

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-526239

(P2014-526239A)

(43) 公表日 平成26年10月6日 (2014. 10. 6)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 7/64 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 7/64	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 P 13/00 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 13/00	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 1/14 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 1/14	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁)

(21) 出願番号	特願2014-527795 (P2014-527795)	(71) 出願人	513041370
(86) (22) 出願日	平成24年8月31日 (2012. 8. 31)		バイオテリガ ホールディングス リミテ
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月30日 (2014. 4. 30)		イド
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/054483		ニュージーランド国, オークランド, キー
(87) 国際公開番号	W02013/030792		ストリート 1 8 8, ピーダブリュシー
(87) 国際公開日	平成25年3月7日 (2013. 3. 7)		タワー
(31) 優先権主張番号	61/530, 168	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成23年9月1日 (2011. 9. 1)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 昆虫病原性菌類から単離された殺虫性脂質薬およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、殺虫性脂質を、掛かる脂質および脂質画分を含む組成物並びにその調製方法と共に提供する。前記脂質または前記脂質を含む組成物を、任意に1種以上の殺虫剤または昆虫病原性真菌を含む昆虫病原性物質と共に用いる、植物病原性昆虫などの昆虫に対する生物学的防除方法も、提供される。

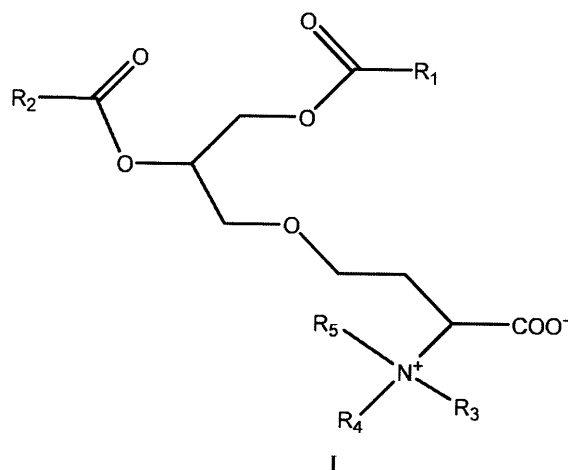
【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離され、精製されているかまたは実質的に純粋な、式 I

## 【化 1】



10

20

(式中、 $R_1$ および $R_2$ は同一または異なることができ、それぞれ脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_3$ 、 $R_4$ および $R_5$ はそれぞれ独立にH、水酸基、カルボキシル基、アミド基、非置換または置換されたアルキル基、非置換または置換されたアルケニル基、非置換または置換されたアルキニル基、および非置換または置換されたアリール基からなる群より選択される。)の脂質。

## 【請求項 2】

1種以上の昆虫の防除用の、請求項 1 記載の脂質。

## 【請求項 3】

$R_1$ および $R_2$ が独立に、C 16 飽和脂肪酸、C 18 飽和脂肪酸、C 18 モノ不飽和脂肪酸、C 18 ジ不飽和脂肪酸およびC 18 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分からなる群より選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載の脂質。

30

## 【請求項 4】

$R_1$ もしくは $R_2$ または $R_1$ および $R_2$ の両方が、C 16 飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 5】

$R_1$ もしくは $R_2$ または $R_1$ および $R_2$ の両方が、C 18 飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 6】

$R_1$ もしくは $R_2$ または $R_1$ および $R_2$ の両方が、C 18 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

40

## 【請求項 7】

$R_1$ もしくは $R_2$ または $R_1$ および $R_2$ の両方が、C 18 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 8】

$R_1$ もしくは $R_2$ または $R_1$ および $R_2$ の両方が、C 18 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 9】

$R_1$ がC 16 飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 10】

50

$R_1$ がC 1 6 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 1 1】

$R_1$ がC 1 6 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC 1 8 ジ不飽和脂肪酸である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 1 2】

$R_2$ がC 1 6 飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 1 3】

$R_2$ がC 1 6 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

10

【請求項 1 4】

$R_2$ がC 1 6 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC 1 8 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 1 5】

$R_2$ がC 1 6 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC 1 8 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 1 6】

$R_1$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

20

【請求項 1 7】

$R_1$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 1 8】

$R_1$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC 1 8 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 1 9】

$R_1$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC 1 8 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 記載の脂質。

【請求項 2 0】

$R_2$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

30

【請求項 2 1】

$R_2$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 2 2】

$R_2$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC 1 8 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 2 3】

$R_2$ がC 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC 1 8 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

40

【請求項 2 4】

$R_1$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 2 5】

$R_1$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 2 6】

$R_1$ がC 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC 1 8 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

50

## 【請求項 27】

$R_1$ がC18モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 28】

$R_2$ がC18モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 29】

$R_2$ がC18モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC18モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 30】

$R_2$ がC18モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC18ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

10

## 【請求項 31】

$R_2$ がC18モノ不飽和脂肪酸の脂肪酸族分であり、 $R_1$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 32】

$R_1$ がC18ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 33】

$R_1$ がC18ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC18ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

20

## 【請求項 34】

$R_1$ がC18ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 35】

$R_2$ がC18ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 36】

$R_2$ がC18ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_1$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

30

## 【請求項 37】

$R_1$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 38】

$R_1$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 39】

$R_2$ がC18トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 40】

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ がそれぞれHまたはメチルである、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

40

## 【請求項 41】

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ がそれぞれメチルである、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 42】

前記脂質が、1,2-ジアシルグリセリル-3-O-4'-(N,N,N-トリメチル)-ホモセリン(ジアシルグリセリル-N,N,N-トリメチルホモセリン、DGT S)である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質。

## 【請求項 43】

前記脂質が、1,2-ジアシルグリセリル-3-O-2'-(ヒドロキシメチル)-(

50

N , N , N - トリメチル ) - - アラニン、または 1 , 2 - ジアシルグリセリル - 3 - O - カルボキシ - ( ヒドロキシメチル ) - コリンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 4 4】

殺虫に有効な量の、1 種以上の請求項 1 記載の脂質を、1 種以上の基剤と共に含む、組成物。

【請求項 4 5】

1 種以上の請求項 1 記載の脂質に富む組成物であって、前記組成物が、1 種以上の子囊菌門真菌の培養物の、またはその培養物からの、細胞抽出物、細胞懸濁液、細胞ホモジネート、細胞溶解物、細胞上清、細胞ろ液、細胞ペレット、または 1 種もしくは 2 種以上の細胞である、あるいはそれを含む、組成物。

10

【請求項 4 6】

1 種以上の請求項 1 記載の脂質が添加された、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

1 種以上の子囊菌門真菌の培養物からの有機溶媒による抽出物が添加された、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記有機溶媒による抽出物が、1 種以上の請求項 1 記載の脂質を含む、組成物。

【請求項 4 8】

再現性よく生存可能な形態および量にある 1 種以上の真菌を含む、請求項 4 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 4 9】

前記 1 種以上の真菌が孢子として存在する、請求項 4 8 記載の組成物。

【請求項 5 0】

粉体、微粉、ペレット、顆粒、スプレー液、乳化液、コロイド、または溶液として処方された、請求項 4 4 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 1】

前記 1 種以上の脂質が、約 1 重量 % ~ 約 99 重量 % の濃度で存在する、前記請求項 4 4 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 2】

約 2 ヶ月よりも長い期間、殺虫剤としての効能を保持可能な安定した組成物である、請求項 4 4 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 5 3】

真菌の単一株を含むまたは真菌の単一株に由来する、請求項 4 4 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 4】

前記子囊菌門真菌が、ボーベリア・バシアーナ 菌株 K 4 B 3 ( N M I A 番号 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 号、2008 年 10 月 14 日寄託 ) である、請求項 4 5 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 5】

ボーベリア・バシアーナ K 4 B 3 N M I A 番号 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 号またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・マスカリウム 菌株 K 4 V 1 ( N M I A 番号 N M 0 5 / 4 4 5 9 3 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・マスカリウム 菌株 K 4 V 2 ( N M I A 受託番号第 N M 0 5 / 4 4 5 9 4 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・マスカリウム 菌株 K 4 V 4 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 0 7 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、ボーベリア・バシアーナ 菌株 K 4 B 1 ( N M I A 受託番号第 N M 0 5 / 4 4 5 9 5 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、ボーベリア・バシアーナ 菌株 K 4 B 2 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 1 0 号またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・ロングスポラム 菌株 K T 4 L 1 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 0 9 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、およびバエシロマイセス・フモソ

40

50

ロセウス 菌株 K 4 P 1 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 0 8 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株より選択される、再現性よく生存可能な形態および量にある 1 種以上の菌株を含む、請求項 4 4 ~ 5 2 または請求項 5 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 6】

- i ) 少なくとも 1 種のボーベリシン、または
- i i ) 少なくとも 1 種のバシアノリド、または
- i i i ) 少なくとも 1 種の昆虫病原性真菌、または
- i v ) 上記 ( i ) ~ ( i v ) の任意の 2 種以上

を更に含む、請求項 4 4 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 5 7】

1 種以上の殺虫剤を更に含む、請求項 4 4 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 8】

1 種以上の昆虫の防除用組成物の製造における、1 種以上の請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の脂質の使用。

【請求項 5 9】

1 種以上の昆虫の防除用組成物の製造における、1 種以上の子囊菌門真菌の培養物からの有機溶媒による抽出物の使用であって、前記有機溶媒による抽出物が、1 種以上の請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の脂質を含む、使用。

【請求項 6 0】

前記 1 種以上の真菌が、ボーベリア・バシアーナ 菌株 K 4 B 3 N M I A 番号 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 号またはその同定のための特徴を有する菌株である、請求項 5 9 記載の使用。

20

【請求項 6 1】

1 種以上の昆虫の防除方法であって、前記 1 種以上の昆虫を、有効な量の 1 種以上の請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の脂質、または有効な量の請求項 4 4 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物に接触させるステップを含む、方法。

【請求項 6 2】

1 種以上の昆虫の防除方法であって、1 種以上の請求項 1 記載の脂質もしくはその機能性変形体、または請求項 4 4 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物を、任意に少なくとも 1 種の昆虫病原性真菌と共に、現場に散布するステップを含む、方法。

30

【請求項 6 3】

1 種以上の殺虫剤または 1 種以上の昆虫病原性物質に対する昆虫の耐性の全てまたは一部を奪う方法であって、1 種以上の請求項 1 記載の脂質もしくはその機能性変形体、または請求項 4 4 ~ 5 7 のいずれか一項の組成物を現場に散布するステップ、あるいは昆虫をこれに接触させるステップを含む、方法。

【請求項 6 4】

1 種もしくは 2 種以上の殺虫剤または 1 種もしくは 2 種以上の昆虫病原性物質、またはそれらの任意の組み合わせと共に、前記 1 種以上の脂質を現場に散布するステップ、あるいは昆虫をこれに接触させるステップを含む、請求項 6 3 記載の方法。

40

【請求項 6 5】

前記投与される 1 種以上の殺虫剤または 1 種以上の昆虫病原性物質が、当該昆虫が耐性を有している、または耐性を有していることもしくは耐性を有することになることが予想される殺虫剤または昆虫病原性物質と同一である、請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

1 種以上の請求項 1 記載の脂質に接触した 1 種以上の昆虫の防除方法であって、前記 1 種以上の昆虫を防除するために有効な量の殺虫剤または昆虫病原性物質を現場に散布するステップ、あるいは前記 1 種以上の昆虫をこれに接触させるステップを含む、方法。

【請求項 6 7】

前記 1 種以上の本発明の脂質の散布または接触と、前記 1 種以上の殺虫剤または昆虫病

50

原性物質の散布または接触とが、同時、連続的、または別途である、請求項 6 6 記載の昆虫の防除方法。

【請求項 6 8】

1 種以上の殺虫剤または 1 種以上の昆虫病原性物質に対する昆虫の耐性の全てまたは一部を奪う方法であって、昆虫病原性真菌を、任意に殺虫剤または昆虫病原性物質と共に現場に散布するステップ、あるいは 1 種以上の昆虫をこれに接触させるステップを含む、方法。

【請求項 6 9】

昆虫病原性真菌を、1 種以上の請求項 1 記載の脂質もしくはその機能性変形体、または請求項 4 4 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物と共に現場に散布するステップ、あるいは 1 種以上の昆虫をこれに接触させるステップを含む、請求項 6 8 記載の方法。

10

【請求項 7 0】

存在する場合に、1 種以上の真菌が、ボーベリア・バシアーナ K 4 B 3 N M I A 番号 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 号またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・マスカリウム 菌株 K 4 V 1 ( N M I A 番号 N M 0 5 / 4 4 5 9 3 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・マスカリウム 菌株 K 4 V 2 ( N M I A 受託番号第 N M 0 5 / 4 4 5 9 4 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・マスカリウム 菌株 K 4 V 4 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 0 7 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、ボーベリア・バシアーナ 菌株 K 4 B 1 ( N M I A 受託番号第 N M 0 5 / 4 4 5 9 5 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、ボーベリア・バシアーナ 菌株 K 4 B 2 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 1 0 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、レカニシリウム・ロングスポラム 菌株 K T 4 L 1 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 0 9 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株、およびパエシロマイセス・フモソロセウス 菌株 K 4 P 1 ( N M I A 受託番号第 N M 0 6 / 0 0 0 0 8 号 ) またはその同定のための特徴を有する菌株より選択される、1 種以上の菌株である、請求項 6 2 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7 1】

1 種以上の前記 1 種以上の昆虫が、植物病原性昆虫である、請求項 6 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

1 種以上の前記 1 種以上の昆虫が、半翅目の昆虫である、請求項 6 1 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7 3】

前記植物病原性昆虫が、蚊、コナガを含む蛾、アザミウマ ( アザミウマ類 ) 、アブラムシ、キジラミ、カイガラムシまたはコナジラミから構成される群より選択される、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

前記 1 種以上の脂質または前記組成物が予防的に散布される、請求項 6 2 ~ 6 5 または 6 9 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記 1 種以上の脂質または前記組成物が、前記 1 種以上の昆虫が現場に存在するときに散布される、請求項 6 2 ~ 6 5 または 6 9 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7 6】

前記 1 種以上の脂質または前記組成物が、間接的に現場に散布される、請求項 6 2 ~ 6 5 または 6 9 ~ 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

昆虫に対する殺虫活性を有する組成物の調製方法であって、1 種以上の請求項 1 記載の脂質を合成することが可能な細胞の培養物から、前記 1 種以上の脂質を単離するステップと、前記 1 種以上の脂質を基剤と組み合わせて前記組成物を形成するステップと、を含む、方法。

50

**【請求項 78】**

前記培養物が 1 種以上の子囊菌門真菌の培養物である、請求項 77 記載の方法。

**【請求項 79】**

生物学的防除組成物の製造方法であって、

1 種以上の子囊菌門真菌の培養物を用意するステップと、

少なくとも 1 種の請求項 1 記載の脂質の産生に好適な条件下に前記培養物を保持するステップと、

i) 前記少なくとも 1 種の脂質を基剤と組み合わせるステップ、または

i i) 前記少なくとも 1 種の脂質を 1 種若しくは 2 種以上の本願に記載の昆虫病原性真菌と組み合わせるステップ、または

i i i) 前記少なくとも 1 種の脂質を前記真菌培養物から分離するステップ、または

i v) 前記少なくとも 1 種の脂質を少なくとも部分的に精製もしくは単離するステップ、または

v) (i) ~ (i v) の 2 つ以上の任意の組み合わせ、と

を含み、それにより前記組成物を形成する、方法。

**【請求項 80】**

前記保持するステップの後に、1 つまたは 2 つ以上の溶菌ステップを更に含む、請求項 79 記載の方法。

**【請求項 81】**

1 種以上の子囊菌門真菌の培養物の有機溶媒抽出または培養抽出物を用意するステップと、

1 種以上の請求項 1 記載の脂質を、1 種以上の他の化合物から、少なくとも部分的に分離するステップと、

前記 1 種以上の脂質を回収するステップと、

を含む、殺虫性脂質の調製方法。

**【請求項 82】**

前記有機溶媒が、クロロホルム、二塩化メタン、それらに限定されないが、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノールなどの短鎖アルキルアルコールを含むアルカノール、またはそれらの任意の 2 種以上の組み合わせである、あるいはそれを含む、請求項 81 記載の方法。

**【請求項 83】**

前記分離が、アニオン交換クロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーを含むクロマトグラフィーによる、請求項 81 または 82 に記載の方法。

**【請求項 84】**

前記培養物が、ボーベリア・バシアーナ K 4 B 3 N M I A 番号 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 号またはその同定のための特徴を有する菌株の培養物である、請求項 77 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、一般に、生物学の分野に関し、より詳細には、糸状菌から調製された脂質を含む脂質、前記脂質を含む組成物、ならびにかかる脂質および組成物の生物学的防除剤としての使用に関する特定の実施形態に関する。この脂質およびこの脂質を含む組成物を用いた、植物病原性昆虫を含む昆虫を防除する方法も提供する。

**【背景技術】****【0002】**

昆虫および昆虫集団を防除する能力は、ヒトおよび動物の健康状態、農業、ならびに広範囲の経済活動にとって非常に重要である。例えば、昆虫は、ヒトの重大な疾患の一部の運び屋である。蚊は、マラリア、ウエストナイル熱およびデング熱の運び屋であり、マダニは、チフス、アフリカダニ熱、およびライム病などのリケッチア症の運び屋であり、ノ

10

20

30

40

50



ミは、ペストの運び屋である。同様に、害虫および病原体（集合的に「植物病原体」）によって引き起こされる植物の疾患または損失は、植物ベースの農業および工業に著しい経済的コストを引き起こす。損失は、収穫前および収穫後の両方の農産物の損傷、植物自体の損失、または成長および生産の能力の低下によって生じ得る。

#### 【 0 0 0 3 】

従来、植物の害虫および病原体などの昆虫の大規模な防除は、化学殺虫剤の適用により行われてきたが、物理的方法（例えば、捕捉、採取、障壁）による防除も用いられ得る。化学薬品の使用は、いくつかの不都合をもたらす。植物の害虫および病原体などの昆虫は、時間とともに化学薬品への耐性を発達させることができ、かつ耐性を発達させて、抵抗性個体群を生じさせた。実際、殺虫剤への耐性は、園芸業などの植物ベースの農業および工業のバイアビリティーにとって最大の課題である。

10

#### 【 0 0 0 4 】

特に、経済的に重要ないくつかの植物病原性昆虫に関する問題について説明する。世界的なミカンキイロアザミウマ（western flower thrips）の集団は、アセフェート、アバメクチン、クロルピリホス、エンドスルファン、メソミル、メチオカルブ、オメトエート、ピラゾホスおよびタウフルバリネートの例を含む殺虫剤のほとんどのグループに耐性を示すことが報告されている。ニュージーランドでは、ネギアザミウマの集団は、デルタメトリンへの耐性を発達させ、地域個体群は、ダイアジノンおよびジクロルボスに耐性を示すことが報告されている。米国では、ネギアザミウマは、多くの殺虫剤に耐性を示すことが報告されている（Grossman, 1994）。温室シロバエは、報告によると、有機塩素剤、有機リン酸エステル、カルバミン酸塩およびピレスロイド系殺虫剤への耐性を発達させてきた（例えば、Georghiou 1981、Anis & Brennan 1982、Elhag & Horn 1983、Wardlow 1985、およびHommes 1986）。より新しい殺虫剤のブプロフェジンおよびテフルベンズロンへの耐性も報告された（Gorman et al. 2000）。

20

#### 【 0 0 0 5 】

化学残留物も環境ハザードを引き起こし、健康問題を引き起こし得る。ここ20年にわたり、微生物殺虫剤などの生物学的防除における関心の復活が、化学毒性に対する懸念に呼応して公的圧力から直接来ている。生物学的防除は、潜在的に現行手法よりも有効で、特異的である植物病原菌の防除および化学物質への依存の低下の代替手段を示す。かかる生物学的防除法は、化学殺虫剤への「天然」の代替物として受け取られ、より大きな大衆の支持、環境汚染の低下、持続可能性の増加という利点を有する。

30

#### 【 0 0 0 6 】

生物学的防除のメカニズムは多様である。有効であることが証明されている1つのメカニズムは、植物病原性昆虫を防除するための細菌などの拮抗微生物の使用である。例えば、パチルス・チューリングエンシスの大量生産により、ニュージーランドのオークランドにおけるペインティッドアップルモス（painted apple moth）を防除するためのこの微生物殺虫剤の使用が可能になった。

#### 【 0 0 0 7 】

しかし、生物学的防除剤（BCA）の適用の成功例は少なく、今日までに、BCAは、栽培者にあまり受け入れられておらず、非経済的であるとみなされてきた。

40

#### 【 0 0 0 8 】

したがって、植物病原性昆虫を含む昆虫を有効に防除するための薬剤および方法、特に、迅速に作用し、昆虫防除における有効性が高く、頻繁または集中的な適用を必要とせず、コストがより低いか、または現在利用可能な殺虫剤よりも毒性が低い薬剤に対するニーズがある。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 発明が解決しようとする課題 】

#### 【 0 0 0 9 】

したがって、本発明の目的は、このニーズを満たすための何らかの方法を提供すること

50

、植物病原性昆虫を含む昆虫および昆虫集団の防除に有用な１つ以上の薬剤ならびに１つ以上の方法を提供するか、または少なくとも有用な選択を大衆に提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

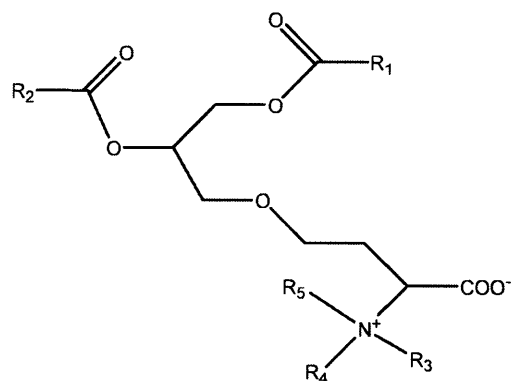
本発明は、殺虫性脂質およびそれらを調製するための方法を提供する。既知の殺虫剤に対するこれらの脂質の相違点は、これらの脂質が新しいクラスの殺虫剤を含むことを示す。

【００１１】

したがって、第１の態様において、本発明は、１種以上の昆虫の防除に使用するための、単離され、精製されているかまたは実質的に純粋な式Ⅰの脂質に関する：

10

【化１】



20

Ⅰ

（式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は同一または異なることができ、それぞれ脂肪酸の脂肪族部分であり、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ独立にH、水酸基、カルボキシル基、アミド基、非置換または置換されたアルキル基、非置換または置換されたアルケニル基、非置換または置換されたアルキニル基、および非置換または置換されたアリール基からなる群より選択される。）

30

【００１２】

一実施形態において、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、独立に、C 1 6 飽和脂肪酸、C 1 8 飽和脂肪酸、C 1 8 モノ不飽和脂肪酸、ならびにC 1 8 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分を含む群から選択される。

【００１３】

一実施形態において、R<sub>1</sub>もしくはR<sub>2</sub>またはR<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の両方は、C 1 6 飽和脂肪酸の脂肪族部分である。

【００１４】

一実施形態において、R<sub>1</sub>もしくはR<sub>2</sub>またはR<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の両方は、C 1 8 飽和脂肪酸の脂肪族部分である。

40

【００１５】

一実施形態において、R<sub>1</sub>もしくはR<sub>2</sub>またはR<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の両方は、C 1 8 モノ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である。

