

(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2013-530965

(P2013-530965A)

(43) 公表日 平成25年8月1日 (2013. 8. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 36/81 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 R	4 C 0 8 8
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-515634 (P2013-515634)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月23日 (2011. 6. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年2月6日 (2013. 2. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2011/000760
 (87) 国際公開番号 W02011/160174
 (87) 国際公開日 平成23年12月29日 (2011. 12. 29)
 (31) 優先権主張番号 61/358, 126
 (32) 優先日 平成22年6月24日 (2010. 6. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512330189
 バルモラル オーストラリア ビーティー
 ワイ リミテッド
 オーストラリア国 2065 ニュー サ
 ウス ウェールズ, セント レオナルズ,
 パシフィック ハイウェイ 100
 (71) 出願人 512330503
 ヘキシマ リミテッド
 オーストラリア国 3000 ヴィクトリ
 ア メルボルン, コリンズ ストリート
 379, レベル 1
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

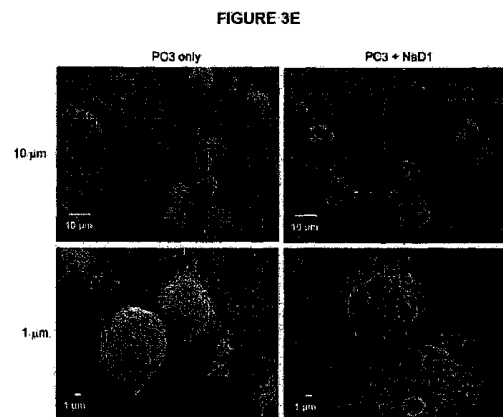
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増殖性疾患の治療

(57) 【要約】

本発明は、増殖性疾患を予防または治療するための方法に関する。具体的には、本発明は、植物に由来する、もしくは植物から得られる組成物、たとえば植物ディフェンシンを、とくにがんなどの増殖性疾患の予防または治療のための方法に使用することに関する。本発明はまた、関連する使用、システム、およびキットに関する。

【選択図】 図 3 E



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

増殖性疾患を予防または治療するための方法であって、その方法が治療上有効な量の：

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；
 - (e) 前記宿主細胞によって産生される発現産物；または
 - (f) 前記植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、もしくは発現産物を、製薬上許容される担体、賦形剤、もしくは添加剤とともに含有する医薬組成物；
- を被験体に投与することを含んでおり、それによって増殖性疾患を予防もしくは治療する、前記方法。

10

【請求項 2】

前記植物ディフェンシンがハナタバコ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*) またはトマト (*Solanum lycopersicum*) に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記植物ディフェンシンがNaD1、NsD1、NsD2、PhD1A、およびTPP3からなる 1 群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記植物ディフェンシンが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、もしくは配列番号 26、またはそれらの機能的断片からなる一群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記植物ディフェンシンが、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、もしくは配列番号 27、またはそれらの機能的断片からなる 1 群から選択される核酸配列、または前記核酸配列のいずれかに対して70%同一性を有する機能的核酸配列によってコードされる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 6】

増殖性疾患ががんである、請求項 1 ~ 5 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

がんが、基底細胞がん、骨肉腫、大腸がん、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、白血病、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、または甲状腺がんからなる 1 群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

増殖性疾患を予防または治療するための薬剤の調製における

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；または
 - (e) 前記宿主細胞によって産生される発現産物；
- の使用。

40

【請求項 9】

前記植物ディフェンシンがハナタバコ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*) またはトマト (*Solanum lycopersicum*) に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項 8 に記載の使用。

50

【請求項 10】

前記植物ディフェンシンがNaD1、NsD1、NsD2、PhD1A、およびTPP3からなる1群から選択される、請求項8に記載の使用。

【請求項 11】

前記植物ディフェンシンが、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、もしくは配列番号26、またはそれらの機能的断片からなる一群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の使用。

【請求項 12】

前記植物ディフェンシンが、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、もしくは配列番号27、またはそれらの機能的断片からなる1群から選択される核酸配列、または前記核酸配列のいずれかに対して70%同一性を有する機能的核酸配列によってコードされる、請求項8に記載の使用。

10

【請求項 13】

増殖性疾患ががんである、請求項8～12のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 14】

がんが、基底細胞がん、骨肉腫、大腸がん、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、白血病、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、または甲状腺がんからなる1群から選択される、請求項13に記載の使用。

20

【請求項 15】

増殖性疾患を予防または治療するために使用されるキットであって、そのキットが治療上有効な量の：

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；
 - (e) 前記宿主細胞によって産生される発現産物；または
 - (f) 前記植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、もしくは発現産物を、製薬上許容される担体、賦形剤、もしくは添加剤とともに含有する医薬組成物；
- を含んでなる、前記キット。

30

【請求項 16】

前記植物ディフェンシンがハナタバコ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*) またはトマト (*Solanum lycopersicum*) に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項15に記載のキット。

【請求項 17】

前記植物ディフェンシンがNaD1、NsD1、NsD2、PhD1A、およびTPP3からなる1群から選択される、請求項15に記載のキット。

【請求項 18】

前記植物ディフェンシンが、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、もしくは配列番号26、またはそれらの機能的断片からなる一群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項15に記載のキット。

40

【請求項 19】

前記植物ディフェンシンが、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、もしくは配列番号27、またはそれらの機能的断片からなる1群から選択される核酸配列、または前記核酸配列のいずれかに対して70%同一性を有する機能的核酸配列によってコードされる、請求項15に記載のキット。

50

【請求項 20】

増殖性疾患ががんである、請求項 15 ~ 19 のいずれか1つに記載のキット。

【請求項 21】

がんが、基底細胞がん、骨肉腫、大腸がん、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、白血病、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、または甲状腺がんからなる1群から選択される、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

増殖性疾患を予防または治療するための請求項 15 ~ 21 のいずれか1つに記載のキットの使用であって、治療上有効な量の：

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；
 - (e) 前記宿主細胞によって産生される発現産物；または
 - (f) 前記植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、もしくは発現産物を、製薬上許容される担体、賦形剤、もしくは添加剤とともに含有する医薬組成物；
- が被験体に投与され、それによって増殖性疾患を予防または治療する、前記使用。

【請求項 23】

増殖性疾患を予防または治療するために使用される医薬組成物であって、その医薬組成物が：

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；または
 - (e) 前記宿主細胞によって産生される発現産物；
- を、製薬上許容される担体、賦形剤、もしくは添加剤とともに含有する、前記医薬組成物。

【請求項 24】

増殖性疾患を予防または治療するために使用される、ナス科クラスII植物ディフェンシン。

【請求項 25】

ナス科クラスII植物ディフェンシンの哺乳類腫瘍細胞に対する細胞毒性についてスクリーニングするための方法であって、その方法が、

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；または
 - (e) 前記宿主細胞によって産生される発現産物；
- を、哺乳類細胞株とともにインキュベートすること、ならびに植物ディフェンシンとの接触に起因する哺乳類細胞株に対する細胞毒性についてアッセイすることを含み、それによって、ナス科クラスII植物ディフェンシンの哺乳類腫瘍細胞に対する細胞毒性についてスクリーニングする、前記方法。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の方法でスクリーニングされたナス科クラスII植物ディフェンシン。

【請求項 27】

溶血作用の低下したナス科クラスII植物ディフェンシンを作製するための方法であって、その方法が少なくとも1つのアラニン残基を、植物ディフェンシンのN末端もしくはその近傍に導入することを含む、前記方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の方法により作製された、溶血作用の低下したナス科クラスII植物デ

10

20

30

40

50

ィフェンシン。

【請求項 29】

実施例のいずれか 1 つもしくはいくつかに準拠して実質的に本明細書に記載される、溶血作用の低下したナス科クラスII植物ディフェンシン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、増殖性疾患を予防または治療するための方法に関する。具体的には、本発明は、植物に由来する、もしくは植物から得られる組成物、たとえば植物ディフェンシンを、とくにがんなどの増殖性疾患の予防または治療のための方法に使用することに関する。本発明はまた、関連する使用、システム、およびキットに関する。

10

【0002】

関連出願の相互参照

本発明は、2010年6月24日出願の米国特許仮出願第61/358,126号の優先権を主張するものであり、これはその全体を参考として本明細書に含めるものとする。

【0003】

連邦政府資金による研究に関する申告

該当なし

【背景技術】

【0004】

植物は、環境ストレス、損傷、または微生物の侵入から植物自体を守るために、構成的または誘導的に、さまざまな化合物を生成することが知られている。

20

【0005】

これまでに性質が明らかになった植物抗菌タンパク質の大部分は、共通の特徴を共有している。こうしたタンパク質は概して小型 (<10 kDa) の高塩基性タンパク質であって、多くの場合、偶数個のシステイン残基 (典型的には4、6、または8個) を含有する。これらのシステインはすべて分子内ジスルフィド結合に関与しており、タンパク質に構造的および熱力学的安定性をもたらす (Broekaert et al. (1997))。アミノ酸配列同一性に基づいて、主としてシステイン残基の数および間隔に準拠して、いくつかの個別のファミリーを定義した。それは、植物ディフェンシン (Broekaert et al., 1995, 1997; Lay et al., 2003a)、チオニン (Bohlmann, 1994)、脂質輸送タンパク質 (Kader, 1996, 1997)、ヘベイン (Broekaert et al., 1992)、およびノッティン (knottin) 様タンパク質 (Cammue et al., 1992)、ならびにマカダミア (*Macadamia integrifolia*) (Marcus et al., 1997; McManus et al., 1999) およびハウセンカ (*Impatiens balsamina*) (Tailor et al., 1997; Patel et al., 1998) 由来の抗菌タンパク質などである (表 1)。異なるタンパク質ファミリーは異なるメカニズムを介して作用すると思われるが、上記の抗菌タンパク質はすべて、標的微生物の細胞膜のレベルで、その活性を発揮すると思われる (Broekaert et al., 1997)。サイクロチドは、アカネ科およびスミレ科のメンバーによく見られる、小型でシステインリッチの植物ペプチドの新規ファミリーである (reviewed in Craik et al., 1999, 2004; Craik, 2001)。これらの異常な環状ペプチド (表 1) は、抗菌性 (Tam, et al., 1999)、抗HIV性 (Gustafson et al., 1994)、および殺虫性 (Jennings et al., 2001) などのさまざまな生物学的活性をもたらした。

30

40

【0006】

表 1：植物の小型のシステインリッチ抗菌タンパク質

【表 1】

植物の小型のシステインリッチ抗菌タンパク質

ペプチド ファミリー	代表的な メンバー	アミノ酸数	コンセンサス配列
植物 ディフェンシン	Rs-AFP2	51	3-C-10-C-5-C-3-C-9-C-8-C-1-C-3-C
α/βチオニン (8-Cys型)	αプロチオニン	45	2-CC-7-C-3-C-8-C-3-C-1-C-8-C-6
脂質輸送 タンパク質	Ace-AMP1	93	3-C-9-C-12-CC-18-C-1-C-23-C-15-C-4
ヘペイン様	Ac-AMP2	30	3-C-4-C-4-CC-5-C-6-C-2
ノッティン様	Mj-AMP1	36	1-C-6-C-8-CC-3-C-10-C-3
マカダミア	MiAMP1	76	10-C-9-C-1-C-25-C-14-C-11-C
ホウセンカ	Ib-AMP1	20	5-CC-8-C-3-C
サイクロチド	Kalata B1	29	1-C-3-C-4-C-4-C-1-C-4-C-6

【0007】

植物抗菌タンパク質の代表的なメンバーに関する、成熟タンパク質のサイズ、およびシステイン残基の間隔を表1に示す。コンセンサス配列中の数字は、その代表的メンバーにおいて高度に保存されたシステイン残基間のアミノ酸の数を表すが、ファミリーの他メンバーは、システイン間の長さの点でわずかに異なる可能性がある。ジスルフィド結合は連結線で示される。サイクロチドの環状骨格は破線で示す (Lay and Anderson, 2005より)。

【0008】

ディフェンシン

「ディフェンシン」という用語は、多種多様な種によって産生される分子であって、細菌、真菌、酵母およびウイルスなどの病原体に対する生得の防御において機能を果たす前記分子の、多様なファミリーを表すために、当技術分野ですでに使用されている。

【0009】

植物ディフェンシン

植物ディフェンシン (チオニンとも称される) は、CysI-CysVIII、CysII-CysIV、CysIII-CysVI、およびCysV-CysVIIの配置をとる4つの厳密に保存されたジスルフィド結合を形成する8個のシステイン残基を有する、小型で (約5 kDa、45-54アミノ酸) 塩基性のタンパク質である。植物ディフェンシンの中には、これら4つの厳密に保存されたジスルフィド結合だけでなく、追加のジスルフィド結合を有するものもある (Lay et al., 2003a, 2003b; Janssen et al., 2003)。

【0010】

「植物ディフェンシン」という名称は、1995年にTerrasらの研究チームが造語したものであるが、彼らは2つの抗真菌タンパク質をダイコンの種子から単離し (Rs-AFP1およびRs-AFP2)、これらのタンパク質が一次構造および三次構造レベルで、植物 / チオニンとは異なるが、昆虫および哺乳類ディフェンシンとはある程度の構造的類似性を共有するこ

10

20

30

40

50

とを指摘した (Terras et al., 1995; Broekaert et al., 1995)。

【0011】

植物ディフェンシンは、比較的限られてはいるが明確な配列保存を示す。厳密に保存されているのは、8個のシステイン残基、および34位のグリシンである (Rs-AFP2に関する番号付け)。ほとんどの配列において、8位のセリン、11位の芳香族残基、13位のグリシン、および29位のグルタミン酸も保存されている (Lay et al., 2003a; Lay and Anderson, 2005)。

【0012】

最初の植物ディフェンシンの三次元溶液構造は、1993年にBruixらの研究チームによって、1-Pおよび1-Hについて解明された。その時以来、他の種子および2つの花に由来する (NaD1およびPhD1) ディフェンシンの構造が究明された (Lay et al., 2003b; Janssen et al., 2003)。これらのディフェンシンはすべて、システインで安定化された (CS) フォールドとして知られるモチーフを作り上げ、明確に定義されたヘリックスおよび3本鎖逆平行シートを含む、高度に重ね合わせられる三次構造を共有している。これらの要素は、配置に組織化され、4つのジスルフィド橋によって補強される。

10

【0013】

CSモチーフはまた昆虫ディフェンシン、およびサソリ毒によっても示される。構造的特徴が明らかになった植物ディフェンシン、昆虫ディフェンシン、およびサソリ毒のアミノ酸配列を比較すると、CSスキヤフォールドは、大きさ、および構造の差異に対して高度に寛容である。

20

【0014】

植物ディフェンシン/チオニン構造は、およびチオニンのとる構造とは対照的である。およびチオニンは、コンパクトで、両親媒性で、L形の分子を形成するが、このLの長い垂直なアームは2つのヘリックスからなり、短いアームは2つの逆平行ストランドおよび最後の (~10) C末端残基で形作られる。これらのタンパク質は、3または4つのジスルフィド結合によっても安定化される (Bohlmann and Apel, 1991)。

【0015】

植物ディフェンシンは、植物界の全体にわたって広範に分布しており、全部ではないが、大部分の植物に存在する可能性が高い。ほとんどの植物ディフェンシンは、それが豊富に存在する種子から単離され、分子的、生化学的および構造的レベルで特性が明らかにされている (Broekaert et al., 1995; Thomma et al., 2003; Lay and Anderson, 2005)。ディフェンシンはまた、他の組織、葉、莢、塊茎、果実、根、樹皮、および花の組織においても確認された (Lay and Anderson, 2005)。

30

【0016】

精製タンパク質として、またはcDNAから推定されたものとして、同定されたいくつかのディフェンシンのアミノ酸配列アラインメントが、LayおよびAnderson (2005) によって公表されている。他の植物ディフェンシンが、米国特許第6,911,577号、国際特許公開公報WO 00/11196 および国際特許公開公報WO 00/68405において公表されており、その内容全体は、参考として本明細書に組み入れられる。

40

【0017】

哺乳類ディフェンシン

哺乳類ディフェンシンは、および、およびディフェンシンとして知られる3つの異なる構造的サブファミリーを構成する。植物ディフェンシンとは異なり、3つのサブファミリーはすべて、システイン残基を6個だけ含有するが、それらのサイズ、それらのシステインの配置および関係性、それらの前駆体の性質、およびそれらの発現部位については差異がある (Selsted et al., 1993; Hancock and Lehrer, 1998; Tang et al., 1999a, b; Lehrer and Ganz, 2002)。すべてのサブファミリーは、自然宿主免疫に関係する役割を有するが、最近になって適応免疫にも、免疫促進物質として関連付けられた (Tang et al., 1999b; Lehrer and Ganz, 2002)。「ディフェンシン」という名称はそもそも、それ

50

らの防御的役割との関連で作られた (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985)。

【0018】

ディフェンシン (古典的ディフェンシンとしても知られている) は、29-35アミノ酸長であって、その6個のシステイン残基は、CysI-CysVI、CysII-CysIV、およびCysIII-CysVの配置を有する3つのジスルフィド結合を形成している (表2)。

【0019】

ディフェンシンに対して、ディフェンシンはもっと大型で (36-42アミノ酸長)、システインペアの組み方が異なり (CysI-CysV、CysII-CysIV、およびCysIII-CysVI)、間隔も異なる (Tang and Selsted, 1993)。ディフェンシンもやはりプレプロディフェンシンとして生成される。しかしながら、そのプロドメインはずっと短い。ディフェンシンと同様に、ディフェンシンの合成は構成的であると考えられるが、損傷後、または細菌、寄生性原虫、細菌性リポ多糖への暴露後に、さらには液性メディエーター (すなわちサイトカイン) に反応して、誘導される可能性がある (Diamond et al., 1996; Russell et al., 1996; Tarver et al., 1998)。

10

【0020】

昆虫および哺乳類由来のディフェンシンおよびディフェンシン様タンパク質の代表的メンバーに関する、成熟タンパク質の大きさおよびシステイン残基の間隔を表2に示す。コンセンサス配列の中の数字は、代表的メンバーにおいて高度に保存されたシステイン残基の間にあるアミノ酸の数を表すが、ファミリーの他メンバーは、システイン間の長さがわずかに異なることもある。ジスルフィド結合は、連結線与えられる。哺乳類ディフェンシンの環状骨格は、破線で示す。

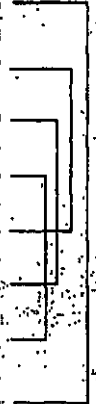

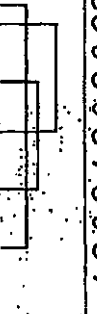
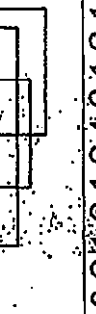

20

【0021】

表2：昆虫および哺乳類由来のディフェンシンおよびディフェンシン様タンパク質の代表的メンバー

【表 2】

昆虫および哺乳類由来のディフェンシンおよびディフェンシン様タンパク質の代表的メンバー

ペプチドファミリー	代表的メンバー	アミノ酸数	コンセンサス配列	参考文献
昆虫ディフェンシン様	ドロソマイシン	44	1-C-8-C-7-C-3-C-9-C-5-C-1-C-2-C 	Lamberty et al., 2001
昆虫ディフェンシン	昆虫 ディフェンシンA	40	2-C-12-C-3-C-9-C-5-C-1-C-2 	Cornet et al., 1995
哺乳類αディフェンシン	HNP-4	34	1-C-1-C-4-C-9-C-9-CC-4 	Harwig et al., 1992
哺乳類βディフェンシン	HBD-1	36	4-C-6-C-4-C-9-C-6-CC-1 	Bensch et al., 1995
哺乳類θディフェンシン	RTD-1	18	2-C-1-C-1-C-4-C-1-C-1-C-2 	Tang et al., 1999a,b Trabi et al., 2001

10

20

30

40

【0022】

昆虫ディフェンシン

数多くのディフェンシンおよびディフェンシン様タンパク質が昆虫で同定された。これらのタンパク質は、脂肪体（哺乳類の肝臓に相当する）で産生され、その後脂肪体から血リンパ中に放出される（Lamberty et al., 1999）。ほとんどの昆虫ディフェンシンは、3つのジスルフィド結合を有する。しかしながら、いくつかの関連タンパク質、すなわちキイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）由来のドロソマイシンは、4つのジスルフィドを有する（Fehlbaum et al., 1994; Landon et al., 1997）（表2）。

【0023】

50

いくつかの昆虫ディフェンシンの三次元構造が解析されている（たとえば、Hanzawa et al., 1990; Bonmatin et al., 1992; Cornet et al., 1995; Lamberty et al., 2001; Da Silva et al., 2003）。昆虫ディフェンシンAに代表される、それらの球状フォールドは、ヘリックス、2本鎖逆平行シート、および長いN末端ループを特徴とする。これらの二次構造の要素は、CysI-CysIV、CysII-CysV、およびCysIII-CysVIの形で配置される3つのジスルフィド結合によって安定化される（Bonmatin et al., 1992; Cornet et al., 1995）。

【0024】

2種類の植物ディフェンシン

植物ディフェンシンは、cDNAクローンから予想される前駆体タンパク質の構造にしたがって2つの主要なクラスに分けることができる（Lay et al., 2003a）（図8）。第1の、しかも最大のクラスでは、前駆体タンパク質は小胞体（ER）シグナル配列および成熟ディフェンシンドメインからなる。これらのタンパク質は分泌経路に入り、翻訳後修飾または細胞内標的化のための明白なシグナルはない（図8A）。

【0025】

ディフェンシンの第2のクラスは、約33アミノ酸のC末端プロドメインもしくはプロペプチド（CTPP）を有する大型の前駆体として生成される（図8B）。クラスIIディフェンシンはナス科の種において同定されたが、これらは花の組織（Lay et al., 2003a; Gu et al., 1992; Milligan et al., 1995; Brandstadter et al., 1996）および果実（Aluru et al., 1999）において、ならびに塩ストレスを与えた葉（Komori et al., 1997; Yamada et al., 1997）において、構成的に発現される。ハナタバコ（*Nicotiana glauca*）由来の（NaD1）、およびペチュニア（*Petunia hybrida*）由来の（PhD1およびPhD2）、ナス科ディフェンシンのCTPPは、成熟中にタンパク質分解で除去される（Lay et al., 2003a）。

【0026】

ナス科ディフェンシンのCTPPは、酸性および疎水性アミノ酸の含量が異常に高い。興味深いことに、中性pHで、CTPPの負電荷は、ディフェンシンドメインの正電荷を相殺する（Lay and Anderson, 2005）。

【0027】

植物ディフェンシンの生物学的活性

生物学的活性の中には植物ディフェンシンに起因するものもあり、これには、真菌（Broekaert et al., 1997; Lay et al., 2003a; Osborn et al., 1995; Terras et al., 1993）、ならびにグラム陽性およびグラム陰性細菌（Segura et al., 1998; Moreno et al., 1994; Zhang and Lewis, 1997）に対する増殖阻害効果が含まれる。ディフェンシンには、アミラーゼ（Zhang et al., 1997; Bloch et al., 1991）およびセリンプロテアーゼ（Wijaya et al., 2000; Melo et al., 2002）などの消化酵素の、効果的な阻害剤となるものもあり、2つの機能は、昆虫の植食性からの防御における役割と一致する。これは、細菌で発現された緑豆ディフェンシン、VrCRPが、人工飼料に0.2%（w/w）入れられると、マメゾウムシ科のアズキゾウムシ（*Callosobruchus chinensis*）に対して致死的であるという観察によって支持される（Chen et al., 2002）。ディフェンシンには、タンパク質翻訳を阻害するものもあり（Mendez et al., 1990; Colilla et al., 1990; Mendez et al., 1996）、イオンチャンネルと結合するものもある（Kushmerick et al., 1998）。ハクサンハタザオ（*Arabidopsis halleri*）由来のディフェンシンは垂鉛耐性も与えるが、これはストレス適応における役割を示唆する（Mirouze et al., 2006）。最近になって、ヒマワリディフェンシンは、ハマウツボ属寄生植物において細胞死を誘導することが示された（de Zelicourt et al., 2007）。

【0028】

抗真菌活性

植物ディフェンシンのすべてではないが一部についてもっともよく特徴が明らかにされている活性は、それらが、さまざまな効力で、多数の真菌種を抑制する能力である（たとえば、Broekaert et al., 1997; Lay et al., 2003a; Osborn et al., 1995を参照された

い)。たとえばRs-AFP2は、1 $\mu\text{g/mL}$ で蛇の目病菌 (*Phoma betae*) の生育を阻害するが、菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) に対しては100 $\mu\text{g/mL}$ で無効である (Terras et al., 1992)。真菌である赤かび病菌 (*Fusarium culmorum*) の生育および形態に及ぼす影響に基づいて、ディフェンシンの2つのグループを識別することができる。「形態形成」植物ディフェンシンは、菌糸伸長の減少を引き起こし、同時に菌糸分岐の増加をもたらすが、「非形態形成」植物ディフェンシンは、菌糸伸長の速度を低下させるものの、顕著な形態的歪みは生じさせない (Osborn et al., 1995)。

【0029】

最近になって、エンドウディフェンシンPsd1は、細胞内に取り込まれて、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) の核に入り、そこで、細胞周期の調節に関わる核サイクリン様タンパク質と相互作用することが明らかになった (Lobo et al., 2007)。アルファルファ由来のディフェンシン、MsDef1については、2つのマイトジェン活性化タンパク質 (MAP) キナーゼシグナル伝達カスケードが、赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) に対するMsDef1活性の制御に主要な役割を担う (Ramamoorthy et al., 2007)。

