

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-515678
(P2025-515678A)

(43)公表日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/415 (2006.01)	C 0 7 K	14/415	Z N A	4 B 0 1 8
A 2 3 L	33/105 (2016.01)	A 2 3 L	33/105		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 H 0 1 1
A 0 1 H	5/00 (2018.01)	A 0 1 H	5/00	A	4 H 0 4 5
A 0 1 H	5/10 (2018.01)	A 0 1 H	5/10		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全34頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2024-565369(P2024-565369)	(71)出願人	524407152		
(86)(22)出願日	令和5年5月10日(2023.5.10)		カボス ナチュラルズ エヌバイ		
(85)翻訳文提出日	令和6年12月18日(2024.12.18)		CABOSSE NATURALS NV		
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/062398		ベルギー国 1 5 0 0 ハレ ブリュッセ		
(87)国際公開番号	WO2023/217848		ルセステーンヴェーク 4 5 0		
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)	(74)代理人	100147485		
(31)優先権主張番号	22172627.6		弁理士 杉村 憲司		
(32)優先日	令和4年5月10日(2022.5.10)	(74)代理人	230118913		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁護士 杉村 光嗣		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100119079		
	最終頁に続く		弁理士 伊藤 佐保子		
		(72)発明者	ガビ コップ		
			ベルギー国 1 5 0 0 ハレ ブリュッセ		
			ルセステーンヴェーク 4 5 0		
		(72)発明者	ヘルウィグ ベルナエルト		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 抗菌活性を有するペプチド

(57)【要約】
本発明はペプチドを対象とし、ここで、前記ペプチドは、SEQ ID NO. 1によるアミノ酸配列を有する。本発明はまた、前記ペプチドを含む組成物および特定の用途を開示する。
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO. 1と95%以上の配列同一性を示す配列、またはSEQ ID NO. 1と最大で3つのアミノ酸が異なる配列を有する、ペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドはSEQ ID NO. 1による配列を有する、請求項 1に記載のペプチド。

【請求項 3】

前記ペプチドは、そのN末端にシグナルペプチドを含む、請求項 1または2に記載のペプチド。

【請求項 4】

前記シグナルペプチドは、SEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示す配列、またはSEQ ID NO. 2による配列を有する、請求項 1～3のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 5】

前記ペプチドは抗細菌活性および／または抗真菌活性を有する、請求項 1～4のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 6】

前記活性はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する活性であるか、ならびに／または真菌に対する活性であり、前記真菌は好ましくは菌糸真菌(hyphal fungi)および酵母である、請求項 1～5のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 7】

前記ペプチドは、テオブロマカカオ由来またはテオブロマカカオから単離されたペプチド、好ましくはテオブロマカカオ種CCN-51由来またはテオブロマカカオ種CCN-51から単離されたペプチドである、請求項 1～6のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 8】

前記ペプチドは、リコンビナントペプチドまたは合成ペプチドである、請求項 1～7のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 9】

前記ペプチドはアフィニティタグを備える、請求項 1～8のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 10】

請求項 1～9のいずれか一項に記載のペプチドおよび賦形剤を含む、組成物。

【請求項 11】

前記組成物は液体、半固体、固体、もしくはガス状の組成物であり、および／または前記組成物は、剤形が、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、エアロゾル、ペースト、シロップ、懸濁液、乳濁液、もしくは溶液である、請求項 10に記載の組成物。

【請求項 12】

治療用のペプチドまたは組成物であって、請求項 1～9のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項 10もしくは11に記載の組成物。

【請求項 13】

細菌感染症および／または真菌感染症の治療を必要とする対象において使用するペプチドまたは組成物であって、請求項 1～9のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項 10もしくは11に記載の組成物。

【請求項 14】

前記対象はヒトまたは動物である、請求項 12～13に記載のペプチド。

【請求項 15】

請求項 1～9のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項 10もしくは11に記載の組成物の、作物保護における飼料添加物もしくは食品添加物としての使用、防腐剤としての使用、除染剤としての使用、または化粧用途における使用。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記ペプチドまたは組成物は、植物における病原体の防除に使用されるペプチドまたは組成物であって、前記植物は好ましくは作物である、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

前記病原体は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または真菌の群から選択される、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のペプチドを得る方法であって、前記ペプチドはリコンビナントペプチドまたは合成ペプチドである、方法。

【請求項 19】

SEQ ID NO. 1 による配列を有するペプチドのコード配列を含むベクターであって、任意に、N 末端にシグナルペプチドの配列を含むベクターにおいて、前記シグナルペプチドの配列は SEQ ID NO. 2 と 95 % 以上の配列同一性を有し、前記ベクターは発現系における前記ペプチドの発現を可能にするように設計されている、ベクター。

【請求項 20】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のペプチドを発現する、トランスジェニック植物。

【請求項 21】

請求項 20 に記載のトランスジェニック植物を生産する方法であって、前記方法は、前記ペプチドをエンコードする核酸を植物細胞に導入することにより、前記ペプチドを発現する形質転換植物細胞を作製し、前記形質転換植物細胞をトランスジェニック植物に再生する工程を含む、方法。

【請求項 22】

請求項 1～11 のいずれか一項に記載のペプチドまたは組成物によりコーティングされた、植物の種子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、種々の細菌株および真菌株に対して抗菌活性を示す抗菌ペプチド、より詳細には天然植物由来ペプチドの技術分野に関連する。特に、本発明は、植物ピシリンタンパク質由来の天然ペプチド、リコンビナントペプチド、または合成ペプチドに関する。本発明は、さらに、植物、動物、およびヒトにおける細菌感染および真菌感染の治療のためのペプチドの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

抗生物質耐性菌は、食品業界、農業業界、医療業、獣医療等が直面する重大な問題である。特に、潜在的に致死的な抗生物質耐性菌が食用動物からヒト消費者へ移行する可能性が懸念されている。

【0003】

抗生物質耐性菌の発生および蔓延を防除するために現在行われている方法としては、抗生物質の使用量および異なる抗生物質の使用形態の変更、政府による監視および規制の強化、ならびに新規または改良された抗生物質の継続的な開発等がある。しかし、ほとんどの細菌は、抗生物質の使用に適応し、既存の抗生物質および新しい抗生物質に対する耐性を獲得する能力があるために、多くの場合、このような従来の手段を超越する。そのため、細菌における抗生物質耐性を制御するための代替手段を継続して開発する必要がある。

【0004】

抗菌ペプチド (AMPs) は、動物、植物、昆虫、および微生物中に存在する多様な天然化合物群である。これらのペプチドは、(他の) 微生物に対する防御を担っており、そのため、化学防腐剤の代替品としてさらに利用することができる。しかし、これらのペプチドは、自然界における入手性が乏しく、生産コストが高いこと、安定性が低いこと、および適切な治療製品への配合が複雑であることから、植物、ヒト、および／または動物の

10

20

30

40

50

微生物蔓延治療における使用は今日まで限定されている。したがって、作物保護における抗菌ペプチドの使用ならびにヒトおよび獣医学における治療目的での使用も、まだ限られている。

【0005】

抗菌タンパク質は、様々な三次元構造を呈し、当該三次元構造により、抗菌タンパク質の活性および安定性の大部分が決定される。特定のタンパク質の安定性は、通常、臨床応用および／または工業への応用において重要なパラメータである。

【0006】

AMPである植物由来分子への最初の関心は、最初の植物由来AMPであるプロチオニンの単離に続いた。Caleyらによる、Appl. Microbiol, 1972, 23(5) 998-1000によれば、小麦と大麦粉の低分子タンパク質であるプロチオニンが、*Pseudomonas solanacearum*、*Xanthomonas phaseoli*および*X. campestris*、*Erwinia amylovora*、ならびに5つの*Corynebacterium*株等の多くの植物病原性細菌に有効なAMPであることが報告されている。以来、チオニン（I-V型）、ディフェンシン、シクロチド、2Sアルブミン様タンパク質、脂質転移タンパク質等、いくつかの主要なAMP群が発見された。

【0007】

植物ビシリンは、植物種子貯蔵タンパク質の一種として一般的に存在する。あるビシリンを加工することにより、植物防御ペプチドを生成できることがわかっている。ビシリンから産生される抗菌ペプチドとして最も特徴的なものは、*Macadamia integrifolia*である。マカダミアナッツの核種には666アミノ酸（aa）ビシリンタンパク質があり、このビシリンタンパク質はN末端のシグナル配列に近接した212aa高親水性領域を含む。

【0008】

国際公開第1998/027805号明細書には、抗菌特性を有するビシリン型ペプチドファミリーが開示されている。タンパク質の原型は天然由来で、*Macadamia integrifolia*から単離され、テオブロマカカオ（*Theobroma cacao*）を含む他の種からも単離される。特に、47-aa TcAMP1（テオブロマカカオ抗菌タンパク質1）および60-aa TcAMP2（テオブロマカカオ抗菌タンパク質2）として示された2つの配列は、556-aaをエンコードするココアビシリン種子貯蔵タンパク質遺伝子配列に由来し、大腸菌で組換え発現された。しかし、単離されたリコンビナントペプチドおよびそのリコンビナントペプチドで調製した組成物が有効な抗菌特性を有するのは、高用量（5-20 μg/ml）のときであった。

【0009】

MarcusらによるPlant. Mol. Biol Rep (2008) 26, 75-87では、ビシリン種子タンパク質のN近位親水性領域と同定された3つの*Macadamia integrifolia*ペプチド配列と、2つのテオブロマカカオペプチド配列を調査した。ペプチドの抗菌活性はN末端に近接した親水性領域に特徴的なC-X-X-X-C-（10-12）X-C-X-X-X-Cモチーフが存在することに基づいて予測された。推定されたペプチドのHisタグ付きバージョンを大腸菌で発現させた。得られたリコンビナントペプチドは、*in vitro*で6種の植物病原菌株に対して抗菌活性を示したが、有効量は9.2~64 μg/mlと非常に高く、病原体によってはさらに高かった。

【0010】

エクアドルは上品な風味のココアの最も重要な生産国であり、世界の生産量のおよそ50%を占める。エクアドルで生産される上品な風味のココアの種類は、主にNational（しばしばNationalまたはArribaとも言われる）種に属する。エクアドルでは、香り高く伝統的なNational cocoaに加えて、CCN-51というココアクローン（cocoa clone）が1960年代から栽培されている。Nationalとは異なり、CCN-51は芳香が弱いため、バルクココアタイプ（bulk cocoa type）とされている。しかし、CCN-51は気候条件の変化への耐性が高く、様々な病