【００１６】

一実施形態において、R<sub>1</sub>もしくはR<sub>2</sub>またはR<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の両方は、C 1 8 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である。

【００１７】

一実施形態において、R<sub>1</sub>もしくはR<sub>2</sub>またはR<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の両方は、C 1 8 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である。

50



実施形態において、 $R_1$ は、C 1 8 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ は、C 1 8 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である。さらなる実施形態において、 $R_1$ は、C 1 8 トリ不飽和脂肪酸の脂肪族部分であり、 $R_2$ は、C 1 8 ジ不飽和脂肪酸の脂肪族部分である。

【0026】

一実施形態において、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ はそれぞれ、Hまたはメチルである。別の実施形態において、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ はそれぞれ、メチルである。

【0027】

一実施形態において、この脂質はベタイン脂質である。

【0028】

一実施形態において、この脂質は、1, 2 - ジアシルグリセリル - 3 - O - 4' - (N, N, N - トリメチル) - ホモセリン (ジアシルグリセリル - N, N, N - トリメチルホモセリン、D G T S) である。別の実施形態において、この脂質は、1, 2 - ジアシルグリセリル - 3 - O - 2' - (ヒドロキシメチル) - (N, N, N - トリメチル) - アラニン、または1, 2 - ジアシルグリセリル - 3 - O - カルボキシ - (ヒドロキシメチル) - コリンである。

【0029】

本発明は、本発明の1種以上の脂質および1種以上の菌類を含む組成物ならびに製剤を含む少なくとも1つの薬学的または農学的に許容される担体と共に、本明細書に開示する脂質のうちの1つ以上を含む組成物ならびに製剤を提供する。かかる組成物は、かかる脂質を生成する細胞の細胞抽出物、細胞懸濁液、細胞ホモジネート、細胞溶解物、細胞上清、細胞ろ液、または細胞ペレットであり得る。特定の例示的な実施形態において、この組成物は、例えば、精製または付加によって、本発明の1種以上の脂質中に濃縮される。他の例示的な実施形態において、この組成物は、本発明の1つ以上の付加脂質を含む。例えば、一実施形態において、この組成物は、本発明の1種以上の脂質を加えられた、上記に記載の細胞抽出物、細胞懸濁液、細胞ホモジネート、細胞溶解物、細胞上清、細胞ろ液、または細胞ペレットである。

【0030】

したがって、第2に態様において、本発明は、1つ以上の担体と共に、本発明の1種以上の脂質を含む組成物に関する。

【0031】

さらなる態様において、本発明は、昆虫、例えば、吸汁昆虫、または鞘翅目、双翅類もしくは鱗翅類の昆虫に対する殺虫活性を有する脂質の調製法を提供する。本方法は、一般に、1種以上の子囊菌門真菌の培養物などの適切な細胞培養物から本明細書に記載の脂質のうちの1つ以上を単離することを含む。特定の実施形態において、この細胞は、菌系成長を支えることができる条件下で増殖するか、または増殖した。かかる脂質は、細胞の培養物もしくは上清から、または細胞培養物に由来する胞子の懸濁液から単離され、天然型で使用されてもよく、または特定の適用にふさわしいように別の方法で精製もしくは濃縮されてもよい。

【0032】

昆虫集団を防除する方法も本発明で提供される。本方法は、一般的に、この集団と本明細書に記載の殺虫有効量の脂質とを接触させることを含む。かかる方法を用いて、特定領域の標的昆虫を死滅させるかまたはその数を減らしてもよく、または受容昆虫による感染を防ぐために環境領域などの場所に予防的に適用されてもよい。

【0033】

さらなる態様において、本発明は、生物学的防除組成物を生成するための方法であって、

- 1種以上の子囊菌門真菌の培養物を提供するステップと、
- 本発明の少なくとも1種の脂質の生成に適する条件下でこの培養物を維持するステップと、
- i) 本発明の少なくとも1種の脂質と担体とを混合するステップ、または
- ii) 本発明の少なくとも1種の脂質と本明細書に記載の1種以上の昆虫病原性菌類とを

10

20

30

40

50

混合するステップ、または

i i i) この菌類もしくは菌類の培養物から本発明の少なくとも１種の脂質を分離するステップ、または

i v) 本発明の少なくとも１種の脂質を少なくとも部分的に精製もしくは単離するステップ、または

v) (i) ~ (i v) の２つ以上の任意の組み合わせ、とを含む方法を提供する。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、この組成物は、本発明の脂質を加えられた上記に記載の菌類、菌類培養物、または菌類培養上清を含む。

【 0 0 3 5 】

本発明は、さらに、１つ以上の植物病原性昆虫などの１種以上の昆虫の防除のための本発明の脂質または本発明の組成物の使用に関する。１種以上の昆虫の防除のための組成物の製造における本発明の脂質の使用が同様に企図される。

【 0 0 3 6 】

さらなる態様において、本発明は、１種以上の昆虫を防除する方法であって、１種以上の昆虫と本発明の脂質もしくはその機能的変異体とを接触させることを含む方法を提供する。

【 0 0 3 7 】

本発明は、さらに、１つ以上の植物病原性昆虫などの１種以上の昆虫を防除する方法であって、任意選択で、本明細書に記載の少なくとも１つの昆虫病原菌と共に本発明の脂質またはその機能的変異体を植物またはその周囲などの場所に適用することを含む方法に関する。

【 0 0 3 8 】

別の態様において、本発明は、１種以上の殺虫剤または１種以上の昆虫病原性物質に対する昆虫の耐性を完全にまたは部分的に逆転させる方法であって、この昆虫を本発明の脂質と接触させることを含む方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

場合により、本方法は、１種以上の殺虫剤または１種以上の昆虫病原性物質、またはこれらの任意の組み合わせと共に、この昆虫を本発明の脂質と接触させることを含む。

【 0 0 4 0 】

各種実施形態において、投与される１種以上の殺虫剤または１種以上の昆虫病原性物質は、昆虫が耐性を示すか、耐性を示すことが予測されるか、または耐性になる薬剤と同じである。

【 0 0 4 1 】

さらなる態様において、本発明は、前記１種以上の昆虫の防除に有効な殺虫剤または昆虫病原性物質の量で、本発明の１種以上の脂質と接触させた１種以上の昆虫を防除する方法を提供する。

【 0 0 4 2 】

この１種以上の殺虫剤または１種以上の昆虫病原性物質は、本発明の脂質の投与前、投与と同時に、または投与後に投与されてもよい。したがって、本発明の１種以上の脂質ならびに１種以上の殺虫剤または１種以上の昆虫病原性物質の投与は、同時、連続的、または別々であってもよい。

【 0 0 4 3 】

別の態様において、本発明は、１種以上の殺虫剤または１種以上の昆虫病原性物質に対する昆虫の耐性を完全にまたは部分的に逆転させる方法であって、任意選択で殺虫剤または昆虫病原性物質と共に本発明の昆虫病原性菌類と１種以上の昆虫を接触させることを含む方法を提供する。

【 0 0 4 4 】

一実施形態において、本方法は、本発明の１種以上の脂質と共に、昆虫病原性菌類と１

10

20

30

40

50

種以上の昆虫を接触させることを含む。

【0045】

以下の実施形態は、本明細書中の態様のいずれかに関し得る。

【0046】

一実施形態において、少なくとも1つの菌類は、以下の亜綱のうちの1種以上の菌類を含むフンタマカビ綱である：コロノフォラ目、ヒボクレア目、メラノスポラ目、もしくはミクロアスクス目のうちの1種以上の菌類などのボタンタケ亜綱；ポリニア目（*Boliales*）、カロスフェリア目（*Calosphaerales*）、カエトスフェリア目（*Chaetosphaerales*）、コニオケータ目（*Coniochaetales*）、ディアポルテ目（*Diaporthales*）、マグナポルテ目（*Magnaporthales*）、オフィオストマ目（*Ophiostomatales*）、アカパンカビ目（*Sordariales*）のうちの1種以上の菌類を含むフンタマカビ綱；クロサイワイタケ目（*Xylariales*）の菌類およびコラリオナステス目（*Koraliionastetales*）、ルルワーチア目（*Lulworthiales*）、メリオラ目（*Meliolales*）、クロカワキン目（*Phyllachorales*）、およびトリコスフェリア目（*Trichosphaerales*）の菌類を含むクロサイワイタケ亜綱。

10

【0047】

一実施形態において、1種以上の菌類は、例えば、バイオネクトリア科（*Bionectriaceae*）、バツカクキン科、ボタンタケ科（*Hypocreaceae*）、ネクトリア科（*Nectriaceae*）、ニエスリアセア（*Niessliaceae*）、またはオフィオコルディケプス科（*Ophiocordycipitaceae*）の1種以上の菌類などのヒボクレア目のものである。

20

【0048】

一実施形態において、1種以上の菌類は、以下の属の1種以上の菌類を含むバツカクキン科のものである：タケ類てんぐ巢病菌（*Aciculosporium*）、*Ascopolyporus*、*Atkinsonella*、*Atricordyceps*、*Balanisia*、*Berkelella*、*Cavimalum*、*Cepsiclavaria*、バツカクキン属（*Claviceps*）、*Cordycepioides*、冬虫夏草属（*Cordyceps*）、*Dussiiella*、チモシーがまの穂病菌など（*Epichloe*）、*Epicrea*、*Helminthascus*、*Heteroepichloe*、*Hyperdermium*、*Hypocreella*、*Konradia*、*Loculistruma*、*Metacordyceps*、*Moelleriella*、*Mycomalumus*、*Myriogenospora*、*Neobarya*、*Neoclaviceps*、*Neocordyceps*、*Parepichloe*、*Phytocordyceps*、*Podocrella*、*Regiocrella*、*Romanoa*、*Shimizuomyces*、*Sphaerocordyceps*、*Stereocrea*、*Torrubie*、*Wakefieldiomyces*、*Akanthomyces*、*Ascher*、*sonia*、ビューベリア属（*Beauveria*）、*Chaunopycnis*、*Corallocytostroma*、*Culiciniomyces*、*Drechmeria*、*Ephelis*、*Gibellula*、*Haptocillium*、*Harposporium*、*Hirsutella*、*Hymenostilbe*、*Isaria*、*Lecanicillium*、*Mariannaea*、メタリジウム菌（*Metarhizium*）、*Microhilum*、*Neomunkia*、*Neotyphodium*、*Nomuraea*、*Paecilomyces*、*Pochonia*、*Polycephalomyces*、*Pseudogibellula*、*Simplicillium*、*Sorosporiella*、*Tolypocladium*または*Ustilaginoides*。

30

40

【0049】

例えば、1種以上の菌類は、例えば、*Beauveria bassiana*、*Beauveria brongniartii*、*Beauveria felina*、またはB

50

*eauveria globulifera*のうちの1つ以上の菌株を含むビューベリア属のものである。

【0050】

別の実施形態において、この1種以上の菌類は、以下の属の1種以上の菌類を含むボタンタケ科 (*Hypocreaceae*) のものである: *Aphysiosstroma*、*Cladobotryum*、*Gliocladium*、*Hypocrea*、*Hypocreopsis*、*Hypomyces*、*Mycogone*、*Podostroma*、*Protocrea*、*Rogersonia*、*Sarawakus*、*Sepedonium*、*Sphaerostilbella*、*Sporophagomyces*、*Stephanoma* or *Trichoderma*。

10

【0051】

一実施形態において、この1種以上の菌類は、以下のうちの1つ以上を含むトリコデルマ属または *Hypocrea phyllostachydis* を含む1つ以上のボタンタケ種のものである: *Trichoderma aggressivum*、*Trichoderma asperellum*、*Trichoderma atroviride*、*Trichoderma aureoviride*、*Trichoderma austrokingii*、*Trichoderma brevicompactum*、*Trichoderma candidum*、*Trichoderma caribbaeum* var. *aequatoriale*、*Trichoderma caribbaeum* var. *caribbaeum*、*Trichoderma catoptron*、*Trichoderma cremeum*、*Trichoderma ceramicum*、*Trichoderma cerinum*、*Trichoderma chlorosporum*、*Trichoderma chromospermum*、*Trichoderma cinnamomeum*、*Trichoderma citrinoviride*、*Trichoderma crassum*、*Trichoderma cremeum*、*Trichoderma dingleyeae*、*Trichoderma dorotheae*、*Trichoderma effusum*、*Trichoderma erinaceum*、*Trichoderma estonicum*、*Trichoderma fertile*、*Trichoderma gelatinosus*、*Trichoderma ghanense*、*Trichoderma hamatum*、*Trichoderma harzianum*、*Trichoderma helicum*、*Trichoderma intricatum*、*Trichoderma konilangbra*、*Trichoderma koningii*、*Trichoderma koningiopsis*、*Trichoderma longibrachiatum*、*Trichoderma longipile*、*Trichoderma minutisporum*、*Trichoderma oblongisporum*、*Trichoderma ovalisporum*、*Trichoderma petersenii*、*Trichoderma phyllostachydis*、*Trichoderma piluliferum*、*Trichoderma pleuroticola*、*Trichoderma pleurotum*、*Trichoderma polysporum*、*Trichoderma pseudokoningii*、*Trichoderma pubescens*、*Trichoderma reesei*、*Trichoderma rogersonii*、*Trichoderma rossicum*、*Trichoderma saturnisporum*、*Trichoderma sinensis*、*Trichoderma sinuosum*、*Trichoderma* sp. MA 3642、*Trichoderma* sp. PPRI 3559、*Trichoderma spirale*、*Trichoderma stramineum*、*Trichoderma strigosum*、*Trichoderma stromaticum*、*Trichoderma surrotundum*、*Trichoderma taiwanense*、*Trichoderma thailandicum*、*Trichoderma thelephoricolum*、*Trichoderma* t

20

30

40

50

*heobromicola*、*Trichoderma tomentosum*、*Trichoderma velutinum*、*Trichoderma virens*、*Trichoderma viride*、*Trichoderma viridescens*。

【0052】

各種実施形態において、この1種以上の菌類は、*Beauveria bassiana* K4B3 NMIA番号V08/025855またはその同定のための特徴を有する菌株；*Lecanicillium muscarium* K4V1株（NMIA番号NM05/44593）またはその同定のための特徴を有する菌株；*Lecanicillium muscarium* K4V2株（NMIA受託番号NM05/44594）またはその同定のための特徴を有する菌株；*Lecanicillium muscarium* K4V4株（NMIA受託番号NM06/00007）またはその同定のための特徴を有する菌株；*Beauveria bassiana* K4B1株（NMIA登録番号NM05/44595）またはその同定のための特徴を有する菌株；*Beauveria bassiana* K4B2株（NMIA受託番号NM06/00010）またはその同定のための特徴を有する菌株；*Lecanicillium longisporum* KT4L1株（NMIA受託番号NM06/00009）またはその同定のための特徴を有する菌株；*Paecilomyces fumosoroseus* K4P1株（NMIA受託番号NM06/00008）またはその同定のための特徴を有する菌株から選択される1つ以上菌株である。

10

【0053】

各種実施形態において、子囊菌門（*phylum Ascomycota*）の菌類から単離、取得、または入手可能な組成物は、脂質を少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99重量%含み、有用な範囲は、これらの値の全ての間（例えば、約1～約99、約5～約99、約10～約99、約15～約99、約20～約99、約25～約99、約30～約99、約35～約99、約40～約99、約45～約99、約50～約99、約55～約99、約60～約99、約65～約99、約70～約99、約75～約99、約80～約99、約85～約99、または約90～約99重量%）から選択され得る。

20

【0054】

本明細書において有用な任意の組成物または分離株は、1種以上の子囊菌門真菌を含む培養物から取得されるかまたは入手可能な組成物および分離株を含み、この1種以上の子囊菌門真菌が存在するかまたは存在していたが、その後除去された培養物から取得されてもよいことは理解されるべきである。

30

【0055】

一実施形態において、本明細書において有用な組成物は、少なくとも約0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mg/mLの脂質を含み、有用な範囲は、これらの値の全ての間（例えば、約0.01～約1.0、約0.01～約10、約0.01～約20、約0.01～約30、約0.01～約40、約0.01～約50、約0.01～約60、約0.01～約70、約0.01～約80、約0.01～約90、約0.01～約100、約0.1～約1.0、約0.1～約10、約0.1～約20、約0.1～約30、約0.1～約40、約0.1～約50、約0.1～約60、約0.1～約70、約0.1～約80、約0.1～約90、約0.1～約100、約0.7～約1.0、約0.7～約10、約0.7～約20、約0.7～約30、約0.7～約40、約0.7～約50、約0.7～約60、約0.7～約70、約0.7～約80、約0.7～約90、約0.7～約100mg/mL）から選択され得る。

40

50



## 【0056】

本発明の1種以上の脂質を生成する例示的な菌類細胞には、2008年10月14日にオーストラリア国家計量機関(National Measurement Institute of Australia (NMI A))に登録番号V08/025855で寄託された*Beauvaria bassiana* K4B3株またはその同定のための特徴を有する培養物;*Beauvaria bassiana* AM2株、*Beauvaria bassiana* F480株、*Trichoderma* 1328分離株、および*Metarhizium*種もしくはその同定のための特徴を有する菌株が含まれる。

## 【0057】

一実施形態において、本発明は、殺虫性脂質を調製する方法であって、  
1種以上の子囊菌門真菌の培養物の有機溶媒抽出物を提供するステップと、  
1つ以上の他の化合物から本発明の1つ上の脂質を少なくとも部分的に分離するステップと、  
1種以上の脂質を回収するステップと、  
を含む方法に関する。

10

## 【0058】

一実施形態において、本発明は、殺虫性脂質を調製する方法であって、  
1種以上の子囊菌門真菌の培養物の有機溶媒抽出物を提供するステップと、  
1つ以上の他の化合物から本発明の1つ上の脂質を少なくとも部分的に分離するステップと、  
1種以上の脂質を回収するステップと、  
を含む方法に関する。

20

## 【0059】

特定の実施形態において、子囊菌門の菌類のから殺虫活性を有する脂質を調製する方法は、基本的に本明細書に記載のとおりである。

## 【0060】

例示的な一実施形態において、この有機溶媒はクロロホルムであるか、またはクロロホルムを含む。例えば、この有機溶媒は、メタノールおよびクロロホルムを含む。別の実施形態において、この有機溶媒はジクロロメタンである。

## 【0061】

各種実施形態において、この有機溶媒は、限定されないが、メタノール、プロパノール、イソプロパノール、もしくはブタノールなどの短鎖アルキルアルコールを含むアルコールであるか、またはクロロホルムである。

30

## 【0062】

各種実施形態において、この有機溶媒は、本明細書に記載の担体を含む農学的に許容される担体である。

## 【0063】

各種実施形態において、分離は、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーを含むクロマトグラフィーによる。例示的な一実施形態において、この陰イオン交換クロマトグラフィーは、DEAE-セファデックスを用いる。

40

## 【0064】

本発明の組成物は、散剤、粉末、ペレット、顆粒、噴霧剤、乳剤、コロイド、または液剤などとして製剤化されてもよく、脂質を含む細胞の培養物の乾燥、凍結乾燥、均質化、抽出、ろ過、遠心分離、沈殿、または濃縮などの常法によって調製されてもよい。少なくとも1つのかかる殺虫性脂質を含む例示的な組成物のいくつかの実施形態において、この脂質は、約1～約99重量%の濃度で存在する。

## 【0065】

好ましくは、かかる組成物は、本明細書に記載の*B. bassiana*細胞の1つ以上の培養物から入手可能である。例示的な殺虫性脂質組成物は、菌糸体を産生するのに有効な条件下で適切な*Beauvaria bassiana* K4B3細胞株を培養するステ

50

ップと、少なくとも部分的に精製された菌系体を提供するステップと、この菌系体から 1 種以上の脂質を取得するステップとを含むプロセスによって調製されてもよい。

【0066】

さらなる実施形態において、本発明は、殺虫性脂質組成物を調製するための方法を提供する。例示的な実施形態において、かかる脂質は、殺虫剤として使用するために製剤化されてもよく、農業環境などを含む環境中の昆虫集団を防除するために用いられてもよい。いくつかの実施形態において、この製剤を用いて、局所適用または昆虫によるこの脂質組成物の摂取のいずれかによって昆虫または昆虫集団を死滅させることができる。他の実施形態において、この製剤を用いて、再び局所適用または昆虫（複数可）によるペプチド組成物の摂取のいずれかによって昆虫または昆虫集団を拮抗することができる。特定の場合において、土壌、植物、木、および低木などの上または植物、木、および低木などの近く、生きている植物、家畜、居住地、農機具、および建物などに適用するために、本発明の脂質を製剤化することが望ましい場合がある。

10

【0067】

本発明の 1 種以上の脂質および 1 種以上の菌類を含む組成物の各種実施形態において、この 1 種以上の菌類は、生殖的に生存可能な形態および量である。

【0068】

一実施形態において、本発明は、少なくとも 1 種の担体と共に、本明細書に記載の 1 種以上の脂質を含む組成物および少なくとも 1 つの菌類から入手可能な孢子を提供する。

【0069】

好ましくは、前記組成物は、生物学的防除用組成物であり、より好ましくは、前記生物学的防除用組成物は、殺虫性組成物である。

20

【0070】

好ましくは、前記生物学的防除用組成物は、少なくとも 1 つの農学的に許容される担体を含む。

【0071】

好ましくは、前記少なくとも 1 種の担体は、農学的に許容される担体であり、より好ましくは、賦形剤刺激剤 (filler stimulant)、凝固防止剤、湿潤剤、乳化剤、および酸化防止剤からなる群から選択され、より好ましくは、前記組成物は、賦形剤刺激剤、凝固防止剤、湿潤剤、乳化剤、および酸化防止剤のそれぞれのうちの少なくとも 1 つを含む。

30

【0072】

好ましくは、前記賦形剤刺激剤は、例えば、ショ糖、果糖、ブドウ糖、または右旋糖を含む二糖などの炭水化物源であり、前記凝固防止剤は、タルク、二酸化ケイ素、ケイ酸カルシウム、またはカオリン粘土から選択され、前記湿潤剤は脱脂粉乳であり、前記乳化剤は、レシチンなどの大豆ベースの乳化剤またはモノグリセリドなどの植物ベースの乳化剤であり、前記酸化防止剤は、グルタミン酸ナトリウムもしくはクエン酸である。

【0073】

各種実施形態において、この組成物は、菌類の生殖生存率 (reproductive viability) を支持することができるか、または約 2 週間よりも長い期間の間、好ましくは、約 1 ヶ月、約 2 ヶ月、約 3 ヶ月、約 4 ヶ月、約 5 ヶ月よりも長い期間の間、より好ましくは約 6 ヶ月よりも長い期間の間殺虫効力を保持することができる安定な組成物である。

40

【0074】

特定の実施形態において、この組成物は、菌類の単一株を含む。例示的な一実施形態において、この菌類は *Beauveria bassiana* K4B3 株 (2008 年 10 月 14 日に寄託された N M I A 番号 V08 / 025855) である。

【0075】

あるいは、この組成物は、前記菌類の複数株を含む。一実施形態において、この組成物は、生殖的に生存可能な形態および量の *Beauveria bassiana* K4B3