10

【0030】

真菌膜の透過化も、植物ディフェンシンの一部で報告されている (Lay and Anderson, 2005)。たとえば、NaD1はハナタバコ (*Nicotiana glauca*) の花の組織から単離された植物ディフェンシンである。NaD1のアミノ酸およびコード配列は、国際特許公開公報WO 02/063011に記載されており、その内容の全体は参考として本明細書に含められる。糸状菌、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) f. sp. *vasinfectum* (Fov)、*Verticillium dahliae*、*Thielaviopsis basicola*、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、および *Leptosphaeria maculans* に対する抗真菌活性についてNaD1を *in vitro* で調べた。NaD1は1 μM でFovおよび *L. maculans* の生育を50%だけ遅らせたが、*V. dahliae*、*T. basicola*、および *A. nidulans* はすべて、約65%阻害された。5 μM NaD1で、5つの種すべての生育が80%以上阻害された。これら5つの真菌種はいずれも、子囊菌門のメンバーであり、チャワンタケ亜門 (subphylum *pezizomycotina*) の3つの綱に分けられる。これらの真菌は、農学上重要な真菌性病原体である。これまで検討したすべての糸状菌は、NaD1による阻害に対して感受性である (van der Weerden et al., 2008)。

20

【0031】

システイン残基を還元およびアルキル化することによって、NaD1の4つのジスルフィド結合の重要性を検討した。還元およびアルキル化されたNaD1 (NaD1R&A) は、NaD1のIC50より10倍高い濃度でも、Fovを用いた生育阻害アッセイにおいて完全に不活性であった (van der Weerden et al., 2008)。

30

【0032】

抗菌ペプチドおよび腫瘍細胞を用いた先行研究

ヒト疾患の治療における小型のシステインリッチ/カチオン性抗菌ペプチドの使用

がん、腫瘍形成、血管形成、および浸潤のさまざまな態様でのヒト および ディフェンシンに関する文献が増えている。哺乳類ディフェンシンの使用は、ウイルスおよび真菌感染症の治療のためにも、細菌感染症の抗生物質治療の代替または追加としても、提案されている。しかしながら、それらのヒト細胞に対する細胞毒性は依然として深刻な障壁である。Mossら (米国特許第7,511,015号) は、アルギニン残基のリボシル化もしくはADPリボシル化によるディフェンシンペプチドの修飾が、ペプチドの毒性を改善し、その抗菌性を高めることを明らかにした。

40

【0033】

MaderおよびHoskinによる総説 (2006) は、がん治療用の新規細胞毒性薬としてのカチオン性抗菌ペプチドの使用を記載する。しかしながら、注目すべきは、PelegrianiおよびFranciscoによる総説 (2005) が誤って、抗がん性分子であるヤドリギ由来の / チオニン (植物ディフェンシンの別名) と記載していることである。当業者には理解されることであろうが、そうした先行技術は植物ディフェンシン (チオニン) とは無関係であって、それよりむしろ、構造的および機能的に異なる / チオニンに関わるもので

50

ある。

【0034】

ヒトがん細胞に対して増殖抑制作用を有する植物ディフェンシンに関する報告

2004年以来、いくつかの独立した報告は、植物ディフェンシン（様）タンパク質がやはり、*in vitro*で、さまざまなヒト腫瘍細胞株に対して（さまざまな効力で）増殖抑制作用を示す可能性があることを示唆している（たとえば、Wong and Ng (2005), Ngai and Ng (2005), Ma et al. (2009) and Lin et al. (2009)を参照されたい）。これらのタンパク質は、大部分がマメ科植物（たとえばマメ）から単離された。これらのタンパク質の植物ディフェンシンクラスへの割り当ては、推定分子量（～5 kDa）に基づいて行われたが、場合によっては、既知のディフェンシン配列に対する限定されたN末端アミノ酸の類似性にに基づいて行われた。しかしながら、上記参考文献に記載のタンパク質は、ディフェンシンを特徴付ける厳密に保存されたシステイン残基およびシステイン間隔を欠いている。それに加えて、こうした参考文献に記載のタンパク質は、クラスIIディフェンシンではなく、ナス科由来でもない。

10

【0035】

文献の再検討から、ハバネロ（*Capsicum chinense*）ディフェンシン（CcD1）だけが、ヒト細胞の生存を阻害する能力を有するとしてすでに関係があるとされた、ナス科のクラスIIディフェンシンであることが示されている（Anaya-Lopez et al., 2006）。CcD1の全長配列をコードする発現構築物をウシ内皮細胞株BE-E6E7にトランスフェクトした結果、ヒト癌化細胞株Helaに対して増殖抑制効果を示す馴化培地を生じたことが報告されている。実験計画およびこれらのデータの解釈には、CcD1が増殖抑制作用を示すかどうかについて、当業者が記載された研究から妥当な結論を導き出すのを不可能にする、いくつかの大きな不備がある。こうした不備には下記のものがある：(i) CcD1のmRNAがトランスフェクト細胞にあることは示唆されたが、CcD1タンパク質が実際に馴化培地中で発現されたことを実証する証拠は提示されなかった、(ii) CcD1の成熟コードドメインではなく全長オープンリーディングフレームを使用すると、「活性」ディフェンシンを生成するために、CTPPドメインの除去による、発現前駆体のプロセッシングが必要になると思われるが、このことが示されなかった、(iii) トランスフェクションのプロセスは結果として細胞の変化をもたらす可能性があるが、トランスフェクション実験の対照は、ベクターだけでトランスフェクトされた細胞という適正な対照ではなくトランスフェクトされない細胞を使用したという点で適切でなかった、(iv) 精製CcD1タンパク質ではなく馴化培地を使用したことは、培地の成分、またはトランスフェクト細胞から分泌された他の分子が、それ自体で、またはCcD1との組み合わせで、増殖抑制作用を有するかもしれないので、実験の読み出し情報に影響を与える可能性がある、(v) トランスフェクトされたさまざまな内皮細胞集団におけるCcD1 mRNAの発現レベル（Anaya-Lopez et al., 2006、図2）は、異なる馴化培地サンプルによって引き起こされる増殖抑制反応の実測値の間で、統計上有意味な相違がないので、提案されているCcD1トランスフェクト細胞馴化培地の増殖抑制作用と相関しない（Anaya-Lopez et al., 2006、図4）。実験計画および解釈における上記の欠陥が、同じ著者による2008年の別の公表論文（Loenza-Angeles et al., 2008）でも明らかに認められたことにも留意すべきである。これらの所見に基づくと、当業者が、Anaya-Lopez et al. (2006)から、CcD1が哺乳類細胞に対してなんらかの増殖抑制作用を有すると解釈することは不可能となる。

20

30

40

【0036】

本発明者らは、すでに国際特許公開公報WO 02/063011において、若干の新規ディフェンシン、ならびに植物もしくは植物の部分において病原体侵入に対する抵抗性を誘導するのにそれらを使用することを記載した。WO 02/063011の内容はその全体を参考として本明細書に含めるものとする。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0037】

50

- 【特許文献 1】米国特許第6,911,577号
- 【特許文献 2】国際特許公開公報第00/11196号パンフレット
- 【特許文献 3】国際特許公開公報第00/68405号パンフレット
- 【特許文献 4】国際特許公開公報第02/063011号パンフレット
- 【特許文献 5】米国特許第7,511,015号
- 【非特許文献】
- 【0038】
- 【非特許文献 1】Broekaert et al. (1997) Crit Rev Plant Sci 16: 297-323
- 【非特許文献 2】Broekaert et al. (1995) Plant Physiol 108: 1353-1358
- 【非特許文献 3】Lay et al. (2003a) Plant Physiol.131: 1283-1293 10
- 【非特許文献 4】Bohlmann (1994) Crit Rev Plant Sci 13: 1-16
- 【非特許文献 5】Kader (1996) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 627-654
- 【非特許文献 6】Kader (1997) Trends Plant Sci 2: 66-70
- 【非特許文献 7】Broekaert et al. (1992) Biochemistry 32: 4308-4314
- 【非特許文献 8】Cammue et al. (1992) J Biol Chem 267: 2228-2233
- 【非特許文献 9】Marcus et al. (1997) Eur J Biochem 244: 743-749
- 【非特許文献 10】McManus et al. (1999) J Mol Biol 293: 629-638
- 【非特許文献 11】Tailor et al. (1997) J Biol Chem 272: 24480-24487
- 【非特許文献 12】Patel et al. (1998) Biochemistry 37: 983-990
- 【非特許文献 13】Craik et al. (1999) J Mol Biol 294: 1327-1336 20
- 【非特許文献 14】Craik et al. (2004) Curr Prot Pept Sci 5: 297-315
- 【非特許文献 15】Craik (2001) Toxicon 39: 1809-1813
- 【非特許文献 16】Tam et al. (1999) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 96: 8913-8918
- 【非特許文献 17】Gustafson et al. (1994) J Am Chem Soc 116: 9337-9338
- 【非特許文献 18】Jennings et al. (2001) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 98: 10614-10619
- 【非特許文献 19】Lay and Anderson (2005) Curr Protein Pept Sci 6: 85-101
- 【非特許文献 20】Lay et al. (2003b) J Mol Biol 325: 175-188
- 【非特許文献 21】Janssen et al. (2003) Biochemistry 42: 8214-8222
- 【非特許文献 22】Terras et al. (1995) Plant Cell 7: 573-588 30
- 【非特許文献 23】Bohlmann and Apel (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42: 227-240
- 【非特許文献 24】Thomma et al. (2003) Curr Drug Targets - Infect. Dis. 3: 1-8
- 【非特許文献 25】Selsted et al. (1993) J Biol Chem 268: 6641-6648
- 【非特許文献 26】Hancock and Lehrer (1998) Trends Biotech 16: 82-88
- 【非特許文献 27】Tang et al. (1999a) Science 286: 498-502
- 【非特許文献 28】Tang et al. (1999b) Infect Immun 67: 6139-6144
- 【非特許文献 29】Lehrer and Ganz (2002) Curr Opin Immunol 14: 96-102
- 【非特許文献 30】Ganz et al. (1985) J Clin Invest 76: 1427-1435
- 【非特許文献 31】Selsted et al. (1985) J Clin Invest 76: 1436-1439 40
- 【非特許文献 32】Tang and Selsted (1993) J Biol Chem 268: 6649-6653
- 【非特許文献 33】Diamond et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93: 5156-5160
- 【非特許文献 34】Russell et al. (1996) Infect Immun 64: 1565-1568
- 【非特許文献 35】Tarver et al. (1998) Infect Immun 66: 1045-1056
- 【非特許文献 36】Lamberty et al. (1999) J Biol Chem 274: 9320-9326
- 【非特許文献 37】Fehlbaum et al. (1994) J Biol Chem 269: 33159-33163
- 【非特許文献 38】Landon et al. (1997) Protein Sci 6: 1878-1884
- 【非特許文献 39】Hanzawa et al. (1990) FEBS Lett 269: 413-420
- 【非特許文献 40】Bonmatin et al. (1992) J Biomol NMR 2: 235-256
- 【非特許文献 41】Cornet et al., (1995) Structure 3: 435-448 50

- 【非特許文献 4 2】Lamberty et al. (2001) *Biochemistry* 40: 11995-12003
- 【非特許文献 4 3】Da Silva et al. (2003) *Protein Sci* 12: 438-446
- 【非特許文献 4 4】Gu et al. (1992) *Mol Gen Genet* 234: 89-96
- 【非特許文献 4 5】Milligan et al. (1995) *Plant Mol Biol* 28: 691-711
- 【非特許文献 4 6】Brandstadter et al. (1996) *Mol Gen Genet* 252: 146-154
- 【非特許文献 4 7】Aluru et al. (1999) *Plant Physiol* 120: 633
- 【非特許文献 4 8】Komori et al. (1997) *Plant Physiol* 115: 314
- 【非特許文献 4 9】Yamada et al. (1997) *Plant Physiol* 115: 314
- 【非特許文献 5 0】Osborn et al. (1995) *FEBS Lett* 368: 257-262
- 【非特許文献 5 1】Terras et al. (1993) *FEBS Lett* 316: 233-240 10
- 【非特許文献 5 2】Segura et al. (1998) *FEBS Lett* 435: 159-162
- 【非特許文献 5 3】Moreno et al. (1994) *Eur J Biochem* 223: 135-139
- 【非特許文献 5 4】Zhang and Lewis (1997) *FEMS Microbiol Lett* 149: 59-64
- 【非特許文献 5 5】Zhang et al. (1997) *Cereal Chem* 74: 119-122
- 【非特許文献 5 6】Bloch et al. (1991) *FEBS Lett* 279: 101-104
- 【非特許文献 5 7】Wijaya et al. (2000) *Plant Sci* 159: 243-255
- 【非特許文献 5 8】Melo et al. (2002) *Proteins* 48: 311-319
- 【非特許文献 5 9】Chen et al. (2002) *J Agric Food Chem* 50: 7258-63
- 【非特許文献 6 0】Mendez et al. (1990) *Eur J Biochem* 194: 533-539
- 【非特許文献 6 1】Colilla et al. (1990) *FEBS Lett* 270: 191-4 20
- 【非特許文献 6 2】Mendez et al. (1996) *Eur J Biochem* 239: 67-73
- 【非特許文献 6 3】Kushmerick et al. (1998) *FEBS Lett* 440: 302-306
- 【非特許文献 6 4】Mirouze et al. (2006) *Plant J* 47: 329-342
- 【非特許文献 6 5】Ramamoorthy et al. (2007) *Mol Microbiol* 66: 771-786
- 【非特許文献 6 6】van der Weerden (2008) *J Biol Chem* 283: 14445-14452
- 【非特許文献 6 7】Mader and Hoskin (2006) *Expert Opin Investig Drugs* 15: 933-46.
- 総説
- 【非特許文献 6 8】Pelegrini and Franco (2005) *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2239-53
- 【非特許文献 6 9】Wong and Ng (2005) *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1626-32 30
- 【非特許文献 7 0】Ngai and Ng (2005) *Biochem Cell Biol* 83: 212-20
- 【非特許文献 7 1】Ma et al. (2009) *Peptides* 30: 2089-2094
- 【非特許文献 7 2】Lin et al. (2009) *Biosci Rep* 30: 101-109
- 【非特許文献 7 3】Anaya-Lopez et al. (2006) *Biotechnol Lett* 28: 1101-8.
- 【非特許文献 7 4】Loenza-Angeles et al. (2008) 30: 1713-1719
- 【非特許文献 7 5】de Zelicourt et al. (2007) *Planta* 226: 591-600
- 【非特許文献 7 6】Lobo et al. (2007) *Biochemistry* 46: 987-96
- 【非特許文献 7 7】Terras et al. (1992) *J Biol Chem* 267: 15301-15309
- 【発明の概要】
- 【0039】 40
- 植物ディフェンシンをさらに研究した結果として、驚くべきことに、ナス科植物由来のクラスIIディフェンシンが、強い細胞毒性を有すると判断された。ゆえに、これらの重要な研究結果は、増殖性疾患を予防および治療する新しい重要な方法を説明するものである。したがって、これらの研究結果は、がんなどの増殖性疾患の予防および治療のための方法、ならびに関連するシステムおよびキットを提供する。
- 【0040】
- 発明の概要
- 本発明の第1の態様において、増殖性疾患の予防もしくは治療用の植物ディフェンシンが与えられる。
- 【0041】 50

本発明の第2の態様において、第1の態様の植物ディフェンシンをコードする核酸が与えられる。

【0042】

本発明の第3の態様において、第2の態様の核酸を有するベクターが与えられる。

【0043】

本発明の第4の態様において、第3の態様のベクターを含有する宿主細胞が与えられる。

【0044】

本発明の第5の態様において、第4の態様の宿主細胞によって生産される発現産物が与えられる。

【0045】

本発明の第6の態様において、増殖性疾患の予防もしくは治療用の医薬組成物が与えられるが、この医薬組成物は、第1の態様の植物ディフェンシン、第2の態様の核酸、第3の態様のベクター、第4の態様の宿主細胞、または第5の態様の発現産物を、製薬上許容される担体、希釈剤または添加剤とともに含有する。

【0046】

本発明の第7の態様において、増殖性疾患を予防もしくは治療するための方法が与えられるが、その方法は、治療上有効な量の第1の態様の植物ディフェンシン、第2の態様の核酸、第3の態様のベクター、第4の態様の宿主細胞、第5の態様の発現産物、または第6の態様の医薬組成物を被験体に投与し、それによって増殖性疾患を予防もしくは治療することを含む。

【0047】

本発明の第8の態様において、第1の態様の植物ディフェンシン、第2の態様の核酸、第3の態様のベクター、第4の態様の宿主細胞、第5の態様の発現産物、または第6の態様の医薬組成物を、増殖性疾患を予防もしくは治療するための薬剤の調製に使用することが与えられる。

【0048】

本発明の第9の態様において、増殖性疾患を予防もしくは治療するためのキットが与えられるが、このキットは、治療上有効な量の第1の態様の植物ディフェンシン、第2の態様の核酸、第3の態様のベクター、第4の態様の宿主細胞、第5の態様の発現産物、または第6の態様の医薬組成物を含んでなる。

【0049】

本発明の第10の態様において、増殖性疾患を予防もしくは治療するための、第9の態様のキットの使用が与えられるが、この使用では、治療上有効な量の第1の態様の植物ディフェンシン、第2の態様の核酸、第3の態様のベクター、第4の態様の宿主細胞、第5の態様の発現産物、または第6の態様の医薬組成物が被験体に投与され、それによって増殖性疾患を予防もしくは治療する。

【0050】

本発明の第11の態様において、哺乳類腫瘍細胞に対する植物ディフェンシンの細胞毒性に関するスクリーニングの方法が与えられるが、その方法は、治療上有効な量の第1の態様の植物ディフェンシン、第2の態様の核酸、第3の態様のベクター、第4の態様の宿主細胞、第5の態様の発現産物、または第6の態様の医薬組成物を、哺乳類細胞株と接触させること、ならびに植物ディフェンシンとの接触に起因する、哺乳類細胞株に対する細胞毒性についてアッセイすることを含む。

【0051】

本発明の第12の態様において、第11の態様の方法でスクリーニングされた植物ディフェンシンが与えられる。

【0052】

本発明の第13の態様において、溶血作用の低下した植物ディフェンシンを生産するための方法が与えられるが、その方法は、少なくとも1つのアラニン残基を植物ディフェンシンのN末端、またはその近傍に導入することを含む。

10

20

30

40

50

【0053】

本発明の第14の態様において、第13の態様に記載の方法によって生産された、溶血作用の低下した植物ディフェンシンが与えられる。

【0054】

定義

「導き出せる」という用語は、「得られる」および「分離できる」という用語を含み、これらと互換的に使用することができる。特定の起源またはプロセスから「導き出せる」、「得られる」または「分離できる」本発明の組成物または他の事柄は、その起源またはプロセスから導き出された、得られた、または分離された組成物または他の事柄を含むだけでなく、同じ組成物または事柄であればどのように調達され、または生産されてもこれを含む。

10

【0055】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合により結合したアミノ酸からなるポリマーを意味し、その断片もしくは類似体を含む。「ポリペプチド」、「タンパク質」および「アミノ酸」という用語は、本発明において「ポリペプチド」が全長タンパク質の一部をなしているかもしれないが、本明細書において互換的に使用される。

【0056】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド塩基、もしくは既知の天然ヌクレオチド類似体、またはそれらの混合物の、一本鎖または二本鎖ポリマーを指す。この用語には、特に指示しない限り、指定された配列、ならびにそれに相補的な配列への言及も含まれる。「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「ヌクレオチド配列」という用語は、本明細書において区別せずに使用される。当然のことながら、核酸に関して本明細書で使用される「5'末端」は、コードされるポリペプチドのN末端に相当し、「3'末端」は、コードされるポリペプチドのC末端に相当する。

20

【0057】

「精製された」という用語は、当該物質をその自然環境もしくは宿主から取り出し、随伴する不純物を減らすかまたは除去して、当該分子が、存在している主要な分子種となるようにすることを意味する。したがって「精製された」という用語は、対象分子種が、存在する主要な分子種となる（すなわち、モル基準で、それが組成物中で他のどの個別分子種より多量に存在すること、そして好ましくは、実質的に精製された画分が、存在するすべての高分子種の少なくとも約30%（モル基準で）を対象分子種が占めるような組成物であることを意味する。概して、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約80から90パーセントより多くを含有する。もっとも好ましくは、対象分子種は基本的に均一にまで精製される（随伴分子種は従来の検出方法では組成物中で検出できない）が、この組成物は基本的に、単一の高分子種からなる。「精製された」および「単離された」という用語は、区別せずに使用することができる。純度および均一性は、典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学の手法を用いて決定される。標品中に存在する主要分子種であるタンパク質もしくは核酸は、実質的に精製されている。「精製された」という用語は、一部の実施形態において、タンパク質もしくは核酸が電気泳動ゲルで基本的に単一バンドを生じることを意味する。

30

40

【0058】

「断片」という用語は、その発明のポリペプチドもしくは核酸の構成成分をコードする、または構成成分である、ポリペプチドもしくは核酸を指す。典型的には、断片は、それが構成要素となっているもののポリペプチドもしくは核酸と共通の、定性的な生物活性を有する。ペプチド断片は、約5から約150アミノ酸長の間、約5から約100アミノ酸長の間、約5から約50アミノ酸長の間、または約5から約25アミノ酸長の間とすることができる。あるいはまた、ペプチド断片は、約5から約15アミノ酸長の間とすることができる。したがって「断片」という用語には、全長植物ディフェンシンの構成成分であるポリペプチドが

50

含まれ、これは、全長植物ディフェンシンポリペプチドと共通する定性的な生物活性を有する。断片は、全長植物ディフェンシンポリペプチドから得られるが、あるいは、何か他の手段、たとえば化学合成で、合成することもできる。

【0059】

「断片」という用語は、本発明のポリヌクレオチドの構成成分をコードする、または構成成分である核酸を指すこともある。むしろ、断片は、たとえば、ハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーとして有用となる可能性がある。断片は、本発明のポリヌクレオチドから得られるが、あるいは、何か他の手段、たとえば化学合成で合成することもできる。本発明の核酸およびその断片はまた、当業者に知られている方法を用いたアンチセンス分子の作製に使用することができる。

10

【0060】

「組換え型（体）」という用語は、たとえば、細胞、核酸、タンパク質、もしくはベクターに関連して使用される場合、その細胞、核酸、タンパク質、もしくはベクターが、異種核酸またはタンパク質の導入によって、または天然の核酸もしくはタンパク質の変更にによって改変されている、または細胞がそのように改変された細胞に由来することを意味する。したがって、「組換え型」細胞は、天然（非組換え）型の細胞には存在しない遺伝子を発現するか、あるいは、天然遺伝子であって、そうでなければ異常発現したり、不十分に発現したり、もしくはまったく発現しないような前記遺伝子を発現する。「組換え核酸」という用語は、もともと *in vitro* で、総じて、たとえばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いた核酸の操作によって、自然状態では通常見られない形で、形成される核酸を意味する。このようにして、異なる配列の機能しうる結合が達成される。したがって、通常は結合していないDNA分子を *in vitro* で連結することによって作製された、直鎖状の単離された核酸もしくは発現ベクターはいずれも、本発明において「組換え体」と見なされる。当然のことながら、ひとたび組換え核酸が作製されて、宿主細胞もしくは生物に導入されれば、それは組み換え技術によらず、すなわち *in vitro* 操作ではなく宿主細胞の *in vivo* 細胞機構を用いて、複製することになる。しかしながら、こうした核酸は、組み換え技術で作製されれば、その後は組み換え技術によらずに複製されても、依然として本発明において組換え体と見なされる。同様に、「組換えタンパク質」は、組み換え技術を用いて、すなわち、上記の組換え核酸の発現によって、作製されたタンパク質である。

20

【0061】

2つ以上のポリペプチド（または核酸）配列に関する「同一の」またはパーセント「同一性」という用語は、2つ以上の配列もしくは部分配列が同一であること、または特定の領域にわたって同一である指定パーセンテージのアミノ酸残基（またはヌクレオチド）を有することを意味するが、このときこれらは、配列比較アルゴリズムを用いて評価されるか、または手作業でのアラインメントおよび視認検査によって、比較ウィンドウもしくは指定領域にわたる最大一致について、比較およびアラインされており、そうした技術は当業者によく知られている。

30

【0062】

本明細書で使用される「治療」という用語は、病状もしくは病徴を軽減し、疾病の定着を防ぎ、または別に、疾病もしくは他の望ましからざる症状の進行をなんであれ多少なりとも阻み、妨げ、遅らせ、改善し、もしくは回復に向かわせる、ありとあらゆる使用を表す。

40

【0063】

特に指示のない限り、本明細書で使用されるすべての科学技術用語は、（たとえば、細胞生物学、化学、分子生物学および細胞培養分野の）当業者が共通して理解するのと同じ意味を有する。分子および生化学の方法に使用される標準的な技術は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. および Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc., ならびに Current Protocols in Molecular Biology と題する完全版に見いだすことができる。

50

【 0 0 6 4 】

本明細書を通じて「含む (comprise)」、またはその変形である「含む (comprises)」もしくは「含んでいる (comprising)」は、当然のことながら、提示された要素、整数、もしくはステップ、または一群の要素、整数、もしくはステップの包含・含有を意味するが、他の要素、整数、もしくはステップ、または一群の要素、整数、もしくはステップの排除を意味しない。

