA-ATT-CCC-AC-3') (SEQ ID NO:8) and a CG8425-derived primer (5'-GTT-GTC-TAC-GGC-GAT-GAG-3') (SEQ ID NO:9), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mix, 1X Taq DNA polymerase reaction buffer and 10u Taq DNA polymerase (Gibco BRL), and 1 μl of a 1:20 dilution of the first strand cDNA/mRNA mixture, in a total volume of 50 μl. The following amplification conditions were used: 3 minutes at 94°C for initial denaturation followed by 40 cycles of 94°C for 45 seconds, 50°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes. Final extension conditions were 72°C for 7 minutes. A second, hemi-nested round of PCR was performed using 1 μl of the first reaction mixture (purified using the QAIquick PCR Purification Kit, Qiagen), 50 pmoles each of adaptor primer and another CG8425-derived primer (5'-CGC-ACT-ACC-TGT-AAT-GGT-CTA-3') (SEQ ID NO:10). Conditions and other reagents were as above except that the annealing was performed at 57°C. The gel purified product (QAIquick PCR Purification Kit, Qiagen) was cloned into the pSTBlue-1 vector (Perfectly Blunt Cloning Kit, Novagen) and sequenced. All incubations and PCR cycling was performed on either a PerkinElmer GeneAmp PCR System 9700 or 2400. Sequencing was performed by the ABI Prism BigDye terminator method (Perkin-Elmer).

20

#### Result

The open reading frame encoding *D. melanogaster* JHE, and the translation thereof, is provided in Figure 3. The isolated *D. melanogaster* JHE cDNA shares some common sequence to the *Drosophila* genome project's predicted product CG8425 (Adams et al., 2000). The cDNA confirms the predicted CG8425 product except that the fifth predicted intron was not removed; instead there is an in-frame stop codon immediately after the predicted splice site followed by a polyadenylation signal and a polyA tail.

Conserved features of carboxylesterases found in JHE of the present invention include a catalytic triad composed of Ser213, His471 and Glu346. Also conserved is an additional Ser [239 in JHE] that is found in the active site of all catalytically active serine esterases and is proposed to have an essential function. Putative oxyanion hole residues are conserved (Gly132, Gly133 and Ala214), as are a pair of Cys residues (90 and 108) forming a disulphide linkage, and residues forming salt bridges (Arg67 and Glu106,

35

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

38

Arg163 and Asp185). There is a predicted signal peptide (cleaving after Ala20) consistent with JHE being secreted into the haemolymph of prepupae.

*D. melanogaster* JHE shows 29% identity overall with the full-length sequences of JHE from the lepidopterans *Heliothis virescens* and *Choristoneura fumiferana* (Feng et al., 1999). This is only slightly greater than the degree of identity found among carboxylesterases in general.

Full or partial cDNA or amino acid sequences of JHEs are available from several lepidopterans and two coleopterans (Hanzlik et al. 1989; Thomas et al., 2000) but none from *D. melanogaster* or any other dipteran. JHE of the present invention could be used in preference to the *H. virescens* JHE in at least two situations. Firstly, it might be more effective for degrading JH in non-lepidopteran insects, especially higher Diptera, as a consequence of a different spectrum of binding preferences among the different forms of JH. *D. melanogaster* JHE shows similar kinetics to the Lepidopteran JHE with JHIII but it also shows good binding affinity for JHB<sub>3</sub>, the form of JH that is apparently unique to the higher Diptera. It is reasonable to assume that the *D. melanogaster* enzyme has evolved to hydrolyse JHB<sub>3</sub> efficiently. Secondly, JHE of the present invention might be more effective in Lepidoptera if its structure is sufficiently different from the lepidopteran enzyme to avoid recognition by a specific mechanism for the removal of JHE.

#### Example 5 - In vitro expression of JHE.

##### Method

RNA was isolated from *D. melanogaster* as described in Example 4.

The JHE cDNA was amplified from the RNA using the oligonucleotides JheRTPCR.F2 (5'CGCGGATCCGCGATGCTACAACCTGCTGCTTCT 3') (SEQ ID NO:11) and JheRTPCR.R2 (5'GCTCTAGAGCTTATACTTTTCGTTGAGTATAT 3') (SEQ ID NO:12) that contain *Bam*HI and *Xba*I restriction enzyme sites respectively (underlined), with an additional stop codon (underlined) in the case of the latter. The SUPERScript One-Step RT-PCR with PLATINUM *Taq* kit (Life Technologies) was used to amplify the *JHE* cDNA. The 50 $\mu$ l reaction contained (final concentrations); 1x Reaction Mix, 200ng *D. melanogaster* prepupal RNA, 0.2 $\mu$ M JheRTPCR.F2, 0.2 $\mu$ M JheRTPCR.R2, 1 $\mu$ l RT/PLATINUM *Taq* Mix. The following amplification cycles were used; 50°C for 30 min, 94°C for 2 min,

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

39

followed by 35 cycles of 94°C for 15 sec, 48°C for 30 sec, 72°C for 2 min, finished with a final amplification step of 72°C for 10 min.

The *Bam*HI and *Xba*I digested RT-PCR product was purified by agarose gel electrophoresis and the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), then  
5 ligated into the pFastBac1 plasmid multiple cloning site, previously digested with *Bam*HI and *Xba*I. The ligation mix was transformed into TG-1 heat shock cells and bacmid DNA prepared and isolated according to the Instruction Manual, BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systems (Gibco BRL LIFE TECHNOLOGIES).