50

N M I A 番号 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 またはその同定のための特徴を有する菌株 ; *L e c a n i c i l l i u m m u s c a r i u m* K 4 V 1 株 ( 2 0 0 5 年 3 月 1 6 日 に 寄 託 された N M I A 番号 N M 0 5 / 4 4 5 9 3 ) またはその同定のための特徴を有する菌株 ; *L e c a n i c i l l i u m m u s c a r i u m* K 4 V 2 株 ( 2 0 0 5 年 3 月 1 6 日 に 寄 託 された N M I A 受 託 番号 N M 0 5 / 4 4 5 9 4 ) またはその同定のための特徴を有する菌株 ; *L e c a n i c i l l i u m m u s c a r i u m* K 4 V 4 株 ( 2 0 0 6 年 3 月 3 日 に 寄 託 された N M I A 受 託 番号 N M 0 6 / 0 0 0 0 7 ) またはその同定のための特徴を有する菌株 ; *B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 1 株 ( 2 0 0 5 年 3 月 1 6 日 に 寄 託 された N M I A 登 録 番号 N M 0 5 / 4 4 5 9 5 ) またはその同定のための特徴を有する菌株 ; *B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 2 株 ( 2 0 0 6 年 3 月 3 日 に 寄 託 された N M I A 受 託 番号 N M 0 6 / 0 0 0 1 0 ) またはその同定のための特徴を有する菌株 ; *L e c a n i c i l l i u m l o n g i s p o r u m* K T 4 L 1 株 ( 2 0 0 6 年 3 月 3 日 に 寄 託 された N M I A 受 託 番号 N M 0 6 / 0 0 0 0 9 ) またはその同定のための特徴を有する菌株 ; *P a e c i l o m y c e s f u m o s o r o s e u s* K 4 P 1 株 ( 2 0 0 6 年 3 月 3 日 に 寄 託 された N M I A 受 託 番号 N M 0 6 / 0 0 0 0 8 ) またはその同定のための特徴を有する菌株から選択される 1 つ以上の株および少なくとも 1 つの農学的に許容される担体と共に本発明の 1 種以上の脂質を含む生物学的防除用組成物である。

10

#### 【 0 0 7 6 】

一実施形態において、生物学的防除用組成物を生成するための方法は、  
*B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 3 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 の培養物を提供するステップと、  
本発明の少なくとも 1 種の脂質の生成に適する条件下で培養物を維持するステップと、  
i ) 本発明の少なくとも 1 種の脂質と担体を混合するステップ、または  
i i ) 本発明の少なくとも 1 種の脂質と本明細書に記載の 1 種以上の昆虫病原性菌類とを混合するステップ、または  
i i i ) *B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 3 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 から本発明の少なくとも 1 種の脂質を分離するステップ、または  
i v ) ( i ) ~ ( i i i ) のうちの 2 つ以上の任意の組み合わせ  
とを含む。

20

30

#### 【 0 0 7 7 】

特定の実施形態において、本方法は、維持ステップ 1 または細胞溶解ステップ後にさらにステップを含んでもよい。

#### 【 0 0 7 8 】

各種実施形態において、分離は、遠心分離またはろ過による。

#### 【 0 0 7 9 】

各種実施形態において、分離は、約 5 0 % を超える菌類、例えば、*B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 3 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5、約 5 5 % を超える、約 6 0 % を超える、約 6 5 % を超える、約 7 0 % を超える、約 7 5 % を超える、約 8 0 % を超える、約 8 5 % を超える、約 9 0 % を超える、約 9 5 % を超える、約 9 9 % を超える、または約 1 0 0 % の菌類、例えば、約 1 0 0 % の *B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 3 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 を除去するのに有効である。

40

#### 【 0 0 8 0 】

したがって、特に企図される一実施形態において、本方法は、*B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 3 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 の培養物を提供するステップと、本発明の少なくとも 1 種の脂質の生成に適する条件下でこの培養物を維持するステップと、*B e a u v e r i a b a s s i a n a* K 4 B 3 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5 から本発明の少なくとも 1 種の脂質を分離するステップと、を含む。

#### 【 0 0 8 1 】

好ましくは、この担体は農学的に許容される担体であり、好ましくは、この少なくとも

50

1種の担体は、賦形剤刺激剤、凝固防止剤、湿潤剤、乳化剤、および酸化防止剤からなる群から選択され、より好ましくは、前記組成物は、賦形剤刺激剤、凝固防止剤、湿潤剤、乳化剤、および酸化防止剤のそれぞれのうちの少なくとも1つを含む。

【0082】

各種実施形態において、植物病原性昆虫は、半翅類目のものである。

【0083】

好ましくは、前記1つ以上の植物病原性昆虫は、蚊、コナガ(diamond back moth)を含む蛾、アザミウマ(Thrips)(アザミウマ類(Thysanoptera))、アブラムシ、オオヨコバイ上科(Psyllids)、カイガラムシ(Scale)またはコナジラミ(半翅目)からなる群から選択される。

10

【0084】

一実施形態において、本発明の脂質またはその機能的変異体は、本明細書に記載の組成物中に存在してもよい。

【0085】

一実施形態において、この組成物は、本発明の2種類以上の脂質を含む。

【0086】

各種実施形態において、この組成物は、

- i) 少なくとも1種のビューベリシン(beauvericin)、
- ii) 少なくとも1種のバシアノリド(bassianolide)、
- iii) 少なくとも1種の昆虫病原性菌類
- iv) 上記の(i)~(iv)のうちの任意の2つ以上。

20

と共に、本発明の少なくとも1種の脂質を含む。

【0087】

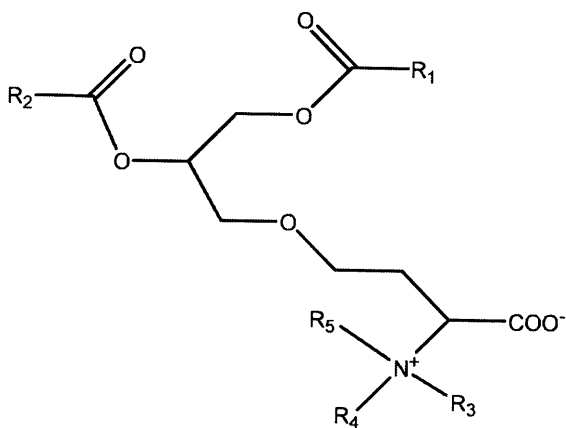
一実施形態において、本発明は、1種以上の植物病原性昆虫などの1種以上の昆虫を防除する方法であって、植物またはその環境などの場所に本発明の脂質または組成物を適用する工程を含む方法を提供する。

【0088】

一実施形態において、1種以上の昆虫を防除する方法は、式Iの脂質をその場所に適用する工程を含む：

【化2】

30



I

40

(式中、式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は同一または異なることができ、それぞれ脂肪酸の脂肪族部分であり、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ独立にH、水酸基、カルボキシル基、アミド基、非置換または置換されたアルキル基、非置換または置換されたアルケニル基、非置換または置換されたアルキニル基、および非置換または置換されたアリール基からなる群より選択される。)

50

## 【0089】

各種実施形態において、本発明の脂質または組成物は、例えば、植物などの場所が昆虫もしくは昆虫集団によって感染されるか、またはそれらに晒される前に予防的に適用される。他の実施形態において、この組成物は、感染が確認された時もしくは病原体が存在する時に、例えば、植物などの場所が昆虫によって感染されるか、またはそれらに晒される時に、または昆虫がその場所上もしくはその場所中に存在する時に適用される。

## 【0090】

一実施形態において、本発明の脂質または組成物は、その場所に直接適用され、例えば、植物またはその環境に直接適用される。例えば、本発明の組成物は溶媒と混合されるか、または（例えば、水と）乳化され、本明細書に記載のとおり適用される。他の実施形態において、本発明の脂質または組成物は、例えば、次にその場所に適用される基質への適用によって、その場所に間接的に適用される。

## 【0091】

好ましくは、この組成物は、適用前の脂質の最終濃度が約  $0.5 \text{ mg/L}$  ~ 約  $10 \text{ mg/L}$ 、より好ましくは、最終濃度が約  $1 \text{ mg/L}$  になるまで水と混合される。

## 【0092】

好ましくは、Deep Fried（商標）、Fortune（商標）、またはFortune Plus（商標）などの乾燥保護剤が、適用前の最終濃度が約  $1 \text{ ml/L}$  になるまで混合される。

## 【0093】

1種以上の昆虫病原性菌類を含む組成物に関して、例示的な濃度範囲は、 $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^2$  ~ 約  $1 \times 10^{12}$  個の孢子、 $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^2$  ~ 約  $1 \times 10^{11}$  個の孢子、 $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^2$  ~ 約  $1 \times 10^{10}$  個の孢子、 $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^2$  ~ 約  $1 \times 10^9$  個の孢子、 $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^3$  ~ 約  $1 \times 10^9$  個の孢子、 $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^4$  ~ 約  $1 \times 10^9$  個の孢子、好ましくは、 $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^5$  ~ 約  $5 \times 10^8$  個の孢子、より好ましくは  $1 \text{ ml}$  あたり約  $1 \times 10^6$  ~ 約  $2 \times 10^8$  個の孢子である。特定の実施形態において、この組成物は、適用時に1ミリリットルあたり少なくとも  $10^7$  個の孢子、適用時に1ミリリットルあたり少なくとも約  $5 \times 10^7$  個の孢子、または適用時に1ミリリットルあたり少なくとも  $10^8$  個の孢子を含む。

## 【0094】

各種実施形態において、1種以上の菌類がこの組成物中に存在する時、本発明の組成物は、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^8$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  の感染単位（IU）、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^9$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  のIU、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  のIU、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{11}$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  のIU、好ましくは、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  のIU、より好ましくは、1ヘクタールあたり約  $5 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  のIU、より好ましくは、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{11}$  ~ 約  $5 \times 10^{11}$  のIUの割合で適用されてもよい。

## 【0095】

一実施形態において、この感染単位は、内生孢子などの孢子であり、この組成物は、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^8$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  個の孢子、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^9$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  個の孢子、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  個の孢子、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{11}$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  個の孢子、好ましくは、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  個の孢子、より好ましくは、1ヘクタールあたり約  $5 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  個の孢子、より好ましくは、1ヘクタールあたり約  $1 \times 10^{11}$  ~ 約  $5 \times 10^{11}$  個の孢子の割合で適用される。

## 【0096】

都合のよいことには、かかる適用率は、1ミリリットルあたり約  $10^8$  個以上の孢子で前記組成物を製剤化し、1ヘクタールあたり約  $1 \text{ L}$  の割合で前記組成物を適用することによって達成することができる。本明細書で説明するとおり、かかる適用率は、農学的に許容される大量の溶媒、例えば、水の中にこの組成物を溶解することによって都合よく達成

10

20

30

40

50

することができる。

【0097】

好ましくは、この組成物は、適用前に水と混合される。一実施形態において、この組成物は水と混合され、少なくとも約100Lの水/Ha、少なくとも約150L/Ha、少なくとも約200L/Ha、少なくとも約250L/Ha、少なくとも約300L/Ha、少なくとも約350L/Ha、少なくとも約400L/Ha、少なくとも約450L/Ha、少なくとも約500L/Haで適用される。好ましい実施形態において、この組成物は、適用前の最終濃度が水500Lあたり約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $5 \times 10^{11}$ 個の胞子になるまで水と混合され、500L/ヘクタールの割合で適用される。

【0098】

好ましくは、前記適用は噴霧による。

【0099】

好ましくは、*Beauveria bassiana* K4B3株(NMIA受託番号V08/025855)またはその同定のための特徴を有する培養物を含む組成物が、1ヘクタールあたり約 $1 \times 10^{10}$ ～約 $1 \times 10^{15}$ 個の胞子、好ましくは、1ヘクタールあたり約 $1 \times 10^{12}$ ～約 $1 \times 10^{14}$ 個の胞子、より好ましくは、1ヘクタールあたり約 $5 \times 10^{12}$ ～約 $1 \times 10^{14}$ 個の胞子、より好ましくは、1ヘクタールあたり約 $1 \sim 3 \times 10^{13}$ 個の胞子の割合で適用される。

【0100】

都合のよいことに、かかる適用率は、1ミリグラムあたり約 $10^7$ 個以上の胞子で前記組成物を製剤化し、1ヘクタールあたり約1kgの割合で前記組成物を適用することによって達成することができる。本明細書で説明するとおり、かかる適用率は、農学的に許容される大量の溶媒、例えば、水の中にこの組成物を溶解することによって都合よく達成することができる。

【0101】

本発明は、全ての植物またはその環境に適用することができる。特定の実施形態において、例示的な植物は、アルファルファ、大麦、キャノーラ、トウモロコシ、綿、亜麻、カボック、ピーナッツ、ジャガイモ、燕麦、米、ライ麦、ソルガム、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、ヒマワリ、タバコ、トマト、小麦、芝草、牧草、ベリー、果実、マメ科植物、野菜、観賞植物、低木、サボテン、多肉植物、および木などの単子葉植物または双子葉植物である。

【0102】

さらに例示的な実施形態において、この植物は、以下の科：ヒルガオ科、ハゼリソウ科、モンチニア科(Montiniaceae)、ナス科およびナガボノウルシ科の植物を含むナス目から選択される植物、ならびに、以下の科：ヒガンバナ科、クサスギカズラ科、アステリア科、ブランドフォルディア科、ボリア科、ドリアンテス科、キンバイザサ科、アヤメ科、イキシオリリオン科、ラナリア科、ラン科、テコフィラエア科、ススキノキ科、およびキセロネマ科の植物を含むクサスギカズラ目の植物を含む任意の植物であってよい。

【0103】

本発明が関連する当業者なら、本発明の構成、異なる実施形態、および適用における多くの変更を、それ自体、添付の特許請求の範囲で定義される本発明の範囲から逸脱することなく提案するであろう。本明細書における開示および記載は、単に例示的なものであり、いかなる意味においても限定することを意図しない。

【0104】

特許明細書、他の外部文書、または他の情報源への言及を行った本明細書において、これは、一般的に、本発明の特徴について説明するための文脈を提供する目的である。特に、具体的に述べない限り、かかる外部文書への言及は、全ての権限において、かかる文書、またはかかる情報源が先行技術であるか、または当技術分野の公知の知識の一部をなすことを認めるものとして解釈されるべきではない。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 5 】

本明細書に開示する数の範囲（例えば、1～10）への言及も、その範囲内の全ての有理数（例えば、1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9および10）ならびにその範囲内の任意の範囲の有理数（例えば、2～8、1.5～5.5および3.1～4.7）への言及を包含し、したがって、本明細書に明確に開示される全ての範囲の全ての部分的な範囲が本明細書に明確に開示されることが意図される。具体的に意図されるものの最適な例があり、最低値と最高値の間の数値の全ての可能な組み合わせが、同じような方法で本出願中に明確に述べられるとみなされるべきである。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 1 0 6 】

10

【 図 1 】 本明細書の実施例 4 に記載の例示的なベタイン脂質のクロマトグラムである。

【 図 2 】 本明細書の実施例 4 に記載の例示的なベタイン脂質の MS / MS スペクトルである。

【 図 3 】 本明細書の実施例 4 に記載の、762.5 の m / z を有する例示的な脂質の娘スペクトルである。

【 図 4 】 本明細書の実施例 6 に記載の、10 日にわたって生成された例示的なベタイン脂質の相対量の経時変化を示すグラフである。

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 1 0 7 】

本発明は、一部分において、ビューベリア種およびトリコデルマ種などの子囊菌門の様々な株から単離された 1 種以上の脂質を含む 1 種以上の脂質（この 1 種以上の脂質は、植物病原性昆虫などの昆虫に対して有効である）、ならびに昆虫および昆虫集団の防除におけるかかる脂質の使用を対象にしている。

20

## 【 0 1 0 8 】

## 定義

本明細書で用いる場合、用語「ベタイン脂質」は、グリセロール部分の sn - 3 位でエステル結合によって結合したベタイン部分を含み、sn - 1 位および sn - 2 位でエステル化された脂肪酸を有するエステル結合グリセロ脂質を意味する。ベタイン脂質は、藻類、苔植物、菌類、いくつかの原始的な原虫、光合成細菌、ならびにシダ類およびトクサ植物に属する種などのいくつかの孢子生成植物中に生じることが報告されている。

30

## 【 0 1 0 9 】

本明細書で用いる場合、用語「生物農薬」（BCA）とは、1 または複数の生物、一般的に、1 または複数の害虫もしくは 1 または複数の植物病原体（例えば植物病原昆虫）などの病原体の拮抗薬として作用する、あるいは 1 または複数の植物病原体などの 1 または複数の病原体を防除することができる生物学的製剤をいう。拮抗作用は、いくつかの形態をとることができる。一形態において、生物農薬は単に忌避剤として作用することができる。別の形態において、生物農薬は、環境を病原体にとって好ましくない状態にすることができる。さらなる好ましい形態において、生物農薬は、害虫もしくは病原体に寄生する、それらを無能力にする、生殖力のない状態にする、それらの増殖を妨害する、拡散もしくは分布を妨害する、および / またはそれらを死滅させることができる。したがって、拮抗機構としては、抗生作用、寄生、不動化、不妊および毒性が挙げられるがこれらに限定されるものではない。したがって、1 または複数の病原昆虫の拮抗薬として作用する薬剤は、殺虫性効力を有するといえる。さらに、植物病原昆虫を含む昆虫の拮抗薬である薬剤は、殺虫性薬剤であるといえる。

40

## 【 0 1 1 0 】

本明細書で用いる場合、「生物的防除組成物」とは、1 または複数の植物病虫害もしくは植物病原体などの 1 または複数の害虫もしくは病原体の拮抗薬である少なくとも 1 種類の生物農薬を含むまたは含有する組成物である。そのような防除剤としては、忌避剤として作用する薬剤、環境を害虫または病原体にとって好ましくない状態にする薬剤、および害虫または病原体を無能力にする、生殖力のない状態にする、および / または死滅させる

50

薬剤が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0111】

したがって、本明細書で用いる場合、「抗植物病原体組成物」とは、1または複数の植物病原体の拮抗薬である少なくとも1種類の薬剤を含むまたは含有する組成物である。そのような組成物は、本明細書では、抗植物病原体効力を有するとみなされる。

【0112】

本明細書で用いる場合、用語「含んでいる」とは、「少なくとも部分的に～なっている」ことを意味する。本明細書において用語「含んでいる」を含む各記載を解釈するとき、それ以外の特徴またはこの用語が前置きをする特徴も存在し得る。「複数を含む」および「単数を含む」などに関連する用語は、同様に解釈されるものとする。

10

【0113】

本明細書で用いる場合、用語「防除する」または「防除している」とは、通常、1または複数の植物病原体による感染症などの1または複数の病原体による感染症を予防する、減少させる、もしくは根絶すること、またはそのような感染症の速度および程度を阻害する、例えば植物中もしくは植物上またはその周囲の植物病原体集団を減少させることを包含する。この場合、感染症（単数または複数の）もしくは集団（単数または複数の）を予防するまたは減少させることは、非処理の感染症（単数または複数の）または集団（単数または複数の）に対して統計的に有意である。治療的処理も、可能とみなされる。好ましくは、そのような防除は、病原体集団間の大量の死滅によって達成される。

【0114】

本明細書では、語句「昆虫病原性活性」および「昆虫病原性効力」をほとんど同じ意味で用いており、特定の微生物などの特定の薬剤または特定の微生物に由来する薬剤が、1または複数の植物病原昆虫などの1または複数の病原昆虫を拮抗する能力をいう。

20

【0115】

種々の実施形態において、前述の昆虫病原性効力とは、好ましくは、昆虫との接触から14日以内、より好ましくは7日以内に、植物病原昆虫などの1または複数の昆虫に寄生して無能力にする、それらを生殖力がない状態にする、それらの増殖を妨害する、またはそれらを死滅させる能力であり、さらにより好ましくは7日以内に1または複数の植物病原昆虫を死滅させる能力である。あるいは、前述の昆虫病原性効力は、1または複数の昆虫病原性糸状菌などの1または複数の昆虫病原性微生物の増殖を持続させるまたは促進する能力である。

30

【0116】

したがって、本明細書で用いる場合、「昆虫病原性組成物」とは、1または複数の病原昆虫の拮抗薬である少なくとも1種類の薬剤を含むまたは含有する組成物である。そのような組成物は、本明細書では昆虫病原性効力を有するとみなされる。

【0117】

したがって、本明細書で用いる場合、「殺虫性組成物」とは、1または複数の病原昆虫の拮抗薬である少なくとも1種類の薬剤を含むまたは含有する組成物である。そのような組成物は、本明細書では殺虫性効力を有するとみなされる。

【0118】

特定の実施形態において、昆虫病原性活性は、殺虫性活性である。例えば、本発明の脂質の特定の実施形態は、殺虫性である。

40

【0119】

例えば、本明細書の実施例で例示した1または複数の脂質について、1または複数の脂質を参照して本明細書で用いる場合、用語「機能性変異体」とは、明確に特定された実体、例えば、1または複数の脂肪酸基などの1または複数の基が欠失、置換または付加されているが、この明確に特定された実体の1または複数の生物活性の少なくとも一部、例えば、この明確に特定された脂質によって誘発される1または複数の生物学的効果を誘発する能力を有する当該実体と異なる脂質をいう。機能性変異体は、同一種または他の種に由来することもあり、かつ相同体、パラログおよびオルソログを包含することもある。

50



## 【 0 1 2 0 】

この場合は、機能性変異体は、好ましくは、明確に特定された脂質の殺虫性活性の少なくとも一部を保持する。

## 【 0 1 2 1 】

殺虫性効力などの本発明の脂質によって誘発される 1 または複数の生物学的効果を決定するための方法およびアッセイは、当技術分野で周知であり、かつそのような方法およびアッセイを用いて、本発明の 1 または複数の脂質の 1 または複数の機能性変異体を特定または確認することができる。例えば、本明細書の実施例に記述されるような、標的昆虫を死滅させるまたはその増殖を拮抗する本発明の脂質の能力についてのアッセイは、脂質の 1 または複数の機能性変異体を特定するよう修正可能である。

10

## 【 0 1 2 2 】

本明細書で用いる場合、用語「脂質」とは、水に不溶であり、一般的に炭素原子が 4 ~ 36 の長さにおよぶ炭化水素鎖を有する 1 または複数の脂肪酸、カルボン酸を含む、炭素に富む高還元物質類を包含する。脂質としては、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質とスフィンゴ脂質を含むリン脂質、糖脂質およびステロールが挙げられる。

## 【 0 1 2 3 】

本明細書で用いる場合、用語「脂質画分」とは、1 または複数の脂質、遊離脂肪酸、または両方を含む組成物を包含し、脂質画分は、非分画の供給材料中に存在する全脂質を含む、または全脂質のサブセットからなる。一般的に、脂質画分は、決定可能で特定可能な組成物、例えば特徴的なクロマトグラフプロファイルまたは質量分析プロファイルを有する。脂質画分の例を本明細書に示す。

20

## 【 0 1 2 4 】

本明細書で用いる場合、用語「植物」とは、植物全体を包含するだけでなく、植物の部分、切り取った部分ならびに根、葉、花、種、茎、カルス組織、木の実と果実、球根、塊茎、球茎、子実、挿し木、台木、または接ぎ穂を含み、かつ植え付け前、生育中、および収穫時または収穫後にかかわらずどのような植物材料も含む植物生成物にまで及ぶ。本発明の用途から利益を得ることができる植物は、農業および園芸作物の広範囲に及ぶ。本発明の組成物は、特に、有機生産システムでの用途でも特に好適である。