【 0 0 6 5 】

本明細書を通じて、数値への言及は、特に明記しない限り、そうした数値「くらい」(「約～」)の意味であると受け取られるべきである。「約～」という用語は、値が、その値を測定するために使用されたデバイスおよび方法に関する固有の誤差変動を含み、あるいは研究対象の間に存在する変動を含むことを示すために使用される。

10

【 0 0 6 6 】

本明細書でのいかなる先行技術への言及も、先行技術が当業者の一般常識の一部をなしているという示唆の承認として、もしくはいかなる形の示唆としても、受け取られることはなく、また受け取られるべきではない。

【 0 0 6 7 】

本明細書に記載のすべての公表文献、特許、特許出願、および他の資料は、参考として本明細書に含めるものとする。

【 0 0 6 8 】

配列表の簡単な説明

20

配列番号1は、クラスII植物ディフェンシンの成熟ドメインのアミノ酸コンセンサス配列である。

【 0 0 6 9 】

配列番号2は、植物ディフェンシンNaD1の代表的な全長アミノ酸配列であり、配列番号3は、それに対応する核酸配列である。

【 0 0 7 0 】

配列番号4は、植物ディフェンシンNaD1の成熟ドメインの代表的なアミノ酸配列であり、配列番号5は、それに対応する核酸配列である。

【 0 0 7 1 】

配列番号6は、植物ディフェンシンNaD1の、組換え改変された成熟ドメインの代表的なアミノ酸配列であるが、これはN末端に追加のアラニン残基を有するものであって、配列番号7は、それに対応する核酸配列である。

30

【 0 0 7 2 】

配列番号8は、植物ディフェンシンTPP3の代表的な全長アミノ酸配列であり、配列番号9は、それに対応する核酸配列である。

【 0 0 7 3 】

配列番号10は、植物ディフェンシンTPP3の成熟ドメインの代表的なアミノ酸配列であり、配列番号11は、それに対応する核酸配列である。

【 0 0 7 4 】

配列番号12は、植物ディフェンシンTPP3の組換え改変された成熟ドメインの代表的なアミノ酸配列であるが、これはN末端に追加のアラニン残基を有するものであって、配列番号13はそれに対応する核酸配列である。

40

【 0 0 7 5 】

配列番号14は、Sol Genomics Networkデータベース受入番号SGN-U207537に相当する植物ディフェンシンPhD1Aの代表的な全長アミノ酸配列であり、配列番号15はそれに対応する核酸配列である。

【 0 0 7 6 】

配列番号16は、本発明者らがクローニングして配列決定した植物ディフェンシンPhD1Aのもう1つの代表的な全長アミノ酸配列であり、配列番号17はそれに対応する核酸配列である。

50

【 0 0 7 7 】

配列番号18は、植物ディフェンシンPhD1Aの成熟ドメインの代表的なアミノ酸配列であり、配列番号19はそれに対応する核酸配列である。

【 0 0 7 8 】

配列番号20は、植物ディフェンシンNsD1の代表的な全長アミノ酸配列であり、配列番号21はそれに対応する核酸配列である。

【 0 0 7 9 】

配列番号22は、植物ディフェンシンNsD1の成熟ドメインの代表的なアミノ酸配列であり、配列番号23はそれに対応する核酸配列である。

【 0 0 8 0 】

配列番号24は、植物ディフェンシンNsD2の代表的な全長アミノ酸配列であり、配列番号25はそれに対応する核酸配列である。

【 0 0 8 1 】

配列番号26は、植物ディフェンシンNsD2の成熟ドメインの代表的なアミノ酸配列であり、配列番号27はそれに対応する核酸配列である。

【 0 0 8 2 】

本発明は、単に一例として、以下の図を参照して説明される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 3 】

【図 1 A】図1Aは、組換えNaD1 (rNaD1) の発現および精製を図示するイムノブロットである。48時間で採取された*P. pastoris*発現培地 (30 μ L)、ならびにSP Sepharose精製のさまざまな段階から得られたサンプルである、未結合画分 (30 μ L)、洗浄画分 (30 μ L)、および最初の5つの1.5 mL溶出画分 (それぞれ30 μ L) を、SDS-PAGEで分離して、-NaD1抗体を用いたイムノブロッティングで検討した。花 (200 μ g) から得られたNaD1を陽性対照として用いた。組換えNaD1は、48時間発現培地、ならびにSP Sepharose溶出画分で検出することができた。

【図 1 B】図1Bは、SP Sepharoseを用いて*P. pastoris*から精製されたrNaD1の純度を示す逆相HPLCの出力図である。rNaD1を含有するSP Sepharose溶出画分を、分析用C8 RP-HPLCカラムにロードし、40分の直線勾配 (0-100%バッファ-B) で溶出した。タンパク質は215 nmでの吸光度で検出した。1つの主要なタンパク質が検出されたことはそのタンパク質が高純度であることを示す。

【図 1 C】図1Cは、rNaD1の構造を花から精製された天然型NaD1と比較する。rNaD1 (白四角) および天然型NaD1 (黒菱形) の遠紫外円二色性スペクトルを比較し、有意な差異のないことを示したが、これは、rNaD1が正しく折り畳まれていることを示す。

【図 1 D】図1Dは、rNaD1の抗真菌活性を花から精製された天然型NaD1と比較する。rNaD1 (白四角) またはNaD1 (黒菱形) 存在下でのフザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) f.sp. *vasinfectum*の菌系の増殖を、タンパク質を含まない対照の、同期間の増殖に対してプロットする。グラフは、4連で実施された3回の別々の実験から得られたデータを表す。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。

【図 2 A】図2Aから2Eまでは、腫瘍細胞生存性に及ぼすNaD1の影響を示すグラフである。(2A) ヒト乳がんMCF-7、(2B) ヒト結腸がんHCT-116、(2C) ヒト黒色腫MM170、(2D) ヒト前立腺がんPC3、(2E) マウス黒色腫B16-F1。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、または組換えStPin1A (rStPin1A) の存在下でその濃度を増加させて (0 ~ 100 μ M) 培養した腫瘍細胞で実施した。%生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図 2 B】図2Aから2Eまでは、腫瘍細胞生存性に及ぼすNaD1の影響を示すグラフである。(2A) ヒト乳がんMCF-7、(2B) ヒト結腸がんHCT-116、(2C) ヒト黒色腫MM170、(2D) ヒト前立腺がんPC3、(2E) マウス黒色腫B16-F1。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、または組換えStPin1A (rStPin1A) の存在下でその濃度を増加させて (0 ~ 100 μ M) 培養した腫瘍細胞で実施した。%生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図 2 C】図2Aから2Eまでは、腫瘍細胞生存性に及ぼすNaD1の影響を示すグラフである。

(2A) ヒト乳がんMCF-7、(2B) ヒト結腸がんHCT-116、(2C) ヒト黒色腫MM170、(2D) ヒト前立腺がんPC3、(2E) マウス黒色腫B16-F1。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、または組換えStPin1A (rStPin1A) の存在下でその濃度を増加させて(0~100 μ M) 培養した腫瘍細胞で実施した。％生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図2D】図2Aから2Eまでは、腫瘍細胞生存性に及ぼすNaD1の影響を示すグラフである。(2A) ヒト乳がんMCF-7、(2B) ヒト結腸がんHCT-116、(2C) ヒト黒色腫MM170、(2D) ヒト前立腺がんPC3、(2E) マウス黒色腫B16-F1。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、または組換えStPin1A (rStPin1A) の存在下でその濃度を増加させて(0~100 μ M) 培養した腫瘍細胞で実施した。％生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図2E】図2Aから2Eまでは、腫瘍細胞生存性に及ぼすNaD1の影響を示すグラフである。(2A) ヒト乳がんMCF-7、(2B) ヒト結腸がんHCT-116、(2C) ヒト黒色腫MM170、(2D) ヒト前立腺がんPC3、(2E) マウス黒色腫B16-F1。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、または組換えStPin1A (rStPin1A) の存在下でその濃度を増加させて(0~100 μ M) 培養した腫瘍細胞で実施した。％生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図2F】図2Fは、腫瘍細胞と正常細胞に対するNaD1活性の比較を示す。NaD1もしくはrNaD1の阻害濃度(IC50) (μ M) は、さまざまなヒトおよびマウス腫瘍細胞株、ならびにヒト正常初代培養細胞株でのMTT細胞生存アッセイから決定した。

【図2G】図2Gは、ヒト黒色腫MM170に対するNaD1およびNaD2の影響を示すグラフである。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、またはNaD2の存在下でその濃度を増加させて(0~100 μ M) 培養した細胞で実施した。％生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図2H】図2Hおよび2Iは、ヒト正常初代細胞である、(2H) 臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、(2I) 冠動脈平滑筋細胞(CASMC) に及ぼすNaD1の影響を示す。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、またはrStPin1Aの存在下でその濃度を増加させて(0~100 μ M) 培養した細胞で実施した。％生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図2I】図2Hおよび2Iは、ヒト正常初代細胞である、(2H) 臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、(2I) 冠動脈平滑筋細胞(CASMC) に及ぼすNaD1の影響を示す。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、rNaD1、またはrStPin1Aの存在下でその濃度を増加させて(0~100 μ M) 培養した細胞で実施した。％生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図2J】図2Jは、マウス黒色腫B16-F1細胞生存性に及ぼす還元型およびアルキル化NaD1 (NaD1R&A) の影響を示す。MTT細胞生存アッセイは、NaD1、またはNaD1R&AもしくはrNaD1のそれぞれの存在下でその濃度を増加させて(0~30 μ M、または0~50 μ M) 培養した細胞で実施した。％生存率は、未処理細胞を100%生存として示す。

【図3A】図3Aおよび3Bは、(3A) ヒトU937骨髄単核細胞、または(3B) ヒト黒色腫MM170細胞の透過性に及ぼす、NaD1の影響を示すグラフである。細胞は、NaD1の濃度を増加させて(0~100 μ M) 37℃で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロピジウム(PI)を添加した。PI陽性で染色された(PI+)細胞数は、フローサイトメトリーで測定した。

【図3B】図3Aおよび3Bは、(3A) ヒトU937骨髄単核細胞、または(3B) ヒト黒色腫MM170細胞の透過性に及ぼす、NaD1の影響を示すグラフである。細胞は、NaD1の濃度を増加させて(0~100 μ M) 37℃で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロピジウム(PI)を添加した。PI陽性で染色された(PI+)細胞数は、フローサイトメトリーで測定した。

【図3C】図3Cおよび3Dは、U937ヒト骨髄単核細胞からのATPの放出に及ぼす、(3C) NaD1および(3D) NaD1R&Aの影響を示す。NaD1またはNaD1R&Aを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の細胞に、ATPルシフェラーゼ検出試薬(Roche商標名)とともに添加し、ATPの放出を、波長562nmでの分光光度法で経時的に検出した。

【図3D】図3Cおよび3Dは、U937ヒト骨髄単核細胞からのATPの放出に及ぼす、(3C) NaD1および(3D) NaD1R&Aの影響を示す。NaD1またはNaD1R&Aを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の細胞に、ATPルシフェラーゼ検出試薬(Roche商標名)とともに添加し、ATPの放出を、波長562nmでの分光光度法で経時的に検出した。

【図3E】電界放出形走査電子顕微鏡は、NaD1で処理したPC3細胞の形態変化をイメージングするために使用した。左右のパネルはそれぞれ、未処理細胞またはNaD1処理PC3細胞

10

20

30

40

50

のFE-SEM画像である。上のパネルは、拡大率1,200倍の細胞であり、顕微鏡の低エネルギー二次電子画像（LEI）は2.00 kVの加速電圧で10 μmであった。下のパネルは、拡大率3,000倍の細胞であって、顕微鏡の低エネルギー二次電子画像（LEI）は2.00 kVの加速電圧で1 μmであった。

【図4】図4は、赤血球（RBC）溶解に及ぼすNaD1およびrNaD1の影響を示すグラフである。ヒトRBCは、NaD1もしくはrNaD1の濃度を増加させて、またはPBSのみ、または水とともに、37℃にて16時間インキュベートした。その後RBC溶解を示す放出ヘモグロビンを、波長412 nmで分光光度法によって測定した。結果を、水で処理したRBC（100%溶解とする）に対して標準化した。

【図5】図5は、血清存在下での腫瘍細胞の透過性に及ぼすNaD1の影響を示すグラフである。U937細胞は、10 μM NaD1存在下で、ウシ胎仔血清（FCS）の濃度を増加させて、37℃で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロビジウム（PI）を添加した。染色陽性（PI+）または陰性（PI-）の細胞数をフローサイトメトリーで測定した。

【図6】図6は、B16-F1腫瘍増殖に及ぼすNaD1の影響のグラフである。B16-F1メラノーマ固形腫瘍（直径約10 mm）をC57BL/6マウスの皮下に形成させた。その後、腫瘍は、2日おきに1 mg/mLのNaD1もしくはNaD1R&Aを含有する50 μL PBS、またはPBS溶媒のみによる腫瘍内注入を受け、腫瘍増殖への影響を腫瘍サイズの測定によって判定した。腫瘍サイズは0日の各マウスを1として標準化した。結果は、処理ごとに5匹のマウスの平均の標準誤差を表す。

【図7A】図7Aから7Cまでは、NaD1の細胞脂質との結合を示すグラフである。Echelon（商標名）脂質ストリップをNaD1で探索し、ウサギ抗NaD1抗体、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。（7A）Membrane脂質ストリップ（商標名）、（7B）PIP脂質ストリップ（商標名）、（7C）SphingoStrip脂質ストリップ（商標名）。各ストリップ上の個々の脂質へのNaD1の結合は、デンシトメトリーで定量した。

【図7B】図7Aから7Cまでは、NaD1の細胞脂質との結合を示すグラフである。Echelon（商標名）脂質ストリップをNaD1で探索し、ウサギ抗NaD1抗体、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。（7A）Membrane脂質ストリップ（商標名）、（7B）PIP脂質ストリップ（商標名）、（7C）SphingoStrip脂質ストリップ（商標名）。各ストリップ上の個々の脂質へのNaD1の結合は、デンシトメトリーで定量した。

【図7C】図7Aから7Cまでは、NaD1の細胞脂質との結合を示すグラフである。Echelon（商標名）脂質ストリップをNaD1で探索し、ウサギ抗NaD1抗体、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。（7A）Membrane脂質ストリップ（商標名）、（7B）PIP脂質ストリップ（商標名）、（7C）SphingoStrip脂質ストリップ（商標名）。各ストリップ上の個々の脂質へのNaD1の結合は、デンシトメトリーで定量した。

【図7D】図7Dから7Fまでは、NaD2の細胞脂質との結合を示す。Echelon（商標名）脂質ストリップをNaD2で探索し、ウサギ抗NaD2抗体、続いてHRP標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。（7D）Membrane脂質ストリップ（商標名）、（7E）PIP脂質ストリップ（商標名）、（7F）SphingoStrip脂質ストリップ（商標名）。各ストリップ上の個々の脂質へのNaD2の結合は、デンシトメトリーで定量した。

【図7E】図7Dから7Fまでは、NaD2の細胞脂質との結合を示す。Echelon（商標名）脂質ストリップをNaD2で探索し、ウサギ抗NaD2抗体、続いてHRP標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。（7D）Membrane脂質ストリップ（商標名）、（7E）PIP脂質ストリップ（商標名）、（7F）SphingoStrip脂質ストリップ（商標名）。各ストリップ上の個々の脂質へのNaD2の結合は、デンシトメトリーで定量した。

【図7F】図7Dから7Fまでは、NaD2の細胞脂質との結合を示す。Echelon（商標名）脂質ストリップをNaD2で探索し、ウサギ抗NaD2抗体、続いてHRP標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。（7D）Membrane脂質ストリップ（商標名）、（7E）PIP脂質スト

10

20

30

40

50

リップ（商標名）、（7F）SphingoStrip脂質ストリップ（商標名）。各ストリップ上の個々の脂質へのNaD2の結合は、デンシトメトリーで定量した。

【図7G】図7Gは、天然型、組換え型、ならびに還元型およびアルキル化NaD1およびNaD2、天然型NsD3、NsD1、NsD2、PhD1AならびにTPP3の、相対的な脂質結合特異性および結合の強さをまとめたものである。バーは結合の強さを示す。PS、ホスファチジルセリン；PA、ホスファチジルアラニン；PG、ホスファチジルグリセロール。

【図8】図8は、2つの主要なクラスの植物ディフェンシンの前駆体タンパク質の構造を、cDNAクローンから予想して表す図である。第1のもっとも大きなクラスでは、前駆体タンパク質は、小胞体（ER）シグナル配列および成熟ディフェンシンドメインからなる（8A）。第2のクラスのディフェンシンは、C末端プロペプチド（CTPP）を有する、より大型の前駆体として生成される（8B）。 10

【図9A】図9Aは、ヒトU937骨髄単核細胞の透過性に及ぼすPhD1Aの影響を示すグラフである。細胞は、天然型PhD1Aの濃度を増加させて（0～50 μM）37 で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロピジウム（PI）を添加した。PI陽性で染色された（PI+）細胞数は、フローサイトメトリーで測定した。

【図9B】図9Bは、ヒトU937骨髄単核細胞からのATP放出に及ぼすPhD1Aの影響を示すグラフである。PhD1Aを、PBS中の細胞に、ATPルシフェラーゼ検出試薬（Roche商標名）とともに添加し、ATPの放出を、波長562nmで分光光度法により経時的に検出した。

【図9C】図9Cは、ヒトU937骨髄単核細胞の透過性に及ぼす組換え体（rTPP3）の影響を示すグラフである。細胞は、rTPP3の濃度を増加させて（0～40 μM）37 で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロピジウム（PI）を添加した。PI陽性で染色された（PI+）細胞数は、フローサイトメトリーで測定した。 20

【図9D】図9Dは、ヒトU937骨髄単核細胞からのATP放出に及ぼすrTPP3の影響を示すグラフである。組換えTPP3を、PBS中の細胞に、ATPルシフェラーゼ検出試薬（Roche商標名）とともに添加し、ATPの放出を、波長562nmで分光光度法により経時的に検出した。

【図10】図10は、ヒトU937骨髄単核細胞の透過性に及ぼす、ナス科クラスIIディフェンシン（NaD1、PhD1A、TPP3）、および非ナス科クラスIディフェンシンであるフジイロテンジクボタン（*Dahlia merckii*）ディフェンシンDm-AMP1、オオムギ（*Hordeum vulgare*）チオニン 1-H、トウモロコシ チオニン 2-Zの影響を示すグラフである。細胞は10 μMの各分子とともに37 で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロピジウム（PI）を添加した。PIで染色された陽性の（PI+）細胞数をフローサイトメトリーで測定した。データは3連の平均 ± SEMである。 30

【図11A】図11Aおよび11Bは、血清存在下で腫瘍細胞の透過性に及ぼす、PhD1A（11A）またはrTPP3（11B）の影響を示すグラフである。U937細胞は、10 μM PhD1AもしくはrTPP3の存在下、または非存在下で、ウシ胎仔血清（FCS）の濃度を増加させて37 で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロピジウム（PI）を添加した。染色陽性（PI+）または陰性（PI-）の細胞数をフローサイトメトリーで測定した。0% FCSでディフェンシンなしでの透過性細胞数が多いのは、血清がないためである。

【図11B】図11Aおよび11Bは、血清存在下で腫瘍細胞の透過性に及ぼす、PhD1A（11A）またはrTPP3（11B）の影響を示すグラフである。U937細胞は、10 μM PhD1AもしくはrTPP3の存在下、または非存在下で、ウシ胎仔血清（FCS）の濃度を増加させて37 で30分間インキュベートし、それにヨウ化プロピジウム（PI）を添加した。染色陽性（PI+）または陰性（PI-）の細胞数をフローサイトメトリーで測定した。0% FCSでディフェンシンなしでの透過性細胞数が多いのは、血清がないためである。 40

【図12A】図12Aは、U937ヒト骨髄単核細胞からのATP放出に及ぼす、天然型NsD3、NsD1、NsD2の影響を、天然型NaD1と比較して示すグラフである。各ディフェンシンを、ATPルシフェラーゼ検出試薬（Roche商標名）とともに、PBS中10 μMで細胞に添加し、ATPの放出を、波長562nmで分光光度法により経時的に検出した。

【図12B】図12Bは、U937ヒト骨髄単核細胞の透過性に及ぼす、NsD3、NsD1、NsD2の影響を、NaD1と比較して示すグラフである。細胞は10 μM各分子とともに37 で30分間イン 50

キュベートし、それにヨウ化プロピジウム (PI) を添加した。PIに陽性染色された (PI+) 細胞数をフローサイトメトリーで測定した。

【図 1 3】図13は、赤血球 (PBC) 溶解に及ぼすクラスIIディフェンシンNsD1、NsD2、PhD1AおよびNaD1の影響を示すグラフである。ヒトPBCは、10 μ Mまたは30 μ Mの各ディフェンシンとともに、37 $^{\circ}$ Cにて16時間インキュベートした。その後、PBC溶解の指標となる遊離ヘモグロビンを、波長412 nmにて分光光度法で測定した。結果は、水で処理したPBCに対して (100%溶解として) 標準化した。PBS = 陰性 (またはバックグラウンド溶解) 対照。

【図 1 4 A】図14Aから14Eまでは、NsD1 (a)、NsD2 (b)、NsD3 (c)、TPP3 (d)、およびPhD1A (e) のPIP細胞脂質との結合を示すグラフである。PIP Echelon (商標名) 脂質ストリップをディフェンシンで探索し、ウサギ抗NaD1抗体 (NsD1、NsD2、PhD1A、TPP3用) またはウサギ抗NaD2抗体 (NsD3用)、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。各ストリップ上の個々の脂質へのディフェンシンの結合は、デンストメトリーで定量した。

【図 1 4 B】図14Aから14Eまでは、NsD1 (a)、NsD2 (b)、NsD3 (c)、TPP3 (d)、およびPhD1A (e) のPIP細胞脂質との結合を示すグラフである。PIP Echelon (商標名) 脂質ストリップをディフェンシンで探索し、ウサギ抗NaD1抗体 (NsD1、NsD2、PhD1A、TPP3用) またはウサギ抗NaD2抗体 (NsD3用)、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。各ストリップ上の個々の脂質へのディフェンシンの結合は、デンストメトリーで定量した。

【図 1 4 C】図14Aから14Eまでは、NsD1 (a)、NsD2 (b)、NsD3 (c)、TPP3 (d)、およびPhD1A (e) のPIP細胞脂質との結合を示すグラフである。PIP Echelon (商標名) 脂質ストリップをディフェンシンで探索し、ウサギ抗NaD1抗体 (NsD1、NsD2、PhD1A、TPP3用) またはウサギ抗NaD2抗体 (NsD3用)、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。各ストリップ上の個々の脂質へのディフェンシンの結合は、デンストメトリーで定量した。

【図 1 4 D】図14Aから14Eまでは、NsD1 (a)、NsD2 (b)、NsD3 (c)、TPP3 (d)、およびPhD1A (e) のPIP細胞脂質との結合を示すグラフである。PIP Echelon (商標名) 脂質ストリップをディフェンシンで探索し、ウサギ抗NaD1抗体 (NsD1、NsD2、PhD1A、TPP3用) またはウサギ抗NaD2抗体 (NsD3用)、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。各ストリップ上の個々の脂質へのディフェンシンの結合は、デンストメトリーで定量した。

【図 1 4 E】図14Aから14Eまでは、NsD1 (a)、NsD2 (b)、NsD3 (c)、TPP3 (d)、およびPhD1A (e) のPIP細胞脂質との結合を示すグラフである。PIP Echelon (商標名) 脂質ストリップをディフェンシンで探索し、ウサギ抗NaD1抗体 (NsD1、NsD2、PhD1A、TPP3用) またはウサギ抗NaD2抗体 (NsD3用)、続いてセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて、結合を検出した。各ストリップ上の個々の脂質へのディフェンシンの結合は、デンストメトリーで定量した。

【図 1 5】図15は、クラスIおよびクラスII植物ディフェンシンの成熟ドメインの、アミノ酸配列アラインメントである。NaD1およびNaD2 (ハナタバコ (*Nicotiana glauca*))、NsD1、NsD2、NsD3 (ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*))、PhD1A (ペチュニア (*Petunia hybrida*))、TPP3 (トマト (*Solanum lycopersicum*))、Dm-AMP1 (フジイロテンジクボタン (*Dahlia merckii*))。同一性もしくは相同性は、それぞれ黒もしくはグレーの枠で囲った残基である。保存されたジスルフィド結合は実線で示す。

【発明を実施するための形態】

【0084】

発明の詳細な説明

驚くべきことに、本発明者らは、チオニンとしても知られるディフェンシンが、強力な細胞毒性作用を有することを見いだした。これらの重要な知見は、増殖性疾患を予防および治療することができる新規の重要な方法を説明する。したがって、これらの知見は、がんなどの増殖性疾患の予防もしくは治療のための方法、ならびに関連する使用、システ

ムおよびキットを提供する。

【0085】

たとえば、NaD1は、ハナタバコ (*Nicotiana glauca*) の花組織から単離された植物ディフェンシンである。NaD1のアミノ酸配列およびコード配列は、国際特許公開公報WO 02/063011に公表されており、その内容は全体を参考として本明細書に含めるものとする。