10

20

30

40

50

原菌への抵抗力があり、他のココア種よりも収穫量が多い。そのため、CCN-51ハイブリッドは、エクアドルの農家の栽培に非常に人気がある。米国特許第2004/0172683号には、ココア豆の種子から得られる、ココア風味の要因となるポリペプチドについて記載されている。

【0011】

本発明は、したがって、広い範囲の動植物の病原性微生物に対して非常に有効で、高い活性のあるココア由来の未知のペプチドについて記載する。このペプチドは安全に使用することができるものであり、毒性を有し、かつ、環境に有害な腐食性化学物質 (aggressive chemicals) を含まないことが好ましい。

【発明の概要】

【0012】

本発明およびその各実施形態は、上述した1つまたは複数のデメリットに対する解決策の提供に貢献する。この目的のため、本発明は、請求項1に記載の抗菌活性を有するペプチドに関する。より具体的には、SEQ ID NO. 1による配列を有するペプチドを提供する。このペプチドは、テオブロマカカオから得られる、または組換えもしくは合成的に産生されるものであり、驚くべきことに、広範な病原体に対して抗細菌活性および／または抗真菌活性を有することが見出された。このペプチドの好ましい実施形態は、請求項2～9のいずれかに示される。

【0013】

第2の態様において、本発明は、請求項10に記載のペプチドを含む組成物に関する。この組成物の好ましい実施形態は、請求項11に示される。

【0014】

第3の態様において、本発明は、請求項12に記載の治療目的のペプチドの使用に関する。この使用における好ましい実施形態は、請求項13～17のいずれかに示される。より詳細には、このペプチドは、ヒト、動物、または植物における、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／もしくは真菌の感染に使用され、当該真菌は好ましくは菌糸真菌 (hyphal fungi) または酵母である。

【0015】

第4の態様において、本発明は、請求項18に記載の当該ペプチドを得る方法に関する。

【0016】

第5の態様において、本発明は、当該ペプチドの配列を含み、当該ペプチドの発現を可能にする請求項19に記載のベクターに関し、請求項20に記載のトランスジェニック植物、および請求項21に記載のトランスジェニック植物を得る方法に関する。

【0017】

最後の態様において、本発明は、請求項22に記載の、当該ペプチドでコーティングされた、種子に関する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】MALDI-TOF分析で決定したペプチドマスフィンガープリンティングフラグメントの検出および配列位置の代表的なスキームを示す図である。下線を引いたアミノ酸配列は、SDSポリアクリルアミドゲルから得たSEQ ID NO. 1によるペプチドのトリプシン消化産物として同定されたものである。

【図2】SEQ ID NO. 1によるペプチドを含むサンプルのLC-MS結果を示す図である。検出されたペプチドの質量は、非還元サンプル (図2A) および還元サンプル (図2B) の両方において8.3 kDaであった。

【発明の詳細な説明】

【0019】

本発明は、医療用または製薬学的用途の有効成分としての、ペプチドまたは当該ペプチドを含む組成物に関し、ペプチドは、SEQ ID NO. 1によるアミノ酸配列を有す

10

20

30

40

50

る。さらに、本発明は、ペプチドの使用、ペプチドを得る方法、およびペプチドの発現を可能にするベクターに関する。

【0020】

他に定義がない限り、本発明の記載に使用される全ての用語は、技術用語および科学用語を含めて、本発明が属する技術分野における当業者により一般的に解される意味を有する。さらなる指針として、本発明の教示をより理解するため、用語の定義が含まれる。

【0021】

本明細書において、以下の用語は以下の意味を有する。

【0022】

本明細書で使用される「ある（「a」、「an」）」および「その（the）」は、文脈上明らかにそうでない場合を除き、単数および複数の指示対象を指す。例として、「区画（a compartment）」は、1つまたは複数の区画を指す。

【0023】

本明細書で使用される「約（about）」は、パラメータ、量、時間的持続時間等の測定可能な値について言及する際に使用され、本発明にて実行するのに適切な限りにおいて、規定値の±20%以下、好ましくは±10%以下、より好ましくは±5%以下、さらに好ましくは±1%以下、そしてさらに好ましくは±0.1%以下の変動を包含することを意味する。ただし、修飾語「約」が指す値自体も具体的に開示されていることを理解されたい。

【0024】

本明細書で使用される「含む（comprise）」、「含む（comprising）」、および「含む（comprises）」ならびに「構成される（comprised of）」は、「含む（include）」「含む（including）」「含む（includes）」または「含む（contain）」「含む（containing）」「含む（contains）」と同義であり、例えば構成要素に続くものの存在を特定する、包括的またはオープンエンドな用語であって、当該技術分野で既知または当該技術分野で開示された、追加の、列挙されていない構成要素、特徴、要素（element）、要素（members）、ステップの存在を除外または排除するものではない。

【0025】

さらに、本明細書および特許請求の範囲において、第1、第2、第3等の用語は、特定されない限り、類似の要素を区別するために使用され、必ずしも連続的または時系列的な順序の説明のために使用されるものではない。このように使用される用語は、適切な状況下では相互に置き換えて使用可能であり、本明細書に記載される本発明の実施形態は、本明細書に記載または図示される以外の順序でも動作可能であることを理解されたい。

【0026】

端点による数値範囲の記載は、記載された端点と同様に、その範囲に含まれる全ての数値および分数を含む。

【0027】

「重量%（% by weight）」、「重量%（weight percent）」、「% wt」、または「wt%」という表現は、他に定義がない限り、本明細書全体を通じて、配合全体の重量に基づく各成分の相対重量を指す。

【0028】

用語「1つまたは複数」または「少なくとも1つ」、例えば、要素の群における1つもしくは複数の要素、または少なくとも1つの要素は、それ自体が明確であり、さらなる例示によって、この用語は、とりわけ当該要素の任意の1つ、または当該要素の任意の2つ以上の言及を包含し、例えば、当該要素の任意の3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上等、全ての当該要素までの言及を包含する。

【0029】

本明細書で使用される用語「ペプチド」は、1つのアミノ酸残基由来のカルボキシル基と、隣接する1つのアミノ酸残基由来のアミノ基とから形成されるアミド結合により結合した、2つ以上のアミノ酸残基を含む化合物を指す。アミノ酸残基は、D体であってもL

10

20

30

40

50

体であってもよく、天然に存在するものであっても合成されたものであってもよく、直鎖状であっても環状であってもよい。

【0030】

用語「治療上有効な量」とは、ある疾患の任意の症状を改善するのに有効な量をいう。予防は治療とみなすことができるため、治療上有効な量は「予防上有効な量」ともいうことができる。

【0031】

他に定義されない限り、本発明の開示に使用される全ての用語は、技術用語および科学用語を含めて、本発明が属する技術分野における当業者により一般的に解される意味を有する。さらなる指針として、本発明の教示をより理解するため、本明細書で使用される用語の定義が含まれる。本明細書で使用される用語または定義は、本発明の理解を助けるためにのみ提供される。

10

【0032】

本明細書全体を通じて、「一実施形態 (one embodiment)」または「ある実施形態 (an embodiment)」という言葉は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通じた様々な箇所における「一実施形態において」または「ある実施形態において」という表現は、必ずしも全てが同一の実施形態を指すわけではないが、同一の実施形態を指すことがある。さらに、特定の特徵、構造、または特性は、1つまたは複数の実施形態において、本開示から当業者に明らかである任意の適切な方法で組み合わせることができる。さらに、本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれるいくつかの特徵を含み、他の特徵を含まないが、当業者に理解されるように、異なる実施形態の特徵の組み合わせは本発明の範囲内であり、異なる実施形態を形成することを意味する。例えば、以下の特許請求の範囲において、特許請求した実施形態のいずれかを任意の組み合わせで使用することができる。

20

【0033】

第1の態様において、本発明はペプチドに関し、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 1によるアミノ酸配列を有する。

【0034】

別の実施形態において、SEQ ID NO. 1と95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつSEQ ID NO. 1による配列を有するペプチドにおいて観察されるような抗菌活性を有するペプチドもまた、本明細書に開示される。

30

【0035】

本明細書で使用される用語「配列同一性」は、比較領域 (a window of comparison) にわたってアミノ酸ごとの配列が同一であることを指す。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較して、両方の配列においてアミノ酸のポジションが一致する数を求め、一致したポジションの数を比較領域におけるポジションの総数 (すなわち領域の大きさ) で除算し、その結果に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることで計算する。ギャップ、すなわち残基が一方の配列に存在し、他方の配列に存在しないアラインメントのポジションは、非同一残基のポジションとみなす。配列同一性のパーセンテージの決定は、手作業で行うこともでき、当該技術分野で利用可能なコンピュータプログラムを利用することもできる。有用なアルゴリズムの例はPILEUPである。BLAST解析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で公開されている。

40

【0036】

別の実施形態では、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 1の配列と、最大で4つ、よりさらに好ましくは3つ、よりさらに好ましくは2つ、よりさらに好ましくは1つのアミノ酸残基が異なり、かつ本明細書に開示される抗菌活性を示す。

50

10

20

30

40

50

本発明によるペプチドは、Theobromacocoa由来のビシリンに由来するリコンビナントペプチドを用いた実験で同定された。理論によって束縛されることを望まないが、当該ペプチドは、これらのリコンビナントペプチドの1つの分解産物であると推定される。

本明細書に記載されるペプチドは、組換え発現により得ることができるが、テオブロマカカオ品種、より好ましくはCCN-51品種から精製することもできる。驚くべきことに、カカオ品種CCN-51または「ラバドス (lavados)」は、微生物の侵入に対して高い耐性があることが知られており、ビシリン由来N末端ペプチドが特に豊富であることが示された。

【0041】

別の、またはさらなる実施形態では、当該ペプチドは、そのN末端にシグナルペプチドを含む。好ましくは、当該シグナルペプチドは、SEQ ID NO. 2による配列を有する。別の実施形態では、当該シグナルペプチドは、SEQ ID NO. 2に対して95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または、より好ましくは100%の配列同一性を示す。あるいは、当該ペプチドは、配列SEQ ID NO. 2と最大で3つ、より好ましくは最大で2つ、よりさらに好ましくは1つのアミノ酸残基が異なるシグナルペプチド配列を有する。