## 【 0 1 2 5 】

昆虫病原性脂質または昆虫病原性菌株などの昆虫病原性剤に関して用いる場合、語句「昆虫病原性効力を保持している」および文法上の均等物ならびにその誘導体とは、その薬剤が依然として有効な昆虫病原性活性を有することを意味するよう意図される。好ましくは、その保持される活性は、最初の活性の少なくとも約 35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99 または 100 % であり、および有効範囲は、（例えば、約 35 ~ 約 100 %、約 50 ~ 約 100 %、約 60 ~ 約 100 %、約 70 ~ 約 100 %、約 80 ~ 約 100 %、および約 90 ~ 約 100 %）これらの値の範囲のいずれかから選択され得る。例えば、本発明の好ましい脂質の機能性変異体は、昆虫病原性活性を保持しているはずである、すなわち、特定の親脂質の昆虫病原性活性の少なくとも約 35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99 または 100 % を保持する。

30

40

## 【 0 1 2 6 】

同様に、本発明の好ましい組成物は、それらが含む昆虫病原性薬剤の有効な昆虫病原性活性の維持を持続させることができ、および本明細書で可能とみなされる方法を用いて適用されるまで、理想的に昆虫病原性活性を保持するといえる。同様に、殺虫性脂質または昆虫病原性菌株などの殺虫性剤に関して用いる場合、語句「殺虫性効力を保持している」および文法上の均等物ならびにその誘導体とは、その薬剤が依然として有効な殺虫性活性を有することを意味するよう意図される。好ましくは、その保持される活性は、最初の活性の少なくとも約 35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99 または 100 % であり、および有効範囲は、（例えば、約 35 ~ 約 100 %、約 50 ~ 約 100 %、約 60 ~ 約 100 %、約 70 ~ 約 100 %、約 80 ~ 約 100 %、約 90 ~ 約 100 %、約 95 ~ 約 100 %、および約 99 ~ 約 100 %）これらの値の範囲のいずれかから選択され得る。例えば、本発明の好ましい脂質の機能性変異体は、殺虫性活性を保持しているはずである、すなわち、特定の親脂質の殺虫性活性の少なくとも約 35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99 または 100 % を保持する。

50

00%、および約90～約100%)これらの値の範囲のいずれかから選択され得る。例えば、本発明の好ましい脂質の機能性変異体は、殺虫性活性を保持しているはずである、すなわち、特定の親脂質の殺虫性活性の少なくとも約35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%を保持する。同様に、本発明の好ましい組成物は、それらが含む殺虫性薬剤(単数または複数の)の有効な殺虫性活性の維持を持続させることができ、および本明細書で可能とみなされる方法を用いて適用されるまで、理想的に殺虫性活性を保持するといえる。

#### 【0127】

本明細書で用いる場合、本発明の組成物に関して用いるとき、用語「安定な」とは、数週間、好ましくは約1ヵ月、約2ヵ月、約3ヵ月、約4ヵ月、好ましくは約5ヵ月、より好ましくは約6ヵ月もしくはそれ以上長く、殺虫性効力を持続させることができる組成物を意味する。例えば、さらに1または複数の昆虫病原性糸状菌を含む組成物に関して用いるとき、用語「安定な」とは、数週間、好ましくは約1ヵ月、約2ヵ月、約3ヵ月、約4ヵ月、好ましくは約5ヵ月、より好ましくは約6ヵ月もしくはそれ以上長く、昆虫病原性糸状菌の生殖生存能力を持続させることができる組成物をいう。

10

#### 【0128】

「[特定の菌株]の識別特徴を有する菌株」、または特定の菌株の相同体または変異体を含む「[特定の培養物]の識別特徴を有する培養物」とは、密接に関連している(すなわち、共通の祖先を共有する)または特定の菌株に由来しているが、通常は、1または複数の遺伝子型特徴または表現型特徴が特定の菌株と異なる。変異体は、通常、遺伝子の差異を評価することで識別可能である。相同体は、遺伝子の差異、生化学的差異および形態的差異の程度を評価すること、および例えば、分岐学などの分析を含む分類学的方法を用いることで識別可能である。だが、特定の菌株の相同体または変異体を含む、[特定の菌株]の識別特徴を有する菌株は、殺虫性効力を保持し、他の細菌株と識別でき、かつ本明細書に記述の技法を用いて、親株の相同体または変異体として識別可能である。

20

#### 【0129】

本発明の菌類、方法および組成物の対象である植物に関して用いる場合、用語「周囲」とは、植物もしくは根、塊茎もしくはその類に隣接するまたはその周辺の土壌、水、落ち葉および/または増殖培地、隣接する植物類、前述の植物の切り取った部分、支持物、植物に与えられる水、および種子被覆物を含む被覆物が挙げられる。この用語としては、さらに、保護被覆物、箱および包装物などの貯蔵材、梱包材または加工材、ならびに定植器材、維持器材または収穫器材が挙げられる。

30

植物病原体の防除

#### 【0130】

本発明が認識していることは、例えば米国、ニュージーランド、および欧州の多数の国を含む多くの国の園芸作物部門が、植物病原性害虫の間で殺虫剤抵抗性が増大している問題に直面していることである。この問題は、一部の規制制度下で、規制障壁のために新規の化学殺虫剤の利用可能性が減少することで悪化している。

#### 【0131】

生物農薬として菌類に由来する殺虫性脂質を用いることにより、この問題の解決策が提供される。効果的な生物農薬は、標的植物病原昆虫または昆虫集団を無能力にする、または死滅させるそれらの能力によって選択されることができる。助長条件下で、アブラムシ、アザミウマおよびコナジラミなどの植物病原昆虫は、植物類、および土壌、落ち葉、隣接する植物類、支持物などを含むそれらの周囲を感染させ得る。菌類由来の殺虫性脂質およびそれに由来する薬剤は、植物病原昆虫を無能力にするおよび/または死滅させるために、適用されることができ、それによって病原体の病原性を阻止するまたは限定する。菌類に由来するこれらの殺虫性脂質の野外での有効性は、一部は、中断される雨季および乾燥などの変化する気候条件において殺虫性効力を保持するそれらの能力による。こ本明細書に記述する脂質類などの昆虫病原性糸状菌に由来する薬剤の有効性は、一般的に、生存能力を維持することではなく、むしろ殺虫性効力を維持することを必要とする。この

40

50

場合もやはり、理解されるように、例えば、微生物の混入によるコロニー形成への抵抗性、微生物の増殖を抑えるもしくは持続させない能力、または静菌特性もしくは静真菌特性などの組成物の安定性は、すべて組成物の有用性および／または軟体動物駆除効力の維持に寄与し得る。

#### 【0132】

植物病原昆虫などの昆虫類に対して有効であり、したがって本発明に従って使用することにより好適な本発明の脂質は、本発明の脂質またはその機能性変異体が比較される対照処理に対して統計的に有意な量で標的昆虫種の集団を減少させるのに有効な1つとして特定される。そのような脂質は、殺虫性効力を有するとみなすことができる。本明細書に記述するように、標的昆虫の集団の減少は、種々の拮抗機構によるものであり得る。例えば、脂質は、植物病原昆虫を無能力にする、それらを生殖力がない状態にする、それらの増殖を妨害する、および／またはそれらを死滅させることができる、または本発明の脂質と共に組成物中に存在する昆虫病原性糸状菌などの、組成物中にも存在する1または複数の昆虫病原体の増殖および殺虫性効力を（別々に、同時に、または連続して）持続させ得るまたは促進し得る。そのようなものとして、本発明の脂質は、植物病原昆虫に寄生する、それらを無能力にする、生殖力がない状態にする、および／または好ましくは死滅させるために、昆虫病原性糸状菌などの昆虫病原体の能力を可能にし得るまたは持続させ得る。また、本発明の脂質は、環境、例えば1または複数の昆虫病原性糸状菌が適用される植物またはその周囲を植物病原昆虫にとって好ましくない状態にすることによって標的昆虫の集団を減少させることができる。この実施形態において、脂質は忌避剤として作用し、かつ植物またはその周囲の近くで標的昆虫の効果的な集団を減少させるとみなされ得る。

10

20

#### 【0133】

一実施形態において、本明細書で定義されるように、脂質は機能性変異体である。

#### 【0134】

好ましくは、本発明の好適な脂質またはその機能性変異体は、対照処理と比較して、関連する昆虫種の集団のパーセンテージ減少として表される約5%殺虫性効力、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、より好ましくは少なくとも約50%殺虫性効力を示す。実例として、本明細書に記述する方法論を用いて、種々の標的昆虫に対して効果的なボーベリア (*Beauveria*) 脂質画分分離菌を特定したが、他方では他の菌類および昆虫種に関して本明細書に記述するものと類似している手順を用いることができる。

30

#### 【0135】

殺虫性効力は、生物農薬としての用途に適しているとみなされる脂質に対する主要な必要条件であるのだが、脂質は生物農薬としての用途に適しているさらなる特徴を有し得る。

#### 【0136】

例えば、脂質は、最終的に、生物農薬として効果的な形態および濃度で標的植物またはその周囲に適用されることを可能にするために、適切な期間にわたり効果的な形態で貯蔵されることが可能でなければならない。

40

#### 【0137】

本明細書に例示されたものを含む、本発明の1または複数の脂質の1または複数の機能性変異体を、本発明の脂質および組成物が含み得る、または本発明の諸方法が用いることができることを当業者は認識することになる。脂質とその機能性変異体の組合せも、本発明では有用である。

脂質を単離するための方法

#### 【0138】

本発明の1または複数の脂質を生成し、単離する代表的な方法を本明細書に記述する。これらの方法は、例えば、ボーベリア・バシアーナ (*Beauveria bassiana*) K4B3またはトリコデルマ (*Trichoderma*) 種を含むボーベリア種などの子囊菌 (*Ascomycota*) 門の1ま

50

たは複数の菌類の培養物から 1 または複数の脂質を単離することを含む。

【0139】

あるいは、その機能性変異体を含む本発明の脂質は、当技術分野で周知の脂質合成方法を用いて調製されることができる。

昆虫病原性糸状菌を含む組成物

【0140】

昆虫病原性糸状菌の輸入は、特定の規制制度下で不可能ではないにしても、しばしば問題になり、費用がかかり、かつ実用的でない。例えば、特定の国の外で利用可能な昆虫病原性糸状菌は、規制および立法上の除外のために、その国内で園芸家が入手可能でないこともあり得る。したがって、本発明は、そのような菌類に由来する殺虫性効力を有し、または昆虫病原性糸状菌（もしくは他の昆虫病原体）の増殖を持続させるもしくは促進することができ、そのため多種多様な環境条件下で、そのような昆虫病原体が活発に増殖する手助けとなり得る、または両方である薬剤を特定し調製する明白な利点があることを認識する。

10

【0141】

前述の菌類の分離株は、好都合なことに、例えば、植物類、それらの周囲から、および前述の植物類の病原体を含む環境から採取し得る。特定の実施形態において、前述の菌類の分離株は、標的昆虫から、または前述の菌類を含む生物農薬または前述の菌類を含む組成物がその後適用される植物種（もしくは周囲）から採取し得る。

20

【0142】

異なる温度を含む異なる条件下で、および異なる培地または他の基質上で前述の菌類の増殖を決定する方法は、当技術分野で周知である。同様に、本発明の脂質の菌類の増殖へのプラス影響、例えば、脂質（単数または複数の）の非存在下で認められるそれと比較して、前述の脂質（単数または複数の）の存在下で前述の菌類の毒性または殺虫性効力の増大を決定する方法も、当技術分野で周知である。種々の温度で、または種々の植物類、環境、もしくは標的生物上での菌類の増殖に影響を与える本発明の脂質の能力を決定する方法例を本明細書に記述する。

【0143】

昆虫病原性効力は、生物農薬としての用途に適しているとみなされる分離株に対する主要な必要条件であるのだが、菌類の分離株は生物農薬としての用途に適しているさらなる特徴を有し得る。

30

【0144】

例えば、菌類は、最終的に、生物農薬として効果的な形態および濃度で標的植物またはその周囲に適用されることを可能にするために、適切な期間にわたり効果的な形態で貯蔵されることが可能でなければならない。

【0145】

生物的防除剤として使用するのに適するために、植物またはその周辺環境へ適用される場合、真菌はまた、感染の閾値に達成することが可能である。本明細書で使用されるように、感染の閾値は、その後昆虫病原性を有するように、標的植物またはその周辺環境へ真菌を根付かせるために必要な真菌の濃度を指す。理解されるように、感染閾値を達成するために、真菌のいくつかの分離株は、非現実的または実行不可能となるような高い割合での適用が必要な場合がある。さらに、いくつかの真菌分離株は、それらが適用される濃度または割合に関係なく、感染の閾値を達成できない可能性がある。ヘクタール当たり、 $10^{10}$  以上の孢子の割合で適用された場合、または、前記組成物が約  $1 \text{ kg} / 1000 \text{ L}$  / ヘクタールの割合で適用されたときに、ミリグラムの組成物当たり、 $10^7$  孢子以上の濃度で適用された場合、適切な昆虫病原性真菌は、感染閾値を達成することができる。

40

【0146】

感染の閾値を決定する方法は、当該技術分野で知られており、そのような方法の例は、本明細書中に提示されている。特定の実施形態において、例えば、標的植物、その周辺環境および / または前記植物の病原体から得られた一つ以上のサンプルの分析、ならびに、

50

前記サンプル上もしくは中における真菌の存在もしくは量の決定、ならびに／または、前記植物の病原体上もしくは中における真菌の存在もしくは量の決定、ならびに、前記サンプル上もしくは中における真菌の存在もしくは量の決定により、感染閾値を、直接的に決定することができる。他の実施形態において、例えば、植物の上または植物の周囲の植物病原性昆虫の個体群の減少などの、ある場所での一つ以上の昆虫の個体群の減少を観察することによって、直接的に決定することができる。そのような方法の組み合わせもまた想定されている。

#### 【0147】

*Beauveria bassiana* は、例えば、バッタ、アブラムシ、アザミウマ、ガおよびいくつかの他の種を含む、未成熟虫および成虫の両方を攻撃する、土壌生まれの真菌である。典型的には、*B. bassiana* は、アブラムシ、穿孔虫およびアザミウマなどの昆虫死体から単離することができ、また、土壌からも単離することができる。代表的な殺虫性 *Beauveria bassiana* 株 K4B3 を、本発明の特定の実施形態において使用することができ、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2008年10月14日に、オーストラリア、ニューサウスウェールズ、Pymble、1スアキンストリート、オーストラリア国立計測研究所 (NMIA、以前のオーストラリア政府分析研究所 (AGAL)) へ寄託した。分離株は、寄託番号 V08/025855 を付与された。

10

#### 【0148】

したがって、一態様において、本発明は、繁殖可能な形態および量の *B. bassiana* 株 K4B3、NMIA 番号 V08/025855、または、株 K4B3、NMIA 番号 V08/025855 の識別特性を有する *Beauveria* とともに、本発明の1種以上の脂質または、それらをコードする一つ以上のポリヌクレオチドへの依存を含む、方法および組成物を提供する。

20

#### 【0149】

*B. bassiana* 株 K4B3 は、特に効果的な生物的防除剤であり、断続性の湿潤期間、乾燥期間を生存することおよびコロニー形成が可能であり、野外でのアブラムシ、ケムシ、コナジラミ、ガ、ミツバチヘギイタダニ、セミ、およびアザミウマなどを含むがそれらに限定されない、植物病原虫の無能力化および死滅が可能である。

30

#### 【0150】

本発明の他の実施形態において、本明細書で同定された1種以上の脂質を含む組成物を調製するために、*B. bassiana* K4B3 を使用することができる。

#### 【0151】

一実施形態において、方法は、少なくとも1種の脂質の産生に適した条件下で、*Beauveria bassiana* K4B3 V08/025855 の培養を維持すること、および、*Beauveria bassiana* K4B3 V08/025855 から少なくとも1種の脂質を分離することを含む。

#### 【0152】

一実施形態において、組成物は、本明細書中に記載の2種以上の脂質を含む。注目すべきことに、これらの脂質のいずれも、*beauvericin* および *bassianolide* などの、*Beauveria* についての既知の殺虫剤に、有意な同一性または相当性を有していない。一実施形態において、組成物は、本明細書に記載の2種以上の脂質を含む、相乗的組成物である。

40

#### 【0153】

別の実施形態において、組成物は、さらに、約  $1 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*、約  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*、約  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*、約  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*、約  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*、約  $0.005 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*、約  $0.001 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*、または、約  $0.0001 \text{ mg L}^{-1}$  未満の *beauvericin*

50

nを含む。

【0154】

例えば、組成物は、さらに、約 $1\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、約 $0.5\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、約 $0.1\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、約 $0.05\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、約 $0.01\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、約 $0.005\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、約 $0.001\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、約 $0.0005\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - F、または、約 $0.0001\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbeauvericin - Fを含む。

【0155】

別の実施形態において、組成物は、さらに、約 $1\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、約 $0.5\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、約 $0.1\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、約 $0.05\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、約 $0.01\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、約 $0.005\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、約 $0.001\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、約 $0.0005\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolide、または、約 $0.0001\text{ mg L}^{-1}$ 未満のbassianolideを含む。

【0156】

各種実施形態において、組成物は、beauvericin - A、beauvericin - D、beauvericin - Eもしくはbeauvericin - Fなどの一つ以上のbeauvericinとともに、または、一つ以上のbassianolideもしくはそれらの任意の組み合わせとともに、本明細書に記載の1種以上の脂質を含む、相乗的組成物である。

【0157】

例えば、組成物は、さらに、約 $0.1\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbeauvericin、約 $0.5\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbeauvericin、約 $1\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbeauvericin、約 $5\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbeauvericin、約 $10\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbeauvericin、約 $50\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbeauvericin、または、約 $100\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbeauvericinを含む。

【0158】

別の実施例において、組成物は、さらに、約 $0.1\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbassianolide、約 $0.5\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbassianolide、約 $1\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbassianolide、約 $5\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbassianolide、約 $10\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbassianolide、約 $50\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbassianolide、または、約 $100\text{ mg L}^{-1}$ よりも多いbassianolideを含む。

【0159】

別の実施形態において、組成物は、beauvericin - A、beauvericin - D、beauvericin - Eもしくはbeauvericin - Fなどの一つ以上のbeauvericinとともに、または、一つ以上のbassianolideもしくはそれらの任意の組み合わせとともに、本明細書に記載の1種以上の脂質および、本明細書に記載の1種以上の昆虫病原性真菌を含む、相乗的組成物である。

【0160】

さらなる実施形態において、組成物は、本明細書に記載の1種以上の脂質および、本明細書に記載の1種以上の昆虫病原性真菌を含む、相乗的組成物である。

【0161】

本発明のBeauveria bassiana株K4B3を、単独で、または、本明細書に記載の他の昆虫病原性真菌と組み合わせて使用することができる。他の昆虫病原性真菌の例は、以下により詳細に記載されている。

【0162】

10

20

30

40

50

*Beauveria bassiana* 株 K 4 B 1 を、ニュージーランド、ボンベイの松林内の穿孔虫の幼虫から単離した。この *B. bassiana* 分離株は、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2005年3月16日に、オーストラリア、ニューサウスウェールズ、Pymble、1スアキンストリートの、オーストラリア国立計測研究所 (N M I A、以前のオーストラリア政府分析研究所) へ寄託した。分離株は、寄託番号 N M 0 5 / 4 4 5 9 5 を付与された。

【0163】

*Beauveria bassiana* 分離株 K 4 B 1 は、アザミウマ成体のプリファレンスを示し、また、アザミウマの幼体およびサナギ、アブラムシならびにコナジラミに対して病原性である。K 4 B 1 の分生子は、クリーム状の凝集を形成している。

10

【0164】

*Beauveria bassiana* 分離株 K 4 B 2 を、ニュージーランドの A k a A k a f l a t s において、ヒマワリ上の鱗翅目の芋虫から分離した。この *B. bassiana* 分離株は、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2006年3月3日に、オーストラリア国立計測研究所へ寄託した。分離株は、寄託番号 N M 0 6 / 0 0 0 1 0 を付与された。

【0165】

*Beauveria bassiana* 分離株 K 4 B 2 は、大豆尺取虫芋虫およびコナジラミおよびヨトウムシの芋虫を含む、芋虫のプリファレンスを示す。この分離株はまた、アザミウマの幼体、成体およびサナギ、アブラムシならびにコナジラミに対して病原性である。K 4 B 2 の分生子は、黄色の粉末状の凝集を形成する。

20

【0166】

N M I A 番号 V 0 8 / 0 2 5 8 5 5、N M I A 番号 N M 0 5 / 4 4 5 9 5、N M I A 番号 N M 0 6 / 0 0 0 1 0 および他の適切な *B. bassiana* 分離株を、本発明の1種以上の脂質またはそれらの機能的変異体もしくは断片と組み合わせて、使用することができ、特に効果的な生物的防除剤であり、断続性の湿潤期間、乾燥期間を生存することおよびコロニー形成が可能であり、野外でのアブラムシ、ケムシ、コナジラミ、ガ、ミツバチヘギイタダニ、セミ、およびアザミウマなどを含むがそれらに限定されない、植物病原虫の無能力化および死滅が可能である。*B. bassiana* のこれらの分離株によるコナジラミ、アザミウマおよびアブラゼミの死滅の程度は、一般的には、上記の一般的に使用される殺虫剤と同じ程度によい。これらの殺虫剤への抵抗が発達され、これらのおよび他の場合において、*B. bassiana* 分離株を含む組成物または *B. bassiana* 分離株を利用する方法は、昆虫制御のための効果的な代替手段を提供する。*B. bassiana* により誘発された、植物病原性の任意の観察の欠如と相まって、植物病害の制御における、この強力な活性は、これらの種の分離株が、生物的防除剤として使用するための望ましい属性を有することを示している。

30

【0167】

*Trichoderma* 種は、これまでには、いかなる殺虫活性も、殺虫効果も認められていない。*Trichoderma* 培養物は、通常、25~30 で増殖するが、35 では増殖しない。コロニーは、コーンミールデキストロース寒天 (C M D) などの培地または、ポテトデキストロース寒天 (P D A) などの *white on richer* 培地で、最初は透明である。菌糸体は、通常、C M D 上では明らかではなく、分生子は、通常、コンパクトに一週間以内に形成し、または、緑色もしくは黄色もしくはそれほど頻繁ではないが白色の濃淡で、緩い房を形成する。黄色の顔料は、寒天、特に P D A 中へ分泌されることがある。いくつかの種は、特徴的な甘い匂いまたは「ココナッツ」の匂いを産生する。

40

【0168】

分生子柄は、高度に分岐しており、したがって、画定または測定することが困難であり、緩くまたはコンパクトに房状であり、多くの場合、僅かな気中菌糸に沿って明確な同心円状に形成されるまたは位置する。分生子柄の主枝は、先端から離れた最も長い枝が対に

50

なっている対にならなくてもよい横側枝を産生し、多くの場合、先端近くの主軸から直接的に生じるフィアライドを産生する。枝は、再分枝することがあり、多くの場合、対になった第二の分枝を有し、最も長い第二の分枝は、主軸に最も近い。全ての第一の分枝および第二の分枝は、主軸に対して、 $90^\circ$ でまたはその近くで生じる。対になった分枝を有する典型的な *Trichoderma* 分生子柄は、ピラミッド型の側面を想定している。通常、分生子柄は、一つまたは少数のフィアライドで終わっている。いくつかの種（例えば、*T. polysporum*）において、主枝は、長く、単純または分岐した、フック状、直線状または波状、隔膜のある、壁の薄い、無菌または末端が肥沃な延長部により、終わっている。主軸は、フィアライドの基部と同じ幅であってもよく、または、それははるかに広くてもよい。

