

(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2007-504810

(P2007-504810A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 B 1 5 0
<b>C 12 N 9/88</b> (2006.01)	C 12 N 9/88	4 B 0 2 4
<b>C 12 P 21/02</b> (2006.01)	C 12 P 21/02	C 4 B 0 5 0
<b>AO 1 K 67/027</b> (2006.01)	AO 1 K 67/027	4 B 0 6 3
<b>C 12 N 1/15</b> (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 44 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2006-525631 (P2006-525631)	(71) 出願人 500586299 ノボザイムス アクティーゼルスカブ
(86) (22) 出願日	平成16年9月13日 (2004.9.13)	デンマーク国, デーコー-2880 バグ
(85) 翻訳文提出日	平成18年3月9日 (2006.3.9)	スパエルト, クロシェイバイ 36
(86) 國際出願番号	PCT/DK2004/000605	(74) 代理人 100099759 弁理士 青木 篤
(87) 國際公開番号	W02005/024002	(74) 代理人 100077517 弁理士 石田 敬
(87) 國際公開日	平成17年3月17日 (2005.3.17)	(74) 代理人 100087871 弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	PA200301310	(74) 代理人 100087413 弁理士 古賀 哲次
(32) 優先日	平成15年9月11日 (2003.9.11)	(74) 代理人 100108903 弁理士 中村 和広
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗微生物剤の組換え製造

## (57) 【要約】

本発明は、収量および/または全生産経済性を改良する目的で、抗微生物剤および酵素の共発現を使用することに関する。抗微生物剤の例は、抗微生物性ペプチド、例えば、ラクトフェリンおよび抗微生物性酵素、例えば、リゾチームおよびグルコースオキシダーゼであり、そして酵素の例は、エンドグルカナーゼ、キシラナーゼ、フィターゼ、プロテアーゼ、ガラクタナーゼ、マンナナーゼ、デキシトラナーゼ、ガラクトシダーゼ、ペクチン酸リーゼ、-アミラーゼおよびグルコアミラーゼである。抗微生物剤および酵素および切断可能なリンカーを含んでなる融合生成物は新規であり、そして動物飼料および動物飼料添加物において使用することができる。本発明は、また、保護ペプチドドメイン中に含有されるアミノ酸残基の少なくとも50%がD (Asp) および/またはE (Glu) である、保護ドメインの使用に関する。保護ドメインまたはクエンチングドメインは、発現間に抗微生物性ペプチドを一時的にかつ可逆的に不活性化する働きをする。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

抗微生物剤をコードする第1核酸配列と、酵素をコードする第2異種核酸配列とを含んでなる組換え微生物宿主細胞。

**【請求項 2】**

第1および/または第2核酸配列が宿主細胞の染色体中に組込まれている、請求項1に記載の宿主細胞。

**【請求項 3】**

第1ならびに第2核酸配列を組込んでいるDNA構築物を含有する、請求項1に記載の宿主細胞。

**【請求項 4】**

第1核酸配列が第1 DNA構築物中に組込まれており、そして第2核酸配列が第2 DNA構築物中に組込まれている、請求項1に記載の宿主細胞。

**【請求項 5】**

第1ならびに第2核酸配列を組込んでいる第3 DNA構築物をさらに含んでなる、請求項4に記載の宿主細胞。

**【請求項 6】**

適当な発現宿主中の酵素および抗微生物剤の発現を指令する1種または2種以上の制御配列に作用可能に連鎖された、抗微生物剤をコードする第1核酸配列、および酵素をコードする第2核酸配列を含んでなり、ここで第2核酸配列が発現宿主に対して異種である、核酸構築物。

**【請求項 7】**

下記の工程を含んでなる酵素および/または抗微生物剤を製造する方法：(a) 請求項1～5のいずれかに記載の組換え宿主細胞を培養して、酵素および抗微生物剤を含んでなる上清を調製し、そして (b) 酵素および/または抗微生物剤を回収する。

**【請求項 8】**

酵素、抗微生物剤、および切断可能なリンカーを含んでなる融合生成物。

**【請求項 9】**

下記の成分を含んでなる動物飼料添加物：

- (a) 少なくとも1種の請求項8に記載の融合生成物、
- (b) 少なくとも1種の脂溶性ビタミン、および/または
- (c) 少なくとも1種の水溶性ビタミン、および/または
- (d) 少なくとも1種の微量ミネラル。

**【請求項 10】**

50～800 g/kgの粗タンパク質含量を有し、そして少なくとも1種の請求項8に記載の融合生成物を含んでなる動物飼料組成物。

**【請求項 11】**

酵素および抗微生物剤を発現することができる、トランスジェニック、非ヒト動物、または生成物、またはそれらの要素。

**【請求項 12】**

動物飼料における請求項8に記載の融合生成物の使用。

**【請求項 13】**

抗微生物剤の収量を改良しおよび/または全生産経済性を改良するツールとしての抗微生物剤および酵素の共発現の使用。

**【請求項 14】**

抗微生物性ペプチドの組換え発現における、保護ペプチド中に含有されるアミノ酸残基の少なくとも50%がD (Asp) および/またはE (Glu) である、保護ペプチドの使用。

**【請求項 15】**

下記の工程を含んでなる、少なくとも1つのD (Asp) および/またはE (Glu) を含んでなる保護ペプチドを同定する方法：

10

20

30

40

50

- a) 少なくとも1つのDおよび/またはEを含んでなるペプチド保護候補を準備し、
- b) ペプチド保護候補をコードする第1 DNA配列と、抗微生物性ペプチドをコードする第2 DNA配列とを含んでなるDNA構築物を調製し、
- c) 宿主細胞をb) のDNA構築物で形質転換し、形質転換された宿主細胞を培養してDNA構築物を発現させ、
- d) 形質転換された宿主細胞の生活能力および/または抗微生物性ペプチドの収量を推定し、そして
- e) 工程b) に従うDNA構築物において、工程c) に従う宿主細胞の形質転換のために使用して、工程d) に従い推定したとき、宿主細胞の生活能力を増加させ、および/または抗微生物性ペプチドの収量を増加させるペプチド保護候補を同定する。

10

【請求項 1 6】

抗微生物性ペプチドの組換え発現における請求項15に記載の方法により同定された保護ペプチドの使用。

【請求項 1 7】

保護ペプチドをコードするDNA配列をさらに含んでなる、請求項1～5のいずれかに記載の宿主細胞。

【請求項 1 8】

保護ペプチドをコードするDNA配列をさらに含んでなる、請求項6に記載の核酸構築物。

【請求項 1 9】

組換え宿主細胞が請求項17に記載の宿主細胞である、請求項7に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

保護ペプチドをさらに含んでなる、請求項8に記載の融合生成物。

【請求項 2 1】

保護ペプチドの使用をさらに含んでなる、請求項13に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、抗微生物剤の組換え製造の分野、特に抗微生物剤および酵素の共発現、ならびに保護メイン中に含有されるアミノ酸残基の少なくとも50%がD (アスパラギン、Asp) および/またはE (グルタミン、Glu) である保護ドメインの使用に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

WO 96/14413には、アスペルギルス (*Aspergillus*) の種々の株において組換えヒトラクトフェリンを発現させるために種々の発現ベクターを使用することが開示されている。アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) における発現のための1つの発現プラスミドは、ヒトラクトフェリンに融合した、グルコアミラーゼプロモーター、シグナル配列、およびアスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) の内因的プロ-グルコアミラーゼの498アミノ酸をコードする配列を含有する。

40

【0 0 0 3】

アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 中でヒトラクトフェリンを発現させるために、発現プラスミドは -アミラーゼプロモーター、分泌シグナル配列および成熟 -アミラーゼの第1コドンをコードするアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) AMY II遺伝子を組込んでいる。アスペルギルス・ニヅランス (*Aspergillus nidulans*) 中でヒトラクトフェリンを発現させるために、発現プラスミドは、アスペルギルス・ニヅランス (*A. nidulans*) からのアルコールデヒドロゲナーゼプロモーターを包含する、制御された遺伝子発現に必要なすべての調節因子を含有するアスペルギルス・ニヅランス (*A. nidulans*) *alcA*遺伝子の300 bpの5' - フランкиング配列を組込んでいる。