10 Sf9 cells were transfected with the recombinant DNA prepared above according to the Instruction Manual, BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systems (Gibco BRL LIFE TECHNOLOGIES) with the following modifications. Grace's cell culture medium was substituted for Sf-900 II Serum Free  
15 Buffered Saline, Solution B contained 15µl DOTAP transfection reagent and 35µl 1xHBS. After the initial cell wash, cells were overlaid with 1.5ml Grace's cell culture medium without Foetal Calf Serum or antibiotics and the complete transfection mixture was added to create JHE/pFastBac1 viral supernatant (first passage) which was harvested 72 hours after the start of  
20 transfection.

The JHE/pFastBac1 viral supernatant titre was amplified in Sf9 cell mono-layer cultures grown in Grace's cell culture medium. A 25 cm<sup>2</sup> flask was seeded to high confluence (approximately 2x10<sup>8</sup> cells) and 2 ml of  
25 JHE/pFastBac1 viral supernatant (first passage) was added to a total of 3 ml of Grace's cell culture medium and incubated at 27 °C for 72 hours. The culture was harvested and centrifuged at 100g for 5 min, the JHE/pFastBac1 viral supernatant (second passage) was removed. This supernatant (1ml) was used to infect a 75 cm<sup>2</sup> flask at high confluence, approximately 5x10<sup>9</sup> cells, in 20  
30 ml of Grace's cell culture medium. The 75 cm<sup>2</sup> infected culture was incubated at 27°C and harvested after 72 hours, centrifuged at 100g for 5 min to remove cells from the JHE/pFastBac1 viral supernatant (third passage) which was titred and used to infect the final expression culture.

Expression of the JHE gene was performed in a 10 ml suspension culture of Sf9 cells with a concentration of 1.5x10<sup>8</sup> cells/ml in HyQ SFX-  
35 Insect serum free medium (HyClone) using JHE/pFastBac1 viral supernatant (third passage) at a multiplicity of infection of 5 pfu/ml. As a control another

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

40

flask of Sf9 cells was prepared in an identical manner except that the virus had not been modified with JHE cDNA. The suspension cultures were incubated at 27°C, with shaking for 72 hours then centrifuged at 100g for 5 min. Supernatants were stored at -80°C. Pelleted cells from both flasks were  
5 resuspended in 800  $\mu$ l 0.1M phosphate buffer, pH 8.0 for final cell densities of  $1 \times 10^8$  cells/ml and stored at -80°C.

The JHE activities of the resuspended cell pellets (10 $\mu$ l) and the supernatants (10 $\mu$ l) were determined using the assay described in Example 1 and adjust to reflect the activities of the original 10ml cultures.  
10

#### Result

Forty four-fold more JHE activity was found in the culture expressing JHE cDNA (15 nmoles/min/10ml culture) compared with the control culture (0.34 nmoles/min/10ml culture) confirming that the *D. melanogaster* JHE  
15 cDNA encodes a protein with JHE activity. Most of the JHE activity detected in the control culture was present in the cells (0.27 nmoles/min/10ml culture) rather than the supernatant fraction (0.07 nmoles/min/10ml culture). In contrast most of the JHE activity in the culture expressing JHE cDNA was found in the supernatant (14.7 nmoles/min/10ml culture) rather than the cells  
20 (0.19 nmoles/min/10ml culture). This shows that *D. melanogaster* JHE is secreted from Sf9 cells, consistent with the predicted signal peptide for secretion described in Example 4.

Any discussion of prior art documents, acts, materials, devices, articles  
25 or the like which has been included in the present specification has been so solely for the purpose of providing a context for the present invention. It is not suggested or represented that any or all of these matters formed part of the prior art base or were common general knowledge in the field relevant to the present invention as it existed before the priority date of each claim of  
30 this application.

All publications discussed above are incorporated herein in their entirety.

It will be appreciated by persons skilled in the art that numerous variations and/or modifications may be made to the invention as shown in the  
35 specific embodiments without departing from the spirit or scope of the

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

41

invention as broadly described. The present embodiments are, therefore, to be considered in all respects as illustrative and not restrictive.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

42

**References:**

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt R.A. et al., (2000) *Science* **287**, 2185-2195.
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- 5  
Campbell, P.M., Healy M.J., Oakeshott J.G. (1992) *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 665-677.
- Campbell, P. M., Oakeshott, J. G., and Healy, M. J. (1998) *Insect Biochem. Molec. Biol.* **28**, 501-515.
- 10  
Cleland, W. W. (1979) *Methods Enzymol.* **63**, 103-138.
- Cusson, M., Yagi, K.J., Ding, Q., Duve, H., Thorpe, A., McNeil, J.N. and Tobe, S.S. (1991) *Insect Biochem.* **21**, 1-6.
- 15  
Dougherty W.G. and Parks, T.D. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 399-405.
- Dunbrack, R.L, Jr, Gerloff, D.L., Bower, M., Chen, X., Lichtarge, O. and Cohen, F.E. (1997). *Folding and Design*, 2:R27-42.
- 20  
Feng, Q.L., Ladd, T.R., Tomkins, B.L., Sundaram, M., Sohi, S.S., Retnakaran, A., Davey, K.G. and Palli, S.R. (1999) *Mol. Cell. Endocrinol.* **148**, 95-108.
- 25  
Hammock, B. D. and Roe, R. M. (1985) *Methods Enzymol.* **111**, 487-494.
- Hanzlik, T.N., Abdel-Aal, Y.A., Harshman, L.G. and Hammock, B.D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12419-12425.
- 30  
Hanzlik, T.N., Christian, P. and Gordon, K. (1999) *Pesticide Outlook* **10**, 22-26.
- Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988) *Nature* **334**, 585-591.
- Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* **48**, 443-453.
- 35  
Perriman, R., Delves, A. and Gerlach, W.L. (1992) *Gene* **113**, 157-163.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

