

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7601362号  
(P7601362)

(45)発行日 令和6年12月17日(2024.12.17)

(24)登録日 令和6年12月9日(2024.12.9)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	35/742 (2015.01)	A 6 1 K	35/742
A 6 1 K	35/74 (2015.01)	A 6 1 K	35/74
A 6 1 K	9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	9/19 (2006.01)	A 6 1 K	9/19

請求項の数 4 (全42頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-564903(P2019-564903)	(73)特許権者	505220170 ユニバーシティ オブ マサチューセッツ University of Mass a chusetts アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 0 8、ボストン ワン ピーコン ス トリート、サーティーファースト フロア
(86)(22)出願日	平成30年5月22日(2018.5.22)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(65)公表番号	特表2020-521744(P2020-521744 A)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(43)公表日	令和2年7月27日(2020.7.27)	(74)代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子
(86)国際出願番号	PCT/US2018/033962	(72)発明者	ラフィ・バン・アロイアン アメリカ合衆国 0 1 6 0 6 マサチューセ 最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO2018/217807		
(87)国際公開日	平成30年11月29日(2018.11.29)		
審査請求日	令和3年5月14日(2021.5.14)		
(31)優先権主張番号	62/510,081		
(32)優先日	平成29年5月23日(2017.5.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			

(54)【発明の名称】 純粋な駆虫組成物および関連する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含む医薬組成物を製造する方法であって、  
 ( a ) 単一種の殺線虫結晶タンパク質を発現するように遺伝子組換えされた芽胞不形成形態の宿主細菌を増殖させること；ここで、前記芽胞不形成宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される天然の生物活性殺線虫結晶を産生し、前記宿主細菌は増殖培地中で増殖される；  
 ( b ) 前記芽胞不形成宿主細菌を濃縮すること；  
 ( c ) 前記濃縮した芽胞不形成宿主細菌を、それを不活化するために、テルペン、ヘキサンまたはホルムアルデヒドを含む抗菌化合物に暴露すること；および  
 ( d ) 前記殺線虫結晶から、前記抗菌化合物、可溶性の細胞成分、脂質および細胞壁デブ  
 リを抽出するために、前記不活化された芽胞不形成宿主細菌に食用油を加えること  
 を含み、  
 前記宿主細菌が、前記天然の生物活性殺線虫結晶が前記細菌のサイトゾル中に捕らえら  
 れるように、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異を持つよう遺伝子組換えされたバチル  
 ス・チューリングシス ( Bacillus thuringiensis ) であり、ここで、芽胞形成の欠失を  
 もたらす前記遺伝子変異が、spo0A遺伝子の欠失または不活性化である、  
 方法。

【請求項 2】

前記宿主細菌が、前記単一種の殺線虫結晶タンパク質を芽胞不形成特異的プロモーター

の制御下に発現するように遺伝子組換えされており、ここで、

前記単一種の殺線虫結晶タンパク質が、C r y 5 B、または配列番号 1 との配列同一性が少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % もしくは少なくとも 9 8 % であるアミノ酸配列を有するそのバリエーションもしくはトランケーションであるか、または C r y 5 B バリエーション S e r 4 0 7 C y s、または配列番号 7 との配列同一性が少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % もしくは少なくとも 9 8 % であるアミノ酸配列を有するそのバリエーションもしくはトランケーションであり、

前記芽胞不形成特異的プロモーターが、C r y 3 A、G e r A、G N A T または T a d A プロモーターである、

請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記不活化された宿主細菌をホモジナイズして、前記天然の生物活性殺線虫結晶を含む細菌溶解物を形成するステップをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記単離された天然の生物活性殺線虫結晶を、経口投与で利用可能な投与形態に製剤化するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[ 連邦委託研究の明示 ]

20

本発明は、米国保健福祉省 ( H H S ) 国立衛生研究所 ( N I H ) により与えられたグラント番号 N I A I D 5 R 0 1 A I 0 5 6 1 8 9 - 1 3、および米国農務省 ( U S D A ) 国立食品農業研究所 ( N I F A ) により与えられたグラント番号 N I F A 2 0 1 6 - 6 7 0 1 5 - 2 4 8 6 1 の下、政府の助成を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】

[ 関連出願 ]

本願は、その内容が引用により本書の一部とされる 2 0 1 7 年 5 月 2 3 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 5 1 0 0 8 1 号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

30

ヒトの消化管に寄生する土壌伝播蠕虫 ( S T H ) に、全世界で最も貧困な人々の 2 3 億人、および最も貧困な子供 4 億人以上が感染している。土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* ( B t ) により産生される結晶 ( C r y ) タンパク質は、安全かつ効果的な S T H 処置を提供する薬剤の候補である。しかしながら、C r y タンパク質による駆虫の生物学的活性は確立されているものの、S T H 処置のためにヒトおよび動物の消化 ( G I ) 管に、無傷の生物活性 C r y タンパク質を効果的に届けることに関して、依然大きな課題が存在する。大勢の貧困患者を処置するのに、処置は非常に低い価格 ( 1 用量あたり 1 ドル未満 ) で大量に利用可能でなければならぬ開発途上国において、C r y タンパク質を実用的 S T H 処置剤として適用することは、C r y タンパク質の発現および精製に係る費用およびスケールアップの問題のために制限されている。

40

【0004】

C r y タンパク質を提供する、安価で簡単でスケールアップ可能な方法は、該タンパク質を *B. thuringiensis* において発現させることである。該細菌は、C r y タンパク質を非常に高いレベルで発現するのに非常に適しており、環境への適用用にはすでに大規模で安価に培養されている。しかしながら、B t における C r y タンパク質の高レベルでの産生には、芽胞形成が必要である。したがって、現在環境に適用されている C r y タンパク質組成物は、細菌由来の結晶タンパク質と芽胞との両方を含む「芽胞 - 結晶溶解物」( S C L ) の形態のものである。このような S C L 組成物をヒトに適用するには、ヒトにおいて食中毒を引き起こす多くのエンテロトキシン遺伝子を含む可能性のある細菌芽胞の存在の故に、問題がある。さらに、芽胞は扱いが難しく有効性に劣るので、B t 芽胞を含む製剤

50

はどれも単位重量当たり、必然的にかなりの量の不活性成分（芽胞）を活性成分（結晶）と共に含むことになるから、ヒトおよび動物のいずれに対しても投与がより困難である。芽胞と結晶タンパク質とを分離することは、両者がほぼ同じ大きさであるゆえに難しい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、タンパク質治療薬、例えば駆虫タンパク質を消化管に送達するための新たなアプローチが当分野において必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、芽胞形成を欠くかまたは芽胞形成能を持たない細菌を使用して、医薬としての使用に適した純度の高い殺線虫結晶製剤を製造できるという発見に基づく。本発明の純粋な殺線虫結晶の製剤は、芽胞結晶溶解物（SCL）から精製された結晶タンパク質よりも優れた抗蠕虫作用を提供する。さらに、そのような製剤は、ヒトへの投与に適さない不純物の芽胞および宿主細菌タンパク質を実質的に含まない。いくつかの例示態様において、本発明の製剤は、可溶性の細胞成分、脂質、および細胞壁デブリを実質的に含まない。

【0007】

一側面において、本開示は、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含む医薬組成物を提供する。殺線虫結晶タンパク質は芽胞不形成形態の宿主細菌によって産生され、医薬組成物は、細菌芽胞、または結晶形態の殺線虫結晶タンパク質以外の宿主細菌タンパク質を実質的に含まない。

【0008】

いくつかの態様において、本発明の医薬組成物は、ヒト対象への経口投与のために適当な賦形剤を含む。いくつかの態様において、宿主細菌はBacillus種である。いくつかの態様において、宿主細菌はBacillus thuringiensis（Bt）である。いくつかの態様において、宿主細菌はEscherichia coliまたはPseudomonas fluorescens種である。

【0009】

いくつかの態様において、芽胞不形成宿主細菌は、天然の生物活性殺線虫結晶が該細菌のサイトゾル中に捕らえられるように、芽胞形成の欠失もたらず遺伝子変異を持つよう遺伝子組換えされている。いくつかの態様において、芽胞形成の欠失をもたらず遺伝子変異は、以下のものからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子の欠失または不活性化である：kinA、kinB、spo0A、spo0B、spo0E、spo0F、spo0J、spo0M、spoIIB、spoIID、spoIIE、spoIIF、spoIIG、spoIIL、spoIIM、spoIIIA、spoIIIB、spoIIIE、spoIVA、spoIVC、spoIVD、spoVG、spoVK、spoVL、spoVM、spoVN、spoVP、spoVQ、spoVID、H、F、E、G、およびK。一態様において、芽胞形成の欠失をもたらず遺伝子変異は、spo0A遺伝子の欠失または不活性化である。

【0010】

いくつかの態様において、宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質を芽胞不形成特異的プロモーターの制御下に発現するように遺伝子組換えされている。いくつかの態様において、芽胞不形成特異的プロモーターは、Cry3A、GerA、GNAT、またはTadAプロモーターである。いくつかの態様において、単一種の殺線虫結晶タンパク質は、Cry5B、Cry5C、Cry5D、Cry6A、Cry13A、Cry14A、Cry21A、Cry21B、Cry55B、ならびにそれらのバリエーションおよびトランケーションからなる群から選択される。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry5Bまたはそのバリエーションもしくはフラグメントである。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry5BバリエーションSer407Cysである。

【0011】

本開示の医薬組成物のいくつかの態様において、医薬組成物は、単離された天然の生物活性殺線虫結晶の形態の第2の結晶タンパク質であって、該第2の結晶タンパク質のみから形成されるものをさらに含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、医薬組成物は、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を少なくとも95%の含量で含む。

## 【 0 0 1 3 】

いくつかの態様において、単離された天然の生物活性殺線虫結晶は、経口的に利用可能な投与形態である。いくつかの態様において、医薬組成物は、乾燥粉末形態であり、医薬用カプセルに封入される。

## 【 0 0 1 4 】

他の一側面において、本開示は、

( a ) 単一種の殺線虫結晶タンパク質を発現するように組換えられた芽胞不形成形態の宿主細菌を増殖させること；ここで、該芽胞不形成宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される天然の生物活性殺線虫結晶を産生し、該宿主細菌は増殖培地中で増殖され、場合により、該芽胞不形成宿主細菌は該天然の生物活性殺線虫結晶を該増殖培地中に放出する；

および

( b ) 該天然の生物活性殺線虫結晶を単離および濃縮して、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を形成すること

を含む、医薬組成物の製造方法を提供する。

## 【 0 0 1 5 】

本方法のいくつかの態様において、宿主細菌はBacillus種である。いくつかの態様において、宿主細菌はBacillus thuringiensis ( B t ) である。いくつかの態様において、宿主細菌はE. coliまたはP. fluorescens種である。

## 【 0 0 1 6 】

本方法のいくつかの態様において、芽胞不形成宿主細菌は、天然の生物活性殺線虫結晶が該細菌のサイトゾル中に捕らえられるように、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異を持つよう遺伝子組換えされている。いくつかの態様において、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異は、以下のものからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子の欠失または不活性化である：kinA、kinB、spo0A、spo0B、spo0E、spo0F、spo0J、spo0M、spoIIB、spoIID、spoIIE、spoIIF、spoIIG、spoIIL、spoIIM、spoIIIA、spoIIIB、spoIIIE、spoIVA、spoIVC、spoIVD、spoVG、spoVK、spoVL、spoVM、spoVN、spoVP、spoVQ、spoVID、H、F、E、G、およびK。いくつかの態様において、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異は、spo0A遺伝子の欠失または不活性化である。

## 【 0 0 1 7 】

上記方法のいくつかの態様において、宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質を芽胞不形成特異的プロモーターの制御下に発現するように遺伝子組換えされている。いくつかの態様において、芽胞不形成特異的プロモーターは、Cry3A、GerA、GNAT、またはTadAプロモーターである。いくつかの態様において、単一種の殺線虫結晶タンパク質は、Cry5B、Cry5C、Cry5D、Cry6A、Cry13A、Cry14A、Cry21A、Cry21B、Cry55B、ならびにそれらのバリエーションおよびトランケーションからなる群から選択される。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry5Bまたはそのバリエーションもしくはフラグメントである。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry5BバリエーションSer407Cysである。

## 【 0 0 1 8 】

いくつかの態様において、前記方法は、芽胞不形成宿主細菌を、該宿主細菌を不活化するために抗菌化合物に暴露するステップをさらに含む。いくつかの態様において、抗菌化合物は沃素である。いくつかの態様において、抗菌化合物は抗生物質医薬である。いくつかの態様において、抗菌化合物は - ラクタム抗生物質である。いくつかの態様において、抗菌化合物は、テルペン、ヘキサンおよびホルムアルデヒドからなる群から選択される

10

20

30

40

50

有機溶媒である。いくつかの態様において、抗菌化合物はテルペンである。いくつかの態様において、テルペンは、チモール、オイゲノール、ゲラニオール、カルバクロールおよびシトラールまたはそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの態様において、テルペンはカルバクロールである。いくつかの態様において、抗菌化合物はヘキサンである。

【0019】

いくつかの態様において、前記方法は、殺線虫結晶タンパク質から不活化剤を抽出するために、不活化された宿主細菌に食用油を加えるステップを含む。いくつかの態様において、食用油は、トウモロコシ油、大豆油、ヤシ油、綿実油、オリーブ油、パーム油、ピーナツ油、ナタネ油、ベニバナ油およびヒマワリ油からなる群から選択される。いくつかの態様において、食用油はトウモロコシ油である。いくつかの態様において、食用油はトウモロコシ油である。いくつかの態様において、前記方法は、殺線虫結晶タンパク質から細胞成分を抽出するために、不活化された宿主細菌に有機溶媒を加えるステップを含む。いくつかの態様において、有機溶媒はヘキサンである。いくつかの態様において、ヘキサンは、不活化宿主細菌に50% v/vまで加えられる。いくつかの態様において、前記方法は、有機溶媒と不活化宿主細菌の混合物を遠心分離して殺線虫結晶タンパク質をペレット化するステップを含む。

10

【0020】

いくつかの態様において、前記方法は、不活化された宿主細菌をホモジナイズして、天然の生物活性殺線虫結晶を含む細菌溶解物を形成するステップをさらに含む。いくつかの態様において、該方法は、該細菌溶解物を濃縮するステップをさらに含む。いくつかの態様において、細菌溶解物を濃縮するステップは、遠心分離、限外濾過および透析からなる群から選択される。

20

【0021】

いくつかの態様において、前記方法は、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を、経口的に利用可能な投与形態に製剤化するステップをさらに含む。いくつかの態様において、該製剤化ステップは、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を凍結乾燥または噴霧乾燥することを含む。いくつかの態様において、該製剤化ステップは、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を医薬用カプセルに充填することを含む。

【0022】

さらなる一側面において、本開示は、  
 (a) 単一種の殺線虫結晶タンパク質を発現するように組換えられた芽胞不形成形態の宿主細菌を増殖させること；ここで、該芽胞不形成宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される天然の生物活性殺線虫結晶を産生する；  
 (b) 該増殖した芽胞不形成宿主細菌を、抗菌化合物への暴露により不活化すること；  
 (c) 該不活化した芽胞不形成宿主細菌をホモジナイズして、細菌溶解物を形成すること；および  
 (d) 該細菌溶解物中の天然の生物活性殺線虫結晶を濃縮して、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を形成すること  
 を含む、医薬組成物の製造方法を提供する。

30

40

【0023】

いくつかの態様において、この方法は、増殖した芽胞不形成宿主細菌を不活化の前に濃縮するステップをさらに含む。いくつかの態様において、宿主細菌は*Bacillus*種である。いくつかの態様において、宿主細菌は*Bacillus thuringiensis* (Bt)である。いくつかの態様において、宿主細菌は*E. coli*または*P. fluorescens*種である。

【0024】

この方法のいくつかの態様において、芽胞不形成宿主細菌は、天然の生物活性殺線虫結晶が該細菌のサイトゾル中に捕らえられるように、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異を持つよう遺伝子操作されている。いくつかの態様において、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異は、以下のものからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子の欠失

50

たは不活性化である：kinA、kinB、spo0A、spo0B、spo0E、spo0F、spo0J、spo0M、spo0IIB、spo0IID、spo0IE、spo0IF、spo0IG、spo0IIL、spo0IIM、spo0IIIA、spo0IIB、spo0IIE、spo0IVA、spo0IVC、spo0IVD、spo0VG、spo0VK、spo0VL、spo0VM、spo0VN、spo0VP、spo0VQ、spo0VID、H、F、E、G、およびK。いくつかの態様において、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異は、spo0A遺伝子の欠失または不活性化である。

【0025】

上記方法のいくつかの態様において、宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質を芽胞不形成特異的プロモーターの制御下に発現するように遺伝子組換えされている。いくつかの態様において、芽胞不形成特異的プロモーターは、Cry3A、GerA、GNAT、またはTadAプロモーターである。いくつかの態様において、単一種の殺線虫結晶タンパク質は、Cry5B、Cry5C、Cry5D、Cry6A、Cry13A、Cry14A、Cry21A、Cry21B、Cry55B、ならびにそれらのバリエーションおよびトランケーションからなる群から選択される。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry5Bまたはそのバリエーションもしくはフラグメントである。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry5BバリエーションSer407Cysである。

10

【0026】

前記方法のいくつかの態様において、抗菌化合物は沃素である。該方法の他のいくつかの態様において、抗菌化合物は抗生物質医薬である。該方法のいくつかの態様において、抗菌化合物はβ-ラクタム抗生物質である。いくつかの態様において、抗菌化合物は、テルペン、ヘキサノールおよびホルムアルデヒドからなる群から選択される有機溶媒である。いくつかの態様において、抗菌化合物はテルペンである。いくつかの態様において、テルペンは、チモール、オイゲノール、ゲラニオール、カルバクロールおよびシトラールまたはそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの態様において、テルペンはカルバクロールである。いくつかの態様において、抗菌化合物はヘキサノールである。

20

【0027】

いくつかの態様において、前記方法は、不活性化された宿主細菌から抗菌化合物を抽出するステップをさらに含む。いくつかの態様において、前記方法は、殺線虫結晶タンパク質から不活性化剤を抽出するために、不活性化された宿主細菌に食用油を加えるステップを含む。いくつかの態様において、食用油は、トウモロコシ油、大豆油、ヤシ油、綿実油、オリーブ油、パーム油、ピーナツ油、ナタネ油、ベニバナ油およびヒマワリ油からなる群から選択される。いくつかの態様において、食用油はトウモロコシ油である。いくつかの態様において、前記方法は、殺線虫結晶タンパク質から細胞成分を抽出するために、不活性化された宿主細菌に有機溶媒を加えるステップを含む。いくつかの態様において、有機溶媒はヘキサノールである。いくつかの態様において、ヘキサノールは、不活性化宿主細菌に50% v/vまで加えられる。いくつかの態様において、前記方法は、有機溶媒と不活性化宿主細菌の混合物を遠心分離して殺線虫結晶タンパク質をペレット化するステップを含む。

30

【0028】

いくつかの態様において、前記方法は、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を、経口的に利用可能な投与形態に製剤化するステップをさらに含む。いくつかの態様において、該方法は、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を凍結乾燥または噴霧乾燥することを含む製剤化ステップを含む。いくつかの態様において、該製剤化ステップは、単離され精製され純粋な天然の生物活性殺線虫結晶を医薬用カプセルに充填することを含む。

40

【0029】

さらなる一側面において、本開示は、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含み、細菌芽胞を含まない医薬組成物を、処置有効量で対象に投与することを含む、対象において寄生虫感染を処置する方法を提供する。

【0030】

該処置方法のいくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry5B、Cry5C、Cry5D、Cry6A、Cry13A、Cry14A、Cry21A、Cry2

50

1 B、Cry 5 5 B、ならびにそれらのバリエーションからなる群から選択される。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry 5 Bである。いくつかの態様において、殺線虫結晶タンパク質は、Cry 5 Bバリエーション Ser 4 0 7 Cysである。