【0 0 0 4】

WO 96/28559には、カチオンタンパク質の抗微生物活性を支持するために、アニオン部

50

分との融合タンパク質として、ある種の抗微生物性タンパク質を発現させることが開示されている。アニオンキャリヤーペプチドの例は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) からのプロテインA、プロテインAの2つの合成 IgG結合性ドメイン (ZZ) 、およびシュードモナス・エルジノーサ [ 緑膿菌 ] (*Pseudomonas aeruginosa*) からの外膜タンパク質Fである。

【0005】

WO 98/54336には、少なくとも2つのシステイン残基を有する負に帯電した酸性ペプチドとの融合タンパク質として、ある種の抗微生物性タンパク質を発現させることが開示されている。

WO 00/75344には、種々のリンカー、例えば、PEPT (配列番号79)、EPTP (配列番号80)、PTEP (配列番号81)、TPEP (配列番号82) またはIEGR (配列番号83) (の反復) を使用して、ペクチン酸リアーゼとの融合物として外因的ポリペプチドを発現させることが開示されている。

【0006】

Okamoto 他、*Plant Cell Physiol.* 39 (1): 57-63 (1998) には、トランスジェニックタバコ植物におけるGUS融合による抗微生物性ペプチドSarcotoxin IAの発現が開示されている。

本発明の目的は、抗微生物剤の改良された製造方法を提供することである。

【発明の開示】

【0007】

発明の要約

第1の面において、本発明は、抗微生物剤をコードする第1核酸配列と、酵素をコードする第2異種核酸配列とを含んでなる組換え微生物宿主細胞に関する。核酸配列のいずれか、好ましくは両方は宿主細胞の染色体中に組込まれることができるか、あるいは1または2以上の染色体外実在物中に存在することができる。

【0008】

第2の面において、本発明は、適当な発現宿主中の酵素および抗微生物剤の発現を指令する1種または2種以上の制御配列に作用可能に連鎖された、抗微生物剤をコードする第1核酸配列、および酵素をコードする第2核酸配列を含んでなり、ここで第2核酸配列が発現宿主に対して異種である、核酸構築物に関する。

第3の面において、本発明は、本発明の組換え宿主細胞を使用することによって、酵素および/または抗微生物剤を製造する方法に関する。

【0009】

第4の面において、本発明は、酵素、抗微生物剤、および切断可能なリンカーを含んでなる融合生成物、ならびに動物飼料および動物飼料添加物におけるそれらの使用に関する。

第5の面において、本発明は、ペプチドの収量を改良しおよび/または全生産経済性を改良するツールとしての、ペプチドおよび酵素の共発現の使用に関する。

【0010】

第6の面において、本発明は、抗微生物性ペプチドの組換え発現における、発現間にペプチドを一時的にかつ可逆的に不活性化する働きをするクエンチングドメインの使用に関し、ここでペプチド保護ドメイン中に含有されるアミノ酸残基の少なくとも50%はDおよび/またはEである。本発明は、また、このようなクエンチングドメインを同定する方法、この方法により同定されたクエンチングドメイン、および抗微生物性ペプチドの組換え製造におけるそれらの使用に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

発明の詳細な説明

一般に、数を表示しない場合は、例えば、第1および第2核酸配列、抗微生物剤、酵素、および種々のDNA構築物の関係において、「少なくとも1種」を意味する。

10

20

30

40

50

## 【0012】

本発明は、少なくとも1種の酵素と少なくとも1種の抗微生物剤との共発現に関する。酵素および抗微生物剤は、宿主細胞の染色体から、異なるDNA構築物から、1つのDNA構築物から、またはこれらの技術の組合せを使用して共発現させることができる。異なる構築物を使用するとき、異なる適当なマーカー、および異なる複製起点を使用することができる。

## 【0013】

ただ1つの構築物を使用するとき、遺伝子を1または2以上のプロモーターから発現させることができる。1つのプロモーター（ジシストロンまたは多シストロン）の調節下にクローニングする場合、遺伝子がクローニングされる順序はタンパク質の発現レベルに影響を与えることがある。また、酵素および抗微生物剤は、融合タンパク質として、酵素をコードする遺伝子がインフレームで抗微生物剤をコードする遺伝子に対して融合されている融合タンパク質として、発現させることができる。抗微生物剤が選択した宿主細胞の生長に消極的に影響を及ぼす場合、抗微生物活性はペプチドを保護ペプチド（クエンチングドメイン）との融合物として発現させることによってクエンチングすることができ、ここでアミノ酸残基の少なくとも50%はDおよび/またはE (Aspおよび/またはGlu) である。

10

## 【0014】

抗微生物剤

本発明の関係において、用語「抗微生物剤」は、抗微生物活性をもつ化合物を表示する（下文参照）。抗微生物剤の例は、抗微生物性ペプチドおよび抗微生物性酵素である。

20

## 【0015】

抗微生物性酵素の例は、細胞壁を崩壊し、毒性化合物を発生させ、必須栄養素を除去し、または望ましくない微生物の生長に必須である化合物を不活性化する酵素である。リゾチーム（1,4-アセチルムラミダーゼ活性を有する酵素）は、グラム陽性細菌の細胞壁を崩壊する抗微生物性酵素の1例である。オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ（EC 1.1.3.4）は、多数の望ましくない微生物に対して毒性である過酸化水素を発生する。

20

## 【0016】

毒性化合物を発生する抗微生物性酵素の他の例は、キサンチンオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、リパーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、およびホスホリパーゼである。また、グルコースオキシダーゼは、必須栄養素、すなわち、酸素を除去し、これにより望ましくない好気的微生物の生長を防止する酵素の1例である。最後に、スルフヒドリルオキシダーゼは、必須化合物、すなわち、その活性が完全なスルフヒドリル基に依存する、望ましくない微生物の必須酵素を不活性化する抗微生物性酵素の1例である。これらの酵素はよく知られており、そして組換え的に製造されてきており、リゾチームおよびグルコースオキシダーゼについては、例えば、それぞれ下記の文献を参照のこと：Bio/Technology 8、1990、741-745、およびWO 89/12675。

30

## 【0017】

特定の態様において、抗微生物性酵素はリゾチーム、グルコースオキシダーゼ、スルフヒドリルオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、およびキサンチンオキシダーゼから選択され、好ましくは抗微生物性酵素はリゾチームおよび/またはグルコースオキシダーゼである。

40

次に抗微生物性ペプチドに関すると、特定の態様において、本発明に従い使用する抗微生物性ペプチドは100以下のアミノ酸を含む。

## 【0018】

表現ある数（例えば、100）「以下のアミノ酸を含む」は、ペプチド配列中のアミノ酸の数が100より小さいか、あるいはそれに等しいことを意味する。

特定の態様において、ペプチドは、100以下のアミノ酸を含んでなり、または有し、またはから成る（そして後述する追加の上限の数値について逆もまた同じ）。

それ以上の特定の態様において、ペプチドは90、80、70、60、50以下、または40以下の

50

アミノ酸を含む。

また、ペプチドはオリゴペプチドとして表示することができる。

他の特定の態様において、ペプチドは少なくとも3のアミノ酸を含む。

#### 【0019】

表現「少なくともある数（例えば、3）のアミノ酸を含む」は、ペプチド配列中のアミノ酸の数が3より大きいか、あるいはそれに等しいことを意味する。

追加の特定の態様において、ペプチドは少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または少なくとも20のアミノ酸を含む。

なおそれ以上の特定の態様において、ペプチドは少なくとも3のアミノ酸を含んでなり、または有し、またはから成る（そして後述する追加の下限の数値について逆もまた同じ）。

