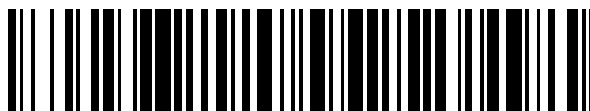


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 844**

51 Int. Cl.:

A01N 25/00 (2006.01)

A61K 35/64 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2004** **E 04781159 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014** **EP 1662867**

54 Título: **Compuestos insecticidas y métodos para la selección de los mismos**

30 Prioridad:

05.09.2003 US 655751

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.08.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF CONNECTICUT (100.0%)
263 FARMINGTON AVENUE
FARMINGTON, CT 06030-6207, US**

72 Inventor/es:

**KING, GLENN y
MCFARLAND, BRIANNA S.**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 488 844 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos insecticidas y métodos para la selección de los mismos

1. Campo de la invención

[0001] La presente invención hace referencia a compuestos biológicos, así como a genes que codifican compuestos biológicos, para su uso como pesticidas, así como a métodos para obtener dichos compuestos.

2. Antecedentes de la técnica relacionada

[0002] Por desgracia, se ha visto cada vez más en las últimas décadas que el empleo de insecticidas químicos convencionales suele provocar consecuencias medioambientales no deseadas. Dichas consecuencias incluyen la toxicidad de organismos que no eran el objetivo como pájaros y peces y peligros para la salud de los humanos. Además

[0003] A lo largo de los últimos años, se han propuesto una cantidad de estrategias “respetuosas con el medio ambiente” para combatir las plagas de insectos fuertemente resistentes como algunas especies de gusano del algodón (p.ej., *Helicoverpa zea*).

[0004] Una propuesta recientemente introducida para enfrentarse los insectos consiste en la producción de cultivos transgénicos que expresan toxinas insecticidas, como las cosechas de algodón y patata genéticamente modificadas que expresan toxinas de proteína a partir de la bacteria de tierra *Bacillus thuringiensis* (Estruch, J.J. et al., *Transgenic plants: An emerging approach to pest control*, Nature Biotechnology 15, 137-141, 1997).

[0005] Una variación de esta estrategia es la liberación de algunos virus específicos de insecto que han sido genéticamente modificados para expresar neurotoxinas insecticidas (Cory, J.S. et al., *Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide*, Nature 370, 138-140, 1994). Los baculovirus, por ejemplo, son virus específicos de artrópodos y ningún miembro de la familia de baculovirus es conocido por infectar ni a vertebrados ni a plantas. La capacidad de infección de algunos baculovirus se limita a unas pocas especies relacionadas dentro de una única familia de insectos lepidópteros (polillas y mariposas) (véase, p.ej., la patente estadounidense núm. 5,639,454). Algunos baculovirus, como el virus de la poliedrosis nuclear de la gardama, sólo afecta a una única especie. Como resultado de su alto nivel de especificidad, los baculovirus se han concebido desde hace tiempo como potenciales agentes de control de plagas y se utilizaron primero como tales en los años 70. Su especificidad significa que los insecticidas baculovirales complementan a los predadores naturales, en lugar de reemplazarlos, como es el caso de muchos insecticidas químicos. Sin embargo, hasta la fecha, los baculovirus se han encontrado solo con un éxito comercial limitado. La mayoría de los baculovirus que ocurren de manera natural tardan entre 4 y 7 días en matar a sus anfitriones e incluso con algunas especies tardan mucho más. Durante este tiempo el insecto continúa alimentándose y perjudicando las cosechas, limitando así la habilidad de los insecticidas baculovirales para completarla con agentes químicos.

[0006] Este defecto se ha abordado mediante baculovirus genéticamente modificados que expresan neurotoxinas específicas de insecto. La expresión de toxinas de insecto heterólogas no sólo reduce el intervalo de tiempo entre la aplicación de virus y la muerte del insecto, sino que también reduce la media de tiempo de alimentación (Prikhood'ko et al., *Effects of simultaneous expression of two sodium channel toxic genes on the properties of baculoviruses as biopesticides*, Biological Control 12, 66-78, 1998). De manera importante, la introducción de genes para las toxinas selectivas de insecto no altera la capacidad de infección intrínseca del baculovirus o su rango de anfitrión natural (Black et al., *Commercialization of baculoviral insecticides*, en The Baculoviruses (ed. Miller, L.K.) 341-387 (Plenum Press, New York, USA, 1997)).

[0007] Nuevos enfoques en cuanto a cómo enfrentarse a las plagas de insectos han estimulado el interés en las toxinas de péptido a partir de venenos de animales, particularmente arañas y escorpiones, que se alimentan de especies de insectos.

[0008] Zlotkin et al., *An Excitatory and a Depressant Insect Toxin from Scorpion Venom both Affect Sodium Conductance and Possess a Common Binding Site*, Arch. Biochem. and Biophysics 240, 877-887, 1985) publica dos toxinas selectivas de insecto a partir del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus*, uno de los cuales indujo una rápida parálisis contractiva excitatoria de las larvas de mosca mientras que el otro indujo una parálisis flácida lenta depresora, con ambas afectando el comportamiento del sodio en las neuronas. De manera similar, la patente canadiense 2,005,658 (concedida en: junio 19, 1990 a Zlotkin et al.) publica una proteína efectiva como insecticida llamada “LqhP35” derivada del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus*.

[0009] Una cantidad de investigadores también reconocieron los venenos de araña como una posible fuente de toxinas específicas de insecto para aplicar en la agricultura (véase, Jackson et al., Ann Rev. Neurosci. 12, 405-

414 (1989)). Por ejemplo, las patentes estadounidenses con núms. 4,855,405 (concedida el: 8 de agosto de 1989 a Yoshioka et al.) y 4,918,107 (concedida el: 17 de abril de 1990 a Nakajima et al.) ambas publican inhibidores de receptor de glutamato obtenidos a partir del veneno de arañas como posibles agentes insecticidas. En las patentes estadounidenses con números 5,457,178 (concedida el: 10 de octubre de 1995), 5,695,959 (concedida el: 9 de diciembre de 1997) y 5,756,459 (concedida el: 26 de mayo de 1998) a Jackson et al. publica una familia de proteínas efectivas como insecticida aisladas a partir del veneno de las arañas *Filistata hibernalis* (una araña común en las casas) y de las arañas *Phidippus audax* (una "araña saltadora").

[0010] Un grupo particular de arañas que han generado un considerable interés en su investigación son las arañas de tela en embudo. WO 89/07608 (publicada el: 24 de agosto de 1989 por Cherksey et al.) revela factores de bajo peso molecular aislados del veneno de las arañas de tela en embudo americanas que se enlaza de manera reversible a los canales de calcio. Adams et al., *Isolation and Biological Activity of Synaptic Toxins from the Venom of the Funnel Web Spider, Agelenopsis aperta*, in *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*, Borkovec and Gelman (eds.) (Humana Press, New Jersey, 1986) describe cómo múltiples toxinas de péptido que antagonizan la transmisión sináptica en insectos se han aislado de la araña *Agelenopsis aperta*. En WO 93/15108, una clase de toxinas de péptido conocidas como las ω -atracotoxinas se publican tras ser aisladas de las arañas de tela de embudo australianas (*Araneae:Heathelidae:Atracinae*) cribando el veneno para la actividad *anti-Helicoverpa* ("anti-gusano del algodón"). Dichas toxinas se publican con un peso molecular de aproximadamente 4000 amu (masa atómica unificada), con entre 36-37 aminoácidos de longitud, y siendo capaces de formar tres enlaces de disulfuro dentro de la cadena. Uno de estos compuestos, llamado ω -ACTX-Hv1 ha demostrado inhibir selectivamente las corrientes de canal activadas por voltaje de un insecto, en lugar de las de un mamífero (Fletcher et al., *The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider*, Nature Struct. Biol. 4, 559-566 (1997)). Se han aislado homólogos de ω -ACTX-Hv1 a partir de la araña de las montañas azules de tela en embudo *Hadromyche versuta* (véase, Wang et al., *Structure-function of ω -atrococtoxin, a potent antagonist of insect voltage-gates calcium channels*, Eur. J., Biochem. 264, 488 – 494 (1999)).

[0011] Mientras que algunas toxinas de péptido insecticida aisladas hasta ahora de los escorpiones y las arañas son alentadoras, sigue existiendo la necesidad de compuestos que muestren una amplia diferencia de toxicidad entre insectos y no insectos y que sigan teniendo una actividad insecticida significativa y actúen rápido.

[0012] Los inventores presentes aislaron, y caracterizaron estructural y funcionalmente, una toxina insecticida novedosa, llamada ω -atracotoxina-Hv2a, a partir del veneno de una araña de red en embudo australiana *H. versuta*. Esta ω -atracotoxina-Hv2a que es el objetivo de la toxina de la patente estadounidense 6,583,264 B2 es un antagonista altamente potente y específico de los canales de calcio de insecto. La toxina ω -atracotoxina-Hv2a de la invención publicada en la patente 6,583,264 B2 no muestra ninguna similitud de secuencia con otras toxinas insecticidas previamente aisladas y ninguna homología de secuencia o estructura con la familia de toxinas insecticidas de omega-atracotoxina-Hv1 anteriormente aislada a partir de *H. versuta* (véase Atkinson et al., *Insecticidal toxins derived from funnel web spider (Atrax or Hadronyche) spiders*, PCT/AU93/00039 (WO 93/15108) (1993); Fletcher et al., *The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider*, Nature Struct. Biol. 4, 559-566 (1997); Wang et al., *Structure-function studies of ω -atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels*, Eur. J. Biochem. 264,488-494 (1999)).

[0013] La invención publicada en U.S. 6,583,264 B2 se dirige al uso de ω -atracotoxina-Hv2a, o la codificación genética para la toxina, como un biopesticida, tanto sola como en combinación con otras toxinas insecticidas o genes de las mismas. También describe el uso de la toxina, o la codificación genética para la toxina, como una criba para compuestos naturales o no naturales que específicamente inhiben los canales de calcio de insecto. Además, la publicación de la patente proporciona en la determinación de la estructura tridimensional de toxina, un modelo para desarrollar imitadores no peptídicos de la toxina que podrían utilizarse como spray foliar de pesticida.

[0014] Según se publica en la patente, se proporciona una toxina polipéptida que es tóxica para insectos adultos y/o larvas con una masa molecular de aproximadamente 4,478 Daltons y una longitud de 45 residuos de aminoácido. El polipéptido es capaz de formar tres enlaces de disulfuro dentro de la cadena. La actividad del polipeptido como una toxina se ha demostrado mediante la rápida parálisis de insectos y/o la potente inhibición de corrientes de calcio de célula entera en neuronas de insecto aisladas. La especificidad filogenética de la toxina polipéptida se demostró mediante la actividad mínima en las preparaciones de músculo-nervio en ratas o en pollos y/o el antagonismo mínimo de las corrientes de canal de calcio en neuronas aisladas de rata.

[0015] La toxina preferida según se publica en U.S. 6,583,264 B2 es omega-atracotoxina-Hv2a

SEQ ID NO:1: Leu-Leu-Ala-Cys-Leu-Phe-Gly-Asn-Gly-Arg-Cys-Ser-
 Ser-Asn-Arg-Asp-Cys-Cys-Glu-Leu-Thr-Pro-Val-Cys-Lys-Arg-Gly-Ser-Cys-
 Val-Ser-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-Gly-Gly-Ile-Leu-Gly-Gly-Ile-Leu
 (LLACLFGNCR CSSNRDCCEL TPVCKRGSCV SSGPGLVGGI LGGIL)

[0016] La ω -ACTX-Hv2a madura, que es idéntica a SEQ ID NO:1 y las secuencias de longitud completa llamadas ω -Hi2a Hi2b, As2a y As2b se publican en Wang et al, *Discovery and Structure of a Potent and Highly Specific Blocker of Insect Calcium Channels*, Journal of Biological Chemistry 20011026, American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. Us, vol. 276, no. 43, 26 October 2001 (2011-10-26), páginas 40306-40312, XP002634168. Sigue existiendo una necesidad significativa de proporcionar una secuencia ω -ACTX-Hv2 adicional.