43

Richard, D. S., Applebaum, S. W., Sliter, T. J., Baker, F. C., Schooley, D. A., Reuter, C. C., Henrich, V. C. and Gilbert, L. I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 1421-1425.

5

Riddiford, L.M. (1993) *Receptor* **3**:203-209.

Schooley, D. A., Baker, F. C., Tsai, L. W., Miller, C. A. and Jamieson, G. C. (1984) In *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate*

10 *Hormones* (Edited by Hoffman, J. and Porchet, M.), pp. 373-383. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Shippy, R., Lockner, R., Farnsworth, M. and Hampel, A. (1999) *Mol. Biotech.* **12**, 117-129.

15

Thomas, B.A., Hinton, A.C., Moskowitz, H., Severson, T.F. and Hammock, B.D. (2000) *Insect Biochem.* **30**, 529-540.

Waterhouse, P.M., Graham, M.W. and Wang, M.B. (1998) *Proc Natl Acad Sci*  
20 *USA* **95**, 13959-13964.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

44

**CLAIMS:**

1. A method of identifying an arthropod control agent, the method comprising
- 5 a) exposing a polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1 to a candidate agent, and  
b) assessing the ability of the candidate agent to modulate the juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.
- 10 2. The method according to claim 1, wherein the agent inhibits juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.
3. The method according to claim 1, wherein the agent enhances juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.
- 15 4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein the polypeptide is at least 300 amino acids in length.
5. A method of identifying an arthropod control agent, the method comprising
- 20 a) exposing a polypeptide which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1 to a binding partner which binds the polypeptide, and a candidate agent, and  
b) assessing the ability of the candidate agent to compete with the
- 25 binding partner for binding to the polypeptide.
6. The method of claim 5, wherein the binding partner is detectably labeled.
- 30 7. The method of claim 5 or claim 6, wherein the binding partner is juvenile hormone.
8. A method of identifying an arthropod control agent, the method comprising
- 35 (a) determining the atomic coordinates defining the three-dimensional structure of a polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

45

least 90% identical to SEQ ID NO:1;

(b) selecting a candidate compound by performing rational drug design with the atomic coordinates obtained in step (a), wherein said selecting is performed in conjunction with computer modeling; and

5 (c) determining the ability of the candidate compound to modulate the juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.

9. A crystal of a polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1.

10

10. A method of arthropod control agent design comprising using the structural coordinates of a crystal according to claim 9 to computationally evaluate a compound for its ability to modulate juvenile hormone esterase activity of the polypeptide.

15

11. A method of identifying an arthropod control agent, the method comprising

a) exposing a polynucleotide encoding a polypeptide with juvenile hormone esterase activity which is at least 90% identical to SEQ ID NO:1, to a candidate agent under conditions which allow expression of the polynucleotide, and

20

b) assessing the ability of the candidate agent to modulate levels of polypeptide produced by the polynucleotide.

25

12. The method according to claim 11, wherein the agent inhibits production of the polypeptide.

13. A method of identifying an arthropod control agent, the method comprising

30

a) exposing a polynucleotide which is at least 90% identical to SEQ ID NO:4 to a candidate agent, and

b) assessing the ability of the candidate agent to hybridize and/or cleave the polynucleotide.

35

14. A substantially purified polypeptide having juvenile hormone esterase activity, the polypeptide being selected from the group consisting of:

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

46

- (i) a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:1; or  
(ii) a polypeptide which has a sequence which is at least 90% identical to (i);  
wherein the polypeptide is not more than 600 residues in length.
- 5
15. The substantially purified polypeptide of claim 14, wherein the polypeptide has a sequence which is at least 95% identical to (i).
16. The substantially purified polypeptide of claim 14, wherein the  
10 polypeptide has a sequence which is at least 99% identical to (i).
17. The substantially purified polypeptide according to any one of claims 14 to 16, wherein the polypeptide is at least 300 amino acids in length.
- 15 18. An isolated polynucleotide, the polynucleotide encoding a polypeptide according to any one of claims 14 to 17.
19. The isolated polynucleotide of claim 18, the polynucleotide having a sequence selected from:
- 20 (i) a sequence of nucleotides shown in SEQ ID NO:3;  
(ii) a sequence of nucleotides shown in SEQ ID NO:4; or  
(iii) a sequence which hybridizes to (i) or (ii) under high stringency conditions.
- 25 20. The isolated polynucleotide of claim 19, wherein the polynucleotide has a sequence which is less than 1660 nucleotides.
21. An antisense polynucleotide which hybridizes under high stringency conditions to a polynucleotide according to any one of claims 18 to 20.
- 30 22. The antisense polynucleotide of claim 21, which comprises a catalytic domain.
23. A double stranded RNA (dsRNA) molecule comprising a  
35 polynucleotide according to any one of claims 18 to 20.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