【0031】

前記処置方法のいくつかの態様において、前記組成物は、第2の結晶タンパク質のみから形成される単離された天然の生物活性殺線虫結晶の形態の第2の結晶タンパク質をさらに含む。いくつかの態様において、前記医薬組成物は、少なくとも約95%の、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含む。いくつかの態様において、前記組成物は、乾燥粉末形態であり、医薬用カプセルに充填される。

10

本発明の実施形態をさらに記載する：

[項1]

単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成された、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含む医薬組成物において、該結晶タンパク質は芽胞不形成形態の宿主細菌によって産生され、該医薬組成物は、細菌芽胞、または結晶の形態の殺線虫結晶タンパク質以外の宿主細菌タンパク質を実質的に含まない、医薬組成物。

[項2]

ヒト対象への経口投与のために適当な賦形剤をさらに含む、上記項1に記載の医薬組成物。

[項3]

宿主細菌がBacillus種である、上記項1に記載の医薬組成物。

20

[項4]

宿主細菌がBacillus thuringiensis (Bt)である、上記項1に記載の医薬組成物。

[項5]

宿主細菌がE. coliまたはP. fluorescens種である、上記項1に記載の医薬組成物。

[項6]

芽胞不形成宿主細菌が、前記天然の生物活性殺線虫結晶が該細菌のサイトゾル中に捕らえられるように、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異を持つよう遺伝子組換えされている、上記項1に記載の医薬組成物。

[項7]

芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異が、下記のものからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子の欠失または不活性化である、上記項6に記載の医薬組成物：kinA、kinB、spo0A、spo0B、spo0E、spo0F、spo0J、spo0M、spoIIB、spoIID、spoIIE、spoIIF、spoIIG、spoIIL、spoIIM、spoIIIA、spoIIIB、spoIIIE、spoIVA、spoIVC、spoIVD、spoVG、spoVK、spoVL、spoVM、spoVN、spoVP、spoVQ、spoVID、H、F、E、G、およびK。

30

[項8]

芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異が、spo0A遺伝子の欠失または不活性化である、上記項6に記載の医薬組成物。

[項9]

宿主細菌が、前記単一種の殺線虫結晶タンパク質を芽胞不形成特異的プロモーターの制御下に発現するように遺伝子組換えされている、上記項1に記載の医薬組成物。

40

[項10]

芽胞不形成特異的プロモーターが、Cry 3 A、Ger A、GNAT、またはTad Aプロモーターである、上記項9に記載の医薬組成物。

[項11]

単一種の殺線虫結晶タンパク質が、Cry 5 B、Cry 5 C、Cry 5 D、Cry 6 A、Cry 1 3 A、Cry 1 4 A、Cry 2 1 A、Cry 2 1 B、Cry 5 5 B、ならびにそれらのバリエーションおよびトランケーションからなる群から選択される、上記項1に記載の医薬組成物。

50

## [ 項 1 2 ]

殺線虫結晶タンパク質が、C r y 5 B またはそのバリエーションもしくはフラグメントである、上記項 1 1 に記載の医薬組成物。

## [ 項 1 3 ]

殺線虫結晶タンパク質が、C r y 5 B バリエーション S e r 4 0 7 C y s である、上記項 1 2 に記載の医薬組成物。

## [ 項 1 4 ]

単離された天然の生物活性殺線虫結晶の形態の第 2 の結晶タンパク質をさらに含み、該結晶は該第 2 の結晶タンパク質のみから形成される、上記項 1 に記載の医薬組成物。

## [ 項 1 5 ]

医薬組成物が、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を少なくとも 9 5 % の含量で含む、上記項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

10

## [ 項 1 6 ]

単離された天然の生物活性殺線虫結晶が、経口投与で利用可能な投与形態にある、上記項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

## [ 項 1 7 ]

医薬組成物が、乾燥粉末形態であり、医薬用カプセルに封入されている、上記項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

## [ 項 1 8 ]

( a ) 単一種の殺線虫結晶タンパク質を発現するように遺伝子組換えされた芽胞不形成形態の宿主細菌を増殖させること ; ここで、該芽胞不形成宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される天然の生物活性殺線虫結晶を産生し、該宿主細菌は増殖培地中で増殖され、場合により、該芽胞不形成宿主細菌は該天然の生物活性殺線虫結晶を該増殖培地中に放出する ;

20

および

( b ) 該天然の生物活性殺線虫結晶を単離および濃縮して、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を形成することを含む、医薬組成物の製造方法。

## [ 項 1 9 ]

宿主細菌が *Bacillus* 種である、上記項 1 8 に記載の方法。

30

## [ 項 2 0 ]

宿主細菌が *Bacillus thuringiensis* ( B t ) である、上記項 1 8 に記載の方法。

## [ 項 2 1 ]

宿主細菌が *E. coli* または *P. fluorescens* 種である、上記項 1 8 に記載の方法。

## [ 項 2 2 ]

芽胞不形成宿主細菌が、前記天然の生物活性殺線虫結晶が該細菌のサイトゾル中に捕らえられるように、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異を持つよう遺伝子組換えされている、上記項 1 8 に記載の方法。

## [ 項 2 3 ]

芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異が、下記のものからなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の遺伝子の欠失または不活性化である、上記項 2 2 に記載の方法 : kinA、kinB、spo0A、spo0B、spo0E、spo0F、spo0J、spo0M spoII B、spoII D、spoII E、spoII F、spoII G、spoII L、spoII M、spoII I A、spoII I B、spoII I E、spoI V A、spoI V C、spoI V D、spoV G、spoV K、spoV L、spoV M、spoV N、spoV P、spoV Q、spoV I D、H、F、E、G、および K。

40

## [ 項 2 4 ]

芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異が、spo0A 遺伝子の欠失または不活性化である、上記項 2 2 に記載の方法。

## [ 項 2 5 ]

宿主細菌が、単一種の殺線虫結晶タンパク質を芽胞不形成特異的プロモーターの制御下

50

に発現するように遺伝子組換えされている、上記項 18 に記載の方法。

[ 項 26 ]

芽胞不形成特異的プロモーターが、Cry3A、GerA、GNAT、またはTadAプロモーターである、上記項 25 に記載の方法。

[ 項 27 ]

単一種の殺線虫結晶タンパク質が、Cry5B、Cry5C、Cry5D、Cry6A、Cry13A、Cry14A、Cry21A、Cry21B、Cry55B、ならびにそれらのバリエーションおよびトランケーションからなる群から選択される、上記項 18 に記載の方法。

[ 項 28 ]

殺線虫結晶タンパク質が、Cry5Bまたはそのバリエーションもしくはフラグメントである、上記項 27 に記載の方法。

[ 項 29 ]

殺線虫結晶タンパク質が、Cry5BバリエーションSer407Cysである、上記項 28 に記載の方法。

[ 項 30 ]

前記芽胞不形成宿主細菌を、該宿主細菌を不活化するために抗菌化合物に暴露するステップをさらに含む、上記項 18 に記載の方法。

[ 項 31 ]

抗菌化合物が沃素である、上記項 30 に記載の方法。

[ 項 32 ]

抗菌化合物が抗生物質医薬である、上記項 30 に記載の方法。

[ 項 33 ]

抗菌化合物がβ-ラクタム抗生物質である、上記項 30 に記載の方法。

[ 項 34 ]

抗菌化合物が、テルペン、ヘキサンおよびホルムアルデヒドからなる群から選択される有機溶媒である、上記項 30 に記載の方法。

[ 項 35 ]

抗菌化合物がテルペンである、上記項 34 に記載の方法。

[ 項 36 ]

テルペンが、チモール、オイゲノール、ゲラニオール、カルバクロールおよびシトラールまたはそれらの組み合わせからなる群から選択される、上記項 35 に記載の方法。

[ 項 37 ]

テルペンがカルバクロールである、上記項 36 に記載の方法。

[ 項 38 ]

抗菌化合物がヘキサンである、上記項 34 に記載の方法。

[ 項 39 ]

前記殺線虫結晶タンパク質から前記抗菌化合物、可溶性細胞成分、脂質および細胞壁デブリを抽出するために、前記不活化された宿主細菌に食用油を加えるステップをさらに含む、上記項 30 に記載の方法。

[ 項 40 ]

食用油がトウモロコシ油である、上記項 39 に記載の方法。

[ 項 41 ]

前記殺線虫結晶タンパク質から前記抗菌化合物を抽出するために、前記不活化された宿主細菌に有機溶媒を加えるステップをさらに含む、上記項 30 に記載の方法。

[ 項 42 ]

有機溶媒がヘキサンである、上記項 41 に記載の方法。

[ 項 43 ]

ヘキサンが、不活化宿主細菌に50% v/vまで加えられる、上記項 42 に記載の方法。

[ 項 44 ]

10

20

30

40

50

有機溶媒と不活化宿主細菌の混合物を遠心分離して前記殺線虫結晶タンパク質をペレット化するステップをさらに含む、上記項 4 3 に記載の方法。

[ 項 4 5 ]

前記不活化された宿主細菌をホモジナイズして、天然の生物活性殺線虫結晶を含む細菌溶解物を形成するステップをさらに含む、上記項 3 0 に記載の方法。

[ 項 4 6 ]

前記細菌溶解物を濃縮するステップをさらに含む、上記項 4 5 に記載の方法。

[ 項 4 7 ]

細菌溶解物を濃縮するステップが、遠心分離、限外濾過および透析からなる群から選択される、上記項 4 6 に記載の方法。

10

[ 項 4 8 ]

前記単離された天然の生物活性殺線虫結晶を、経口的に利用可能な投与形態に製剤化するステップをさらに含む、上記項 1 8 に記載の方法。

[ 項 4 9 ]

製剤化ステップが、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を凍結乾燥または噴霧乾燥することを含む、上記項 4 8 に記載の方法。

[ 項 5 0 ]

製剤化ステップが、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を医薬用カプセルに充填することを含む、上記項 4 8 に記載の方法。

[ 項 5 1 ]

20

( a ) 単一種の殺線虫結晶タンパク質を発現するように組換えられた芽胞不形成形態の宿主細菌を増殖させること；ここで、該芽胞不形成宿主細菌は、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される天然の生物活性殺線虫結晶を産生する；

( b ) 該増殖した芽胞不形成宿主細菌を、抗菌化合物への暴露により不活化すること；

( c ) 該不活化した芽胞不形成宿主細菌をホモジナイズして、細菌溶解物を形成すること；および

( d ) 該細菌溶解物中の天然の生物活性殺線虫結晶を濃縮して、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を形成すること

を含む、医薬組成物の製造方法。

[ 項 5 2 ]

30

前記増殖した芽胞不形成宿主細菌を不活化の前に濃縮するステップをさらに含む、上記項 5 1 に記載の方法。

[ 項 5 3 ]

宿主細菌が *Bacillus* 種である、上記項 5 1 に記載の方法。

[ 項 5 4 ]

宿主細菌が *Bacillus thuringiensis* ( B t ) である、上記項 5 1 に記載の方法。

[ 項 5 5 ]

宿主細菌が *E. coli* または *P. fluorescens* 種である、上記項 5 1 に記載の方法。

[ 項 5 6 ]

芽胞不形成宿主細菌が、前記天然の生物活性殺線虫結晶が該細菌のサイトゾル中に捕らえられるように、芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異を持つよう遺伝子組換えされている、上記項 5 1 に記載の方法。

40

[ 項 5 7 ]

芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異が、下記のものからなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の遺伝子の欠失または不活性化である、上記項 5 6 に記載の方法： *kinA*、*kinB*、*spo0A*、*spo0B*、*spo0E*、*spo0F*、*spo0J*、*spo0M*、*spoilB*、*spoilD*、*spoilE*、*spoilF*、*spoilG*、*spoilL*、*spoilM*、*spoilIA*、*spoilIB*、*spoilIE*、*spoilVA*、*spoilVC*、*spoilVD*、*spoVG*、*spoVK*、*spoVL*、*spoVM*、*spoVN*、*spoVP*、*spoVQ*、*spoVID*、H、F、E、G、および K。

[ 項 5 8 ]

50

芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異が、spo0A遺伝子の欠失または不活性化である、上記項56に記載の方法。

[項59]

宿主細菌が、前記単一種の殺線虫結晶タンパク質を芽胞不形成特異的プロモーターの制御下に発現するように遺伝子組換えされている、上記項56に記載の方法。

[項60]

芽胞不形成特異的プロモーターが、Cry3A、GerA、GNAT、またはTadAプロモーターである、上記項59に記載の方法。

[項61]

単一種の細胞質結晶タンパク質が、Cry5B、Cry6A、Cry5C、Cry5D、Cry13A、Cry14A、Cry21A、Cry21B、Cry55B、ならびにそれらのバリエーションからなる群から選択される、上記項51に記載の方法。

10

[項62]

殺線虫結晶タンパク質が、Cry5Bまたはそのバリエーションもしくはフラグメントである、上記項61に記載の方法。

[項63]

殺線虫結晶タンパク質が、Cry5BバリエーションSer407Cysである、上記項62に記載の方法。

[項64]

抗菌化合物が沃素である、上記項51に記載の方法。

20

[項65]

抗菌化合物が抗生物質医薬である、上記項51に記載の方法。

[項66]

抗菌化合物がβ-ラクタム抗生物質である、上記項51に記載の方法。

[項67]

抗菌化合物が、テルペン、ヘキサンおよびホルムアルデヒドからなる群から選択される有機溶媒である、上記項51に記載の方法。

[項68]

抗菌化合物がテルペンである、上記項67に記載の方法。

30

[項69]

テルペンが、チモール、オイゲノール、ゲラニオール、カルバクローロールおよびシトラールまたはそれらの組み合わせからなる群から選択される、上記項68に記載の方法。

[項70]

テルペンがカルバクローロールである、上記項69に記載の方法。

[項71]

抗菌化合物がヘキサンである、上記項70に記載の方法。

[項72]

前記不活化された宿主細菌から前記抗菌化合物および細胞壁デブリを抽出するステップをさらに含む、上記項51に記載の方法。

40

[項73]

前記殺線虫結晶タンパク質から前記不活化剤を抽出するために、前記不活化された宿主細菌に食用油を加えるステップをさらに含む、上記項51に記載の方法。

[項74]

食用油がトウモロコシ油である、上記項73に記載の方法。

[項75]

前記殺線虫結晶タンパク質から前記抗菌化合物、可溶性細胞成分、脂質および細胞壁デブリを抽出するために、前記不活化された宿主細菌に有機溶媒を加えるステップをさらに含む、上記項51に記載の方法。

[項76]

50

有機溶媒がヘキサンである、上記項 7 5 に記載の方法。

[ 項 7 7 ]

ヘキサンが、不活化宿主細菌に 5 0 % v/v まで加えられる、上記項 7 6 に記載の方法。

[ 項 7 8 ]

有機溶媒と不活化宿主細菌の混合物を遠心分離して前記殺線虫結晶タンパク質をペレット化するステップをさらに含む、上記項 7 5 に記載の方法。

[ 項 7 9 ]

前記単離された天然の生物活性殺線虫結晶を、経口的に利用可能な投与形態に製剤化するステップをさらに含む、上記項 5 1 ~ 7 8 のいずれかに記載の方法。

[ 項 8 0 ]

製剤化ステップが、前記単離された天然の生物活性殺線虫結晶を凍結乾燥または噴霧乾燥することを含む、上記項 7 9 に記載の方法。

[ 項 8 1 ]

製剤化ステップが、前記単離され精製された天然の生物活性殺線虫結晶を医薬用カプセルに充填するステップを含む、上記項 7 9 に記載の方法。

[ 項 8 2 ]

対象において寄生虫または蠕虫感染を処置するための方法であって、

単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含む医薬組成物を処置有効量で対象に投与することを含み、ここで、該医薬組成物は、細菌芽胞、または結晶の形態の殺線虫結晶タンパク質以外の宿主細菌タンパク質を実質的に含まない、方法。

[ 項 8 3 ]

殺線虫結晶タンパク質が、Cry 5 B、Cry 5 C、Cry 5 D、Cry 6 A、Cry 1 3 A、Cry 1 4 A、Cry 2 1 A、Cry 2 1 B、Cry 5 5 B、ならびにそれらのバリエーションおよびトランケーションからなる群から選択される、上記項 8 2 に記載の方法。

[ 項 8 4 ]

殺線虫結晶タンパク質がCry 5 Bである、上記項 8 2 に記載の方法。

[ 項 8 5 ]

殺線虫結晶タンパク質が、Cry 5 B バリエーション Ser 4 0 7 Cys である、上記項 8 2 に記載の方法。

[ 項 8 6 ]

医薬組成物が、単離された天然の生物活性殺線虫結晶の形態の第 2 の結晶タンパク質をさらに含む、該結晶は該第 2 の結晶タンパク質のみから形成される、上記項 8 2 に記載の方法。

[ 項 8 7 ]

医薬組成物が、単離された天然の生物活性殺線虫結晶を少なくとも約 9 5 % の含量で含む、上記項 8 2 に記載の方法。

[ 項 8 8 ]

医薬組成物が、乾燥粉末形態であり、医薬用カプセルに封入されている、上記項 8 2 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 2 】

【 図 1 】 図 1 A ~ 1 B は、野生型結晶タンパク質における保存されたアミノ酸ブロックを示す図である。図 1 A は、いくつかのCryタンパク質間において保存されたブロックの位置を示す。de Maagd, R.A., et al. "How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world." *Trends in Genetics* 17(4): 193-99, 195 (Figure 2a) (April 2001)。図 1 B は、いくつかのCryタンパク質間において保存されたブロックの位置を示す。Schnepf, E., et al. "*Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 775-806, 781 (Figure 3) (Sept. 1998)。

10

20

30

40

50

【図2】図2に、Cry5Ba1のアミノ酸配列[配列番号1]を示す。

【図3】図3に、Cry13Aa1のアミノ酸配列[配列番号2]を示す。

【図4】図4に、Cry14Aa1のアミノ酸配列[配列番号3]を示す。

【図5】図5A~5Cに、他の結晶タンパク質のアミノ酸配列を示す。図5Aに、Cry21Aa1のアミノ酸配列[配列番号4]を示す。図5Bに、Cry21Aa2のアミノ酸配列(Cry21Aa1との同一性が98%) [配列番号5]を示す。図5Cに、Cry6Aのアミノ酸配列[配列番号6]を示す。

【図6】図6は、不活化BaCC(IBaCC)から殺線虫結晶タンパク質を精製するステップを示すフローチャートである。

【図7】図7は、Cry5B PCCの精製プロセスのいくつかのステップからのサンプルを適用したタンパク質ゲルの画像である。 10

【図8】図8は、Cry5B PCCの、1000倍の倍率の位相差顕微鏡写真である。

【図9】図9Aは、インビトロでCry5B PCCに暴露した後の鞭虫の運動性の経時変化を示すグラフである。図9Bは、Cry5B PCCおよび水対照で処置したハムスターにおけるインビボ鞭虫量を示すヒストグラムである。

【図10】図10Aは、インビトロでCry5B PCCに暴露した後の鉤虫の運動性の経時変化を示すグラフである。図10Bは、Cry5B PCCおよび水対照で処置したハムスターにおける鉤虫量を示すヒストグラムである。図10Cは、Cry5B PCCおよび水対照での処置の前後のハムスターにおける鉤虫量を示すヒストグラムである。

【図11】図11Aは、Cry5B芽胞-結晶溶解物(SCL)または水対照のいずれかで処置したハムスターにおける鉤虫量のプロットを示す。図11Bは、SCLまたは水対照のいずれかで処置したハムスターにおけるグラム当たりの卵数のプロットを示す。 20

【図12】図12は、Ancylostoma ceylanicum鉤虫卵に対するさまざまな濃度のCry5B PCCの毒性を示すヒストグラムである；一部のCry5B PCCは、リゾチームの添加により処理した。