本発明に従い使用する抗微生物性ペプチドの例は下に列挙される。

#### 【0020】

##### 抗微生物活性

用語「抗微生物活性」は、微生物細胞を殺すか、あるいは微生物細胞の増殖を阻害することができる活性として本明細書において定義される。本発明の関係において、用語「抗微生物性」は、殺菌および/または殺真菌および/または静真菌作用および/または殺ウイルス作用が存在することを意味することを意図する。

#### 【0021】

用語「殺菌」は、細菌の増殖を阻害する、すなわち、細菌細胞の増殖を阻害することができるとして理解すべきである。用語「静真菌」は、真菌の増殖を阻害する、すなわち、真菌細胞の増殖を阻害することができるとして理解すべきである。用語「殺ウイルス」は、ウイルスを不活性化することができるとして理解すべきである。用語「微生物細胞」は、細菌細胞または真菌細胞（酵母を含む）を意味する。

#### 【0022】

本発明の関係において、用語「微生物細胞の増殖を阻害する」は、細胞が非増殖状態にあること、すなわち、細胞が増殖することができないことを意味することを意図する。

本発明の目的に対して、抗微生物活性は下記の文献に記載されている手順に従い決定することができる： Lehrer 他、Journal of Immunological Methods Vol. 137 (2) pp. 167-174 (1991)。

#### 【0023】

抗微生物活性を有するペプチド、および/または酵素は、抗微生物活性を有するペプチドの25%(w/w)の水溶液中で、好ましくは10%(w/w)の水溶液中で、より好ましくは5%(w/w)の水溶液中で、なおより好ましくは1%(w/w)の水溶液中で、最も好ましくは0.5%(w/w)の水溶液中で、特に0.1%(w/w)の水溶液中で、20において8時間、好ましくは4時間、最も好ましくは1時間、特に30分のインキュベーション後に、大腸菌 (Escherichia coli) (DSM 1576) の生きている細胞の数を1/100に減少させることができる。

#### 【0024】

また、抗微生物活性を有するペプチド、および/または酵素は、1000 ppmの濃度で添加したとき、好ましくは500 ppmの濃度で添加したとき、より好ましくは250 ppmの濃度で添加したとき、なおより好ましくは100 ppmの濃度で添加したとき、最も好ましくは50 ppmの濃度で添加したとき、特に25 ppmの濃度で添加したとき、微生物増殖基質中で25において24時間大腸菌 (Escherichia coli) (DSM 1576) の発芽後成長を阻害することができる。

#### 【0025】

抗微生物活性を有するペプチド、および/または酵素は、抗微生物活性を有するペプチドの25%(w/w)の水溶液中で、好ましくは10%(w/w)の水溶液中で、より好ましくは5%(w/w)の水溶液中で、なおより好ましくは1%(w/w)の水溶液中で、最も好ましくは0.5%(w/w)の水溶液中で、特に0.1%(w/w)の水溶液中で、20において30分のインキュベーション後に、バシラス・サチリス (Bacillus subtilis) (ATCC 6633) の生きている細胞の数を1/1

20

30

40

50

00に減少させることができる。

【0026】

また、抗微生物活性を有するペプチド、および/または酵素は、1000 ppmの濃度で添加したとき、好ましくは500 ppmの濃度で添加したとき、より好ましくは250 ppmの濃度で添加したとき、なおより好ましくは100 ppmの濃度で添加したとき、最も好ましくは50 ppmの濃度で添加したとき、特に25 ppmの濃度で添加したとき、微生物増殖基質中で25において24時間バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) (ATCC 6633) の発芽後成長を阻害することができる。

【0027】

抗微生物活性についての詳細なアッセイは実施例1に記載されている。

10

特定の態様において、抗微生物活性に対する代替として、または抗微生物活性に加えて、ペプチド、および/または酵素は免疫刺激作用を有する。免疫刺激作用は、マクロファージにおける酸化的バーストの増加を通して、または選択的にリンパ球の増殖の増加を通して仲介することができる。

【0028】

抗微生物性ペプチド (AMP) の例は、膜活性抗微生物性ペプチド、または細胞内ターゲットで影響を受ける/それと相互作用する抗微生物性ペプチド、例えば、細胞DNAに結合する抗微生物性ペプチドである。一般に、それらは正常の哺乳動物細胞に対して低い溶血活性および/または細胞障害性を有する。溶血は赤血球について実施し、ヘモグロビンの放出を通して測定される。細胞障害は、テトラゾリウム減少アッセイ (Boehringer-Mannheim、米国インジアナポリス) に従い関係する細胞系統、例えば、ヒトME 180頸部上皮細胞 (ATCC HTB-33) またはA 549ヒト肺上皮細胞 (ATCC CCL-185) について実施することができる。

20

【0029】

一般に、本発明に従い使用する抗微生物性ペプチドは、高度にカチオン性および疎水性である。典型的には、それはいくつかのアルギニンおよびリシン残基を含有し、そして単一のグルタミン酸塩またはアスパラギン酸塩を含有しないことがある。通常、それは大きい比率の疎水性残基を含有する。一般に、ペプチドは両親媒性構造を有し、1つの表面は高度に陽性であり、そして他方の表面は疎水性である。

30

【0030】

ペプチドおよびエンコーディングスクレオチド配列は、植物、無脊椎動物、昆虫、両生類および哺乳動物に由来するか、あるいは微生物、例えば、細菌および真菌に由来することができる。

抗微生物性ペプチドは、ターゲット微生物の細胞膜に対して、例えば、膜に対する非特異的結合を通して、通常膜に並行の向きで作用し、二層のうちの1つの面とのみ相互作用することができる。

【0031】

典型的には、抗微生物性ペプチドは、5つの主要なクラスの1つに属する構造を有する：-らせんペプチド、シスチンに富んだ (デフェンシン様) ペプチド、-シートペプチド、正規アミノ酸の異常な組成をもつペプチド、および異常なおよび/または修飾されたアミノ酸を含有するペプチド。なおそれ以上の例は、アスペルギルス・ギガンテウス (*Aspergillus giganteus*) およびアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) に由来する抗真菌ペプチド (AFP)、例えば、WO 02/090384に開示されているものである。

40

【0032】

特定の態様において、本発明に従い使用する抗微生物性ペプチドは、(i) -らせんペプチド、(ii) シスチンに富んだペプチド、(iii) -シートペプチド、(iv) 正規アミノ酸の異常な組成をもつペプチド、(v) 異常な修飾されたアミノ酸を含有するペプチド、および/または (vi) 抗真菌ペプチドである。

【0033】

追加の特定の態様 (vii) において、-らせんペプチドは下記から選択される：ノビス

50

ピリン (Novispirin) 、マガニン (Magainin) 1、マガニン2、セクロピン (Cecropin) A 、セクロピンB、セクロピンP1、CAP 18、アンドロピン (Andropin) 、クラバニン (Clavamin) AK、スチエリン (Styelin) D、スチエリンC、ブフォリン (Buforin) II、およびWO 02/000839、DK 2004 000800、PCT/DK 2004/000399、および/またはPCT/DK 2004/000400に記載されている抗微生物性ペプチド、ならびに抗微生物活性を保持するそれらの変異型またはフラグメント。

【0034】

それ以上の特定の態様 (viii) において、シスチンに富んだペプチドは下記から選択される：プレスタシン (Plestasin) 、 - デフェンシン (Defensin) 、 HNP-1 (ヒト好中性ペプチド) 、 HNP-2、 HNP-3、 - デフェンシン-12、ドロソマイシン (Drosomycin) 、 ガンマ1-プロチオニン、昆虫デフェンシンA、および/またはWO 03/044049に記載されている抗微生物性ペプチド、ならびに抗微生物活性を保持するそれらの変異型またはフラグメント。

【0035】

他の特定の態様 (ix) において、異常な組成をもつペプチドは下記から選択される：インドリシジン (Indolicidin) 、 Pro-Argに富んだペプチドPR39、バクテニシン (Bactenin) Bac5、バクテリシン (Bactericin) Bac7、ヒスタチン (Histatin) 5、ポリ-L-リシン、および/またはDK 2003 001324に記載されている抗微生物性ペプチド、ならびに抗微生物活性を保持するそれらの変異型またはフラグメント。