47

24. The dsRNA molecule of claim 23, wherein the dsRNA is encoded by a single open reading frame and the resulting dsRNA molecule has a stem loop structure at one end of the molecule.
- 5 25. A fusion protein comprising a polypeptide according to any one of claims 14 to 17 fused to at least one other polypeptide sequence.
26. The fusion protein of claim 25, wherein the at least one other polypeptide is selected from the group consisting of: a polypeptide that  
10 enhances the stability of the polypeptide of any one of claims 14 to 17, a polypeptide that acts as an immunopotentiator to enhance an immune response to a polypeptide of any one of claims 14 to 17, and a polypeptide that assists in the purification of the fusion protein.
- 15 27. An isolated polynucleotide that encodes a fusion protein according to claim 25 or claim 26.
28. A vector comprising a polynucleotide according to any one of claims claim 18 to 20 or 27.
- 20 29. The vector according to claim 28, wherein the polynucleotide is operably linked to a promoter.
30. A vector comprising an antisense polynucleotide according to claim 21  
25 or 22.
31. The vector according to claim 30, wherein the antisense polynucleotide is operably linked to a promoter.
- 30 32. A vector comprising an open reading frame(s) which upon expression form a dsRNA molecule according to claim 23 or 24.
33. The vector according to claim 32, wherein the dsRNA molecule is operably linked to a promoter.
- 35

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

48

34. The vector according to any one of claims 28 to 33, wherein the vector is a plasmid or a virus.
35. The vector of claim 34, wherein the viral vector is a baculovirus.
- 5 36. The vector according to any one of claims 28 to 33, wherein the vector is a capsid.
37. A host cell transformed or transfected with the vector according to any one of claims 28 to 36.
- 10 38. The host cell of claim 37 which is a bacterial cell.
39. The host cell of claim 37 which is an arthropod cell.
- 15 40. The host cell of claim 37 which is an insect cell.
41. A transgenic plant, the plant having been transformed with a polynucleotide according to any one of claims 18 to 20 or 27, wherein the plant expresses the polynucleotide.
- 20 42. A transgenic plant, the plant having been transformed with an antisense polynucleotide according to claim 21 or claim 22, wherein the plant expresses the antisense polynucleotide.
- 25 43. A transgenic plant, the plant having been transformed with open reading frame(s) which, upon expression, form a dsRNA molecule according to claim 23 or claim 24, wherein the plant produces the dsRNA molecule.
- 30 44. A transgenic non-human animal, the animal having been transformed with a polynucleotide according to any one of claims 18 to 20 or 27, wherein the animal expresses the polynucleotide.
- 35 45. A transgenic non-human animal, the animal having been transformed with an antisense polynucleotide according to claim 21 or claim 22, wherein the animal expresses the antisense polynucleotide.

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

49

46. A transgenic non-human animal, the animal having been transformed with open reading frame(s) which, upon expression, form a dsRNA molecule according to claim 23 or claim 24, wherein the animal produces the dsRNA molecule.
47. An arthropod control composition, the composition comprising an agent identified according to any one of claims 1 to 8 or 10 to 13, and an agriculturally acceptable carrier.
48. An arthropod control composition, the composition comprising a polypeptide according to any one of claims 14 to 17, and an agriculturally acceptable carrier.
49. An arthropod control composition, the composition comprising a vector according to any one of claims 28 to 36, and an agriculturally acceptable carrier.
50. A method of controlling an arthropod population, the method comprising exposing members of the arthropod population to an arthropod control composition according to any one of claims 47 to 49.
51. The method according to claim 50, wherein the arthropod is an insect.
52. A process for preparing a polypeptide according to any one of claims 14 to 17, the process comprising cultivating a host cell transformed or transfected with a vector according to claim 29 under conditions providing for expression of the polynucleotide encoding the polypeptide, and recovering the expressed polypeptide.
53. A kit for identifying an arthropod control agent, the kit comprising a polypeptide according to any one of claims 14 to 17, and means for determining juvenile hormone esterase activity.
54. A kit for identifying an arthropod control agent, the kit comprising a polynucleotide according to any one of claims 18 to 20, and means for

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

50

determining juvenile hormone esterase activity of a polypeptide encoded by the polynucleotide.