【図13】図13Aは、BaCCからPCCを精製するプロトコルを示すダイアグラムである。図13Bは、10%ヘキサンの処理の前後のBaCCの顕微鏡画像(上図)、および10%ヘキサンによる処理の前後のBaCCの細胞増殖率(OD600を用いて測定)を示す棒グラフ(下図)である。図13Cは、出発BaCC材料および最終的な精製されたPCC産物を示すSDS-PAGEゲルの画像である。 30

【図14】図14は、BaCCを、該細菌を死滅させるために10%ヘキサンの処理し、他の微生物汚染物を除去するために50%ヘキサンの処理して得たPCC(PCC-Hex/Hex)の生物活性を示す折れ線グラフである。

【図15】図15は、BaCCを、該細菌を死滅させるためにカルバクロールで処理し(IBaCC)、他の微生物汚染物を除去するために50%ヘキサンの処理して得たPCC(PCC-Carv&Hex)、およびBaCCを、該細菌を死滅させるために10%ヘキサンの処理し、他の微生物汚染物を除去するために50%ヘキサンの処理して得たPCC(PCC-Hex&Hex)の生物活性を示す棒グラフである。

【図16】図16は、BaCCを、該細菌を死滅させるためにカルバクロールで、他の微生物汚染物を除去するために50%ヘキサンの処理して得たPCCの生物活性を示す折れ線グラフである。 40

【発明を実施するための形態】

【0033】

純粋な殺線虫結晶タンパク質の組成物、そのような純粋な殺線虫結晶タンパク質を製造する方法、純粋な殺線虫結晶タンパク質の製剤を対象に投与することによりSTH感染を治療または予防する方法を開示する。

【0034】

微生物

いくつかの態様において、本開示の細菌は、芽胞不形成細菌である。本書において、用語「芽胞不形成細菌」は、芽胞形成能力のない野生型細菌(例えばある種のグラム陰性細 50

菌)、および芽胞形成を欠くように組換えられた芽胞形成細菌の遺伝的バリエーション(例えばある種のグラム陽性細菌)を包含する。本書において、「芽胞形成の欠失をもたらす変異」または「芽胞形成の欠失をもたらす遺伝子変異」とは、芽胞形成経路の構成員の欠失をもたらす任意の遺伝子変異、および/または生存能力のある芽胞の形成を阻止する任意の遺伝子変異をさす。例えば、芽胞不形成細菌およびその作製は、国際特許出願番号 P C T / U S 2 0 1 7 / 0 1 3 4 3 6 に記載されており、それを参照により本書の一部とする。

#### 【 0 0 3 5 】

いくつかの態様においては、芽胞形成欠失細菌が好ましい。芽胞形成欠失細菌の例は、spo0A-Bacillus thuringiensisである。芽胞形成欠失をもたらすが、生存能力または異種遺伝子発現には実質的に影響しない、任意の変異または変異の組み合わせを用いることができる。そのような変異は、以下の遺伝子における変異を包含するが、それに限定されない: kinA、kinB、spo0A、spo0B、spo0E、spo0F、spo0J、spo0M、spo0N、spo0O、spo0P、spo0Q、spo0R、spo0S、spo0T、spo0U、spo0V、spo0W、spo0X、spo0Y、spo0Z、spo0AA、spo0AB、spo0AC、spo0AD、spo0AE、spo0AF、spo0AG、spo0AH、spo0AI、spo0AJ、spo0AK、spo0AL、spo0AM、spo0AN、spo0AO、spo0AP、spo0AQ、spo0AR、spo0AS、spo0AT、spo0AU、spo0AV、spo0AW、spo0AX、spo0AY、spo0AZ、spo0BA、spo0BB、spo0BC、spo0BD、spo0BE、spo0BF、spo0BG、spo0BH、spo0BI、spo0BJ、spo0BK、spo0BL、spo0BM、spo0BN、spo0BO、spo0BP、spo0BQ、spo0BR、spo0BS、spo0BT、spo0BU、spo0BV、spo0BW、spo0BX、spo0BY、spo0BZ、spo0CA、spo0CB、spo0CC、spo0CD、spo0CE、spo0CF、spo0CG、spo0CH、spo0CI、spo0CJ、spo0CK、spo0CL、spo0CM、spo0CN、spo0CO、spo0CP、spo0CQ、spo0CR、spo0CS、spo0CT、spo0CU、spo0CV、spo0CW、spo0CX、spo0CY、spo0CZ、spo0DA、spo0DB、spo0DC、spo0DD、spo0DE、spo0DF、spo0DG、spo0DH、spo0DI、spo0DJ、spo0DK、spo0DL、spo0DM、spo0DN、spo0DO、spo0DP、spo0DQ、spo0DR、spo0DS、spo0DT、spo0DU、spo0DV、spo0DW、spo0DX、spo0DY、spo0DZ、spo0EA、spo0EB、spo0EC、spo0ED、spo0EE、spo0EF、spo0EG、spo0EH、spo0EI、spo0EJ、spo0EK、spo0EL、spo0EM、spo0EN、spo0EO、spo0EP、spo0EQ、spo0ER、spo0ES、spo0ET、spo0EU、spo0EV、spo0EW、spo0EX、spo0EY、spo0EZ、spo0FA、spo0FB、spo0FC、spo0FD、spo0FE、spo0FF、spo0FG、spo0FH、spo0FI、spo0FJ、spo0FK、spo0FL、spo0FM、spo0FN、spo0FO、spo0FP、spo0FQ、spo0FR、spo0FS、spo0FT、spo0FU、spo0FV、spo0FW、spo0FX、spo0FY、spo0FZ、spo0GA、spo0GB、spo0GC、spo0GD、spo0GE、spo0GF、spo0GG、spo0GH、spo0GI、spo0GJ、spo0GK、spo0GL、spo0GM、spo0GN、spo0GO、spo0GP、spo0GQ、spo0GR、spo0GS、spo0GT、spo0GU、spo0GV、spo0GW、spo0GX、spo0GY、spo0GZ、spo0HA、spo0HB、spo0HC、spo0HD、spo0HE、spo0HF、spo0HG、spo0HH、spo0HI、spo0HJ、spo0HK、spo0HL、spo0HM、spo0HN、spo0HO、spo0HP、spo0HQ、spo0HR、spo0HS、spo0HT、spo0HU、spo0HV、spo0HW、spo0HX、spo0HY、spo0HZ、spo0IA、spo0IB、spo0IC、spo0ID、spo0IE、spo0IF、spo0IG、spo0IH、spo0IJ、spo0IK、spo0IL、spo0IM、spo0IN、spo0IO、spo0IP、spo0IQ、spo0IR、spo0IS、spo0IT、spo0IU、spo0IV、spo0IW、spo0IX、spo0IY、spo0IZ、spo0JA、spo0JB、spo0JC、spo0JD、spo0JE、spo0JF、spo0JG、spo0JH、spo0JI、spo0JJ、spo0JK、spo0JL、spo0JM、spo0JN、spo0JO、spo0JP、spo0JQ、spo0JR、spo0JS、spo0JT、spo0JU、spo0JV、spo0JW、spo0JX、spo0JY、spo0JZ、spo0KA、spo0KB、spo0KC、spo0KD、spo0KE、spo0KF、spo0KG、spo0KH、spo0KI、spo0KJ、spo0KK、spo0KL、spo0KM、spo0KN、spo0KO、spo0KP、spo0KQ、spo0KR、spo0KS、spo0KT、spo0KU、spo0KV、spo0KW、spo0KX、spo0KY、spo0KZ、spo0LA、spo0LB、spo0LC、spo0LD、spo0LE、spo0LF、spo0LG、spo0LH、spo0LI、spo0LJ、spo0LK、spo0LL、spo0LM、spo0LN、spo0LO、spo0LP、spo0LQ、spo0LR、spo0LS、spo0LT、spo0LU、spo0LV、spo0LW、spo0LX、spo0LY、spo0LZ、spo0MA、spo0MB、spo0MC、spo0MD、spo0ME、spo0MF、spo0MG、spo0MH、spo0MI、spo0MJ、spo0MK、spo0ML、spo0MM、spo0MN、spo0MO、spo0MP、spo0MQ、spo0MR、spo0MS、spo0MT、spo0MU、spo0MV、spo0MW、spo0MX、spo0MY、spo0MZ、spo0NA、spo0NB、spo0NC、spo0ND、spo0NE、spo0NF、spo0NG、spo0NH、spo0NI、spo0NJ、spo0NK、spo0NL、spo0NM、spo0NN、spo0NO、spo0NP、spo0NQ、spo0NR、spo0NS、spo0NT、spo0NU、spo0NV、spo0NW、spo0NX、spo0NY、spo0NZ、spo0OA、spo0OB、spo0OC、spo0OD、spo0OE、spo0OF、spo0OG、spo0OH、spo0OI、spo0OJ、spo0OK、spo0OL、spo0OM、spo0ON、spo0OO、spo0OP、spo0OQ、spo0OR、spo0OS、spo0OT、spo0OU、spo0OV、spo0OW、spo0OX、spo0OY、spo0OZ、spo0PA、spo0PB、spo0PC、spo0PD、spo0PE、spo0PF、spo0PG、spo0PH、spo0PI、spo0PJ、spo0PK、spo0PL、spo0PM、spo0PN、spo0PO、spo0PP、spo0PQ、spo0PR、spo0PS、spo0PT、spo0PU、spo0PV、spo0PW、spo0PX、spo0PY、spo0PZ、spo0QA、spo0QB、spo0QC、spo0QD、spo0QE、spo0QF、spo0QG、spo0QH、spo0QI、spo0QJ、spo0QK、spo0QL、spo0QM、spo0QN、spo0QO、spo0QP、spo0QQ、spo0QR、spo0QS、spo0QT、spo0QU、spo0QV、spo0QW、spo0QX、spo0QY、spo0QZ、spo0RA、spo0RB、spo0RC、spo0RD、spo0RE、spo0RF、spo0RG、spo0RH、spo0RI、spo0RJ、spo0RK、spo0RL、spo0RM、spo0RN、spo0RO、spo0RP、spo0RQ、spo0RR、spo0RS、spo0RT、spo0RU、spo0RV、spo0RW、spo0RX、spo0RY、spo0RZ、spo0SA、spo0SB、spo0SC、spo0SD、spo0SE、spo0SF、spo0SG、spo0SH、spo0SI、spo0SJ、spo0SK、spo0SL、spo0SM、spo0SN、spo0SO、spo0SP、spo0SQ、spo0SR、spo0SS、spo0ST、spo0SU、spo0SV、spo0SW、spo0SX、spo0SY、spo0SZ、spo0TA、spo0TB、spo0TC、spo0TD、spo0TE、spo0TF、spo0TG、spo0TH、spo0TI、spo0TJ、spo0TK、spo0TL、spo0TM、spo0TN、spo0TO、spo0TP、spo0TQ、spo0TR、spo0TS、spo0TT、spo0TU、spo0TV、spo0TW、spo0TX、spo0TY、spo0TZ、spo0UA、spo0UB、spo0UC、spo0UD、spo0UE、spo0UF、spo0UG、spo0UH、spo0UI、spo0UJ、spo0UK、spo0UL、spo0UM、spo0UN、spo0UO、spo0UP、spo0UQ、spo0UR、spo0US、spo0UT、spo0UU、spo0UV、spo0UW、spo0UX、spo0UY、spo0UZ、spo0VA、spo0VB、spo0VC、spo0VD、spo0VE、spo0VF、spo0VG、spo0VH、spo0VI、spo0VJ、spo0VK、spo0VL、spo0VM、spo0VN、spo0VO、spo0VP、spo0VQ、spo0VR、spo0VS、spo0VT、spo0VU、spo0VV、spo0VW、spo0VX、spo0VY、spo0VZ、spo0WA、spo0WB、spo0WC、spo0WD、spo0WE、spo0WF、spo0WG、spo0WH、spo0WI、spo0WJ、spo0WK、spo0WL、spo0WM、spo0WN、spo0WO、spo0WP、spo0WQ、spo0WR、spo0WS、spo0WT、spo0WU、spo0WV、spo0WW、spo0WX、spo0WY、spo0WZ、spo0XA、spo0XB、spo0XC、spo0XD、spo0XE、spo0XF、spo0XG、spo0XH、spo0XI、spo0XJ、spo0XK、spo0XL、spo0XM、spo0XN、spo0XO、spo0XP、spo0XQ、spo0XR、spo0XS、spo0XT、spo0XU、spo0XV、spo0XW、spo0XX、spo0XY、spo0XZ、spo0YA、spo0YB、spo0YC、spo0YD、spo0YE、spo0YF、spo0YG、spo0YH、spo0YI、spo0YJ、spo0YK、spo0YL、spo0YM、spo0YN、spo0YO、spo0YP、spo0YQ、spo0YR、spo0YS、spo0YT、spo0YU、spo0YV、spo0YW、spo0YX、spo0YY、spo0YZ、spo0ZA、spo0ZB、spo0ZC、spo0ZD、spo0ZE、spo0ZF、spo0ZG、spo0ZH、spo0ZI、spo0ZJ、spo0ZK、spo0ZL、spo0ZM、spo0ZN、spo0ZO、spo0ZP、spo0ZQ、spo0ZR、spo0ZS、spo0ZT、spo0ZU、spo0ZV、spo0ZW、spo0ZX、spo0ZY、spo0ZZ

#### 【 0 0 3 6 】

いくつかの態様において、組換えによる芽胞形成欠失は、宿主細菌における他の結晶タンパク質および他の毒性関連芽胞形成産物の産生の欠失をもたらす。例えば、spo0A-B tは、C r y 5 Bまたは他のエンドトキシン、例えばC r y 1、C r y 4またはC r y 8を産生しない。いくつかの態様において、タンパク質結晶の形成にさらなるC r y タンパク質が用いられないことを確実にするために、他のC r y タンパク質および/またはアクセサリタンパク質の遺伝子が欠失または不活性化されうる。

#### 【 0 0 3 7 】

芽胞形成欠失細菌のそのような態様において、芽胞形成欠失細菌は、細菌の芽胞形成期に先立って、例えば増殖(vegetative growth)または静止期において活発におよび/または高度に発現されるプロモーターの制御下のC r y 5 Bのような単一の結晶タンパク質遺伝子を発現するように組換えられうる。そのような組換え細菌は、単一の結晶タンパク質のみを発現させることができ、得られる殺線虫結晶は均一に単一種の結晶タンパク質のみからなる。いくつかの態様において、プロモーターは異種(すなわち、芽胞不形成特異的プロモーター)である。一態様において、プロモーターはC r y 3 A、G e r A、G N A TまたはT a d Aプロモーターである。

#### 【 0 0 3 8 】

いくつかの態様においては、増殖サイクルの終了時に自己溶解する芽胞不形成細菌の株を使用しうる。精製プロセスにおけるホモジナイズステップを回避または縮小しうるように、そのような自己溶解細菌を使用しうる。

#### 【 0 0 3 9 】

細菌は、次の理由で、S T Hの防除に特に適用しうる: 1) 組換え細菌は、哺乳動物対象の消化管に投与される前に、大量のC r y タンパク質を安価に発現することができ、消化管内で細菌により分泌されうるC r y タンパク質とは独立してそのように発現されるC r y タンパク質は、S T Hに対し顕著に作用することが示されている。2) 精製C r y タンパク質を用いて鉤虫、鞭虫およびH. bakeriに対処するための、いずれも感染齧歯動物において行われた研究により、哺乳動物消化管中のS T HはC r y タンパク質を摂取して、C r y タンパク質によって死滅/無毒化されることが示されている。3) 処置用タンパク質を、該タンパク質が精製されないで発現する組換え細菌は、タンパク質精製工程が

不要であるから、製造がより安価である。4) STH処置タンパク質(例えばCry5B)をもたらす組換え細菌は、精製タンパク質(例えばCry5B)よりも、同じ生物活性タンパク質量(例えば総Cry5B)において、感染処置の効率が高い。

#### 【0040】

本開示の組成物および方法の微生物は、死滅および不活化された形態のBacillus種、例えばBacillus subtilis(例えばB. subtilis natto、およびB. subtilis PY79)、B. cereus(例えばB. cereus var. Toyoi (Toyocerin)、B. cereus var. toyoi)、B. toyonensis、B. clausii、B. pumilus、およびB. thuringiensisを包含する。B. subtilisは、ヒトにおいて安全に摂取される食品添加物として広く特徴付けられている。いくつかの例示態様において、死滅および不活化形態のB. thuringiensisを使用する。

10

#### 【0041】

他の有用な細菌は、以下の細菌の芽胞不形成バリエーションを包含するが、それに限定されない：Lactococcus sp.、Bifidobacterium sp.、Streptococcus sp.、Clostridium sp.、Sporolactobacillus sp.、Sporosarcina sp.、Brevibacillus sp.、Leuconostoc sp.、Pediococcus sp.、Enterococcus sp.、およびEscherichia sp. Lactobacillus sp.は、L. lactis、L. casei、L. paracasei、L. acidophilus、L. bulgaricus、L. delbrueckii subsp. bulgaricus、L. helveticus、L. plantarum、L. salivarius、L. reuteri、L. gasseri、およびL. animalisを包含するが、それに限定されない。Bifidobacterium sp.は、B. animalis、B. bifidum、B. breve、B. infantis、およびB. longumを包含するが、それに限定されない。Streptococcus sp.は、S. thermophilusを包含するが、それに限定されない。Clostridium sp.は、Clostridium butyricumを包含するが、それに限定されない。Sporolactobacillus sp.は、Sporolactobacillus vineaeを包含するが、それに限定されない。Sporosarcina sp.は、Sporosarcina pasteuriiを包含するが、それに限定されない。Brevibacillus sp.は、Brevibacillus laterosporusを包含するが、それに限定されない。

20

#### 【0042】

本開示に関して有用なさらに別の細菌は、グラム陰性細菌の形態を包含する。いくつかの例示態様において、グラム陰性細菌は、E. coli種(例えば、NISSLE 1917)、およびPseudomonas種(例えばPseudomonas fluorescens)を包含する。本開示の方法によって死滅または不活化することができるCry発現グラム陰性細菌の例は、GeららのCry発現E. coli株(“Hyperexpression of a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin-encoding gene in Escherichia coli: properties of the product”, Gene, 93: 49-54 (1990))、およびPengららのP. fluorescens株(“A Delta-endotoxin encoded in Pseudomonas fluorescens displays a high degree of insecticidal activity”, App. Microbiol Biotech., (2003), 63:300-306)を包含する。

30

#### 【0043】

##### 殺線虫タンパク質

本書において、「殺線虫タンパク質」とは、文脈から異義であることが明らかでない限り、線虫または蠕虫に対し毒性活性を示す任意のタンパク質をいう。殺線虫タンパク質の例には、蠕虫(例えば回虫)に感染した脊椎動物の消化管への経口投与(経口摂取物、飲料、食物、ピル、カプセル、粉末等)による送達のための、細菌の駆虫Cryタンパク質(例えばCrickmore et al., 1998 Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3): 807-813; Schnepf et al., 1998 Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3): 775-806; B. thuringiensis Cryタンパク質Cry5B(例えば配列番号1)およびそのサブバリエーション、Cry13A(例えば配列番号2)およびそのサブバリエーション、Cry14A(例えば配列番号3)およびそのサブバリエーション、Cry21A(例えば配列番号4~5)およびそのサブバリエーション、ならびにCry6Aおよびそのサブバリエーション(例えば配列番号6)を包含するが、それに限定されない)のような結晶タンパク質が含まれる。Cryタンパク質は、細菌のサイトゾル中に発現され、結晶を形成し、該駆虫タンパク質へのアクセスは、細菌の溶解または開放によって可能となる。殺線虫

40

50

結晶タンパク質（例えばCryタンパク質）から形成される殺線虫結晶は蠕虫において毒性を誘導するが、これは、可溶化または脱結晶化によって個々の殺線虫結晶タンパク質を放出し、それによって結晶タンパク質が蠕虫に直接作用できるようになることによる。