【0042】

ある実施形態では、シグナルペプチドを含む本発明のペプチドは、SEQ ID NO. 3による配列を有する。

10

【0043】

別の実施形態では、ペプチドは、リコンビナントペプチドまたは合成ペプチドである。適切な表現系、例えば大腸菌または当該技術分野で公知の別の適切な発現系へと、SEQ ID NO. 1を有するペプチドのコード配列を含むベクターを挿入すると、ペプチドを生じる。本発明のペプチドを合成するために、当該技術分野で公知の任意の適切なタンパク質／ペプチド合成方法を採用することができる。

【0044】

さらなる、または別の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、そのN末端および／またはC末端にアフィニティタグを備える。アフィニティタグは、大腸菌および他の系で発現されたリコンビナントタンパク質およびペプチドのアフィニティ精製に使用される。当該タグは、少なくとも6つのヒスチジン(His)残基からなるアミノ酸モチーフである、ポリヒスチジンタグであることができる。

20

【0045】

あるいは、限定するものではないが、ペプチドは、ヒスチジンとグルタミン残基とが交互に並ぶHQTAG(HQHQQH)、ヒスチジンとアルパラギンとが交互に並ぶHNタグ(HNHNHNHNHNHNHN)、HATタグ(KDHLIHNVHKEEHAHAHNK)、ALFATAG(SRLEEEELRRRLTE)、Aviタグ(GLNDIFEAQKIEWHE)、CTAG(EPEA)、カルモジュリンタグ(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL)、ポリグルタミン酸タグ、ポリアルギニントグ、ETAG(GAPVPYPDPLEPR)、FLAGタグ(DYKDDDDK)、HATAG(YPYDVPDYA)、Mycタグ(EQKLISEEDL)、NETAG(TKENPRSNQEESYDDNES)、Rho1D4タグ(TETSQVAPA)、STAG、SBPタグ(DEKTTGWRGGHVV EGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP)、Streptタグ(WSHPQFEK)等によりタグ化することができる。

30

【0046】

本発明のペプチドを分析した結果、このペプチドは抗細菌活性および／または抗真菌活性を有することがわかった。

【0047】

抗菌ペプチドそれ自体は、特定の三次元構造を有し、この三次元構造はX線結晶構造解析技術または核磁気共鳴分光法技術を使用して決定できる。理論によって束縛されることを望まないが、この構造が、当該ペプチドにおいて観察される活性に役割を果たすと考えられる。本発明のペプチドが属する α -ヘリックス型植物由来抗菌ペプチド(AMP)は、しばしば、ヘリックスの一方の面が主に親水性であり、他方の面が主に疎水性である、両親媒性ヘリックスを有する。この構造は、細胞膜を破壊し、細胞内容物の漏出、および溶解を引き起こすAMP、ならびに細胞内に侵入して細胞内の他の構造を攻撃するAMPによく見られる。 α -ヘリックスAMPは通常、溶液中で構造的に無秩序であり、これにより細胞壁の緻密な網を容易に通過することができる。疎水性であり、かつ脂質ヘッド(lipid heads)よりも下に荷電している細胞膜に結合すると、二次構造(α -ヘリックス)が形成され、タンパク質が細胞膜を貫通できるようになる。この秩序／無秩

40

50

序転移は、主に α -ヘリックス内の疎水性領域の長さにより制御されている。疎水性ヘリックスが長すぎると、溶液中で秩序構造が形成され、AMPの活性に悪影響を及ぼす。

【0048】

ある実施形態において、当該ペプチドは、グラム陽性およびグラム陰性の細菌および真菌、好ましくは菌糸真菌および酵母に対して活性がある。限定するものではないが、ペプチドは、以下を含む群から選択される細菌に対して活性がある。Acinetobacter属菌、Bartonella属菌、Bordetella属菌、Borrelia属菌、Brucella属菌、Campylobacter属菌、Chlamydia属菌、Clostridium属菌、Corynebacterium属菌、Enterococcus属菌、Enterobacter属菌、Erwinia属菌、Escherichia属菌、Francisella属菌、Haemophilus属菌、Helicobacter属菌、Klebsiella属菌、Legionella属菌、Leptospira属菌、Listeria属菌、Mycobacterium属菌、Mycoplasma属菌、Neisseria属菌、Rickettsia属菌、Salmonella属菌、Shigella属菌、Staphylococcus属菌、Streptococcus属菌、Treponema属菌、Ureaplasma属菌、Vibrio属菌、Yersinia属菌、Acidovorax属菌、Agrobacterium属菌、Arthrobacter属菌、Bacillus属菌、Burkholderia属菌、Clavibacter属菌、Cronobacter属菌、Curtobacterium属菌、Lefsonia属菌、Pantoea属菌、Paenibacillus属菌、Pectobacterium属菌、Phytoplasma属菌、Proteus属菌、Pseudomonas属菌、Ralstonia属菌、Rhizobacter属菌、Rhizomonas属菌、Rhodococcus属菌、Seratia属菌、Sphingomonas属菌、Spiroplasma属菌、Streptomyces属菌、Xanthomonas属菌、Xylella属菌、Xylophilus属菌等。

10

20

【0049】

限定するものではないが、本発明のペプチドは、以下を含む群から選択される真菌に対して活性がある。Ajellomyces属菌、Aspergillus属菌、Baidiobolus属菌、Blastomyces属菌、Candida属菌、Coccidioides属菌、Conidiobolus属菌、Cryptococcus属菌、Emmonsia属菌、Histoplasma属菌、Hanseniaspora属菌、Lacazia属菌、Paracoccidioides属菌、Pneumocystis属菌、Sporothrix属菌、Stachybotrys属菌、Talaromyces属菌、Acrocallymma属菌、Aecidium属菌、Albonectria属菌、Allodus属菌、Alternaria属菌、Amphobotrys属菌、Apiosporina属菌、Armillaria属菌、Blumeria属菌、Botryotinia属菌、Botrytis属菌、Ceratosystis属菌、Colletotrichum属菌、Cryptosporiopsis属菌、Exobasidium属菌、Fusarium属菌、Hypocrea属菌、Leptosphaeria属菌、Magnaporthe属菌、Melampsora属菌、Meyerozyma属菌、Monilinia属菌、Mycosphaarella属菌、Microsphaera属菌、Mucor属菌、Penicillium属菌、Pichia属菌、Phytophthora属菌、Saccharomyces属菌、Sporobolomyces属菌、Plasmodiophora属菌、Podosphaera属菌、Puccinia属菌、Pythium属菌、Rhizoctonia属菌、Sclerotinia属菌、Septoria属菌、Taphrina属菌、Thanatephorus属菌、Torulaspora属菌、Uromyces属菌、Ustilago属菌、Venturia属菌、またはVerticillium属菌等。

30

40

【0050】

50

第2の態様において、本発明は、上記段落に記載のペプチドを含む組成物を提供する。当該組成物は、医薬用途および獣医用途、ならびに／または作物保護用途に特に適している。

【0051】

ある実施形態において、上記組成物は、液体、半固体、固体、もしくはガス状の組成物であり、および／または当該組成物の剤形は、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、エアロゾル、ペースト、シロップ、懸濁液、乳濁液、もしくは溶液である。当該組成物の非限定的な例は、SP (soluble powders)、SG (soluble granules)、湿潤性顆粒、錠剤製剤、ドライフロアブル、水性フロアブル、顆粒水和剤、OD (Oil dispersion)、フロアブル剤 (suspension concentrate)、DC (Dispersible concentrate)、乳剤、水性懸濁液、肥料顆粒、噴霧可能な組成物等である。当該組成物は、経口投与、注射投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮膚投与、吸入投与、局所投与、または経鼻投与に適するように調合することができる。他の実施形態において、当該組成物は、1つまたは複数の対象物のコーティング、噴霧、噴霧コーティング、蒸発、ネブライジング、アトマイジング、懸濁、希釈等が可能となるように調合することができる。

10

【0052】

いくつかの実施形態において、組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む。好みに応じて、上記賦形剤は、フィラー、バインダー、崩壊剤、甘味剤、コーティング剤、潤滑剤 (lubricants)、および／または滑剤 (glidants) から選択される。希釈剤またはフィラーは、固体組成物の容量を増加させ、組成物を含む剤形を、患者および介護者が扱いやすくすることができる。本発明による錠剤に適した希釈剤としては、例えば、結晶セルロース (例えば、Avicel (登録商標))、微細セルロース、ラクトース、デンプン、アルファ化デンプン、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、砂糖、デキストレート類、デキストリン、デキストロース、第二リン酸カルシウム二水和物、リン酸三カルシウム、カオリン、炭酸マグネシウム、酸化マグネシウム、マルトデキストリン、マンニトール、ポリメタクリレート (例えば、Eudragit (登録商標))、塩化カリウム、粉末セルロース、塩化ナトリウム、ソルビトール、タルク等がある。

20

【0053】

錠剤等に圧縮される固体組成物には、賦形剤を含んでいてもよい。賦形剤は、圧縮後に有効成分および他の賦形剤と一緒に含むことを補助する機能を含む。好適なバインダーとしては、アカシア、アルギン酸、カルボマー (例えば、カルボポール)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、デキストリン、エチルセルロース、ゼラチン、グアーガム、水素添加植物油、ヒドロキシエチルセルロース (例えば、Klucel (登録商標))、ヒドロキシプロピルセルロース (例えば、Methocel (登録商標))、液体グルコース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、マルトデキストリン、メチルセルロース、ポリメタクリレート、ポビドン (例えば、Kollidon (登録商標))、Plasdone (登録商標)、アルファ化デンプン、アルギン酸ナトリウム、デンプン等がある。

30

【0054】

組成物に崩壊剤を添加することにより、圧縮された固形組成物の溶解速度を増加させることができる。好適な崩壊剤としては、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム (例えば、Ac-Di-Sol (登録商標))、PrimeLlose (登録商標)、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン (例えば、Kollidon (登録商標))、Polyplasdone (登録商標)、グアーガム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、メチルセルロース、結晶セルロース、ポラクリリンカリウム (Polacrillin potassium)、粉末セルロース、アルファ化デンプン、アルギン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム (例えば、ExploTab (登録商標))、デンプン等がある。