1/3

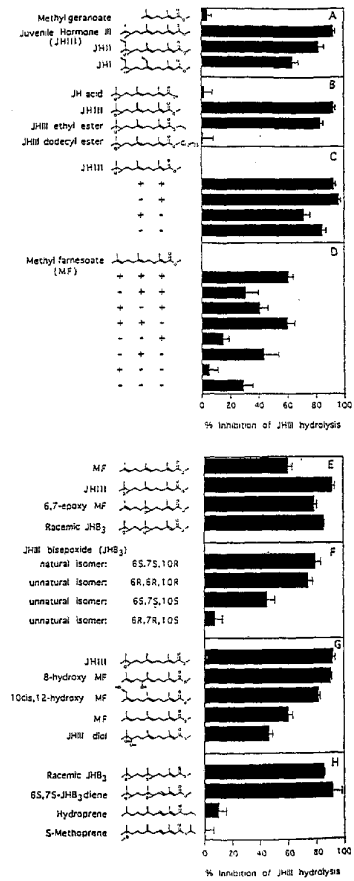


Figure 1

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

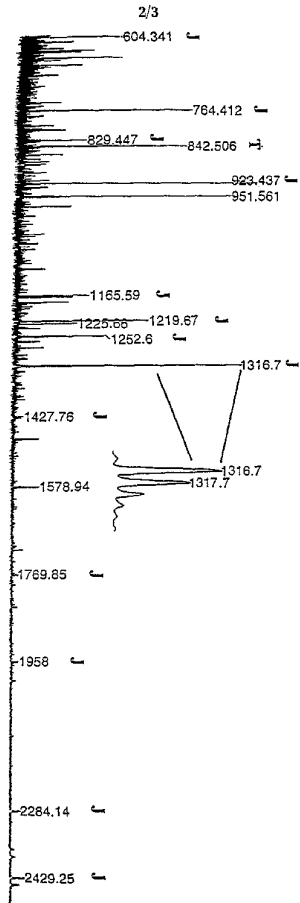


Figure 2



WO 02/060940

PCT/AU02/00101

1/11

## SEQUENCE LISTING

5 <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> Juvenile hormone esterases  
10

<150> AU FR2821

<151> 2001-02-01  
15

<160> 12  
20

<170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 554

30 <212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

35 <400> 1

Leu Ala Thr Val Asp Gln Leu Thr Val Cys Pro Pro Ser Val Gly Cys  
1 5 10 15

40 Leu Lys Gly Thr Asn Leu Gln Gly Tyr Gln Ser Glu Arg Phe Glu Ala  
20 25 30

45 Phe Met Gly Ile Pro Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Gly Asp Leu Arg Phe  
35 40 45

50 Ser Asn Pro Lys Val Met Pro Lys Leu Leu Gly Met Tyr Asp Ala Ser  
50 55 60

55 Ala Pro Lys Met Asp Cys Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Leu Pro Thr Pro  
65 70 75 80

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

2/11

Val Val Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Val Tyr Arg Pro  
85 90 95

5 Glu Ile Arg Lys Ser Ala Leu Pro Val Met Val Tyr Ile His Gly Gly  
100 105 110

10 Gly Phe Phe Gly Gly Ser Ala Gly Pro Gly Val Thr Gly Pro Glu Tyr  
115 120 125

15 Phe Met Asp Ser Gly Glu Val Ile Leu Val Thr Met Ala Tyr Arg Leu  
130 135 140

Gly Pro Phe Gly Phe Leu Ser Thr Gln Asp Ala Val Met Ser Gly Asn  
145 150 155 160

20 Phe Gly Leu Lys Asp Gln Asn Leu Ala Leu Arg Trp Val Gln Arg Asn  
165 170 175

25 Ile Arg Phe Phe Gly Gly Asp Pro Gln Arg Val Thr Ile Phe Gly Gln  
180 185 190

30 Ser Ala Gly Gly Val Ala Ala His Met His Leu Leu Ser Pro Arg Ser  
195 200 205

35 His Gly Leu Phe His Arg Val Ile Ser Met Ser Gly Thr Ala Asn Val  
210 215 220

40 Pro Phe Ala Ile Ala Glu Gln Pro Leu Glu Gln Ala Arg Leu Leu Ala  
225 230 235 240

Glu Phe Ala Asp Val Pro Asp Ala Arg Asn Leu Ser Thr Val Lys Leu  
245 250 255

45 Thr Lys Ala Leu Arg Arg Ile Asn Ala Thr Lys Leu Leu Asn Ala Gly  
260 265 270

50 Asp Gly Leu Lys Tyr Trp Asp Val Asp His Met Thr Asn Phe Arg Pro  
275 280 285

55 Val Val Glu Glu Gly Leu Glu Val Asp Ala Phe Leu Asn Ala His Pro  
290 295 300

Met Asp Met Leu Ala Gln Gly Met Pro Thr Ser Ile Pro Leu Leu Leu



WO 02/060940

PCT/AU02/00101

4/11

Asn Leu Trp Ser His Ile Leu Asn Glu Lys  
 545 550  
 5  
 <210> 2  
 <211> 574  
 10 <212> PRT  
 <213> Drosophila melanogaster  
 15  
 <400> 2  
 20 Met Leu Gln Leu Leu Leu Leu Gly Gln Leu Leu Ala Gly Pro Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Phe Cys Ala Ala Leu Ala Thr Val Asp Gln Leu Thr Val Cys Pro Pro  
 25 20 25 30  
 Ser Val Gly Cys Leu Lys Gly Thr Asn Leu Gln Gly Tyr Gln Ser Glu  
 35 40 45  
 30 Arg Phe Glu Ala Phe Met Gly Ile Pro Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Gly  
 50 55 60  
 35 Asp Leu Arg Phe Ser Asn Pro Lys Val Met Pro Lys Leu Leu Gly Met  
 65 70 75 80  
 40 Tyr Asp Ala Ser Ala Pro Lys Met Asp Cys Ile Gln Lys Asn Tyr Leu  
 85 90 95  
 Leu Pro Thr Pro Val Val Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn  
 100 105 110  
 45 Val Tyr Arg Pro Glu Ile Arg Lys Ser Ala Leu Pro Val Met Val Tyr  
 115 120 125  
 50 Ile His Gly Gly Gly Phe Phe Gly Gly Ser Ala Gly Pro Gly Val Thr  
 130 135 140  
 55 Gly Pro Glu Tyr Phe Met Asp Ser Gly Glu Val Ile Leu Val Thr Met  
 145 150 155 160