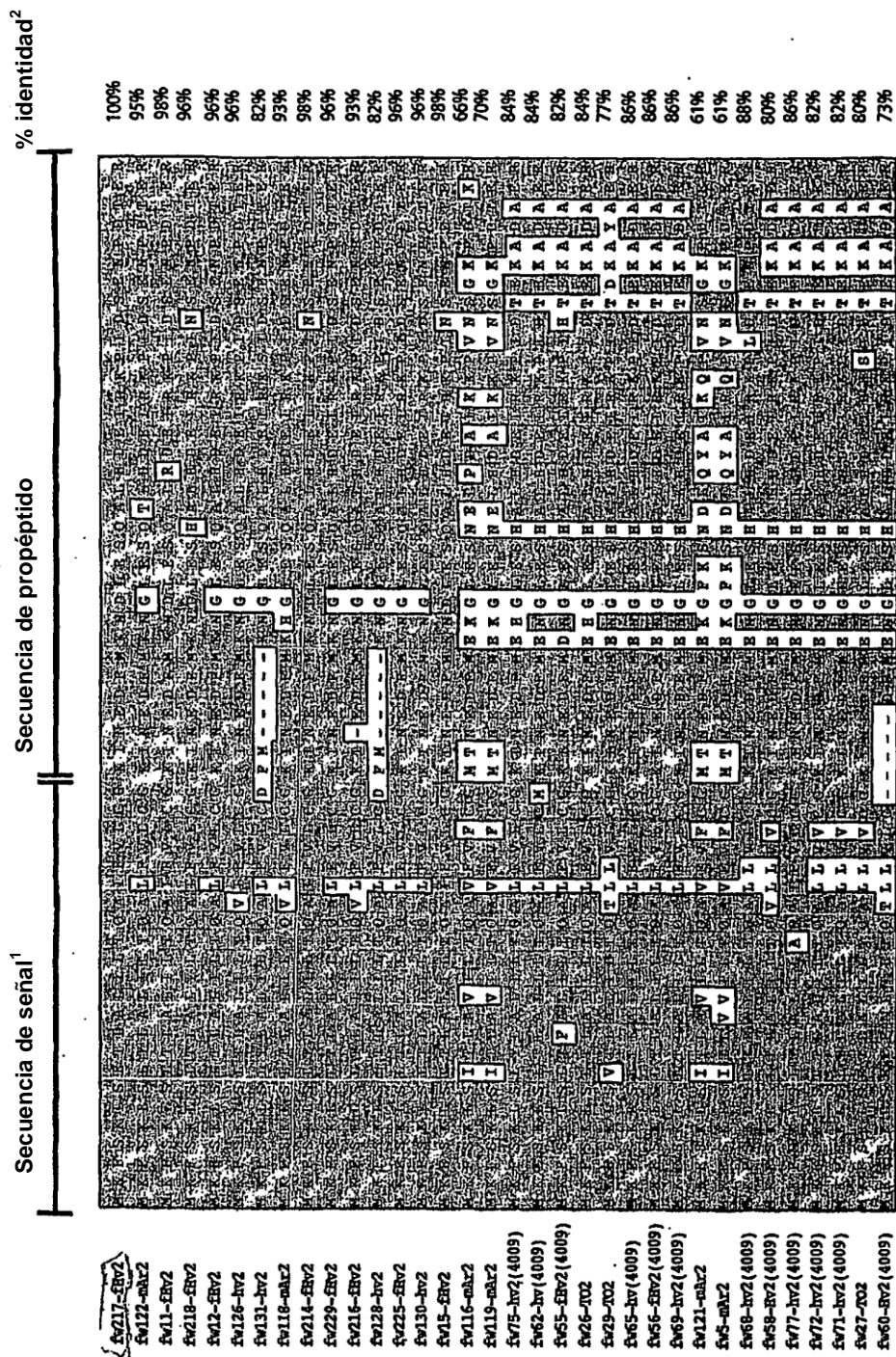
3. SUMARIO DE LA INVENCION

[0017] Los inventores presentes han aislado y caracterizado péptidos adicionales de veneno de araña. La toxina de la presente invención puede aislarse del veneno de araña o sintetizarse de forma química y oxidarse/plegarse utilizando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente para producir la omega-atracotoxina-Hv1a sintética (véase, Atkinson et al., *Insecticidal toxins derived from funnel web spider (Atrax or Hadronyche) spiders*, PCT/AU93/00039 (WO 93/15108)(1993); Fletcher et al., *The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider*, Nature Struct. Biol. 4, 559-566 (1997)). La toxina también puede prepararse utilizando las técnicas utilizadas en U.S. 6,583,264 B2 y concretamente a partir de un gen construido de manera sintética utilizando técnicas de ADN recombinante según han descrito los autores anteriormente para una proteína no relacionada (Riley et al., *Cloning, expression, and spectroscopic studies of the Junleucine zipper domain*, Eur. J. Biochem. 219, 877-886 (1994)). Un código de sonda del ADN para la secuencia amino de la toxina puede utilizarse para aislar la codificación genética de la proteína o de la correspondiente preproteína o preproproteína utilizando técnicas biológicas moleculares estándar. El/los gen(es) natural(es) o sintético(s) puede(n) insertarse en vectores de sobreexpresión para la producción de la toxina. En particular, el gen para la proteína, la preproteína o la preproproteína puede insertarse en el genoma del vector de insecto apropiado, como un baculovirus. De manera alternativa, las plantas transgénicas pueden elaborarse para expresar la toxina o la forma de preproteína o de preproproteína de la toxina. Por ello, la invención también proporciona virus de insecto y especies de planta modificadas genéticamente para expresar las toxinas de esta invención.

[0018] Los péptidos adicionales de veneno de araña se muestran en las tablas siguientes. La Tabla 1 proporciona las secuencias de señal y las secuencias de propéptido con el porcentaje de identidad total proporcionado relativo a fw 217-fHV2 y la Tabla 2 proporciona las secuencias de toxina madura con el porcentaje de identidad de secuencia dado relativo a ω -ACTX-Hv2a (SEQ ID NO:1). Los péptidos de las Tablas 1-2, excepto ω -ACTX-Hv2a, se muestran en SEQ ID NOS 2-35, respectivamente, en orden de apariencia.

[0019] El polipéptido aislado de la presente invención con actividad insecticida tiene la secuencia SEQ ID NO: 2.

Tabla 1.



1. El límite C-terminal de la secuencia de señal se predijo utilizando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997).

2. El porcentaje de identidad se da relativo a fw217-4hv2

Tabla 2.

	Secuencia de toxina madura																				% Identidad
ω-ACTX-Hv2a	A	F	G	G	R	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw217-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw122-mAr2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw11-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw218-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw12-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw131-hv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw118-mAr2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw214-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	58%
fw229-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56%
fw216-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56%
fw128-hv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56%
fw225-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56%
fw130-hv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56%
fw15-fHv2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	53%
fw116-mAr2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	53%
fw119-mAr2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw75-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw62-hv(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw55-fHv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw26-TO2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw29-TO2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw65-hv(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw56-fHv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw69-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw121-mAr2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw5-mAr2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	49%
fw68-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	47%
fw58-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	47%
fw77-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	47%
fw72-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	47%
fw71-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	47%
fw27-TO2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	47%
fw60-hv2(4009)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	47%

1. Identidad de secuencia con ω-ACTX-Hv2a

[0020] Las variantes de ω -ACTX-Hv2a, que se proporcionan, son aquellas en las que se define una "variante" como un polipéptido que corresponde a o comprende una parte de ω -ACTX-Hv2a, o es homóloga a ω -ACTX-Hv2a. Para el propósito de esta invención "homología" entre dos secuencias de péptidos connota una similitud corta de identidad, que indica una derivación de la primera secuencia por parte de la segunda. En particular, un polipéptido es "homólogo" a ω -ACTX-Hv2a si una comparación de sus secuencias de amino ácido revelan una identidad mayor al 30% aproximadamente (que suele ser suficiente para indicar una homología estructural). Dicha comparación de secuencias puede realizarse a través de múltiples algoritmos de ordenador de dominio público.

[0021] La invención también proporciona un método para cribar, o diseñar, un antagonista de los canales de calcio de insecto. Este método incluye seleccionar o diseñar una sustancia que inhibe el enlace de ω -ACTX-Hv2a, o una variante de la misma ahora descrita, con los canales de calcio del insecto y probar la habilidad de la sustancia para actuar como un antagonista de los canales de calcio del insecto. El término "canal de calcio del insecto" hace referencia a cualquier canal de calcio del insecto que se inhiba mediante ω -ACTX-Hv2a o una variante de la misma como se ha descrito ahora.

[0022] También se proporciona mediante la presente invención un método para cribar sustancias de potencia insecticida y especificidad filogenética, el método comprendiendo: (a) medición de la habilidad de una sustancia para inhibir el enlace de ω -ACTX-Hv2a, o las nuevas variantes de la misma, con canales de calcio de insecto; (b) medición de la habilidad de las sustancias para antagonizar los canales de calcio de insecto; y (c) determinación de si las sustancias tienen una actividad mínima contra los canales de calcio de los vertebrados. Preferiblemente, la sustancia aislada mediante el uso de estos métodos tendrá una especificidad filogenética estando definida aquí con una selectividad 100 veces mayor de los canales de calcio de insecto sobre los canales de calcio de vertebrados, y preferiblemente 1000 veces mayor a la selectividad de canales de calcio de insecto sobre los canales de calcio de vertebrados.

[0023] De acuerdo con otro modo de realización adicional de la presente invención se proporciona una composición insecticida para administrar ω -ACTX-Hv2a, y las variantes de la misma, o un inhibidor de canales de calcio de insecto, diferenciado por los métodos arriba descritos. Por ejemplo, donde la toxina, la variante, o el antagonista de canal de calcio puede expresarse mediante un virus de insecto, el virus que codifica la toxina, el variante, o el antagonista de canal de calcio puede expresarse mediante un virus de insecto, el virus que codifica la toxina, el variante o un antagonista de canal de calcio puede aplicarse a la cosecha para protegerla. El virus puede modificarse genéticamente para expresar ω -ACTX-Hv2a, una variante de ω -ACTX-Hv2a según se ha descrito aquí o uno de los inhibidores de canal de calcio solo, en combinación con otro o en combinación con otras toxinas polipeptídicas insecticidas que pueden provocar una actividad insecticida sinérgica. El virus puede formularse en un portador, diluyente y/o excipiente aceptable por la agricultura. Los virus adecuados incluyen, sin carácter limitativo, los baculovirus.

[0024] De manera alternativa, la propia cosecha puede modificarse genéticamente para expresar ω -ACTX-Hv2a, una variante de ω -ACTX-Hv2a, o un antagonista del canal de calcio, diferenciado por los métodos arriba descritos, tanto solo, como en combinación o en combinación con otras toxinas polipeptídicas insecticidas que pueden provocar una actividad insecticida sinérgica. Las cosechas para las que este enfoque sería útil incluyen las de algodón, tomate, judía verde, maíz, alfalfa, soja, sorgo, guisante forrajero, linaza, alazor, semilla de colza, girasol y altramuz.

[0025] De manera alternativa, el agente insecticida puede administrarse directamente a la cosecha en un portador, diluyente y/o excipiente aceptable por la agricultura. La administración puede, por ejemplo, darse en forma de spray foliar. La infestación de insectos en las cosechas puede controlarse tratando las cosechas y/o los insectos con dichas composiciones. Los insectos y/o sus larvas pueden tratarse con la composición, por ejemplo, atrayendo los insectos a la composición con un atrayente.