40

【0055】

滑剤を添加することで、非圧縮固形組成物の流動性を改善し、投与精度を向上させることができる。滑剤として機能する賦形剤としては、コロイド状二酸化ケイ素、三ケイ酸マ

50

グネシウム、ステアリン酸マグネシウム、粉末セルロース、デンプン、タルク、リン酸三カルシウム等がある。

【0056】

錠剤のような剤形が粉末組成物の圧縮により製造される場合、組成物はパンチとダイによる圧力を受ける。いくつかの賦形剤および有効成分の中には、パンチとダイに付着しやすいものがあり、これにより製品に穴あきおよび表面凹凸が生じることがある。潤滑剤を組成物に加えることで、付着を減らし、製品のダイからの型離れを容易にすることができる。潤滑剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、モノステアリン酸グリセリル、パルミトステアリン酸グリセリル、水素添加ヒマシ油、水素添加植物油、鉱物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、フマル酸ステアリルナトリウム、ステアリン酸、タルク、ステアリン酸亜鉛等がある。好ましくは、当該潤滑剤は、0.25～1重量% (w/w) で存在する。

10

【0057】

着香料および風味増強剤は、剤形を患者にとってより口当たりのよいものにする。医薬品のための一般的な着香料および風味増強剤であって、本明細書に開示される組成物に含むことができるものとしては、マルトール、バニリン、エチルバニリン、メントール、クエン酸、フマル酸、エチルマルトール、酒石酸等がある。

【0058】

固形組成物はまた、任意の薬学的に許容される着色剤を使用して染色することができ、その外観を改善する、ならびに／または製品および単位投与量の識別を容易にすることができる。

20

【0059】

ある実施形態、特に組成物が農業用である場合において、当該賦形剤は、農業適合性賦形剤である。当該「農業適合性担体」または「農業適合性賦形剤」は、溶媒と見なすことができ、一般に不活性であるが、農業において許容できるものである必要がある。したがって、語句「農業適合性」は、耕作地で日常的に使用しても、生産者の植栽設備に干渉せず、作物の発育または耕作地域における所望の生態学的バランスに悪影響を及ぼすことのない物質を意味する。

【0060】

農業適合性担体または農業適合性賦形剤は、固体であってもよい。固体の担体または賦形剤としては、粘土、天然または合成のケイ酸塩、シリカ、樹脂類、ワックス類、固体肥料類、ポリマー、粒状塊、パーライト、パーライト顆粒、泥炭、泥炭ペレット、土壌、バーミキュライト、木炭、製糖工場の炭酸化プレスマッド、籾殻、カルボキシメチルセルロース、細砂、炭酸カルシウム、小麦粉、ミョウバン、デンプン、タルク、ポリビニルピロリドン、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。農業適合性担体または農業適合性賦形剤は、液体であってもよい。液体の担体または賦形剤としては、水、アルコール類、ケトン類、石油留分類、油類、芳香族炭化水素類またはパラフィン系炭化水素類、塩素化炭化水素類、液化ガス類、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。より詳細には、農業適合性担体または農業適合性賦形剤は、分散剤、界面活性剤、添加材、増粘剤、固結防止剤、残渣分解剤、堆肥化製剤、粒状適用剤、珪藻土、着色剤、安定剤、保存剤、ポリマー、コーティングまたはそれらの組み合わせを含むことができる。当業者であれば、特定の化合物、接種材料が適用される植物、土壌の種類、気候条件、接種材料が液体、固体、粉末のいずれの形態であるか等の要因を考慮して、使用すべき適切な担体または賦形剤を容易に決定することができる。添加剤は、油、ガム、樹脂、粘土、ポリオキシエチレングリコール、テルペン、粘性有機物、脂肪酸エステル、硫酸化アルコール、アルキルスルホネート、石油スルホネート、アルコール硫酸塩、アルキルブタンジアミノ酸ナトリウム、ナトリウムチオブタントジオエート (sodium thiobutane dioate) のポリエステル、ベンゼンアセトニトリル誘導体、タンパク性物質、またはこれらの組み合わせを含むことができる。タンパク性物質としては、乳製品、小麦粉、大豆粕、血液、アルブミン、ゼラチン、またはこれらの組み合わせが挙げ

30

40

50

られる。増粘剤は、ポリエチレングリコールの長鎖アルキルスルホネート、ポリオキシエチレンオレエート、またはこれらの組み合わせを含むことができる。界面活性剤は、重質石油油、重質石油蒸留物、ポリオール脂肪酸エステル、ポリエトキシシル化脂肪酸エステル、アリアルアルキルポリオキシエチレングリコール、アルキルアミンアセテート、アルキルアリアルスルホネート、多価アルコール、アルキルホスフェート、またはこれらの組み合わせを含むことができる。固結防止剤としては、亜硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、モノメチルナフタレンスルホン酸ナトリウム塩等のナトリウム塩、またはこれらの組み合わせ；炭酸カルシウム、珪藻土等のカルシウム塩、またはこれらの組み合わせ等が挙げられる。

【0061】

ある実施形態において、当該組成物は、水、他の栄養物質、弱酸、植物油、精油、代謝促進剤、乳化剤、粘度剤、着色剤、懸濁剤、分散剤、保存剤、錯化剤、安定剤、担体、溶媒もしくは湿潤剤、またはこれらの任意の組み合わせから選択される1つ以上をさらに含む。ある実施形態において、当該組成物は、少なくとも1つの油、界面活性剤およびポリマーをさらに含む。

【0062】

組成物は、従来の方法で製造することができる。特定の実施形態において、本明細書で提供される組成物は、微生物の活性を阻害する1つまたは複数の防腐剤を含む。好適な防腐剤としては、メルフェンおよびチオメルサル等の水銀含有物質；安定化二酸化塩素；ならびに塩化ベンザルコニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウムおよび塩化セチルピリジニウム等の第4級アンモニウム化合物等が挙げられる。

【0063】

本明細書に記載のペプチドは、0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または、好ましくは0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で組成物中に配合することができる。

【0064】

あるいは、ペプチドは、0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.3~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.4~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.5~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.6~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.7~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.8~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.9~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは3~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは4~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは5~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは6~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは7~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは8~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは9~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは15~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは25~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは30~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは35~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは40~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは45~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で組成物中に配合することができる。

【0065】

別の実施形態では、組成物は0.1重量%以上のペプチドを含み、より好ましくは、0.5重量%以上、1重量%以上、2重量%以上、3重量%以上、4重量%以上、5重量%以上、6重量%以上、7重量%以上、8重量%以上、9重量%以上、10重量%以上、11重量%以上、12重量%以上、13重量%以上、14重量%以上、15重量%以上、1

10

20

30

40

50

6重量%以上、17重量%以上、18重量%以上、19重量%以上、20重量%以上、21重量%以上、22重量%以上、23重量%以上、24重量%以上、25重量%以上、26重量%以上、27重量%以上、28重量%以上、29重量%以上、30重量%以上、31重量%以上、32重量%以上、33重量%以上、34重量%以上、35重量%以上、36重量%以上、37重量%以上、38重量%以上、39重量%以上、40重量%以上、41重量%以上、42重量%以上、43重量%以上、44重量%以上、45重量%以上、46重量%以上、47重量%以上、48重量%以上、49重量%以上、50重量%以上、51重量%以上、52重量%以上、53重量%以上、54重量%以上、55重量%以上、56重量%以上、57重量%以上、58重量%以上、59重量%以上、60重量%以上、61重量%以上、62重量%以上、63重量%以上、64重量%以上、65重量%以上、66重量%以上、67重量%以上、68重量%以上、69重量%以上、70重量%以上、71重量%以上、72重量%以上、73重量%以上、74重量%以上、75重量%以上、76重量%以上、77重量%以上、78重量%以上、79重量%以上、80重量%以上、81重量%以上、82重量%以上、83重量%以上、84重量%以上、85重量%以上、86重量%以上、87重量%以上、88重量%以上、89重量%以上、90重量%以上、91重量%以上、92重量%以上、93重量%以上、94重量%以上、95重量%以上、96重量%以上、97重量%以上、98重量%以上、99重量%以上または99.5重量%以上のペプチドを含む。

10

【0066】

第3の態様において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、治療的使用に適している。「治療的使用」とは、ヒトまたは非ヒト動物における疾患の症状を改善するためのペプチドまたはその組成物の使用をいう。本明細書で提供される治療方法または使用方法の実施において、本明細書に記載される治療有効量の医薬組成物が、治療されるべき疾患、障害、または状態を有する哺乳動物または非哺乳動物等の対象に投与される。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。治療上有効な量は、疾患の重篤度、対象の年齢および相対的健康状態、使用される治療剤の効力、および他の要因によって大きく変わり得る。本明細書に記載される治療剤、および場合によっては組成物は、単独で、または混合物の成分として、1つまたは複数の治療剤と組み合わせて使用することができる。

20

【0067】

ある実施形態において、本明細書に記載のペプチドは、それを必要とする対象における、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または真菌を含む広範な微生物によって引き起こされる感染症の治療または予防のための医薬組成物において使用される。ここで、真菌は好ましくは菌糸真菌または酵母である、当該対象は、ヒトまたは動物であることができる。当該医薬組成物は、治療上有効な量の抗菌ペプチド、および適切な担体を含むことができる。

30

【0068】

本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、適切な投与経路によって対象に投与することができ、静脈内、動脈内、経口、非経口、頬部、局所、経皮、直腸、筋肉内、皮下、骨内、経粘膜、吸入、腹腔内投与経路等が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の組成物には、水性分散液、自己乳化型分散体、固溶体、リポソーム分散体、エアロゾル、固形剤形、粉末、即時放出性製剤、放出制御製剤、速溶製剤、錠剤、カプセル剤、丸薬 (pill)、遅延放出製剤、徐放製剤、拍動放出製剤、多粒子製剤、および即時放出製剤と放出制御製剤との混合製剤が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0069】

ある実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、動物飼料に添加されて、家畜の潜在的な微生物感染を低減することができる。別の実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、経口投与、局所投与、または非経口投与用に調合されて、獣医学における微生物感染症を治療することができる。

【0070】

別の実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、飼料または食品添

50

加物としての作物保護における使用、防腐剤として、除染剤として、および/または化粧品用途としての医薬品用途のための使用に適している。

【0071】

作物保護のために使用される場合、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、上記の実施形態にしたがって、農業適合性担体または農業適合性賦形剤とともに調合される。当業者は、治療される作物および標的とされる病原体の機能における、当該組成物の適切な用量、剤形、および適用方法を決定するであろう。

【0072】

ある実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、飼料または食品添加物に組み込まれて、飼料および食品を介した病原体の拡散を防止する。飼料は、動物の健康および福祉に有害な病原体を運ぶおそれがあることが知られている。ホルムアルデヒド等の防腐製品を使用して飼料を消毒することが広く行われているが、これらの製品は、かえって悪影響を及ぼす可能性がある。本明細書に記載の抗菌ペプチドは安全な代替品である。