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

5/11

Ala Tyr Arg Leu Gly Pro Phe Gly Phe Leu Ser Thr Gln Asp Ala Val  
165 170 175

5 Met Ser Gly Asn Phe Gly Leu Lys Asp Gln Asn Leu Ala Leu Arg Trp  
180 185 190

10 Val Gln Arg Asn Ile Arg Phe Phe Gly Gly Asp Pro Gln Arg Val Thr  
195 200 205

15 Ile Phe Gly Gln Ser Ala Gly Gly Val Ala Ala His Met His Leu Leu  
210 215 220

Ser Pro Arg Ser His Gly Leu Phe His Arg Val Ile Ser Met Ser Gly  
225 230 235 240

20 Thr Ala Asn Val Pro Phe Ala Ile Ala Glu Gln Pro Leu Glu Gln Ala  
245 250 255

25 Arg Leu Leu Ala Glu Phe Ala Asp Val Pro Asp Ala Arg Asn Leu Ser  
260 265 270

30 Thr Val Lys Leu Thr Lys Ala Leu Arg Arg Ile Asn Ala Thr Lys Leu  
275 280 285

35 Leu Asn Ala Gly Asp Gly Leu Lys Tyr Trp Asp Val Asp His Met Thr  
290 295 300

Asn Phe Arg Pro Val Val Glu Glu Gly Leu Glu Val Asp Ala Phe Leu  
305 310 315 320

40 Asn Ala His Pro Met Asp Met Leu Ala Gln Gly Met Pro Thr Ser Ile  
325 330 335

45 Pro Leu Leu Leu Gly Thr Val Pro Gly Glu Gly Ala Val Arg Val Val  
340 345 350

50 Asn Ile Leu Gly Asn Glu Thr Leu Arg Gln Ser Phe Asn Leu Arg Phe  
355 360 365

55 Asp Glu Leu Leu Gln Glu Leu Leu Glu Phe Pro Ala Ser Phe Ser Gln  
370 375 380

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

6/11

Asp Arg Arg Glu Lys Met Met Asp Leu Leu Val Glu Val Tyr Phe Gln  
 385 390 395 400