【0086】

NaD1などの活性ディフェンシンを大量に作製できることは、臨床の場で治療として使用する可能性を考慮すると、根本的に重要である。天然起源（観賞用タバコであるハナタバコ (*N. glauca*) の花）から、必要とされる大量のNaD1を精製することは、実現不可能であり、活性のある組換えタンパク質を作製する必要がある。活性のある精製組換えNaD1を高レベルで作製するために、一定のタンパク質精製法と組み合わせた *Pichia pastoris* 発現系を確立することに成功した（図1A、B）。組換えNaD1は、天然型NaD1と類似した折り畳み構造を有し（図1C）、*F. オキシスポルム* の菌系増殖を阻害する能力を保持している（図1D）。これらのデータは、NaD1などの活性のある精製組換えディフェンシンを大量に生産するための効率的なシステムの確立を実証する。

【0087】

天然型および組換えNaD1は、*in vitro*で、低い μM 濃度で腫瘍細胞を選択的に死滅させることが示された（図2A-F）。種々の組織を起源とするさまざまなヒト腫瘍細胞株（前立腺がんPC3、結腸がんHCT-116、乳がんMCF-7、およびメラノーマMM170）、およびマウスメラノーマ細胞株B16-F1はすべて、天然型もしくは組換えNaD1のいずれによっても同様の効率で死滅し、 IC_{50} は2から4.5 μM の間であった。正常な初代細胞（ヒト冠動脈平滑筋または臍帯静脈内皮細胞）も、天然型もしくは組換えNaD1によって死滅するが、腫瘍細胞株より有意に高濃度（ IC_{50} は7.5-12 μM ）を必要とした。これらのデータから、NaD1などの植物ディフェンシンが、特定の低い μM 濃度で使用される場合、腫瘍細胞を選択的に死滅させるが正常細胞は死滅させないように適用することができる抗がん剤として可能性を示すことが示唆された。NaD1（ナス科クラスIIディフェンシン）とは対照的に、ナス科クラスIディフェンシンNaD2またはプロテアーゼインヒビターStPin1Aは、腫瘍細胞を死滅させる能力を示さなかった（図2A-I）が、これは、クラスIIディフェンシンが腫瘍細胞を死滅させる固有の可能性を有することを示唆する（下記でさらに検討する）。還元型およびアルキル化型のNaD1は腫瘍細胞の生存に影響を及ぼさなかったが、これは、インタクトな三次構造がNaD1の腫瘍細胞への細胞毒性に決定的に重要であることを示す。

【0088】

NaD1の腫瘍細胞に対する作用メカニズムを検討し、細胞膜の透過性に関与することが明らかになった。蛍光色素PIの取り込み（図3A、3B）、およびATPの放出（図3C、3D）のどちらにも関与しうるNaD1の能力によって実証されるように、NaD1は、用量依存的に、ヒト腫瘍細胞株U937およびMM170を透過性にした。腫瘍細胞の透過化は急速で、ATPは細胞への添加後すぐに放出され、約5分でATP放出がピークになった。還元型もしくはアルキル化型NaD1は、腫瘍細胞を透過性にするができなかった（図3D）。NaD1の腫瘍細胞透過化作用に関するさらなる裏付けは、走査電子顕微鏡を用いた、NaD1で処理したヒト前立腺がんPC3細胞の検査によって与えられた（図3E）。これらのデータは、NaD1が、細胞膜を迅速に不安定化して、細胞の透過化を引き起こすことによって、腫瘍細胞を死滅させることを示す。NaD1の作用メカニズムに関する理解は、ディフェンシンを単独で、または他の抗がん剤と併用して、治療に使用するために有用な情報を与える。

【0089】

NaD1などのディフェンシンを抗がん剤として適用する可能性は、ディフェンシンが血清/血漿中で活性を保持すること、ならびに赤血球への溶解活性を示さないことも必要とする。NaD1は、ヒト赤血球（RBC）に対して、*in vitro*で腫瘍細胞を死滅させるために必要とされる濃度で、溶血作用を示さなかった。12.5 μM 以上の濃度で、天然型NaD1は溶血作用を示し、100 μM で約50%のRBC溶解を示し最大となった。意義深いことに、組換えNaD1は、100 μM に達するまで高濃度でも溶血作用を示さなかった（図4）。天然型および組換えN

aD1は、組換えNaD1のN末端への、1つのアラニン残基の付加により、一次アミノ酸配列が異なっている。天然型と組換えNaD1の間には大きな構造的相違はないように思われ（図1C）、どちらも腫瘍細胞の透過化には非常によく似た活性を示すので、組換えNaD1のN末端の付加アラニンが、NaD1の溶血作用の喪失の原因となった可能性がある。このように、N末端にアラニンを有するNaD1のような組換えディフェンシンを作製することは、最小限の溶血作用を伴う治療法として適用するという観点から、天然型ディフェンシン配列よりかなり有利であると予想される。天然型および組換えNaD1が40%以下の血清の存在下で腫瘍細胞を死滅させる能力を保持していることに留意すべきである（図5）。多くのカチオン性ペプチドは、血清存在下で腫瘍細胞透過化作用が大きく低下することが明らかになっており、治療薬として無効になるので、血清存在下でNaD1が腫瘍細胞透過化作用を保有することは、重要な所見である。

10

【0090】

NaD1のようなディフェンシンの抗がん剤としての可能性は、マウスでのメラノーマ増殖のin vivoモデルにおいてさらに実証された。固形の進行B16F1腫瘍を、1 mg NaD1/体重kgの腫瘍内直接注入によって処置した結果、還元型およびアルキル化NaD1（不活性）または溶媒のみで処置した腫瘍と比べて、腫瘍増殖が有意に減少した（図6）。その上、NaD1は、300 mg NaD1/体重kg 以下で経口投与される場合、有害な作用がないことが判明した。

【0091】

本明細書に記載のデータは、(i)低い μM 濃度でin vitro腫瘍細胞選択性が広範であること、(ii)血清存在下で活性を保持すること、ならびに(iii)溶血作用のないことを示すので、NaD1のようなディフェンシンは、抗がん剤として有望なモデルとなる。

20

【0092】

NaD1相互作用分子候補の研究は、NaD1のリガンドとしてリン脂質の同定に至った。NaD1は、さまざまなホスホイノシチド、ならびにホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルアラニン（PA）、ホスファチジルグリセロール（PG）、およびスルファチドと、特異的に結合することが判明した（図7A-C）。天然型および組換えNaD1はいずれも、非常に類似した脂質結合特異性を示した（図7C）。興味深いことに、クラスIディフェンシンNaD2もリン脂質と結合することが判明したが、NaD1とははっきり異なる特異性を有しており、強い結合がPAに対して観察されたが、NaD1との結合が示されたホスホイノシチドの多くに対しては観察されなかった（図7D-F）。こうした特定のリン脂質とのNaD1の相互作用が、NaD1の腫瘍細胞傷害作用の一因となっている可能性がある。また、NaD1の還元およびアルキル化がリン脂質との結合を失う結果をもたらすことに留意すべきである（図7G）。これらのデータは、NaD1の三次構造がリン脂質結合にも、抗腫瘍活性にも必須であることを示唆する。

30

【0093】

ナス科クラスIIディフェンシンNaD1は腫瘍細胞を死滅させることができるがクラスIディフェンシンNaD2はできないことから、ナス科クラスIIディフェンシンが腫瘍細胞に対して特有の細胞障害作用を有する可能性が示唆された。実際、ナス科クラスIIディフェンシンTPP3およびPhD1Aはいずれも、NaD1と類似した腫瘍細胞透過化作用を有することが判明した（図9A-D）。NaD1について記載したように、TPP3およびPhD1Aも、血清存在下で腫瘍細胞透過化作用を保持していることが判明した（図11AおよびB）。それに対して、非ナス科クラスIディフェンシンDm-AMP1、1-H、および2-Zは、腫瘍細胞透過化作用を示さなかった（図10）。腫瘍細胞を死滅させる能力がナス科クラスIIディフェンシンに特有であって、クラスIディフェンシンはそうでないことをさらに裏付ける証拠は、クラスIIディフェンシンNaD1およびNsD2は腫瘍細胞を透過化したが、クラスIディフェンシンNsD3は透過化しなかったことで示される（図12）。また、観察された、ヒト赤血球に対するNaD1の溶血作用の喪失は、他のクラスIIディフェンシンでも維持されることに留意すべきである。NsD1、NsD2、およびPhD1Aはすべて、30 μM の濃度以下ではPBC溶解能力を示さないが、ごくわずかに示した（図13）。さらに、クラスIIディフェンシンNaD1およびクラスIディフェンシンNaD2について確認された、はっきり異なるリン脂質特異性パターン（図7）は

40

50

、他のナス科クラスIおよびIIディフェンシンについても観察された。クラスIIディフェンシンNsD1、NsD2、TPP3、およびPhD1Aはすべて、概してホスホイノシチドとの結合を優先する傾向を示した（図14A-B、D-E）が、クラスIディフェンシンNaD3はPAともっとも強く結合した（図14C）。

【0094】

増殖性疾患の予防もしくは治療に使用するための植物ディフェンシン

本発明は増殖性疾患の予防もしくは治療に使用するための植物ディフェンシンを提供する。

【0095】

ある実施形態において、植物ディフェンシンは任意の植物 チオニンである。

10

【0096】

他の実施形態において、植物ディフェンシンは、少なくとも8個の基準のシステイン残基を有するが、これらはCysI-CysVIII、CysII-CysIV、CysIII-CysVI、およびCysV-CysVIIの配置でジスルフィド結合を形成している。

【0097】

さらに他の実施形態において、植物ディフェンシンは、C末端プロドメインもしくはプロペプチド（CTPP）を有する、またはかつて有していた、クラスII植物ディフェンシンである。

【0098】

具体的な実施形態において、植物ディフェンシンは、ナス科（Solanaceae）、イネ科（Poaceae）、またはキク科（Asteraceae）に由来し、またはそれらから得ることができる。

20

【0099】

ある実施形態において、植物ディフェンシンは、CcD1（NCBIデータベース受入番号AF128239）ではない。

【0100】

好ましい実施形態において、植物ディフェンシンは、CysI-CysVIII、CysII-CysIV、CysIII-CysVI、およびCysV-CysVIIのコンフォメーションでジスルフィド結合を形成する少なくとも8個の基準のシステイン残基を有し、しかもC末端プロドメインもしくはプロペプチド（CTPP）を有する、またはかつて有していたクラスII植物ディフェンシンである。

30

【0101】

ある実施形態において、植物ディフェンシンは、配列番号1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、もしくは26に記載のアミノ酸配列、またはその断片を含有する。

【0102】

さらに他の実施形態において、植物ディフェンシンは、配列番号1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、もしくは26に記載のアミノ酸配列に対して95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、または60%同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含有する。

【0103】

さらに他の実施形態において、植物ディフェンシンは、配列番号1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、もしくは26に記載のアミノ酸配列に対して99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%もしくは1%同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含有する。

40

【0104】

さらに他の実施形態において、植物ディフェンシンは、ナス科クラスIIディフェンシン

50

である。

【0105】

具体的な実施形態において、植物ディフェンシンは、ハナタバコ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*)、トマト (*Solanum lycopersicum*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、*Nicotiana attenuata*、*Nicotiana excelsior*、*Nicotiana paniculata*、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、ハバネロ (*Capsicum chinense*) またはトウガラシ (*Capsicum annuum*) に由来し、またはそれらから得ることができる。

【0106】

より具体的な実施形態において、植物ディフェンシンは、ハナタバコ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*)、またはトマト (*Solanum lycopersicum*) に由来し、またはそれらから得ることができる。

【0107】

ある実施形態において、ディフェンシンは、NaD1 (NCBIデータベース受入番号A509566)、NsD1 (配列番号20または22)、NsD2 (配列番号24または26)、PhD1A (Sol Genomics Networkデータベース受入番号SGN-U207537または配列番号16)、TPP3 (NCBIデータベース受入番号SLU20591)、FST (NCBIデータベース受入番号Z11748)、NatD1 (NCBIデータベース受入番号AY456268)、NeThio1 (NCBIデータベース受入番号AB005265)、NeThio2 (NCBIデータベース受入番号AB005266)、NpThio1 (NCBIデータベース受入番号AB005250)、CcD1 (NCBIデータベース受入番号AF128239)、PhD1 (NCBIデータベース受入番号A507975)、PhD2 (NCBIデータベース受入番号AF507976)、NCBIデータベース受入番号EU367112、EU560901、AF112869もしくはAF112443に記載の配列のいずれかに相当するアミノ酸もしくは核酸配列を有する任意のディフェンシン、またはSol Genomics Networkデータベース受入番号SGN-U448338、SGN-U449253、SGN-U448480、SGN-U447308、SGN-U578020、SGN-U577258、SGN-U286650、SGN-U268098、SGN-U268098、SGN-U198967、SGN-U196048、SGN-U198968もしくはSGN-U198966に記載の配列のいずれかに相当するアミノ酸もしくは核酸配列を有する任意のディフェンシンからなる1群から選択される。

【0108】

特に好ましい実施形態において、植物ディフェンシンは、NaD1、NsD1、NsD2、PhD1AまたはTPP3である。

【0109】

ある実施形態において、植物ディフェンシンは、本明細書に記載の任意のアミノ酸配列の断片、または任意の核酸配列の断片もしくは相補体であってもよい。

【0110】

特定の実施形態において、断片は成熟ドメインを含有することができる。

【0111】

好ましい実施形態において、成熟ドメインのアミノ酸配列は、配列番号4、6、10、12、18、22、または26に示される。

【0112】

ある実施形態において、植物ディフェンシンは、単離された、精製された、または組換え型の、植物ディフェンシンとすることができる。

【0113】

特定の実施形態において、組換え植物ディフェンシンは、N末端またはその近傍に追加のアラニン残基を有する。

【0114】

好ましい実施形態において、組換え植物ディフェンシンは、溶血作用が低下している。

【0115】

特に好ましい実施形態において、組換え植物ディフェンシンは、配列番号6、22もしくは26に示すアミノ酸配列、またはその断片を含有する。

【0116】

ポリヌクレオチド

本発明の組成物がポリペプチドを含有する実施形態において、本発明はまた、そうしたポリペプチドをコードする核酸、またはその断片もしくは相補体を提供する。そのような核酸は、天然に存在することもあるが、合成または組換えであることもある。

【0117】

ある実施形態において、核酸は、1つもしくは複数のプロモーターと、機能しうるように連結することができる。特定の実施形態において、核酸は、増殖性疾患を予防もしくは治療するポリペプチドをコードすることがある。

【0118】

したがって、ある実施形態において植物ディフェンシンは核酸の形で与えられる。ある実施形態において、植物ディフェンシン核酸は、配列番号1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24もしくは26に示すアミノ酸配列、またはその断片をコードする。さらに他の実施形態において、植物ディフェンシン核酸は、配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、もしくは27に示すヌクレオチド配列、またはその断片もしくは相補体を含有する。

【0119】

さらに他の実施形態において、植物ディフェンシン核酸は、配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、もしくは27に示すヌクレオチド配列と95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、もしくは60%同一であるヌクレオチド配列、またはその断片もしくは相補体を含有する。

【0120】

さらに他の実施形態において、植物ディフェンシン核酸は、配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、もしくは27に示すヌクレオチド配列と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%もしくは1%同一であるヌクレオチド配列、またはその断片もしくは相補体を含有する。

【0121】

ベクター、宿主細胞、および発現産物

本発明はまた、本明細書に記載の核酸を含有するベクターを提供する。ベクターは、外来配列の挿入、細胞内への導入、および導入された配列の発現に適した、プラスミドベクター、ウイルスベクター、または他の任意の適当な伝達体とすることができる。ベクターは真核生物発現ベクターであってもよく、プロモーターのような発現調節およびプロセシング配列、エンハンサー、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル、ならびに転写終結配列を含んでいてもよい。好ましい実施形態において、ベクターは、本明細書に記載の植物ディフェンシンのうち任意の1つもしくは複数を機能しうるようコードする、1つもしくは複数の核酸を含有する。

【0122】

本発明はさらに、本明細書に記載のベクターを含有する宿主細胞を提供する。典型的には、宿主細胞はベクターによって、形質転換、トランスフェクト、または形質導入されるが、それはたとえば、エレクトロポレーション後に形質転換、トランスフェクト、または形質導入された細胞を選択培地上で選択することによる。その結果得られる、ベクターおよびそれに挿入された核酸の形をとる異種核酸配列は、染色体外に維持されるが、相同組換えにより宿主細胞ゲノム内に導入されることもある。このような細胞の形質転換、トランスフェクション、または形質導入のための方法は当業者によく知られている。指針は、たとえば、標準的な指導書である Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory M

10

20

30

40

50

annual, Cold Spring Harbor, New York, 1989、および Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992 などから得ることができる。

【0123】

本発明はさらに、本明細書に記載の宿主細胞の発現産物を提供する。ある実施形態において、発現産物は、増殖性疾患を予防もしくは治療するポリペプチドとすることができる。好ましい実施形態において、発現産物は本明細書に記載の植物ディフェンシンのいずれか1つもしくはいくつかである。

【0124】

組成物

本発明はまた、増殖性疾患の予防もしくは治療用の医薬組成物を提供するが、この医薬組成物は、本明細書に記載の植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、または発現産物を、製薬上許容される担体、賦形剤もしくは添加剤とともに含有する。

【0125】

したがって、本発明の組成物は、治療のために投与することができる。そうした適用において、組成物は、すでに疾患に罹患している被験体に、その疾患および合併症を治癒させるのに十分な量、または少なくともある程度は抑えるのにじゅうぶんな量を、投与することができる。組成物の量は、患者を効果的に治療するのに十分であるべきである。組成物は、当業者に知られている方法にしたがって調製することができるが、それに応じて、化粧品もしくは医薬品として許容される担体、添加剤もしくは賦形剤を含有することができる。投与可能な組成物を調製するための方法は、当業者には明白であって、たとえば Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. により詳細に記載されており、これは参考として本明細書に含めるものとする。

【0126】

組成物は、アニオン性、カチオン性、もしくは非イオン性界面活性剤のような任意の適当な界面活性剤、たとえばソルビタンエステルもしくはそのポリオキシエチレン誘導体などを組み込むことができる。懸濁剤、たとえば天然ガム、セルロース誘導体、またはシリカ (silicaceous silicas) などの無機材料、およびラノリンなどの他の成分も含有することができる。

【0127】

組成物はまた、リボソームの形で投与することができる。リボソームはリン脂質もしくは他の脂質材料から得られ、水性溶媒中に分散したモノ-もしくはマルチ-ラメラ水和液晶によって形成することができる。リボソームを形成することができる、毒性のない、生理的に許容される、代謝可能な脂質であればどれも使用することができる。リボソーム型の組成物は、安定化剤、防腐剤、および添加剤を含有することができる。好ましい脂質としては、リン脂質およびホスファチジルコリン (レシチン) があり、天然でも合成でもよい。リボソームを作製するための方法は当技術分野で知られており、これについては特に Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 以下参照、に言及するが、その内容は参考として本明細書に含めるものとする。

【0128】

ある実施形態において、組成物は、錠剤、液剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、または乳剤の形をとることができる。

【0129】

投与量

任意の個別の患者に対する「治療上有効な」用量レベルは、さまざまな要因に応じて決まってくるが、こうした要因には、治療すべき疾患、疾患の重篤度、用いられる化合物もしくは薬剤の活性、用いられる組成物、患者の年齢、体重、全身健康状態、性別、および食習慣、投与時間、投与経路、植物ディフェンシンまたは組成物の除去率、治療の持続期間、および治療と併用して、または治療と同時に使用される任意の薬物が、当技術分野で

10

20

30

40

50

よく知られているほかの関連要因とともに、含まれる。したがって、当業者は、通常の実験によって、適用可能な疾患を治療するために必要とされる、有効で毒性のない植物ディフェンシンもしくは組成物の量を決定することが可能となる。

【0130】

典型的には、治療適用において、治療は病状の持続する間、行われることになる。

【0131】

さらに、組成物の個別投薬の最適な量および間隔が、治療すべき疾患の性質および程度、投与の形態、経路、および部位、ならびに治療すべき特定の個人の性質によって決まってくることは当業者にとって明白である。また、こうした最適条件は、従来の技術で決定することもできる。

10

【0132】

最適な治療コース、たとえば決められた日数の間、1日あたり与えられる組成物の投与回数を、当業者が従来の治療コース決定試験を用いて確認することも当業者にとって明白である。

【0133】

重量については、患者に投与するための組成物の治療上有効な用量は、24時間につき体重kgあたり約0.01mgから約150mgまでであると予想されるが；典型的には24時間につき体重kgあたり約0.1mgから約150mgまで；24時間につき体重kgあたり約0.1mgから約100mgまで；24時間につき体重kgあたり約0.5mgから約100mgまで；または24時間につき体重kgあたり約1.0mgから約100mgまでの範囲内であると予想される。より典型的には、有効な用量範囲は、24時間につき体重kgあたり約5mgから約50mgまでの範囲内であると予想される。

20

【0134】

あるいはまた、有効な投与量は、約5000mg/m²以下とすることができる。概して、有効な投与量は、約10から約5000mg/m²まで、典型的には約10から約2500mg/m²まで、約25から約2000mg/m²まで、約50から1500mg/m²まで、約50から1000mg/m²まで、または約75から約600mg/m²までの範囲内であると予想される。

【0135】

投与経路

本発明の組成物は、標準的な経路で投与することができる。一般に、組成物是非経口（たとえば、静脈内、脊髄内、皮下、もしくは筋肉内）、経口、または局所経路で投与することができる。

30

【0136】

ほかの実施形態において、組成物は、ほかの経腸/腸内経路、たとえば直腸、舌下もしくは口唇下、または中枢神経系を経て、たとえば硬膜外、脳内もしくは脳室内経路で、投与されることもある。ほかの投与部位としては、皮膚上、経皮、皮内、経鼻、動脈内、心臓内、骨内、くも膜下腔内、腹腔内、膀胱内、硝子体内、陰茎海綿体内、腔内、または子宮内経路を挙げることができる。

【0137】

担体、添加剤、および賦形剤

担体、添加剤、および賦形剤は、組成物の他成分と融和性であって、レシピエントにとって有害でないという点で「許容できる」ものでなければならない。こうした担体、添加剤および賦形剤は、本発明の組成物の完全性を高め、半減期を増やすために使用することができる。これらはまた、本発明の組成物の生物学的活性を増強または保護するために使用することができる。

40

【0138】

製薬上許容される担体または賦形剤の例は、脱塩水もしくは蒸留水；食塩水；植物油、たとえばピーナッツ油、サフラワー油、オリーブ油、綿実油、コーン油、ゴマ油、ラッカセイ油、もしくはヤシ油；ポリシロキサンなどのシリコーン油、たとえばメチルポリシロキサン、フェニルポリシロキサン、およびメチルフェニルポリシロキサン；揮発性シリコーン；鉱油、たとえば流動パラフィン、軟パラフィン、もしくはスクアラン；セルロース

50

誘導体、たとえばメチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、もしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース；低級アルカノール、たとえばエタノールもしくはイソプロパノール；低級アラルカノール；低級ポリアルキレングリコール、もしくは低級アルキレングリコール、たとえばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、もしくはグリセリン；脂肪酸エステル、たとえばパルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル、もしくはオレイン酸エチル；ポリビニルピロリドン；寒天；トラガカント・ゴム、またはアカシア・ゴム、およびワセリンである。典型的には、1つもしくは複数の担体が、重量比で組成物の10%から99.9%を構成する。

10

【0139】

本発明の組成物は、注射による投与に適した形態、経口摂取に適した製剤（たとえばカプセル、錠剤、カプレット、エリキシル剤など）の形態、局所投与に適した軟膏、クリームもしくはローション剤の形態、鼻内吸入もしくは経口吸入などの吸入による投与に適したエアロゾル形態、非経口投与、すなわち皮下注射、筋肉注射もしくは静脈注射に適した形態をとることができる。

【0140】

注射可能な溶液もしくは懸濁液として投与するために、毒性のない、許容される賦形剤もしくは担体として、リンゲル液、等張食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノールおよび1,2-プロピレングリコールを挙げることができる。

20

【0141】

増殖性疾患を予防もしくは治療するための方法

本発明は、増殖性疾患を予防もしくは治療するための方法を提供するが、その方法は、本明細書に記載のように、治療上有効な量の植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、または医薬組成物を被験体に投与し、それによって増殖性疾患を予防もしくは治療することを含む。

【0142】

本発明はまた、増殖性疾患を予防もしくは治療するための薬剤の調製における、本明細書に記載の植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、および発現産物の使用を提供する。

30

【0143】

ある実施形態において、増殖性疾患は、血管新生疾患、転移性疾患、腫瘍形成疾患、腫瘍性疾患およびがんからなる1群から選択される細胞増殖性疾患とすることができる。

【0144】

ある実施形態において、増殖性疾患はがんとすることができる。具体的な実施形態において、がんは、基底細胞がん、骨肉腫、大腸がん、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、白血病、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、または甲状腺がんからなる1群から選択することができる。