10

#### 【0169】

フィアライドは、一般的に中央が拡大されているが、円筒形またはほぼ垂球体であってもよい。フィアライドは、渦巻き状の他の部について、 $90^\circ$ の角度で渦巻きに保持されていてもよく、または、それらは、多様に毛筆状（グリオクラディウムのように）であってもよい。フィアライドは、広い主軸上で高密度にクラスタ化することが可能である（例えば、*T. polysporum*、*T. hamatum*）または、それらは、単生であり得る（例えば、*T. longibrachiatum*）。

#### 【0170】

分生子は、一般的に乾燥しているようであるが、いくつかの種では、それらは、透明な緑色または黄色の液体の滴に保持することができる（例えば、*T. virens*、*T. flavofuscum*）。ほとんどの種の分生子は、楕円形であり、 $3 \sim 5 \times 2 \sim 4 \mu\text{m}$ （ $L/W > 1.3$ ）、球形の分生子（ $L/W < 1.3$ ）は、稀である。分生子は、一般的に滑らかであるが、結節があり、細かいイボのある分生子が、いくつかの種において知られている。

20

#### 【0171】

シンアナモルフは、典型的なトリコデルマ膿疱も有するいくつかの種により形成されている。シンアナモルフは、フィアライド的に分岐しており、各フィアライドの先端の透明な緑色の液体の滴において分生子を産生する、それらの孤立性の分生子柄により認識されている。

#### 【0172】

厚膜胞子は、全ての種により産生され得るが、10日以内に20で、CMD上に全ての種が厚膜胞子を産生するわけではない。厚膜胞子は、典型的には単細胞垂球状であり、短い菌糸で終了し、それらはまた、菌糸細胞内で形成され得る。いくつかの種の厚膜胞子は、多細胞である（例えば、*T. stromaticum*）。

30

#### 【0173】

*Lecanicillium muscarium*は、同翅目昆虫および他の節足動物のグループを含む、広い宿主範囲を有する、昆虫病原糸状菌である。*L. muscarium*は、種複合体と考えられており、様々な形態学的特徴および生化学的特徴の分離株を含む。一般的に、*L. muscarium*は、アブラムシ、アザミウマ、コナジラミおよびコナカイガラムシなどの、昆虫の死体から単離することができ、また、土壌からも単離することができる。

40

#### 【0174】

*Lecanicillium muscarium*株K4V1を、ニュージーランド、ブケコへの温室トマトの収穫物中のコナジラミから単離した。この*L. muscarium*単離株を、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2005年3月16日に、オーストラリア国立計測研究所へ寄託した。分離株は、寄託番号NM05/44593を付与された。

#### 【0175】

K4V1は、追加の識別特性 - コナジラミスケールで、60%分生子 $1.0 \times 1.0$ ミクロン、アザミウマ幼体（幼虫）で30%分生子 $2.0 \times 1.0$ ミクロン、アザミウマの

50



サナギで10%分生子 $2.5 \times 1.3$ ミクロンを有する。菌系の葉状体の下側はまばらにシワになっており、菌系の葉状体は、非常に簡単に寒天から取り除かれる。

【0176】

*L. muscarium*株K4V2を、ニュージーランド、Ruakakaにおいて、キュウリの温室中のコナジラミから単離した。この*L. muscarium*単離株を、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2005年3月16日に、オーストラリア国立計測研究所へ寄託した。分離株は、寄託番号NM05/44594を付与された。

【0177】

K4V2は、追加の識別特性 - 50%分生子 $2.0 \times 1.5 \mu\text{m}$ 、30%分生子 $2.0 \times 1.0 \mu\text{m}$ 、20%分生子 $1.0 \times 1.0 \mu\text{m}$ を有し、アブラムシに対して病原性の芽胞子でありながら、コナジラミ成虫に対して病原性である。菌系の葉状体の下側は、短い間隔でシワになっており、菌系の葉状体は、寒天表面から取り除くのが困難である。

【0178】

*L. muscarium*株K4V4を、屋外の有機コダチトマト作物由来の単離株から単離した。この*L. muscarium*単離株を、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2006年3月3日に、オーストラリア国立計測研究所へ寄託した。分離株は、寄託番号NM06/00007を付与された。

【0179】

K4V4は、追加の識別特性 - 50%分生子 $1.0 \times 0.5 \mu\text{m}$ を有し、コナジラミスケールおよびコナジラミ成体へ病原性であり、低湿度(65~75%)、高温28~32°で非常に活動的である。一般的に、 $v.1 > 75\%$ 。50%成体子 $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ 。菌系の葉状体の下側は、まばらにシワであり、菌系の葉状体は、培地中において、明るいオレンジ色の顔料ヘカスタードの黄色を拡散させる。

【0180】

NMIA番号NM05/44593、NMIA番号NM05/44594、NMIA番号NM06/00007および他の*L. muscarium*の適切な分離株を、本発明の1種以上の脂質または機能的変異体と組み合わせて用いることができ、特に効果的な生物学的防除剤であり、断続性の湿潤期間、乾燥期間を生存することおよびコロニー形成が可能であり、野外でのアブラムシ、ケムシ、コナジラミ、ガ、ミツバチヘギイタダニ、セミ、およびアザミウマなどを含むがそれらに限定されない、植物病原虫の無能力化および死滅が可能である。

【0181】

*Lecanicillium longisporum*は、特にアブラムシに対して病原性である、昆虫病原性糸状菌である。*Lecanicillium longisporum*株KT4L1を、ニュージーランド、オークランド、フランクリンの大麦若葉のパンカープラント中のアブラムシから単離した。この*L. longisporum*単離株を、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2006年3月3日に、オーストラリア国立計測研究所へ寄託した。分離株は、寄託番号NM06/00009を付与された。

【0182】

単離株KT4L1は、100%分生子 $6.0 \times 2.1 \mu\text{m}$ という特性を有する。菌系の葉状体は、オフホワイトから黄色であり、一貫して粒粒として記述することが可能であった、非常に粗く増殖している。菌系の葉状体は、寒天中へ明るい赤茶色を拡散する。

【0183】

NMIA番号NM06/00009および、*L. longisporum*の他の適切な単離株を、本発明の1種以上の脂質または機能的変異体と組み合わせて使用することができ、特に効果的な生物学的防除剤であり、断続性の湿潤期間、乾燥期間を生存することおよびコロニー形成が可能であり、野外でのアブラムシなどの植物病原虫の無能力化および死滅が可能である。

10

20

30

40

50

## 【0184】

*Paecilomyces fumosoroseus* は、感染した昆虫および死んだ昆虫の中、ならびに、いくつかの土壌中で見つけられた昆虫病原性真菌である。*P. fumosoroseus* は、通常、コナジラミ、アザミウマ、アブラムシおよびケムシに感染する。

## 【0185】

*Paecilomyces fumosoroseus* の K4P1 株を、ニュージーランド、ランシマンにおけるキャベツの上に存在する、ダイヤモンドバック蛾の芋虫から単離した。この *P. fumosoroseus* 単離株を、特許手続きの目的のためのブダペスト条約に従って、2006年3月3日に、オーストラリア国立計測研究所へ寄託した。分離株は、寄託番号 NM06/00008 を付与された。

10

## 【0186】

NMIA 番号 NM06/00008 および他の適切な *P. fumosoroseus* 分離株を、本発明の1種以上の脂質または機能的変異体と組み合わせて使用することができ、特に効果的な生物的防除剤であり、断続性の湿潤期間、乾燥期間を生存することおよびコロニー形成が可能であり、コナジラミ、ミツバチヘギタダニおよび野外の鱗翅目の芋虫などを含むがそれらに限定されない、植物病原虫の無能力化および死滅が可能である。

## 【0187】

上述のように、多くの昆虫は、多数の殺虫剤に対する耐性を発達させ、これらの例および他の例において、必要に応じて上述したような一つ以上の真菌分離株を含むまたはそれらと一緒に投与した本発明の組成物は、昆虫制御のための効果的な代替手段を提供する。哺乳類の任意の観察の欠如またはこれらの薬剤により誘発される植物病原性と相まって、ヒトまたは植物病害を引き起こすものなどの、昆虫の制御におけるこの強力な活性は、これらの種の真菌分離株が存在する場合、本発明の脂質は、生物的防除剤として使用するための望ましい属性を有することを実証している。

20

## 【0188】

本発明は、1種以上の昆虫病原性真菌および少なくとも1種の担体とともに、本発明の1種以上の脂質またはそれらの機能的変異体を含む組成物を提供する。

## 【0189】

組成物は、昆虫病原性真菌の複数の株を含み得、特定の実施形態において、多数の植物病原性種または、多数の異なる発生段階の単一の植物病原体または、実際に同じものの組み合わせを標的とするために、複数の株を利用することができる。例えば、植物病原性昆虫の成体は、別の真菌株を標的とすることができながら、複数の形態の植物病原性昆虫は、一つの真菌株を標的とすることができ、両方の株は、本発明の組成物に含まれる。他の実施形態において、三株以下が好ましく、しばしば、単一の株が好ましい。

30

## 【0190】

適切には、組成物は、*Lecanicillium muscarium* 株 K4V1 (NMIA 受託番号 NM05/44593) またはその識別特性を有する株、*Lecanicillium muscarium* 株 K4V2 (NMIA 受託番号 NM05/44594) またはその識別特性を有する株、*Lecanicillium muscarium* 株 K4V4 (NMIA 受託番号 NM06/00007) またはその識別特性を有する株、*Beauveria bassiana* 株 K4B1 (NMIA 受託番号 NM05/44595) またはその識別特性を有する株、*Beauveria bassiana* 株 K4B2 (NMIA 受託番号 NM06/00010) またはその識別特性を有する株、*Lecanicillium longisporum* 株 KT4L1 (NMIA 受託番号 NM06/00009) またはその識別特性を有する株、*Paecilomyces fumosoroseus* 株 K4P1 (NMIA 受託番号 NM06/00008) またはその識別特性を有する株から成る群から選択された真菌を含む。

40

## 【0191】

特に意図されているものは、本発明の1種以上の脂質またはそれらの機能的変異体およ

50

び *Lecanicillium muscarium* 株 K4V1 (NM05/44593) またはその識別特性を有する株を含む組成物、本発明の1種以上の脂質またはその機能的変異体および *Lecanicillium muscarium* 株 K4V2 (NM05/44594) またはその識別特性を有する株を含む組成物、ならびに、本発明の1種以上の脂質またはその機能的変異体および *Lecanicillium muscarium* 株 K4V1 (NM05/44593) またはその識別特性を有する株の両方を含む組成物、本発明の1種以上の脂質またはその機能的変異体および *Lecanicillium muscarium* 株 K4V2 (NM05/44594) またはその識別特性を有する株を含む組成物である。

#### 【0192】

殺虫性または抗病原性真菌を含む組成物の例は、当該技術分野でよく知られており、例えば、Mycotech Corporation による PCT/US94/11542 (WO95/10597 として公開)、農務長官に代表される米国による PCT/US2002/037218 (WO2003/043417)、McCabe らによる米国特許第4,530,834号、Wright らによる米国特許出願第10/657,982号 (米国特許第2004/0047841号として公開)、および PCT/NZ2009/000217号 (WO2010/044680 として公開) に記載のものを含み、それぞれは、その全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。

#### 【0193】

例えば、植物またはその周囲環境へ適用するのに適するためには、前記少なくとも1種の担体は、農業的に許容可能な担体であり、より好ましくは、フィラー刺激剤、固結防止剤、湿潤剤、乳化剤および酸化防止剤から成る群から選択され、より好ましくは、前記組成物は、少なくとも一つのそれぞれの、フィラー刺激剤、固結防止剤、湿潤剤、乳化剤、酸化防止剤を含む。好ましくは、前記フィラー刺激剤は、例えば、ショ糖、果糖、グルコースまたはデキストロースを含む二糖類などの炭水化物源であり、前記固結防止剤は、タルク、二酸化ケイ素、ケイ酸カルシウムまたはケラン粘土から選択され、前記湿潤剤はスキムミルク粉末であり、前記乳化剤は、レシチンなどの大豆ベースの乳化剤またはモニジグリセリドなどの植物性乳化剤であり、前記酸化防止剤は、グルタミン酸ナトリウムまたはクエン酸である。しかしながら、当該技術分野で周知の他の例は、置換されていてもよく、殺虫効力をサポートする組成物の能力を提供し、必要な場合は、真菌の生存能力が維持されている。

#### 【0194】

好ましくは、前記組成物は生物的防除組成物である。生物的防除剤として効果的であることが要求される組成物中に存在する本発明の殺虫性脂質の濃度は、最終用途、植物の生理的状态、種類 (昆虫種を含む)、病原体感染の濃度および程度、温度、季節、湿度、生育期ステージ、植物の年齢、適用される従来の殺虫剤または他の処理 (殺真菌剤を含む) の数および種類、ならびに、デリーフィングおよび剪定のような植物処理などの物理的処理に応じて変更することができ、全ての組成物を処方する際に考慮することができる。

#### 【0195】

殺虫剤組成物

脂質組成物および使用方法

本発明者らは、本明細書に開示の脂質組成物は、例えば、畑作物、草、果物および野菜、芝生、樹木および / または観葉植物への局所的および / または全体的適用のための、BCA 組成物としての、特定の有用性が見出される。あるいは、本明細書に開示された脂質は、昆虫を殺すまたは昆虫の個体数を制御するための、噴霧、ダスト、粉末または、他の水性の霧状エアロゾルとして、処方され得る。本明細書に開示された脂質組成物を、予防的に用いることができる、または代わりに、標的昆虫が、処理される特定の環境において同定された後に、環境へ投与することができる。脂質組成物は、個々の脂質を含み得るまたは、本明細書に開示される様々な脂質の組み合わせを含み得る。

#### 【0196】

適用方法にかかわらず、活性脂質成分（単数または複数）の量は、殺虫剤として有効な量で適用され、例えば、制御されるべき特性の標的昆虫、特定の環境、場所、植物、穀物または処理されるべき農業部位、環境条件ならびに、殺虫活性脂質組成物の適用の方法、速度、濃度、安定性および量により変化する。製剤はまた、機構条件、環境への配慮および/または適用の頻度および/または昆虫混入の重大度に対して変化し得る。

#### 【0197】

記載の組成物を、必要に応じて、所望の農業的に許容可能な担体を有する真菌細胞および/または孢子懸濁液とともに、1種以上の脂質、その機能的変異体または機能的断片を配合することにより、作成することができる。組成物を、凍結乾燥、フリーズドライ、乾燥、または、生理食塩水もしくは他の緩衝液などの水性担体、媒体または適切な希釈剤中で、適切な手段により、投与前に製剤化することができる。製剤化された組成物は、ダストもしくは顆粒材料、または、油（植物油または鉱物油）中の懸濁液、または、水もしくは油/水エマルジョン、または質純正粉末、または、農業的用途に適した任意の他の担体材料との組み合わせの形態であり得る。適切な農業用担体は、固体または液体とすることができ、当該技術分野において周知である。用語「農業的に許容可能な担体」は、通常、殺虫剤製剤技術において使用される、全ての補助剤、不活性成分、分散剤、界面活性剤、粘着付与剤、結合剤などをカバーし、これらは、当該殺虫剤製剤の当業者によく知られている。例えば、従来の製剤技術を使用して、均一に、殺虫成分を適切な補助剤と混合、ブレンドおよび/または粉碎することによるなどの、様々な手段によって、製剤を一つ以上の固体または液体の補助剤と混合し、調製することができる。

10

20

#### 【0198】

組成物は、一つ以上の真菌株を含み得、ひとつ以上の細菌種またはそれらの両方を含み得る。典型的な細菌種は、*B. thuringiensis*、*B. megaterium*、*B. subtilis*、*B. cereus*、*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Agrobacterium* spp.、または*Pseudomonas* spp.などの細菌種を含む。

#### 【0199】

##### 油流動性懸濁液

例示的な一実施形態において、生物殺虫組成物は、必要に応じて、本明細書に開示された一つ以上の新規のタンパク質を発言する一つ以上の真菌細胞を含む、一つ以上の真菌細胞とともに、本発明の1種以上の脂質、その機能的変異体または機能的断片の油流動性懸濁液を含む。

30

#### 【0200】

##### 水分散性顆粒

別の重要な例示的な実施形態において、生物殺虫剤組成物は、水分散性顆粒を含む。この顆粒物は、必要に応じて、本明細書に開示の本発明の脂質を生成する一つ以上の真菌細胞を含む、一つ以上の真菌細胞とともに、本発明の1種以上の脂質、その機能的変異体または機能的断片を含む。

#### 【0201】

##### 粉末、ダストおよび孢子製剤

40

第三の重要な例示的な実施形態において、生物殺虫剤組成物は、水和剤、ダスト、孢子製剤、細胞ベレットまたはコロイド濃縮物を含む。この粉末は、必要に応じて、本明細書に開示の本発明の脂質を生成する一つ以上の真菌細胞を含む、一つ以上の真菌細胞とともに、本発明の1種以上の脂質、その機能的変異体または機能的断片を含む。そのような乾燥形態の殺虫剤組成物を、湿潤時に直ちに溶解するように、または代わりに、制御放出、持続放出または他の時間依存的な様式で溶解するように、製剤化することができる。そのような組成物を、標的昆虫へ適用することができる、または、標的昆虫により摂取することができ、そのようにして、昆虫の数、または所与の環境における昆虫の蔓延を制御するために、使用することができる。

#### 【0202】

50

水性懸濁液および真菌細胞ろ液または溶解物

第四の重要な例示的な実施形態において、生物殺虫剤組成物は、必要に応じて、本明細書に開示される本発明の脂質を産生することができる、一つ以上の真菌細胞を含む一つ以上の真菌細胞とともに、本発明の１種以上の脂質、それらの機能的変異体または機能的断片の水性懸濁液を含む。そのような水性懸濁液を、適用前に希釈される濃縮ストック溶液として、または代わりに、すぐに適用される希釈液として、提供することができる。

【０２０３】

殺虫性組成物が、目的の脂質を産生する完全な細胞を含む場合、そのような細胞は、様々な方法で製剤化することができる。それらを、無機鉱物（フィロシリケート、炭酸塩、硫酸塩、リン酸塩など）または植物性材料（粉末のトウモロコシの穂軸、もみ殻、クルミの殻など）などの、様々な不活性物質と混合することにより、水和剤、顆粒またはダストとして用いることができる。製剤は、スプレッダーステッカー補助剤、安定化剤、他の殺虫性添加剤または界面活性剤を含んでもよい。液体製剤は、水性または非水性であってもよく、発泡剤、懸濁剤、乳剤などとして用いることができる。成分は、レオロジー剤、界面活性剤、乳化剤、分散剤またはポリマーを含み得る。

10

【０２０４】

あるいは、新規の殺虫性脂質を、天然のまたは *in vitro* での組換え発現系によって調製することができ、その後のフィールドアプリケーションのために単離することができる。そのような脂質は、粗細胞溶解物、懸濁液、コロイドなどのいずれかであってもよく、または代わりに、活性な殺生物製剤中で製剤する前に、精製され、洗練され、バッファされおよび／または、さらに処理され得る。同様に、特定の状況下において、脂質を産生する培養物から脂質または胞子を単離し、活性な生物殺虫剤組成物として、溶液、懸濁液またはそのような脂質もしくは胞子のコロイド製剤を適用することが望ましい場合がある。

20

【０２０５】

多機能製剤

特定の実施形態において、例えば、複数の昆虫手の制御が所望される場合、本明細書に記載の殺虫製剤は、さらに、一つ以上の化学殺虫剤（化学殺虫剤、殺線虫剤、殺真菌剤、殺ウイルス剤、殺菌剤、殺アメーバ剤、殺虫剤など）および／または、本明細書で同定した殺虫性脂質と同じもしくは異なる殺虫活性もしくは殺虫特異性を有する１種以上の脂質を含んでいても良い。製剤の単一適用を伴う標的領域の長期投薬を可能にする、肥料、除草剤、凍結防止剤、界面活性剤、洗剤、殺虫性石鹸、休眠油、ポリマーおよび／または持続放出担体制剤もしくは生分解性担体制剤などの他の処理と併用して、殺虫性脂質を使用することもできる。同様に、殺虫性製剤の標的昆虫による接触または摂取を可能にするために、食用の「餌」または昆虫「餌」中へ製剤を調製することができる。

30

【０２０６】

本発明の殺虫性組成物を、環境サイトへ単独で、連続的にもしくは同時適用で、または、一つ以上の追加の殺虫剤、農薬、化学物質、肥料もしくは他の化合物と組み合わせ、用いてもよい。

【０２０７】

40

真菌を含む組成物

生物的防除剤として使用するために、組成物中に存在する場合、本発明の昆虫病原性真菌を、繁殖可能な形態へする必要がある。本明細書中で使用される用語である繁殖可能は、真菌の菌糸および胞子の形態を含む。例えば、ほとんどの目的のために、真菌株は、望ましくは、胞子の形態（分生子または芽）で、組成物中へ組み込まれる。胞子は、本明細書に記載の全ての真菌株から得ることが可能であり、公知の技術を用いて製造することができる。必要に応じて、本明細書に記載の真菌株から得られた一つ以上の胞子を含む、一つ以上の真菌細胞とともに、本発明の１種以上の脂質、それらの機能的変異体または機能的断片を含む本発明の組成物は、本発明のさらなる態様を形成する。組成物中の真菌の胞子の濃度は、組成物が置かれる有用性に依存する。例示的な濃度範囲は、mL 当たり、約

50

$1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$  孢子、好ましくは、 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^{10}$ 、より好ましくは、mL 当たり、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  孢子である。

#### 【0208】

理論的には、一つの感染性単位は、宿主を感染させるために十分であるべきであるが、実際の状況において、感染単位の最小数は、感染を開始するために必要とされる。定期的に化学農薬とともに用いられる致死量 (LD) の概念は、昆虫病原性活性のいくつかの要素が、植物のコロニー形成または、昆虫病原性真菌によるその周辺環境に依存する、それらの微生物農薬は、不適切である。感染量 (ID) または感染濃度 (IC) の概念は、より正確であるまたはより適切である。ID または IC は、感染を開始するために必要とされる感染単位の実際の数または死を引き起こすために病原体へ晒される感染単位の数を指す。したがって、病原体に対する室外または温室中で適用される感染単位の数は、制御の程度に影響を与える。外注の良好な制御を得るために、抗病原性真菌の所望の濃度を敵将し、適切に配置し、適切なタイミングであることが重要であり；これは、「感染閾値」として知られている。