【0036】

なおそれ以上の特定の態様 (x) において、異常なアミノ酸もつペプチドは下記から選択される：ニシン (Nisin) 、グラミシジン (Gramicidin) A、および/またはアラメチシン (Alamethicin) 、ならびに抗微生物活性を保持するそれらの変異型またはフラグメント。

追加の特定の好ましい態様 (xi) において、ペプチドは抗真菌性ペプチドである。

なおそれ以上の特定の態様 (xii) において、発現されたペプチドは保護性スカホールドタンパク質を含まない。

【0037】

特定の態様において、ペプチドは抗微生物活性および/または免疫刺激作用を有する。なおそれ以上の特定の態様 (xiv) において、 - シートペプチドは下記から選択される：ラクトフェリン、ラクトフェリシン (例えば、Lactoferricin B) 、タキプレシン (Tachyplesin) I、および/またはプロテグリン (Protegrin) PG1-5、ならびに抗微生物活性を保持するそれらの変異型またはフラグメント。

【0038】

ラクトフェリンは哺乳動物において鉄の結合および放出に関係する糖タンパク質であり、ここでそれは乳および他の体液の中に見出される。ラクトフェリンの例は、ヒトラクトフェリン、ウシラクトフェリン、ブタラクトフェリン、ウマラクトフェリン、ネズミラクトフェリン、ヤギラクトフェリンおよびその他である。ラクトフェリンは20年以上前に抗微生物剤として記載された。

【0039】

用語 「ラクトフェリン」 は、本明細書において使用するとき、抗微生物活性および/または免疫刺激作用を有するラクトフェリンを表示する。特定の態様において、本発明に従い使用するラクトフェリンは、ウシラクトフェリン (LFB) 、すなわち、チーズ乳漿から工業的に製造され、多年にわたって乳児処方箋に補充されてきている、689アミノ酸のタンパク質である。

【0040】

本発明に従い使用するラクトフェリンのある数の例を下に列挙する (非限定的リスト) :

EP 474506に開示されている配列番号1~4は、ラクトフェリンの加水分解により製造された抗微生物性ペプチドである；

10

20

30

40

50

EP 503939に開示されている配列番号5~19、ならびにカルボキシ末端にアミドを有するそれらの誘導体は、ウシラクトフェリンのアミノ酸18~28 (LFB (18-28)) に基づく抗微生物性ペプチドである；

【0041】

EP 510912に開示されている配列番号20~31、ならびにカルボキシ末端にアミドを有するそれらの誘導体は、ウシラクトフェリンの加水分解により得られる抗微生物性ペプチドである；

EP 629213に開示されている配列番号32は、多形性好中球からのロイコトリエンB4の放出またはマスト細胞からのヒスタミンの放出を促進する薬剤の製造に使用される、他のラクトフェリン誘導体である；

10

米国特許第5,656,591号に開示されている配列番号1~4、配列番号15、配列番号20~32、および配列番号33~46は、ラクトフェリンに基づく抗微生物性ペプチドの追加の例である。

【0042】

配列番号47はウシラクトフェリンのアミノ酸1~50 (LFB (1-50)) であり、そしてラクトフェリシンB (LfcinB、またはLFB (17-41) と略す) は配列番号47のアミノ酸17~41を表示する。

配列番号48~52、すなわち、それぞれLFB (14-31)、LFB (17-31)、LFB (18-31)、LFB (19-31)、およびLFB (20-31) は、下記の文献に開示されている追加のラクトフェリンのフラグメントである： Rekdal 他、 *J. Peptide Sci.* 5: 32-45 (1999)、また、これには配列番号53~55、すなわち、それぞれ変異型LFB (17-31) 17K、LFB (17-31) 20F、およびLFB (17-31) 17K + 20Fが記載されている。

20

【0043】

追加のラクトフェリシン、例えば、配列番号56~57、すなわち、それぞれLFB (17-30)、およびLFB (19-37) は下記の文献に開示されている： Groenink 他、 *FEMS Microbiology Letters* 179 (1999) 217-222。

Vogel 他 (Biochem. Cell. Biol. 80 (2002): 49-63) によれば、実際的レベルの抗微生物活性を保持するためには、LFBのフラグメントはその6アミノ酸20~25 (LFB (20-25)、配列番号58) を含有しなくてはならない。

30

【0044】

LFB (17-31) のある数の変異型、すなわち、17A、18A、19A、20A、21A、22A、23A、24A、25A、26A、28A、29A、30A、および31Aは下記の文献に開示されている： Stroem 他、 *J. Peptide Res.* 2000, 56, 265-274。

LFB (17-31) の追加の変異型、すなわち、22F、24F、および22F + 24Fは下記の文献に開示されている： Haug および Svendsen、 *J. Peptide Sci.* 7: 190-196 (2001)。

特定の態様において、本発明に従い使用する抗微生物性ペプチドは、(a) 配列番号58を含んでなる；(b) 配列番号47、および/またはそれらのフラグメントまたは変異型を含んでなる；(c) 配列番号48~52、配列番号56~57、および/またはそれらのフラグメントまたは変異型を含んでなる。

40

【0045】

酵素

酵素は酵素活性を有するポリペプチドである。本発明の目的（抗微生物剤との共発現）に対して問題の他のタンパク質生成物は、ホルモン、血液凝固因子、免疫グロブリン、ならびにそれらのフラグメントまたは変異型である。

【0046】

下記は特に重要である酵素の例の非限定的リストである：エンドグルカナーゼ、キシラナーゼ、フィターゼ、プロテアーゼ、ガラクタナーゼ、マンナナーゼ、デキシトラナーゼ、および -ガラクトシダーゼ。特に関係する追加の酵素は、ペクチン酸リアーゼ、フィターゼ、 -アミラーゼおよびAMGである。特定の態様において、酵素はキシラナーゼ、フィターゼ、ガラクタナーゼ、またはプロテアーゼである。なおそれ以上の特定の態様にお

50

いて、酵素はフィターゼ、またはプロテアーゼである。なおそれ以上の特定の態様において、酵素はグルタチオン-S-トランスフェラーゼではない。他の特定の態様において、酵素は-グルクロニダーゼではない。

【0047】

酵素の由来については制限がない。こうして、用語「酵素」は、関係する酵素活性を示すかぎり、任意の属の微生物から得られた天然または野生型酵素ばかりでなく、かつまたそれらの任意のアナローグ、突然変異体、変異型、フラグメントおよびその他、ならびに合成酵素、例えば、シャッフルド酵素、およびコンセンサス酵素を包含する。このような遺伝子操作された酵素は、この分野において一般に知られているように、例えば、位置指定突然変異誘発、PCR、またはランダム突然変異誘発により製造することができる。

10

【0048】

特定の態様において、酵素、および/またはそれをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、異種、または外因性の酵素および/またはヌクレオチド配列である。これが意味するように、それは選択されたまたは意図する発現宿主細胞に対して外因性である。用語「異種」は、問題の宿主細胞に対して内因性である天然または野生型核酸配列を排除する。

【0049】

酵素はハンドブック Enzyme Nomenclature (NC-IUBMB, 1992) に基づいて分類することができる：また、下記のインターネットのサイト ENZYME を参照のこと：<http://www.exasy.org/enzyme/>。ENZYME は酵素の命名法に関する情報の貯蔵所である。それは主として下記の推奨に基づき：the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB) そして EC (Enzyme Commission) 番号が与えられている特性決定された酵素の各タイプを記載している (Bairoch A. The ENZYME database. 2000, Nucleic Acids Res. 28: 304-305)。この IUB-MB の酵素の命名法は酵素の基質特異性に基づき、時々酵素の分子機構に基づく：このような分類はこれらの酵素の構造的特徴を反映しない。