【0145】

ほかの実施形態において、がんは、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質がん、AIDS関連がん、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、B細胞リンパ腫、基底細胞がん、胆管がん、膀胱がん、骨肉腫、大腸がん、脳幹グリオーマ[神経膠腫]、脳腫瘍、乳がん、気管支腺腫/カルチノイド、パーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、大脳星状細胞腫/悪性神経膠腫、子宮頸がん、小児がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、結腸がん、皮膚T細胞性リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜がん、上衣細胞腫、食道がん、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん、眼球内黒色腫/網膜芽細胞腫、胆嚢がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛腫瘍、神経膠腫、胃カルチノイド、頭頸部がん、心臓がん、肝細胞（肝臓）がん、下咽頭がん、視床下部および視経路グリオーマ、カボジ肉腫、腎臓がん、咽頭がん、白血病（急性リンパ芽球性/急性骨髄性/慢性

40

50

リンパ球性/慢性骨髄性/ヘアリー細胞)、口唇および/または口腔がん、肝臓がん、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、リンパ腫(AIDS関連/パーキット/皮膚T細胞/ホジキン/非ホジキン/原発性中枢神経系)、マクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫/骨肉腫、髄芽腫、黒色腫、メルケル細胞がん、中皮腫、転移性頸部扁平上皮がん、口腔がん、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫/形質細胞種、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄異形成/骨髄増殖性疾患、骨髄性(myelogenous)白血病、骨髄性(myeloid)白血病、骨髄増殖性疾患、鼻腔および/または副鼻腔がん、鼻(上)咽頭がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫/骨の悪性線維性組織球腫、卵巣がん、上皮性卵巣がん、卵巣胚細胞腫瘍、脾臓がん、脾島細胞がん、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体星細胞腫、松果体胚腫、松果体芽腫および/またはテント上原始神経外胚葉性腫瘍、下垂体腺腫、形質細胞腫/多発性骨髄腫、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺がん、直腸がん、腎細胞がん、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、ユーイング肉腫、カボジ肉腫、軟部肉腫、子宮肉腫、セザリー症候群、皮膚がん(非黒色腫)、皮膚がん(黒色腫)、皮膚がん(メルケル細胞)、小細胞肺癌、小腸がん、軟部肉腫、扁平上皮細胞がん、原発不明転移性頸部扁平上皮がん、胃がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、T細胞リンパ腫、精巣がん、咽頭がん、胸腺腫および/または胸腺がん、甲状腺がん、移行性がん、絨毛性腫瘍、尿管および/または腎盂がん、尿道がん、子宮内膜がん、子宮肉腫、膣がん、視経路および視床下部膠腫、外陰がん、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、またはウィルムス腫瘍からなる一群から選択することができる。

10

20

【0146】

キット

本発明は、増殖性疾患を予防もしくは治療するためのキットを提供するが、このキットは、本明細書に記載の、治療上有効な量の植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、または医薬組成物を含む。

【0147】

本発明はまた、増殖性疾患を予防もしくは治療するための、本明細書に記載のキットの使用を提供するが、この場合、本明細書に記載の、治療上有効な量の植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、または医薬組成物を被験体に投与し、それによって、増殖性疾患を予防もしくは治療する。

30

【0148】

本発明のキットは、本発明の方法の使用を容易にする。典型的には、本発明の方法を実施するためのキットは、本発明の方法を実施するのに必要な試薬をすべて含んでいる。たとえば、ある実施形態において、キットは、本明細書に記載の植物ディフェンシン、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、発現産物、または医薬組成物を含有することができる。

【0149】

典型的には、本明細書に記載のキットはまた、1つもしくは複数の容器を含む。本発明に関して、区分されたキットとしては、化合物もしくは組成物を別々の容器に入れた任意のキットが挙げられ、これは小ガラス容器、プラスチック容器、またはプラスチックもしくは紙のストリップを含んでいてもよい。こうした容器は、サンプルの二次汚染を回避する一方で、化合物もしくは組成物を1つの区画から別の区画へ効率よく移すこと、ならびに各容器の薬剤もしくは溶液を、一方の容器から別の容器に定量的に添加することを可能にする。

40

【0150】

典型的には、本発明のキットは、適当な方法を実施するためにキットの構成成分を使用するための使用説明書も含んでいることがある。

【0151】

本発明の方法およびキットは、ヒトおよび他の動物、たとえばヒト以外の霊長類、ウマ科、ウシ亜科、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、鳥類、ネコ科およびイヌ科の種を含む、いかなる

50

動物にも等しく適用可能である。したがって、異なる種に適用するために、本発明の単一のキットが適用可能である場合もあるが、あるいはまた、たとえば、それぞれ個々の種に特異的な化合物もしくは組成物を含有する、別の異なるキットが必要とされることもある。

【0152】

本発明の方法およびキットは、増殖性疾患を予防もしくは治療することが望ましい、いかなる状況にも応用される。

【0153】

組成物の前駆体およびモジュレーターのスクリーニング

本発明は、哺乳類腫瘍細胞に対する植物ディフェンシンの細胞毒性をスクリーニングするための方法を提供するが、その方法は、本明細書に記載の植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物もしくは医薬組成物を、哺乳類細胞株と接触させること、ならびに植物ディフェンシンとの接触に起因する、哺乳類細胞株に対する細胞毒性をアッセイすることを含む。

【0154】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸およびその断片もしくは相補体を使用して、当業者によく知られている組換えDNA法によって、対応する部分配列および完全配列を他の種から同定して得ることを検討するものであって、その方法にはサザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、および遺伝子マッピング法が含まれるが、これらに限定されない。本発明の核酸およびその断片は、当業者に知られている技法を用いて、アンチセンス分子の作製にも使用することができる。

【0155】

したがって、本発明は、相同配列を同定するためのプライマーおよびプローブとして使用するために、本明細書に記載の核酸の配列に基づくオリゴヌクレオチドおよび断片を検討する。オリゴヌクレオチドは、PCRなどの核酸増幅反応に使用するのに適した、短い一続きのヌクレオチド残基であって、典型的には少なくとも約10ヌクレオチドから約50ヌクレオチドの長さであり、より典型的には約15から約30ヌクレオチドまでの長さである。プローブは、さまざまな長さのヌクレオチド残基であるが、たとえば、約10ヌクレオチドから数千ヌクレオチドの間であって、典型的にはハイブリダイゼーションによる相同配列の検出に使用するためのものである。配列間の相同性のレベル（配列同一性）は、大部分はハイブリダイゼーションのストリンジェンシーによって決まってくる。詳細には、プローブとして使用されるヌクレオチド配列は、ストリンジェンシーの低い、中程度の、または高い条件下で、本明細書に記載のポリヌクレオチドのホモログ、もしくは他の機能的に同等なバリエーションとハイブリダイズすることができる。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、 $2 \times \text{SSC}$ 中50℃で実施されるハイブリダイゼーションに相当するといえる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変更するために利用することができる、当業者によく知られた、数多くの条件および要因が存在する。たとえば、特定の核酸とハイブリダイズする核酸の長さおよび特質（DNA、RNA、塩基組成）；塩濃度および他の化合物濃度、たとえば、ホルムアミド、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコールなどの有無；ならびにハイブリダイゼーションの温度および/または洗浄ステップの変更。たとえば、ハイブリダイゼーションフィルターは、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.5% SDS中で30分間、ならびに少なくとも55℃（低ストリンジェンシー）、少なくとも60℃（中程度のストリンジェンシー）、少なくとも65℃（中/高ストリンジェンシー）、少なくとも70℃（高ストリンジェンシー）、または少なくとも75℃（非常に高いストリンジェンシー）で2回、洗浄することができる。

【0156】

好ましい実施形態において、ディフェンシンは、MTT（3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物）アッセイを用いてスクリーニングされる。MTTアッセイは、当業者が細胞の生存および増殖を評価することを可能にする。したがっ

10

20

30

40

50

て、それを用いて、治療薬となる可能性のある薬剤の細胞毒性を、そうした薬剤が細胞の生存および増殖を促進するか阻害するかということに基づいて、判定することができる。アッセイにおいて、MTTは生細胞では紫色のホルマザンに還元される。可溶化溶液（通常ジメチルスルホキシド、酸性エタノール溶液、または希塩酸中の界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム溶液のいずれかを添加して、不溶性の紫色のホルマザン生成物を溶解させて、着色溶液とする。この着色溶液の吸光度は、分光光度計で一定の波長（通常500から600 nm）で測定することで数値化することができる。最大吸収は、使用される溶媒によって決まる。

【0157】

本発明はまた、増殖性疾患の予防もしくは治療に使用するために、本明細書に記載の方法でスクリーニングされた植物ディフェンシンを提供する。

10

【0158】

溶血作用の低下した植物ディフェンシンを作製するための方法

本発明は、溶血作用の低下した植物ディフェンシンを作製するための方法を提供するが、その方法は、少なくとも1つのアラニン残基をディフェンシンのN末端で、またはその近傍で、植物ディフェンシンに導入することを含む。当業者には当然であるが、そうしたN末端アラニンの付加を達成するために、いくつかの方法、たとえば、部位特異的変異誘発、相同組換え、トランスポゾン、および非相同末端結合などを使用することができる。

【0159】

植物ディフェンシンの溶血作用が結果として、溶血作用を低下させるよう改変されていない対応する植物ディフェンシンの使用によって生じる、もしくは生じると合理的に予想されるよりも、相対的に少ない溶血をもたらすならば、溶血作用が「低下した」と見なすことができる。

20

【0160】

本発明はまた、本明細書に記載の方法で作製された、溶血作用の低下した植物ディフェンシンを提供する。

【0161】

併用療法

当業者には当然のことながら、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、および組成物は、本明細書に記載の1つもしくは複数のポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、および組成物を本明細書に記載の方法への他の治療アプローチと併せて使用する、併用療法アプローチの一環として投与することができる。こうした併用療法のために、併用の各成分は、望ましい治療効果を与えるように、同時に投与しても、任意の順序で順次投与しても、別の時に投与してもよい。別々に投与される場合、成分は、同じ投与経路で投与されることが好ましいかもしれないが、ただし、これがその通りであることは必要ではない。あるいはまた、成分は、併用製品として、1回分の投与単位の中に一緒に製剤されていてもよい。本発明の組成物と併用して使用することができる適当な薬剤は、当業者に知られており、たとえば、化学療法剤、ラジオアイソトープ、および抗体などの標的療法が含まれる。

30

【0162】

本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、および組成物と併用して使用される化学療法薬としては、アルキル化薬、たとえば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、およびイホスファミド、代謝拮抗薬、たとえば、プリンもしくはピリミジン、植物アルカロイドおよびテルペノイド、たとえば、ビンカ・アルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、およびビンデシンなど）およびタキサン（パクリタキセル、およびドセタキセルなど）、ポドフィロトキシン、トポイソメラーゼ阻害薬、たとえばイリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、およびテニポシド、抗悪性腫瘍薬、たとえば、ドキソルビシン、エピルビシン、およびブレオマイシン、ならびにチロシンキナーゼ阻害薬を挙げることができる。

40

50

【0163】

本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、および組成物と併用して使用される標的療法としては、たとえば、メシル酸イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、トラスツズマブ、ラパチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ、テムシロリムス、エベロリムス、ボリノスタット、ロミデプシン、ベキサロテン、アリトレチノイン、トレチノイン、ボルテゾミブ、プララトレキサート、ペバシズマブ、ソラフェニブ、スニチニブ、パゾパニブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、¹³¹I-トシツモマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、デニロイキン・ディフティトックス、タモキシフェン、トレミフェン、フルベストラント、アナストロゾール、エキセメスタン、およびレトロゾールが挙げられる。

10

【0164】

他の療法も、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、発現産物、および組成物と併用して使用することができるが、これにはたとえば、外科的介入、食事療法およびサプリメント、催眠療法、代替医療、および理学療法が含まれる。

【0165】

治療時期

当業者には当然のことながら、本明細書に記載のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、発現産物、および組成物は、そうした治療のために現在用いられている治療法の補完として、診断時に、またはその後に、たとえば追跡治療もしくは地固め療法として、単独の薬剤として投与してもよいが、本明細書に記載の方法への併用療法アプローチの一部として投与してもよい。本明細書に記載のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、発現産物、および組成物はまた、遺伝的または環境的にそうした疾患を発症しやすい被験体に対する予防的治療として使用することもできる。

20

【0166】

当業者には当然のことであるが、本明細書に記載のさまざまな特徴を組み合わせ、本発明の範囲に含まれる特徴の組み合わせを構成することができる。

【0167】

本発明は、ここで、以下の実施例に準拠してさらに説明することとするが、この実施例は単に説明のためのものであって、限定するものではない。

【0168】

30

(実施例)

材料および方法ハナタバコ (Nicotiana glauca) からのNaD1の精製

NaD1をその天然起源から単離するために、前述 (Lay et al., 2003a) のように、花の発生の花弁呈色期までのハナタバコ (N. glauca) の花全体を微粉末に粉碎し、希硫酸で抽出した。手短に述べると、花 (湿重量760 g) を液体窒素中で凍結し、すり鉢とすりこぎで微粉末にまで粉碎し、50 mM硫酸中 (生重量g当たり3 mL) で、5分間、Ultra-Turrax ホモジナイザー (Janke and Kunkel) を用いてホモジナイズした。4 にて1時間攪拌した後、細胞残渣をMiracloth (Calbiochem, San Diego, CA) による濾過、および遠心分離 (25,000 x g、15分、4) によって除去した。その後10 M NaOHを添加してpHを調整し、抽出物を4 で1時間攪拌した後、遠心分離 (25,000 x g、15分、4) して、沈殿したタンパク質を除去した。上清 (1.8 L) を、10 mMリン酸ナトリウムバッファーであらかじめ平衡化したSP Sepharose (商標名) Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences) カラム (2.5 x 2.5 cm) にアプライした。20カラム容の10 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) で洗浄することによって未結合タンパク質を除去し、結合したタンパク質は、500 mM NaClを含有する10 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) で、3 x 10 mL画分中に溶出された。各精製ステップのサンプルを、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、および抗NaD1抗体によるイムノブロッティングによって分析した。SP Sepharoseカラムから得られたNaD1含有画分を、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にかけた。

40

【0169】

50

逆相高速液体クロマトグラフィー

検出器（モデル166, Beckman）に接続したSystem Gold HPLC（Beckman）で、ガードカラムを付けた調製用C8カラム（22 x 250 mm, Vydac）を用いて、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を行った。タンパク質サンプルは、バッファーA（0.1% [v/v]トリフルオロ酢酸）でロードし、1-100%（v/v）バッファーB（0.089% [v/v] トリフルオロ酢酸中60% [v/v] アセトニトリル）の直線勾配で、40分かけて10 mL/分の流速で溶出した。タンパク質は、215 nmの吸光度をモニターすることで検出した（図1B）。タンパク質ピークを集め、SDS-PAGEで分析した。

【0170】

DaN1精製の各段階のサンプル（30 μ L）を、NuPAGE（登録商標）LDSサンプルローディングバッファー（10 μ L, Invitrogen）に添加し、10分間70℃に加熱した。その後サンプルをNuPAGE（登録商標）プレキャスト4-12% ビス-Trisポリアクリルアミドゲル（Invitrogen）上にロードし、200 Vで作動するXCell-Surelock電気泳動装置を用いてタンパク質を分離した。Coomassie Blue染色でタンパク質を可視化し、または抗NaD1抗体によるイムノブロッティングのためにニトロセルロース上に移した。

10

【0171】

他のディフェンシン（NsD1、NsD2、PhD1A）の植物からの単離

ハナタバコの花からNaD1を精製するための本明細書に記載の手順を用いて、種子または花からディフェンシンを単離した。手短に述べると、種子（500 g）をUltra-Turrax ホモジナイザー（Janke and Kunkel）に入れ、微粉末に粉碎した後、50 mM硫酸を添加した（生重量g当たり4 mL）。液体窒素中で花を微粉末に粉碎した後、50 mM硫酸を添加した（生重量g当たり3 mL）。ホモジナイズを5分間続行した後、ホモジネートをピーカーに移し、4

20

にて1時間撹拌した。細胞残渣をMiracloth（Calbiochem, San Diego, CA）による濾過および遠心分離（25,000 x g、15分、4℃）によって除去した。その後、10 M NaOHの添加によりpHを7.0に調整し、抽出物を4℃にて1時間撹拌した後、遠心分離して（25,000 x g、15分、4℃）、沈殿したタンパク質を除去した。上清を、10 mMリン酸ナトリウムバッファーであらかじめ平衡化したSP Sepharose（商標名）Fast Flow（GE Healthcare Bio-Sciences）カラム（2.5 x 2.5 cm）にアプライした。20カラム容の10 mMリン酸ナトリウムバッファー（pH 6.0）で洗浄することによって未結合タンパク質を除去し、結合したタンパク質は、500 mM NaClを含有する10 mMリン酸ナトリウムバッファー（pH 6.0）で、3 x 10 mL画分中に溶出された。

30

【0172】

分析用Zorbax 300SB-C8 RP-HPLCカラムおよびAgilent Technologies 1200シリーズシステム、または調製用C8 RP-HPLCカラムとBeckman Coulter System Gold HPLCを用いて、SP Sepharoseカラムから得られた画分を、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）にかけた。タンパク質サンプルは、バッファーA（0.1% [v/v]トリフルオロ酢酸）でロードし、1-100%（v/v）バッファーB（0.089% [v/v] トリフルオロ酢酸中60% [v/v] アセトニトリル）の直線勾配で溶出した。溶出されたタンパク質は、215 nmの吸光度をモニターすることで検出した。タンパク質ピークを集め、SDS-PAGEおよび質量分析によってディフェンシンを同定した。

40

【0173】

ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）における組換えディフェンシンの発現および精製

ピキア・パストリス発現系はよく知られており、Invitrogen（Carlsbad, CA；pPIC9発現ベクターの配列を記載するメーカーのPichia Expression Manual（ピキア発現マニュアル）を参照されたい）から市販されている。NaD1、TPP3、2-z、1-H、Dm-AMP1などの当該ディフェンシンを、pPIC9発現ベクター中にクローニングした（これらのクローンによってコードされるタンパク質は、それぞれrNaD1、rTPP3、r 2-z、r 1-H、rDm-AMP1と命名された）。次に、これらの構築物を用いてP. pastoris GS115細胞を形質転換した。各クローンのコロニーを用いて、100 mLフラスコ内の10 mL BMG培地（Invitrogen Pichia

50

Expression Manualに記載)に接種し、30 の振盪培養器(140 rpm)で一晩培養した。その培養物を用いて2 Lのバッフル付きフラスコ内の500 mL BMG培地に接種し、そのフラスコを30 の振盪培養器(140 rpm)に入れた。OD₆₀₀が2.0に達したら(約18時間)、細胞を遠心分離(2,500 x g、10分)によって集め、5L バッフル付きフラスコ内の1 L BMM培地中に再懸濁し(OD₆₀₀ = 1.0)、28 の振盪培養器で3日間培養した。発現培地を遠心分離(4750 rpm、20分)によって細胞から分離し、等量の20 mMリン酸カリウムバッファー(pH6.0)で希釈した。培地をNaOHでpH 6.0に調整した後、あらかじめ10 mMリン酸カリウムバッファー、pH 6.0で平衡化したSP Sepharoseカラム(1 cm x 1 cm、Amersham Biosciences)にかけた。その後、カラムを100 mLの10 mMリン酸カリウムバッファー、pH 6.0で洗浄し、結合したタンパク質を、500 mM NaCl含有10 mMリン酸カリウムバッファー10 mL中に溶出した(図1A)。溶出されたタンパク質を、本明細書書きの40分の直線勾配でRP-HPLCにかけた。タンパク質ピークを集め、SDS-PAGE、および抗DaN1抗体によるイムノブロッティングで分析した。ディフェンシンを含有する画分を凍結乾燥し、滅菌Milli-Q超純水中に再懸濁した。ピキア発現ディフェンシンのタンパク質濃度は、タンパク質標準としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いたピシンコニン酸(BCA)タンパク質アッセイ(Pierce Chemical Co.)によって測定した。

10

【0174】

rNaD1の円二色性スペクトル

*P. pastoris*から精製されたNaD1(rNaD1)が正しく折り畳まれているかどうかを調べるために、その遠紫外円二色性(CD)スペクトルを記録して、天然型NaD1のスペクトルと比較した(図1C)。2つのスペクトルの類似性は、rNaD1の構造が天然型NaD1と比べて有意に変化しなかったことを示す。

20

【0175】

rNaD1の抗真菌活性

フザリウム・オキシスポルム(*Fusarium oxysporum*) f. sp. *vasinfectum* の増殖に及ぼすrNaD1の影響を天然型NaD1と比較した。組換えNaD1は、IC₅₀が約1.6 μMの低濃度で抗真菌活性を示した。NaD1はIC₅₀が約1.0 μMで、わずかに、より有効であった(図1D)。

【0176】

還元型およびアルキル化NaD1の調製

凍結乾燥NaD1(500 μg)を400 μLストックバッファー(200 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA、6 M 塩酸グアニジン、0.02% [v/v] Tween(登録商標)-20)中に溶解した。還元バッファー(15 mMジチオスレイトール[DTT]を含有するストックバッファー)を添加した(44 μL)後、40 にて4.5時間インキュベートした。反応混合物を室温に冷却した後、ヨード酢酸(0.5 M、1 M NaOH中、55 μL)を添加し、暗所で室温にて30分間インキュベートを続行した。Nanosep omega(登録商標)スピンカラム(3K分子量カットオフ、PALL Life Sciences)を用いて、塩、DTT、およびヨード酢酸を除去し、タンパク質濃度は、BCAタンパク質アッセイ(Pierce)を用いて測定した。Fovの増殖に及ぼす還元型およびアルキル化NaD1(NaD1R&A)の影響を本明細書に記載のように評価した。

30

【0177】

イムノブロット分析

イムノブロット分析のために、タンパク質をニトロセルロースに転写し、プロテインA-精製抗NaD1抗体(1:3000希釈を7.5 mg/mL)、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したヤギ抗ウサギIgG(1:3500希釈:Amersham Pharmacia Biotech)で探索した。高感度ケミルミネッセンス法(ECL)検出試薬(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて、Chemi Genius(商標名)バイオイメージングシステム(Syngene)によって、結合した抗体を可視化した。

40

【0178】

抗NaD1または抗NaD2抗血清を作製するために、Harlow and Lane(1988)に記載のようにグルタルアルデヒドを用いて、精製NaD1もしくはNaD2(1.5 mg)を、それぞれキーホールリンベットヘモシアニン(0.5 mg, Sigma)に結合した。等容量のフロイント完全アジュ

50

バント (Sigma) 中のタンパク質 (150 µg NaD1) 1.5 mLをウサギに注射した。複合タンパク質 (100 µg NaD1またはNaD2) およびフロイント不完全アジュバント (Sigma-Aldrich) の追加免疫を、4週間後および8週間後に投与した。注射前に免疫前血清を採取し、免疫血清は、3回目および4回目の免疫処置の14日後に採取した。免疫前血清および免疫血清のIg G画分を、Protein-A Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて精製し、それぞれ3.4 mg/mLおよび7.5 mg/mLの濃度で -80 で保存した。

【 0 1 7 9 】

rStPin1Aの細菌発現および精製

ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) から単離されたI型セリンプロテアーゼ阻害剤StPin1Aは、米国特許第7,462,695号 "Insect chymotrypsin and inhibitors thereof" および第11/753,072号 "Multi-Gene Expression Vehicle"に (Pot1Aとして) すでに記載されており、参考として本明細書に組み入れられる。

【 0 1 8 0 】

StPin1Aの成熟ドメインをコードするDNA断片を、大腸菌 (*E. coli*) での組換えタンパク質発現用のベクター-pHUEにサブクローニングするためにPCR増幅した (Baker et al, 2005, Cantanzariti et al, 2004)。以下のプライマー: Sac2StPin1A5': 5' CTC CGC GGT T GGT AAG GAA TCG GAA TCT GAA TCT TG 3'; Pot1Sal13': 5' GGT CGA CTT AAG CCA C CC TAG GAA TTT GTA CAA CAT C 3' を使用したが、これは、5'および3'末端にそれぞれSacIIおよびSacI制限酵素部位を組み込んだ。PCR反応には、2x GoTaq Mastermix (25 µL、Promega)、Sac2Pot15' プライマー (10 µM、2 µL)、Pot1Sal13' プライマー (10 µM、2 µL)、滅菌蒸留水 (16 µL)、および鋳型としてpGEM-T Easy-StPin1A plasmid DNA (約20 ng、5 µL)を入れた。初回の変性は、94 で2分間行い、続いて94 で1分間、60 で1分間、および72 で1分間を30サイクル行い、その後、最後の伸長ステップ、72 で10分間を行った。

【 0 1 8 1 】

PCR産物をpCR2.1-TOPOベクター (Invitrogen) にクローニングし、次にこれを用いて、化学的コンピテント細胞である大腸菌TOP10 (Invitrogen) をメーカーの使用説明書にしたがって形質転換した。Wizard Plus SV Miniprepキット (Promega)を用いてプラスミドDNAを単離し、TOPO特異的M13フォワードおよびリバースプライマーを用いて、ベクターインサートを配列決定した (Macrogen)。

【 0 1 8 2 】

SacIIおよびSacIを用いてインサートを切り出し、Perfectprepキット (Eppendorf)を用いてアガロースゲルから抽出し、pHUEにライゲートしたが、次にこれを用いて大腸菌TOP10細胞を形質転換した。StPin1A含有pHUEのプラスミドDNAを抽出した後、大腸菌BL21 (DE3) CodonPlus-RIL細胞 (Stratagene)を形質転換した。