【0044】

本発明の殺線虫結晶は、それを形成する個々の結晶タンパク質よりも安定であり、タンパク質分解に抵抗性である。本発明の細菌により発現される結晶タンパク質は、約100kDa～約170kDa、約110kDa～約160kDa、約120kDa～約150kDa、約125kDa～約145kDa、または約130kDa～約140kDaの結晶を形成する。結晶タンパク質は集合して、より大きい殺線虫結晶を形成する。

【0045】

各殺線虫結晶は、その最長軸において約100nm、約200nm、約300nm、約400nm、約500nm、約600nm、約700nm、約800nm、約900nm、約1000nm、約1100nm、約1200nm、約1300nm、約1400nm、約1500nm、約1600nm、約1700nm、約1800nm、約1900nm、または約2000nmのサイズを有しうる。

【0046】

いくつかの態様において、本発明の殺線虫結晶は、各殺線虫結晶の最長軸の長さが、約100nm～約2000nm、約200nm～約2000nm、約300nm～約2000nm、約400nm～約2000nm、約500nm～約2000nm、約600nm～約2000nm、約700nm～約2000nm、約800nm～約2000nm、約900nm～約2000nm、約1000nm～約2000nmでありうる。

【0047】

いくつかの態様において、本発明の殺線虫結晶は、各殺線虫結晶の最長軸の長さが、約100nm～約1000nm、約200nm～約1000nm、約300nm～約1000nm、約400nm～約1000nm、約500nm～約1000nm、約600nm～約1000nm、約700nm～約1000nm、約800nm～約1000nm、約900nm～約1000nm、約1000nm～約1000nmでありうる。

【0048】

いくつかの態様において、第1の種類の殺線虫結晶タンパク質（例えばCry5B）から形成される純粋な殺線虫結晶を、第2の種類の殺線虫結晶タンパク質（例えばCry5C、Cry5D、Cry6A、Cry13A、Cry14A、Cry21A、Cry21B、またはCry55B）から形成される殺線虫結晶と、1つの医薬製剤中に組み合わせうる。そのような態様においては、1つの製剤で複数形態の純粋殺線虫結晶を同時に消化管にもたすことが可能である。例えば、Cry5B耐性回虫とCry21A耐性回虫の間に交差耐性がない故に、消化管へのCry5BとCry21Aの同時投与は、該組み合わせ療法に対する寄生虫耐性の発現を阻止しうる。

【0049】

長期間の実施において、組換え細菌を環境的に含むために、異種Cryタンパク質コード配列を導入するために使用されるプラスミドから抗生物質選択能（例えば遺伝子選択マーカー）を排除すること、また、脊椎動物宿主体外では複製不能な細菌株を使用することが望まれうる。例えば、LAB（Lactic Acid Bacteria）は、チミジンまたはチミンが存在しない環境では増殖せず、チミジンおよびチミンが存在する脊椎動物の腸においてのみ増殖することができるように、チミジンまたはチミン合成において独立栄養性であるように組換えられている。例えば、Steidler L, et al. “Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10.” *Nat Biotechnol* 21: 785-789 (2003)を参照されたい。

【0050】

Cry形質転換細菌、例えばBacillusまたはLABを培養し、そのような細菌による、細胞内の、膜係留された、または分泌されたCryタンパク質の発現を、各Cryタンパク質に対して作られた抗体および標準的なウエスタンブロットティングまたはELISA技

10

20

30

40

50

術を用いて確認しうる。

【0051】

すべてのコンストラクトの生物活性を評価するために、Cryタンパク質（全長、トランケートされたもの、またはバリエーション）を発現する組換え細菌を、*C. elegans*に与える。次いで、*C. elegans*に対するCryタンパク質毒性を、固体媒体上、および液体ウェル内での、LC50、繁殖（brood）サイズ、成長阻害のアッセイによって定量しうる。*C. elegans*はCryタンパク質に、固体媒体上/液体ウェル内に分泌されたタンパク質を介して、または細菌を潰す、解放する、および消化する該虫の能力によって、アクセスすることができる。組換え細菌が生物活性Cryタンパク質を産生していることの確認を得ることができる。さらに、生物活性（例えば $\mu\text{g}/\text{mL}$ のLC50）を定量して、最高の活性を示すコンストラクトを決定することができる。

10

【0052】

トランケーション、バリエーション、およびサブバリエーション

結晶タンパク質は、その有効性向上のためにトランケートされうる。STH防除のためのBt毒素（例えば結晶タンパク質）の有効性は、STHが摂取可能なタンパク質サイズによって制限されうる。いくつかの寄生回虫は、約40kDaよりも大きいタンパク質を摂取し難い。したがって、任意の特定のBt毒の有効性は、STHが取り込むタンパク質のサイズ排除によって制限され得、したがって、STH腸に容易に吸収されるように、毒性活性を維持しながら、十分小さいものであるべきである。トランケートされた毒素は、細菌における発現がより容易でありうる。トランケートされた毒素を製造することにより、標的STHが、全長プロトキシン（不活性）のトランケートされた活性毒素形態への正しいプロセシングのための適正なプロテアーゼを有しなければならないという要件も緩和される。したがって、トランケートされた毒素は、STH標的において適正なプロテアーゼプロセシング酵素が存在するか否かに関わらず、直ちに中毒のために利用可能である。また、トランケートされた毒素は、それを発現する細胞内において可溶性であり、不溶性封入体（該細胞に対し毒性でありうるか、または毒素の誤った折り畳みをもたらす）を形成する可能性がより低いので、トランケートされた毒素は微生物中で、より高いレベルで発現しうる。したがって、トランケートされたBt毒素フラグメント（例えば結晶タンパク質フラグメント）を製造することが望ましい。「トランケートされた」とは、Bt毒素タンパク質（結晶タンパク質）に関して言うとき、全長ではないが、対応する全長Bt毒素タンパク質の毒素活性を少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%またはそれ以上維持するBt毒素タンパク質のことをいう。

20

30

【0053】

Cryタンパク質の「バリエーション」または「サブバリエーション」は、対応する野生型ポリペプチドまたはそのトランケートされたバージョンに対して、1つまたはそれ以上の置換、例えば20以下の置換もしくは10以下の置換、または10%またはそれ以下の残基における置換を有するポリペプチドを包含する。該バリエーション、サブバリエーションまたはトランケートされたポリペプチドは、対応する野生型ポリペプチドまたはトランケートされたバージョンの活性、例えば毒性活性の、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を有する。保存的置換は、下記群内での置換を包含する：グリシン、アラニン、スレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、システイン；リジン、アルギニン；アスパラギン酸、グルタミン酸；セリン、スレオニン；アスパラギン、グルタミン；フェニルアラニン、チロシン。バリエーションCryタンパク質の一例は、407位のセリンがシステインで置換された（Ser407Cys）Cry5B（配列番号7）である。

40

【0054】

結晶タンパク質は、全長のもの、トランケートされたもの、バリエーション、またはサブバリエーションでありうる。トランケートされた結晶タンパク質は、毒素活性を維持するNおよ

50

びC末端の任意のトランケーションを含みうる。トランケートされた形態は、全長ではないが、対応する全長Bt毒素タンパク質の毒性活性の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%もしくは90%またはそれ以上を維持する。例えば、トランケートされた部分は、全長タンパク質の保存されたブロック5の末端とC末端との間でトランケートされていてよい。図1Aおよび1Bに、さまざまなCryタンパク質において、付番された保存されたアミノ酸ブロック(1~5)を比較する図を示す。

#### 【0055】

一態様において、トランケートされた結晶タンパク質は、結晶タンパク質の毒素ドメイン、および場合により5、10または20個までのさらなるアミノ酸を含みうる。トランケートされた結晶タンパク質は、ブロック5の保存されたアミノ酸配列の後でトランケートされていてよく、場合により5、10または20個までのさらなるアミノ酸を含みうる。ブロック5の保存されたアミノ酸配列は、モチーフDRIEF(配列番号23)、DRLEF(配列番号24)または何らかの他の関連配列と、それに続くアミノ酸残基、例えば該モチーフの上流の3アミノ酸および下流の2アミノ酸を含みうる。表1に、さまざまなCryタンパク質のブロック5配列を示す。例えば、Schnepf, E., et al., *Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 775-806, (例えば、第781頁、Figure 3) (Sept. 1998); およびCrickmore et al., *Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 807-813 (Sept. 1998)を参照されたい。トランケートされた結晶タンパク質は、N末端でトランケートされていてよい。例えば、トランケートされた結晶タンパク質は、N末端の最初の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50個のアミノ酸を含まないものでありうる。

#### 【0056】

Cryタンパク質バリエーションは、全長Cryタンパク質およびトランケートされたCryタンパク質、そのCryタンパク質バリエーションまたはサブバリエーションを包含する、知られているCryタンパク質配列、例えばCrickmore et al., 1998 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 807-813, またはSchnepf et al., 1998 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 775-806に開示された任意のCryタンパク質配列に対して、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%のアミノ酸配列同一性を示しうる。また、いくつかの態様においては、そのようなCryタンパク質およびトランケーションならびにそのバリエーションをコードするポリヌクレオチドが企図される

#### 【0057】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1	
タンパク質	ブロック5の保存されたグループ
Cry1A	VYIDRIEFVP (配列番号 7)
Cry3A	VYIDKIEFIP (配列番号 8)
Cry4A	VLIDKIEFLP (配列番号 9)
Cry5A	VFLDRIEFIP (配列番号 10)
Cry5B	LFLDRIEFVP (配列番号 11)
Cry7A	FYVDSIEFIP (配列番号 12)
Cry8A	VYIDRIEFIP (配列番号 13)
Cry9A	VYVDRIEFIP (配列番号 14)
Cry10A	IYIDKIEFIP (配列番号 15)
Cry12A	MVLDRIEFVP (配列番号 16)
Cry13A	IYLDRLIEFVP (配列番号 17)
Cry14A	IFIDRIEFIP (配列番号 18)
Cry19A	LILDKIEFLP (配列番号 19)
Cry20A	FVLDKIELIP (配列番号 20)
Cry21A	LFLDRIEFIS (配列番号 21)
コンセンサス	i-iDkIEFiP (配列番号 22)

10

20

## 【0058】

30

表 1 中、コンセンサス配列は、該グループのアラインされたタンパク質の少なくとも 75% が同一または保存的アミノ酸配列を有する位置を示している。該配列中の大文字は、その位置において少なくとも 75% の残基が同一であることを示す。小文字は、その位置において少なくとも 75% の残基が保存的であることを示す。保存的アミノ酸は、次の群に属するものである：a (A、G、S、T または P)；d (D、E、N または Q)；f (F、W または Y)、I (I、L、M または V)、および k (K または R)。

## 【0059】

トランケートされた結晶タンパク質は、Cry 5 B、例えば *B. thuringiensis* Cry 5 B (図 2) のトランケートされた形態でありうる。トランケートされた Cry 5 B は、およそアミノ酸 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45 または 50 から、少なくともおよそアミノ酸 693 まで伸長しうる。Cry 5 B のトランケートされた形態は、さらに、保存されたブロック 5 の後の C 末端側からの 5、10、20、30、40 または 50 個までのアミノ酸を含んでもよく、例えばおよそアミノ酸 698、703、713、733 または 743 までを含んでもよい。

40

## 【0060】

トランケートされた結晶タンパク質は、Cry 13 A、例えば *B. thuringiensis* Cry 13 A (図 3) のトランケートされた形態でありうる。トランケートされた Cry 13 A は、およそアミノ酸 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45 または 50 から、少なくともおよそアミノ酸 688 まで伸長しうる。Cry 13 A のトランケートされた形態は、さらに、保存されたブロック 5 の後の C 末

50

端側からの5、10、20、30、40または50アミノ酸を含んでもよく、例えばおよそアミノ酸693、698、708、718、728または738までを含んでもよい。

【0061】

トランケートされた結晶タンパク質は、*B. thuringiensis* Cry 14 A (図4)のトランケートされた形態でありうる。トランケートされたCry 14 Aは、およそアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50から、少なくともおよそアミノ酸675まで伸長しうる。Cry 14 Aのトランケートされた形態は、さらに、保存されたブロック5の後のC末端側からの5、10、20、30、40または50アミノ酸を含んでもよく、例えばおよそアミノ酸680、685、695、705、715または725までを含んでもよい。

10

【0062】

トランケートされた結晶タンパク質は、Cry 21 A、例えば*B. thuringiensis* Cry 21 A a 1 (図5A)またはCry 21 A a 2 (図5B)のトランケートされた形態でありうる。トランケートされたCry 21 Aは、およそアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50から、少なくともおよそアミノ酸685まで伸長しうる。Cry 21 Aのトランケートされた形態は、さらに、保存されたブロック5の後のC末端側からの5、10、20、30、40または50アミノ酸を含んでもよく、例えばおよそアミノ酸690、695、705、715、725または735までを含んでもよい。

【0063】

Cryタンパク質のアミノ酸配列バリエーション、トランケートされたバージョン、またはその両方コードする核酸分子を、当分野で知られたさまざまな方法によって作製する。そのような方法は、天然原料からの単離(天然に存在するアミノ酸配列バリエーションの場合)、または例えば、先に作製されたバリエーションもしくは非バリエーションバージョンのタンパク質におけるオリゴヌクレオチド仲介(または部位特異的)変異導入、PCR変異導入およびカセット変異導入による作製を包含するが、それに限定されない。さらに、本技術は、特定の生物において好ましいコドンを含むように、特定の生物においてあまり用いられないコドンを排除するように、または転写またはRNAプロセッシング等を阻害しうる配列を排除するように、ヌクレオチドが改変されている合成核酸分子を含む。

20

【0064】

Cryタンパク質のトランケーションは、保存されたブロック1~5を少なくとも含むうる。図1Aおよび1Bに示されるように、既知のCry毒素のアラインメントは、該タンパク質の多くに共通で活性毒素ドメイン中に位置すると考えられる、5つの保存された配列ブロック(ブロック1~5)をあらわす。de Maagd, R.A., et al. "How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world." *Trends in Genetics* 17(4): 193-99 (April 2001)を参照されたい。配列のカルボキシ末端側の比較により、活性毒素コア外に3つのさらなるブロックが存在すると考えられている。Schnepf, E., et al. "Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 775-806 (Sept. 1998)を参照されたい。したがって、Cryタンパク質トランケーションは、保存されたブロック5のアミノ酸配列(例えばDRIEF(配列番号23)またはDRLF(配列番号24))の後にトランケートされうる。あるいは、Cryタンパク質トランケーションは、保存されたブロック5のアミノ酸配列(例えばDRIEF(配列番号23)またはDRLF(配列番号24))にC末端ドメインのおよそ2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45または50アミノ酸を付け加えたものの後にトランケートされうる。

30

40

【0065】

Cry 5 B a 1の完全なアミノ酸配列を図2に示す。Cry 5 Bにおいて、保存されたアミノ酸配列DRIEF(配列番号23)は、アミノ酸番号693で終わる。したがって、Cry 5 Bのトランケートされた形態は、少なくともアミノ酸50からおよそ693ま

50

で含みうる。Cry 5 Bのトランケートされた形態は、およそアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50から、少なくともおよそアミノ酸693まで伸長しうる。その代わりに、またはそれに加えて、Cry 5 Bのトランケートされた形態は、C末端ドメインのおよそ5、10、15、20、25、30、35または40個のさらなるアミノ酸を含みうる。

#### 【0066】

Cry 13 A a 1の完全なアミノ酸配列を図3に示す。Cry 13 Aにおいて、保存されたアミノ酸配列DRLEF（配列番号24）はアミノ酸番号688で終わる。したがって、Cry 13 Aのトランケートされた形態は、少なくともアミノ酸50からおよそ688までを含みうる。Cry 5 Bのトランケートされた形態は、およそアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50から、少なくともおよそアミノ酸688まで伸長しうる。その代わりに、またはそれに加えて、Cry 13 Aのトランケートされた形態は、C末端ドメインのおよそ5、10、15、20、25、30、35または40個のさらなるアミノ酸を含みうる。

10

#### 【0067】

Cry 14 A a 1の完全なアミノ酸配列を図4に示す。Cry 14 Aにおいて、保存されたアミノ酸配列DRIEF（配列番号23）はアミノ酸番号675で終わる。したがって、Cry 14 Aのトランケートされた形態は、少なくともアミノ酸50からおよそ675までを含みうる。Cry 5 Bのトランケートされた形態は、およそアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50から、少なくともおよそアミノ酸675まで伸長しうる。その代わりに、またはそれに加えて、Cry 14 Aのトランケートされた形態は、C末端ドメインのおよそ5、10、15、20、25、30、35または40個のさらなるアミノ酸を含みうる。

20

#### 【0068】

Cry 21 A a 1およびCry 21 A a 2の完全なアミノ酸配列を図5 Aおよび図5 Bにそれぞれ示す。Cry 21 A a 2のアミノ酸配列は、Cry 21 A a 1のアミノ酸配列との同一性が約98%である。Cry 21 Aにおいて、保存されたアミノ酸配列DRIEF（配列番号23）はアミノ酸番号685で終わる。したがって、Cry 21 Aのトランケートされた形態は、少なくともアミノ酸50からおよそ685までを含みうる。Cry 5 Bのトランケートされた形態は、およそアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50から、少なくともおよそアミノ酸685まで伸長しうる。その代わりに、またはそれに加えて、Cry 21 Aのトランケートされた形態は、C末端ドメインのおよそ5、10、15、20、25、30、35または40個のさらなるアミノ酸を含みうる。

30

#### 【0069】

##### 駆虫実験

異種Cryタンパク質発現および生物活性を所望の細菌において確認したら、該組換え細菌を、治療型および予防型の駆虫実験に使用しうる。

#### 【0070】

抗体作製：組換えCryタンパク質（例えば、Cry 5 B、Cry 21 A、Cry 14 A、Cry 13 AおよびCry 6 A、全長およびトランケートされたタンパク質）に対する抗体を、標準的な方法（例えば、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009)）にしたがって作製し精製しうる。

40

#### 【0071】

生物活性試験：すべてのコンストラクトの生物活性を試験するために、異種Cryタンパク質を発現する組換えパチルスまたは他の細菌を、自由生活線虫*C. elegans*に与える。*C. elegans*は、固体媒体上/液体ウェル内に分泌されるタンパク質を介して、細菌が壊れて開くときに自然に放出されるタンパク質によって、または細菌を破壊および消化して細菌細胞を開放する該虫の能力によって、Cryタンパク質にアクセスすることができる。

#### 【0072】

50

齧歯動物寄生虫試験：3つの腸寄生線虫を試験する：マウスにおける*H. bakeri*（小腸寄生線虫）、マウスにおける*Trichuris muris*（鞭虫）、ハムスターにおける*A. ceylanicum*（鉤虫）を試験する。本試験では、1）消化管において異種*Cry*発現細菌が棲みつくか、また、どのくらいの期間棲みつくか；および2）該細菌が、腸寄生線虫の寄生獲得およびその経過に対してどのように影響するか、を調べる。

【0073】

寄生虫試験：発現および生物活性に基づいて最良の異種*Cry*タンパク質発現組換え細菌株を、ナイーブ（未感染）マウスに経口摂取させる。

【0074】

経過改善効果試験：マウスを*H. bakeri*に感染させる。2週間後、感染マウスを、異種*Cry*タンパク質発現細菌または対照細菌でそれぞれ処置する。腸内の虫の量および糞便中の卵の数をを用いて、既に線虫感染しているマウスにおいて組換え細菌が駆除効果をもたらすかを決定する。