【0073】

別の実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、外面類、ツール類、器具類、デバイス類、物体類、または身体部分の除染剤または消毒剤としての使用に適している。ある実施形態において、このような装置または物体としては、リネン、布、プラスチック類、ラテックス織物類、天然ゴム類、埋め込み型デバイス類、外面類、または貯蔵容器類が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本明細書に開示されるペプチドまたは組成物は、洗浄剤類、洗剤類、石鹸類、またはスプレー類に組み込まれる。

【0074】

特定の実施形態において、本明細書に記載のペプチドは、種々のヘルスケア製品類、特に化粧品類にも組み込むことができる。例えば、ペプチドは、歯磨き粉、マウスウォッシュ、シャンプー、石鹸、クリーム、または制汗剤に組み込まれて、口腔もしくは皮膚における微生物のコロニー形成もしくは再定着を低減または防止することができる。

【0075】

別の実施形態において、本明細書に記載のペプチドおよび組成物は、食品、飼料、化粧品もしくは医薬品の保存剤として、または食品を処理する際に使用されて、潜在的な病原体または汚染物質を防除、低減、または除去することができる。

【0076】

別の実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、植物、好ましくは作物において病原体を防除するために使用される。ここで、病原体はグラム陽性およびグラム陰性の細菌および／または真菌であり、真菌は、好ましくは菌糸真菌または酵母である。植物は、単子葉植物または双子葉植物であってよく、飼料もしくは飼料用マメ科植物、観用植物、食用作物、樹木、または低木を含む。ある実施形態において、当該植物は、好ましくは作物である。好ましくは、当該植物は以下の群、すなわち、*Acer* 属、*Actinidia* 属、*Abelmoschus* 属、*Agave sisalana*、*Agropyron* 属、*Agrostis stolonifera*、*Allium* 属、*Amaranthus* 属、*Ammophila arenaria*、*Ananas comosus*、*Annona* 属、*Apium graveolens*、*Arachis* 属、*Artocarpus* 属、*Asparagus officinalis*、*Avena* 属、*Averrhoa carambola*、*Bambusa* 属、*Benincasa hispida*、*Bertholletia excelsea*、*Beta vulgaris*、*Brassica* 属、*Cadaba farinosa*、*Camellia sinensis*、*Canna indica*、*Cannabis sativa*、*Capsicum* 属、*Carex elata*、*Carica papaya*、*Carissa macrocarpa*、*Carya* 属、*Carthamus tinctorius*、*Castanea* 属、*Ceiba pentandra*、*Cichorium endivia*、

Cinnamomum属、Citrus属、Citrullus lanatus、Citrullus属、Cocos属、Coffea属、Colocasia esculenta、Cola属、Corchorus属、Coriandrum sativum、Corylus属、Crataegus属、Crocus sativus、Cucurbita属、Cucumis属、Cynara属、Daucus carota、Desmodium属、Dimocarpus longan、Dioscorea属、Diospyros属、Echinochloa属、Elaeis属、Eleusine coracana、Eragrostis tef、Erianthus属、Eriobotrya japonica、Eucalyptus属、Eugenia uniflora、Fagopyrum属、Fagus属、Festuca arundinacea、Ficus carica、Fortunella属、Fragaria属、Ginkgo biloba、Glycine属、Gossypium hirsutum、Helianthus属、Hemerocallis fulva、Hibiscus属、Hordeum属、Ipomoea batatas、Juglans属、Lactuca sativa、Lathyrus属、Lens culinaris、Linum usitatissimum、Litchi chinensis、Lotus属、Luffa acutangula、Lupinus属、Luzula sylvatica、Lycopersicon属、Macrotyloma属、Malus属、Malpighia emarginata、Mammea americana、Mangifera indica、Manihot属、Manilkara zapota、Medicago sativa、Melilotus属、Mentha属、Miscanthus sinensis、Mordica属、Morus nigra、Musa属、Nicotiana属、Olea属、Opuntia属、Ornithopus属、Oryza属、Panicum miliaceum、Panicum virgatum、Passiflora edulis、Pastinaca sativa、Pennisetum属、Persea属、Petroselinum crispum、Phalaris arundinacea、Phaseolus属、Phleum pratense、Phoenix属、Phragmites australis、Physalis属、Pinus属、Pistacia vera、Pisum属、Poa属、Populus属、Prosopis属、Prunus属、Psidium属、Punica granatum、Pyrus communis、Quercus属、Raphanus sativus、Rheum rhabarbarum、Ribes属、Ricinus communis、Rubus属、Saccharum属、Salix属、Sambucus属、Secale cereale、Sesamum属、Sinapis属、Solanum属、Sorghum bicolor、Spinacia属、Syzygium属、Tagetes属、Tamarindus indica、Theobroma cacao (テオブロマカカオ)、Trifolium属、Tripsacum dactyloides、Triticosecale rimpai、Triticum属、Tropaeolum minus、Tropaeolum majus、Vaccinium属、Vicia属、Vigna属、Viola odorata、Vitis属、Zea mays、Zizania palustris、Ziziphus属に属し、これらの子孫および雑種を含む。

【0077】

本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、植物、植物の一部、または当該植物を構成する基質もしくは当該植物の宿主となる基質への導入に適しており、これにより当該植物に病原体抵抗性または病害防除性を付与する。当該導入は、人為的であってもよい。

【0078】

ペプチドまたはその組成物を植物等に導入する方法としては、植物および／もしくは植物の一部ならびに／または当該植物を生育させる生育培地の処理、種子への接種、種子のコーティング、植物または植物の一部への直接接種、植物または植物の一部（例えば、穂

）に噴霧または湿潤させること等が挙げられる。ペプチドまたは組成物が導入される植物の種類に応じて適切な方法を選択することができる。

【0079】

別のさらなる非限定的な例として、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、コーティングの形態で適用することができる。コーティングは、種子への噴霧、またはペプチドもしくは組成物を含む溶液への当該種子の含浸によって、種子に適用することができる。別の例では、先の例において説明した溶液で種子をコーティングするために、結合剤、例えば、炭化物（炭酸カルシウム）からなる結合剤を添加することができる。

【0080】

いくつかの実施形態では、コーティングは、むき出しかつ未処理の植物部位に適用することができる。他の実施形態において、コーティングは、先に処理がなされた植物部位にオーバーコートとして適用することができる。種子のコーティングは、土壤媒介性真菌病害の処置において特に好ましい。いくつかの実施形態において、種子のコーティングは、むき出しかつ未処理の種子に適用することができる。他の実施形態において、種子のコーティングは、先に処理がなされた種子への種子のオーバーコートとして適用することができる。

10

【0081】

ある実施形態では、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、当該植物が生育する土壌または任意の他の基質に適用することができ、これにより、当該基質から害虫および／または病原体を除去する。

20

【0082】

当該植物または植物部分を構成する基質、または植物もしくは植物部分の宿主となる基質への接種は、例示であって限定する意図はないが、粉末、顆粒、ペレット、プラグ、または土壌浸漬を基質に適用することにより実施することができる。接種は、また、葉面散布や液状組成物等の液体施用によっても行うことができる。この適用は、生育中の植物に適用してもよく、植物基質に適用してもよい。植物、特に農業植物は、基質中で生育させることができる。一実施形態において、当該基質は、土、砂、砂利、多糖類、マルチ、堆肥、ピートモス、わら、丸太、粘土、またはこれらの組み合わせである。別の実施形態において、基質はまた、ハイドロカルチャー系または生体外培養系を含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような、異なる適用方法の組み合わせが適用される。

30

【0083】

ある実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、病原性感染の治療または予防における使用に適している。病原体は、先の実施形態のいずれかに記載のグラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または真菌からなる群から選択される。

【0084】

本明細書に開示される本発明はまた、先の実施形態のいずれかに記載されるペプチドまたは組成物でコーティングされた植物種子に関する。

【0085】

ある実施形態では、本明細書に開示される方法は、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有するペプチドを得るために使用される。ここで、当該ペプチドは、リコンビナントペプチド、合成ペプチド、またはテオブロマカカオ、より好ましくはCCN-51品種に由来する。これらの方法は、当該技術分野で公知である。

40

【0086】

ある実施形態では、所望のペプチドは凍結乾燥により乾燥させることができる。

【0087】

ある実施形態では、ペプチドを濃縮する。好ましくは、ペプチドは、標準的な塩または有機溶媒沈殿により濃縮する。あるいは、揮発性バッファー（例えば、炭酸アンモニウム

50

）に対する透析によって、フィルターベースの濃縮器を使用することによって、またはイオン交換クロマトグラフィーによってペプチドを濃縮する。

【0088】

ペプチド含量の定量は、Lowry法またはBradfordアッセイ等の分光光度法、または当該分野で公知の任意の他の方法によって行われる。別の実施形態では、ペプチドの定量は、当該分野で公知の任意の適切なクロマトグラフィー法によって行う。好ましい実施形態において、ペプチド含量の定量にLC-MS法を使用する。好ましい実施形態では、カカオ抽出物から得られたタンパク質のトリプシン消化を介して生成されたフラグメントに対してMALDI-TOF分析を実施する。一実施形態では、試料間の特異的差異を検出するため、免疫化学的アッセイを調製して実施することにより、MALDI-MSトリプシン消化物分析から得られたデータをさらに裏付けることができる。

10

【0089】

さらに好ましい実施形態では、当該ペプチドは、他のペプチドから実質的に遊離している。用語「実質的に遊離」とは、本明細書で使用される場合、他のペプチドと95wt%以上遊離していることを意味し、好ましくは、他のペプチドと99wt%以上遊離していることを意味する。好ましい実施形態では、当該ペプチドは、結晶および／または固体の形態で存在する。

【0090】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO. 1による配列を有するペプチドのコード配列を含むベクターに関し、任意でN末端シグナルペプチドの配列を含み、当該シグナルペプチド配列は、SEQ ID NO. 2による配列を有し、ここで、当該ベクターは、発現系における当該ペプチドの発現を可能にするように設計される。別の好ましい実施形態では、当該ベクターは、先の実施形態に開示されたような精製タグを含む。

20

【0091】

ある実施形態では、カカオ豆から抽出したDNAは、ペプチドのコード配列を増幅するために使用し、これを細胞における遺伝子発現のために設計された任意のプラスミドまたはウイルス等の適切な発現ベクター中にクローニングする。