【 0 1 8 3 】

形質転換された大腸菌のシングルコロニーを用いて、アンピシリン (0.1 mg/mL)、クロラムフェニコール (0.034 mg/mL) およびテトラサイクリン (0.01 mg/mL) を含有する2YT培地 (10 mL、16 g/L トリプトン、10 g/L 酵母エキス、5 g/L NaCl) 20 mLに接種し、37 にて振盪しながら一晩培養した。この培養物を用いて、抗生物質を含有する新調製2YT培地 (1L) に接種し、つぎにそれを光学濃度 (595 nm) が約0.8になるまで振盪しながら37 で培養した。IPTGを添加し (終濃度1 mM)、培養物をさらに3時間増殖させた。

【 0 1 8 4 】

細胞を遠心分離によって集め、The QiaExpressionist Manual (Qiagen)で概略が述べられている天然型タンパク質精製プロトコールを用いて、ニトリロ三酢酸ニッケル (Ni-NTA) 樹脂 (Qiagen) でのアフィニティークロマトグラフィーによって、可溶性組換えタンパク質を精製した。結合したタンパク質は、樹脂から、250 mMイミダゾール含有バッファー中に溶出した後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) および300 mM NaCl含有溶液中で4 にて8-16時間透析した。脱ユビキチン化プロテアーゼ6H.Usp2-cc (Cantanzariti et al., 2004; Baker et al., 2005)とともに37 で1時間インキュベートすることによって、透析された融合

10

20

30

40

50

タンパク質を切断した。次に、切断されたタンパク質を、検出器（モデル166、Beckman）に接続されたSystem Gold HPLC（Beckman）、および調製用C8カラム（22 x 250 mm, Vydac）を用いて精製した。タンパク質サンプルは、10 mL/分の流速で、バッファーA（0.1% [v/v] トリフルオロ酢酸）中でロードし、5分間の0-60% (v/v) バッファーB（60% [v/v] acetonitrile in 0.089% [v/v] trifluoroacetic acid）の段階勾配、ならびに20分間の60-100% バッファーBの段階勾配で溶出した。タンパク質は215 nmの吸光度をモニターして検出した。タンパク質ピークを手作業で集め、SDS-PAGEで分析した。

【0185】

細胞株および培養

本研究に使用した哺乳類細胞株は以下の通りである：ヒト黒色腫MM170細胞、不死化Tリンパ球Jurkat細胞、ヒト白血病単球リンパ腫U937細胞、ヒト前立腺がんPC3細胞、マウス黒色腫B16細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、GAG欠損CHO変異体pgsA-745細胞、およびアフリカミドリザル腎臓線維芽細胞COS-7細胞。細胞は、組織培養フラスコ内で37℃にて5% CO₂ / 95%空気の加湿環境で増殖させ、増殖速度に応じて週に2、3回、規定通りに継代した。哺乳類細胞はすべて、10%熱不活化ウシ胎児血清（FBS、Invitrogen）、100 U/mLペニシリン（Invitrogen）、および100 µg/mLストレプトマイシン（Invitrogen）を添加したRPMI-1640培地（Invitrogen）中で培養したが、例外としてCHOおよびPGS細胞は10% FBS、100 U/mLペニシリン、および100 µg/mLストレプトマイシンを添加したDMEM-F12培地（DMEM, Invitrogen）中で培養した。接着細胞株は、0.25% トリプシンおよび0.5 µM EDTA（Invitrogen）を含有する混合物3-5 mLを添加することでフラスコから剥離した。

【0186】

末梢血単核細胞（PBMC）のFicoll-paqueによる分離

PBMCは、Ficoll-paque分離後に、細胞濃度1 × 10⁶ PBMC/mLとなるよう再懸濁した。手短に述べると、ヘパリン添加チューブに血液を採取し、滅菌1 × PBS / 0.5% BSA（D-PBS、Ca²⁺ およびMg²⁺ を含まない、Invitrogen）で、1 : 2に希釈した。50 mL滅菌チューブを用いて、希釈した血液（35 mL）を15 mL ficoll-paqueに重層し、続いて、1800 rpmで30分間遠心分離した（ブレーキオフ）。上部の血漿層を未使用のチューブに取り出し、再度回転させた後、PBMC層を取り出し、1 × PBS / 0.5% BSAをいれた4つのチューブに細胞を分割した。細胞を室温にて1000 rpmで10分間回転させ、各チューブのペレットを50 mL 1 × PBS / 0.5% BSAで3回洗浄した。より多くの血小板を除去するために、800 rpmで15分間回転させた。

【0187】

赤血球（RBC）溶解

Ficoll-paque分離後、RBCを集め、1 × PBSで洗浄し、1000 × g、10分間でペレットとした。RBCは処理のために1 : 10に希釈し、ディフェンシンの濃度を増加させて（0-100 µM）、5% CO₂ / 95%空気の加湿環境で一晩インキュベートした。24時間インキュベート後、細胞を2000 rpmで10分間遠心分離し、上清を1 × PBSで1 : 10に希釈した。赤血球溶解の程度を412 nmの吸光度で評価した。

【0188】

MTT細胞生死判別アッセイ

腫瘍細胞を4連で、平底96ウェルマイクロタイタープレートのウェル（50 µL）に、2 × 10⁶ 細胞個/mLから始めてさまざまな密度で接種した。完全培地のみを入れた4つのウェルを、各アッセイにおいてバックグラウンド対照として含めた。マイクロタイタープレートを37℃にて、5% CO₂ / 95%空気を含有する加湿環境下で、一晩インキュベートした後、完全培地（100 µL）を各ウェルに添加し、さらに48時間37℃にてインキュベートした。細胞生死判別アッセイに最適な細胞密度（30-50%培養密度）は、光学顕微鏡によって、各細胞株について決定された。

【0189】

腫瘍細胞を96ウェルマイクロタイタープレート（50 µL / ウェル）に、上記の細胞最適

10

20

30

40

50

化アッセイで決定された最適な密度で播種した。同量の完全培地を入れたバックグラウンド対照ウェル ($n = 8$) をこのアッセイに含めた。マイクロタイタープレート[®]を37 °Cにて一晩インキュベートした後、さまざまな濃度でタンパク質を添加し、そのプレートをさらに48時間インキュベートした。細胞生存に関する3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾリル)-2, 5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド (MTT, Sigma-Aldrich) アッセイは次のように実施した: MTT溶液 (1 mg/mL) を各ウェルに添加し (100 μ L)、プレートを5% CO₂ / 95%空気を含む加湿雰囲気下で37 °Cにて2-3時間インキュベートした。その後、接着細胞株については、培地を除去して、ジメチルスルホキシド (100 μ L、DMSO、Sigma-Aldrich) に置き換え、5分間振盪器に乗せて、テトラゾリウム塩を溶解した。浮遊細胞の場合には、DMSO添加前に、細胞を1500 rpmで5分間回転させた。各ウェルの吸光度を570 nmで測定し、IC₅₀値 (細胞増殖を50%阻害するタンパク質濃度) をOrigin Software Programを用いて決定した。

【0190】

ATPバイオルミネッセンスアッセイ

ATPバイオルミネッセンスアッセイ (Roche Diagnostics, NSW Australia) を用いて、透過化された腫瘍細胞によるATPの放出を定量した。ルシフェラーゼ試薬をメーカーの説明書通りに溶解し、4 °Cにて5分間インキュベートした。手短に述べると、細胞を1 \times PBS / 0.1% BSA中に1 \times 10⁶細胞個/mLの濃度で再懸濁し、10 μ Lタンパク質サンプルを入れた空のマイクロタイタープレート (Nunc (商標名)) のルシフェラーゼ試薬 (50 μ L/ウェル) に加えた (40 μ L/ウェル)。一斉にマルチチャンネルピペットを用いて、その混合物を加え (90 μ L/ウェル)、サンプルは直ちにマイクロタイタープレートリーダーで、562 nmで30分間読み取り、読み取りは30分間隔で行った。データはSoftMaxPro 4.0ソフトウェア (Molecular Devices Company) で解析した。

【0191】

蛍光活性化細胞選別 (FACS) による細胞透過性アッセイ

特に指示のない限り、細胞は、10% FBS、100 U/mLペニシリン、および100 μ g/mLストレプトマイシンを添加した完全培地RPMI-1640中に4 \times 10⁵ 細胞個/mLの細胞濃度で再懸濁して、V底96ウェルプレートまたは微量遠心管に加えた。細胞は、さまざまな濃度の、または10 μ Mの設定濃度のタンパク質を添加する際に、特に指示のない限り37 °Cに維持した。典型的には、細胞は当該タンパク質と混合し、37 °Cで30分間インキュベートした。また、ある実施形態において、細胞は、フローサイトメトリー分析前に4 °Cまたは37 °Cのいずれかで、2-60分間インキュベートした。等量の2 μ g/mLヨウ化プロピジウム (PI, Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Invitrogen) 含有完全培地に細胞を添加し、直ちにFACSCantoセルソーター (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) およびCell Quest Pro Software (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリーで分析した。典型的には、サンプル当たり5000-10000個の事象を収集し、得られたデータをFlowJoソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR) を用いて解析した。細胞は前方散乱 (FSC) および側方散乱 (SSC) に基づいて適切に流路を制御し、生存細胞はPIを排除する能力によって測定された。分析するために、全データは対照に対して標準化された (正常細胞%は約0-7%の範囲であった)。

【0192】

透過化細胞の走査型電子顕微鏡検査

走査型電子顕微鏡法を本研究に用いて、NaD1 (10 μ M) で処理した場合のPC3細胞を未処理対照と比較して可視化した。細胞は、いったんインキュベーターから取り出したら、必要になるまで氷上に保持した。小型のガラス製シャーレを、蒸留水に浸した濾紙と重ねて、その後カバーガラスをシャーレ上に載せた。最初の固定の前にサンプルを洗浄バッファー (0.2 Mリン酸ナトリウム (pH 7.2) および5.4% (w/v) グルコース) で洗浄し、サンプルを4 °Cにて30分間、等量の1.25% グルタルアルデヒドおよび0.5%四酸化オスミウム固定剤中に浸漬した。サンプルは、洗浄バッファーで2回15分間洗浄した後、氷上、遮光/気密ガラス製シャーレ内で1時間2%オスミウム中に浸漬した。その後の脱水手順の前に、サン

ブルを洗浄バッファーで3回5分間洗浄した。次にプロトコールの中の脱水ステップを実施したが、これはエタノール (EtOH) 濃度を増加させて、次々と浸漬することを必要とした：50% EtOH中1 × 10分、70% EtOH中1 × 10分、90% EtOH中1 × 10分、95% EtOH中1 × 10分、および最後に100% EtOH中2 × 10分。サンプルの固定および脱水に続いて、凍結乾燥したが、このサンプルは数秒間液体窒素中に浸漬した後、真空蒸発装置 (Dynavac) 中の銅製のブロックに入れた。48時間凍結乾燥した後、金属スタブ上にマウントし、デシケーター内に保存した。最後に自動化スパッタ塗布装置 (SC7640 Polaron) を用いて、サンプルを金属 (金およびパラジウム) の薄層でコーティングした。高分解能デジタル電界放射型走査電子顕微鏡、FE-SEM (JSM-6340F, JEOL Ltd, Japan) を用いてサンプルを分析した。

10

【0193】

脂質コート膜ストリップによるアッセイ

膜脂質ストリップ (Membrane Lipid Strips (商標名))、PIPストリップ (PIP Strips (商標名)) およびスフィンゴストリップ (Sphingo Strips (商標名)) (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT) をPBS / 3% BSAとともに室温で1-2時間インキュベートし、非特異的な結合をブロックした。次に膜ストリップを、PBS / 1% BSA中に希釈したディフェンシン (0.12 μM) とともに、4 にて一晚インキュベートした後、PBS / 0.1% Tween-20で室温にて60分間完全に洗浄した。ウサギ抗NaD1ポリクローナル抗体 (NaD1、NsD1、NsD2、rTPP3、またはPhD1A検出用) またはウサギ抗NaD2抗体 (NaD2またはNsD3検出用) (いずれの場合もPBS / 1% BSAで1:2000希釈) を用いて4 にて1時間、続いてHRP標識ロバ抗ウサギIgG抗体 (PBS / 1% BSAで1:2000希釈) を用いて4 にて1時間、膜ストリップを探索することによって、膜に結合したタンパク質を検出した。それぞれ抗体とインキュベートした後、膜ストリップを室温にてPBS / 0.1% Tween-20で60分間十分に洗浄した。高感度化学発光 (ECL) ウェスタンブロッティング試薬 (GE Healthcare BioSciences, NSW Australia) を用いて化学発光を検出し、Hyperfilm (GE Healthcare BioSciences, NSW, Australia) に露光して、Xomat (All-Pro-Imaging) を用いて現像した。

20

【0194】

ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland) を用いて、脂質ストリップから得られた画像についてデンストメトリー分析を行った。手短に述べると、同等な大きさの円が当該領域付近に追跡された。同じ大きさのバックグラウンド円も、脂質が存在せずバックグラウンドとして設定された膜上の領域にあった。当該領域は、バックグラウンドから差し引かれた平均ピクセル強度として数値化された。

30

【実施例1】

【0195】

NaD1のin vitro抗腫瘍活性

実施例1：序論

腫瘍細胞株および初代ヒト細胞分離株の生存能力に及ぼすNaD1 (ハナタバコ (N. alata) の花由来の精製天然型タンパク質またはP. pastorisで作製された精製組換えタンパク質) の影響を、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド (MTT) in vitro細胞培養生死判別アッセイによって判定した。テストした腫瘍細胞株は、HCT-116 (ヒト結腸がん)、乳がんMCF-7 (ヒト乳がん)、MM170 (ヒト黒色腫)、PC3 (ヒト前立腺がん)、および、B16-F1 (マウス黒色腫)、CASMC (ヒト冠動脈平滑筋細胞) およびHUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) である。NaD1は、精製植物タンパク質組換えStPin1A (rStPin1A) またはNaD2と並行してテストした。細胞を、次の細胞数で96ウェル平底マイクロタイタープレートに播種し：MM170 (2 × 10⁴/ウェル)、MCF-7 (2 × 10⁴/ウェル)、HCT-116 (5 × 10³/ウェル)、PC3 (5 × 10³/ウェル)、B16-F1 (2 × 10³/ウェル)、HUVEC (3 × 10³/ウェル)、CASMC (5 × 10³/ウェル)、一晚培養した。その後NaD1、rNaD1またはrStPin1Aを終濃度1 ~ 100 μMとなるよう細胞に添加し、48時間インキュベートしたが、そこで「材料および方法」に記載のようにMTTアッセイを行った。

40

【0196】

50

実施例 1 : 結果

NaD1およびrNaD1は調べたすべての腫瘍細胞株の生存率を劇的に低下させ、IC50の値は低い μM 濃度(2-5 μM)であった(図2A-2E)。2つの型のNaD1はいずれも非常によく似た阻害効果を示したが、NaD1はrNaD1よりわずかに大きい活性を有していた(図2F)。これに対して、植物タンパク質rStPin1Aは、腫瘍細胞の細胞生存に対し有意な影響を示さなかった(図2A-2E)。NaD2(同様にハナタバコ(*N. alata*)の花から分離されたナス科クラスIディフェンシン)もMM170細胞について調べたが、細胞生存への有意な影響は観察されなかった(図2G)。NaD1およびrNaD1は、正常なヒトCASM CおよびHUVECの細胞生存も低下させることが明らかになったが、IC50値は腫瘍細胞株に対する値より高かった(7.5-12 μM)(図2Hおよび2I)。NaD2またはrStPin1Aは、CASM CおよびHUVECの細胞生存に対して有意な影響を示さなかった(図2Hおよび2I)。NaD1と比べて、還元型およびアルキル化型NaD1(NaD1R&A)は、マウス黒色腫B16-F1でテストしたとき、腫瘍細胞生存への影響を示さなかった(図2J)。これらのデータは、NaD1が天然型も組換え型も、低い μM 濃度で腫瘍細胞を選択的に死滅させることを示す。

10

【実施例 2】

【0197】

in vitroでヒト細胞の透過性に及ぼすNaD1の影響

実施例 2 : 序論

NaD1は、*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*の菌糸を透過性にする能力を有することがすでに示されている(van-der-Weerden et al., 2008)。NaD1が真菌と同様の様式で腫瘍細胞を死滅させるのかどうかを判断するために、NaD1が腫瘍細胞を透過化する能力を、2つの異なるアプローチによって評価した。第1は、細胞内ATPの放出を測定するためにバイオルミネッセンスアッセイを利用した。4x10⁴ U937(ヒト骨髄単球腫瘍細胞)またはMM170(ヒト黒色腫)細胞を、天然型NaD1の濃度を増加させて(0-20 μM)処理し、ATPの放出を、562 nmで吸光度を測定することにより、30秒間隔で全体として30分間測定した。第2のアプローチは、NaD1の濃度を増加させて(0-100 μM)30分間細胞を処理した後の、U937およびMM170細胞(4x10⁵/mL)による蛍光色素ヨウ化プロピジウム(PI)(2 $\mu\text{g/mL}$)の取り込みを測定するために、フローサイトメトリーを用いた。

20

【0198】

それに加えて、電界放射型走査電子顕微鏡法(FE-SEM)を用いて、腫瘍細胞膜の形態変化を観察した。ヒトPC3細胞(前立腺がん)をNaD1(10 μM)で30分間処理し、または処理せず、その後FE-SEMのために固定して加工した。

30

【0199】

実施例 2 : 結果

U937およびMM170細胞は、NaD1で処理すると、時間依存性、および濃度依存性のATP放出を示した(図3Cおよび3D)。いずれの場合も、ATPは、NaD1に暴露してほとんどすぐに、細胞から放出された。NaD1R&Aは、U937もしくはMM170を透過性にする能力を示さなかった(図3D)。これらの結果は、NaD1のインタクトな構造が、細胞透過化に必須であって、実施例 2 に示すように腫瘍細胞を死滅させるNaD1の能力と相関することを示す。

40

【0200】

NaD1による腫瘍細胞の透過化をさらに調べるために、U937およびMM170細胞を、NaD1の濃度を増加させて(0-100 μM)37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間処理した後、PI取り込みをフローサイトメトリーで測定した。NaD1によってもたらされるATPの放出について記載したように、U937およびMM170細胞によるPIの取り込みは、NaD1の濃度増加に伴って増加した。図3AおよびBに記載のように、PI⁺のU937またはMM170細胞数は、さまざまな濃度のNaD1への暴露に際してよく似ており、6.25 μM で約30% PIであるが、100 μM では100% PIに増加した。

【0201】

NaD1に暴露したPC3細胞のFE-SEMによる研究は、そうした細胞が未処理細胞に対して明確な形態の差異を示すことを明らかにした。NaD1処理細胞は、未処理細胞の滑らかなインタクトな表面と比べて、歪んだ不規則な細胞表面によって実証されるように、破壊された

50

細胞膜を示した（図3E）。これらの変化は、細胞膜の不安定化を示し、NaD1が腫瘍細胞の細胞膜を透過性にするという上記の知見を裏付ける。

【実施例3】

【0202】

赤血球溶解に及ぼすNaD1および組換えNaD1の影響

実施例3：序論

濃度を増加させたNaD1（0-100 μ M）とともに107 RBCを37℃にて16時間インキュベートすること、ならびに412 nmでの吸光度を測定することによりヘモグロビン放出を測定することによって、天然型NaD1またはrNaD1がヒト赤血球を溶解する能力を調べた。

【0203】

実施例3：結果

低濃度（<12.5 μ M）のNaD1は、PBSのみの対照と比較して、RBC溶解に影響しなかった。しかしながら、もっと高濃度（12.5-100 μ M）のNaD1はRBC溶解を引き起こし、放出されるヘモグロビンのレベルは、（水で100%完全に溶解を生じさせた陽性対照に対して）100 μ Mで最大約50%の溶解に達した。これに対して、rNaD1は、100 μ Mに至るまでの濃度で、RBCの溶解能力を示さなかった（図4）。

【実施例4】

【0204】

血清存在下でのNaD1の透過化作用

実施例4：序論

血清存在下で腫瘍細胞を透過性にするNaD1の能力を評価するために、PI取り込みフローサイトメトリーアッセイを実施例2に記載のように利用したが下記を変更した：4x10⁵/mL U937細胞を10 μ M天然型NaD1とともに、ウシ胎児血清（FCS）存在下でその濃度を増加させて（0-40%）60分間インキュベートし、続いて2mg/mL PIを添加した。その後PI⁺細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって決定した。

【0205】

実施例4：結果

NaD1は、40% FCS存在下で70%のPI⁺細胞が検出されたことから実証されるように、血清存在下でU937細胞を透過性にする能力を保有したが、それは0% FCSでの90% PI⁺細胞よりごくわずかに低かった。

【実施例5】

【0206】

NaD1のin vivo抗腫瘍活性

実施例5：序論

マウスにおける固形黒色腫増殖のin vivoモデルで、腫瘍増殖に及ぼすNaD1の影響を評価した。C57BL/6マウスに5x10⁵ B16-F1腫瘍細胞を皮下注射し、固形腫瘍を直径約10 mmまで増殖させた。次に、50 μ L PBS中の1 mg/体重kgのNaD1またはNaD1R&A、または50 μ L PBSのみを2日ごとに、マウスを屠殺するまで腫瘍内に注射した。2日ごとの注射の前に、腫瘍サイズを測定した。各群6匹のマウスを使用した。

【0207】

実施例5：結果

1 mg/体重kgのNaD1の腫瘍内注入は、NaD1R&AおよびPBS単独の対照と比較して、腫瘍増殖の有意な減少をもたらした。4日までに、腫瘍サイズは、NaD1R&AまたはPBS単独処理マウスについてそれぞれ4.0 \pm 0.4または3.7 \pm 0.6であったのと比較して NaD1処理マウスについてはわずか1.8 \pm 0.2に達していた（腫瘍サイズは0日の各マウスについて1に標準化した）。B16-F1腫瘍は、処置が開始されたとき、高度に進行した段階となっていたことに留意すべきである。

【実施例6】

【0208】

マウスにおけるNaD1の急性経口毒性

10

20

30

40

50

実施例 6 : 序論

本研究は、OECD Test Guideline (テストガイドライン) 423 (OECD [経済協力開発機構] 2001. Guideline (ガイドライン) 423: Acute Oral Toxicity (急性経口毒性) - Acute Toxic Class Method (急性毒性等級法)、Paris: OECD)に基づいて行った。

【0209】

同腹に由来する健康な雌C57BL/6マウスは、La Trobe University (Bundoora Campus)のCentral Animal House、またはMonash Animal Servicesから入手した。動物は耳パンチによって識別し、研究中はケージ当たり3匹を維持した。動物は、La Trobe Universityでの標準的な動物舎の条件にしたがって、ケージ内に3匹のグループで収容され維持される。

【0210】

投与日に、試験マウスは体重を量り、投与前4時間は絶食させた。投与直前に、マウスは再度体重を測定した。タンパク質溶液(純粋NaD1の水溶液)は、3匹の試験マウスのそれぞれが、0(水のみ)の溶媒対照)、20、50、または300 mg NaD1/体重kgの固定された投与レベルで全体として400 µLのタンパク質溶液を受けとるように、投与の少し前に調製した。タンパク質溶液は、先端が円形のカニューラ針を用いて強制経口投与によって投与された。飼料は投与の1時間後に元に戻した。マウスは標準的な齧歯類飼料および水を不断給餌で受け取った。

【0211】

マウスは第1日に投与後4時間の間、1時間に1度観察し、その後は第14日に予定通り屠殺するまで1日2回観察した。肉眼的毒性、薬理学的悪影響、および行動変化の兆候を、飼料および水の消費と同様に、毎日評価して記録した。第7、8、および14日に再度、マウスの体重を測定した。研究最終日(第14日)に、マウスを二酸化炭素吸入により屠殺し、剖検した。マウスはすべて、肉眼的病理検査を受けた。次の臓器の重さを記録した: 脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、消化管、脾臓、および胸腺。その後、サンプルは4%(v/v)パラホルムアルデヒド中で固定してから、パラフィン包埋し、切片を作製し、さらにAustralian Phenomics Network, University of Melbourne ノードで組織病理学検査を行った。消化管は、次のセクションに分けた: 胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、および結腸。

【0212】

実施例 6 : 結果 : 体重および臨床的兆候

すべての動物は外見上健康であって、肉眼的毒性、薬理学的悪影響、または行動変化の兆候を示さず、研究の終了まで生存した。治療に係る体重への影響はなく、体重は、研究開始時の絶食前の体重に厳密に一致した。

【0213】

研究終了時に、二酸化炭素窒息によってマウスを屠殺し、次の臓器を採取した: 脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、消化管、脾臓、および胸腺。これらの組織は、4%(v/v)パラホルムアルデヒド中で固定した。消化管は下記のセクションに分けた: 胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、および結腸。すべての臓器は、パラフィン包埋して切片を作製し、Australian Phenomics Network, University of Melbourne ノードに基づいてヘマトキシリンおよびエオシン(および、脳切片についてはルクソールファスト青)で染色した。

【0214】

タンパク質投与に起因する病的状態はいかなるマウスにおいても観察されなかったが、例外は、300 mg NaD1/体重kgの最高用量で予想される、胃上皮に対するわずかな炎症であった。