10

【0075】

寄生虫の例

本開示の方法は、*Bacillus*由来の結晶タンパク質およびその誘導体を使用する、寄生虫、例えば線虫および扁形動物の防除に関する。本発明の範囲に含まれる寄生虫は、以下に属するものを包含するが、それに限定されない：Class Adenophorea、例えばOrder Mononchida、Family Plectidae、およびOrder Stichosomida、Family Mermithidae およびTetradonematidae；Class Secernentea、例えばOrder Rhabditida、Family Carabonematidae、Cephalobidae、Chambersiellidae、Heterorhabditidae、Oxyuridae、Panagrolaimidae、Rhabditidae、Steinernematidae、Syrphonematidae、Syrphonematidae、またはThelastomatidae；Order Spirurida、Family Filariidae、Onchocercidae、Physalopteridae、Syngamidae、Spiruridae、Subuluridae、またはThelaziidae；Order Diplogasterida、Family Diplogasteridae；およびOrder Tylenchida、Family Allantonematidae、Aphelenchidae、Aphelenchoididae、Entaphelenchidae、Fergusobiidae、Phaenopsitylenchidae、Sphaerulariidae、Anguinidae、Dolichodoridae、Belonolaimidae、Pratylenchidae、Hoplolaimidae、Heteroderidae、Criconematidae、Tylenchulidae、またはTylenchidae。一態様において、寄生虫は、Class Secernentea、Order Ascaridida、Family Ascarididae；Class Adenophorea、Order Trichurida、Family Trichuridae；Class Secernentea、Order Strongylida、Family Ancylostomatidae（ancylostomidae）またはTrichostrongylidae；またはClass Secernentea、Order Spirurida、Family Dracunculidae、Filariidae、またはOnchocercidaeに属するものである。

20

30

【0076】

寄生虫は蠕虫でありうる。本発明の範囲に含まれる蠕虫は、以下に属するものを包含するが、それに限定されない：Phylum Annelida、Class Polychaetae、Class Myzostomida、Class Clitellata、Subclass Hirudinea、Order Gnathobdellidae、Order Rhyngobdellidae；Phylum Platyhelminthes（Flatworms）、Class Turbellaria、Class Monogenea、Order Monopisthocotylea、Order Polyopisthocotylea、Class Trematoda、Subclass Aspidogasrea、Subclass Digenea；Super Order Anepitheliocystida、Order Strigeatida、Family Schistosomatidae、Subfamily Schistosomatinae、Genus Schistosoma、Order Echinostomatida、Family Fasciolidae、Family Paramphistomatidae、Family Echinostomatidae；Super Order Epitheliocystida、Order Plagiorchiida、Family Dicrocoeliidae、Family Troglotrematidae、Order Opisthorchiida、Family Heterophyidae、Family Opisthorchiidae、Class Cestoda、Subclass Cestodaria、Subclass Eucestoda、Order Pseudophyllidea、Family Diphyllbothriidae、Order Cyclophyllidea、Family Taeniidae、Family Hymenolepididae、Family Dilepididae、Family Mesocestoididae、Order Tetraphyllidea、Order Proteocephalata、またはOrder Spatheobothridea。例えば、本発

40

50

明の範囲におけるCryタンパク質は、回虫、鞭虫、鉤虫、住血吸虫または吸虫を、阻害し、抑制し、またはそれに対処するために使用しうる。

【0077】

寄生虫は、消化管寄生性の回虫/線虫であってもよい。消化管寄生性の回虫/線虫は、以下の種を包含するが、それに限定されない：Haemonochus、Cooperia、Ostertagia、Trichostrongylus、Teladorsagia、Nematodirus、Ancylostoma、Cyathostominaea/Cyathostomin/Cyathostome、Strongylus、Parascaris、Ascaris、Trichuris、Oesophagostomum/Oesophagustomum、Trichiuris、Bunostomum、Oxyuris、Chabertia、Habronema、Draschia、Triodontophorus、Toxocara、Toxascaris、およびUncinaria。Haemonochus種は、Haemonochus contortusおよびHaemonochus pl 10  
 aceiを包含するが、それに限定されない。Cooperia種は、Cooperia oncophora、Cooperia pectinata、およびCooperia curticeiを包含するが、それに限定されない。Ostertagia種は、Ostertagia ostertagi、Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta、およびOstertagia trifurcataを包含するが、それに限定されない。Trichostrongylus種は、Trichostrongylus axei、Trichostrongylus colubriformis、およびT. circumcinctaを包含するが、それに限定されない。Teladorsagia種は、Teladorsagia (Ostertagia) circumcinctaを包含するが、それに限定されない。Nematodirus種は、Nematodirus s pathigerを包含するが、それに限定されない。Ancylostoma種は、Ancylostoma caninum、Ancylostoma braziliense、およびAncylostoma tubaeformeを包含するが、そ 20  
 れに限定されない。Cyathostominaea/Cyathostomin/Cyathostome線虫もまた包含される。Strongylus種(小および大)は、Strongylus vulgaris、Strongylus equinus、およびStrongylus edentatusを包含するが、それに限定されない。Parascaris種は、Parascaris equorumを包含するが、それに限定されない。Strongyloides種は、Strongyloides westeriを包含するが、それに限定されない。Ascaris種は、Ascaris suumを包含するが、それに限定されない。Trichuris種は、Trichuris globulosa、Trichuris suis、Trichuris campanula、およびTrichuris vulpisを包含するが、それに限定されない。Oesophagostomum/Oesophagustomum種は、Oesophagostomum dentatum、Oesophagostomum quadrispinulatum、Oesophagostomum columbianum、およびOesophagostomum venulosumを包含するが、それに限定されない。Trichiuris種は、Trichiuris ovisを包含するが、それに限定されない。Bunostomum種は、Bunostomum trigonocephalumを包含するが、それに限定されない。Oxyuris種は、Oxyuris equi( 30  
 蟯虫)を包含するが、それに限定されない。Chabertia種は、Chabertia ovinaを包含するが、それに限定されない。Habronema種は、Habronema microstoma、およびHabronema muscaeを包含するが、それに限定されない。Draschia種は、Draschia megastomaを包含するが、それに限定されない。Triodontophorus種は、Triodontophorus minor、およびTriodontophorus serratesを包含するが、それに限定されない。Toxocara種は、Toxocara canis、およびToxocara catiを包含するが、それに限定されない。Toxascaris種は、Toxascaris leonineを包含するが、それに限定されない。Uncinaria種は、Uncinaria stenocephalaを包含するが、それに限定されない。ヒトの消化管に寄生する回虫類は、鉤虫であるAncylostoma duodenaleおよびNecator americanus、鞭虫 40  
 であるTrichuris trichiura、回虫であるAscaris lumbricoides、線虫であるStrongyloides stercoralis、および蟯虫であるEnterobius vermiculariを包含するが、それに限定されない。

【0078】

さらなる処置剤

いくつかの態様において、本発明の医薬組成物は、少なくとも1つのさらなる処置剤との組み合わせとして投与される。さらなる処置剤は、例えば、小分子またはポリペプチド(抗体およびその断片を包含する)でありうる。さらなる態様において、さらなる処置剤は、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストである。いくつかの態様において、さら 50  
 なる処置剤は、本発明の医薬組成物と同時に投与される。いくつかの態様において、さら

なる処置剤は、本発明の医薬組成物と（順序は問わず）前後して投与される。いくつかの態様において、前記ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストは、レバミソールファミリーのニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストから選択される。いくつかの態様において、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストはレバミソールである。いくつかの態様において、レバミソールが、約  $0.1 \text{ mg/kg}$  ~ 約  $5.0 \text{ mg/kg}$  の量で投与される。いくつかの態様において、ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストはピランテルまたはトリベンジミジン（tribendimidine）である。いくつかの態様において、ピランテルが、約  $1.0 \text{ mg/kg}$  ~ 約  $15.0 \text{ mg/kg}$  の量で投与される。いくつかの態様において、トリベンジミジンが、約  $0.25 \text{ mg/kg}$  ~ 約  $10 \text{ mg/kg}$  の量で投与される。

10

## 【0079】

## 投与、投与形態、医薬組成物

本発明は、対象の消化管への純粋な結晶タンパク質の投与を企図する。したがって、本発明の医薬組成物は、経口投与用に製剤化されうる。経口投与は好ましくは、水性懸濁液、エマルジョン、粉末または固体として行われる。本発明の組成物は、食物中に組み込まれるか、または使用者によって消費前に食物に添加されうる。消化管への投与は、（例えばゲルまたは半固形製剤である）肛門坐剤の形態であってもよい。そのような調製物はいずれも、標準的な方法を用いて調製される。

## 【0080】

本発明の処置方法は典型的には、病原体または寄生虫の抑制が望ましい任意の動物に対して実施される。いくつかの態様において、動物はヒトである。しかしながら、動物は、寄生虫/病原体抑制により経済的および健康上の利益がもたらされる任意の家畜または動物学的個体でありうる。本発明の方法は、鳥類、爬虫類、哺乳動物、例えばウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタおよび他の家畜、または動物学的関心が持たれるさまざまな動物を包含する任意の動物に有益でありうる。他の目的は、栄養の吸収、食餌の利用およびバイオアベイラビリティの技術に精通する者には容易に理解される。

20

## 【0081】

本発明はさらに、寄生虫感染を処置、軽減および/または防除するための処置システムを企図する。該システムは典型的には、本発明の処置用組成物を含む、または包装材料との組み合わせとして含む、パッケージの形態である。包装材料は、パッケージの構成成分の使用に関するラベルまたは指示書を含む。指示書は、本発明の方法または組成物のために本書に記載されるような、包装された構成成分の意図される使用を指示する。例えば、システムは、本発明の処置用組成物の1またはそれ以上の単位用量を含みうるが、それに限定されない。あるいは、システムは、バルクの量の処置用組成物を含むこともできる。ラベルは、処置用組成物を適切に単位用量またはバルク形態で使用するための指示書を含み、組成物の貯蔵、適用疾患、投与量、投与経路および投与方法等に関する情報をも含みうる。

30

## 【0082】

さらに、本発明のシステムは、意図される特定の用途に応じて、下記成分の1つまたはそれ以上を、一体的または別の包装中に含んでもよい：ビフィズス菌に適する（bifidogenic）オリゴ糖、香料、担体等の成分。一態様は、従来の液体製品と組み合わせて使用するための純粋な殺線虫結晶タンパク質の単位用量パッケージを、処置方法における使用のために該純粋な殺線虫結晶タンパク質を該製品と組み合わせるための指示書と共に含む。

40

## 【0083】

本発明の方法において異なる投与レジメンを用いる。いくつかの態様において、毎日の投与を、1日に1回、2回、3回または4回の回数で、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10日間にわたり行う。いくつかの態様において、1日1回または2回の投与を隔日に行う。

## 【0084】

腸および糞便中における寄生虫増殖を抑制するのに有効な活性成分を含有する組成物の

50

投与は、通常、体重約100kgのヒトに対しては、投与量当たり10mg～10gの組成物の1～10単位の投与量を、1日～1箇月間投与することからなる。単位投与量の投与は通常、12時間～4時間毎に行う。好ましくは、1日当たり2～4の投与量の組成物（それぞれ投与量当たり約0.1g～50gを含む）を1～7日間投与することが、所望の結果の達成のために十分である。

**【0085】**

さまざまな特定の態様において、本発明の組成物の有効用量は、成人患者に対しては組成物約0.01mg/kg～約100mg/kgの範囲、好ましくは組成物約0.1mg/kg～約10mg/kgの範囲でありうる。有効用量の対象への投与は、任意の適当な頻度で、例えば少なくとも週1回、好ましくは1日1回行いうる。小児投与量は成人投与量の15%～90%の範囲でありうる。

10

**【0086】**

他のいくつかの態様において、本発明の組成物を、生理学的状態の重篤度に応じて、継続して一定の投与量で、例えば約2g～約4g/日ないし約6g～約10g/日で投与しうる。感染が効果的に軽減されたら、多くの症例において、維持を目的として、対象への投与量を約2g～約4g/日に低減しうる。望ましい用量を、1日のうちに適当な間隔で、複数に（例えば2、3、4、5、6またはそれ以上に）分割した用量として投与しうる。

**【0087】**

本発明の医薬組成物は、当分野で知られた任意の許容される投与様式または手段で投与することができる。しかしながら、経口投与は、該投与経路が、純粋な殺線虫結晶タンパク質を消化管に送達する故に、好ましい。投与形態は、例えば固体、半固体、凍結乾燥粉末、または液体の投与形態であり得、その例は、錠剤、丸薬、軟または硬ゼラチンカプセル、散剤、溶液剤、懸濁液剤、坐剤、エーロゾル等であり得、正確な投与量で簡便に投与するのに適した単位用量の形態でありうる。投与形態の一例示態様は、本発明の純粋な殺線虫結晶タンパク質を乾燥形態で医薬担体との組み合わせとして含むカプセルである。そのような投与形態用のカプセルは、任意の適当な種類のもの、例えば従来のさまざまなゼラチンカプセルでありうる。

20

**【0088】**

純粋な殺線虫結晶タンパク質と組み合わせて使用される生理学的に適合性の担体媒体は、任意の単純な種類のもの、例えば薬学的に許容しうる担体、例えばフラクトオリゴ糖（FOS）媒体、または細菌種の製剤化（例えば経口投与形態への製剤化）に使用することのできる、組成物用の他の可溶性繊維、糖、栄養物もしくは基剤でありうる。他の担体媒体としては、マンニトール、イヌリン（多糖）、ポリデキストロース、アラビノガラクトン、ポリオールであるラクツロース、ラクチトール等が挙げられる。当業者には明らかのように、本発明の実施において、本書の記載に基づいてさまざまな材料を担体媒体として使用することができる。

30

**【0089】**

さまざまな態様において、担体媒体が存在する場合、任意の適当な量、例えば細菌種と担体媒体の総重量に対して担体媒体5重量%～95重量%の量で、細菌種と組み合わせることができる。他のいくつかの態様において、担体媒体の量は、5%、10%、12%、15%、20%、25%、28%、30%、40%、50%、60%、70%または75%のいずれかを下限とし、20%、22%、25%、28%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%または95%のいずれかであって下限よりも大きい値を上限とする範囲でありうる。特定の態様における担体媒体の量は、プロバイオティクスおよび医薬製剤の分野に精通する者には分かるように、その特定の投与形態、純粋な殺線虫結晶タンパク質の相対量、担体媒体と細菌種を含む組成物の総重量、および担体媒体の物理的および化学的性質、ならびに他の因子を考慮して決定しうる。

40

**【0090】**

いくつかの態様において、純粋な殺線虫結晶タンパク質は、該Cryタンパク質を胃の酸性環境から保護する組成物に製剤化される。したがって、本発明は、純粋な殺線虫結晶

50

タンパク質および薬学的に許容しうる耐酸性（「腸溶性」）担体を含む組成物を包含する。耐酸性とは、担体またはコーティングが酸性環境において溶解しないことを意味する。酸性環境は、pHが7未満であることによって特徴付けられる。耐酸性担体は、pH約4.0未満の酸に対して耐性である。好ましくは、耐酸性担体はpH2～3において溶解しない。最も好ましくは、耐酸性担体は、2未満のpHで溶解しない。純粋な殺線虫結晶タンパク質の胃酸からの保護のために、純粋な殺線虫結晶タンパク質を耐酸性担体でコーティングするか、または耐酸性担体に封入する。

#### 【0091】

いくつかの態様において、前記コーティングはpH感受性である。例えば、コーティングはpHが4.0よりも高まると溶解しうる。例えば、コーティングは、小腸におけるような中性環境において溶解し、胃におけるような酸性環境においては溶解しない。あるいは、腸溶性コーティングは、小腸に存在する消化酵素との接触のような特定の代謝イベントに暴露されたとき、溶解する。例えば、コーティングは、膵臓の酵素、例えばトリプシン、キモトリプシンまたは膵リパーゼによって消化される。製剤は小腸において水和される。コーティングの消化または溶解によって、純粋な殺線虫結晶タンパク質、例えば純粋なCry5Bが腸内へ放出されうる。

#### 【0092】

他のいくつかの態様において、純粋な殺線虫結晶タンパク質は、ゲルまたはペースト中、例えば無水炭水化物ペースト中に安定化される。他の製剤においては、純粋な殺線虫結晶タンパク質は凍結乾燥され、および/またはゲルもしくはペースト中に懸濁される。腸溶性コーティング材料は当分野で知られており、その例として、リンゴ酸-プロパン1,2-ジオールが挙げられる。セルロース誘導体、例えばセルロースアセテートフタレートまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート（HPMCP）も、腸溶性耐酸性コーティングにおいて有用である。他の適当な腸溶性コーティングとしては、セルロースアセテートフタレート、ポリビニルアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、およびメタクリル酸およびメタクリル酸メチルのアニオン性ポリマーが挙げられる。さらに別の適当な腸溶性コーティングは、水性エマルジョン形態のエチルアクリレート・メチルアクリル酸コポリマー、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネート（HPMAS）である。（例えば米国特許第5591433号を参照されたい。）腸溶性コーティングは、胃における溶解に耐え、中性またはアルカリ性の腸液中で溶解するように設計される。いくつかの態様において、純粋な殺線虫結晶タンパク質は好ましくは、乾燥粉末に調製される。適当な乾燥方法は、自然乾燥、強制空気乾燥、噴霧乾燥、凍結乾燥等を包含する。それらのうち、噴霧乾燥、ドラム乾燥、または強制空気乾燥が好ましい。乾燥の際に、保護剤、例えばスキムミルク、グルタミン酸ナトリウム、および糖を使用しうる。糖、グルコースおよびトレハロースを使用しうる。凍結乾燥の一例において、純粋な結晶タンパク質を-80で凍結し、次いでFreeZone 1Lベンチトップ凍結乾燥システム（Labconcoカタログ番号7740020）中に入れうる。このコンデンサーを-60に設定し、減圧を2.2mTorrに設定する。サンプルを一晩凍結乾燥する。噴霧乾燥の一例においては、固体が10% w/vのPCCサンプルを、Yamato Pulvis GB22（または任意の他の噴霧乾燥システム）を用いて、100μアトマイザーノズルから5mL/分で、噴霧空気を1kgf/m<sup>2</sup>に、乾燥空気を0.21m<sup>3</sup>/分に、入口/出口温度を98/59にそれぞれ設定して、噴霧乾燥する。

#### 【0093】

助剤および佐剤としては、例えば保存剤、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、乳化剤および分散剤が挙げられる。要すれば、汚染微生物の作用の抑制を、さまざまな抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等の使用により達成することができる。等張化剤、例えば糖、塩化ナトリウム等も含めうる。

#### 【0094】

固体投与形態は、コーティングおよびシェル、例えば当分野で周知の腸溶性コーティング等を伴って調製することができる。それは抑止剤を含むことができ、活性化化合物を腸管

10

20

30

40

50

内のある部分において遅延様式で放出する組成物でありうる。使用しうる包埋組成物の例は、ポリマー材料およびワックスである。場合により、1つまたはそれ以上の前記賦形剤を用いて活性化化合物をマイクロカプセル化形態とすることもできる。

【0095】

経口投与用の液体投与形態は、薬学的に許容しうるエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ剤およびエリキシル剤を包含する。そのような投与形態は、例えば、活性成分（例えば純粋な殺線虫結晶タンパク質）および場合により医薬佐剤を、担体、例えば水、食塩液、水性デキストロース、グリセロール、エタノール等；可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド；油、特に綿実油、落花生油、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタン脂肪酸エステル；またはそれら物質の混合物等に溶解、分散等させ、それにより溶液または懸濁液を形成することによって調製される。

10

【0096】

そのような投与形態を調製するための実際の方法は、当業者に知られているか、または明らかである。例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990)を参照することができる。

【0097】

方法

本発明の方法は、対象において寄生蠕虫感染を処置するためのものであり、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含む組成物を処置有効量で対象に投与することを含む。本発明の医薬組成物は、細菌芽胞、または結晶の形態の殺線虫結晶タンパク質以外の宿主細菌タンパク質を実質的に含まない。

20

【0098】

本発明の方法はまた、寄生蠕虫感染の重篤度を低下するためのものであり、単一種の殺線虫結晶タンパク質から形成される単離された天然の生物活性殺線虫結晶を含む組成物を処置有効量で対象に投与することを含み、該医薬組成物は、細菌芽胞、または結晶の形態の殺線虫結晶タンパク質以外の宿主細菌タンパク質を実質的に含まない。