4. Breve descripción de los dibujos

[0026]

La FIG.1, panel a, es un cromatograma de líquidos de alta resolución de fase inversa del veneno aislado completo a partir de *H. versuta* con la flecha indicando el tiempo de retención de ω -ACTX-Hv2a.

La FIG.1, panel b, es un cromatograma de líquidos de alta resolución de fase inversa de ω -ACTX-Hv2a purificada a partir del veneno de *H. versuta*.

La FIG.2 es un cromatograma de líquidos de alta resolución de fase inversa de ω -ACTX-Hv2a que se ha reducido, alquilado con vinilpiridina, después tratado con *Staphylococcus aureus* cepa V8 tipo XWII-B proteasa.

La Fig. 3 muestra la estructura principal de ω -ACTX-Hv2a (SEQ ID NO: 1) según se clarifica por los datos de secuencia de amino ácido N-terminal y C-terminal. Los fragmentos de péptido corresponden a los residuos 1-32, 20-41 y 39-45 de SEQ ID NO: 1, respectivamente, en orden de aparición.

La Fig. 4 es un esquema de la estructura tridimensional de ω -ACTX-Hv2a.

5 La Fig. 5 ilustra una corriente de calcio de célula completa medida en neuronas aisladas de cerebro de abeja expuestas a 1 nM y 10 nM de ω -ACTX-Hv2a.

La Fig. 6 ilustra el tiempo transcurrido para la inhibición de las corrientes de canal de célula completa en una neurona del cerebro de abeja incubada con ω -ACTX-Hv2a.

10 La Fig. 7 ilustra curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de corrientes de calcio de célula completa mediante ω -ACTX-Hv2a y ω -agatoxina-IVA (a partir de la araña de tela en embudo americana *A. aperta*) en cerebros de abeja y neuronas trigeminales de ratones.

5. Descripción detallada de la invención

15 **[0027]** Los inventores de esta invención han publicado en sus solicitudes anteriores y en U.S. 6,583,264 un antagonista-polipéptido específico extremadamente potente de canales de calcio de insecto identificados por SEQ ID NO:1, nombrado aquí como "omega-ACTX-Hv2a" o " ω -ACTX-Hv2a". Dicho antagonista consiste en cuarenta y cinco residuos de amino ácido, tiene una masa molecular de aproximadamente 4,478 Daltons y es capaz de formar tres enlaces de disulfuro dentro de la cadena. Se ha descubierto que dicho antagonista es tóxico para los insectos adultos y/o para las larvas y que muestra una especificidad 50,000 veces mayor para los canales de calcio activados por voltaje de invertebrados que para los de vertebrados.

20 **[0028]** Los inventores han aislado y caracterizado un amplio número de diferentes toxinas a partir de diferentes arañas. Se ha descubierto que dichas toxinas o antagonistas de polipéptido (véase las Tablas 1 y 2 arriba) son altamente tóxicas para los insectos adultos y/o para las larvas y tienen una actividad mínima en otras especies.

25 **[0029]** La SEQ ID NO:1 y los péptidos mostrados en las Tablas 1-2 pueden derivarse sintetizando de manera química los mismos y oxidando/plegando el péptido utilizando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente para la producción de omega-atracotoxina-Hv1a sintética (Véase, Atkinson et al., Insecticidal toxins derived from funnel web spider (*Atrax* or *Hadronyche*) spiders, PCT/AU93/00039 (WO 93/15108) (1993); Fletcher et al., *The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -atracotoxin-Hv1, from the venom of an Australian funnel web spider*, Nature Struct. Biol. 4, 559-566 (1997)). El polipéptido antagonista también puede derivarse del aislamiento de veneno de araña, en particular del veneno de *Hadronyche versuta* y otras arañas de red en embudo del género *Hadronyche* y *Atrax*.

30 **[0030]** El polipéptido antagonista SEQ ID NO:1 y los péptidos según se muestran en las Tablas 1-2 también pueden derivarse construyendo una codificación genética sintética para el polipéptido (p.ej., basado en la retraducción por ordenador), clonando el gen en un vector apropiado, transformando una línea celular con el vector, transformando una línea celular con el vector, provocando que el polipéptido se exprese y purificando el polipéptido. Los sistemas de expresión pueden contener secuencias de control, como promotores, intensificadores y controles de terminación como los conocidos en la técnica para una variedad de anfitriones (Véase, p.ej., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed., Cold Spring Harbor Press (1989) que se incorpora aquí por completo) Los sistemas de expresión también pueden contener péptido de señal y secuencias proproteína que facilitan la expresión del gen de toxina y/o el plegado de la toxina.

35 **[0031]** Las toxinas de polipéptido de la presente invención pueden prepararse utilizando técnicas de ADN recombinante según se describe en Riley et al., *Cloning, expression, and spectroscopic studies of the Jun leucine zipper domain*, Eur.J. Biochem 219, 817-886 (1994) (dicha referencia se incorpora como referencia completa aquí), cuyo autor es uno de los inventores presentes.

40 **[0032]** Las toxinas de polipéptido de la presente invención pueden prepararse tanto en sistemas procarióticos como eucarióticos. Las construcciones pueden hacerse donde la secuencia de codificación para el polipéptido está precedida por un péptido de señal operable que provoca la secreción de la proteína. Los particulares para la construcción de sistemas de expresión y purificación de péptidos y la división de los péptidos de fusión son conocidos por aquellos con un conocimiento estándar en la técnica. La tecnología para la introducción de ADN en las células incluye cuatro métodos generales: (1) métodos físicos como la microinyección, electroporación y la pistola genética (Véase, p.ej., Johnston et al., *Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization*, Methods Cell. Biol. 43(A), 353-365 (1994)); (2) vectores virales

(Véase, p.ej., Eglitis et al., *Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells*, Biotechniques 6(7), 608-614 (1988)); (3) métodos químicos (Véase, p.ej., Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol.1, Greene Publishing Associates/John Wiley & Sons (1993); Zatloukal et al., *Transferrinfection: A highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660, 136-153 (1992)), y (4) mecanismos mediados por receptores (Véase, p.ej., Wagner et al., *Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor mediated gene delivery and expression of transfected genes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(13), 6099-6103 (1992)). Según lo entendería alguien con un conocimiento estándar de la técnica, una modificación menor de la secuencia primaria de amino ácido de SEQ ID NO:1 puede resultar en un polipéptido según se contempla aquí y según se ejemplifica en las Tablas 1-2, teniendo una actividad sustancialmente equivalente o mejorada en comparación con la SEQ ID NO:1. Con "modificación" de la secuencia primaria de amino ácido se pretende incluir "borrados" (es decir, polipéptidos en los que uno o más residuos de amino ácido están ausentes), "adiciones" (es decir, un polipéptido que tiene uno o más residuos de amino ácido en comparación con el polipéptido especificado), "sustituciones" (es decir, un polipéptido que resulta del reemplazo de uno o más residuos de amino ácido) y "fragmentos" (es decir, un polipéptido que consiste en una secuencia primaria de amino ácido que es idéntica a una parte de la secuencia primaria del polipéptido especificado). Por "modificación" también se incluyen los polipéptidos que están alterados como resultado de los eventos post-traducción que cambian, por ejemplo, la glicosilación, amidación, diseño de lipidación o la estructura primaria, secundaria o terciaria de polipéptido.

[0033] Las "sustituciones" preferidas son aquellas conservadoras, es decir, en las que el residuo se reemplaza con otro del mismo tipo general. Al hacer cambios, el índice hidropático de amino ácidos puede considerarse (Véase, p.ej., Kyte et al., J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982), aquí incluido como referencia en su totalidad). Se conoce en la técnica que ciertos amino ácidos pueden sustituirse con otros amino ácidos que tienen un índice o una marca hidropática similar y siguen dando como resultado un polipéptido con una actividad biológica similar. Al hacer dichos cambios, la sustitución de amino ácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran entre ± 2 es preferible, aquellos entre ± 1 son más preferibles y aquellos entre $\pm 0,5$ son aún más preferibles. De manera similar, los amino ácidos seleccionados pueden sustituirse con otros amino ácidos que tienen una hidrofiliidad similar, según se ha descrito en la patente estadounidense núm. 4,554,101 (aquí incorporada como referencia en su totalidad). Al hacer dichos cambios, igual que con los índices hidropáticos, la sustitución de amino ácidos cuyos índices de hidrofiliidad se encuentran entre ± 2 son preferibles, aquellos entre ± 1 son más preferibles y aquellos entre $\pm 0,5$ son incluso más preferibles.

[0034] Los cambios de amino ácido pueden conseguirse cambiando los codones de la secuencia de ADN haciendo uso de, por ejemplo, una redundancia conocida en el código:

TABLA 3

<u>Amino ácido</u>	<u>Abreviatura de tres letras</u>	<u>Abreviatura de una letra</u>	<u>Codones</u>
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Aspargina	Asn	N	AACAAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

[0035] Preferiblemente, la variante es homóloga a ω -ACTX-Hv2a. La comparación de secuencia puede realizarse a través de numerosos algoritmos de ordenador que son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Puede producirse un péptido homólogo de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, mediante mutagénesis convencional dirigida al lugar (que es una avenida para identificar de manera rutinaria residuos de la molécula que son importantes o no de manera funcional), mediante mutación aleatoria (con "mutación" se entiende una alteración en la estructura primaria del polipéptido debido a cambios en la secuencia nucleotídica del ADN que lo codifica), mediante síntesis química, o mediante división química o enzimática de ω -ACTX-Hv2a y otras técnicas conocidas por aquellos con un conocimiento estándar de la técnica.

[0036] La tecnología de ADN recombinante puede utilizarse para producir un virus de vector de la expresión recombinante de los antagonistas de polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, puede producirse un vector de expresión baculovirus del tipo publicado en la patente estadounidense núm. 4,879,236. Otras publicaciones que describen un método para la expresión de proteína recombinante utilizando vectores baculovirus incluye Tomalski, et al., Nature 352, 82-85 (1991), Stewart et al., Nature 352, 85-88 (1991) and McCutchen et al., Biotechnology 9, 848-851 (1991). El virus de vector de expresión recombinante podría aplicarse al área donde existe una plaga de insectos. Cuando el virus se ingiere por el insecto comienza su reproducción. Durante la reproducción, el gen para la proteína efectiva como insecticida se expresa, resultando en la invalidez o muerte del insecto. El virus puede expresar ω -ACTX-Hv2a, o una variante de la misma de acuerdo con esta invención, o un antagonista de canal de calcio descubierto por los métodos aquí descritos. El virus también podría estar genéticamente modificado para expresar ω -ACTX-Hv2a, o una variante de la misma según se describe aquí, o dicho antagonista de canal de calcio en las varias combinaciones posibles entre ellos, y además en combinación con otras toxinas de polipéptido insecticida. Dichas combinaciones pueden provocar una actividad insecticida sinérgica. Las células de bacteria híbrida, que comprenden un plásmido con la codificación genética para los antagonistas de polipéptido de la presente invención pueden utilizarse de la misma manera para controlar insectos de acuerdo con la presente invención.

[0037] Los antagonistas de canal de calcio de insecto, los vectores virales y las células de bacteria híbridas de la presente invención pueden aplicarse en la forma de un spray foliar comprendiendo un portador aceptable en la agricultura. Las cosechas para las que este enfoque sería útil son numerosas e incluyen, sin carácter limitativo, las de algodón, tomate, judía verde, maíz, alfalfa, soja, sorgo, guisante forrajero, linaza, alazor, semilla de colza, girasol y altramuza. Dichos agentes también pueden aplicarse a los insectos directamente.