#### 【0209】

適用のために製剤化された組成物における真菌孢子の濃度は、例えば、貯蔵のために製剤化された組成物と比較して、小さくてもよいことは明らかであろう。出願人は、本明細書に記載の昆虫病原性真菌を用いて、ヘクター当たり約 1 L の割合で適用された場合、感染の閾値は、噴霧可能な溶液の mL 当たり約  $10^7$  孢子で生じることを実証した。したがって、一例において、適用のために製剤化された組成物は、好ましくは、mL 当たり少なくとも約  $10^7$  孢子の濃度を有する。別の例において、貯蔵のために製剤化された組成物 (例えば、適用に適した組成物へ製剤化することが可能な水和剤など) は、好ましくは、グラム当たり約  $10^{10}$  孢子の濃度を有する。貯蔵および適用に適した組成物へのその後製剤化のために製剤化された組成物の孢子濃度は、感染の閾値に到達するために適用することができるように、前記適用のための組成物が十分な濃度になることができるために、適切なものでなければならない。

#### 【0210】

特定の実施形態において、組成物は、約二週間以上、好ましくは約一ヶ月以上、約二ヶ月以上、約三ヶ月以上、約四ヶ月以上、約五ヶ月以上、より好ましくは、約六ヶ月以上の期間、殺虫剤の有効性 (例えば、1 種以上の脂質の有効性) を支持することができる、安定な組成物である。本明細書に記載の昆虫病原性真菌などの、一つ以上の昆虫病原物質を利用する実施形態における使用に適しているために、組成物は、好ましくは、約六ヶ月以上の期間、昆虫病原物質または昆虫病原性効力の繁殖生存率を支持することができる。

#### 【0211】

当該技術分野でよく知られている従来の固体基質および液体発行技術を用いて、本発明の殺虫性脂質を、生物的防除剤としての使用を可能にするために、十分な量で製造することができる。例えば、本発明の脂質 (単数および複数) 画分を、これらの増殖技術を用いて十分な量で製造することができ、例示的な技術は、実施例において本明細書において提示されている。増殖は、一般的に、生物の増殖のために適切な任意の温度で、好気性条件下で行われる。例えば、*B. bassiana* について、 $10 \sim 32$ 、好ましくは  $25 \sim 30$ 、最も好ましくは  $23$  の温度範囲が好ましい。増殖培地の pH は、弱酸性～中性、すなわち、約  $5.0 \sim 7.0$ 、最も好ましくは  $5.5$  である。 $23$  でインキュベーションした場合、単離株が定常期に達するために十分なインキュベーション時間は、約 21 日間であり、通常の光周期で生じる。

#### 【0212】

選択された株からの孢子を、栄養素フィルム、深部培養、米基盤成長技術を用いて、フィールドアプリケーションについてのバルクで、産生することができる。例えば、従来のろ過または沈降方法論 (例えば、遠心分離) または、サイクロンシステムを用いた収穫乾燥によるなど、当該技術分野で周知の方法によって、孢子を回収することができる。孢子を、それらが、生殖的に生存し続ける限り、すぐに使用するまたは、 $0 \sim 6$ 、好まし

くは2 で冷却して保存することができる。しかしながら、一般的には、本発明の組成物中へ組み込まれていない場合には、収穫から2週間以内に使用することが好ましい。

【0213】

同様に、必要な場合、一つ以上の細胞溶解工程（例えば、細胞内脂質について）を組み合わせるか否かによらず（例えば、増殖培地中に分泌される脂質について）、ろ過または沈降方法論（例えば、遠心分離）によるなど、当該技術分野で周知の方法により、B. bassianaにより産生された1種以上の脂質を、B. bassiana K4 B3から単離することができる。

【0214】

本発明の組成物はまた、一つ以上の担体、好ましくは、一つ以上の農業的に許容可能な担体を含むことができる。一実施形態において、農業的に許容可能な担体などの担体は、固体または液体とすることができる。本明細書において有用な担体は、典型的に、農業用組成物を配合するために使用される任意の物質を含む。

10

【0215】

一実施形態において、農業的に許容可能な担体は、充填剤、溶媒、賦形剤、界面活性剤、懸濁化剤、スपीダー/ステッカー（接着剤）、消泡剤、分散剤、湿潤剤、ドリフト還元剤、助剤、補助剤またはそれらの混合物から選択され得る。

【0216】

本発明の組成物は、例えば、濃縮物、溶液、スプレー、エアロゾル、浸漬浴、ディップ、エマルジョン、水和剤、可用性粉末、懸濁濃縮物、粉剤、粒剤、顆粒水和物、マイクロカプセル、ペースト、ゲルおよびその他のよく確立された手順による製剤の種類として、処方され得る。

20

【0217】

これらの手順は、活性成分と、例えば、充填剤、溶媒、賦形剤、界面活性剤、懸濁化剤、スピーダー/ステッカー（接着剤）、消泡剤、分散剤、湿潤剤、ドリフト還元剤、助剤および補助剤などの農業的に許容可能な担体物質との混合および/または粉碎を含む。

【0218】

一実施形態において、固体担体は、例えば、ケイ酸、シリカゲル、ケイ酸塩、タルク、カオリン、アタパルガスクレ、石灰石、石灰、チョーク、赤土、黄土、粘土、ドロマイト、珪藻土、アルミナ硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、酸化マグネシウム、粉碎プラスチックなどの鉱物土、例えば硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウムおよび尿素などの肥料、ならびに、例えば穀物粉、樹皮粉、木粉および堅果穀粉、セルロース粉末などの野菜製品などを含むが、それらに限定されない。以下の顆粒についての固体担体が適している：方解石、大理石、軽石、海泡石およびドロマイトなどの粉碎した天然岩または分画した天然岩；無機または有機粉などの合成顆粒；おがくず、ココナッツ殻、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮またはタバコの茎などの有機材料の顆粒、珪藻土、リン酸三カルシウム、コルク粉または、吸収性カーボンブラック；水溶性ポリマー、樹脂、ワックス；または固形肥料。そのような固体組成物は、所望の場合、固体であるときには希釈剤としても機能し得る、一つ以上の互換性の湿潤剤、分散剤、乳化剤または着色剤を含み得る。

30

40

【0219】

一実施形態において、担体は、例えば、水；アルコール、特にブタノールまたはグリコールおよびそれらのエーテルまたはエステル、特にメチルグリコールアセテート；ケトン、特にアセトン、シクロヘキサノン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトンまたはイソホロン；パラフィン系炭化水素または芳香族炭化水素、特にキシレンまたはアルキルナフタレンなどの石油留分；鉱油または植物油；脂肪族塩素化炭化水素、特にトリクロロエタンまたは塩化メチレン；芳香族塩素化炭化水素、特にクロロベンゼン；ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドまたはN-メチルピロリドンなどの水溶性または強極性溶媒；液化ガス；など、またはそれらの混合物などの、液体であってもよい。

【0220】

50

一実施形態において、界面活性剤は、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤および/または両性界面活性剤を含み、噴霧の間に溶液中に残存する凝集体の能力を促進する。

【0221】

スプレッダー/ステッカーは、本発明の組成物の植物表面に付着する能力を促進する。界面活性剤、スプレッダー/ステッカーの非限定的な例としては、トゥイーンおよびトリトン（ロームアンドハース社）、ディープフライド、フォーチュン、パルス、C・ダクソイル、コダサイドオイル、D-C・テート、スパメットオイル、ボンド、ペネトランド、グロベルトおよびフリーウェイ、シトウェット、フォーチュンプラス、フォーチュンプラスライト、フルメック、フルメックライト、例えばリグニンスルホン酸、フェノールスルホン酸、ナフタレンスルホン酸およびジブチルナフタレンスルホン酸等の芳香族スルホン酸のアルカリ金属、アルカリ土類金属および芳香族スルホン酸のアンモニウム塩、および脂肪酸のアルカリ金属、アルカリ土類金属および芳香族スルホン酸のアンモニウム塩、アルキルおよびアルキルアリアルスルホン酸エステル、およびアルキル、ラウリルエーテルおよび脂肪質のアルコール硫酸塩、および硫酸化ヘキサデカノールの塩、ヘプタデカノール、およびオクタデカノール、脂肪族アルコールグリコールエーテルの塩、ホルムアルデヒドによるスルホン化ナフタレンおよびナフタレン誘導体の縮合体、フェノールおよびホルムアルデヒドによるナフタレンの縮合体またはナフタレンスルホン酸、ポリオキシエチレンオクチルフェノールエーテル、エトキシ化イソオクチルフェノール、エトキシ化オクチルフェノールおよびエトキシ化ノニルフェノール、アルキルフェノールポリグリコールエーテル、トリブチルフェニルポリグリコールエーテル、アルキルアリアルポリエーテルアルコール、イソトリデシルアルコール、脂肪族アルコールエチレンオキシド縮合物、エトキシ化ひまし油、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、エトキシ化ポリオキシプロピレン、ラウリルアルコールポリグリコールエーテルアセタール、ソルビトールエステル、リグニン亜硫酸塩廃液およびメチルセルロースを挙げることができる。混合するものを選択する場合に、トゥイーン等の農業界面活性剤を一つ以上が、既知のプロトコルに従って、組成物に含まれることが望ましい。

10

20

【0222】

湿潤剤は、組成物中の水の表面張力を低減するため、所与の量の組成物を塗布できる表面積を増加させる。湿潤剤の非限定的な例としては、ポリアクリル酸の塩、リグノスルホン酸の塩、フェノールスルホン酸またはナフタレンスルホン酸の塩、脂肪族アルコールまたは脂肪酸または脂肪族エステルまたは脂肪族アミンを含むエチレンオキシドのポリ縮合物、置換フェノール（特にアルキルフェノールまたはアリアルフェノール）、スルホコハク酸エステルの塩、タウリン誘導体（特にアルキルタウリン塩）、アルコールまたはフェノールを含むエチレンオキシドのポリ縮合物のリンのエステル、ポリオールによる脂肪酸のエステル、または上記の化合物の硫酸塩、スルホン酸塩またはリン酸塩官能性誘導体を挙げることができる。

30

【0223】

一実施形態では、本発明の化合物または組成物を塗布する好適な方法は、ハンドガンまたは市販のエアーブラストによって希釈または濃縮溶液をスプレーすることである。

40

【0224】

先に述べたように、本発明の組成物は、単独で、または一つ以上の他の農業添加剤と共に用いてもよく、この農業添加剤には、農薬、殺虫剤、ダニ駆除剤、抗真菌剤または殺菌剤（組成物の中に存在するあらゆる真菌またはバクテリアに対してこの抗真菌剤または殺菌剤は有害でなくまたは有毒でない）、除草剤、抗生物質、抗菌物質、抗線虫剤、殺鼠剤、昆虫病原物質、フェロモン、誘引物質、植物生長調節物質、植物ホルモン、昆虫生長調節物質、不妊化剤、微生物のペスト制御剤、駆虫剤、ウイルス、摂食刺激物質、植物栄養物、植物肥料および生体制御を挙げることができる。他の農業添加剤と共に用いる場合、2つの剤の投与は、別個でもよくて、同時でもよくてまたは連続していてもよい。これらの農業添加剤の具体的な例は、当業者に知られている、および、多くは容易に商業的に入

50



手可能である。

【0225】

植物栄養物の非限定的な例としては、窒素、マグネシウム、カルシウム、硼素、カリウム、銅、鉄、リン、マンガン、モリブデン、コバルト、硼素、銅、シリコン、セレン、ニッケル、アルミニウム、クロムおよび亜鉛を含む。

【0226】

抗生物質非限定的な例としては、オキシテトラサイクリンおよびストレプトマイシンを含む。

【0227】

抗真菌剤の非限定的な例は、カルボアミド、ベンゾイミダール、トリアゾール、ヒドロキシピリジン、ジカルボキシアミド、フェニルアミド、チアジアゾール誘導体、カルバミン酸塩、シアノ-オキシム、ケイ皮酸誘導体、モルホリン、イミダゾール、ペータメトキシアクリレートおよびピリジン/ピリミジンの形態の抗真菌剤を含む。

10

【0228】

更に、抗真菌剤の非限定的な例としては、天然の抗真菌剤、有機抗真菌剤、サルファーベースの抗真菌剤、銅/カルシウム抗真菌剤および植物ホスト防御のエリシターを含む。

【0229】

天然の抗真菌剤の非限定的な例としては、全乳、ホエー、脂肪酸またはエステル化脂肪酸を含む。

【0230】

有機抗真菌剤の非限定的な例としては、有機認定基準に合格するあらゆる抗真菌剤を含み、例えば生態防除剤、天然製品、エリシター（一部は天然製品として分類）、ならびに硫黄および銅抗真菌剤（限定的な使用に制限）を挙げることができる。

20

【0231】

サルファ剤ベースの抗真菌剤の例としては、K u m u l u s（商標）（B A S F、ドイツ）が挙げられる。

銅抗真菌剤の一例としては、コサイド2000DF（グリフィン社、米国）が挙げられる。

エリシターの非限定的な例としては、キトサン、バイオン（商標）、B A B A（dl-3-アミノ-nブタン酸（-アミノ酪酸））およびミルサナ（商標）（ウェスタンファームサービス社、米国）を挙げることができる。

30

【0232】

一部の実施形態では、非有機抗真菌剤が使用されてもよい。非有機抗真菌剤の非限定的な例としては、B r a v o（商標）（ウリ科植物のPMの調節）；スーパーシールド（商標）（イエーツ社、ニュージーランド）（ボトリティス属およびばらの花のPMの調節）；（バラのボトリティス病およびPMの調節）；トパス（登録商標）200EW（ブドウおよびウリ科の植物のPMの調節）；フリント（商標）（リンゴおよびウリ科の植物のPMの調節）；アミスター（登録商標）WG（銹菌および穀類のPMの調節）；キャプタン（商標）、ディタン（商標）、ユーパレン（商標）、ロブラル（商標）、スカラ（商標）、シルラン（商標）、スイッチ（商標）およびテルドール（商標）（ブドウのボトリティス病の調節）を挙げることができる。

40

【0233】

農薬の非限定的な例としては、アゾキシストロビン、ピテルタノール、カルボキシノ、C u<sub>2</sub>O、シモキサニル、シプロコナゾール、シプロジニル、ジクロフラミド、ジフェノコナゾール、ジニコナゾール、エポキシコナゾール、フェンピクロニル、フルジオキシニル、フルキコナゾール、フルシラゾール、フルトリアホール、フララキシル、グアザチン、ヘキサコナ、ヒドロキシソキサゾール、イマザリル、イミベンコナゾール、イブコナゾール、クレソキシムメチル、マンコゼブ、メタラキシル、R-メタラキシル、メトコナゾール、オキサジキシル、ペフラゾエート、ペンコナゾール、ペンシクロン、プロクロラズ、プロピコナゾール、ピロキロン、S S F - 109、スピロキサミン、テブコナゾール、チ

50

アペンダゾール、トリフルアミド、トリアゾキシド、トリアジメホン、トリアジメノール、トリフ、トリチコナゾールおよびウニコナゾールを挙げることができる。

【0234】

ここで記載される菌類株以外の生体制御剤の一例は、ウロクラジウムウーデマンシ（商標）を含むボトリゼン生体制御剤である。

【0235】

また、これら組成物は、活性成分を強化するために用いられる安定剤および浸透液等や、また、例えば塩化カリウム、グリセリン、塩化ナトリウムおよびブドウ糖等の、芽胞精力、出芽および帰還性を改良するいわゆる『ストレッシング』添加剤等の広範囲の添加剤を備えてもよい。添加剤は、また、長期貯蔵において微生物生存能力を維持することを援助する組成物、例えば、未精製トウモロコシ油、外側に油およびワックスの混合物、内側に水、アルギン酸ナトリウムおよび分生胞子を含むいわゆる逆エマルジョンを含んでもよい。

10

【0236】

用いられるあらゆる添加剤は、生体制御剤の効率を妨げない量で存在することが重要であることが、当業者によって理解される。

【0237】

キャリア、保存剤、界面活性剤およびぬれ剤、スプレッダーおよび栄養物を含む適切な組成物の実施例が米国特許第5780023号に提供され、同文献はその全体が参照によりここに援用される。

20

【0238】

また、一般に用いられた抗真菌剤の多くは、存在時に、ここに記載される昆虫病原真菌に悪影響を及ぼさないことを、出願人は提示するものである。したがって、前記真菌を備える本発明の組成物も、この抗真菌剤を含んでもよい。あるいは、調節プログラムにおいて、これら組成物は、この抗真菌剤と別々かつ提携して用いられてもよい。

【0239】

また、本発明は、本発明の1種以上の脂質またはこれらの一つ以上の官能性変異株およびここで記載される一つ以上の昆虫病原真菌を備える組成物を生成する方法を提供し、前記方法は、前記昆虫病原真菌の再生的に成育可能な形態を提供することと、および前記昆虫病原真菌の前記再生的に成育可能な形態を、本発明の1種以上の脂質またはこれらの官能性変異株および少なくとも1つの農業上容認可能なキャリアと組み合わせることを含む。

30

【0240】

これら組成物は、多数の形態で調製されてもよい。一つの調製方法としては、植物またはその周囲にふりかけることができるよう、本発明の組成物の粉末の形態を挙げることができる。更なる形態としては、組成物を水等の希釈液と混合してスプレー、発泡体、ゲルまたはディップを形成し、既知のプロトコルを適切に用いて塗布することが挙げられる。好ましい実施形態では、上記のように処方する組成物は、水と混合して、約1 g m / Lに加圧された噴霧器を用い、1 ~ 3 k g / h aで水が1 0 0 0 L / h aを越えないよう散布する。好ましくは、ディーブフライド（商標）またはフォーチュンプラスド（商標）を、約1 m l / L、UVおよび乾燥保護剤として組成物に加える。L . マスカリウム、L . ロングスポラムまたはP . フモソロシウスを備える組成物を、同様の方法で塗布することができる。

40

【0241】

従来技術方法で知られるインジェクション、研磨またはブラッシング等、他の方法のために処方した組成物を用いてもよい。土、水またはシードコーティング等の植物周囲または環境への組成物の間接的な塗布を行うことも可能である。

【0242】

上で示したように、ここで記載されるように、昆虫病原真菌を備えているそれらを含む本発明の組成物が、有効な生体制御剤となるよう塗布されるべき濃度は、最終用途、植物

50

の生理的条件；種類（昆虫化学種を含むこと）、濃度および病原体感染症の度合い；温度、季節、湿度、成長中の段階および植物の年令；塗布さる従来の殺虫剤または他の処理剤（抗真菌剤を含むこと）の数および種類；および植物処理（例えば葉摘採および剪定）により変更することができる。

#### 【0243】

散粉、散水、土浸漬、土注入、シードコーティング、苗コーティング、葉噴霧、通気、ミスト、噴霧、燻蒸、エアロゾル化その他を含む他の散布技術も可能であり、例えばこれは、根または茎外に寄生する昆虫や繊細な植物または装飾的な植物への塗布等、特定の状況の下で必要とされる。これらの散布の方法は、従来技術で当業者に知られている。

#### 【0244】

また、本発明の殺虫剤の組成物は、予防的また予防性の塗布に対する処方を行ってもよく、あるいは、ペット、家畜、動物寝具、あるいは、農場装置、バーン、居所、農業または産業の設備等の場所およびその周囲等、特定の状況に対して散布してもよい。

#### 【0245】

環境、全体、局所または葉への塗布に用いられる殺虫剤の組成物の濃度は、特定の配合、塗布の手段、環境の条件および殺菌の活性の度合いの性質によって、広い範囲で変更される。典型的には、バイオ殺虫剤組成物は、少なくとも約1重量部の濃度で塗布配合中に存在し、最大で約99重量部以下であってもよい。脂質組成の乾燥状態配合は、脂質組成を重量基準で約0.01%～約99%以上含有してもよく、液状配合は一般に、重量基準で活性成分を約1%～約99%以上含有してもよい。このように、殺虫脂質を重量基準で約5%～約95%以上の配合、殺虫脂質を重量基準で約10%～約90%以上の配合を含む様々な配合が好ましい。当然、殺虫脂質を重量基準で約15%～約85%以上を含む組成物と、殺虫脂質を重量基準で約5%～約95%以上含む配合とが、本開示の範囲内に含まれる。

#### 【0246】

殺虫脂質を含む無損傷の菌類細胞が含まれる組成物の場合、調製物は細胞を、約 $10^4$ ～約 $10^8$ 個/mgを一般に含むが、特定の実施形態では、細胞を約 $10^2$ ～約 $10^4$ 個/mgを備えている配合を利用することが望ましく、濃縮度の高い配合が所望の場合、細胞を約 $10^{10}$ または約 $10^{11}$ 個/mg含む配合を調整してもよい。あるいは、細胞ペースト、芽胞濃縮物または脂質懸濁液濃縮物は、活性脂質の細胞約 $10^{12}$ ～ $10^{13}$ 個/mgと同等を含むように調製されてもよく、この濃縮物は、塗布の前に薄められてもよい。

#### 【0247】

上記の殺虫の配合物は、一つ以上の塗布に必要な応じて、ヘクタール当たり代表的なフィールド散布速度、すなわち活性成分約50g/ヘクタール～約500g/ヘクタールで、特定の植物またはターゲットエリアに投与されてもよく、あるいは、約500g/ヘクタール～約1000のg/ヘクタールを利用してもよい。特定の場合、活性成分約1000g/ヘクタール～約5000g/ヘクタールの散布速度で、均一にターゲットエリアに殺虫剤配合を塗布することが好ましい。実際、この殺虫剤の配合を用いて、活性脂質ヘクタール当たり約50gから約10,000のg/ヘクタールまでの範囲の全ての塗布速度が、ターゲット害虫の管理、調節および殺害に有用であると意図される。このように約100g/ヘクタール、約200g/ヘクタール、約300g/ヘクタール、約400g/ヘクタール、約500g/ヘクタール、約600g/ヘクタール、約700g/ヘクタール、約800g/ヘクタール、約900g/ヘクタール、約1kg/ヘクタール、約1.1kg/ヘクタール、約1.2kg/ヘクタール、約1.3kg/ヘクタール、約1.4kg/ヘクタール、約1.5kg/ヘクタール、約1.6kg/ヘクタール、約1.7kg/ヘクタール、約1.8kg/ヘクタール、約1.9kg/ヘクタール、約2.0kg/ヘクタール、約2.5kg/ヘクタール、約3.0kg/ヘクタール、約3.5kg/ヘクタール、約4.0kg/ヘクタール、約4.5kg/ヘクタール、約6.0kg/ヘクタール、約7.0kg/ヘクタール、約8.0kg/ヘクタール、約8.5kg/ヘクタール、約9.0kg/ヘクタール、ならびに、約10.0のkg/ヘクタール以上の活

10

20

30

40

50

性脂質が、先に記載される殺虫剤の配合の特定の農業用、工業用および室内用途に利用されてもよい。

#### 【0248】

例えば、特定の用途の中に、ここに記載した真菌を備える組成物の塗布は、ヘクタール当たり芽胞が約  $1 \times 10^{10}$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  個の速度、好ましくはヘクタール当たり芽胞が約  $1 \times 10^{12}$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  個の速度、より好ましくはヘクタール当たり芽胞が約  $5 \times 10^{12}$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  個の速度、さらに好ましくはヘクタール当たり芽胞が約  $1 \sim 3 \times 10^{13}$  個の速度で、行ってもよい。