【0099】

定義

本書において、文脈から異義であることが明らかでない限り、用語「処置」、および同様の用語、例えば「処置される」、「処置する」等は、有益な、または所望の結果（これは、臨床的に望ましい結果を包含し、好ましくは臨床的に望ましい結果である）を得るためのアプローチをさす。処置は、任意に、疾患の症状もしくは状態の改善、または疾患もしくは状態の進行の遅延を伴いうる。

30

【0100】

本書において、文脈から異義であることが明らかでない限り、「対象」とは、脊椎動物、例えば哺乳動物を意味する。哺乳動物は、ネコ、齧歯類、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジまたは霊長類でありうる。いくつかの態様において、対象はヒトである。

40

【0101】

本書において、文脈から異義であることが明らかでない限り、「発症の可能性を低減する」、「予防」、および同様の用語、例えば「予防される」、「予防する」等は、統計学的有意性、例えば指示される方法ステップを省略した場合に得られる結果との比較において示される統計学的有意性を以て、疾患または状態の発症もしくは再発の可能性を抑制または低下するためのアプローチを包含する。同様に、疾患もしくは状態の症状の発症もしくは再発の可能性を抑制または低下すること、または場合により、疾患もしくは状態の発症もしくは再発を遅延させること、または疾患もしくは状態の症状の発症もしくは再発を遅延させることも包含される。本書において、「予防」および同様の用語は、疾患または状態の発症または再発に先立って、疾患または状態の強さ、作用、症状および/または負

50

荷を低減することをも包含する。このような実施形態および関連する実施形態の方法は、土壌伝播蠕虫（STH）感染の発症を、実質的に阻止し、その重篤度を低下させ、またはその可能性を低下させる薬剤を、有効量または処置有効量で用いて実施されうる。本書において、組成物、薬剤または物質の「有効量」または「処置有効量」とは、所望の生物学的効果、例えば有益な結果、例えば臨床的結果を得るのに十分な量である。

#### 【0102】

本書において、文脈から異義であることが明らかでない限り、「食用油」は、ヒトまたは動物が摂取するのに適当な油を包含する。食用油の例としては、植物から抽出される油、例えばトウモロコシ油、ダイズ油、ヤシ油、綿実油、オリーブ油、パーム油、ピーナツ油、ナタネ油もしくはキャノーラ油、ベニバナ油、ヒマワリ油が挙げられるが、それに限定されない。食用油は、ナッツ油、例えばアーモンド油、ピーチナッツ油、ブラジルナッツ油、カシュー油、ヘーゼルナッツ油、マカダミアナッツ油、モンゴンゴナッツ油、ペカン油、松果油、ピスタチオ油、クルミ油、およびパンプキンシード油を包含するが、それに限定されない。食用油は、柑橘類、果物、メロン類およびウリ種子類、または任意の可食植物由来の油を包含する。

10

#### 【0103】

いくつかの好ましい態様において、STH感染の重篤度または発症可能性を処置または低減するための本発明の組成物は、医薬組成物として調製される。これは好ましくは経口送達用に調製されうる。医薬組成物は、それに含まれる薬剤が、該組成物のヒトへの投与後に生物学的に利用可能となるように調製される。

20

#### 【0104】

本発明のいくつかの態様の実施にあたり、特に異なる指示がない限り、当分野の技術の範囲内のウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学およびDNA組換えの技術における従来の方法を用いるものと理解され、その多くについて、説明の目的で下記に記載する。そのような技術は文献において詳細に説明されている。例えば、以下の文献を参照されたい：Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)、および他の同様の文献。

30

#### 【0105】

DNA組換え、オリゴヌクレオチド合成ならびに組織培養および形質転換（例えばエレクトロポレーション、リポフェクチン）のために、標準的な方法を用いる。酵素反応および精製方法を、製造者の仕様書にしたがって、または当分野で一般に行われるように、または本書に記載されるように行いうる。これらの、および関連する技術および手順は通常、当分野で知られ、また、さまざまな総論的およびより専門的な文献（本書中に引用され述べられる）に記載される、従来の方法にしたがって実施しうる。特別な定義がなされない限り、本書において分子生物学、分析化学、有機合成化学ならびに医薬品化学および薬化学に関連して用いられる技術用語、ならびに本書における分子生物学、分析化学、有機合成化学ならびに医薬品化学および薬化学の実験手順および技術は、当分野において知られ、一般に用いられるものである。組換え技術、分子生物学的、微生物学的、化学的合成、化学分析、医薬調製、製剤化、ならびに送達および患者処置のために、標準的な方法を用いうる。

40

#### 【0106】

本書において、用語「純粹」および「純度」と数字との組み合わせ（例えば、95%純

50

粹)は、本開示の化合物および物質が他の化合物および物質に対して重量/重量の量で存在することを意味する。例えば、95%純粋な殺線虫結晶である組成物とは、該組成物の95%(重量/重量)が殺線虫結晶タンパク質であり、該組成物の5%(w/w)が1つまたはそれ以上の他の物質からなることを意味する。

【0107】

本書において、用語「結晶含量」とパーセンテージの組み合わせ(例えば、結晶含量95%)は、本開示の殺線虫結晶が組成物中に、該組成物の総重量に対して、記載されるパーセンテージで存在することを意味する。いくつかの態様において、本発明の組成物は、結晶含量が少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%(例えば、95%、96%、97%、98%、99%または100%)である。

10

【0108】

本書において、組成物または化合物に関する用語「~を実質的に含まない」(例えば、芽胞を実質的に含まない化合物)は、該組成物または化合物が、他の物質を5% w/wまたは5% w/w未満の量含むこと(例えば、化合物が芽胞を5% w/w、2% w/w、1% w/w、0.5% w/w、0.1% w/w、0.01% w/w、0.001% w/wもしくは0.0001% w/wまたはそれ未満の量含むこと)を意味する。

【0109】

本明細書および請求の範囲において、内容からそうでないことが明らかでない限り、単数形での記載は、そのものが複数である場合を包含する。本書を通して、文脈からそうでない必要があるものでなければ、用語「含む」、または「含んでいる」のようなその変化形は、記載される要素もしくは整数または要素群もしくは整数群を含むが、他の要素もしくは整数または要素群もしくは整数群を排除しないことを意図すると理解される。そうでないことを明記しない限り、本書におけるそれぞれの態様は、必要に応じ変更を加えて、他のいずれの態様にも適用される。

20

【0110】

本書において、用語「約」を用いた数量の記載は、それに係る値の±5%の範囲をさす(分子、ヌクレオチドまたはアミノ酸等の数で、値をさらに除すことができない場合には、最も近い整数に切り上げられる)。例えば、「約20%」は、上限値および下限値を含む15~20%を包含し得、「約80%」は、上限値および下限値を含む75~85%を包含しうる。さらに、本書において用語「約」が数量に関して用いられるとき、±5%の値に加えて、記載の数値そのものも意図され記載されるものと理解される。例えば、「約23%」なる記載は、正23%を明らかに意図し、記載し、含む。

30

【実施例】

【0111】

以下の実施例は、例示説明のためのものであって、限定のためのものではない。

【実施例1】

【0112】

I B a C C の作製

芽胞形成欠失細胞においてC r y 5 Bを製造するため、*B. thuringiensis* (B t)株4 D 8; この株は、結晶タンパク質発現を欠き(Identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1-Like bacteria from environmental and human samples after aerial spraying of Victoria, British Columbia, Canada, with Foray 48B. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Mar;67(3):1035-43)、この株において、芽胞形成のマスター-spo0Aレギュレーター(spo0A-)が相同組換えにより欠失された。本組成はさらに、C r y 5 B - B a C C (サイトゾルに結晶を含む*Bacillus* (*Bacillus* with Cytosolic Crystal))と称される

40

【0113】

C r y 5 B - B a C Cを不活化するために、該形質転換*B. thuringiensis* 4 D 8株を、10 μg/mLエリスロマイシンおよび200 μg/mLカナマイシンを補充した3倍濃縮ルリア-ベルターニ培地(L B)において、バッフル付き2 Lフラスコ内で200 mL

50

の体積で、30 において振盪しながら48時間好氣的に培養した。形質転換*B. thuringiensis*細胞を、4 において1時間、4500rpmでの遠心分離に付し、予め冷却した滅菌再蒸留水で、元の細胞培養体積の4分の1の体積で再懸濁し、次いで1mg/mLカルバクロール(食品用抗菌剤)により、4 で振盪しながら15分間処理した。カルバクロール処理した細胞を遠心分離し、予め冷却した滅菌再蒸留水で3回洗った。最終ペレットを40倍濃縮し、使用するまで-80 で保存した。この生物学的に活性なCry5B結晶を含む死BACCを、IBACC(サイトゾルに結晶を含む不活化*Bacillus*(Inactivated *Bacillus* with Cytosolic Crystal))と称する。4D8株はまた、自己溶解することができ、成長サイクルの最後に自然に溶解して結晶を放出することができる。それでもなお、残っている可能性のある細胞を死滅させ、残っている可能性のある無傷IBACCを破り開くために、カルバクロールによる死滅およびホモジナイズを行うことができる。

10

## 【実施例2】

## 【0114】

ホモジナイズによるIBACCからのCry5Bの精製

図6に、IBACCからCry5B結晶タンパク質を精製するために用いる方法のフローチャートを示す。大量のCry5Bタンパク質をIBACCから精製するために、10Lの培養物の採取を行った(図6、ステップ610)。10LのBACCを、250~350OD/mLとなるまで増殖させた。次いで、そのBACCを遠心分離(8000xg、30分間)により0.5L~1Lに濃縮し、その後、1mL/Lカルバクロールを加えて室温で15分間攪拌することにより不活化して(ステップ612)、IBACCを得た。不活化ステップの前のBACCの濃縮を、他の方法、例えば限外濾過または透析によって行ってもよい。

20

## 【0115】

IBACCを15000psiで、5~7回のパス回数でホモジナイズし(ステップ614)、得られた溶解物を遠心分離して細菌溶解物を濃縮した(ステップ616)。他の方法、例えば限外濾過または透析によってIBACCを濃縮してもよい。得られたペレットを0.5L~1Lの1M NaCl溶液中に再懸濁した(ステップ618)。次いで、該濃縮溶解物を250mL/Lの油と、室温で2時間混合して、カルバコールを抽出した(ステップ620)。この油抽出の後、9Lの水を加え(ステップ622)、混合物を再度、遠心分離により濃縮した(ステップ624)。濃縮されたペレットを、0.5L~1LのNaCl溶液中に再懸濁した(ステップ626)。次いで、その混合物を10Lの水で3回洗い、遠心分離(8000xg、30分間)により濃縮した(ステップ628)。得られる組成物は、純粋なCry5B結晶(PPC)である。いくつかの態様において、該組成物を噴霧乾燥または凍結乾燥しうる(ステップ630)。

30

## 【0116】

図7に、該精製方法のさまざまな段階におけるサンプルを適用したタンパク質ゲルを示す。ゲルのレーン1は、200nm ODまで増殖させた後の、ホモジナイズしたIBACC5μLである。レーン2は、ホモジナイズしたIBACCを濃縮した上清の15μLサンプルである。レーン3は、油抽出したIBACC溶解物を洗った水相の15μLサンプルである。レーン4は、1M NaCl洗浄液(ステップ626)の15μLサンプルである。レーン5は、ペレット化したIBACCをリン酸緩衝食塩液で洗った洗浄液の15μLサンプルである。レーン6は、ステップ628の後のPPCの15μLサンプルである(312吸光度600単位のODまで増殖させた、別のバッチのBACCから得たもの)。

40

## 【0117】

図8に、PPC粒子の、1000倍の倍率の位相差顕微鏡写真を示す。

## 【実施例3】

## 【0118】

自己溶解IBACCからのCry5Bの精製

いくつかのBACC株、例えば4D8株は、成長サイクルの最後に自己溶解する。この

50

自己溶解により、抗菌化合物による不活化後にホモジナイズを行うステップが必要無くなるか、またはその必要性が低減されうる。したがって、図6の精製フローチャートにおいて、自己溶解する細菌株を使用する場合は、ホモジナイズステップ614を省略するか、またはパス回数を少なくしうる。そのような態様において、自己溶解B a C Cの10 L培養物の採取を行いうる(図6、ステップ610)。10 LのB a C Cを、250~350 OD/mLとなるまで増殖させうる。次いで、B a C Cを遠心分離により0.5 L~1 Lに濃縮し、その後、1 mL/Lカルバクロールを加えて室温で15分間攪拌することにより不活化して(ステップ612)、I B a C Cを得ることができる。不活化の前および/または後にI B a C Cは自己溶解しているので、ホモジナイズの必要は無かった。不活化ステップ前のB a C Cの濃縮は、他の方法、例えば限外濾過または透析によって行ってもよい。

10

#### 【0119】

次いで、自己溶解I B a C Cの溶解物を、遠心分離、限外濾過または透析によって濃縮しうる(ステップ616)。次いで、得られたペレットを0.5 L~1 Lの1 M N a C l溶液中に再懸濁しうる(ステップ618)。次いで、該濃縮溶解物を250 mL/Lの油と、室温で2時間混合して、カルバコールを抽出しうる(ステップ620)。この油抽出の後、9 Lの水を加え(ステップ622)、混合物を再度、遠心分離、限外濾過または透析により濃縮しうる(ステップ624)。次いで、濃縮された混合物を、0.5 L~1 LのN a C l溶液中に再懸濁しうる(ステップ626)。次いで、その混合物を10 Lの水で3回洗い、遠心分離、限外濾過または透析によって濃縮しうる(ステップ628)。

20

得られた組成物は、純粋なC r y 5 B結晶(P C C)でありうる。いくつかの態様において、該組成物を噴霧乾燥または凍結乾燥しうる(ステップ630)。

#### 【実施例4】

##### 【0120】

P C Cはインビトロで鞭虫を中毒させる

インビトロで、実施例2に記載のように製造したP C Cで処理した後の鞭虫の運動性を調べた。鞭虫を各ウェルに、抗生物質を含むR P M I培地中、3匹ずつ入れた。P C C(C r y 5 B)の用量は20、100および500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、各用量につき4つのウェルを使用した。図9Aに、示されている時点で測定した鞭虫運動性に対するP C C(C r y 5 B)の用量応答効果のグラフを示す。データは、ウェル毎に平均運動性指数として表され、ここで、3 = 運動性が高い、2 = 運動性が緩徐、1 = 触れても不動、である。

30

#### 【実施例5】

##### 【0121】

P C Cはインビボで鞭虫量を低減する

P C Cが鞭虫量を低減する能力をハムスターにおいて調べた。マウスを鞭虫Trichuris murisに感染させた。マウスを2群に分け(各群4匹)、水、および実施例2に記載のように製造したC r y 5 B約500 mg/kgのP C C油洗浄物で処置した。両群に、水およびP C C油洗浄物を、0.5 mLの体積で単回投与として、強制経口投与した。感染後34日目に、処置前の糞便中の卵数を測定し、マウスを、等しい糞便中の卵数で2群に分けた。感染後35日目に、強制経口投与による処置をマウスに行った。感染後41日目(処置から6日後)に、処置後の評価を、すべてのマウスを切開して総鞭虫数(盲腸)を測定して行った。鞭虫量の45%の低下が見られた(水の場合、平均5.5の鞭虫数; P C Cの場合、平均3の鞭虫数)( $p = 0.02$ )。

40

##### 【0122】

図9Bに、水で処置したハムスター(対照)と、実施例2に記載のように製造したP C C 500 mg/kgで処置したハムスターとで鞭虫量を比較する本試験のヒストグラムを示す。

#### 【実施例6】

##### 【0123】

P C Cはインビトロで鉤虫を中毒させる

50

インビトロで鉤虫 (*Necator americanus*) の運動性を、実施例 2 に記載のように製造した PCC による処理後に調べた。各ウェルに 3 匹の鉤虫を入れ、各用量につき 4 つのウェルを用い、用量は  $250 \mu\text{g} / \text{mL}$  とした。図 10 A は、Cry 5 B PCC へのインビトロ暴露後の鉤虫運動性の経時変化を示すグラフである。PCC は、鉤虫中毒に対し用量依存的効果を示した。データは、ウェル毎に平均運動性指数として表され、ここで、3 = 運動性が高い、2 = 運動性が緩徐である、1 = 触れられなければ動かない、0 = 触れられても動かない、である。

【実施例 7】

【0124】

PCC はインビボで鉤虫量を減少させる

10

PCC を  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  の用量で用いて、鉤虫 *Necator americanus* に感染させたハムスターを処置した。6 匹のハムスターを *N. americanus* に感染させ、該寄生虫の駆除を防ぐために本実験の期間にわたって免疫抑制レジメン (デキサメタゾンを飲料水に含め、かつ、週 2 回注射した) に付した。鉤虫を与えた後 (約 60 日後) に、3 匹のハムスターを経口 PCC  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  の単回用量で処置し、3 匹のハムスターを対照としての水で処置した。処置前に糞便中の卵数測定値を得て虫が棲み付いたことを確認し、処置前の糞便中卵数が等しくなるようにハムスターを 2 群に分けた。処置後 5 日目に動物を殺し、腸内鉤虫量を調べた。

【0125】

図 10 B は、Cry 5 B PCC および水対照で処置したハムスターにおける鉤虫量を示すヒストグラムである。図 10 C は、Cry 5 B PCC および水対照による処置の前と後の、ハムスター糞便中の鉤虫卵数を示すヒストグラムである。 $10 \text{ mg} / \text{kg}$  の PCC の単回投与により、鉤虫量が 92% 減少し ( $P = 0.016$ )、糞便中卵数が 98% 減少した (FEC;  $P = 0.019$ )。

20

【0126】

一方、Cry 5 の芽胞含有溶解物 (SCL) は、ハムスターにおいて同等の鉤虫量減少を達成するために、4 倍の量で投与する必要がある。ハムスターを鉤虫 *Necator americanus* に感染させ、Cry 5 B  $40 \text{ mg} / \text{kg}$  の単回用量で処置した。図 11 A は、ハムスターにおける経口 Cry 5 B SCL または水対照による処置後の鉤虫量のプロットを示す。図 11 B は、ハムスターにおける経口 Cry 5 B SCL または水対照による処置後の卵数 / g のプロットを示す。 $40 \text{ mg} / \text{kg}$  Cry 5 B SCL の単回用量は、鉤虫量の 88% の減少、および糞便中卵数の 95% の減少をもたらした。

30

【実施例 8】

【0127】

PCC は鉤虫卵に対して有効な毒素である

図 12 は、*Ancylostoma ceylanicum* 鉤虫の卵から幼虫への成長に対する、さまざまな濃度の Cry 5 B PCC (3 つの調製物) の毒性を、Cry 5 B IBACC と比較して示すヒストグラムである。一部の Cry 5 B PCC はリゾチームの添加により処理したが、これは Cry 5 B PCC の毒性に影響を及ぼさないようであった。*A. ceylanicum* の卵 (卵約 65 個 / ウェル、複数ウェル / 用量) を大腸菌食物源と共に緩衝液に入れ、25 で 7 日間成長させた。7 日目に、孵化して第 3 幼虫感染段階まで成長した卵の数を調べる。PCC は低濃度でも、IBACC よりも高い活性で、該鉤虫の成長を阻止することができる ( $IC_{50}$  が約  $15 \text{ ng} / \text{mL}$ )。

40

【実施例 9】

【0128】

BACC からの純粋な PCC の改良された精製方法

Cry 5 B を発現する *B. thuringiensis* を、実施例 1 に記載のように、すなわち、(BACC) 10 L の規模で培養した (ステップ 631) (図 13 A)。遠心分離 ( $4500 \text{ rpm}$ 、4 で 60 分間) により細胞を 10 倍濃縮した後 (ステップ 632)、洗った BACC を水 500 mL (最終体積) 中に懸濁し、ヘキサンを最終濃度 10% v/v で加え、