[0038] Según lo entendería alguien con un conocimiento general de la técnica, las plantas pueden producirse para expresar los antagonistas polipéptidos de la presente invención. Con "planta transgénica" entendemos cualquier planta, o progenia de la misma, derivada de una célula o protoplasto de "planta transformada", donde el ADN de la planta (nuclear o cloroplasto) contiene una molécula de ADN exógeno introducido no presente originariamente en una planta nativa no transgénica con la misma cepa. Los vectores útiles comunes para la expresión de genes en plantas más altas son conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido inductor de tumor (Ti) de la *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers et al., *Methods in Enzymol.* 153, 253-277 (1987)), y el vector de control de transferencia pCaMVN (disponible por Pharmacia, Piscataway, NJ). Por supuesto, según se entendería por alguien con un conocimiento estándar de la técnica, pueden emplearse otros medios de introducción génica en la célula, como la electroporación (Fromm et al., *Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(17), 5824-5828 (1985)), transformación de los protoplasmas mediante polietilenglicol (Ominrulleh et al., *Plant Molecular Biology* 21, 415-428 (1993)), absorción del ADN mediante desecación/inhibición, agitación con fibras de carburo de silicio, mediante la aceleración de partículas revestidas de ADN, la inyección en órganos reproductivos y la inyección en embriones inmaduros.

[0039] Si un vector de expresión de la presente invención se utiliza para transformar una planta, es preferible que un se elija un promotor con la habilidad de promover la expresión en la planta. Los promotores que funcionan en plantas son muy conocidos en la técnica. Los promotores de ejemplo específicos de tejido son sintetasa 1 de sacarosa de maíz (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4144-4148 (1990)), promotor del virus mosaico de la coliflor (CaMV 35S), promotor S-E9 pequeña subunidad RuBP de carboxilasa y proteínas de choque térmico del maíz (Odell et al., Nature 335, 810 (1985)). La elección del vector de expresión y finalmente de a qué promotor está operativamente enlazada la región de codificación de polipéptido, depende directamente de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, la ubicación y el ritmo de la expresión de proteína y la célula anfitriona a transformar. En un modo de realización preferido, el vector utilizado para expresar el polipéptido incluye la selección de un marcador que sea efectivo en una célula de planta. Los vectores de transformación utilizados para transformar plantas y los métodos para elaborar esos vectores se describen por ejemplo, en las patentes estadounidenses con número 4,971,908, 4,940,835, 4,769,061 y 4,757,011.

[0040] La presente invención también abarca las codificaciones de secuencias de ADN para SEQ ID NO:1 y las variantes de la misma aquí publicadas y contempladas. Las codificaciones de secuencias de ADN para dichas secuencias de polipéptido activas permiten la preparación de secuencias relativamente cortas de ADN (o de ARN) con la habilidad de hibridar específicamente en dichas secuencias genéticas. Las secuencias cortas de ácido nucleico pueden utilizarse como sondas para detectar la presencia de secuencias complementarias de una muestra dada, o pueden utilizarse como cebadores para detectar, ampliar o mutar un segmento definido de la codificación de secuencias de ADN para SEQ ID NO:1, y variantes de la misma. Una secuencia de ácido nucleico preferida empleada para estudios de hibridación es al menos de 14 nucleótidos de longitud para asegurarse de que el fragmento tiene una longitud suficiente para formar una molécula estable y selectiva dúplex. Dichos fragmentos pueden prepararse mediante, por ejemplo, la sintetización directa del fragmento mediante un medio químico, al aplicar una tecnología de reproducción de ácido nucleico, como la tecnología PCR (descrita en las patentes estadounidenses con número 4,683,195 y 4,683,202), o mediante la eliminación de plásmidos recombinantes con forma de fragmentos de ácido nucleico seleccionados que contienen inserciones y lugares de restricción adecuados.

[0041] También se proporcionan métodos para la criba y/o diseño de antagonistas de canales de calcio de insecto. Dada la gran diferencia entre las constantes de vinculación de ω -ACTX-Hv2a o una variante de la misma con respecto a los canales de calcio de invertebrados frente a los de vertebrados, en particular aquellos canales de calcio asociados al sistema neuronal del insecto, ω -ACTX-Hv2a o una variante según se publica aquí puede utilizarse de manera efectiva en los procedimientos de criba para identificar nuevos antagonistas de canales de calcio de insecto. Utilizando un análisis de actividad-estructura convencional de los antagonistas identificados de canal de calcio de insecto, pueden perseguirse las rutas del diseño químico de otros antagonistas más potentes basándose en los antagonistas identificados.

[0042] Un método para aislar los compuestos con una actividad de antagonista de canal de calcio de insecto comprende los pasos de: preparar una preparación celular de invertebrado con un número sustancial de

canales de calcio sin vincular; añadir una cantidad de ω -ACTX-Hv2a o una variante según se publica aquí efectiva para vincular de manera sustancial todos los canales de calcio de la preparación celular de invertebrado; seleccionar un compuesto de prueba; añadir el compuesto de prueba a la preparación celular de invertebrado vinculada con ω -ACTX-Hv2a o la variante según se publica aquí; medir la cantidad de ω -ACTX-Hv2a de la variante liberada al añadir el compuesto de prueba.

[0043] Otro método para aislar compuestos con una actividad antagonista de canal de calcio de insecto comprende los pasos de: preparar una preparación celular de invertebrado con un número sustancial de canales de calcio sin vincular; seleccionar un compuesto de prueba; añadir el compuesto de prueba a la preparación celular de invertebrado con una concentración establecida; permitir al compuesto de prueba incubarse durante un periodo de tiempo suficiente para permitir al compuesto de prueba vincularse con los canales de calcio de la preparación; limpiar la preparación celular de invertebrados que estaba incubada con el compuesto de prueba para eliminar cualquier compuesto de prueba sin vincular; añadir una cantidad de ω -ACTX-Hv2a o una variante de la misma como por ejemplo las establecidas en las Tablas 1-2, suficiente para vincular todos los canales de calcio de la preparación celular de invertebrado sin tratar; medir la cantidad de compuesto de prueba desplazada mediante la adición del ω -ACTX-Hv2a o la variante seleccionada.

[0044] Preferiblemente, cualquier antagonista identificado mediante el proceso de criba se vinculará firmemente a el canal o los canales de calcio de insecto para que la constante de disociación (K_d) en su interacción con el canal o los canales de calcio sea menor a 10^{-7} M y más preferiblemente menor a 10^{-9} M. Preferiblemente, la actividad del compuesto de prueba contra los canales de calcio de vertebrado se determina entonces para discernir la selectividad relativa del compuesto. En un modo de realización preferido, la especificidad filogenética es 100 veces mayor en los canales de calcio de insectos que en los de vertebrados, y más preferiblemente 1000 veces mayor. Cualquier persona con un conocimiento estándar en la técnica reconocerá que otros tipos de métodos competitivos y procesos de criba de la actividad farmacológica conocidos en la técnica pueden adaptarse para utilizar ω -ACTX-Hv2a o una variante de acuerdo con esta invención para proporcionar una criba mejorada de compuestos para el antagonismo de canal de calcio de invertebrado.

[0045] Los compuestos de prueba pueden comprender un compuesto a partir de un archivo de compuestos naturales o a partir de librerías combinatorias de compuestos peptídicos y no peptídicos.

[0046] Las librerías de toxinas mutadas para el objetivo de criba puede obtenerse mediante la evolución *in vitro* de un gen para ω -ACTX-Hv2a o una variante, según se ha descrito anteriormente para las proteínas no relacionadas (Stemmer, *DNA shuffling by random fragmentation and re-assembly; in vitro recombination for molecular evolution*, Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 10747-10751 (1994); Stemmer, *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, Nature 370, 389-391 (1994); Zhang et al., *Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4504-4509 (1997)). Esto podría llevarse a cabo utilizando la mutagénesis al azar por PCR de toda la ω -ACTX-Hv2a o una variante de gen o digestión de la ω -ACTX-Hv2a o una variante del gen con una enzima apropiada seguida de la reconstrucción de mutagénesis al azar por PCR de toda la secuencia genética. Estos procedimientos de mutagénesis al azar por PCR también podrían aplicarse a la secuencia genética preproteína completa para ω -ACTX-Hv2a o una variante contemplada (Tabla 1-2). La librería de ω -ACTX-Hv2a mutante o de secuencias genéticas variantes podría utilizarse entonces para generar una serie de antagonistas variantes de ω -ACTX-Hv2a. Estos antagonistas pueden cribarse entonces por su habilidad para inhibir la vinculación de ω -ACTX-Hv2a, o una variante seleccionada de este, a los canales de calcio de insecto, o directamente por su habilidad para inhibir los canales de calcio de insecto. La criba puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el uso de la técnica phage display de una librería de gen mutante seguida por la selección de partículas fago que se vinculan firmemente a los canales de calcio de insecto, o de partículas fago que inhiben el vínculo de ω -ACTX-Hv2a, o una variante seleccionada del mismo, con los canales de calcio de insecto. Según se entendería por alguien con un conocimiento estándar de la técnica, una librería de gen mutante también podría construirse mediante otros métodos biológicos moleculares estándar como la mutagénesis oligonucleotida de "cassette" o una construcción de genes sintéticos con ciertas posiciones nucleótidas aleatorias.

[0047] La estructura tridimensional de ω -ACTX-Hv2a y las variantes de la misma, que se han sido explicadas por los inventores presentes según se describe en las tablas y dibujos, también puede utilizarse para buscar librerías de estructura para (o para diseñar) tanto los compuestos peptídicos o no peptídicos que se asemejan a los elementos estructurales clave de ω -ACTX-Hv2a, particularmente aquellas regiones categorizadas como críticas para la actividad mediante experimentos de mutagénesis/truncamiento/modificación. Estos compuestos podrían probarse entonces por su habilidad para inhibir el enlace de ω -ACTX-Hv2a, o la variante de la misma, a los canales de calcio de insecto.

[0048] El ω -ACTX-Hv2a, o una variante de la misma de acuerdo con la invención, utilizada en un ensayo competitivo puede ser marcada de manera radioactiva o fluorescente, características que quedan dentro del alcance de la presente invención. La criba de compuestos de prueba puede llevarse a cabo utilizando tanto canales de calcio nativos como producidos de manera recombinante, o canales de calcio modificados en su estructura.

[0049] Los inventores presentes han descubierto que las neuronas aisladas con precisión del cerebro de cucaracha y de abeja son particularmente adecuadas para proporcionar la base para un delicado ensayo electrofisiológico para estudiar las sustancias que interfieren con la habilidad de ω -ACTX-Hv2a o sus variantes para inhibir los canales de calcio de insecto, mientras que una variedad de neuronas de ganglio sensorial de ratón son adecuadas para proporcionar la base de un estudio electrofisiológico preciso para evaluar la habilidad de los compuestos para inhibir los canales de calcio de vertebrados. Sin embargo, se apreciará que otras células de insecto y vertebrados o líneas celulares serían también adecuadas para su uso en este aspecto de la presente invención. Por ejemplo, la expresión transitoria de los canales de calcio de insectos clonados en líneas celulares adecuadas u ovocitos podría formar la base de un sistema de estudio adecuado.

[0050] Volvemos ahora a varios ejemplos que ilustran las composiciones y métodos particulares dentro del alcance de la presente invención. Dichos ejemplos y las figuras asociadas a ellos, se presentan para hacer ciertos aspectos de la presente invención más fáciles de entender y no intentan limitar el alcance de la invención según se describe aquí de ninguna manera.

Ejemplo 1. Elución y purificación de la toxina polipeptídica a partir de la totalidad de veneno de *H. versuta*

[0051] El veneno bruto liofilizado (1,25 mg) se disolvió en 50 μ l de agua destilada, se cargó en una columna HPLC de fase inversa analítica Vydac C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m de tamaño de poro) y se eluyó con un caudal de 1 ml min⁻¹ utilizando un gradiente de 5-25% Búfer B (0,1% TFA en acetonitrilo) durante 22 min, seguido por un gradiente de 25-50% Búfer B durante 48 min. Búfer A fue 0,1% TFA en agua. La Fig. 1 describe dos cromatogramas HPLC de fase inversa. La Fig. 1a es un cromatograma HPLC de fase inversa de la totalidad del veneno aislado a partir de *H. Versuta*. La posición de elución de la toxina polipeptídica denominada ω -ACTX-Hv2a (tiempo de retención de aproximadamente 48 min) se marca con una flecha. La Fig. 1b es un cromatograma HPLC de fase inversa de la ω -ACTX-Hv2a que se ha purificado a partir de *H. versuta venom* utilizando técnicas de purificación cromatográfica estándar.