【0092】

したがって、本明細書に記載のペプチドは、さらなる使用のためのペプチドを生産する目的で、任意の適切な系で発現させることができる。タンパク質の発現に適した宿主としては、大腸菌、真菌細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞および植物が挙げられる。このような宿主でタンパク質を発現させるための標準的な方法は、Current Protocols in Molecular Biology (supra) の第16節 (Protein Expression) を含む種々のテキストに記載されている。

30

【0093】

一般に、目的のアミノ酸配列をコードするDNAは発現ベクターに含まれ、場合によっては、SEQ ID NO. 1による配列を有するペプチドをコードするように、5'または3'末端で別のコード配列にインフレームで連結され、任意にN末端にSEQ ID NO. 2を含む。全コード配列は、プロモーターがコード配列の発現を駆動するように、プロモーターに作動可能に連結される。本明細書において、コード配列は「標的遺伝子」ともいう。

40

【0094】

ある実施形態においては、プロモーターは、微生物にネイティブなプロモーター（例えば、大腸菌trpEプロモーター）、Tacプロモーターのような合成プロモーターか、異種生物、例えば、ウイルス、細菌、または微生物中で機能することができる、ファージもしくはT7のようなバクテリオファージから得られるプロモーターのいずれかである。プロモーターは構成的であってもよく、より好ましくは誘導性であってもよい。発現ベクターはまた、選択可能なマーカー遺伝子を含んでいてもよく、それはアンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、カナマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性遺伝子であることができる。

50

【0095】

大腸菌における本発明のペプチドの発現に適した多くのプロモーター系が、よく市販されている。例えば、*araBAD*（アラビノース）オペロンからの*PBAD*プロモーターは有利な誘導特性を有し、バックグラウンドの1, 200倍誘導可能である（Guzmanら、1995）。その他、*PLAC*、*PTAC*、*Ptrc*、*PL*、*PR*等がある。*PTAC*プロモーターは、大腸菌の*trp*プロモーターと*lac*プロモーターから派生したハイブリッドであり、知られている大腸菌ベースのプロモーター系の中で最も強力なものの一つである。*lac*プロモーターと同様にIPTGによって誘導可能である。

【0096】

本発明の好ましい宿主細胞は、大腸菌M15宿主株である。別の好ましい実施態様では、本発明のペプチドの発現のための宿主細胞として*Pichia pastoris*を使用する。

10

【0097】

さらに好ましい実施形態では、クローンの選択を行い、Ni-NTAアガロースを用いて、そのアフィニティタグを介して過剰発現されたペプチドを抽出する。先の実施形態において天然源から単離されたペプチドに適用したのと同じ方法を用いて、リコンビナントペプチドを分離精製する。

【0098】

遺伝子操作した細胞における新規ペプチドの発現は、通常は、カカオ植物材料から単離した天然由来のペプチドと同一の三次元構造を有する生成物をもたらす。この立体構造は、システイン残基の間に正しく形成された分子内ジスルフィド結合を含む。しかし、タンパク質を化学的に合成した場合でも、望ましくないジスルフィド結合を切断し、所望のシステイン残基間の結合を形成して所望の三次元構造を与えるために、タンパク質をさらに処理する方法が当技術分野で知られている。

20

【0099】

本発明の別の実施形態では、当該ペプチドは、公知のペプチド合成技術、例えば、室温ペプチド合成機、マイクロ波ペプチド合成機、並列ペプチド合成機等の機器上での固相合成等を用いた化学合成によって得ることができる。

【0100】

本発明の一実施形態では、本明細書に記載のペプチドをトランスジェニック植物で発現させることが可能である。したがって、本発明はまた、本明細書に記載の1つ以上のペプチドを発現するトランスジェニック植物に関する。

30

【0101】

ある実施形態では、トランスジェニック植物は、SEQ ID NO. 1と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 1と最大で3つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有するペプチドを発現する。さらなる実施形態において、当該ペプチドは、N末端シグナルペプチドの配列を含み、当該シグナルペプチド配列は、SEQ ID NO. 2と95%の配列同一性を有する。

【0102】

さらなる実施形態では、トランスジェニック植物は、SEQ ID NO. 1と96%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、より好ましくは99%、あるいはより好ましくは100%の同一性を有するペプチドを発現する。ある実施形態では、当該ペプチドは、先の実施形態に開示されるような精製タグを含む。

40

【0103】

ある実施形態において、当該ペプチドは、先の実施形態に開示されるような精製タグを含む。

【0104】

本発明によれば、植物細胞は、種々の公知の遺伝子工学的な方法（*Agrobacterium tumefaciens*形質転換、Tiプラスミド、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクトイルガン、PEG媒介形質転換等）に

50

より、DNA構築物で形質転換させることができる。本明細書で使用する遺伝子工学的方法は、所望の形質または特性を発現する遺伝子組換え植物を再生するために、外来DNA配列の植物細胞への導入に使用する任意の方法として理解されたい。

【0105】

本発明の一実施形態において、SEQ ID NO. 1による配列を有するペプチドをコードするDNA配列、または他の植物種由来のホモログをコードするDNA配列は、成熟タンパク質を産生するプレタンパク質をコードするDNA配列と組み合わせて使用することができる。このプレタンパク質はネイティブなペプチド配列を含み、タンパク質を特定の細胞区画（例えば、アポプラストや液胞）に標的化する。これらのコード配列は、植物細胞での強力な発現を確実にする植物プロモーター配列にライゲーションすることができる。このプロモーター配列は、ほとんどの植物細胞またはすべての植物細胞におけるタンパク質の強力な構成的発現を保証し得、微生物感染の影響を受けやすい特定の組織または細胞における発現を保証するプロモーターであり得、また、感染プロセス中の発現の強力な誘導を保証するプロモーターであり得る。これらのタイプの遺伝子カセットはまた、抗菌タンパク質をコードするmRNAの効率的な産生および安定化を確実にするため、抗菌タンパク質をコードする領域の3'に転写終結およびポリアデニル化配列を含む。本明細書に開示される抗菌ペプチドの効率的な発現は、その個々のDNA配列を、はるかに大きなペプチドをコードする配列に組み込むことにより促進され得る。

10

【0106】

当該技術分野で公知の方法を用いて、ペプチドをコードする遺伝子カセットを植物細胞で発現させる。第一に、遺伝子カセットを、以下のものを有するバイナリーベクターにライゲーションする。i) *Agrobacterium tumefaciens* TiプラスミドのT-DNAを挟む左右の境界配列、ii) 抗生物質耐性植物細胞の選択のための適当な選択マーカー遺伝子、iii) *Agrobacterium tumefaciens* および大腸菌の両方で機能する複製起点、および、iv) *Agrobacterium tumefaciens* および大腸菌のプラスミド保有細胞の選択を可能にする抗生物質耐性遺伝子。限定するものではないが、本明細書に開示されるペプチドのDNA配列は、プラスミド（pEXA128、pBR322、pUC19）、バクテリオファージ（λファージ、M13ファージ）、コスミド、BACまたはYAC等、当該技術分野で公知の任意のバイナリーベクターにクローニングすることができる。ペプチドのDNA配列を有するバイナリーベクターは、LBA4404株、GV3101株、AGL1株等の解除されたTiプラスミドを有する*Agrobacterium tumefaciens* 株、またはA4株やNCCP1885株等の*Agrobacterium rhizogenes* 株に、ヒートショック、エレクトロポレーション、または三親交配のいずれかによって導入することができる。次いで、これらの*Agrobacterium* 株を適当な植物摘出物または無傷の植物組織と共培養し、形質転換された植物細胞および／または再生株を抗生物質耐性を用いて選択することができる。あるいは、ペプチドのDNA配列を有するバイナリーベクターを細菌または真菌細胞により過剰発現させることもできる。

20

30

【0107】

本開示はまた、SEQ ID NO. 1と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 1と最大で3つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有し、任意にN末端シグナルペプチドの配列を含むペプチドを発現し、当該シグナルペプチド配列は、SEQ ID NO. 2と95%の配列同一性を有する、トランスジェニック植物を得る方法に関する。

40

【0108】

本方法は、以下の工程を含む：

(a) 任意選択で、SEQ ID NO. 1と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 1と最大で3つのアミノ酸が異なる配列を有するペプチドをコードする核酸配列を単離または合成する工程、

50

および核酸配列を適切な発現ベクターに組み込む工程、

(b) 遺伝子工学的方法により、核酸を少なくとも植物細胞に導入し、当該ペプチドを発現する形質転換植物細胞を作製する工程、

(c) 形質転換植物細胞をトランスジェニック植物全体へと再生する工程、および

(d) 適切なスクリーニング方法を用いて、当該ペプチドを発現するトランスジェニック植物を選択し、同定する工程。

【0109】

本明細書に開示される方法の別の実施形態では、生物学的ボンバードメントによってペプチドのDNA配列を植物細胞に導入する。生物学的ボンバードメントは、遺伝子ガンを用いて外来DNA配列を植物細胞に導入することを含む。本明細書に開示される抗菌ペプチドをコードするDNA配列を、金粒子などの金属粒子に付着させ、次いで植物細胞にボンバードする。

10

【0110】

さらに別の実施形態では、エレクトロポレーションによってペプチドのDNA配列を植物細胞に導入し、当該エレクトロポレーションは、電気パルスを使用して細胞膜に孔を作り、抗菌ペプチドをコードするDNA配列の当該細胞への中に入ることを可能にする。あるいは、抗菌ペプチドをコードするDNA配列を植物細胞に直接注入してもよい（マイクロインジェクション）。

【0111】

さらに別の実施形態では、ポリエチレングリコール（PEG）を用いて細胞膜に一時的な孔を形成させ、DNA配列が細胞内に入ることを可能にする、PEG媒介形質転換によって、当該ペプチドをコードするDNA配列を植物細胞に導入する。

20

【0112】

本明細書において開示されるトランスジェニック植物を得るために、任意の植物器官、組織または摘出物を遺伝子工学的方法とともに使用することができる。非限定的な例としては、個体細胞、カルス、種子、葉摘出物、茎摘出物、根摘出物、胚組織、分裂組織、花粉が挙げられる。

【0113】

概して、本明細書に開示されるペプチドを発現するトランスジェニック植物を得るために使用する特定の遺伝子工学的方法ならびに摘出物は、植物種、形質転換法の効率、および抗菌ペプチドの所望の発現レベル等の因子に依存する。