20

【0050】

本発明の目的に対して、キシラナーゼはEC 3.2.1.8として分類される酵素である。キシラナーゼは細菌のキシラナーゼ、例えば、バシラス (*Bacillus*) 株に由来するか、あるいは酵母およびフィラメント状真菌のキシラナーゼを包含する真菌のキシラナーゼであることができる。真菌のキシラナーゼは、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)、フミコラ (*Humicola*)、テルモアクチノマイセス (*Thermoactinomyces*)、またはトリコデルマ (*Trichoderma*) の株に由来することができる。

30

【0051】

本発明の目的に対して、用語エンドグルカナーゼは、EC 3.2.1.4、EC 3.2.1.6、EC 3.2.1.73、またはEC 3.2.1.39として分類される酵素を表示する。特定の態様において、エンドグルカナーゼはEC 3.2.1.4またはEC 3.2.1.6として分類される酵素である。エンドグルカナーゼは、種々の真菌または細菌の株、例えば、テルモアスカス (*Thermoascus*) の株に由来することができる。

40

【0052】

用語プロテアーゼは、本明細書において使用するとき、EC 3.4酵素のグループの中に分類できる酵素である。プロテアーゼの例は次の通りである：アスペルギルス・アクレアツス (*Aspergillus aculeatus*) プロテアーゼIまたはプロテアーゼII；アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 酸性プロテイナーゼ (プロテアーゼA)；アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) アスペルギロペプシン0；バシラス (*Bacillus*) 種、バシラス・アルカロフィルス (*Bacillus alcalophilus*) に由来するWO 01/58275のp. 5, l. 19-23に開示されている酸安定性プロテアーゼ；ペシロマイセス・リラシヌス (*Paecilomyces lilacinus*)、アスペルギルス (*Aspergillus*) 種、アクレモニウム・クリソゲヌム (*Acremonium chrysogenum*)、およびアクレモニウム・キリエンセ (*Acremonium kiliense*)；およびノカルジオプシス (*Nocardiopsis*) 種およびノカルジオプシス・アルバ (*Nocardia* 50

iopsis alba) に由来する WO 01/58276 の p. 4, l. 27-28 に開示されている酸安定性プロテアーゼ。

【 0 0 5 3 】

ノカルジオプシス (Nocardiopsis) 種プロテアーゼは、配列番号 59 の成熟部分 (アミノ酸 1~188) のアミノ酸配列を含んでなる。好ましいプロテアーゼは、配列番号 59 の A87T、すなわち、Ala が Thr で置換されている配列番号 59 のアミノ酸 1~188 を有する変異型である。

他の好ましいプロテアーゼ次の通りである：

ノカルジオプシス・ダッソンビレイ (Nocardiopsis dassonvillei) 亜種ダッソンビレイ (dassonvillei) に由来し、配列番号 60 の成熟部分 (アミノ酸 1~188) のアミノ酸配列を含んでなるプロテアーゼ。 10

【 0 0 5 4 】

ノカルジオプシス・アルバ (Nocardiopsis alba) に由来し、配列番号 61 の成熟部分 (アミノ酸 1~188) のアミノ酸配列を含んでなるプロテアーゼ。

ノカルジオプシス・プラシナ (Nocardiopsis prasina) に由来し、配列番号 62 の成熟部分 (アミノ酸 1~188) のアミノ酸配列を含んでなるプロテアーゼ。

ノカルジオプシス・プラシナ (Nocardiopsis prasina) に由来し、配列番号 63 の成熟部分 (アミノ酸 1~188) のアミノ酸配列を含んでなるプロテアーゼ。

【 0 0 5 5 】

特定の態様において、配列番号 59、60、61、62 または 63 のプロテアーゼは、エクステンション、例えば、N 末端または C 末端のエクステンション、好ましくは C 末端のエクステンションを含んでなる変異型である。エクステンションはポリペプチドの C 末端の少なくとも 4 アミノ酸内に少なくとも 3 の非極性または非帶電の極性アミノ酸を含んでなり、特にこれらの変異型は野生型に比較して C 末端に付加された 1 または 2 以上のアミノ酸のエクステンションを有する。 20

【 0 0 5 6 】

それ以上の特定の態様において、

- i) 1 または 2 以上の付加されたアミノ酸は非極性または非帶電である；
- ii) 1 または 2 以上の付加されたアミノ酸は Q、S、V、A、または P である；
- iii) 1 または 2 以上の付加されたアミノ酸は、QSHVQSAP (配列番号 84)、QSAP (配列番号 85)、QP、TL、TT、QL、TP、LP、TI、IQ、QP、PI、LT、TQ、IT、QQ、および PQ から成る群から選択される。 30

なおそれ以上の態様において、プロテアーゼは配列番号 59 のアミノ酸 1~188 に対する同一性の程度が少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 75%、80%、85%、90%、または少なくとも 95% である。

【 0 0 5 7 】

本発明の目的に対して、2つのアミノ酸配列間の同一性の程度は、Needleman-Wunsch アラインメント (すなわち、包括的アラインメント) であるプログラム「align」により決定される。デフォルトスコアリングマトリックス BLOSUM 50 をポリペプチドのアラインメントに使用する。ギャップの第 1 残基のペナルティーはポリペプチドについて -12 であり、そしてギャップのそれ以上のペナルティーはポリペプチドについて -2 である。 40

【 0 0 5 8 】

「align」は FASTA パッケージバージョン v20u6 の一部分であり (下記の文献を参照のこと、W. R. Pearson および D. J. Lipman (1988)、"Improved Tools for Biological Sequence Analysis"、PNAS 85: 2444-2448、および W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA"、Methods in Enzymology 183: 63-98)。FASTA タンパク質アラインメントは、ギャップサイズに対する制限なしに、Smith-Waterman アルゴリズムを使用する (下記の文献を参照のこと、"Smith-Waterman algorithm"、T. F. Smith および M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197)。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

本発明の関係において、フィターゼはEC 3.1.3.8、および/またはEC 3.1.3.26として分類することができる。フィターゼは、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) およびエメリセラ (*Emericella*)、テルモアクチノマイセス (*Thermoactinomyces*)、フミコラ (*Humicola*)、ペニオホラ (*Peniophora*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、バシラス (*Bacillus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)；またはシュワンニオマイセス (*Schwanniomyces*)の種々の株から得ることができる。

好みしいフィターゼはペニオホラ・リシイ (*Peniophora lycii*) に由来し、配列番号64のアミノ酸1～409を含んでなるか、あるいはその変異型である。特定の態様において、変異型はWO 03/066847の表1～5に開示されている。

さらに特定の態様において、フィターゼは配列番号64のアミノ酸31～439に対する同一性の程度が少なくとも75%である。 10

#### 【0060】

用語ガラクタナーゼは、本明細書において使用するとき、EC 3.2.1.89として分類することができる酵素である。ガラクタナーゼは、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)、バシラス (*Bacillus*)、テルモトガ (*Thermotoga*)、メリピルス (*Meripilus*)、ミセリオフトラ (*Myceliophthora*)、フミコラ (*Humicola*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、キサントモナス (*Xanthomonas*)、またはエルシニア (*Yersinia*)の株に由来することができる。

#### 【0061】

用語マンナナーゼは、本明細書において使用するとき、EC 3.2.1.78として分類することができる酵素である。マンナナーゼは、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)、バシラス (*Bacillus*)、またはトリコデルマ (*Trichoderma*)の株に由来することができる。 20

用語デキシトラナーゼは、本明細書において使用するとき、EC 3.2.1.11として分類することができる酵素である。デキシトラナーゼは、例えば、ペシロマイセス (*Paecilomycetes*)の株に由来することができる。

#### 【0062】

用語-ガラクトシダーゼは、本明細書において使用するとき、EC 3.2.1.22として分類することができる酵素である。-ガラクトシダーゼは、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)の株に由来することができる。 30