5 Gly Gln His Glu Val Asn Glu Leu Thr Val Gln Gly Phe Met Asn Leu  
 405 410 415

10 Ile Ser Asp Arg Gly Phe Lys Gln Pro Leu Tyr Asn Thr Ile His Lys  
 420 425 430

15 Asn Val Cys His Thr Pro Asn Pro Val Tyr Leu Tyr Ser Phe Asn Tyr  
 435 440 445

20 Gln Gly Pro Leu Ser Tyr Ala Ser Ala Tyr Thr Ser Ala Asn Val Thr  
 450 455 460

25 Gly Lys Tyr Gly Val Val His Cys Asp Asp Leu Leu Tyr Leu Phe Arg  
 465 470 475 480

30 Ser Pro Leu Leu Phe Pro Asp Phe Gln Arg Asn Ser Thr Glu Ala Lys  
 485 490 495

Val Ile His Ser Phe Val Asp Tyr Phe Val His Phe Ala Lys Phe Gly  
 500 505 510

35 Lys Pro Arg Asn Ser Glu Ser Leu Thr Pro Cys Ser Ile Glu Val Leu  
 515 520 525

40 Gln Ser Arg Pro Asp Gly Ile Cys Asp Tyr His Glu Phe Ala Asn Ala  
 530 535 540

45 Pro Asp Ala Tyr Gln Gly Phe Glu Val His Val Ala Ser Glu Phe Gln  
 545 550 555 560

50 Thr Asp Arg Val Asn Leu Trp Ser His Ile Leu Asn Glu Lys  
 565 570

<210> 3  
 <211> 1869  
 <212> DNA  
 55 <213> *Drosophila melanogaster*

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

7/11

<400> 3  
 5 atgctacaac tggctgcttct tggacagctc ttggctggcc ctggaccctt ctgctgggccc 60  
 ttggccactg tggaccagct caccgtgtgc ccaccgagcg tggctgtcct gaagggcacc 120  
 aatctccagg gctatcagtc cgaagatcc gaggccttca tgggcattcc ctatgcccctg 180  
 10 cctcccattg gagatctgag attcagtaat cccaagtaa tggccaagt gctggggatg 240  
 tacgatgcca gtgcgccaa gatggaactc atccagaaga actatctgct gccaacgcca 300  
 15 gttgtctacg gcgatgagga ttccctctat ttgaatgtct acaggccaga gattcgaaaa 360  
 tccgcactac ctgtaattgt ctatatccat gggcgggct tctttggcgg ctctgcagga 420  
 ccaggggtaa ctggaccoga atactttatg gactcgggtg aagtattct ggtgaccatg 480  
 20 gcgtatagac taggaccctt tggattocta tcgacgacg atgctgtgat gctgtgtaac 540  
 tttggctaa aggatcagaa cttggcactg cyttgggtgc agcgaacat tcttttctt 600  
 ggcgggac ctcagcgggt gaccatttcc gcccaagt cggcgggct ggtgcccac 660  
 25 atgcaactgc tgagtcccag atccatggc ctgttccatc gaggatcag catgagcggc 720  
 acggccaatg tgcctctgc cattgcccag cagccactgg agcaggctcg cctctggcg 780  
 30 gaggttgacg acgtgccaga tggcaggaat ctgagtacag taaagctaac caagccactg 840  
 cgaagtataa atgcccaca gctactgaat gccggcagtg gtctcaagta ctgggatgtg 900  
 gatcacatga ccaatttccg tccagtggc gaggaggtat tggagtcga tgcctttctc 960  
 35 aacgcgcabc ccatggatat gctggccaa ggaatgcca catccattcc cctgcttctc 1020  
 ggcactgttc caggtgaggg tgcagtoagg gtggtgaca ttctgggcaa tgagacgcta 1080  
 40 gcgcagagtt ttaacttgcc attcagcag ctgctgcagg aactgctgga attcccgcc 1140  
 agctttagcc aggatagcgc cgaaaagatg atgactctgc tggtggaagt gtatttccag 1200  
 ggcagcatg aagtcaacga gctgaccgtc caagggttta tgaattaat atctgatagg 1260  
 45 ggtttcaagc aaccctata caataccatt cacaaaaatg ttgccaac gccgaatccc 1320  
 gtctacttat atagtttcaa ctatcaagga cctcttagct atgctctgc ctatacatcc 1380  
 50 gcgaatgta ccggaataa tggagtatg cactgcgatg atctctctta tctgttccgt 1440  
 agtccactgc tcttcccga ctttcagcgg aactccacgg aggcgaaggt gatacatcc 1500  
 tttgttgatt acttctgca cttcccaag tttgaaaa ccaggaatc cgagtcactg 1560  
 55 accccctgct ccattgaggt gctccagtc cgtcccagc gaatatgca ctatcacgaa 1620

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

8/11

```

ttcgcaaatg caccagatgc ctaccaaggc ttcgaggttc acgtggccag cgaattccaa 1680
acggataggg tgaatctatg gtogcatata ctcaacgaaa agtaaaatag ttctaaactc 1740
5  tgotcaacog aaaaactaat gtacatata gaacggttgg tactgaaaa agtogyhaga 1800
agttaagatag aatgcagota ttgtaagaaa ataaactact atcaataact aagaaaaaaa 1860
aaaaaaaaa 1869
10
<210> 4
<211> 1665
15 <212> DNA
<213> Drosophila melanogaster
20
<400> 4
ttggccaactg tggaccaact caccgtgtgc ccaccgagcg tgggctgect gaagggcacc 60
25 aatctccagg gctatcaatc cgaagatgc gaggccttca tgggcatlcc ctatgcctg 120
cctcccatg gagatctgag attcagtaat cccaaggtaa tgcocaaagt gctggggatg 180
tacyatgcca gtggoccaa gatggactgc atccagaaga actatctgct gccaacgcca 240
30 gttgtctac gcatgagga ttgcctctat ttgaatgtct acaggccaga gattcgaaaa 300
tccgcactac ctgtaatggt ctatatccat ggcggcggct tctttggcgg ctctgcagga 360
35 ccaggggtaa ctggaccoga atactttatg gactcgggtg aagtgattct ggtgacatg 420
gogtatagac taggaocctt tggattccta tcgacgcagg atgctgtgat gctcggtaac 480
tttggcctaa aggatoagaa cttygcactg cyttgggtgc agcgcacat togtttcttt 540
40 ggcggcgate ctacagcgggt gaocatttct gccaaagtg cggcggcgt ggotgcccac 600
atgcactgc tgagtccag atccatggc ctgttccatc gagtgatcag catgagcggc 660
45 acggccaatg tgcacttcgc cattgcccag cagccaactg agcaggctcg cctcctggcg 720
gagtttgacg acgtgcaga tgcaggaaat ctgagtacag taaagtaac caaggcactg 780
cgactataa atgcaccaca gctactgaat gccggcgatg gtctcaagta ctgggatgtg 840
50 gatcacatga ccaatttcg tccagtgtc gaggagggat tggagtcga tgcatttctc 900
aacgcgcate coatggatat gctggcccaa ggaatgccca catcattcc cctgttctc 960
55 ggcactgttc caggtgaggg tgcagtcagg gtggtgaca ttctgggcaa tgagacgcta 1020
cgccagagtt ttaacttgcg attcgaagag ctgctgcagg aactgctgga attccggcc 1080

```

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

9/11

agctttagcc aggataggcg cgaagaagatg atggatctgc tgggtggaagt gtatttccag 1140  
 5 ggccagcatg aagtcacaaga gctgaccctc caagggttta tgaatttaat atctgatagg 1200  
 ggtttcaagc aacctatata caataccatt cacaaaaatg tttgccacac gcogaatccc 1260  
 gtctacttat atagtttcaa ctatcaagga cctcttagct atgctctctg ctatacatcc 1320  
 10 gogaatgtga ccggaataa tggagtagtg cactgcgatg atctgctota tctgttccgt 1380  
 agtccactgc tctttccoga ctttcagcgg aactccacgg aggcgaaggt gatacaattcc 1440  
 tttgttgatt acttcgtgca ctccccaag tttggaaac ccaggaattc cgagtcactg 1500  
 15 accccctgct ccattgaggt gctccagta cgtccgacg gaatatgoga ctatcaagaa 1560  
 ttcccaaatg caccagatgc ctaccaagc ttccaggttc acgtggccag cgaattccaa 1620  
 20 accgataggg tgaatctatg gtcgcatata ctcaacgaaa agtaa 1665