#### 【0249】

液体組成物の代表的な塗布速度は、活性脂質がヘクタール当たり約 50 ml ~ 約 20 L / ヘクタールまでの範囲の塗布速度を含み、この殺虫剤の配合を用いるターゲット昆虫害虫の、管理、調節および殺害の中に使用可能であると意図される。このように、活性脂質約 100 ml / ヘクタール、約 200 ml / ヘクタール、約 300 ml / ヘクタール、約 400 ml / ヘクタール、約 500 ml / ヘクタール、約 600 ml / ヘクタール、約 700 ml / ヘクタール、約 800 ml / ヘクタール、約 900 ml / ヘクタール、約 1 L / ヘクタール、約 1.1 L / ヘクタール、約 1.2 L / ヘクタール、約 1.3 L / ヘクタール、約 1.4 L / ヘクタール、約 1.5 L / ヘクタール、約 1.6 L / ヘクタール、約 1.7 L / ヘクタール、約 1.8 L / ヘクタール、約 1.9 L / ヘクタール、約 2.0 L / ヘクタール、約 2.5 L / ヘクタール、約 3.0 L / ヘクタール、約 3.5 / ヘクタール、約 4.0 L / ヘクタール、約 4.5 L / ヘクタール、約 6.0 L / ヘクタール、約 7.0 L / ヘクタール、約 8.0 L / ヘクタール、約 8.5 L / ヘクタール、約 9.0 L / ヘクタール、および約 10.0 L / ヘクタール以上の各速度を利用してよい。

10

20

#### 【0250】

別の態様では、本発明は、一つ以上の植物病原性昆虫を制御する方法を提供するものであり、該方法は、ここに記載される脂質を植物またはその周囲に塗布することを備えている。

#### 【0251】

一実施形態ではここで例証されるように、塗布は、ここに記載される一つ以上の他の昆虫病原真菌と共に、1種以上の脂質画分を塗布するものである。

#### 【0252】

好ましくは、前記1つ以上の他の菌類は、B. バシアナ株 K4B3 (NMIA 受託番号 V08 / 025855) またはこれらの識別特性を有する株；ラカニシリウムマスカリウム株 K4V1 (NMIA 受託番号 NM05 / 44593) またはこれらの識別特性を有する株；ラカニシリウムマスカリウム株 K4V2 (NMIA 受託番号 NM05 / 44594) またはこれらの識別特性を有する株；ラカニシリウムマスカリウム株 K4V4 (NMIA 受託番号 NM06 / 00007) またはこれらの識別特性を有する株；ポーベリア・バシアーナ株 K4B1 (NMIA 受託番号 NM05 / 44595) またはこれらの識別特性を有する株；ポーベリア・バシアーナ株 K4B2 (NMIA 受託番号 NM06 / 00010) またはこれらの識別特性を有する株；ラカニシリウムロンギスボラム株 KT4L1 (NMIA 受託番号 NM06 / 00009) またはこれらの識別特性を有する株；およびベシロマイセスフモソロセウス株 K4P1 (NMIA 受託番号 NM06 / 00008) またはこれらの識別特性を有する株から成る群より選択される。

30

40

#### 【0253】

再び、本発明の複数の脂質が、一つ以上の植物病原性昆虫化学種に対する活性による昆虫病原真菌の複数の株と共に、調節プロセスに使用されてもよい。

#### 【0254】

若い苗は、典型的には、昆虫害虫からの損傷に最も影響されやすい。したがって、新たに植えられた作物への本発明の組成物の発芽前塗布は、出芽における塗布であるように意図される。

#### 【0255】

50

作物サイクル中に、同一または異なる時間で塗布を繰り返すことも意図される。本発明の殺虫脂質においては、本発明の殺虫脂質を備えている組成物が、季節の後または前に、塗布されてもよい。これは、開花または結実の間にわたって行ってもよい。本発明の殺虫脂質または本発明の殺虫脂質を備えている組成物を、収穫前または収穫後直ちに塗布して、迅速に壊死し老化した葉、果物、葉柄、機械採取した茎等にコロニーを作り、昆虫コロニー化を防止することができる。また、本発明の殺虫脂質または本発明の組成物は、冬の休眠中の植物に塗布することにより、休眠組織の昆虫の成長を遅くすることもできる。

【0256】

塗布は、芽破裂の前後および収穫の前後と同時であってもよい。しかしながら、処理は開花と収穫との間に行われることが好ましい。効力を高めるため、本発明の殺虫脂質または本発明の組成物の複数の塗布（例えば、開花と結実との間に2～6回の塗布）が好適である。

10

【0257】

また、雨の後は、本発明の殺虫脂質または組成物の再塗布を考慮する必要がある。また、昆虫感染性予言モデルまたは感染症分析データを用いて、昆虫感染症のリスク期間に合わせることができるよう、BCAの塗布を考慮することもできる。

【0258】

各種例示的な実施形態では、本発明の脂質およびこの脂質を備えている組成物は、殺虫の効力を実現することでできる投与率で塗布される植物または植物周囲には有害でない。

【0259】

20

現在好ましい実施形態では、本発明の殺虫脂質または同じものを備えている組成物が、例えば先に述べたように、加圧された噴霧器を用いて、溶液として塗布される。理想的には確実に全部をカバー出来るよう、植物部分は、流れ出る直前まで軽くスプレーされなければならない。塗布は、植物および/またはその周囲のあらゆる部分に行われてもよく、例えば植物草冠全体、花および発育中の果物が集中される草冠エリア、または、根、塊茎またはその種の他のものに隣接しまたはその周囲の植物葉柄および/または土、水または成長培地等である。

【0260】

組成物は安定であることが好ましい。本明細書で使用される用語「安定な」は、数週間、殺虫効力を維持可能な組成物のことをいい、好ましくは約1ヶ月、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、好ましくは5ヶ月、より好ましくは少なくとも約6ヶ月以上安定である。好ましくは、組成物は、例えば冷凍または凍結等の特殊な条件下で、貯蔵に関する処置無しで安定である。

30

【0261】

塗布された組成物は、植物病原性昆虫を防除する。植物病原性昆虫は、収穫前後の疾患の多くの原因であり、植物部分を攻撃しておよび成長速度、開花、結実、生成を低減し、罹患した植物の死を引き起こすこともある。ここで用いられる例では、植物病原性昆虫は、自身が植物への病原体である昆虫を含み、また、他の植物病原体ベクターとして作動することができる昆虫も含み、例えば、植物病原性真菌およびバクテリアが挙げられる。他の植物生病原生物ベクターとして作動する宿主昆虫を防除することによって、植物疾患の発生率および/または重症度を最小にすることができることが理解されよう。

40

【0262】

ニュージーランドで生育する多数の重要な園芸の作物を悩ます主要な植物病原性昆虫の実施例を、以下の表1に示す。

【0263】

【表 1】

## 主要な昆虫害虫

作物	栽培家番号	植栽面積 (ha)	主要な害虫
サクラ		550	アブラムシ
ジャガイモ	321	10,611	アブラムシ、コナジラミ
トマト (屋内)	390	167	コナジラミ、イモムシ
アブラナ	227	3,746	コナジラミ、イモムシ
カボチャ	181	6,560	コナジラミ、アブラムシ
タマリコ	175	270	コナジラミ、アブラムシ
イチゴ	125	361	アブラムシ、アザミウマ
キュウリ (屋内)		55	アブラムシ、アザミウマ、コナジラミ
タマネギ	150	5,488	アザミウマ
トマト (屋外)	80	609	コナジラミ、イモムシ、アザミウマ
トウガラシ	142	87	アザミウマ、アブラムシ、コナジラミ、イモムシ
レタス	252	1,287	アブラムシ、アザミウマ
カボチャ	125	1,033	コナジラミ、アブラムシ

10

20

## 【0264】

本発明の脂質、組成物および方法を用いて、上で概説する作物中に含まれるコナジラミ科、アザミウマ類、アブラムシおよびキャタピラ等の半翅類を防除することが、特に意図される。本発明の脂質を用いて、バロアダニを、単独でまたは一つ以上のB、バシアナ菌類株またはL、マスカリウムまたはペシロマイセスフモソロセウスと共に、防除すること、および同じものを備える本発明の組成物を用いた場合が、特に意図される。

## 【0265】

本発明の方法は、収穫前後いずれにおいても、植物および植物製品に特に塗布される。例えば、本発明の組成物は、果物、野菜、切り花およびシードを含む上方に列挙した種類の保存製品に塗布されてもよい。適切な応用技術は、上記で言及した技術、特に噴霧をカバーする。

30

## 【0266】

植物への直接の塗布とは反対に、組成物を用いて、土またはシードを処理または前処理することができる可能性がある。組成物は、保護コーティング、ボックスおよび包装紙等の植物処理材料に使用してもよい。

## 【0267】

また、本発明の脂質または本発明の組成物で直接に処理される植物、植物製品、土およびシードが、本発明によってカバーされる。

40

## 【0268】

本発明は、前述のことを備え、また、例示目的のみでありこれらの範囲を制限するものではない以下の構造が予想される。

## 【0269】

## 実施例1 昆虫防除のバイオアッセイ

この実施例では、各種脂質の殺虫の効力を決定するための確固としたバイオアッセイの開発を記載する。

## 【0270】

ターゲット昆虫アッセイが開発され、1) 利用度、2) 罹病性および3) 使いやすさの基準を用いて評価した。

50

## 【0271】

一定の温度の部屋内でキャベツ植物により育てられたターゲット昆虫、アブラムシ（モモアカアブラムシ、順半翅類）を、全ての実験に用いた。アブラムシに脂質画分サンプルを接種するため、アブラムシは、1%の水寒天平板の表面上のキャベツ葉の部分へ移され、葉と寒天の間の湿潤剤として0.05%のトゥイーン80を用いた。混合された年令のアブラムシを用い、通常30～50個/ペトリ皿であった。

## 【0272】

携帯型のパアシェエアブラシを改良して、マイクロ容量を取り、300  $\mu$ lの試験または対照溶液を霧化した。その後、処理されたアブラムシのプレートは、20で12h光を当てて維持し、12h暗状態とし、毎日検査した。死んだ個体は除去した。噴霧の後に、接種されるアブラムシを直接カウントして、%死亡率に生まれたてのアブラムシを含むことを回避したが、孵卵の間の新生若虫を除去するための策は講じなかった。

10

## 【0273】

## 実施例2 昆虫防除のバイオアッセイ

この実施例は、殺虫の効力を決定するため、バイオアッセイの範囲を広げる開発を記載する。

## 【0274】

数個のターゲット昆虫アッセイが開発され、1)利用度、2)罹病性および3)使いやすさの基準を用いて評価した。コナジラミ、コナガ、ゴミムシダマシおよび蚊の4つの昆虫システムをテストした。

20

## 【0275】

## 1.コナジラミ若虫（半翅類）

コナジラミは主要なターゲット生物種であり、現在適切な制御剤を欠いている。コナジラミ若虫は、バイオフィース社（オークランド、ニュージーランド）から得られた。K4B3脂質画分および対照ブローのサンプルを用いて、ポッタータワーを通して約100の若虫群に接種した。

## 【0276】

## 2.ミールワーム（ゴミムシダマシ）幼虫（鞘翅類）

ゴミムシダマシ幼虫は、生物供給者から得られる。10匹の幼虫にK4B3脂質サンプルまたは水対照がスプレー、2週間モニターされた。

30

## 【0277】

3.コナガ-DBM（コナガ: *Plutella xylostella*）幼虫（鱗翅類）

コナガは、世界中のアブラナ作物および最も多くの防除用化学薬品に耐性を示すようになった昆虫の主要な害虫である。培養株は、試験用K4B3脂質サンプルでリンカーン大学から得られる。

## 【0278】

標準方法では、ポッタータワーの小型版を用いる。携帯型のA320エアブラシを改造して、マイクロ容量をとり、脂質サンプルまたは対照溶液を霧化する。幼虫は、0.05%のトゥイーン80を用いて、水寒天平板（水+1%の寒天）の表面上に保持された小さいキャベツ葉上に維持される。全てのサイズ（第1齢から前蛹）の5～20匹の幼虫が、各実験で用いられる。一つの試験では、幼虫はまた、溶液の滴下で浸される。毒性が局所的または経口摂取か否かを決定するため、液滴供給が試みられる。

40

## 【0279】

38匹の第2～第6齢の幼虫が、K4B3脂質画分中および対照中に接種される。幼虫は、16h1で20に維持され、植菌の後8hD維持される。

## 【0280】

## 4.蚊幼虫（ボウフラ）

バイオアッセイが行われ、異なる量のK4B3脂質画分が、イエカ（*Culex perviligan*）の幼虫を含む約12.5mlの水ボトルに加わられる。幼虫は蛹化に近づき、一部は実験中に蛹化してもよい。

50

## 【0281】

## 実施例3 殺虫脂質の同定

## 序論

この実施例では、ボーベリア・バシアーナ K4B3 から調製される殺虫脂質の同定を説明する。

## 【0282】

## 方法

ボーベリア・バシアーナ K4B3 の培養株は、振盪フラスコ内および 200 L のバイオ発酵用容器内で成長した。凍結乾燥したサンプルを、メタノールで抽出し、乾燥した。残留物を 50 % エチルアルコール中に溶解し、ジクロロメタンで抽出した。望まない共抽出物を除去するため、ジクロロメタンを水で洗浄した。残存しているジクロロメタンエキストラクトの少ない方の部分を、乾燥し、メタノール中で再溶解し、MS 分析を行った。

## 【0283】

分画は、スタトラ S I - 1 シリカカラム (フェノメネックス社) で実行した。生のサンプルは、小容積のジクロロメタンに溶解し、シリカカートリッジ上に装てんし、イソプロパノールおよびジクロロメタンの混合液で溶出 (数回のステップで 100 % のジクロロメタンから 100 % のイソプロパノールへ) し、次いで、メタノールおよびジクロロメタンの混合液で溶出した (数回のステップ数回のステップで 100 % のジクロロメタンから 100 % のメタノールへ)。

## 【0284】

ウォーターズアキュイティ UPLC (ウォーターズ社、ミルフォード、MA) を、ウォーターズ-マイクロマスケイトロプレミエトリブル四重極分光装置 (ウォーターズ-マイクロマス社、マンチェスター、英国) に接続した。40 でアキュイティ C18 BEH1, 7  $\mu$ m カラム 50  $\times$  1 mm を用い、分離を実現した。カラムは、それぞれ 0.1 % の蟻酸を含む水 (A) およびアセトニトリル (B) 可動相で、0.25 の mL / 分で溶出された。最初の組成物は、1 分、100 % の A であり、その後、1 ~ 7 分、100 % の B に対して直線勾配になり、7 ~ 9 分、100 % の B に保たれ、9 ~ 11 分、最終的に、カラムは 100 % の A に再平衡された。

## 【0285】

電気スプレーイオン化ソースを、ポジティブモードで、100 、キャピラリー 3 kV 、コーン 60 V、窒素脱溶媒和 200 L / h (250 °C)、コーンガス 50 L / h で運転され、コリジョンセルは、3 mbar アルゴンで駆動した。プロトン化分子カチオンからのドータイオンスペクトルは、40 eV の衝突エネルギー (CE) を用いて取得された。定量分析 (絶対でなく、引用文献参照サンプルに対して相対的) では、選択的イオン記録 (SIR) および複数の反応モニター (MRM) を用いた。ピーク面積を、参照サンプルから得られるそれらと比較した。

## 【0286】

## 結果

第1のメタノール/ジクロロメタン分画ステップ中、ベタイン脂質が、20 ~ 40 % メタノールと 60 ~ 80 % ジクロロメタンの混合液でシリカカラムから溶出された。有機溶媒抽出された画分のクロマトグラフィーが、図1に示され、例示的な当該着目脂質を備えるピークを見ることができる。

## 【0287】

当該着目画分は、マススペクトル分析 (MS) を用いて分析された。着目ピークは、MS / MS (フラグメンテーション解析) のために選択された。図2から分かるように、736、738、760、762、764 および 766 の m / z による6つの脂質が観察された。

## 【0288】

更に分析を行い、各脂質の構造を解像した。762.5 m / z を有する例示的な脂質の代表的なドータイオンスペクトルが、図3に示される。ここで C18 のアシル部分の損失: 2

10

20

30

40

50



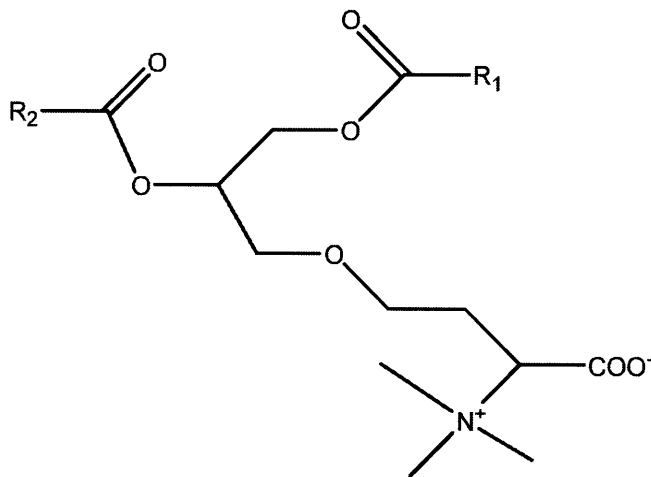
つの脂肪酸が、 $m/z$  500.3で見られ、C18のアシル部分の損失：1つの脂肪酸が、 $m/z$  498.3で見ることができる。水分子の以降の損失は、 $m/z$  482.2および480.4に顕性である。両方の脂肪酸の損失が $m/z$  236.1で示された後、共通のグリセリル-N,N,N-トリメチルホモセリンフラグメントが生成した。グリセリンの以降の損失が、 $m/z$  162.0で観察されるピークが形成された。

【0289】

また、5つの残存する例示的な脂質の当量分析を実行し、以下の式IIで示されるように、式IIの全体的な構造を有するよう、例示的な殺虫脂質は、この分析によって決定された。

10

【化3】



20

式II

式中、RおよびR2は、各脂肪酸の脂肪部分である。

30

【0290】

この実施例で決定される具体的な例示的なベタイン脂質の脂肪酸構成を、下記表2に示す。

【0291】

【表2】

ベタイン脂質中の脂肪酸

M+H	脂肪酸A	脂肪酸B
736	C16:0	C18:2
738	C16:0	C18:1
760	C18:2	C18:2
762	C18:2	C18:1
764A	C18:2	C18:0
764B	C18:1	C18:1
766	C18:1	C18:0

40

【0292】

764Aおよび764Bの存在証明は、碎片分離データから得られた。M+H764は、C18:2脂肪酸と同様に、764の親脂質からC18:0、C18:1の初期損失を

50

示す。

【0293】

バイオ発酵用容器で成長中に異なる時点で生成される各種ベタイン脂質の相対的な量が、図4に示される。図から明らかなように、48時間の成長によって脂質760は優れたベタイン脂質となり、また48時間が、試験時のベタイン脂質生成のピークを表す。

【0294】

検討

この実施例は、ボーベリア・バシアーナK4B3からの例示的な殺虫脂質の構造を解明し、生体制御化合物の新規の型式を提供する。

【0295】

実施例4 殺虫脂質の同定

序論

この実施例では、ボーベリア・バシアーナK4B3から調製される殺虫脂質の同定を記載する。

【0296】

方法

ボーベリア・バシアーナK4B3の培養株は、振盪フラスコ内および200Lのバイオ発酵用容器内で成長した。凍結乾燥したサンプルを、メタノールで抽出し、乾燥した。

【0297】

乾燥したメタノール抽出物(81.936 g)を、音波処理を用いて、水(450 ml)およびメタノール(1 L)中に再溶解した。クロロホルム(500 ml)を混合液に加え、単一相の溶液を与え、これは等しく970 mlの2つの部分に分割された。各部分は、クロロホルム(250 ml)および水(225 ml)を加えて別々に振とうされ、そしてその後、それらは有機相および水相に分かれた。組み合わせられた水相(1820 ml)は、2つの等しい部分に分割され、次いで、これらのそれぞれは、クロロホルム(250 ml)を加えて振とうされた。得られた有機層にバルク有機層(990 ml)を加える一方、水層の2つの部分は、乾燥凍結の前に再結合されてブッチ回転乾燥機で濃縮された。乾燥した水層(74.764 g、収率91.2%)は、次いで-20の冷凍装置で保存された。

【0298】

複合有機相から減圧下で溶媒を除去し、2.728 g(3.3%収率)のクロロホルム抽出物を提供し、これは50 mlのクロロホルム中に再溶解され-20の冷凍装置で保存された。

【0299】

まず、DEAE-セファデックス(22.5 g)を、クロロホルム-メタノール0.8 M酢酸ナトリウム(30:60:8)と平衡させ、それから、クロロホルム-メタノール水(30:60:8)で洗浄した。ビューブラストクロロホルム抽出物(2.706 g)を、クロロホルム-メタノール水(30:60:8)中で、DEAE-セファデックスカラムに装てんし、担持しない分(非酸性画分)を、同一溶媒で溶出した。次いで酸性画分を、クロロホルム-メタノール0.8のM酢酸ナトリウム(30:60:8)で溶出した。

【0300】

各画分は、小体積に別々に濃縮され、クロロホルムおよび0.88%の塩化カリウム溶液で振盪した。分離に続いて、ろ過し減圧下の乾燥状態で濃縮する前に、各画分からの下側の有機相は、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。非酸性画分の収率は、1.308 g(48.4%)であり、酸性画分について0.072 g(2.7%)であった。各画分はクロロホルム中に溶解し、-20の冷凍装置で保存された。

【0301】

非酸性画分(1.29 g)の順相クロマトグラフィーを、クロロホルム中に自己充填したシリカゲル60(BDH、120のメッシュ、121.5 g)のカラムの上で実行した。サンプルをクロロホルム中で装てんし、クロロホルム、クロロホルム-アセトン(9:

10

20

30

40

50

1) で溶出し、最後にメタノール(それぞれ～7.8層容積)で溶出した。減圧下での乾燥状態への各小画分の蒸発の後、3つの小画分の収率は、以下の通りであった：クロロホルムサブ分画 0.609 g (47.2%)；クロロホルム-アセトンサブ分画 0.142 g (11.0%)；およびメタノールサブ分画 0.508 g (39.4%)。各サブ分画は、クロロホルム中に溶解され、20℃の冷凍装置で保存された。

#### 【0302】

ナノスプレースペクトル分析(MS)が、QSTARパルサーj Q-TOFマスマススペクトロメーターで実行された。分析の前に、サンプルは、10 mM 酢酸アンモニウムを含む1:1クロロホルム-メタノールで、1:20に希釈された。

#### 【0303】

##### 結果

ナノスプレーMS/MS(フラグメンテーション解析)を実行し、メタノール小分画中に存在する化合物の構造を解像した。 $m/z$ が736.6、738.6、758.6、760.6、762.6および764.6の7つのベタイン脂質を観察した。

これらのベタイン脂質の脂肪酸構成を、下記表3に示す。

表3：ベタイン脂質中の脂肪酸

#### 【0304】

##### 【表3】

表3：ベタイン脂質中の脂肪酸

$m/z$	脂肪酸A	脂肪酸B
736.6	C16:0	C18:2
738.6	C16:0	C18:1
758.6	C18:2	C18:3
760.6	C18:0	C18:2
762.6	C18:0	C18:2
764.6	C18:0	C18:2
764.6	C18:1	C18:1