50

密閉容器内で室温で1時間混合して、I B a C Cを調製した(ステップ633)。図13Bに、B a C CからのI B a C Cの調製を示す顕微鏡画像を示す。左の顕微鏡画像はB a C Cを示し、右の顕微鏡画像では、ロッド状の構造が破壊されており、B a C Cに対するヘキサンの効果が示される。図13Bの棒グラフは、B a C C(100%細胞増殖)、および10%ヘキサンで処理されたB a C C(0%細胞増殖、完全な不活化)の細胞増殖パーセンテージの値を示す。図13Cに、B a C C出発材料、および図13Aのフローチャートに示す方法に付した後の最終的な精製P C C産物の、S D S - P A G Eゲルの画像を示す。ヘキサンの代わりに他の細胞不活化手段、例えば界面活性剤、抗菌剤、殺生物剤等を使用することができる。

#### 【0129】

実施例2に記載のように、I B a C Cから純粋なC r y 5 B結晶(P C C)を調製した。すなわち、I B a C Cを15000 p s iで、パス回数5~7でホモジナイズすることにより細胞溶解して、I B a C C細胞壁ゴーストからP C Cを放出させた(ステップ634)。

#### 【0130】

P C Cを、可溶性細胞成分、脂質および細胞壁デブリから相分配により精製するために、ヘキサンを50% v/vとなるように加え、密閉容器内で室温で1時間激しく混合した。そのエマルジョンを密閉ボトルに移し、4500 r p mで、4で1時間遠心分離した(ステップ635)。ヘキサンの上層を取り、廃棄溶媒とした。細胞壁デブリを含む中間層を取り、廃棄した。水溶性細胞成分を含む水層を取り、廃棄し、P C Cのペレットを残した。P C Cペレットを水で洗った後、凍結保存した。得られたP C Cはタンパク質含量が98% w/wであった。他のP C C回収方法、例えばP C Cを水相中に集め、ヘキサンおよびインターフェースを上清相に集める連続遠心分離も可能である。最終P C Cは、凍結保存するか、または凍結乾燥もしくは噴霧乾燥して室温、4もしくは凍結温度で保存することができる。

#### 【実施例10】

#### 【0131】

改善された方法で精製されたP C Cは線虫に対して有効な毒素である

もう1つの実施例において、実施例9の方法を、実施例9のヘキサン相分配法と組み合わせた。図14は、細菌の不活化のために10%ヘキサンを、他の細菌汚染物を除去するために50%ヘキサンを用いてB a C Cから調製したP C C(P C C - H e x / H e x)の生物活性を示すグラフである。グラフには、未凍結乾燥P C Cを菱形で、凍結乾燥P C Cを四角形で示す。表示の値は、幼虫段階L4で出発した単一のC. elegansの、3日後の繁殖サイズの平均値である(条件毎にn=3)。P C Cの効力は、10 μ g / m Lで繁殖サイズの出現を完全に抑制するので、優れている。これに対し、文献に記載されるデータによると、この用量での抑制率は平均70%である(Hu, Y, et al., Proc Natl Acad Sci USA 107: 5955-60 (2010))。これらデータから、P C C H e x / H e x法は凍結乾燥との適合性が十分であることが示される。

#### 【実施例11】

#### 【0132】

改善された方法で精製されたP C Cは鉤虫に対して有効な毒素である

図15に、細菌の不活化(I B a C C)のためにカルバクロールを、他の細菌汚染物を除去するために50%ヘキサン相分配を用いてB a C Cから調製したP C C(P C C - C a r v & H e x)の生物活性を示す。表示の値は、7日目の、成熟した感染性幼虫段階に達した鉤虫A. ceylanicum卵のパーセントである。バーが低いほど、鉤虫成長の阻害が大きいことを示す。対照は、培地中のヘキサンのみであり、終濃度をP C Cサンプルにおけるのと同じとしたものである。データは、ヘキサン単独では寄生虫に対し効果がないことを示している。

#### 【0133】

図16は、細菌を殺すためにカルバクロールを、他の細菌汚染物を除去するために50

10

20

30

40

50

%ヘキサンを用いてB a C Cから調製したP C Cの生物活性を示す。表示の値は、24時間置きに評価したインビトロの鉤虫*A. ceylanicum*成虫の運動性であり、ここで、3 = 活動的で運動性が高い；2 = 運動性が緩徐である；1 = 触れられなければ動かない（高度の中毒）；0 = 触れられても動かない（死亡が推定される）、である。データは、P C C用量が高いほど運動性が低下するという明確な用量応答を示しており、ヘキサンで処理されたP C Cが、生物活性が高いことを示している。

【0134】

本明細書において引用する文献および特許出願はいずれも、個々の文献または特許出願が引用により本書の一部とされることが個別に明記されるかのように、引用により本書の一部とされる。上記の発明は、明確に理解されることを目的として例示によっていくぶん詳細に説明したが、本発明の教示に照らして、特許請求の範囲またはその意図から外れることなく発明に変化および変更を加えうることは、当業者に明らかであろう。

10

【0135】

本書において、説明の目的で、本発明の特定のステップ、要素、態様および適用を示し、説明したが、当然のことながら本発明はそれに限定されるものではないことが理解される。なぜなら、特に上記教示に照らして、本発明の範囲またはその意図から外れることなく当業者によって変更が加えられうるからである。したがって、本発明は、特許請求の範囲によって限定されることを除き、限定されるものではない。

【0136】

上記のさまざまな態様は、組み合わせられてさらなる態様を表すことができる。本明細書において引用され、および/または出願データシートにおいて挙げられる、米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許文献はいずれも、引用によってその全体が本書の一部とされる。態様の側面は、必要に応じてさまざまな特許、出願および文献の概念を用いるように、改変されて、さらなる態様を表すことができる。

20

【0137】

そのような変更および他の変更を、上記の詳細な説明に照らして態様に対してなすことができる。全般に、特許請求の範囲において、用いられる用語は、請求項を、明細書および特許請求の範囲に開示される特定の態様に限定するものと解釈すべきではなく、すべての可能な態様を、請求項に認められるすべての範囲の等価物と共に包含するものと解釈すべきである。

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 - 1 】

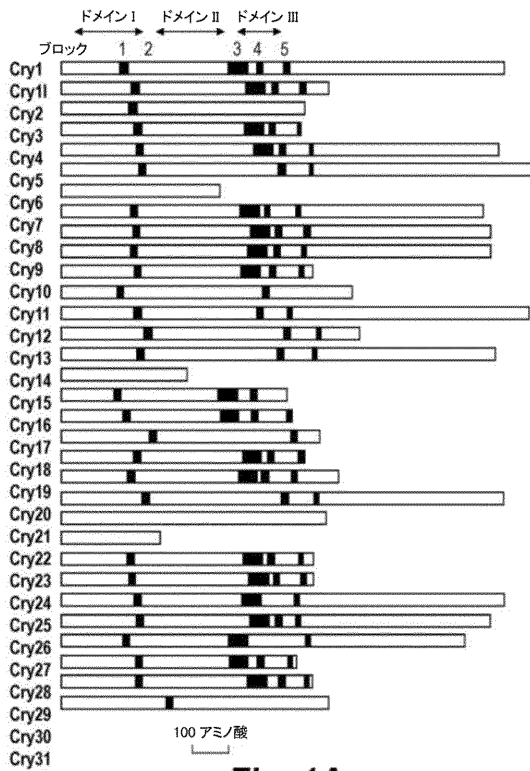


Fig. 1A

【 図 1 - 2 】

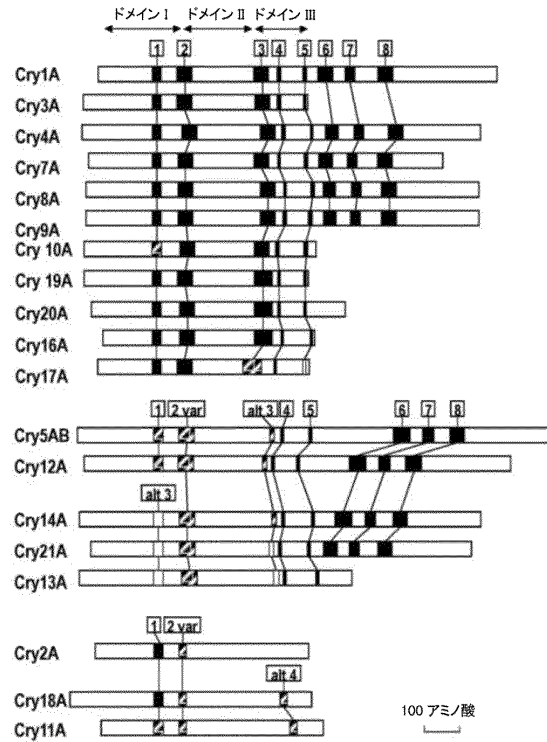


Fig. 1B

【 図 2 】

**Cry5Ba1**

1 MATINELYPV PYNVLAHEIK EVDDPYSNSN LLKGIQEGME EWGKTGQKKI FEDHLTIAMN  
 61 LYKTKGLDYE ALTKASISLI GFIPGAEAAN PFINMEVDFV WPKLFGANTE GKDQDLFNAI  
 121 MDAVNMWVN KFLSYNLSLTK NKTIEGICQN LGLFONAIQV AICCGSTPEF VNFDCNCTPC  
 181 NNQPCKDDI DRVASREDA NSQFTQHLPE FKNPWSDENS TQEFKRTSVE LLEPMYITVA  
 241 TLHLLYEGY IEFMKWNEH NEQYLNLLK ELQQLIHSYK ETVRISFLOF LFLNNRSKS  
 301 SNMAYRYVF NMTVNCGLDIA ATWPFIDTHN YHOGGKLDLI RIIILSDIAGE IBEYTHGDKT  
 361 SGPEHSNTE NNILDTPTSPT YOHSHFSVSDS IIVSRKELQD LDIATYSTNK SNCHPYGLR  
 421 LSYDGSRYE YGDNPQFETI SNNSYCHRSY TAPETILVNAF LHYNAKSLCQ NVESLWSTV  
 481 NGGSSCICL AWINYLAPPQ TAKNESFDC KDNVLYPTE TVNKGITGNI GVISAIVEME  
 541 LVPENVIQDV NADTKLELTQ LKGFPEKYC SEYNRGI SI VREINGNNA VKLSNSQSVG  
 601 IQITNTEQK VEIRCVASK GDNVYFVAVI LSEPNFNSI SFGSTESSV VYOGGNGYI  
 661 LKSIITVEIF AGSEYVHITN QGSSBLFIDF IBEVFKIQFC FCDNNLHLCI CNPVDITDCT  
 721 FCVCTSLTL CDCNNRPLGD CTLCCQVENC LPSFVLTLDI QNITTVQNAL VASSHEDTLA  
 781 TVDSVYEIE VLVKVDALSG EYFGKRAI RKLNVHTKRI SKARNLLIGG NFDNLDAMVR  
 841 GRNVNVSDH ELFKSDHVLV PPETLYSSYV FOKVEESKLR ANTRYSVSGE IAHAEDELIV  
 901 VSEYGOEVK VQVYFGEAF FLTISGAICC PPRSTNGRF ADPHEFSYI DVGTTLDVEAN  
 961 PSELGIRIV ERIGMAYSN LEIREDFEL KNELRNVQRF ARNRWSAYDC ERAEYVALIQ  
 1021 PVLQINALLY ENEDMNGAIR SGVSYHDLEF IVLPTLPKLN HFMWSDMLGE QGSILAQFOE  
 1081 ALDRAYTOLE ESTILHNGEIR TTDAAWTE GDAAHAIIEF GRVLRLPDW SSSVSQTIIEI  
 1141 ENFDPKKYC LVFHAQEGE VSLQHGEGE YVETHPHKPA NFTTSHRQGI IFETNKRVTVE  
 1201 ITSDEGEELV DHIALVEAPL PTDDQSSDGN TFSNTNSNTS MNNNQ

Fig. 2

【 図 3 】

**Cry13Aa1**

1 MTCQLQAQPL IPYNVLGAYP TSNITGSPIGN AGNQFDQFEQ TVKELKEAWV AFQKNGSFSL  
 61 AALEKGFDA A IGGGSEFDYLG LVQAQGLGVG TLGAALPGVS VAVPLISMV GVFWPCKGTNN  
 121 QENLITVIDK EVQRLIDKLI SDQLIKKINA DLNAFTDLVT RLEEVIIDAI FENHRPVLQV  
 181 SKSNMVKYDS AYFSTGGILT LGMSELDLTI YSKLTFPLVY LGATMKLSAY HSYQFGNTW  
 241 LNKVYDLSDD ECKTMSQALA RAKQHRQDI AFYTSQALNM FTGNLPSLSS NKYAINDYV  
 301 YTRAMVNLG DIVATWPTLY PDDYSSQIKL EKTRVIFSDM VQQSESDGS VTIKNIFDNT  
 361 DSHQHSIGL NSISYFFPEL QKAQLRMVYD NHPKYCTDCF CWPYGVILNY NKNATFRYGDN  
 421 DFLSGDVQL PAMPVYVNAQ TQTAQYTDGE NINIDTGRSW LCTLRGYCTI NCFPGRCYN  
 481 NSTGYGECN QSLPQKIHA LYFETQTNVL GQSGKLGILA SHIPYDLSN NTIGDKQTS  
 541 TNYVAKGTPV EKVYASSGQK VEIREWING ANVVQLSPCQ SWGMDFNST GGQYVRCRY  
 601 ASTINDIPEF NLVYDGGSN IYNQMTFFAT KETPAHSDVD NEILGKIGN GNYSLMNVKD  
 661 SVELPSSGREH VEFTNGSSA IVDLLELYP LQPAAPTIOS TOPINYPITS RLPHRSGEPP  
 721 ALIWEKSGNV RGNQLITSAQ GVPENSQIYL SVGGDRQLD RNSGFKLVNY SPYVSFTNIQ  
 781 ASSSNLVDIT SGIITGQVQV SNL

Fig. 3

10

20

30

40

50

【 図 4 】

Cry14Aa1

1 MDCNLSQOQN IPYNVLAIPV SNVALVDTA GDLKAWEEF QKTGSESLTA LQGFSAQG  
 61 GAENYLTLQ SGSLDAGSEV PGGTFVAPIV NWVIGLWMPH ENKTADTENL IKLIDEEIQK  
 121 QLNKALLDQD RNNWTSFLES IFDTSATVSN ADIDAQWSGI VDTNRQOKT FTTSZYLNVV  
 181 GKFDSDADSI ITNENQIMNG NFDVAAPFYF VDGATLRSL YQSYIKFCNS WIDAVGFSTN  
 141 DANTOKANLA RYKLRWESI NEYTORWVKV FKDSKNMPTI GYNKFSVDAY NYVYKGMILN  
 301 VLDWAIWSS LYPNDVTSPT ALEQTRVTFV NMGQEEGTD GILKIYNTFD SUSYQHSLLP  
 361 NNWNVLSYY TBLQWLELA VYTPKGGSY AYPYGFILNY ANSNKYGN DFTGRPLNKQ  
 421 DGIPIQINAA TONSKYLDGE TINGIGASLP GYCTTGSSAT EOPFSGTGA NYKASCNPS  
 481 DTQKINALY AFOTNVKGS TGLKGLVLSL VPDINLPEKV FGLDSEDTNN VILKGPAPK  
 541 GYFPNARPT VKEWTNGAS AVFFYSGNTL FMTAINLTAI QYKIRIRYAN FNSDTQISYL  
 601 ITQNGSQISN NLLVYSTD SMSSNLQPN VYVTGNGNY TLLDLYSTIN VLSTGDIITLK  
 661 LTGSKOKIFI **DRIEE**PTWP VPAPTNNTN NNGNGNPNP PHHGCAIAGT QOLCSGPKF  
 721 EQVSDLEKII TQVYMLFKSS SYEELAIKVS SYQINQVALK VMALSDEKFC EKRLRLKLV  
 781 NKANQLLEAR NLLVGNFTT TQNWYLGINA YNDYDSEFLN GNYLSLQPAS GFTSYAYQK  
 841 IDESTLKPYT RYKVSFGIQ SNOVELIISR YGREIDKILN VPYAGPLPI ADIETCCAP  
 901 EIDQCQGGOS DSHFFNYSID YGALHPELNP GDEIGLIVQ SNGYISISNL ELIERPLTE  
 961 METQAVNRKD QWKRELLE CASVSELLQF IDNQISLFR DANWYNDILP HWYQTLKMI  
 1021 IVFDLPRKH WFIDHLPGEY HEIEQRMKEA LKHAFTQLDE KNLIHNGHFA TNLIDWQVEG  
 1081 DAFMKVLENN ALALQLSNWD SSVSOSIDIL EFDEDKAYKL RYVAQSGGTI QFCNCEDEAI  
 1141 QFNINSEVYK EKTIYEDSPS INLHIQSEGS EFVYSSIDLIV ELSDEE

Fig. 4

【 図 5 - 1 】

Cry14Aa1

MINTILYPSYHNVLARPIRLDSEFPFVETFKDLKGAWEFEFGKIGYMDPLKQHLQIAWD  
 TSONGTVDYXALTKASISLIGLIPGADAVVPFINMFVDFIPKFLFGRGSOQNAQAQFFEL  
 IIEKVKELVDEDFRNTLNLLNLYLDGMQALSHFQNDVQIAICQGEQPGMLDQPTAC  
 TPTDHLISVRESFKDARTIETALPHFKPNLS.TNDNTPDNSDVLTLPLMYTTAATL  
 NLIHQGYIQFAERWKSVDSEFINQIKVDLORRIQDYSTIVTIFEKFRPLNFSNKE  
 SVNKYRNVRSMTLQSLDIAATWPTLDNVPVSNVDIQLDQTRLVFSDVAGPWECDNIT  
 SNIIDVLPINTIGIGQESDRLKFTYPRIELQSMQFHGQVNSKSVHECHYSDGLKLNK  
 NKTITAGVSNIDESNQNKHYGPVINSPIIDINVNSQYLDLNSVMVNGGQKVTGCS  
 PLSNNGSNNALPNOKINVTYSVQNDKPKHADTYRKGWYMSHPIYDLVPEVNGDI  
 DEDTKQPSLLKGFPAEKYGDSDIAYSEPLNGANAVKITSYQVLOMEVNTQITQYRIR  
 IRYAIGDGTAAASIWPHIIGPSCNDLNEGHNFSVSSVRNRMFVQGNNGKYLVINLTDSE  
 LPSGQOITLIONTSODL**DRIEE**LSLPSSTFTINFEVPESELEKIINQVNLFSSS  
 QTELAHVSDYKIDOVVLKVALSDVDFGVEKKAARKLVAKOLSKARVVLVGNFEKG  
 HEWALSREATVYANHELKGDHLLLEPPTLPSYAYQKIDESKLSNTRYVLSVGGFAQSE  
 HLEVVSRYGKEVHMDLPIYEALPISSESPNCKPAACOCSSCDGSOSSHFFYSYI  
 DVGSLQSDVNLGIEFGLRIAKPNGFARISNLEIKEDRPLTEKIKRVORKEQWKKAFNO  
 EQAEVATLQPTLDQINALYQNEHWNSVHESADYQHSVAVVPTLPKQRHWFMEGREGE  
 HVVLIQQFQQALDRAFQIEEQNLIHNGFANGLIDWTVIGDAQLSIFDEDPVLELAHWD  
 ASISQITIEIMDFEEDTEYKLRVKGKGTIVYGHGEEBELEITMFTNSFTTQEQTYFEG  
 DIVDVHVQSENTEFLIDSVELLIEIEE

Fig. 5A

【 図 5 - 2 】

Cry21Aa2

(cry21Aa1 との同一性 98%)