用語-アミラーゼは、本明細書において使用するとき、EC 3.2.1.1として分類することができる酵素である。

用語グルコアミラーゼは、本明細書において使用するとき、EC 3.2.1.3として分類することができる酵素である。

用語ベクチン酸リアーゼは、本明細書において使用するとき、EC 4.2.2.2として分類することができる酵素である。

#### 【0063】

前述の種の株および本明細書に記載する他の株は多数の微生物株保存機関、例えば、下記から公衆に容易にアクセス可能である：American Type Culture Collection (ATCC)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)、Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS)、およびAgricultural Research Service Patent Culture Collection、Northern Regional Research Center (NRRL)。 40

#### 【0064】

##### 核酸配列

本発明において使用する核酸配列は、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、合成由来、またはおよびそれらの組み合わせであることができる。

抗微生物剤または酵素をコードする核酸配列を単離またはクローニングする技術はこの分野において知られており、そしてゲノムDNAからの単離、cDNAからの製造、化学的合成、またはそれらの組み合わせを包含する。シグナルトラッピング（例えば、TAST、すなわち、トランスポゾン補助シグナルトラッピング）により見出されるペプチド遺伝子は天然由 50

来である。

【0065】

このようなゲノムDNAからの核酸配列のクローニングは、例えば、よく知られているポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または共有する構造的特徴をもつクローニングされたDNAフラグメントを検出する発現ライブラリーの抗体スクリーニングを使用することによって、実施することができる。例えば、下記の文献を参照のこと: Innis 他、1990、PCR: A Guide to Methods and Application、Academic Press、New York。他の核酸増幅手順、例えば、リガーゼ連鎖反応 (LCR) 、結合活性化転写 (LAT) および核酸配列をベースとする増幅 (NASBA) を使用することができる。

【0066】

酵素および/または抗微生物剤をコードする核酸配列は、例えば、必要な細菌または真菌の株、または他のまたは関係する生物からクローニングし、こうして、例えば、アレレまたは種変異型であることができる。

【0067】

用語「単離された核酸配列」は、本明細書において使用するとき、他の核酸配列を本質的に含まない、例えば、アガロース電気泳動により決定して、少なくとも約20%の純度、好ましくは少なくとも約40%の純度、より好ましくは少なくとも約60%の純度、なおより好ましくは少なくとも約80%の純度、最も好ましくは少なくとも約90%の純度の核酸配列を意味する。例えば、単離された核酸配列は、核酸配列をその天然の位置からそれが再生される異なる部位に再配置するために遺伝子操作において使用される標準的クローニング手順により、得ることができる。クリーニング手順は、抗微生物剤または酵素をコードする核酸配列を含んでなる必要な核酸フラグメントの切除および単離、このフラグメントのベクター分子中への挿入、および核酸配列の多数のコピーまたはクローンが複製される宿主細胞中への組換えベクターの組込みを包含する。

【0068】

請求項1において規定される抗微生物剤または酵素をコードする核酸配列の修飾は、変異型抗微生物剤または変異型酵素の合成に必要であることがある。用語「変異型抗微生物剤」または「変異型酵素」は、それらの天然に存在しない形態を意味する。これらは天然源から単離された抗微生物剤または酵素といくつかの操作された方法で異なり、例えば、比活性、熱安定性、pH最適値、アレルゲン性が異なる抗微生物剤または酵素、または抗微生物活性または特異性のプロファイル、またはその他が異なる抗微生物剤の変異型である。

【0069】

変異型の配列は、抗微生物剤または酵素の成熟部分、例えば、そのサブ配列をコードする核酸配列に基づいて、および/または核酸配列によりコードされるポリペプチドの他のアミノ酸配列を生じないが、酵素または抗微生物剤の製造に意図される宿主生物のコドン使用頻度に相当するヌクレオチド置換の導入により、または異なるアミノ酸配列を生ずるヌクレオチド置換の導入により、構築することができる。ヌクレオチド置換の総括的説明については、例えば、下記の文献を参照のこと: Ford 他、1991、Protein Expression and Purification 2: 95-107。低アレルゲン性酵素および抗微生物剤は、例えば、上に記載したようにして製造することができる。

【0070】

当業者にとって明らかなように、このような置換は分子に対して重大な領域の外側でなすことができ、そしてなお活性剤または酵素を生成することができる。核酸配列によりコードされる酵素または抗微生物剤の活性に対して必須であり、したがって置換しないことが好ましいアミノ酸残基は、この分野において知られている手順、例えば、位置指定突然変異誘発またはアラニン走査突然変異誘発により同定することができる（例えば、下記の文献を参照のこと: CunninghamおよびWells、1989、Science 244: 1081-1085）。

【0071】

後者の技術において、突然変異は分子中のすべての正に帶電した残基に導入され、そし

10

20

30

40

50

て生ずる突然変異分子を活性について試験して、分子の活性にとって重大であるアミノ酸残基を同定する。また、基質-酵素の相互作用部位は、核磁気共鳴吸収分析、結晶学またはフォトアフィニティーラベリングのような技術に従い決定される三次元構造の解析により決定することができる（例えば、下記の文献を参照のこと：Vos 他、1992、Science 255: 306-312; Smith 他、1992、Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver 他、1992、FEBS Letters 309: 59-64）。

#### 【0072】

##### 核酸構築物

本発明は、ある種のタイプの核酸構築物、すなわち、制御配列と適合性の条件下に適当な発現宿主中の下記のコーディング配列の発現を指令する1種または2種以上の制御配列に作用可能に連鎖された、抗微生物剤をコードする第1核酸配列、および酵素をコードする第2核酸配列を含んでなる核酸構築物に関する。特定の態様において、第2核酸配列は発現宿主に対して異種である。

#### 【0073】

「核酸構築物」は、一本鎖または二本鎖であり、天然に存在する遺伝子から単離されるか、あるいは天然に存在しないような方法で組合わされかつ並置された核酸のセグメントを含有するように修飾された核酸分子として本明細書において定義される。用語「核酸構築物」は、核酸構築物が発現に必要なすべての制御配列を含有するとき、用語「発現カセット」と同義である。

#### 【0074】

用語「をコードする核酸配列」または「コーディング配列」は、そのペプチドまたは酵素生成物のアミノ酸配列を直接特定する核酸配列として本明細書において定義される。一般に、コーディング配列の境界は、リボソーム結合部位（原核生物）により、またはmRNAの5'末端におけるオープンリーディングフレームの直ぐ上流に位置するATG開始コドン（真核生物）およびmRNAの3'末端におけるオープンリーディングフレームの直ぐ下流に位置する転写停止配列により決定される。コーディング配列は、DNA、cDNA、および組換え核酸配列を包含できるが、これらに限定されない。

発現は酵素および抗微生物剤の製造に関する工程を包含すると理解され、このような工程は転写、転写後の修飾、翻訳、翻訳後の修飾、および分泌を包含するが、これらに限定されない。

#### 【0075】

用語「制御配列」は、それぞれ、酵素、および抗微生物剤の発現に必要または好都合であるすべての成分を包含すると本明細書において定義される。各制御配列は、それぞれのエンコーディング核酸配列に対して自然または外来性であることができる。このような制御配列は、リーダー、ポリアデニル化配列、プレプロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列、および転写ターミネーターを包含するが、これらに限定されない。最小において、制御配列はプロモーター、および転写および翻訳停止シグナルを包含する。制御配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列のコーディング領域と制御配列との結合を促進する特異的制限部位を導入する目的で、リンカーを有することができる。用語「作用可能に連鎖された」は、DNA配列のコーディング配列に関して、制御配列がポリペプチドの発現を指令する位置に、制御配列が適当に配置されている立体配置として本明細書において定義される。

#### 【0076】

制御配列は、適当なプロモーター配列、核酸配列を発現する宿主細胞により認識される核酸配列であることができる。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を仲介する転写制御配列を含有する。プロモーターは、選択した宿主細胞において転写活性であることを示す任意の核酸配列であることができ、突然変異体、トランケーテッド、およびハイブリッドプロモーターを包含し、そして宿主細胞に対して相同的または異種的である、細胞外または細胞内のポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