#### 【0305】

##### 検討

この実施例は、ボーベリア・バシアーナK4B3から例示的な殺虫脂質の構造を解明し、生体制御化合物の新規の型式を提供する。

#### 【0306】

##### 実施例5 殺虫脂質のバイオアッセイ

##### 序論

この実施例では、異なる時間点でボーベリア・バシアーナK4B3から調製される殺虫脂質の評価を説明する。

#### 【0307】

##### 方法

ボーベリア・バシアーナK4B3の培養株は、振盪フラスコ内および上記のバイオ発酵用容器内で成長した。16gのサンプルを、10日にわたって、各24時間の時間点で抽出し、脂質を上記のようにメタノールで抽出した。上記の実施例1および2に記載されるバイオアッセイ中の評価に先立ち、1.28 mlの $H_2O$ 中で全強度(FS)を、および0.2 mlのFSを0.8 mlで $H_2O$ で希釈することによって1:5希釈物(1:5)を、再構成する前に、全てのサンプルを乾燥凍結した。手短に言えば、各サンプル300  $\mu$ lを、40個のアブラムシの上にスプレーした。4つのネガティブ対照( $H_2O$ のみ)を、アッセイの中を含めた。

## 【 0 3 0 8 】

## 結果

下の表 4 は、各種処理群の中でアブラムシ死亡率を示しているデータを提示する。

## 【表 4】

表 4 アブラムシ死亡率のバイオアッセイ

処理	2 4 時間での観測						平均 (%)
	複製 1			複製 2			
	死	生	複製 1 (%)	死	生	複製 2 (%)	
D1 FS	23	19	55	29	21	58	56
D1 1:5	8	27	23	5	43	10	17
D2 FS	40	5	89	40	0	100	94
D2 1:5	0	32	0	5	40	11	6
D3 FS	40	0	100	40	0	100	100
D3 1:5	11	35	24	13	36	27	25
D4 FS	40	0	100	40	0	100	100
D4 1:5	16	16	50	27	8	77	64
D5 FS	40	0	100	40	2	95	98
D5 1:5	14	31	31	24	19	56	43
D6 FS	40	0	100	40	0	100	100
D6 1:5	6	17	26	42	24	64	45
D7 FS	40	0	100	40	0	100	100
D7 1:5	3	22	12	5	19	21	16
D8 FS	40	0	100	40	0	100	100
D8 1:5	6	17	26	19	21	48	37
D9 FS	40	0	100	40	0	100	100
D9 1:5	5	28	15	0	40	0	8
D10 FS	47	2	96	40	2	95	96
D10 1:5	4	40	9	0	40	0	5
H20	2	40	5	0	40	0	2
H20	0	40	0	0	40	0	0

## 【 0 3 0 9 】

## 結果

表 4 から分かるように、全ての全強度サンプル（すなわち、10 日の各日）がアブラムシを殺虫した。1 日～5 日でサンプルにより殺虫されたアブラムシは、非常に乾燥していたが、5 日～10 日でサンプルにより殺虫されたアブラムシは、あまり乾燥していなかった。

## 【 0 3 1 0 】

## 検討

この実施例は、殺虫脂質が成長中に迅速に生成され、殺虫活性の生成が長期に維持されることを示す。繰り返すと、抽出された脂質は、有力な殺虫の活性を有し、典型的には全強度でターゲット昆虫 100 % を殺し、これよりも希釈すると、約 50 % のターゲット昆虫を頻繁に殺す。

## 【 0 3 1 1 】

## 実施例 6 殺虫脂質のバイオアッセイ

## 序論

この実施例では、ボーベリア・バシアーナ K 4 B 3 から調製される殺虫脂質の評価を説明する。

## 【 0 3 1 2 】

## 方法

ボーベリア・バシアーナ K 4 B 3 からの脂質画分は、上記のように 5 0 % メタノール : 5 0 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で抽出された。バイオアッセイ中の評価に先立ち、全強度 ( F S ) を、および 1 : 5 希釈物 ( 1 : 5 ) を、再構成する前に、全てのサンプルを乾燥凍結した。手短に言えば、各サンプル 2 0  $\mu\text{l}$  を、蚊 ( イエカ : *Culex perviligan* ) の幼虫に投与した。また、ネガティブ対照 ( MeOH のみ ) およびポジティブ対照 ( S I I ) を、アッセイ中に含めた。死亡率は、曝露後 2 3 時間および 4 8 時間で評価した。

10

## 【 0 3 1 3 】

## 結果

以下の表 5 は、各種処理群中で蚊の死亡率を示すデータである。

## 【 0 3 1 4 】

## 【 表 5 】

蚊幼虫 ( ボウフラ ) 死亡率のバイオアッセー

処理	死亡率					
	2 3 時間			4 8 時間		
	死	生	2 3 時間 (%)	死	生	4 8 時間 (%)
S1	0	10	0	3	7	30
S2	2	8	20	4	6	40
S3	4	6	40	5	5	50
S4	2	8	20	3	7	30
S5	6	4	60	8	2	80
S6	3	7	30	5	5	50
S7	4	6	40	6	4	60
S8	6	4	60	8	2	80
S3 1:5	2	8	20	8	2	80
S3 1:10	2	6	25	5	3	73
S4 1:5	4	6	40	8	2	71
S4 1:10	2	7	22	3	6	57
S5 1:5	4	6	40	7	3	50
S5 1:10	3	5	38	7	1	88
MeOH	33	10	23	4	9	44
S11	6	1	86	6	1	80

20

30

40

## 【 0 3 1 5 】

## 結果

表 5 から分かるように、希釈した場合であっても、画分 S 5 および S 8 が特に、蚊幼虫 ( ボウフラ ) の顕著な死滅を示した。

## 【 0 3 1 6 】

## 解説

この実施例は、本発明の殺虫脂質は有力な殺虫の活性を有し、広範囲にわたるターゲット昆虫生物種を殺すことを示す。

## 【 0 3 1 7 】

50

## 実施例 7 哺乳動物モデルに対するボーベリア・バシアーナ K 4 B 3 脂質の毒性 序論

この実施例は、哺乳動物モデルにおける K 4 B 3 脂質の毒性の評価を記載する。

### 【0318】

#### 方法

K 4 B 3 脂質は、実施例 1 で上記のように単離する。

試験は、OECD ガイドライン 425 によって（急性経口毒性-上下手順で）マウスに行われる。この材料は、有毒が高いと予想されないため、経口用挿管法による 2,000 mg/kg 単一服用レベルによる境界試験を選択する。このドーズは、例外的な状況以外で、急性毒性の評価 OECD によって推奨される最高のものである。

10

### 【0319】

次のように、経口用挿管法により、K 4 B 3 脂質の単一 2,000 mg/kg のドーズを、5 体のメスのスィスマウスに投与する。

### 【0320】

#### 試験条件

午後 4 時頃に、マウスうちの一体からエサを回収し、その体重を測定する。翌朝、そのマウスの体重を測定し、2,000 mg/kg ドーズの提供に必要な K 4 B 3 脂質の重量を計算する。この量を秤量し、150 µL の水で希釈する。全容量を、強制栄養によってマウスに投与する。

### 【0321】

投与後、マウスは即座に、エサの摂食を許される。マウスは OECD 化学薬品試験ガイドライン、2000 年 10 月、修正ドラフトガイドライン 425 で特定される方法で投与後、60 分集中的に観察し、その後、投与日およびそれ以降の日を通して一日数回の間隔で観察した。第 2 のマウスは、第 1 のマウスの後、48 時間、また 2,000 mg/kg 体重の用量で K 4 B 4 ポリペチドを投与される。次いで、第 3、第 4 および第 5 のマウスは、48 時間の間隔で、全て 2,000 mg/kg が投与される。

20

### 【0322】

マウスは各個に、自由摂取の水および食品と共に収容される（投与前の一夜絶食を除く）。マウスは、毎日観察され、2 週間、投与後の体重の測定がなされる。体重は、ドーズ後 1 日、1 週および 2 週で記録され、その後、動物を二酸化炭素吸入で殺し、死亡後検査を行う。

30

### 【0323】

#### 結果

K 4 B 3 複合体の投与後の毒作用はなく、マウスは観察期間を通して健康のままであり、ドーズ直後にエサも食べ、ドーズ日の間および実験を通して、普通に振る舞っていた結果から、毒性を示さない。

### 【0324】

体重。実験を通して各時間間隔でマウスの平均体重が不変であることを示す結果から、毒性は示さない。一夜絶食の後、マウスは典型的には、平均して、体重から 2.4 グラム失っていた。食品の摂取が次の投与後に回復してこの損失が次の日に大きく回復した状況およびマウスが投与後 2 週の観察期間を通してその重量を維持する状況から、毒性は示されない。

40

### 【0325】

事実の検討と発見。屍検でマウスに異常状態が観察されない結果および肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺およびマウスの小腸（肛門への幽門）の重量は、それらの正常な範囲内にある結果から、毒性は示さない。

### 【0326】

#### 検討

K 4 B 3 脂質を 2,000 mg/kg の用量でのマウスへ経口投与しても、識別できる副作用を引き起こさないことを示す結果および死亡が生じず、異常状態が屍検で発見され

50

ず、器官重量が正常な範囲内にあり、マウスの行動は完全に正常であることを示す結果は、低い急性毒性を示す。

【0327】

この結果は、2,000mg/kg体重より大きなLD50でも、K4B3脂質は低い急性の経口毒性を示している。この結果は、K4B3脂質は、ニュージーランド危険物質および新規生物体(HSN0)規制1996の下でも、最も低い危険カテゴリーに分類されることを示している。

【0328】

産業上の利用可能性

上記の説明から明らかなように、本発明は、植物病原性昆虫等の昆虫の防除に使用可能な前記脂質を備えている組成物と共に、糸状菌からの殺虫脂質を提供する。

この脂質および脂質画分の使用ならびに植物病原性昆虫等の昆虫を防除する方法が、提供される。本発明の脂質および組成物は、広範囲にわたる農業のおよび園芸の用途に効用を有する。

【0329】

その一部を詳細に実例として、また明瞭さの目的と理解される実施例として、本発明を詳細に説明してきたが、本発明の範囲またはこれらのあらゆる具体的な実施形態に影響を及ぼすことなく、条件配合および他のパラメータの広く同等な範囲内で、本発明を変更または変形することにより、同じものを実行することができることが当業者にとって明らかであり、この変更または変形は、添付の請求項の範囲内でカバーされるものである。

【0330】

ここで特定の例証されたもの以外の出発原料、試薬、精製法、材料、基板、デバイス素子、分析法、アッセイ方法、混合液および構成部分の組合せは、過度の実験に頼らずに本発明の実行の中に使用されることができ、当業者に理解されよう。この材料および方法において、全ての従来技術に既知の機能的に同等なものが、本発明の中に含まれるものである。ここに用いた用語および表現は、説明のためであり限定する意図はなく、この用語および表現の使用が、ここに示され記載される特徴のあらゆる同等物およびその一部を排除することを意図するものではなく、各種変更は、主張される本発明の範囲内で可能であることが認識されよう。したがって、好適な具体例および随意の特徴によって、本発明を具体的に開示してきたが、ここで開示されるコンセプトの変更および変形は、当業者によって行うことができ、添付の請求項によって定義されるように、この変更および変異は本発明の範囲内であるとみなされることが理解されなければならない。

【0331】

ここで用いられる例では、「備える」は、「含む」および「含有する」または「～を特徴とする」と同義であり、これは含有的であり両端を含み、および、付加的で記載されない素子または方法ステップを排除しない。ここで用いられる例では、「～から成る」は、請求項で特定されないあらゆる要素、ステップまたは構成成分を排除する。ここで用いられる例では、「～から実質的に成る」は、請求項の基礎的かつ新規な特性に対して、物質的に影響を及ぼさない材料またはステップを排除しない。各場合、用語「備える」、「実質的に成る」および「成る」のいずれかは、他の2つの語のいずれでも置換されてもよい。

【0332】

材料、組成物、構成部分または化合物の群がここに開示される場合、これらの群および小グループの全ての個々のメンバーが別々に開示されることが理解される。マーカッシュグループまたは他の方式がここで用いられる場合、グループの全て個々のメンバーおよび全ての組合せグループで可能な小組合せが開示の中に各個に含まれるものである。ここで記載または例証される構成部分のあらゆる配合または組合せは、特に明記しない限り、本発明の実施に用いることができる。範囲が明細書の中に与えられる場合、例えば、温度範囲、時間範囲または組成物範囲、全て中間の範囲および部分範囲、および、与えられる範囲に含まれる全ての個々の値は全て、本開示に含まれるものである。本開示および請求項

において、「および/または」は、付加または選択を意味する。さらに、単数の用語のあらゆる使用は、複数の形態をカバーする。

【 0 3 3 3 】

ここに引用される全て引用文献の全体は、この明細書の開示と不一致でない限度において、参照によりここに援用される。ここで提供される一部の引用文献は、参照によりここに援用され、本発明の出発原料、付加的な出発原料、付加的な試薬、合成の付加的な方法、分析の付加的な方法、付加的な生物物質、付加的な核酸、化学的変性した核酸、付加的な細胞のソースおよび付加的な使用を、詳細に提供する。ここで用いられる全て見出し項目は、便宜のためだけに与えられるものである。明細書の中に説明される全ての特許および公表事項は、本発明に関する当業者の熟練のレベルを示し、各個々の公表、特許または特許出願は、参照によりここに援用されることが具体的かつ個別的に示される限度で、参照によりここに援用される。ここで引用される引用文献の全部が、それらの公表または出願日現在の技術を示すものとして参照によりここに援用され、先行技術の具体的な実施形態を排除するために必要であるならば、その情報はここに使用することができる。

10

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 3 3 4 】

【 非特許文献 1 】 Anis, A.I.M.; Brennan, P. 1982 Susceptibility of different populations of glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*, Westwood to a range of chemical insecticides. Faculty of General Agriculture University College of Dublin, Research report 1980-1981: 55.

20

【 非特許文献 2 】 Elhag, E.A.; Horn, D.J. 1983 Resistance of greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in selected Ohio greenhouses. Journal of Economic Entomology 76: 945-948.

【 非特許文献 3 】 Georghiou, G.P. 1981 The occurrence of resistance to pesticides in arthropods, an index of cases reported through 1980. FAO of UN, Rome 1981. 172 p.

【 非特許文献 4 】 Gorman, K.; Devine, G.J.; Denholm, I. 2000 Status of pesticide resistance in UK populations of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, and the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. The BCPC Conference: Pests and diseases: 1 : 459-464

30

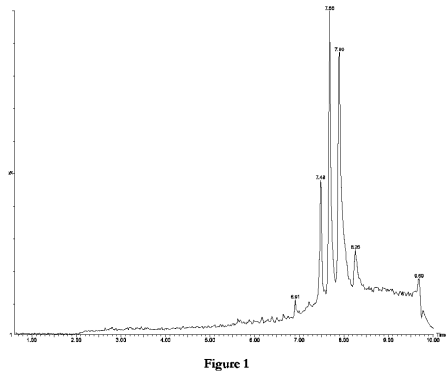
【 非特許文献 5 】 Grossman, J. 1994 Onion thrips. IPM Practitioner. 16(4): 12-13

【 非特許文献 6 】 Hommes, M. 1986 Insecticide resistance in greenhouse whitefly { *Trialeurodes vaporariorum*, Westw.) to synthetic pyrethroids. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft 232: 376.

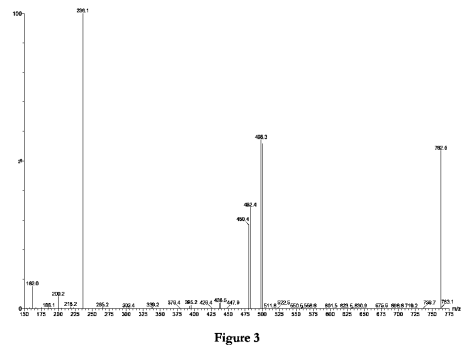
【 非特許文献 7 】 OECD 1998: Guidelines for the Testing of Chemicals, www.oecd.org Wardlaw, L.R. 1985 Pyrethroid resistance in glasshouse whitefly { *Trialeurodes vaporariorum*, Westw. }. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijks universiteit, Gent 50 (2b): 164-165.



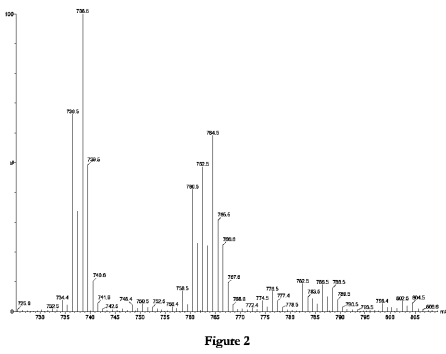
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/IB2012/054483</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C07C 229/22 (2006.01) A01H 15/00 (2006.01) A01N 37/44 (2006.01) A01N 63/04 (2006.01) C07C 227/40 (2006.01) C12N 1/14 (2006.01)</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
STN Registry, Caplus: Structure Search based on compounds of formula (I); EPODOC, WPI: Keyword Search based on Beauveria Bassiana, Lecanicillium Muscarium, Lecanicillium Longisporum, Verticillium Lecanii, Paecilomyces Fumoso roseus, Isaria Fumoso rosea, Spicaria W Fumoso rosea and insecticidal.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 January 2013		Date of mailing of the international search report 18 January 2013
<b>Name and mailing address of the ISA/AU</b>  AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999		<b>Authorised officer</b>  Tina Bryant AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 62837992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/IB2012/054483
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Zhang, X. et al., "Combined Genetic and Metabolic Manipulation of Lipids in <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Reveals Non-Phospholipid Substitutions in Fully Active Cytochrome c Oxidase", <i>Biochemistry</i> , 2011, Vol. 50, No. 19, pages 3891-3902. Published 08 April 2011. Page 3891 left column line 24 – right column line 4, page 3892 right column line 21 – page 3893 right column line 30, page 3898 left column lines 30-35, page 3899 Figure 4, page 3901 Table 3, Supporting Information.	1-3, 6, 24, 25, 28, 29, 40-42, 44, 50-52
X	Siddhanta, A. K. et al., "Nitrogenous glycerolipids from <i>Ulva fasciata</i> (Ulvaceae, Chlorophyta) of West Coast of India", <i>Journal of the Indian Chemical Society</i> , 2002, Vol. 79, No. 10, pages 843-845. Page 844 left column lines 33-34, page 844 left column line 36 – page 844 right column line 50, page 844 Figure.	1-4, 9, 12, 40-42, 44, 50-52
X	Kiet, T. T. et al., "New homoserine lipids from <i>Xerocomus langbianensis</i> ", <i>Journal of Basic Microbiology</i> , 2002, Vol. 42, No. 2, pages 133-136. Page 133 lines 21-33, page 134 Figure 1, page 135 lines 28-50.	1-3, 4, 7, 9, 11, 12, 14, 32, 33, 35, 40-42 44, 50-53
X	Vishwanath, B. S. et al., "Interaction of plant lipids with 14 kDa phospholipase A2 enzymes", <i>Biochemical Journal</i> , 1996, Vol. 320, No. 1, pages 93-99. Page 93 right column lines 18-21, page 94 left column lines 6-23, page 95 Table 1.	1, 2, 7, 35, 40-44, 50-52
X	Choudhury, M. K. "Synthesis of Ether Betaine Lipids: O4-(2,3-dipropionyloxypropyl)-N,N,N-trimethylhomoserine", <i>Journal of Chemical Research, Synopses</i> , 1995, Vol. 5, page 157. Page 157 Scheme.	1, 2, 40-42
X	Sato, N. et al., "Transition of lipid phase in aqueous dispersions of diacylglyceryltrimethylhomoserine", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 1991, Vol. 1082, No. 1, pages 108-111. Page 108 right column line 11 – page 109 left column line 17, page 109 Table 1.	1-5, 9, 16, 20, 40-42, 44, 50-52
X	Norman, H. A. et al., "Quantitative analysis of <i>Dunaliella salina</i> diacylglyceryltrimethylhomoserine and its individual molecular species by high performance liquid chromatography", <i>Plant Science</i> , 1985, Vol. 42, No. 2, pages 83-87. Page 83 right column line 20 – page 85 left column line 20, page 85 Table I.	1-9, 11, 16, 19, 24, 26, 32, 34, 35, 37-42, 44, 50-52
X	CAS Registry Number RN 1301213-40-0, STN Entry Date 26 May 2011. RN 1301213-40-0	1-3, 5, 6, 16, 17, 24, 28, 40-42
X	CAS Registry Number RN 100663-44-3, STN Entry Date 08 March 1996. RN 100663-44-3	1, 2, 4, 9, 40-42
X	WO 2010/044680 A1 (MILLENNIUM MICROBES LIMITED) 22 April 2010 Page 1 lines 3-9, page 3 lines 5-8, page 4 line 22 – page 5 line 10, page 7 lines 11-20, Page 16 lines 27-33, page 17 lines 23-26, page 19 lines 2-7, page 27 line 15 – page 28 line 23, page 29 line 26 – page 30 line 3, page 32 lines 13-16, page 32 lines 30-32, page 41 Table 2, Examples 2-6, Claims 1, 38-42, 45.	1-84
X	WO 2006/121350 A1 (MILLENNIUM MICROBES LIMITED) 16 November 2006 Page 16 lines 26-32, page 17 lines 26-29, page 19 lines 14-18, page 21 lines 4-7, page 26 lines 9-12, Claims 1-7, 10-14, 43, 45, 46 and 49.	68, 70-76
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/IB2012/054483
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pedrini, N. et al., "Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi", Plos Neglected Tropical Diseases, 2009, Vol. 3, No. 5, page e434(1-11). Page 1 Abstract, page 3 left column lines 15 – page 3 right column line 17, page 6 Table 4, page 7 Figure 2.	68, 71, 72, 74-76
P,X	Kind, T. et al., "Qualitative analysis of algal secretions with multiple mass spectrometric platforms", Journal of Chromatography A, 2012, Vol. 1244, pages 139-147. Published online 04 May 2012. Page 144 right column lines 8-12, page 145 Figure 6.	1-4, 7, 9, 11, 35, 40-44, 50-52
P,X	CN 102246824 A (ZHEJIANG SUB TROPICS CROP INST) 23 November 2011 Abstract, Examples 1-7, Claim 3.	68, 70-76

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.	
Information on patent family members		<b>PCT/IB2012/054483</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
WO 2010/044680 A1	22 Apr 2010	AU 2009304001 A1	22 Apr 2010
		CA 2756429 A1	22 Apr 2010
		CN 102341493 A	01 Feb 2012
		EP 2350261 A1	03 Aug 2011
		KR 20110084516 A	25 Jul 2011
		US 2011280839 A1	17 Nov 2011
		WO 2010044680 A1	22 Apr 2010
WO 2006/121350 A1	16 Nov 2006	NZ 539935 A	30 Apr 2008
		WO 2006121350 A1	16 Nov 2006
CN 102246824 A	23 Nov 2011	CN 102246824 A	23 Nov 2011
<b>End of Annex</b>			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72)発明者 スティーブン レイノルド フォード

ニュージーランド国, オークランド, フランクリン, ボンベイ, チャンパーレイン ロード 47

(72)発明者 トラビス ロベルト グレア

ニュージーランド国, 7608, リンカーン, ミルストリーム ドライブ 30

(72)発明者 コディー カルダー

ニュージーランド国, オークランド, フランクリン, ツアカウ, ブラウン ロード 32

(72)発明者 ロエロフ バン ギンケル

ニュージーランド国, 7152, ネルソン, アッパー モーテル, ネウドルフ ロード 817

Fターム(参考) 4B064 AD85 CA05 CE11 CE17 DA12

4B065 AA57X AC14 AC20 BD11 BD14 BD16 CA13 CA48