30

【0114】

本明細書に開示される方法のさらなる実施形態において、ペプチドを発現する植物全体に、形質転換細胞を再生する。

【0115】

ペプチドを発現する形質転換植物を同定し、選択する。このステップは、非形質転換計画を排除するために不可欠である。抗生物質耐性選択または除草剤耐性選択は、トランスジェニック植物に最もよく用いられる選択法の一つである。トランスジェニック植物を、抗生物質または除草剤に対する耐性を付与する遺伝子で形質転換させ、次いで当該抗生物質または除草剤を含む培地上で生育して、非形質転換植物を死滅させる、または生育を阻害する。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をエンコードする遺伝子でトランスジェニック植物を形質転換させて、レポーター遺伝子の発現に基づいて容易に同定および選択することができる。

40

【0116】

他の実施形態では、栄養選択によってトランスジェニック植物を選択する。この方法は、トランスジェニック植物が、非形質転換植物の生育に必須である特定の栄養素を欠く培地上で生育する能力に基づく。欠乏している栄養素を合成する能力を付与する遺伝子でトランスジェニック植物を形質転換する。

【0117】

マーカーフリー選抜は、選抜後にトランスジェニック植物から除去できる選択マーカー

50

を用いる。これは、Cre-loxシステムのような部位特異的組換えシステムを用いて達成することができ、外来DNAの痕跡を残すことなく選択マーカー遺伝子を除去することができる。

【0118】

本発明は、本発明をさらに説明する以下の非限定的な実施例によってさらに説明されるが、これらは本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、また限定するように解釈されるべきではない。

【実施例】

【0119】

(実施例1：ペプチドの生産)

CCN-51ココア豆の胚から全DNAを抽出し、プライマーForward__BamH1-5'CGCGGATCCTATGGCAGAAACAATAT3'、およびReverse__Kpn1-5'GGTACCTCATTTGCCCTTTGAAGCTCTTCTTCT3'を用いて、171bpのDNA断片(目的のDNA)を増幅した。

【0120】

増幅したDNA断片をクローニングベクターpEXA128のBamH1/Kpn1部位にライゲーションした。ペプチドのDNAを保持するプラスミドとpQE30過剰発現プラスミドの両方を、増幅のため大腸菌DH5α細胞に形質転換した。プラスミドは一晚培養したものから抽出し、37℃で2時間、BamHIとKpnIで消化し、1%アガロースゲルで分離した。直鎖化したpQE30プラスミドとpEXA128プラスミドからの挿入体をゲルから抽出し、挿入体をpQE30プラスミドにライゲーションした。pQE30過剰発現プラスミドはHISタグをコードし、本発明のペプチドの過剰発現によって、ペプチドとN末端HISタグからなる融合ペプチドが生じる。得られたプラスミドを大腸菌M15過剰発現細胞に形質転換した。一晚培養して抽出したプラスミドの塩基配列を決定し、予想される配列に一致するクローンのみを過剰発現に使用した。16mlの一晚培養液を用い、37℃で800mlの液体LB培地に接種した。OD600が0.6~0.8に達したのち、IPTGを最終濃度1mMまで添加し、過剰発現を誘導した。シグナルペプチドを含むペプチドを過剰発現する細胞は20℃で24時間、シグナルペプチドを含まないペプチドを過剰発現する細胞は37℃で5時間インキュベートした。

細胞を溶解し、上清をタンパク質抽出に供した後、Ni-NTAアガロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーに供した。イミダゾールを用いてHISタグタンパク質を溶出した後、精製したペプチドをSDS-PAGEを用いて分子量別に分離した。すなわち、タンパク質サンプル25μlを、追跡色素としてプロモフェノールブルーを含む6Xサンプルバッファー5μlと混合した。混合物を95℃で5分間加熱し、12.5%または15%(w/v)のアクリルアミドを含むSDS-PAGEゲル(83mm×65mm×1mm)にロードした。電気泳動は130Vで90分間行った。電気泳動後、ゲルをCoomassie(登録商標)Blue(45%(v/v)メタノール、10%酢酸、2.93×10⁻³M Coomassie(登録商標)Brilliant Blue G-250)で20分間染色するか、あるいはTowbinらによって先にProc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354に記載されている方法でPVDF膜に電気泳動した。プロットをPBST中の5%(w/v)牛乳で4℃で一晚処理した。その後、タンパク質プロットを、5%(w/v)粉乳を含むPBSTで1:2,000に希釈したポリクローナル抗体でプローブし、室温で2時間(h)インキュベートした。さらに、プロットを穏やかに振とうしながら室温で5分ずつ6回洗浄した。その後、プロットをHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体で、5%(w/v)粉乳を含むPBST中で1:10,000に希釈し、室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プロットをPBSTで6回洗浄し、それぞれ5分間、室温で穏やかに振とうした。最後に、MrukとChengがSpermatogenesis, 2011, 1, 121-122に記載したように、過酸化水素存在下、ルミノールを基質として、間接的に結合したHRPをその酵素活性により検出した。

10

20

30

40

50

【0121】

(結果)

SEQ ID NO. 1のリコンビナントペプチドをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ゲルから切り出し、トリプシン消化にかけた結果、図1に示すMALDI-TOF-MSペプチドフィンガープリントを得た。SEQ ID NO. 1によるペプチドを含む還元サンプルと非還元サンプルとの両方において、インタクトなマスフィンガープリントを用いて8.3 kDaの質量を検出した。SEQ ID NO. 1によるサンプルのLC-MS結果を図2に示す。

【0122】

(実施例2：ペプチドの合成)

SEQ ID NO. 1と同一の配列のペプチドは、Seramun Diagnostica GmbH (ハイデゼー、ドイツ)により化学合成できる。

【0123】

(実施例3：最小阻害濃度(MIC)アッセイ)

MICアッセイは、化合物が微生物集団の増殖を阻害する最低濃度を決定する。本明細書に記載のペプチドの抗菌力を、国際公開第1998/027805号で議論されている2つの他のAMP、TcAMP 1およびTcAMP 2、ならびに抗生物質または殺菌剤の活性と比較した。いくつかの細菌種および真菌種に対して比較MICアッセイを実施した(表1)。

【0124】

SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、およびSEQ ID NO. 7によるペプチドを、0.39 µg/mlから303 µg/mlの範囲の濃度配列を作成するために連続希釈した。

【0125】

Pantoea、StaphylococcusおよびListeriaは、1.7%カゼインペプトン、0.3%大豆ペプトン、0.25%グルコース、0.5%NaCl、0.25%K₂HPO₄、および任意で1.5%寒天からなるTrypticase Soy Broth (TSY) 培地で培養した。Candida細胞は、1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース、任意で2%寒天からなる酵母抽出ペプトンデキストロース(YPD)ブロス培地で培養した。Ceratocystis、Botrytis、Leptosphaeria、Mycosphaerella、SclerotiniaおよびVerticilliumは、2.4%のDifcoプレミックスブロスおよび任意で1.5%の寒天からなるPotato Dextrose Agar (PDA) 培地で培養した。

【0126】

MICアッセイでは、細菌と真菌をそれぞれの培地を用いた寒天平板で培養した。前培養は、それぞれの液体培地5 mlに単一の細菌コロニーまたは真菌の薄片を接種して調製した。600 nmの光学密度(OD)を1~5日後に測定し、OD 600が1になるように調整した。この細胞懸濁液を用いて1:500希釈液を調製し、1 mlあたり約2 × 10⁶の微生物細胞に対応させた。

【0127】

MICを評価するため、試験抗菌ペプチドで96ウェルプレートで調製した。各ウェルには、100 µlの微生物細胞培養液、90 µlの培養培地、10 µlのペプチドまたは対応する希釈度のコントロールを入れた。プレートは各被験菌に最適な増殖温度で一晩(ON)培養した。結果は目視で評価し、増殖の有無に基づいてMICを決定した。

【0128】

表1は、MICアッセイで試験した生物である。種名、分類、生育条件を示す。DSMはGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ、Braunschweig、Germany)の注文番号である。SFはJena Microbial Resource

10

20

30

40

50

Collection (JMRC、Jena、Germany) から入手した生物を指す。

【0129】

【表1】

種名	注文番号	分類	増殖培地	増殖温度
<i>Pantoea agglomerans</i>	JUB-CC-3253	グラム陰性菌	TSY	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	DSM 11729	グラム陽性菌	TSY	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 102976	グラム陽性菌	TSY	37°C
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	酵母	YPD	30°C
<i>Ceratosystis paradoxa</i>	DSMZ 63054	真菌	PDA	18°C
<i>Botrytis cinerea</i>	DSMZ 877	真菌	PDA	24°C
<i>Leptosphaeria maculans</i>	SF 70	真菌	PDA	18°C
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	DSMZ 62763	真菌	PDA	30°C
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SF 79	真菌	PDA	18°C
<i>Verticillium dahliae</i>	SF 76	真菌	PDA	28°C

MICアッセイは、少なくとも2つの独立した複製で、異なる開始濃度のペプチドを用いて実施した。事前テストでは、テストしたタンパク質を精製するために実施したどのステップも、得られたMICに影響を及ぼさないことが示された。

【0130】

(結果)

真菌種に対するSEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6およびSEQ ID NO. 7によるペプチドについて得られたMIC値を表2に示す。本発明のペプチドはすべて、先行技術のペプチドよりも低濃度で真菌の増殖をより効率的に阻害した。

【0131】

表2は、真菌類を試験菌とし、本発明のペプチド (SEQ ID NO. 1) および先行技術のペプチド (SEQ ID NO. 4、NO. 5) を用いたMICアッセイの結果である。クロトリマゾールを参照として用いた。

【0132】

【表 2】

真菌	最小発育阻止濃度 (μ g/ml)			
	クロトリマゾール	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 4	SEQ ID NO. 5
<i>Candida albicans</i>	3.1	3.85	13.1	12.75
<i>Ceratosystis paradoxa</i>	0.4	1.9	4.8	4.7
<i>Botrytis cinerea</i>	6.25	3.5	14.5	12.75
<i>Leptosphaeria maculans</i>	0.4	12.5	37.9	9.4
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	3.1	2.8	13.12	10.68
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	25	10.4	27.2	23.5
<i>Verticillium dahliae</i>	1.56	3.85	14.5	12.7