Ejemplo 2. Determinación de la estructura primaria de ω -ACTX-Hv2a

[0052] La ω -ACTX-Hv2a aislada (50 μ g) se redujo y se sometió a un piridiletildado, después fue digerida con *Staphylococcus aureus* cepa V8 tipo XVII-B proteasa [EC 3.4.21.19] durante 6 horas en una relación entre toxina:proteasa de 100:1 y a una temperatura de 37°C. La reacción se llevó a cabo en 50 mM Tris búfer, pH 7,8. Los fragmentos de péptido resultantes (designados como V1-V4) se aplicaron a una columna de HPLC de fase inversa analítica Vydac C 18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m de tamaño de poro), y se eluyeron con un caudal de 1 ml min⁻¹ utilizando un gradiente de 5-60% Búfer B (0,1% TFA en acetonitrilo) durante 40 min. El búfer A era 0,1% TFA en agua. La Fig.2 muestra un cromatograma HPLC de fase inversa de los fragmentos que resultan de la digestión de ω -ACTX-Hv2a.

[0053] La estructura primaria de ω -ACTX-Hv2a se reconstruyó a partir de la secuenciación de N-terminal y C-terminal de la toxina completa así como de la secuenciación de varios fragmentos obtenidos a partir de la digestión con proteasa V8. La estructura primaria se muestra en la Fig. 3 utilizando las abreviaturas de una letra reconocidas internacionalmente para cada uno de los amino ácidos. Dicha estructura según se muestra se reconstruyó desde la secuenciación de N-terminal y C-terminal así como del fragmento 4 de V8 obtenido por la digestión con proteasa V8. El modelo de vinculación de disulfuro de ω -ACTX-Hv2a, según se determina a partir de la estructura tridimensional (véase la Figura 4), se indica mediante las líneas gruesas.

Ejemplo 3. Determinación de la estructura tridimensional de ω -ACTX-Hv2a

[0054] La estructura tridimensional de ω -ACTX-Hv2a se determinó utilizando técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) homonuclear de dos dimensiones que resultan familiares a aquellos especialistas en la técnica (véase, Fletcher et al., *The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -ACTX-Hv2a, from the venom of an Australian funnel web spider*, Nature Struct. Biol. 4, 559-566, 1997; Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1986), ambas incorporadas aquí en su totalidad como referencia). La Fig. 4 es un esquema de la estructura de solución tridimensional de los residuos 1-32 de ω -ACTX-Hv2a; los residuos 33-45 no tienen una conformación preferida en solución. La estructura contiene una hélice 3_{10} que abarca los residuos 13-17, un antiparalelo de horquilla β

comprendiendo dos cadenas β (cadena β 1 = residuos 23-25, cadena β 2 = residuos 28-30)) y tres enlaces de disulfuro (Cys4-Cys18, Cys11-Cys24 y Cys17-Cys29). Estas características estructurales se delinean todas mediante flechas en la Fig. 4.

Ejemplo 4. Efecto de la ω -ACTX-Hv2a en corrientes de canal de calcio de célula completa en neuronas de abeja aisladas

[0055] Las neuronas se aislaron de los cerebros de abejas productoras de miel europeas, *Apis mellifera*, según han descrito anteriormente los autores (véase, Wang et al., *Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bond*, Nature Struct. Biol. 7, 505-513, que se ha incorporado aquí en su totalidad como referencia). Se hicieron grabaciones de fijación de tensión (célula-completa) estándar de las corrientes de canal de calcio del cerebro de la abeja (I_{Ca}), del canal de sodio (I_{Na}) y del canal de potasio (I_K) a una temperatura ambiente (22 – 24°C). Para las neuronas de abeja, se hicieron grabaciones con pipetas de borosilicato pulidas a fuego de ~6 M Ω resistencia cuando se llenan con una solución intracelular de cualquiera de las siguientes composiciones (mM): CsCl 120, NaCl 5, MgATP 5, Na₂GTP 0,3, EGTA 10, CaCl₂ 2 y HEPES 10, pH 7,3 (para I_{Na} e I_{Ca}) o KF 130, EGTA 10, CaCl₂ 2 y HEPES 10, pH 7,3 para el registro I_K . Para los registros de I_{Ca} y I_{Na} la solución externa consistía en NaCl 135, cloruro de tetraetilamonio (TEACl) 20, CsCl 5, BaCl₂ 5, HEPES 10, glucosa 10, BSA 0,05%, pH 7,3. Para la grabación de I_K la solución externa consistía en (mM) NaCl 130, KCl 20, CaCl₂ 2,5, MgCl₂ 1,5, HEPES 10, glucosa 10, BSA 0,05%, pH 7,3.

[0056] Las neuronas se fijaron con una tensión de -90 mV y las corrientes se evocaron aumentando el nivel del potencial de membrana desde -60 hasta +60mV. Los efectos de toxina en I_{Ca} e I_{Na} se probaron con el potencial de corriente interna más largo, normalmente -10 o 0 mV. En las neuronas de abeja las corrientes de pico interno solían anularse por 100 μ M Cd²⁺, sugiriendo que la corriente se llevaba por canales Ca²⁺. En unas pocas neuronas de abeja hubo una corriente de rápida activación, transitoria e insensible a Cd¹⁺ que se bloqueó totalmente mediante tetrodotoxina (TTX, 1 μ M).

[0057] La Fig. 5 ilustra el efecto de la ω -ACTX-Hv2a en las corrientes de canal de calcio de célula entera en dichas neuronas de cerebro de abeja aisladas. La figura muestra la corriente de calcio de célula entera obtenida a partir de una neurona de cerebro de abeja en la ausencia ("control") o presencia de 1nM o 10 nM de ω -ACTX-Hv2a. La aplicación de ω -ACTX-Hv2a (10 pM a 100 nM) inhibió las corrientes de canal de calcio en todas las neuronas examinadas ($n = 37$). La casi completa anulación de las corrientes de canal de calcio en neuronas de cerebro de abeja son sensibles a ω -ACTX-Hv2a. Estos contrasta con la ω -ACTX-Hv1a, que inhibe corrientes de canales de calcio de célula entera en neuronas aisladas de cucaracha con sólo $25 \pm 10\%$ en una concentración de 100 nM (véase la Fig. 6 en Fletcher et al., *The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -ACTX-Hv2a, from the venom of an Australian funnel web spider*, Nature Struct. Biol. 4, 559-566, 1997).

[0058] La Fig. 6 ilustra el tiempo transcurrido para la inhibición de las corrientes de canal de calcio de célula entera en una neurona de cerebro de abeja siguiendo la adición de 1 nM y 10 nM de ω -ACTX-Hv2a: el efecto es rápido y reversible sólo de manera muy lenta, según se indica, mediante la recuperación prolongada de la actividad de un canal tras inicial un paso de lavado (indicado por la línea horizontal sólida). La rápida inhibición de canal de calcio y la lenta recuperación observad en estos experimentos electrofisiológicos es consistente con los efectos fenotípicos observados cuando la toxina se inyecta en grillos (*Acheta domesticus* Linnaeus). La inyección en grillos provoca una parálisis inmediata con un PD₅₀ (la dosis requerida para paralizar el 50% de los insectos inyectados) de 160 ± 9 pmol g⁻¹ y una media de tiempo de parálisis de 4-5 horas con una dosis de 250-500 pmol g⁻¹. La inyección en grillos de una segunda dosis (250-500 pmol g⁻¹) de toxina antes de la inversión de la parálisis fue letal. Por el contrario, la toxina no provocó ningún efecto adverso al inyectarse de manera subcutánea en ratones recién nacidos del tipo BALB/c ($3,1 \pm 0,2$ g, $n = 3$) con dosis de hasta 800 pmol g⁻¹, que es 5 veces mayor a la PD₅₀ en grillos.

Ejemplo 5. Comparación de los efectos de ω -ACTX-Hv2a y ω -agatoxina-IVA sobre las corrientes de canal de calcio de célula entera en neuronas de abeja aisladas y neuronas trigeminales de ratón

[0059] Las neuronas de cerebro de abeja se aislaron según se describe en el ejemplo 4 arriba. Las neuronas de ganglio trigeminal de ratón se aislaron mediante la trituración ligera de ganglios picados siguiendo un tratamiento de 20 minutos a 34°C con papaína (20 unidades ml⁻¹) en una solución salina conservada en HEPES (HBS) de composición (en mM): NaCl 140, KCl 2,5, CaCl₂ 2,5, MgCl₂ 1,5 HEPES 10, glucosa 10, pH 7,3. Las grabaciones de fijación de tensión de célula entera estándar se hicieron de las corrientes del canal de calcio del cerebro de abeja (I_{Ca}), del canal de sodio (I_{Na}) y del canal de potasio (I_K) y de la neurona sensorial del ratón I_{Ca} e I_{Na} a una temperatura ambiente (22-24°C). La misma solución interna descrita para

las grabaciones del cerebro de abeja en el ejemplo 4 se utilizó para las grabaciones de neurona sensorial del ratón I_{Ca} e I_{Na} ; los electrodos tenían una resistencia de 1-2 M. La solución externa I_{Ca} para las grabaciones de neurona del ratón contenían (mM): TEACl 140, CaCl₂ 2,5, CsCl 2,5, HEPES 10, glucosa 10, BSA 0,05%, pH 7,3, mientras que I_{Na} se grabó en HBS.

[0060] Las neuronas fueron fijadas con una tensión de -90 mV y las corrientes activadas al aumentar el potencial de la membrana desde -60 a +60 mV. En las neuronas sensoriales del ratón, las corrientes de pico internas activadas en la presencia de bloqueadores de canal de potasio y sodio se anularon con 30 μ M Cd²⁺. Las corrientes internas grabadas en HBS consistían ambas en componentes sensibles al TTX y resistentes al TTX. Los efectos de toxina en el cerebro de abeja I_K se determinaron en un intervalo de potenciales de membrana (entre -40 y +60 mV). Los datos se recogieron y analizaron según se ha descrito previamente (véase, Fletcher et al., *The structure of a novel insecticidal neurotoxin, ω -ACTX-Hv1, from the venom of an Australian funnel web spider*, Nature Struct. Biol. 4,559-566, 1997).

[0061] La Fig. 7 muestra que el EC₅₀ para la inhibición de ω -ACTX-Hv2a de I_{Ca} era -150 pM (véase los datos indicados mediante círculos rellenos), con una inhibición máxima en las concentraciones >10 nM. La aplicación de la toxina ω -agatoxina-IVA de araña con red en embudo americana (ω -Aga-IVA; véase los cuadrados rellenos en la Fig. 7), el antagonista prototípico de los canales de calcio activados por voltaje de los vertebrados tipo P (véase, Mintz et al., *P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA*, Nature 355, 827-829, 1992), también inhibió I_{Ca} en todas las neuronas de abeja examinadas ($n = 19$), pero la EC₅₀ (10 nM) y la concentración requerida para la inhibición máxima (>100 nM) fueron ambas significativamente mayores que para la ω -ACTX-Hv2a.

[0062] Por el contrario, la superfusión de altas concentraciones de ω -ACTX-Hv2a (1 μ M, $n = 10$) durante 5 min no tuvo prácticamente ningún efecto en I_{Ca} en las neuronas sensoriales de ratón (véase los círculos sin rellenar en la Fig. 7), mientras que la aplicación de ω -Aga-IVA inhibió un componente de I_{Ca} en neuronas sensoriales de ratón con un EC₅₀ de aproximadamente 20 nM (máxima I_{Ca} inhibición ~40%; véase los círculos sin rellenar en la Fig. 7). ω -ACTX-Hv2a (100 nM) no inhibió I_{Na} sensible a TTX de las neuronas de cerebro de abeja (I_{Na} era 98 ± 4 % de control, $n = 4$), ni afectó significativamente a I_{Na} en las neuronas sensoriales (I_{Na} era 97 ± 3 % de control con ω -ACTX-Hv2a = 1 μ M, $n = 5$). ω -ACTX-Hv2a (10 nM, $n = 1$; 100 nM, $n = 5$) no tuvo efectos sobre el cerebro de abeja I_K con ningún potencial cuando las neuronas se aumentaron desde -90 mV hasta entre -40 y +60 mV.