#### 【0077】

10

20

30

40

50

特に細菌宿主細胞中で、本発明の核酸構築物の転写を指令するために適当なプロモーターの例は、下記から得られるプロモーターである：大腸菌 (*E. coli*) lacオペロン、ストレプトマイセス・ケリコロル (*Streptomyces coelicolor*) アガロース遺伝子 (*daga*) 、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) レバンスクラーゼ遺伝子 (*sacB*) 、バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) -アミラーゼ遺伝子 (*amyL*) 、バシラス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) マルトジエニックアミラーゼ遺伝子 (*amyM*) 、バシラス・アミロリクファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) -アミラーゼ遺伝子 (*amyQ*) 、バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*) 、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) *xylA*および*xylB*遺伝子、および原核生物の -ラクタマーゼ遺伝子 (Villa 他、1978、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731) 、ならびにtacプロモーター (DeBoer 他、1983、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25) 。それ以上のプロモーターは下記の文献に記載されている：“Useful proteins from recombinant bacteria”、Scientific American 1980、242: 74-94; およびSambrook 他、1989、前掲。

10

20

30

40

## 【0078】

フィラメント状真菌宿主細胞細胞中で本発明の核酸構築物の転写を指令するために適当なプロモーターの例は、下記の遺伝子から得られるプロモーター、およびそれらの突然変異体、トランケーテッド、およびハイブリッドプロモーターである：アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼ、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 中性 -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 酸安定性 -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) またはアスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) グルコアミラーゼ (*glaA*) 、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) アルカリ性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) トリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・ニヅランス (*Aspergillus nidulans*) アセトアミダーゼ、およびフザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) トリプシン様プロテアーゼ (WO 96/00787) 、ならびにNA2-tpiプロモーター (アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 中性 -アミラーゼおよびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) トリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子からのプロモーターのハイブリッド)。

30

40

## 【0079】

酵母宿主において、有効なプロモーターは下記の遺伝子から得られるプロモーターである：サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) エノラーゼ (ENO-1) 、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) ガラクトキナーゼ (GAL1) 、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) アルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-ホスフェート (ADH2/GAP) 、およびサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ。酵母宿主細胞に有効な他のプロモーターは下記の文献に記載されている：Romanos 他、1992、Yeast 8: 423-488。

40

## 【0080】

また、制御配列は、適当な転写停止配列、すなわち、転写を停止するために宿主細胞により認識される配列である。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作用可能に連鎖されている。選択した宿主細胞中で機能的である任意のターミネーターを本発明において使用することができる。

50

## 【0081】

フィラメント状真菌宿主細胞に好ましいターミネーターは、下記の遺伝子から得られるターミネーターである：アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニヅランス (*Aspergillus nidulans*) アントラニル酸シンターゼ、アスペルギルス・ニガ

50

- (*Aspergillus niger*) -グルコシダーゼ、およびフザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) トリプシン様プロテアーゼ。

【0082】

酵母宿主細胞に好ましいターミネーターは、下記の遺伝子から得られるターミネーターである：サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) シトクロムC (CYC1)、およびサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ。酵母宿主細胞に有効な他のターミネーターは下記の文献に記載されている：Romanos 他、1992、前掲。

【0083】

細菌宿主細胞に好ましいターミネーターは下記からのターミネーターである：バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) -アミラーゼ遺伝子 (amyL)、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) マルトジエニックアミラーゼ遺伝子 (amyM)、またはバシラス・アミロリクファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) -アミラーゼ遺伝子 (amyQ)。

【0084】

また、制御配列は、適当なリーダー配列、すなわち、宿主細胞による翻訳に重要である mRNA の非翻訳領域である。リーダー配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の 5' 末端に作用可能に連鎖されている。選択した宿主細胞中で機能的である任意のリーダー配列を本発明において使用することができる。

フィラメント状真菌宿主細胞に好ましいリーダーは、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼおよびアスペルギルス・ニヅランス (*Aspergillus nidulans*) トリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子から得られる。

【0085】

酵母宿主細胞に適当なリーダーは下記の遺伝子から得られるリーダーである：サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) エノラーゼ (ENO-1)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) -因子、およびサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) アルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-ホスフェート (ADH2/GAP)。

【0086】

また、制御配列は、ポリアデニル化配列、すなわち、ヌクレオチド配列の 3' 末端に作用可能に連鎖されており、そして転写されたとき、ポリアデノシンを転写された mRNA に付加するシグナルとして宿主細胞により認識される配列である。選択した宿主細胞中で機能的である任意のポリアデニル化配列を本発明において使用することができる。

【0087】

フィラメント状真菌宿主細胞に好ましいポリアデニル化配列は下記の遺伝子から得られる：アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) アントラニル酸シンターゼ、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) トリプシン様プロテアーゼ、およびアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) -グルコシダーゼ。

【0088】

酵母宿主細胞に有効なポリアデニル化配列は下記の文献に記載されている：Guo および Sherman、1995、*Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990。

また、制御配列は、酵素のアミノ末端に結合したアミノ酸配列をコードし、かつコードされた酵素を細胞の分泌経路に向ける、シグナルペプチドコーディング領域であることができる。核酸配列のコーディング配列の 5' 末端は、分泌された酵素をコードするコーディング領域のセグメントと翻訳リーディングフレームで自然に結合した、シグナルペプチドコーディング領域を固有に含有することがある。

【0089】

10

20

30

40

50

選択的に、コーディング配列の5'末端は、制御配列に対して外来性であるシグナルペプチドコーディング領域を含有することがある。調節配列がシグナルペプチドコーディング領域を自然に含有しない場合、外来性のシグナルペプチドコーディング領域は必要とされることがある。選択的に、外来性のシグナルペプチドコーディング領域を自然のシグナルペプチドコーディング領域と置換して、酵素の分泌を増強することができる。しかしながら、発現された酵素を選択した宿主細胞の分泌経路に向けるシグナルペプチドコーディング領域を、本発明の方法において使用することができる。

## 【0090】

細菌宿主細胞に有効なシグナルペプチドコーディング領域は、下記の遺伝子から得られるシグナルペプチドコーディング領域である：バシラス (*Bacillus*) NCIB 11837マルトジエニックアミラーゼ、バシラス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) -アミラーゼ、バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) スブチリシン、バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) -ラクタマーゼ、バシラス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) 中性プロテアーゼ (nprT、nprS、nprM)、およびバシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) prsA。それ以上のシグナルペプチドは下記の文献に記載されている：SimonenおよびPalva、1993、Microbiological Reviews 57: 109-137。

## 【0091】

フィラメント状真菌宿主細胞に有効なシグナルペプチドコーディング領域は、下記の遺伝子から得られるシグナルペプチドコーディング領域である：アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 中性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼ、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテアーゼ、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) セルラーゼ、およびフミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) リパーゼ。

## 【0092】

酵母宿主細胞に有効なペプチドは、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) -因子およびサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) インベルターゼの遺伝子から得られる。他の有効なシグナルペプチドコーディング領域は下記の文献に記載されている：Romanos 他、1992、前掲。

## 【0093】

また、制御配列は、酵素のアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコーディング領域である。生ずる酵素はプロ酵素またはプロポリペプチド（またはある場合においてチモーゲン）として知られている。プロ酵素は一般に不活性であり、そしてプロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的または自己触媒的切断により、成熟活性酵素に転化することができる。プロペプチドコーディング領域は下記の遺伝子から得ることができる：バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) アルカリ性プロテアーゼ (aprE)、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) 中性プロテアーゼ (nprT)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) -因子、リゾムコル・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテアーゼ、およびミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) ラッカーゼ (WO 95/33836)。

## 【0094】

両方のシグナルペプチドおよびプレプロペプチド領域が酵素のアミノ末端に存在する場合、プロペプチド領域は酵素のアミノ末端の次に位置し、そしてシグナルペプチド領域はプロペプチド領域の次に位置する。