【実施例 7】

【0215】

NaD1およびNaD2の細胞脂質結合特性

実施例 7 : 序論

Echelon (商標名) の3つの異なる市販の脂質ストリップ (Membrane、PIP、およびスフィンゴ脂質ストリップ (Sphingolipid Strip)) を用いて固体脂質結合アッセイを実施することにより、NaD1およびNaD2と細胞脂質との相互作用を調べた。これらのストリップに

10

20

30

40

50

は、各脂質100 pmolが生物学的に活性な形でスポットされている。NaD1、もしくはNaD2、rNaD1もしくはrNaD2 (0.12 μ M) を脂質ストリップとともに4 にて一晚インキュベートし、NaD1もしくはNaD2に対する特異的ウサギポリクローナル抗体、続いてHRP標識ロバ抗ウサギ抗体で、結合を検出した。NaD1もしくはNaD2結合は、発色した脂質ストリップ上でデンストメトリーを行うことによって定量した。

【0216】

実施例7：結果

NaD1は、PtdIns(3,5)P₂、PtdIns(3,5)P₂、PtdIns(4,5)P₂、およびPtdIns(3,4,5)P₃などのホスホイノシチドPtdIns (PIP₂) および (PIP₃) ともっとも強く結合したが、PtdIns(3)P、PtdIns(4)P₂、およびPtdIns(5)Pなどの、カルジオリピンおよびPtdIns(PIP)に対して10
も強い結合を示した(図7Aおよび7B)。NaD1は、ホスファチジルセリン、ホスファチジルアラニン、ホスファチジルグリセロール、およびスルファチドに対しても弱い結合を示した(図7A、BおよびC)。組換えNaD1はNaD1と同様の脂質結合特異性を示したが、例外は、ホスファチジルセリン、ホスファチジルアラニン、およびホスファチジルグリセロールに対してもっと強い結合が観察されたことである(図7G)。NaD1R&Aはいかなる細胞脂質にも結合を示さなかった(図7G)。

【0217】

NaD2も細胞脂質と結合するが、NaD1とは異なる特異性を有することが明らかとなった。NaD1とは対照的に、NaD2はホスファチジン酸に対して強い結合を示したが、PtdIns(3,5)P₂、PtdIns(3,5)P₂、PtdIns(4,5)P₂、およびPtdIns(3,4,5)P₃に対しては明確な結合を示さ20
なかった。

【0218】

しかしながら、NaD1と同様に、NaD2もPtdIns(3)P、PtdIns(4)P、およびPtdIns(5)P₂に対して結合を示した(図7D、EおよびF)。以上をまとめると、これらのデータは、関連ディフェンシンNaD1およびNaD2がともに、重複はあるが異なる特異性をもって細胞リン脂質と結合することを示唆する。組換えNaD2は、NaD2と類似した脂質結合特異性を示したが、例外は、ホスファチジルセリンに対してもっと強い結合が観察されたことである(図7G)。rNaD1とは対照的に、rNaD2は脂質結合を示さなかった(図7G)。

【実施例8】

【0219】

in vitroでヒト細胞の透過性に及ぼすペチュニア (Petunia hybrida) ディフェンシンPhD1Aまたはトマト (Solanum lycopersicum) ディフェンシンTPP3の影響

実施例8：序論

ナス科植物の他のディフェンシンも哺乳類腫瘍細胞をNaD1と同様に透過化することができるかどうかを判定するために、ペチュニア (Petunia hybrida) ディフェンシンPhD1Aまたはトマト (Solanum lycopersicum) ディフェンシンTPP3がU937細胞を透過性にする能力を、2つのアプローチによって評価した。第1は、細胞内ATPの放出を測定するためにバイオルミネッセンスアッセイを利用した。4x10⁴ U937 (ヒト骨髓単球腫瘍細胞)をPhD1AまたはrTPP3とともに、その濃度を増加させて(0-20 μ M)処理し、ATPの放出を、562 nmで吸光度を測定することにより、30秒間隔で全体として30分間測定した。第2のアプローチは40
、濃度を増加させたPhD1A (0-50 μ M) またはrTPP3 (0-40 μ M) で30分間、細胞を処理した後、U937 (4x10⁵/mL) による蛍光色素ヨウ化プロピジウム (PI) (2 μ g/mL) の取り込みを測定するために、フローサイトメトリーを用いた。

【0220】

実施例8：結果

U937細胞は、PhD1A (図9B) またはrTPP3 (図9D) で処理すると、時間依存性、および濃度依存性のATP放出を示した。NaD1と同様に、ATPは、PhD1AまたはrTPP3に暴露してほとんどすぐに、細胞から放出された。PhD1AまたはrTPP3による腫瘍細胞の透過化をさらに調べるために、U937細胞を、PhD1A (0-50 μ M) またはrTPP3 (0-50 μ M) の濃度を増加させて37
にて30分間処理した後、PI取り込みをフローサイトメトリーで測定した。PhD1Aまたはr

10

20

30

40

50

TPP3によってもたらされるATPの放出について記載したように、U937細胞によるPIの取り込みは、PhD1AまたはrTPP3の濃度増加に伴って増加した。図9Aに記載のように、PI⁺のU937細胞数は、6.25 μ Mで約35%であるが、50 μ Mでは約90% PI⁺に増加した。TPP3については、PI + U937細胞は5 μ Mで約35%であるが、40 μ Mでは約90% PI⁺に増加した。

【実施例 9】

【0221】

ナス科および非ナス科ディフェンシン/ チオニンによるU937細胞への透過化作用の比較

実施例 9：序論

ナス科クラスIIディフェンシン (NaD1、PhD1A、およびTPP3) が腫瘍細胞を透過化する能力を、非ナス科ディフェンシンおよび関連 チオニン (フジイロテンジクボタン (*Dahlia merckii*) ディフェンシンDm-AMP1、オオムギ (*Hordeum vulgare*) チオニン 1-H、トウモロコシ チオニン 2-Z) と比較して評価するために、PI取り込みフローサイトメトリーアッセイを、下記の変更を行って実施例2に記載のように行った：4x10⁴ U937細胞を10 μ Mの各植物ディフェンシン/ チオニン (NaD1、PhD1A、組換えTPP3、組換え 1-H、および組換え 2-Z) とともに60分間 (血清なしで) インキュベートした後、2 μ g/mL PIを添加した。次にPI⁺細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって決定した。

【0222】

実施例 9：結果

3つのナス科クラスIIディフェンシン、NaD1、PhD1AおよびrTPP3はすべて、U937細胞を透過化する能力を示し、それは細胞のみの対照と比較してPI⁺細胞数が有意に増加したことで示された；10 μ MのNaD1、PhD1AおよびrTPP3処理の結果、56.07 \pm 3.65%、57.07 \pm 2.76%、および49.97 \pm 2.93% PI⁺細胞 (対照27.03 \pm 0.52) となった。これに対して、Dm-AMP1、1-H、または 2-Zについては、細胞のみの対照と比べて有意な活性は観察されなかった。

【実施例 10】

【0223】

血清存在下でのペチュニア (*Petunia hybrida*) ディフェンシンPhD1Aまたはトマト (*Solanum lycopersicum*) ディフェンシンTPP3の透過化作用

実施例 10：序論

血清存在下で腫瘍細胞を透過性にするPhD1AまたはrTPP3の能力を評価するために、PI取り込みフローサイトメトリーアッセイを実施例2に記載のように用いたが、下記の変更を加えた：4x10⁵/mL U937細胞を、ウシ胎仔血清 (FCS) 存在下でその濃度を増加させて (0-40%)、10 μ M PhD1AまたはrTPP3とともに60分間インキュベートした後、2 μ g/mL PIを添加した。その後PI⁺細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって測定した。

【0224】

実施例10：結果

PhD1AおよびrTPP3はいずれも血清存在下でU937細胞を透過性にする能力を、活性は低下するものの保持していた。PhD1Aに関して、0% FCSでは90% PI⁺細胞であるのに対して、40% FCS存在下では40% PI⁺細胞が検出された (図11A)。組換えTPP3は、5-40% FCSの存在下で最大70%の活性を保持することで示されるように、血清存在下でPhD1Aより強い活性を示すと思われた (図11B)。0% FCSでPI陽性細胞レベルが高いのは、血清がまったく存在しないことの結果である点に留意すべきである。

【実施例 11】

【0225】

in vitroでのヒト腫瘍細胞の透過化に及ぼす天然型タバコ (*Nicotiana suaveolens*) ディフェンシンNsD1、NsD2、およびNsD3の影響

実施例 11：序論

ナス科の他のクラスIIディフェンシンもNaD1と同様に哺乳類腫瘍細胞を透過化することができるかどうか、ならびに他のクラスIディフェンシンはできないかどうかをさらに調べるために、*Nicotiana suaveolens*クラスIIディフェンシンNsD1およびNsD2、またはクラ

スIディフェンシンNsD3の、U937細胞を透過性にする能力を、2つのアプローチによって、NaD1と比較して評価した。第1のアプローチは、バイオルミネッセンスアッセイを用いて、細胞内ATPの放出を測定した。 4×10^4 U937を $10 \mu\text{M}$ の各ディフェンシンで処理し、562 nmで吸光度を測定することにより、ATP放出を30秒間隔で全体として30分間測定した。第2のアプローチは、細胞を $10 \mu\text{M}$ の各ディフェンシンで30分間処理した後、フローサイトメトリーを用いて、U937 ($4 \times 10^5/\text{mL}$) による蛍光色素ヨウ化プロピジウム (PI) ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) の取り込みを測定した。

【0226】

実施例 1 1 : 結果

U937細胞は、天然型NsD1およびNsD2で処理すると、時間依存性および濃度依存性のATP放出を示した (図12A)。NaD1と同様に、ATPは、NsD1およびNsD2に暴露するとほとんどすぐに細胞から放出された。これとは対照的に、天然型NsD3は、細胞のみの対照と比較して、ATPの放出をもたらさなかった (図12A)。NsD1およびNsD2による腫瘍細胞透過化を、NsD3と対比してさらに調べるために、U937細胞を $10 \mu\text{M}$ の各ディフェンシンで37℃にて30分間処理した後、PI取り込みをフローサイトメトリーで測定した。NsD1およびNsD2はNaD1と同レベルで、U937細胞によるPIの取り込みをもたらした ($10 \mu\text{M}$ で約60% PI⁺) のに対して、NsD3は低いPI取り込みしかもたらさなかった ($10 \mu\text{M}$ で約10% PI⁺) (図12B)。

【実施例 1 2】

【0227】

赤血球溶解に及ぼすナス科クラスIIディフェンシンの影響

実施例 1 2 : 序論

NaD1がヒト赤血球 (RBC) を溶解する能力のないことが、他のナス科クラスIIディフェンシンにも保存されているかどうかを判定するために、 10^7 RBCを $10 \mu\text{M}$ または $30 \mu\text{M}$ の各ディフェンシンとともに37℃にて16時間インキュベートし、412 nm吸光度測定でヘモグロビン放出を測定することによって、天然型NsD1、NsD2およびPhD1AのPBC溶解能力を調べた。

【0228】

実施例 1 2 : 結果

NsD1およびPhD1Aはともに $10 \mu\text{M}$ および $30 \mu\text{M}$ で、PBCのみの対照と比較してPBCの溶解に影響を及ぼさなかった。それに比べて、NsD2は $10 \mu\text{M}$ および $30 \mu\text{M}$ で、低い溶血作用を示した (それぞれ約17%溶解、および約23%溶解) (図13)。

【実施例 1 3】

【0229】

ナス科クラスIおよびIIディフェンシンの細胞脂質結合特性

実施例 1 3 : 序論

EchelonTM PIPストリップを用いた固体脂質結合アッセイで、ナス科クラスIおよびクラスIIディフェンシンと細胞脂質との相互作用をさらに調べた。クラスIディフェンシンNsD3、またはクラスIIディフェンシンNsD1、NsD2、PhD1A、およびrTPP3 ($0.12 \mu\text{M}$) を脂質ストリップとともに4℃にて一晩インキュベートし、NaD2もしくはNaD1に対する特異的ウサギポリクローナル抗体 (これらの抗体はそれぞれクラスIもしくはクラスIIディフェンシンと交差反応する)、続いてHRP標識ロバ抗ウサギ抗体を用いて、結合を検出した。ディフェンシン結合は、発色した脂質ストリップのデンストメトリーによって定量した。

【0230】

実施例 1 3 : 結果

NaD1について説明したように、概してクラスIIディフェンシンはすべて、ホスホイノシチドPtdIns(PIP2)および(PIP3)、たとえばPtdIns(3,4)P2、PtdIns(3,5)P2、PtdIns(4,5)P2、およびPtdIns(3,4,5)P3などともっとも強く結合したが、PtdIns(PIP)、たとえばPtdIns(3)P、PtdIns(4)P、およびPtdIns(5)Pなどとの結合も示した (図14A、14B、14C、および14D)。例外はPhD1Aであって、これはホスファチジン酸とも強く結合した (図14E)。クラスIディフェンシンNsD3も細胞脂質と結合することが判明したが、特異性はクラスIIデ

ィフェンシンの特異性と明確に異なっていた。クラスIIディフェンシン (PhD1Aを除く) とは対照的に、NsD3はホスファチジン酸に対して強い結合を示し、PtdIns(PIP)、(PIP2)、および(PIP3)に対して弱い結合を示した (図14E)。まとめると、これらのデータは、ナス科クラスIおよびクラスIIディフェンシンが、重なり合うが異なる特異性で細胞リン脂質と結合するものであって、クラスIディフェンシンはホスファチジン酸と優先的に結合し、クラスIIディフェンシンはPtdIns (PIP)、(PIP2)、および(PIP3)と結合することを示唆する (図7G)。

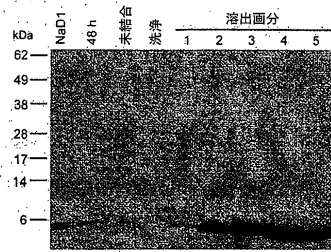
【 0 2 3 1 】

参考文献

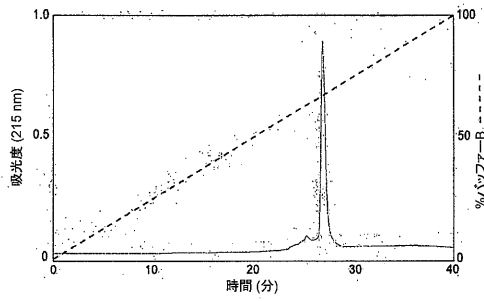
- Aluru et al. (1999) *Plant Physiol* 120: 633 10
- Anaya-Lopez et al. (2006) *Biotechnol Lett* 28: 1101-8.
- Baker et al. (2005) *Methods Enzymol* 398: 540-554
- Bensch et al. (1995) *FEBS Lett* 368:331-335
- Bloch et al. (1991) *FEBS Lett* 279: 101-104
- Bohlmann (1994) *Crit Rev Plant Sci* 13: 1-16
- Bohlmann and Apel (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 227-240
- Bonmatin et al. (1992) *J Biomol NMR* 2: 235-256
- Brandstadter et al. (1996) *Mol Gen Genet* 252: 146-154
- Broekaert et al. (1992) *Biochemistry* 32: 4308-4314
- Broekaert et al. (1995) *Plant Physiol* 108: 1353-1358 20
- Broekaert et al. (1997) *Crit Rev Plant Sci* 16: 297-323
- Bruix et al. (1993) *Biochemistry* 32: 715-724
- Cammue et al. (1992) *J Biol Chem* 267: 2228-2233
- Catanzariti et al. (2004) *Protein Sci* 13: 1331-1339
- Chen et al. (2002) *J Agric Food Chem* 50: 7258-63
- Colilla et al. (1990) *FEBS Lett* 270: 191-4
- Cornet et al., (1995) *Structure* 3: 435-448
- Craik et al. (1999) *J Mol Biol* 294: 1327-1336
- Craik (2001) *Toxicon* 39: 1809-1813
- Craik et al. (2004) *Curr Prot Pept Sci* 5: 297-315 30
- Da Silva et al. (2003) *Protein Sci* 12: 438-446
- de Zelicourt et al. (2007) *Planta* 226: 591-600
- Diamond et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5156-5160
- Fehlbaum et al. (1994) *J Biol Chem* 269: 33159-33163
- Ganz et al. (1985) *J Clin Invest* 76: 1427-1435
- Gu et al. (1992) *Mol Gen Genet* 234: 89-96
- Gustafson et al. (1994) *J Am Chem Soc* 116: 9337-9338
- Hancock and Lehrer (1998) *Trends Biotech* 16: 82-88
- Hanzawa et al. (1990) *FEBS Lett* 269: 413-420
- Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 40
- Harwig et al. (1992) *Blood* 79: 1532-1537
- Janssen et al. (2003) *Biochemistry* 42: 8214-8222
- Jennings et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98: 10614-10619
- Kader (1996) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 627-654
- Kader (1997) *Trends Plant Sci* 2: 66-70
- Komori et al. (1997) *Plant Physiol* 115: 314
- Kushmerick et al. (1998) *FEBS Lett* 440: 302-306
- Lamberty et al. (1999) *J Biol Chem* 274: 9320-9326
- Lamberty et al. (2001) *Biochemistry* 40: 11995-12003 50

- Landon et al. (1997) *Protein Sci* 6: 1878-1884
- Lay and Anderson (2005) *Curr Protein Pept Sci* 6: 85-101
- Lay et al. (2003a) *Plant Physiol* 131: 1283-1293
- Lay et al. (2003b) *J Mol Biol* 325: 175-188
- Lehrer and Ganz (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 96-102
- Lin et al. (2009) *Biosci Rep* 30: 101-109
- Lobo et al. (2007) *Biochemistry* 46: 987-96
- Loenza-Angeles et al. (2008) 30: 1713-1719
- Ma et al. (2009) *Peptides* 30: 2089-2094
- Mader and Hoskin (2006) *Expert Opin Investig Drugs* 15: 933-46. Review 10
- Marcus et al. (1997) *Eur J Biochem* 244: 743-749
- McManus et al. (1999) *J Mol Biol* 293: 629-638
- Melo et al. (2002) *Proteins* 48: 311-319
- Mendez et al. (1990) *Eur J Biochem* 194: 533-539
- Mendez et al. (1996) *Eur J Biochem* 239: 67-73
- Milligan et al. (1995) *Plant Mol Biol* 28: 691-711
- Mirouze et al. (2006) *Plant J* 47: 329-342
- Moreno et al. (1994) *Eur J Biochem* 223: 135-139
- Ngai and Ng (2005) *Biochem Cell Biol* 83: 212-20
- Osborn et al. (1995) *FEBS Lett* 368: 257-262 20
- Patel et al. (1998) *Biochemistry* 37: 983-990
- Pelegrini and Franco (2005) *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2239-53
- Ramamoorthy et al. (2007) *Mol Microbiol* 66: 771-786
- Russell et al. (1996) *Infect Immun* 64: 1565-1568
- Segura et al. (1998) *FEBS Lett* 435: 159-162
- Selsted et al. (1985) *J Clin Invest* 76: 1436-1439
- Selsted et al. (1993) *J Biol Chem* 268: 6641-6648
- Tailor et al. (1997) *J Biol Chem* 272: 24480-24487
- Tam et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96: 8913-8918
- Tang and Selsted (1993) *J Biol Chem* 268: 6649-6653 30
- Tang et al. (1999a) *Science* 286: 498-502
- Tang et al. (1999b) *Infect Immun* 67: 6139-6144
- Tarver et al. (1998) *Infect Immun* 66: 1045-1056
- Terras et al. (1992) *J Biol Chem* 267: 15301-15309
- Terras et al. (1993) *FEBS Lett* 316: 233-240
- Terras et al. (1995) *Plant Cell* 7: 573-588
- Thomma et al. (2003) *Curr Drug Targets - Infect. Dis.* 3: 1-8
- Trabi et al. (2001) *Biochemistry* 40: 4211-4221
- van der Weerden (2008) *J Biol Chem* 283: 14445-14452
- Wijaya et al. (2000) *Plant Sci* 159: 243-255 40
- Wong and Ng (2005) *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1626-32
- Yamada et al. (1997) *Plant Physiol* 115: 314
- Zhang and Lewis (1997) *FEMS Microbiol Lett* 149: 59-64
- Zhang et al. (1997) *Cereal Chem* 74: 119-122