MNTPTILYPSYHNVLARPIRLDSEFPFVETFKDLKSAWEFEFGKIGYMDPLKQHLQIAWD  
 TSONGTVDYXALTKASISLIGLIPGADAVVPFINMFVDFIPKFLFGRGSOQNAQAQFFEL  
 IIEKVKELVDEDFRNTLNLLNLYLDGMQALSHFQNDVQIAICQGEQPGMLDQPTAC  
 TPTDHLISVRESFKDARTIETALPHFKPNLS.TNDNTPDNSDVLTLPLMYTTAATL  
 NLIHQGYIQFAERWKSVDSEFINQIKVDLORRIQDYSTIVTIFEKFRPLNFSNKE  
 SVNKYRNVRSMTLQSLDIAATWPTLDNVPVSNVDIQLDQTRLVFSDVAGPWECDNIT  
 SNIIDVLPINTIGIGQESDRLKFTYPRIELQSMQFHGQVNSKSVHECHYSDGLKLNK  
 PLSSNNGSNNALPNOKINVTYSVQNDKPKHADTYRKGWYMSHPIYDLVPEVNGDI  
 DEDTKQPSLLKGFPAEKYGDSDIAYSEPLNGANAVKITSYQVLOMEVNTQITQYRIR  
 IRYAIGDGTAAASIWPHIIGPSCNDLNEGHNFSVSSVRNRMFVQGNNGKYLVINLTDSE  
 LPSGQOITLIONTSODL**DRIEE**LSLPSSTFTINFEVPESELEKIINQVNLFSSS  
 QTELAHVSDYKIDOVVLKVALSDVDFGVEKKAARKLVAKOLSKARVVLVGGFAQSE  
 HEWALSREATVYANHELKGDHLLLEPPTLPSYAYQKIDESKLSNTRYVLSVGGFAQSE  
 HLEVVSRYGKEVHMDLPIYEALPISSESPNCKPAACOCSSCDGSOSSHFFYSYI  
 DVGSLQSDVNLGIEFGLRIAKPNGFARISNLEIKEDRPLTEKIKRVORKEQWKKAFNO  
 EQAEVATLQPTLDQINALYQNEHWNSVHSPHYTYQHSVAVVPTLPKQRHWFMEGREGE  
 HVVLIQQFQQALDRAFQIEEQNLIHNGFANGLIDWTVIGDAQLSIFDEDPVLELAHWD  
 ASISQITIEIMDFEEDTEYKLRVKGKGTIVYGHGEEBELEITMFTNSFTTQEQTYFEG  
 DIVDVHVQSENTEFLIDSVELLIEIEE

Fig. 5B

【 図 5 - 3 】

MIIDSKTTLPRHSLIHTIKLNSRKYGFGDMTRGNQFIISKQEWATIGAYIQTLGLVPEQQRLTHVNL  
 SODISIFSDFSQYDVCSDKTSAEWKNKLYPLIITSANDIASYGFYKVGADPSIKKDGYFRKLODELIN  
 IVDNNSDDDAIATAKAIKDFKARCGLIIEAKQYEEAAKNIVTSLDQFLHGDQKLEGVINIQRKREVQTA  
 LNQAHESSPAHKELLEKRNKLTTLERTIKAEQDLEKVEYFLLGFLPVFFVYVILENIAVQRHKQOI  
 DETREQLDSAQHLDROVKIIGMNSINTIDNLYSQGFARVFKQIQIWAITGAQENLRTTSLQEV  
 QDSDADEIOTELEDAWLVVAQEARDFLNAYSINSRONLPIINVISDCNSCTNNTSNQYGNFTTN  
 MTSQYMWLSHEYTSLPNNFMLSRSNLEKYCPEENFMIIWYNNSDWYNNSDWYNN

Fig. 5C

【 図 6 】

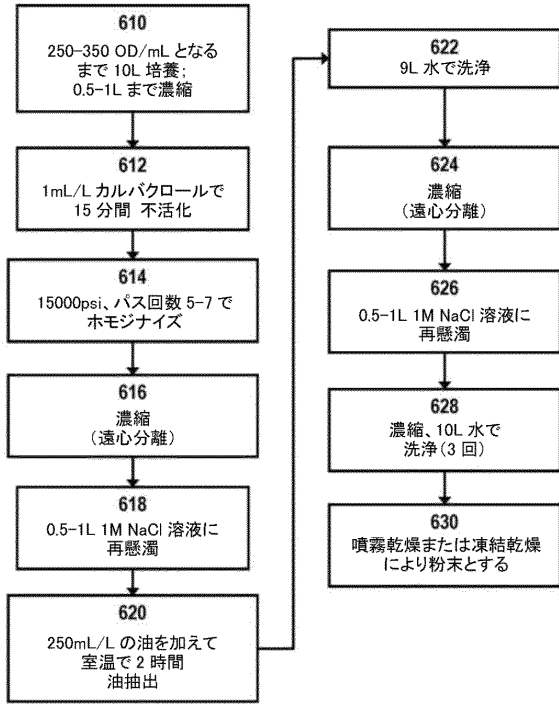
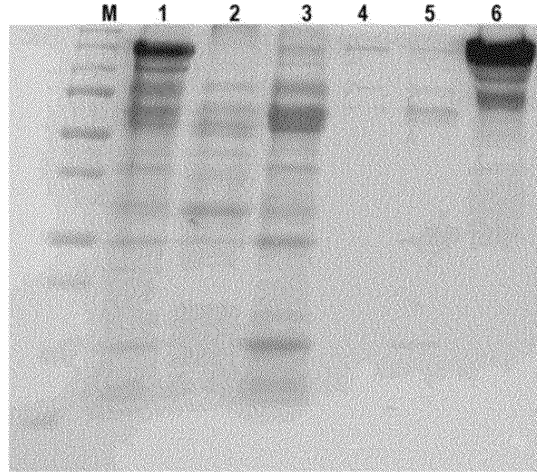


Fig. 6

【 図 7 】



番号の説明

1. ホモジナイズした IBaCC (5 μl, 200 OD)
2. ホモジナイズした IBaCC の上清 (15 μl)
3. 水相 (15 μl)
4. NaCl 洗浄液 (15 μl)
5. PBS 洗浄液 (15 μl)
6. 油洗浄後の最終的な大規模 PCC 産物 (5 μl, OD 312)

Fig. 7

【 図 8 】

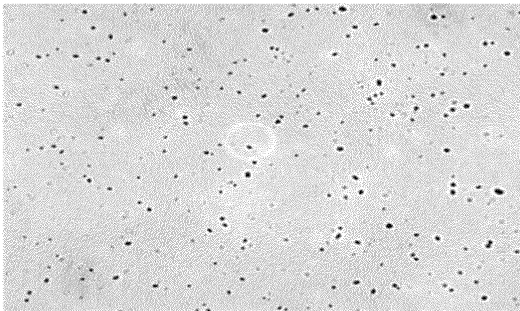


Fig. 8

【 図 9 - 1 】

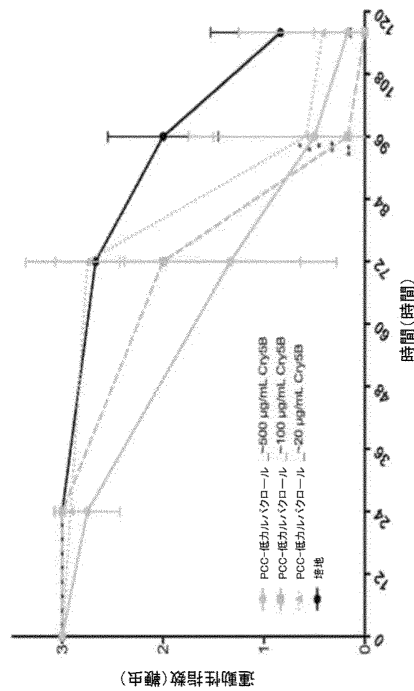


Fig. 9A

10

20

30

40

50

【 図 9 - 2 】

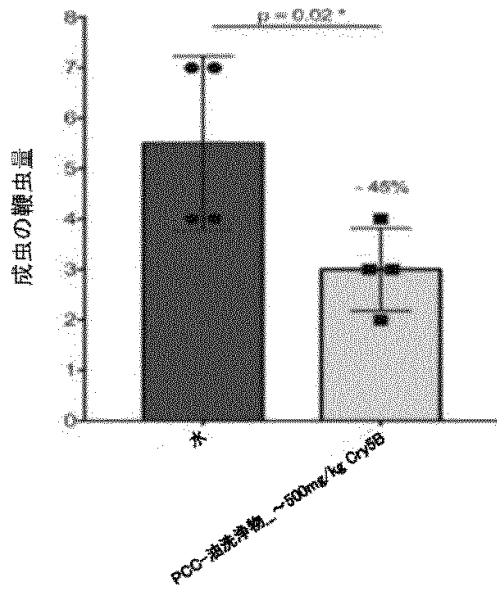


Fig. 9B

【 図 10 - 1 】

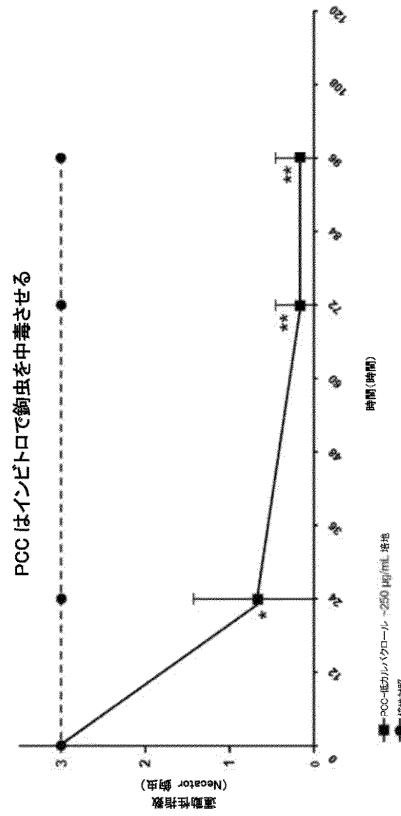


Fig. 10A

【 図 10 - 2 】

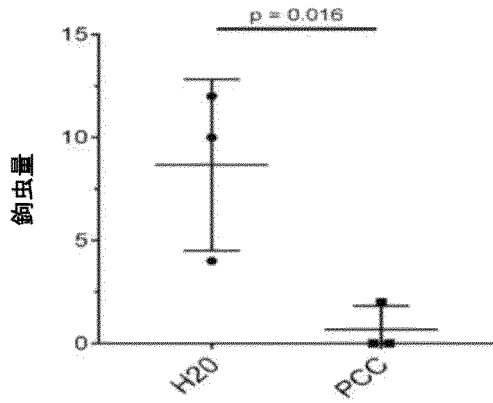


Fig. 10B

【 図 10 - 3 】

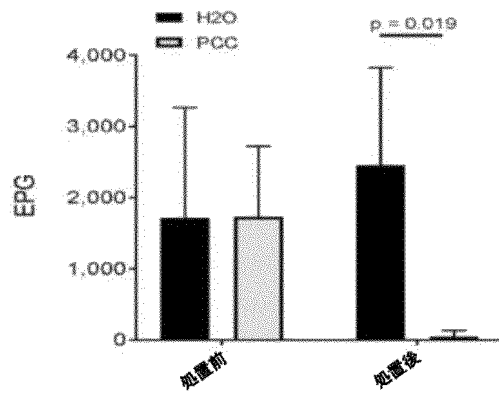


Fig. 10C

10

20

30

40

50

【 図 1 1 - 1 】

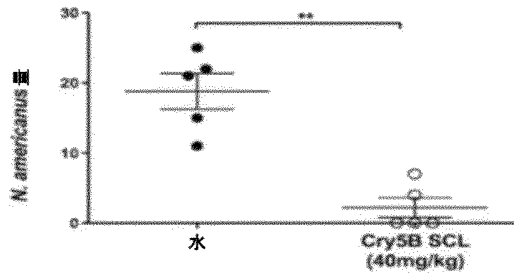


Fig. 11A

【 図 1 1 - 2 】

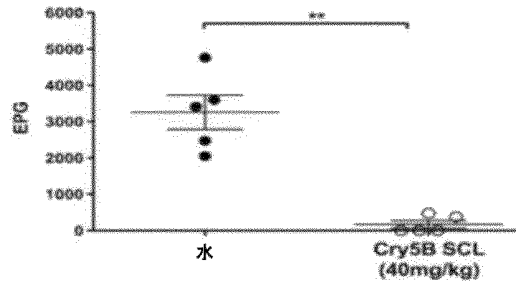


Fig. 11B

10

【 図 1 2 】

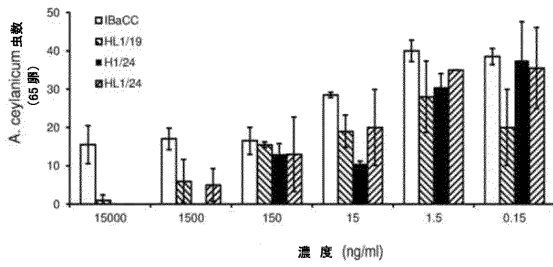


Fig. 12

【 図 1 3 - 1 】

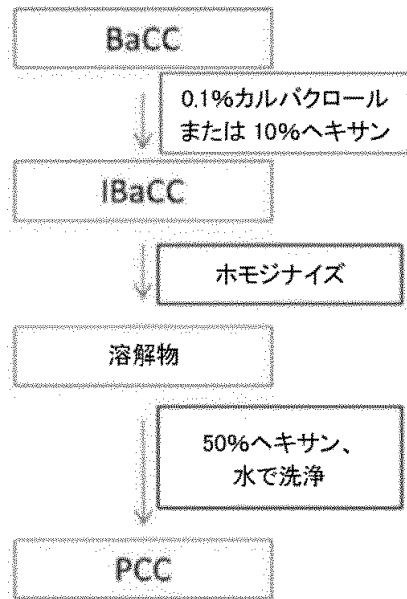


Fig. 13A

20

30

40

50

【 図 1 3 - 2 】

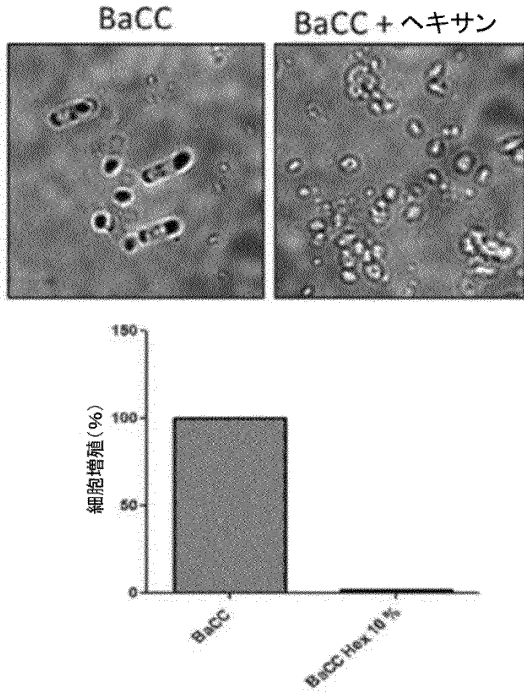


Fig. 13B

【 図 1 3 - 3 】

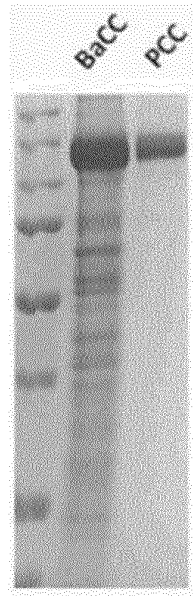


Fig. 13C

【 図 1 4 】

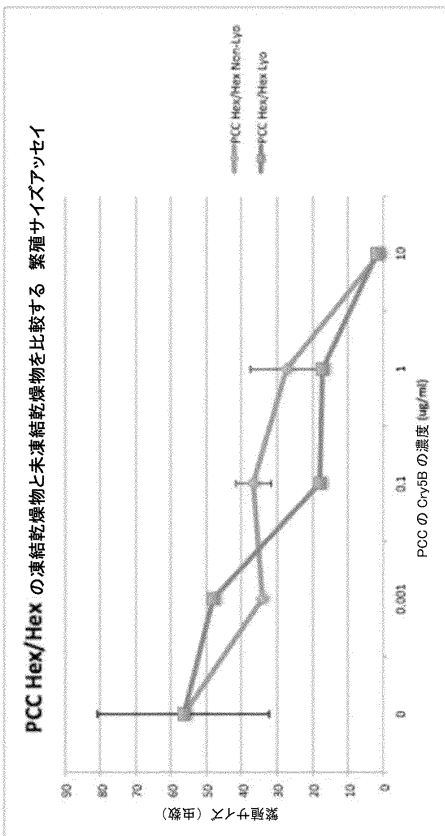


Fig. 14

【 図 1 5 】

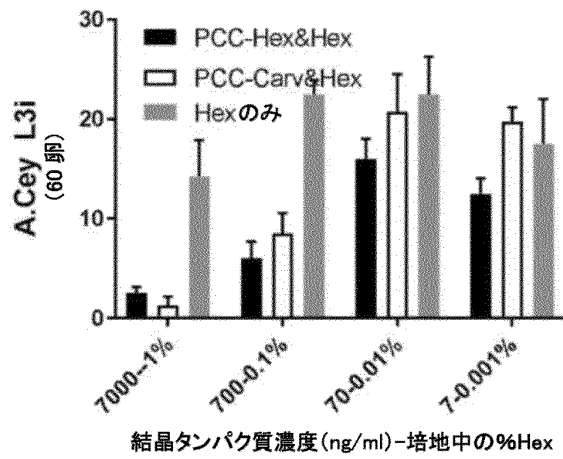


Fig. 15

10

20

30

40

50

【 図 16 】

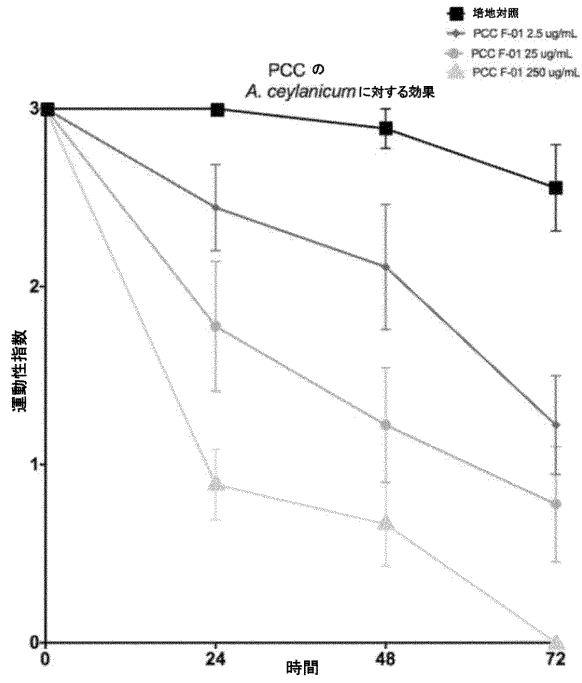


Fig. 16

【 配列表 】

0007601362000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 P	33/10 (2006.01)	A 6 1 P	33/10	
C 0 7 K	14/325 (2006.01)	C 0 7 K	14/325	Z N A
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	

ッツ州ウースター、ピー・オー・ボックス 6 0 6 3 5

## (72)発明者

ゲイリー・アール・オストロフ

アメリカ合衆国 0 1 6 0 4 マサチューセッツ州ウースター、ブライドル・パス 3 0 1 番

審査官 清野 千秋

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 0 7 / 0 6 2 0 6 4 ( W O , A 2 )

国際公開第 8 9 / 0 0 7 6 0 5 ( W O , A 1 )

BIO/TECHNOLOGY, 1995年, Vol.13, pp.67-71

EVELYN DURMAZ, INTRACELLULAR AND EXTRACELLULAR EXPRESSION OF BACILLUS T HURINGIENSIS CRYSTAL PROTEIN 以下備考, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2016年02月, VOL:82, NR:4, PAGE(S):1286-1294, <https://aem.asm.org/content/aem/82/4/1286.full.pdf>, CRY5B IN LACTOCOCCUS LACTIS FOR USE AS AN ANTHELMINT

HIC

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 1 6

A 6 1 K 3 5 / 7 4 2

A 6 1 K 3 5 / 7 4

A 6 1 K 9 / 4 8

A 6 1 K 9 / 1 9

A 6 1 K 9 / 1 4

A 6 1 P 3 3 / 1 0

C 0 7 K 1 4 / 3 2 5

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 1 5 / 3 1