Ejemplo 6.

[0063] Australia. Una hembra de la especie *Hadronyche infensa* se recogió de la ciudad de Toowoomba, Queensland. Una hembra de *Hadronyche versuta* se obtuvo de las Montañas Azules de Nueva Gales del Sur, Australia. Macho y hembra de la especie *Atrax robustus* se recogieron del área de Sydney de Nueva Gales del Sur, los especímenes se guardaron en una colección de latas herméticas hasta la extracción de las glándulas de veneno. Las arañas de tela en embudo se enfriaron a -20°C durante 40-60 minutos. Las glándulas de veneno estaban diseccionadas de manera independiente de cada espécimen (*H. Infensa* H *versuta*. Macho *A robustus* y hembra *A. Robustus*). Cada par de glándulas de veneno se situaron de manera independiente en el tampón de extracción (Pharmacia).

Preparación de ADNc

[0064] Inmediatamente después del aislamiento de la glándula de veneno, se preparó polyA+ mRNA utilizando el kit de purificación *QuickPrep Micro mRNA* (Amersham Pharmacia Biotech). Las muestras de mRNA purificadas se lavaron con 80% etanol y se secaron con una *Speedvac*. 10 μ l de agua destilada libre de RNasa libre obtenida gracias al kit *cDNA Synthesis* (Pharmacia) se usó para rehidratar las muestras de mRNA. Las muestras de mRNA purificada se almacenaron a -20°C.

[0065] Después, las librerías de ADNc se construyeron utilizando el kit *Marathon cDNA Amplification* (CLONTECH). A partir del modelo de mRNA adaptado, la cadena única de ADNc se construyó utilizando Superscript III transcriptasa inversa (Life Technologies, Inc) y el cebador Echoclonanch-2, un poli(dT) cebador de ancla (GGGCAGGT₁₇) (SEQ ID NO: 36) La segunda síntesis de cadena se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del kit. Los productos ADNc se purificaron utilizando el kit *Concert Rapid PCR Purification* (GIBCO). El cDNA de cadena doble se eludió con 50 μ l ~70°C TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH8,0).

[0066] El adaptador *Marathon cDNA Amplification* (CLONTECH) se ligó entonces al ADNc de doble cadena. La reacción de ligadura se permitió a 16°C durante la noche. Tras la ligadura durante la noche, la muestra se precipitó utilizando 10 μ l de una dilución de 1 a 20 de glucógeno, 10 μ l 3M de acetato sódico pH 5,2 y 100 μ l

100% etanol frío. Posteriormente, la muestra se lavó con 80% etanol y se secó durante 10 minutos antes de la resuspensión en 200 µl TE buffer.

Diseño del cebador

5 **[0067]** Con tal de obtener información de la secuencia líder, se utilizó 5'RACE (en inglés *Rapid Amplification of ADNc Ends*). Frohman, M.A., M.K. Dush, and G.R. Martin, *Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988. 85(23):p.8993-9002. Los cebadores de reacción en cadena de la polimerasa redundante (PCR) se diseñaron para esta técnica. Los cebadores se diseñaron basados en la secuencia de amino ácido N-terminal de la toxina madura w-ACTX-Hv2a. Los cebadores redundantes se utilizaron junto con un adaptador de cebador universal a5' (EchoAP2) con tal de obtener información de la secuencia líder desconocida. Los cebadores 3' RACE PCR se diseñaron a partir de la secuencia de datos líder cDNA obtenidos a partir de '5' RACE. Los cebadores 3' RACE PCR se utilizaron en combinación con un adaptador universal de cebador oligo d(T) (CLONTECH) para generar productos genéticos que tienen una secuencia de señal que es homóloga a la de w-ACTX-Hv2a. Todos los cebadores no incluidos en kits se construyeron por PROLIGO Ltd.

Amplificaciones de PCR

[0068] PCR se llevó a cabo utilizando 5 µl de ADNc de doble cadena, 27 µl Milli Q agua, 25 mM MgCl₂, 10x PCR buffer, 50x dNTP's, AMPLI_{GOLD} Enzima TAQ (Perkin Elmer, AmpliTaq Gold con GeneAmp Kit) 5 µl. El PCR se utilizó en un ciclador térmico utilizando el protocolo de ciclo siguiente:

Temp. Ciclo	Tiempo	Núm. De ciclos
95°C	5 minutos	1
95°C	30 segundos	35
55°C	60 segundos	35
72°C	90 segundos	35
72°C	10 minutos	1
30°C	1 minuto	1

20 **[0069]** Los productos ADNc amplificados se activaron sobre un gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio para la verificación de tamaño.

Clonación, transformación y secuenciación

25 **[0070]** Los productos PCR verificados eran gel extraído (GIBCO kit de purificación de gel) y precipitado utilizando un kit de coprecipitación de gránulo de pintura (Novagen). Una vez precipitado, los extremos de ADNc se fosforilaron con quinasa en la preparación para el cierre. Las muestras se ligaron con el vector SMART y se transformaron en células *E. cloni* (Lucigen) utilizando el kit *Lucigen CloneSmart Blunt Cloning*. Los clones transformados con éxito se cultivaron en *Terrific Broth* con 50 µl/mL de ampicilina durante una hora y después se depositó para permitir el crecimiento durante la noche.

30 **[0071]** Las muestras se probaron para el tamaño de inserción correcto mediante electroforesis de PCR y de gel. Las muestras que contenían el tamaño de inserción correcto se presentaron para la secuenciación de ADN.

35 **[0072]** Puede concluirse que ω-ACTX-Hv2a y sus variantes, según se han descrito aquí, son un antagonista potente y extremadamente específico de los canales de calcio activados por voltaje de un insecto. Las toxinas no tienen ningún efecto en las corrientes de potasio y de sodio ni en el cerebro de abeja ni en las neuronas trigeminales de ratón.

[0073] Basado en los datos presentados en la Fig. 7, ω-ACTX-Hv2a puede calcularse por tener >50.000 veces más preferencia por los canales de calcio de insecto que por los de los vertebrados, haciéndolo >25.000 veces más selectivo que la ω-agatoxina-IVA (que sólo tiene 2 veces más preferencia). Así, ω-ACTX-Hv2a es una de las toxinas de péptido más selectivas de invertebrados descubiertas hasta la fecha.

40 **[0074]** Los ejemplos 1-6 pueden repetirse para producir las variantes mostradas en las Tablas 1-2, especialmente el polipéptido con la secuencia de SEQ ID NO: 2 de la presente invención y para determinar su efectividad. Las variantes similares son las toxinas de péptido selectivas de insecto más efectivas.

[0075] Mientras que la invención se ha descrito con respecto a ciertos modos de realización, aquellos expertos en la técnica apreciarán fácilmente que pueden realizarse varios cambios y/o modificaciones a la invención sin apartarse del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIACIÓN

5

[0076]

<110> KING, GLENN F.
WANG, XIU-HONG

<120> INSECTICIDAL COMPOUNDS AND METHODS FOR SELECTION THEREOF

<130> 883933.0091

<140>

<141>

<150> 10/436,324

<151> 2003-05-12

<150> 09/780,874

<151> 2001-02-09

<150> 60/181,532

<151> 2000-02-10

<160> 36

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 1

Leu	Leu	Ala	Cys	Leu	Phe	Gly	Asn	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Arg	Asp
1				5					10					15	

Cys	Cys	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Cys	Lys	Arg	Gly	Ser	Cys	Val	Ser	Ser
			20					25					30		

Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gly	Gly	Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Leu
		35					40					45

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 2

ES 2 488 844 T3

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Ile Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
50 55 60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
85 90 95

Leu Gly

<210> 3

<211> 98

<212> PRT

<213> Atrax robustus

<400> 3

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
20 25 30

Gly Leu Glu Ser Gln Thr Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
50 55 60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Arg Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
85 90 95

Leu Gly

ES 2 488 844 T3

<210> 4
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 4

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

Leu Gly

<210> 5
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 5

ES 2 488 844 T3

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Ile Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
20 25 30

Asp Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asn
35 40 45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
50 55 60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
85 90 95

Leu Gly

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 6

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
20 25 30

Gly Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
50 55 60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
85 90 95

Leu Gly

<210> 7

ES 2 488 844 T3

<211> 98
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 7

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

Leu Gly

<210> 8
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 8

ES 2 488 844 T3

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1          5          10          15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Asp Phe Met Lys Asn Gly Leu Glu Ser Gln
          20          25          30

Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Ser Ile Asp Ser Glu Asn Pro Asp
          35          40          45

Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn Arg Val Cys Ser Ser
          50          55          60

Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys Thr Met Gly Leu Cys
65          70          75          80

Val Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile Leu Gly
          85          90

```

<210> 9
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Atrax robustus

<400> 9

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1          5          10          15

Val Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys His
          20          25          30

Gly Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
          35          40          45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
          50          55          60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65          70          75          80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
          85          90          95

Leu Gly

```

<210> 10
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 10

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1           5           10           15

Ala Ile Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
                20           25           30

Asp Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asn
          35           40           45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
      50           55           60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65           70           75           80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
          85           90           95

```

Leu Gly

<210> 11

<211> 98

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 11

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1           5           10           15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
                20           25           30

Gly Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
          35           40           45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
      50           55           60

```

ES 2 488 844 T3

Arg Val Cys Ser Ser Asp Arg Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Val Gly Asp Ile
85 90 95

Leu Gly

<210> 12

<211> 97

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 12

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Val Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Glu Asp Phe Met Lys Asn Gly
20 25 30

Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp Ser
35 40 45

Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn Arg
50 55 60

Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys Thr
65 70 75 80

Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile Leu
85 90 95

Gly

<210> 13

<211> 93

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 13

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Asp Phe Met Lys Asn Gly Leu Glu Ser Gln
20 25 30

ES 2 488 844 T3

Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp Ser Glu Asn Pro Asp
35 40 45

Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn Arg Val Cys Ser Ser
50 55 60

Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys Thr Met Gly Leu Cys
65 70 75 80

Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile Leu Gly
85 90

<210> 14

<211> 98

<212> PRT

<213> Hadroryche versuta

<400> 14

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
20 25 30

Gly Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
50 55 60

Arg Ile Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
85 90 95

Leu Gly

<210> 15

<211> 98

<212> PRT

<213> Hadroryche versuta

<400> 15

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

ES 2 488 844 T3

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
20 25 30

Gly Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Asn
50 55 60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
85 90 95

Leu Gly

<210> 16

<211> 98

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 16

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Ile Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Lys Asn
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Gln Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asn
35 40 45

Ser Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Leu Leu Asp Ser
50 55 60

Arg Val Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Met Gly Leu Cys Val Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Ile
85 90 95

Leu Gly

<210> 17

<211> 96

<212> PRT

<213> Atrax robustus

ES 2 488 844 T3

<400> 17

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Ile Thr Leu Ala Val Ile Leu Thr Gln
 1           5           10           15

Ala Val Phe Val Phe Cys Gly Met Thr Asn Glu Asp Phe Met Glu Lys
          20           25           30

Gly Leu Glu Ser Asn Glu Leu Pro Asp Ala Ile Lys Lys Pro Val Asn
          35           40           45

Ser Gly Lys Pro Asp Thr Lys Arg Leu Leu Asp Cys Val Leu Ser Arg
 50           55           60

Met Cys Phe Ser Asn Ala Asn Cys Cys Gly Leu Thr Pro Pro Cys Lys
65           70           75           80

Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Leu Gly Gly Ile Leu
          85           90           95

```

<210> 18

<211> 96

<212> PRT

<213> Atrax robustus

<400> 18

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Ile Thr Leu Ala Val Ile Leu Thr Gln
 1           5           10           15

Ala Val Phe Val Phe Cys Gly Met Thr Asn Glu Asp Phe Met Glu Lys
          20           25           30

Gly Leu Glu Ser Asn Glu Leu His Asp Ala Ile Lys Lys Pro Val Asn
          35           40           45

Ser Gly Lys Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Val Leu Ser Arg
 50           55           60

Met Cys Ser Ser Asp Ala Asn Cys Cys Gly Leu Thr Pro Thr Cys Lys
65           70           75           80

Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Leu Gly Gly Ile Leu
          85           90           95

```

<210> 19

<211> 101

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

ES 2 488 844 T3

<400> 19

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
 1          5          10          15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu His
 20          25          30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
 35          40          45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Leu Val Asp Cys Val Val Asn Thr
 50          55          60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
 65          70          75          80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Arg Gly Leu Val Gly Gly Leu
          85          90          95

Leu Gly Arg Ala Leu
          100

```

<210> 20

<211> 101

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 20

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
 1          5          10          15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Met Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
 20          25          30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
 35          40          45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Leu Val Asp Cys Val Val Asn Thr
 50          55          60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
 65          70          75          80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu
          85          90          95

```

ES 2 488 844 T3

Leu Gly Arg Ala Leu
100

<210> 21
<211> 101
<212> PRT
<213> Hadronyche versuta

<400> 21

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

<210> 22
<211> 101
<212> PRT
<213> Hadronyche infensa

<400> 22

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

ES 2 488 844 T3

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu
85 90 95

Leu Gly Arg Ala Leu
100

<210> 23

<211> 101

<212> PRT

<213> Hadronyche infensa

<400> 23

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Val Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Leu Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
20 25 30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Thr Asp Lys Ala Tyr Ala Glu Arg Val Leu Asp Cys Val Val Asn Thr
50 55 60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu
85 90 95

Leu Gly Arg Ala Leu
100

<210> 24

<211> 101

<212> PRT

<213> Hadronyche versuta

<400> 24

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
20 25 30

ES 2 488 844 T3

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Leu Val Asp Cys Val Val Asn Thr
50 55 60 /

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu
85 90 95

Leu Gly Arg Ala Leu
100

<210> 25

<211> 101

<212> PRT

<213> Hadroryche versuta

<400> 25

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
20 25 30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Val Leu Asp Cys Val Val Asn Thr
50 55 60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu
85 90 95

Leu Gly Arg Ala Leu
100

<210> 26

<211> 100

<212> PRT

<213> Hadroryche versuta

<400> 26

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln

1 5 10 15

Ala Leu Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
20 25 30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
35 40 45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Leu Val Asp Cys Val Val Asn Thr
50 55 60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65 70 75 80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Leu Val Gly Gly Leu Leu
85 90 95

Gly Arg Ala Leu
100

<210> 27

<211> 97

<212> PRT

<213> Atrax robustus

<400> 27

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Ile Thr Leu Ala Val Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Phe Cys Gly Met Thr Asn Glu Asp Phe Met Glu Lys
20 25 30

Gly Phe Lys Ser Asn Asp Leu Gln Tyr Ala Ile Lys Gln Pro Val Asn
35 40 45

Ser Gly Lys Pro Asp Thr Glu Arg Leu Leu Asp Cys Val Leu Ser Arg
50 55 60

Val Cys Ser Ser Asp Glu Asn Cys Cys Gly Leu Thr Pro Thr Cys Thr
65 70 75 80

Met Gly Leu Cys Val Pro Asn Val Gly Gly Leu Leu Gly Gly Leu Leu
85 90 95

Ser

ES 2 488 844 T3

<210> 28
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Atrax robustus

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 29

ES 2 488 844 T3

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1          5          10          15

Ala Leu Leu Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
          20          25          30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Leu Asp
          35          40          45

Thr Glu Asn Pro Asp Thr Glu Arg Gln Leu Asp Cys Val Leu Asn Thr
          50          55          60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65          70          75          80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Asn Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu

          85          90          95

Leu Gly Arg Ala Leu
          100

```

<210> 30
<211> 101
<212> PRT
<213> Hadronyche versuta
<400> 30

ES 2 488 844 T3

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1           5           10           15

Val Leu Leu Val Val Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
          20           25           30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
          35           40           45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Val Leu Asp Cys Val Val Asn Thr
          50           55           60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65           70           75           80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Ile Val Gly Gly Leu
          85           90           95

Leu Gly Arg Ala Leu
          100

```

<210> 31
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta
 <400> 31

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Ala Gln
1           5           10           15

Ala Ile Phe Val Leu Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
          20           25           30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
          35           40           45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Val Val Asp Cys Val Leu Asn Thr
          50           55           60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
65           70           75           80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu
          85           90           95

Leu Gly Arg Ala Leu
          100

```

<210> 32

ES 2 488 844 T3

<211> 101
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 32

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
 1          5          10          15

Ala Leu Leu Val Val Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
 20          25          30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
 35          40          45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Val Leu Asp Cys Val Val Asn Ile
 50          55          60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
 65          70          75          80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Ile Val Gly Gly Leu
 85          90          95

Leu Gly Arg Ala Leu
          100
  
```

<210> 33
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta

<400> 33

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
 1          5          10          15

Ala Leu Leu Val Val Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
 20          25          30
  
```

ES 2 488 844 T3

```

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp
    35                                40                                45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Val Leu Asp Cys Val Val Asn Thr
    50                                55                                60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
    65                                70                                75                                80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Ile Val Gly Gly Leu
    85                                90                                95

Leu Gly Arg Ala Leu
    100

```

<210> 34
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Hadronyche infensa
 <400> 34

```

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Leu Ala Leu Ile Leu Thr Gln
    1                    5                    10                    15

Ala Leu Leu Val Val Cys Gly Lys Ile Asn Glu Asp Phe Met Glu Asn
    20                    25                    30

Gly Leu Glu Ser His Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Ser Ile Asp
    35                                40                                45

Thr Glu Lys Ala Asp Ala Glu Arg Val Leu Asp Cys Val Val Asn Thr
    50                                55                                60

Leu Gly Cys Ser Ser Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys
    65                                70                                75                                80

Thr Leu Gly Ile Cys Ala Pro Ser Val Gly Gly Ile Val Gly Gly Leu
    85                                90                                95