&lt;210&gt; 5

25 &lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

30 <213> *Drosophila melanogaster*

&lt;400&gt; 5

35 gttctgatcc tttaggcc 18

&lt;210&gt; 6

40 &lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

45 <213> *Drosophila melanogaster*

&lt;400&gt; 6

50 ggccaaagtt accagacatc a 21

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 37

55 &lt;212&gt; DNA

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

10/11

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Poly-T adaptor primer

<400> 7

10 ggggcccgtt gaattcccac tttttttttt tttttttt 37

<210> 8

15 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

25 <223> Adaptor primer for 3'RACE

<400> 8

ggggcccgtt gaattcccac 20

30 <210> 9

<211> 18

35 <212> DNA

<213> Drosophila melanogaster

40

<400> 9

gttgtctacg gcgatgag 18

45 <210> 10

<211> 21

<212> DNA

50 <213> Drosophila melanogaster

55 <400> 10

cgcactacct gtaatggtct a 21

WO 02/060940

PCT/AU02/00101

11/11

<210> 11  
<211> 32  
5 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
10  
<220>  
<223> PCR primer  
15 <400> 11  
ogcggatccg cgatgctaca actgctgctt ct 32  
20 <210> 12  
<211> 33  
<212> DNA  
25 <213> Artificial Sequence  
30 <220>  
<223> PCR primer  
<400> 12  
35 gctctagagc ttattacttt tcgttgagta tat 33  
40

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00101															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>																	
Int. Cl. <sup>7</sup> : C07K 14/435; C12N 15/10; A01N 63/00																	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>																	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) ANGIS, BLAST sequence searches on SEQ ID NO:1; STN File CA, Biosis, WPIDS, Medline, keyword juvenile hormone esterase and drosophila melanogaster.																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	GENPEPT Accession Number AAK07833, "Drosophila melanogaster juvenile hormone esterase mRNA, complete cds", submitted 11 September 2000.	1-54															
X	GENPEPT Accession Number AAF58061, "Drosophila melanogaster genomic scaffold", submitted 21 March 2000 & M. D. Adams et al., Science 287 (5461), 2185-2195 (2000)	1-54															
X	STN FILE MEDLINE Abstract 1998384794 & P. M. CAMPBELL et al., Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28(7), pp. 501-515. See abstract.	1-54															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex																	
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width: 33%;">"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 28 March 2002		Date of mailing of the international search report ~ 8 APR 2002															
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@pastralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer  L.F. MCCAFFERY Telephone No. (02) 6283 2573															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/AU02/00101</b>
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos : <b>47, 50, 51</b> because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: These define compositions and uses of compounds that are identified by the methods of the present application. Such "reach-through" claims may include known matter and cannot be searched economically since it is not clear what may be encompassed by the claims.
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15 Z T D	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	4 H 0 1 1
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/18	C 1 2 N 9/18	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/44	C 1 2 Q 1/44	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50 Z	
	C 1 2 N 5/00 A	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72) 発明者 キャンプベル, ピーター, マルコム

オーストラリア国 2 6 1 4 オーストラリアン キャピタル テリトリー, クック, ウイバレナ  
グループ 2 5

(72) 発明者 クローン, エリカ, ジェーン

オーストラリア国 2 6 1 2 オーストラリアン キャピタル テリトリー, ターナー, マクリー  
ストリート 5 6

(72) 発明者 サザーランド, タラ, ジアン

オーストラリア国 2 6 0 2 オーストラリアン キャピタル テリトリー, ワトソン, バーンサ  
イド ストリート 2 6

(72) 発明者 ラッセル, ロビン, ジョイス

オーストラリア国 2 9 0 3 オーストラリアン キャピタル テリトリー, ワニアサ, サリバン  
クレセント 2 8

(72) 発明者 オークショット, ジョン, グラム

オーストラリア国 2 9 0 3 オーストラリアン キャピタル テリトリー, ワニアサ, サリバン  
クレセント 2 8

F ターム(参考) 2B030 AD08 CA14

2G045 AA35 BB14 BB20 BB24 BB48 BB51 CB17 FB01 FB08 JA01

4B024 AA08 AA10 AA11 AA20 BA11 BA79 BA80 CA04 CA07 CA09

CA12 CA20 DA01 DA02 EA02 GA11 HA11 HA13 HA14 HA17

HA20

4B050 CC01 CC05 DD11 FF04E FF05E FF11E FF12E FF13E LL03 LL05

LL10

4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ32 QQ41 QQ53 QQ61 QQ89 QR08 QR12

QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR57 QR62 QR77 QR80 QS16

QS34 QS36 QS40 QX01 QX02

4B065 AA01X AA58X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BB01

	BC03	BC26	BD14	CA31	CA43	CA46	CA47	CA53		
4H011	AC01	BA01	BB19	BB21	BC03	BC06	BC19	DA15	DC05	DD03
	DH10	DH11								