10

20

【0133】

SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 4およびSEQ ID NO. 5によるペプチドの細菌種に対するMIC値を表3に示す。SEQ ID NO. 1による配列を有するペプチドは、試験したすべての真菌種に対して阻害効果を有した。さらに、本発明のペプチドは、SEQ ID NO. 5を有するペプチドによって最も効果的に阻害された *Leptosphaeria maculans* を唯一の例外として、試験した菌種のほとんど全てにおいて、先行技術のペプチドよりも低濃度で、真菌の増殖をより効果的に阻害した。

30

【0134】

表3は、細菌種をテスター生物とし、本発明のペプチド (SEQ ID NO. 1) および先行技術のペプチド (SEQ ID NO. 4、NO. 5) を用いたMICの結果である。ゲンタマイシンおよびストレプトマイシンを参照として用いた。

【0135】

40

50

【表 3】

細菌	最小発育阻濃度 (μg/ml)				
	ゲンタマイシン	ストレプトマイシン	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 4	SEQ ID NO. 5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.8	>125	3.2	13	13.6
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.4	7.8	1.6	3.25	13.6
<i>Pantoea agglomerans</i>	1.56	NA	2.5	7.9	9.45

【配列表】

SEQ ID NO. 1 (本発明のある実施形態のペプチド)
YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCQRCER
EYKEQQRQQEEEELQRQ

SEQ ID NO. 2 (本発明のある実施形態のシグナルペプチド)
MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA

SEQ ID NO. 3 (本発明のある実施形態のペプチド)
MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSAYGRKQYERDPRQ
QYEQCQRRCESEATEEREQEQCQRCEREYKEQQRQQEEE
LQRQ

SEQ ID NO. 4 (先行技術のペプチド)
YERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCQRCEREYKEQ
QRQQEEE

SEQ ID NO. 5 (先行技術のペプチド)
LQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQQQCQRKWEQYKEQERGE
HENYHNHKKNRSEEEEGQQR

SEQ ID NO. 6 (Forward_BamH1 forward DNA プ
ライマー)
CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT

SEQ ID NO. 7 (Reverse_Kpn1 forward DNA プラ
イマー)
GGTACCTCATTGCCTTTGAAGCTCTTCTTCTT

SEQ ID NO. 8 (HQ タグ)
HQHQHQ

SEQ ID NO. 9 (HN タグ)
HNHNHNHNHNHN

SEQ ID NO. 10 (HAT タグ)
KDHLIHNVHKEEHAHAHNK

SEQ ID NO. 11 (ALFA タグ)
SRLEEEELRRRLTE

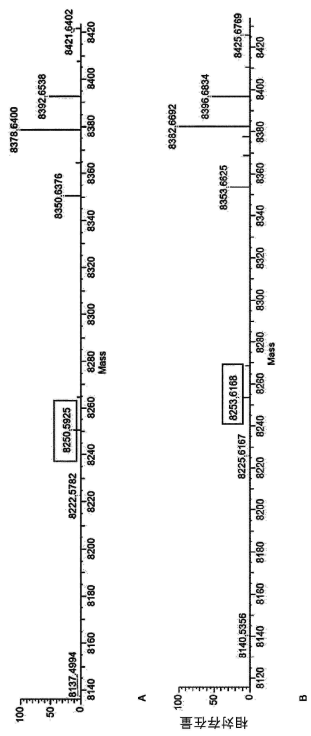
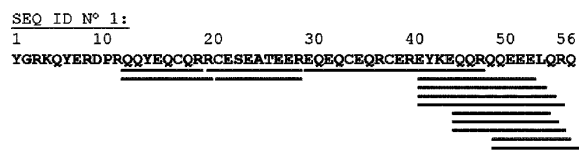
SEQ ID NO. 12 (Avi タグ)
GLNDIFEAQKIEWHE

SEQ ID NO. 13 (C-タグ)
EPEA

SEQ ID NO. 14 (Calmodulin-タグ)
KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL
SEQ ID NO. 15 (E-タグ)
GAPVPYPDPLEPR
SEQ ID NO. 16 (FLAG-タグ)
DYKDDDDDK
SEQ ID NO. 17 (HA-タグ)
YPYDVPDYA
SEQ ID NO. 18 (Myc-タグ)
EQKLISEEDL
SEQ ID NO. 19 (NE-タグ)
TKENPRSNQEEESYDDNES
SEQ ID NO. 20 (Rho1D4 タグ)
TETSQVAPA
SEQ ID NO. 21 (S-タグ)
KETAAAKFERQHMD S
SEQ ID NO. 22 (SBP タグ)
DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP
SEQ ID NO. 23 (Strep-タグ)
WSHPQFEK

【図面】
【図 1】
【図 2】

FIG. 1



10

20

30

40

50

【配列表】
2025515678000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年3月8日(2024.3.8)

【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】

SEQ ID NO. 1と95%以上の配列同一性を示す配列、またはSEQ ID NO. 1と最大で3つのアミノ酸が異なる配列を有する、ペプチド。 10

【請求項2】

前記ペプチドはSEQ ID NO. 1による配列を有する、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

前記ペプチドは、そのN末端でシグナルペプチドと融合している、請求項1または2に記載のペプチド。

【請求項4】

前記シグナルペプチドは、SEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示す配列、またはSEQ ID NO. 2による配列を有する、請求項3に記載のペプチド。 20

【請求項5】

前記ペプチドは抗細菌活性および／または抗真菌活性を有する、請求項1～4のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項6】

前記活性はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する活性であるか、ならびに／または真菌に対する活性であり、前記真菌は好ましくは菌糸真菌(hyphal fungi)および酵母である、請求項1～5のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項7】

前記ペプチドは、テオブロマカカオ由来またはテオブロマカカオから単離されたペプチド、好ましくはテオブロマカカオ種CCN-51由来またはテオブロマカカオ種CCN-51から単離されたペプチドである、請求項1～6のいずれか一項に記載のペプチド。 30

【請求項8】

前記ペプチドは、リコンビナントペプチドまたは合成ペプチドである、請求項1～7のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか一項に記載のペプチドおよび賦形剤を含む、組成物。

【請求項10】

前記組成物は液体、半固体、固体、もしくはガス状の組成物であり、および／または前記組成物は、剤形が、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、エアロゾル、ペースト、シロップ、懸濁液、乳濁液、もしくは溶液である、請求項9に記載の組成物。 40

【請求項11】

治療用のペプチドまたは組成物であって、請求項1～8のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項9もしくは10に記載の組成物。

【請求項12】

細菌感染症および／または真菌感染症の治療を必要とする対象において使用するペプチドまたは組成物であって、請求項1～8のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項9もしくは10に記載の組成物。

【請求項13】

前記対象はヒトまたは動物である、請求項11～12に記載のペプチド。

【請求項14】 50

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項 9 もしくは 10 に記載の組成物の、作物保護における飼料添加物もしくは食品添加物としての使用、防腐剤としての使用、除染剤としての使用、または化粧用途における使用。

【請求項 15】

前記ペプチドまたは組成物は、植物における病原体の防除に使用されるペプチドまたは組成物であって、前記植物は好ましくは作物である、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

前記病原体は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または真菌の群から選択される、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のペプチドを生産する方法であって、前記ペプチドを組換え技術または合成により生産する、方法。

【請求項 18】

SEQ ID NO. 1 による配列を有するペプチドのコード配列を含むベクターであって、任意に、N 末端にシグナルペプチドの配列と融合しているベクターにおいて、前記シグナルペプチドの配列は、好ましくは SEQ ID NO. 2 と 95 % 以上の配列同一性を有し、前記ベクターは発現系における前記ペプチドの発現を可能にするように設計されている、ベクター。

【請求項 19】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のペプチドを発現する、トランスジェニック植物。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のトランスジェニック植物を生産する方法であって、前記方法は、前記ペプチドをエンコードする核酸を植物細胞に導入することにより、前記ペプチドを発現する形質転換植物細胞を作製し、前記形質転換植物細胞をトランスジェニック植物に再生する工程を含む、方法。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のペプチドまたは組成物によりコーティングされた、植物の種子。

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2023/062398
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/415 A61P31/04 A61P31/10 A61K38/16 A01N37/00
A01N65/08

ADD.

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)

C07K A61P A61K A01N

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)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/27805 A1 (COOPERATIVE RESEARCH CENTRE FO [AU]; MANNERS JOHN MICHAEL [AU] ET AL.) 2 July 1998 (1998-07-02) cited in the application page 3, line 26 - page 4, line 31 examples 1-18	1-22
A	JOHN P. MARCUS ET AL: "Peptide Fragments From Plant Vicilins Expressed in Escherichia Coli Exhibit Antimicrobial Activity In Vitro", PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER., vol. 26, no. 2, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 75-87, XP055592751, NL ISSN: 0735-9640, DOI: 10.1007/s11105-008-0024-9 cited in the application figure 2; table 2	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 August 2023

Date of mailing of the international search report

16/08/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, Jürg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No	
Information on patent family members				PCT/EP2023/062398	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9827805	A1	02-07-1998	AT	343927 T	15-11-2006
			BR	9713772 A	21-03-2000
			CA	2274730 A1	02-07-1998
			CN	1244769 A	16-02-2000
			DE	69736904 T2	21-06-2007
			EP	1006785 A1	14-06-2000
			ES	2277363 T3	01-07-2007
			JP	2001510995 A	07-08-2001
			KR	20000057699 A	25-09-2000
			NZ	336337 A	26-05-2000
			US	2002168392 A1	14-11-2002
			US	2003171274 A1	11-09-2003
			WO	9827805 A1	02-07-1998

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/29	(2006.01)	C 1 2 N	15/29
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10
A 0 1 P	3/00	(2006.01)	A 0 1 P	3/00
A 0 1 N	37/46	(2006.01)	A 0 1 N	37/46
A 0 1 N	65/34	(2009.01)	A 0 1 N	65/34

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
 ベルギー国 1 5 0 0 ハレ ブリュッセルセステーンヴェーク 4 5 0

(72)発明者 マシアス ウルリッヒ

ドイツ国 2 8 7 5 9 ブレーメン カンプス リング 1

(72)発明者 ニコライ クンネルト

ドイツ国 2 8 7 5 9 ブレーメン カンプス リング 1

(72)発明者 ネハ クマリ

ドイツ国 0 1 4 5 4 ラーデベルク アム ヴァル 4 5 セー

F ターム (参考)

4B018 MD57 ME09 MF01

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA20 BA23 CA15 CA53 CA59 DA42

NA14 ZB351 ZB352

4H011 AA01 AA03 BB06 BB22

4H045 AA10 AA20 AA30 BA20 CA33 EA01 EA06 EA29 FA74