Leu Gly Arg Ala Leu
    100

```

<210> 35
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Hadronyche versuta
 <400> 35

ES 2 488 844 T3

Met Lys Phe Ser Lys Leu Ser Leu Thr Phe Ala Leu Ile Leu Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Leu Val Leu Cys Asp Phe Met Glu Asn Gly Leu Glu Ser His
20 25 30

Ala Leu His Asp Glu Ile Arg Lys Pro Ile Asp Thr Glu Lys Ala Asp
35 40 45

Ala Glu Arg Val Leu Asp Cys Val Val Asn Thr Leu Gly Cys Ser Ser
50 55 60

Asp Lys Asp Cys Cys Gly Met Thr Pro Ser Cys Thr Leu Gly Ile Cys
65 70 75 80

Ala Pro Ser Val Gly Gly Leu Val Gly Gly Leu Leu Gly Arg Ala
85 90 95

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 36

gggcaggttt tttttttt tttt 24

\C&LDOC: .StmLib1:1028279.1 09/02/03

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado con una actividad insecticida de secuencia SEQ ID NO:2.
- 5 2. Un polipéptido aislado con una actividad insecticida derivado de la araña de tela en embudo *Hadronyche versuta* de secuencia SEQ ID NO:2.
3. Una composición insecticida comprendiendo una cantidad efectiva de insecticida del polipéptido según la reivindicación 1 y un portador aceptable en cuanto a la agricultura.
- 10 4. Un ácido nucleico aislado con una codificación de secuencia para el polipéptido según la reivindicación 1.
5. Un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 4 que es ADN.
- 15 6. Un vector de clonación comprendiendo un impulsor enlazado de manera operacional al ADN de la reivindicación 5 y opcionalmente otros elementos de regulación que mejoran la expresión.
7. Un vector de clonación comprendiendo el ADN de acuerdo con la reivindicación 5.
- 20 8. Un baculovirus recombinante u otro virus específico de insecto comprendiendo un vector de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Una célula recombinante comprendiendo un vector de acuerdo con la reivindicación 7.
- 25 10. Una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, donde la célula es una célula vegetal.
11. Una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, donde la célula es una célula procariótica.
- 30 12. Una expresión de tipo casete comprendiendo una codificación genética para el polipéptido según la reivindicación 1.
13. Una secuencia nucleótide que codifica una toxina con una actividad inhibitoria en los canales de calcio de insecto donde dichos códigos de secuencia nucleótide para toda o parte de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 2.
- 35 14. Un microorganismo transformado con una secuencia nucleótide según la reivindicación 13.
15. Un método para controlar las plagas de insectos comprendiendo el contacto de dichas plagas con una cantidad efectiva de insecticida del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 40 16. Un método para cribar las sustancias con una actividad antagonista respecto al canal de calcio activado por voltaje de un insecto comprendiendo los pasos de: (a) cribar una serie de compuestos para determinar aquellos compuestos que inhiben el enlace de un miembro de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con la reivindicación 13, a los canales de calcio de insecto y (b) probar la habilidad de dichos compuestos inhibitorios para actuar como un antagonista de los canales de calcio de insecto.
- 45 17. Un método para cribar las sustancias con una actividad antagonista con respecto al canal de calcio activado por voltaje del insecto comprendiendo los pasos de: (a) cribar una serie de compuestos para determinar aquellos compuestos que inhiben el enlace de un miembro de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con la reivindicación 13, a los canales de calcio del insecto; (b) cribar aquellos compuestos que inhiben el enlace de dicho miembro del grupo para interactuar con los canales de calcio de insecto para identificar aquellos compuestos con una constante de disociación por su interacción con los canales de calcio del insecto menor a 10^{-7} M aproximadamente y (c) determinando si cualquier compuesto identificado con una constante de disociación por su interacción con los canales de calcio del insecto tiene una actividad mínima contra los canales de calcio de vertebrados.
- 50
- 55

FIG. 1

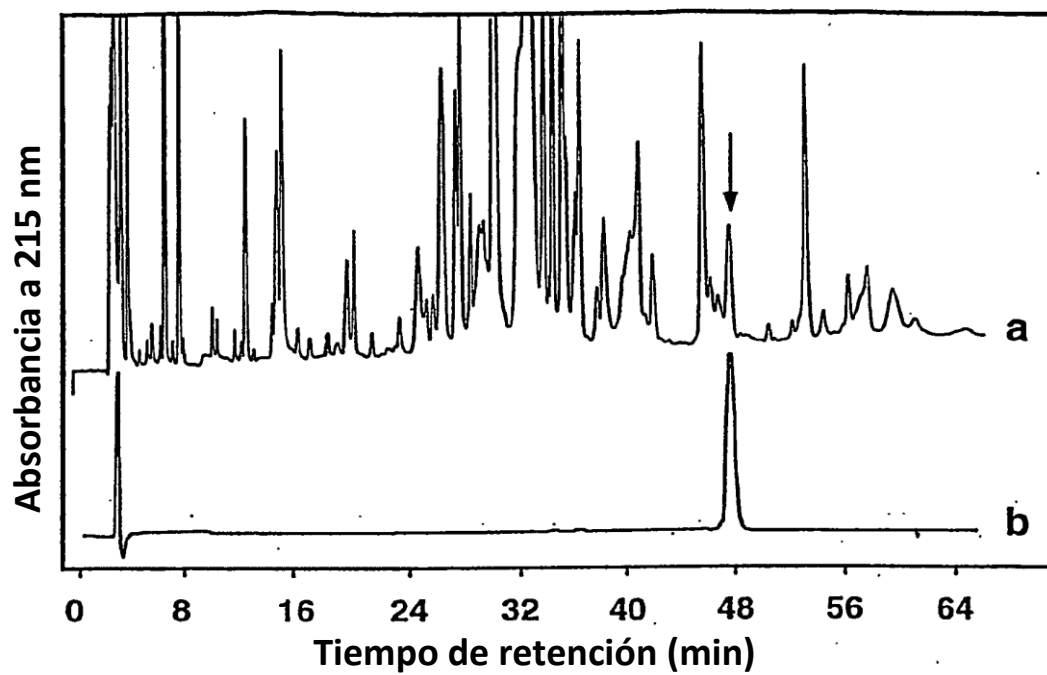


FIG. 2

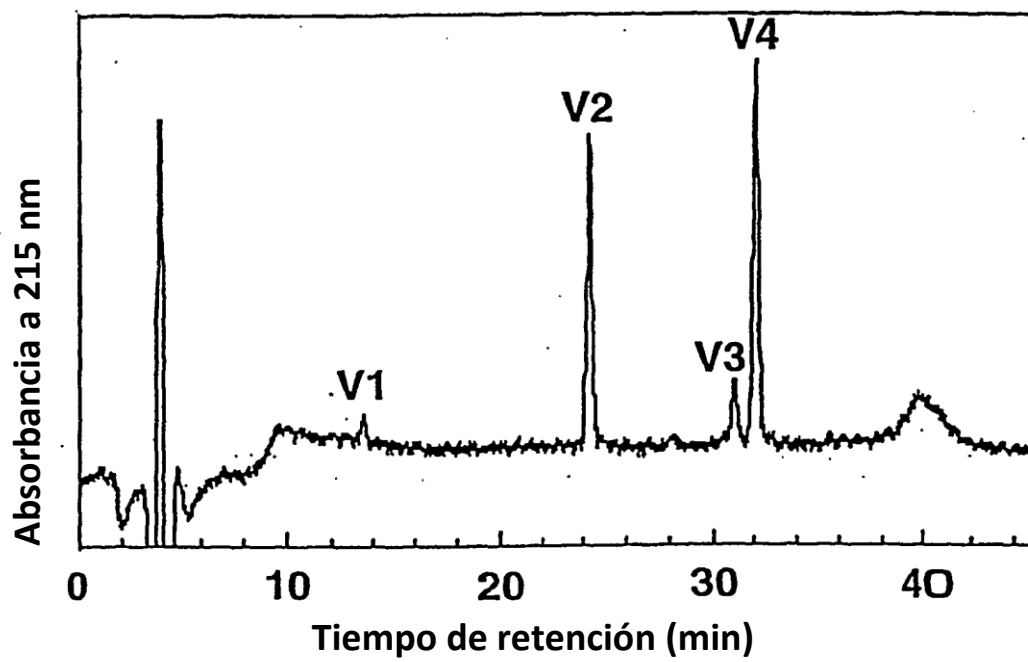


FIG. 3

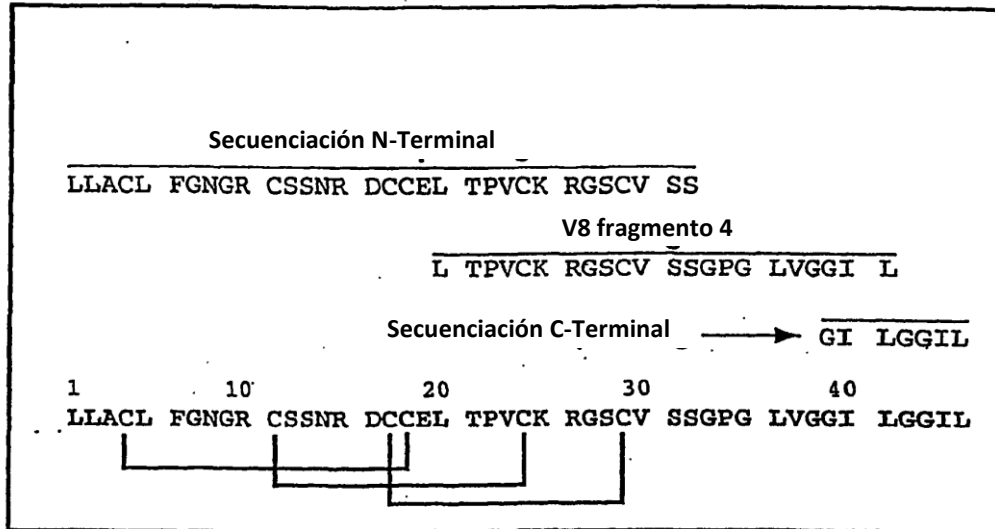


FIG. 4

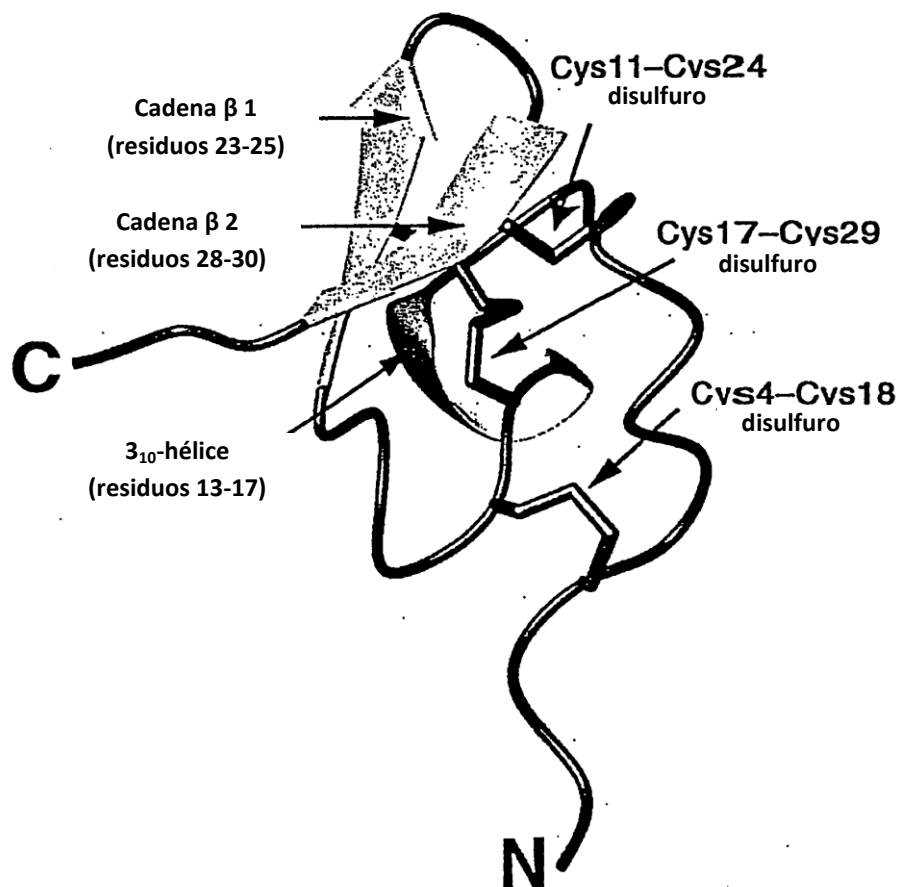


FIG. 5

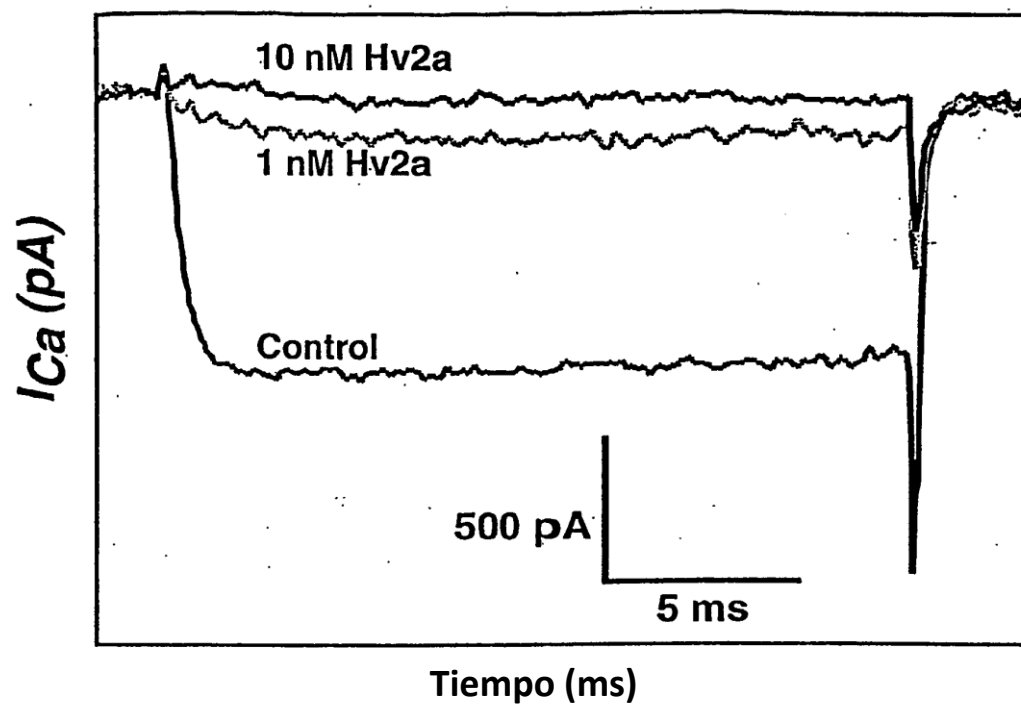


FIG. 6

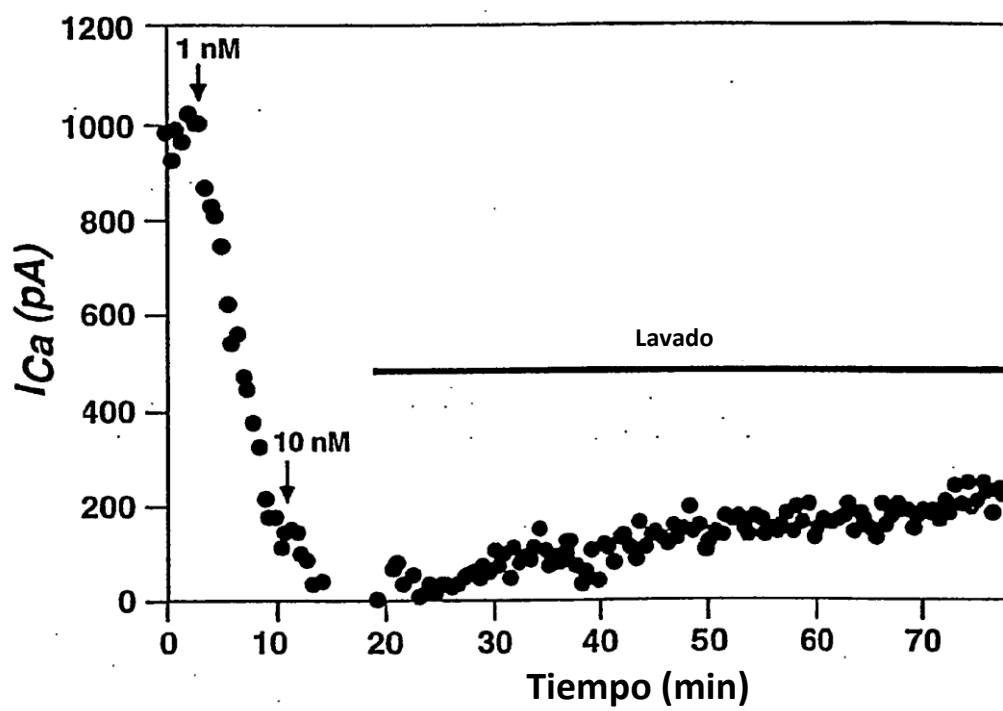


FIG. 7