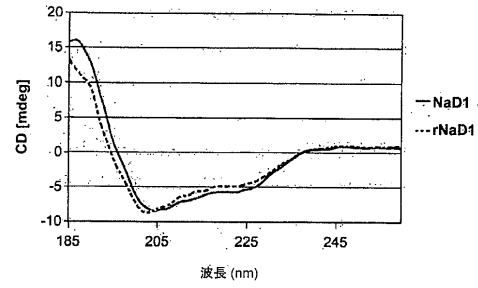
【図 1 A】



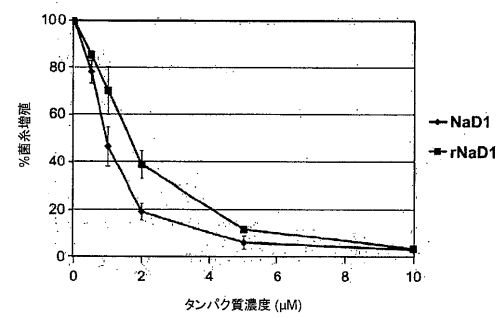
【図 1 B】



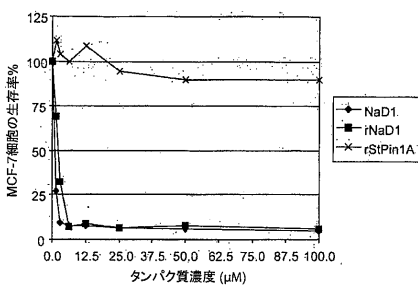
【図 1 C】



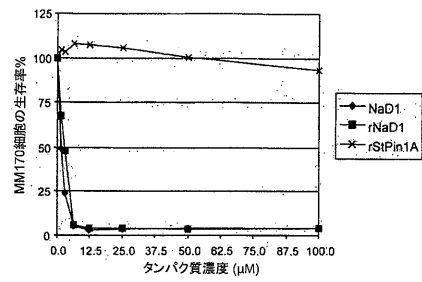
【図 1 D】



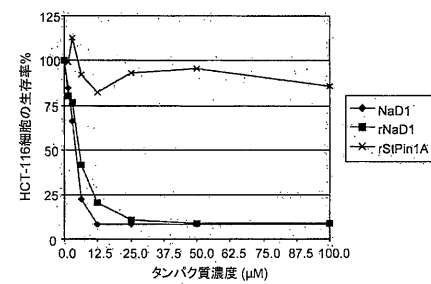
【図 2 A】



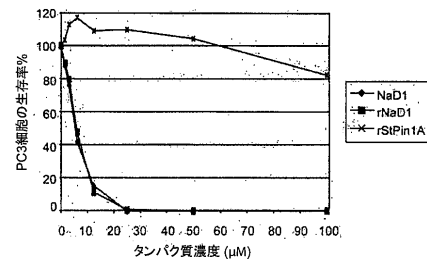
【図 2 C】



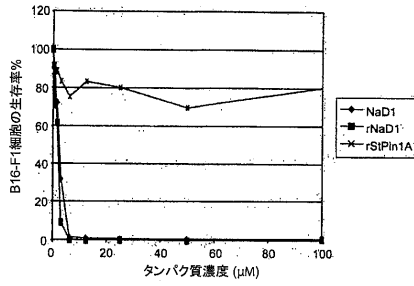
【図 2 B】



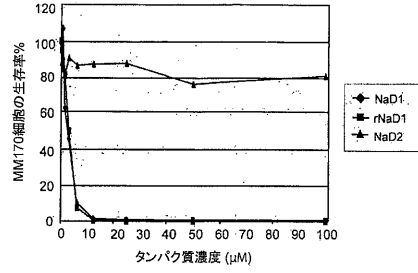
【図 2 D】



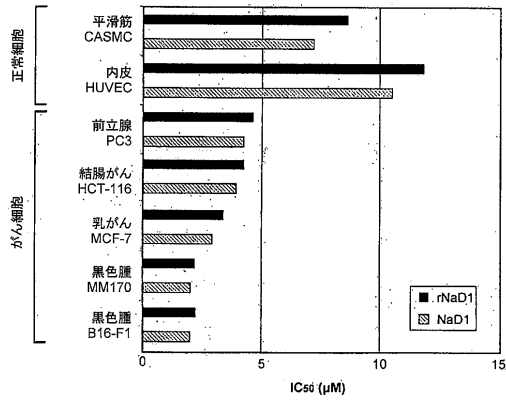
【図 2 E】



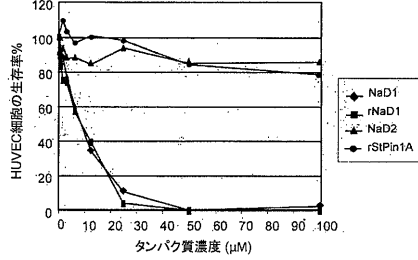
【図 2 G】



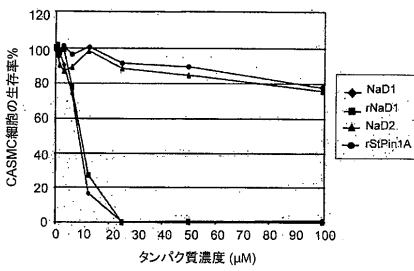
【図 2 F】



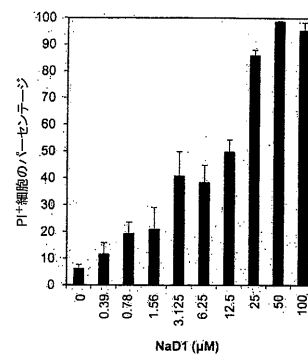
【図 2 H】



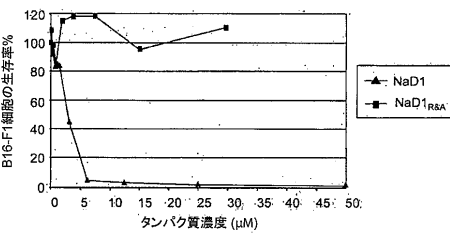
【図 2 I】



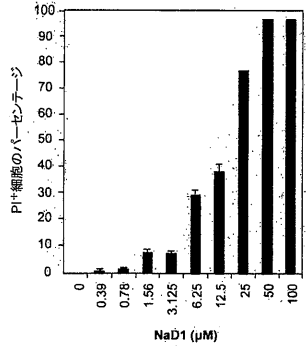
【図 3 A】



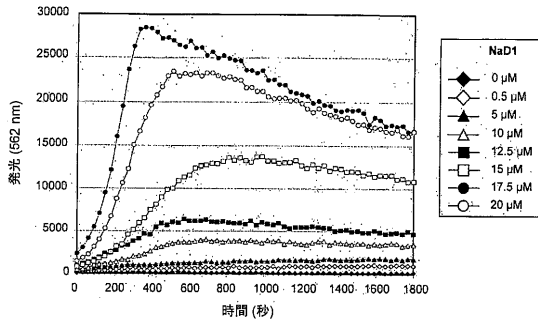
【図 2 J】



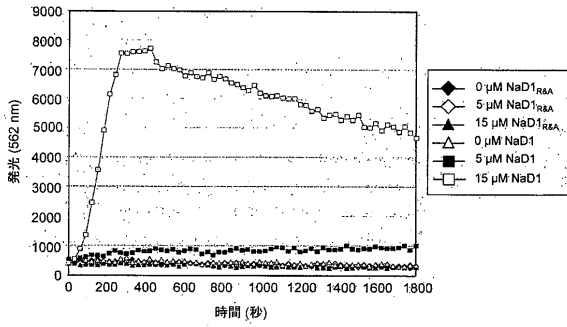
【図 3 B】



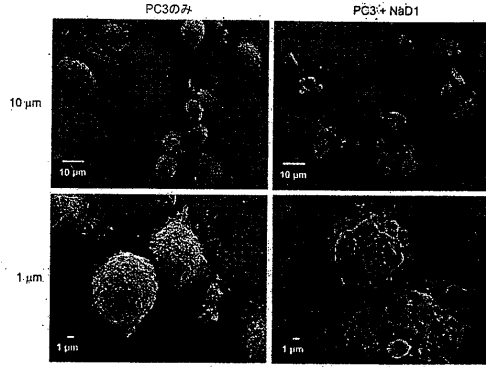
【図 3 C】



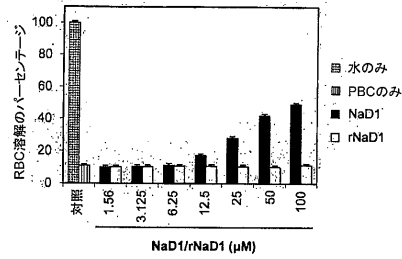
【図 3 D】



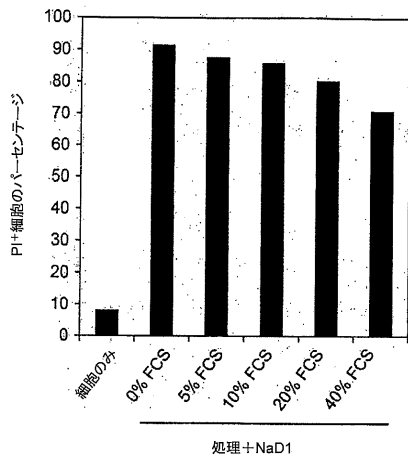
【図 3 E】



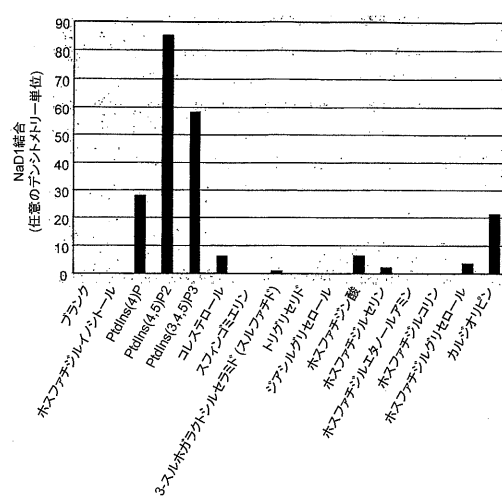
【図 4】



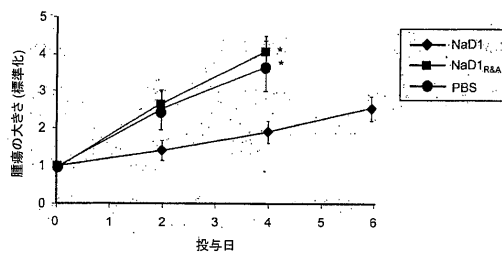
【図 5】



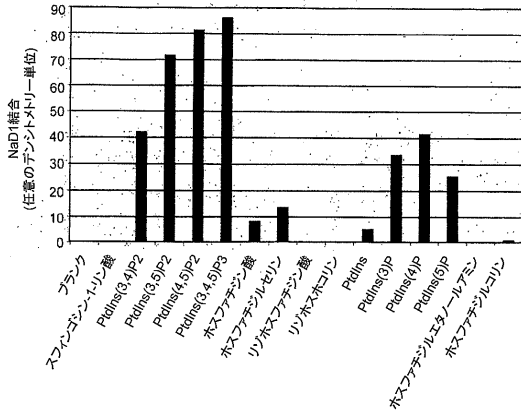
【図 7 A】



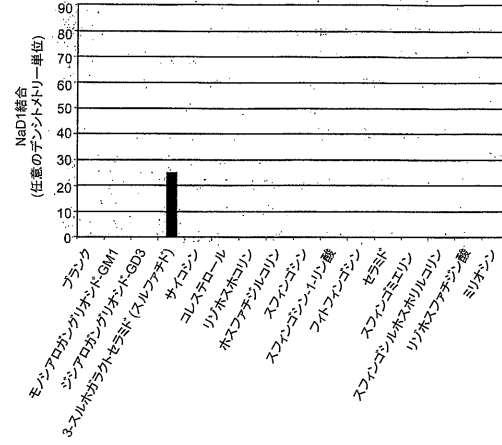
【図 6】



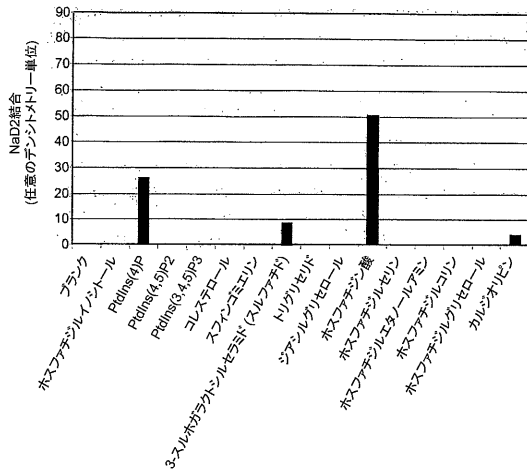
【図 7 B】



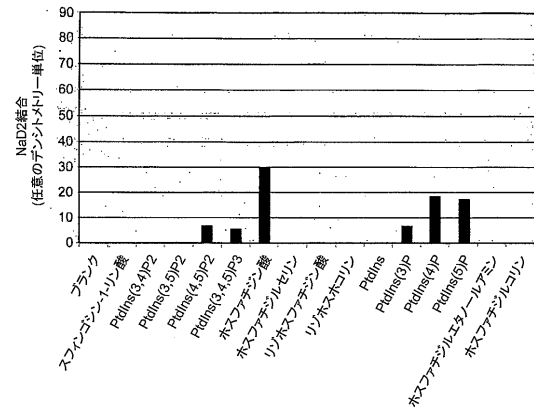
【図 7 C】



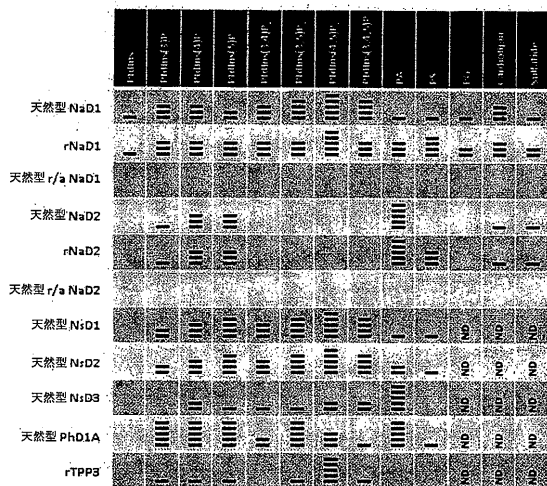
【図 7 D】



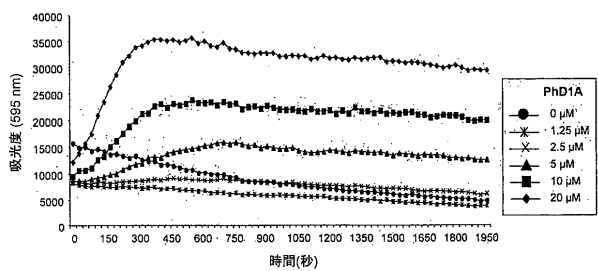
【図 7 E】



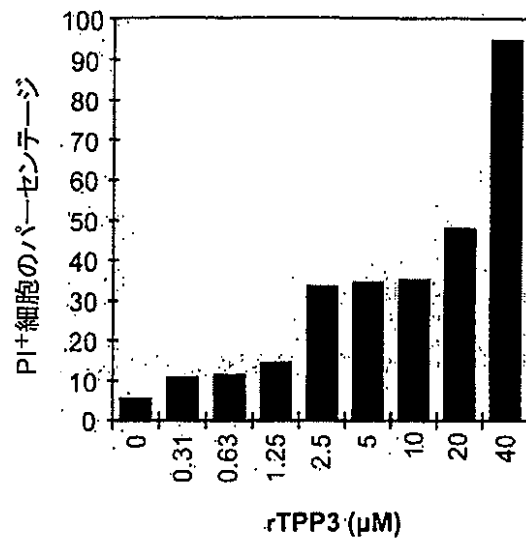
【 図 7 G 】



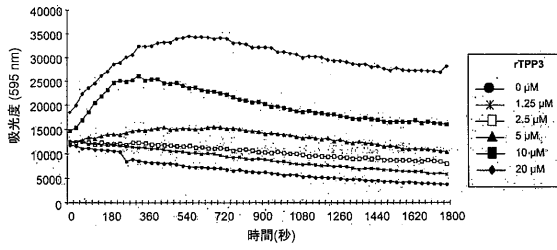
【 図 9 B 】



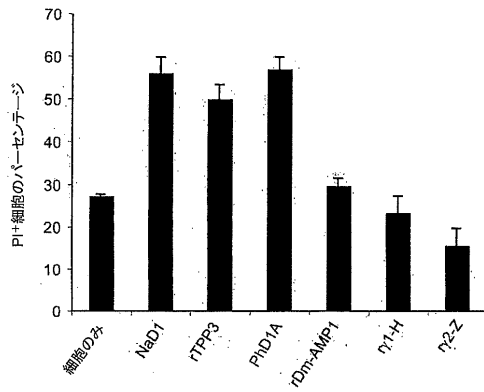
【 図 9 C 】



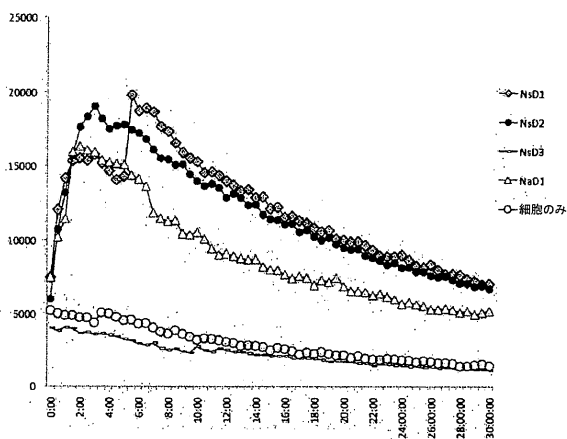
【図 9 D】



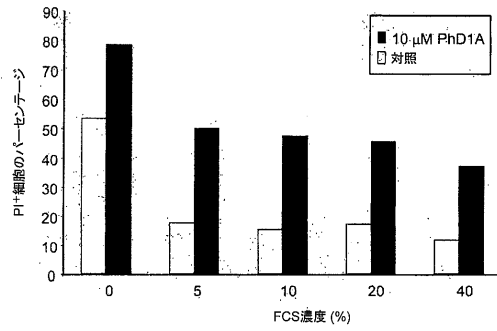
【図 10】



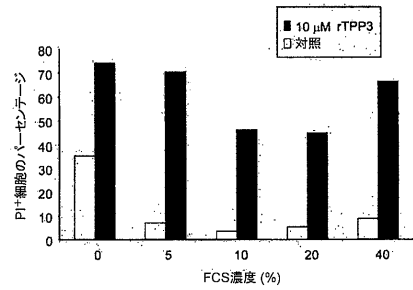
【図 12 A】



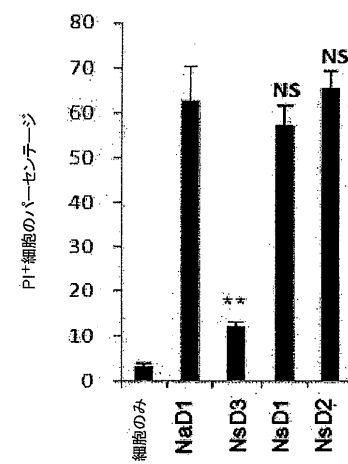
【図 11 A】



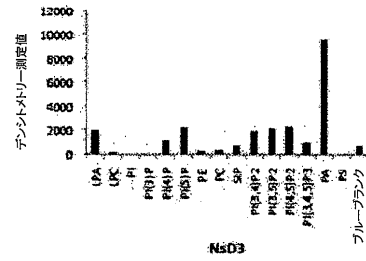
【図 11 B】



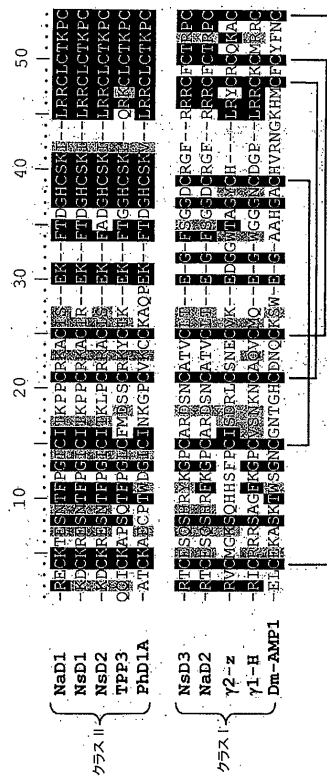
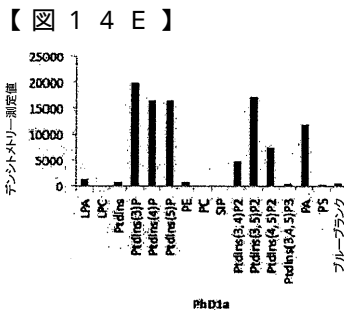
【図 12 B】



【 図 1 4 C 】



【 図 1 5 】



【配列表】

2013530965000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年5月10日(2013.5.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

増殖性疾患を予防または治療するための医薬組成物であって、その医薬組成物が治療上有効な量の：

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
- (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
- (c) 前記核酸を含有するベクター；
- (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；または
- (e) 前記ベクターによって産生される発現産物；

を、製薬上許容される担体、賦形剤、もしくは添加剤とともに含む、前記医薬組成物。

【請求項2】

植物ディフェンシンがニコチアナ属種(Nicotiana spp.)、ペチュニア属種(Petunia spp.)、またはナス属種(Solanum spp.)に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記植物ディフェンシンがハナタバコ(Nicotiana glauca)、ニコチアナ・スアベオレンス(Nicotiana suaveolens)、ペチュニア(Petunia hybrida)またはトマト(Solanum lycopersicum)に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記植物ディフェンシンがNaD1、NsD1、NsD2、PhD1A、およびTPP3からなる群から選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記植物ディフェンシンが、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、もしくは配列番号26、またはそれらの機能的断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記植物ディフェンシンが、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、もしくは配列番号27、またはそれらの機能的断片もしくは相補的な配列からなる群から選択される核酸配列、または前記核酸配列のいずれかに対して70%同一性を有する機能的核酸配列によってコードされる、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項7】

増殖性疾患ががんである、請求項1～6のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【請求項8】

がんが、基底細胞がん、骨肉腫、大腸がん、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、白血病、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、または甲状腺がんからなる群から選択される、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

増殖性疾患を予防または治療するための医薬の調製における

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；または
 - (e) 前記ベクターによって産生される発現産物；
- の使用。

【請求項 10】

植物ディフェンシンがニコチアナ属種 (Nicotiana spp.)、ペチュニア属種 (Petunia spp.)、またはナス属種 (Solanum spp.) に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記植物ディフェンシンがハナタバコ (Nicotiana glauca)、ニコチアナ・スアベオレンス (Nicotiana suaveolens)、ペチュニア (Petunia hybrida) またはトマト (Solanum lycopersicum) に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 12】

前記植物ディフェンシンがNaD1、NsD1、NsD2、PhD1A、およびTPP3からなる群から選択される、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 13】

前記植物ディフェンシンが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、もしくは配列番号 26、またはそれらの機能的断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 14】

前記植物ディフェンシンが、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、もしくは配列番号 27、またはそれらの機能的断片もしくは相補的な配列からなる群から選択される核酸配列、または前記核酸配列のいずれかに対して70%同一性を有する機能的核酸配列によってコードされる、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 15】

増殖性疾患ががんである、請求項 9 ~ 14 のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 16】

がんが、基底細胞がん、骨肉腫、大腸がん、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、白血病、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、または甲状腺がんからなる群から選択される、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

増殖性疾患を予防または治療するためのキットであって、そのキットが治療上有効な量の：

- (a) ナス科クラスII植物ディフェンシン；
 - (b) ナス科クラスII植物ディフェンシンをコードする核酸；
 - (c) 前記核酸を含有するベクター；
 - (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；
 - (e) 前記ベクターによって産生される発現産物；または
 - (f) 前記植物ディフェンシン、核酸、ベクター、宿主細胞、もしくは発現産物を、製薬上許容される担体、賦形剤、もしくは添加剤とともに含有する医薬組成物；
- を含んでなる、前記キット。

【請求項 18】

植物ディフェンシンがニコチアナ属種 (Nicotiana spp.)、ペチュニア属種 (Petunia spp.)、またはナス属種 (Solanum spp.) に由来し、またはそれらから得ることができる

、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

前記植物ディフェンシンがハナタバコ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ペチュニア (*Petunia hybrida*) またはトマト (*Solanum lycopersicum*) に由来し、またはそれらから得ることができる、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 20】

前記植物ディフェンシンが NaD1、NsD1、NsD2、PhD1A、および TPP3 からなる群から選択される、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 21】

前記植物ディフェンシンが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、もしくは配列番号 26、またはそれらの機能的断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 22】

前記植物ディフェンシンが、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、もしくは配列番号 27、またはそれらの機能的断片もしくは相補的な配列からなる群から選択される核酸配列、または前記核酸配列のいずれかに対して 70% 同一性を有する機能的核酸配列によってコードされる、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 23】

増殖性疾患ががんである、請求項 17 ~ 22 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 24】

がんが、基底細胞がん、骨肉腫、大腸がん、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、白血病、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、または甲状腺がんからなる群から選択される、請求項 23 に記載のキット。

【請求項 25】

増殖性疾患を予防または治療するための、ナス科クラス II 植物ディフェンシン。

【請求項 26】

増殖性疾患を予防または治療するためのナス科クラス II 植物ディフェンシンをコードする核酸。

【請求項 27】

増殖性疾患を予防または治療するためのナス科クラス II 植物ディフェンシンをコードする核酸を含むベクター。

【請求項 28】

増殖性疾患を予防または治療するためのナス科クラス II 植物ディフェンシンをコードする核酸を含むベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 29】

増殖性疾患を予防または治療するためのナス科クラス II 植物ディフェンシンをコードする核酸を含むベクターにより産生される発現産物。

【請求項 30】

ナス科クラス II 植物ディフェンシンの哺乳類腫瘍細胞に対する細胞毒性についてスクリーニングするための方法であって、その方法が、

- (a) ナス科クラス II 植物ディフェンシン；
- (b) ナス科クラス II 植物ディフェンシンをコードする核酸；
- (c) 前記核酸を含有するベクター；
- (d) 前記ベクターを含有する宿主細胞；または
- (e) 前記ベクターによって産生される発現産物；

を、哺乳類細胞株とともにインキュベートすること、ならびに植物ディフェンシンとの接

触に起因する哺乳類細胞株に対する細胞毒性についてアッセイすることを含み、それによって、ナス科クラスII植物ディフェンシンの哺乳類腫瘍細胞に対する細胞毒性についてスクリーニングする、前記方法。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載の方法でスクリーニングされたナス科クラスII植物ディフェンシン。

【請求項 3 2】

溶血作用の低下したナス科クラスII植物ディフェンシンを作製するための方法であって、その方法が少なくとも1つのアラニン残基を、植物ディフェンシンのN末端もしくはその近傍に導入することを含む、前記方法。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の方法により作製された、溶血作用の低下したナス科クラスII植物ディフェンシン。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2011/000760
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. A61K 38/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
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) GenomeQuest (SEQ ID Nos 1-2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26), EPODOC, Medline, WPIDs, Indian Traditional Knowledge Digital Library: defensin, γ-thionin, solance, nightshade, potato family, datura, mandragora, belladonna, lyceum barbarum, physalis, capsicum, solanum, petunia, nicotine, nicotiana, capsaicin, tomatine, peisundai, kasikathiri, cockroach berry, nightshade, fellenwort, tomato weed, trompillo, horsenettle, potatotree, chundai, aanai sundai, molakkai, kandal, kuttuchadikkand, vattargi, kari, brinjal, baigan, eggplant, kaliliyam, achatti, koyampatti, pandagi, piragadi, varitagam, vangam, valudunai, devils fig, terongan, kasikathari, pugaiyilai, tobacco, tambaaku, proliferate, cancer, tumour, neoplasm		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANAYA-LOPEZ, J.L. 'Fungicidal and cytotoxic activity of a <i>Capsicum chinense</i> defensin expressed by endothelial cells'. Biotechnol Lett. 2006. 28: 1101-1108 See abstract, pages 1104, 1107	1-2, 4-9, 11-16, 18-26
X	WO 2002/063011 A1 (HEXIMA LTD) 15 August 2002 See whole document, SEQ ID NOS: 7, 13, 21 and 51	26, 28
X	LAY, F.T. and ANDERSON, M.A. 'Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants'. Current Protein and Peptide Science. 2005. 6: 85-101 See whole document	26, 28
<input 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 02 August 2011		Date of mailing of the international search report 08 August 2011
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer SUZANNE PIETERSZ AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. : +61 2 6225 6152

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2011/000760

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 29
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The claim does not comply with Rule 6.2(a) because it relies on references to any one or more of the Examples in the description.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2011/000760

This Annex lists the known "A" publication level 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.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO 02063011	CA	2437606	CN	1496403	CN 101029308
	EP	1366168	NZ	523345	US 2003217382
	US	7041877	US	2005150004	US 7297840
	US	2006156433	US	7544861	US 2006150276
	US	2009069545	US	2010218280	
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 21/00 (2006.01)		A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)		A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)		A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)		A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)		A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 5/00 (2006.01)		A 6 1 P 5/00	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)		A 6 1 K 35/12	
C 0 7 K 14/415 (2006.01)		C 0 7 K 14/415 Z N A	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, 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, I D, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 ハレット, マーク ダレン

オーストラリア国 3 0 9 5 ヴィクトリア, エルサム, ネイサン ロード 1 3

(72)発明者 ブーン, アイヴァン, カ ホ

アメリカ合衆国 2 2 9 0 3 - 5 4 1 2 バージニア州, シャーロットツビル, アpartment 2
ペイトン コート 2 8 5

(72)発明者 アンダーソン, マリリン アン

オーストラリア国 3 0 3 6 ヴィクトリア, キーラー, ガーデン アベニュー 2 5

F ターム(参考) 4B063 QA05 QQ79 QR77 QS24 QX01

4C084 AA02 AA13 BA44 DC50 NA14 ZA591 ZA661 ZA751 ZA811 ZA891
ZA941 ZA961 ZB021 ZB261 ZB271

4C086 AA01 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZA02 ZA59 ZA66
ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB26 ZB27

4C087 AA01 CA04 NA14 ZA02 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94
ZA96 ZB26 ZB27

4C088 AB48 AB49 BA16 NA14 ZA02 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89
ZA94 ZA96 ZB26 ZB27

4H045 AA10 BA05 BA19 BA20 CA30 EA28 EA51 FA74