## 【0095】

また、宿主細胞の生長に関してポリペプチドの発現の調節を可能とする調節配列を付加することが望ましいことがある。調節系の例は、化学的または物理的刺激、例えば、調節化合物の存在に応答して遺伝子の発現をオンまたはオフにする系である。原核生物系における調節系は、lac、tac、およびtrpオペレーター系を包含する。酵母において、ADH2系

10

20

30

40

50

またはGAL1系を使用することができる。

【0096】

フィラメント状真菌において、TAKA -アミラーゼのプロモーター、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼのプロモーター、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) グルコアミラーゼのプロモーターを調節配列として使用することができる。調節配列の他の例は、遺伝子の増幅を可能とするものである。真核生物系において、これらはメトトレキセートの存在下に増幅されるジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、および重金属で増幅されるメタロチオネイン遺伝子を包含する。これらの場合において、酵素をコードする核酸配列は調節配列と作用可能に連鎖するであろう。

【0097】

本発明の核酸構築物は、2以上の酵素をコードする2以上の核酸配列、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10の酵素をコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9または10の核酸配列を含んでなることができる。酵素は同一であるか、あるいは異なることができる。1または2以上の酵素をコードする核酸配列は同一であるか、あるいは異なることができる。

【0098】

また、本発明の核酸構築物は、2以上の抗微生物剤をコードする2以上の核酸配列、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20の抗微生物剤をコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20の核酸配列を含んでなることができる。また、本発明の核酸構築物は、20より多い抗微生物剤をコードする20より多い核酸配列、例えば、25、30、35、40、45まで、またはさらに50までの抗微生物剤をコードする25、30、35、40、45まで、またはさらに50までの核酸配列を含んでなることができる。抗微生物剤は同一であるか、あるいは異なることができる。1または2以上の抗微生物剤をコードする核酸配列は同一であるか、あるいは異なることができる。特に、核酸配列の数は、発現が封入体中で起こるとき、より高い範囲にあることがある。

【0099】

本発明の核酸構築物において、1または2以上の酵素をコードする1または2以上の核酸配列は、1または2以上の抗微生物剤をコードする1または2以上のスクレオチド配列から上流に存在することができる。なおさらに、発現をコードする配列のいくつかは抗微生物剤をコードする配列から上流に存在し、いくつかはから下流に存在することができ、そして逆もまた同じである。

【0100】

もちろん、普通の一般的知識であるが、本明細書に記載する核酸構築物において、個々の構成成分の配列、例えば、1または2以上の酵素、1または2以上の抗微生物剤をコードする核酸配列、制御配列、およびまたリンカーおよびさらに後述されるドメインは、必要な正しい発現が起こるように、適切に間隔を置いて並置されるべきである。

本発明の比較的簡単な核酸構築物の3つの例a) ~ c) を下に列挙する。構築物は5' 3' の通常の方向で列挙され、そして下記の略号を使用する：AMP：抗微生物性ペプチド；ENZ：酵素；RBS：リボソーム結合部位；PROM：プロモーター；TERM：ターミネーター。

【0101】

- a) PROM-RBS1-遺伝子 (AMP)-リンカー-遺伝子 (ENZ)-TERM
- b) PROM-RBS1-遺伝子 (AMP)- RBS2-遺伝子 (ENZ)-TERM
- c) PROM1-RBS1-遺伝子 (AMP)- TERM1-PROM2-RBS2-遺伝子 (酵素)-TERM2

Ad a)：この構築物は1つの転写生成物、および1つの翻訳生成物、すなわち、融合タンパク質（融合生成物）を生ずる。上記構築物において、「リンカー」は切断可能なリンカーを表示し、これはいっそう詳しく後述し、そして引き続いて融合タンパク質、AMP-リンカー-ENZを切り離して、それぞれ、明確な生成物、AMP、およびENZにする。

【0102】

Ad b)：この構築物は、遺伝子 (AMP) に固有の翻訳停止コドンのために、翻訳が停止す

10

20

30

40

50

るので、1つの転写生成物、および2つの翻訳生成物を生ずる。したがって、2つの明確な生成物、AMPおよびENZが生成するであろう。

Ad c): この構築物において、転写は遺伝子 (AMP) 後に停止するが、PROM2において転写は連続する。したがって、2つの転写生成物、ならびに2つの翻訳生成物、AMPおよびENZがこの構築物から生ずる。変化する強さのPROM1およびPROM2を適用するが、1または2以上の誘導可能なプロモーターを使用することによって、例えば、発現されたAMPおよびENZの必要な比が得られることからみて、AMPの発現をENZに比較して調節することができる。

#### 【0103】

下記の構築物d) ~ f) は、酵素および/またはペプチドをコードする2以上の核酸配列を組んでいる本発明の核酸構築物の非限定的例である。上記の同一記号法が制御配列に適用されるが、リンカーおよびその他は簡素化のために排除されている：

- d) 遺伝子 (ENZ)-遺伝子 (AMP)-遺伝子 (AMP)
- e) 遺伝子 (ENZ)-遺伝子 (AMP)-遺伝子 (AMP)-遺伝子 (AMP)
- f) 遺伝子 (ENZ)-遺伝子 (AMP)-遺伝子 (AMP)-遺伝子 (AMP)-遺伝子 (ENZ)

上記構築物において、AMPは同一であるか、あるいは異なるAMPを表示することができ、そしてENZについて同一の事柄が当てはまる。

#### 【0104】

##### 切断可能なリンカー

アミノ酸レベルにおいて、用語「切断可能なリンカー」は、典型的には短い、例えば、切断可能な部位を含んでなる1~30アミノ酸から成るアミノ酸の配列として本明細書において定義される。用語「切断可能な部位」は、切断剤により、すなわち、物理的または化学的、典型的には酵素的手段により切断可能である、典型的には短い、例えば、1~10アミノ酸から成るアミノ酸の配列として本明細書において定義される。切断可能なリンカー、認識部位および切断部位の非限定的例は下に列挙される。

#### 【0105】

例えば、切断可能なリンカーは部位特異的プロテアーゼの認識部位であることができる。部位特異的プロテアーゼ(切断剤)の例は、酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)の-細胞からのKex2膜結合プロテイナーゼである。Kex2プロテイナーゼは、ペプチド結合のC-末端で切断される塩基性アミノ酸対をもつペプチドおよびタンパク質を加水分解する (Bessmertnaya 他 (1997) *Biochemistry* Vol. 62 (8) pp. 850-857)。Kex2切断部位の例は、Lys-Arg (K-/-R) およびArg-Arg (R-/-R) であり、そしてまた塩基性アミノ酸の他の組合せを挿入して、Kex2による切断を最適化することができる (Ledgerwood 他 (1995) *J. Biochemistry* Vol. 308 (1) pp. 321-326; またはGhosh S. 他 (1995) *Gene (Amersham)* Vol. 176 (1-2) pp. 249-255)。

#### 【0106】

プロテアーゼ(切断剤)および切断可能なリンカーの他の有効な組合せは次の通りである：アミノ酸配列X-D-D-D-K-/-X (配列番号86) を優先的に切断するエンテロキナーゼ (La Vallie 他 (1993) *J. Biol. Chem.* Vol. 268 pp. 2311-2317)、アミノ酸配列X-K-R-/-X (配列番号87) を優先的に切断するトリプシン (Jonasson 他 (1996) *Eur. J. Biochem.* Vol. 236 (2) pp. 656-661)、アミノ酸配列X-I-E-G-R-/-X (配列番号88) を優先的に切断する因子Xa (Nagai 他 (1985) *PNAS* Vol. 82 pp. 7252-7255)、アミノ酸配列P-X-/-G-P-X-X (配列番号89) を優先的に切断するコラゲナーゼ (Chinery 他 (1993) *Eur. J. Biochem.* Vol. 212 (2) pp. 557-558)、アミノ酸配列X-G-V-R-G-P-R-/-X (配列番号90) を優先的に切断するトロンビン (Rahman 他 (1992) *Cell. Mol. Biol.* Vol. 38 (5) pp. 529-542)、リシンにおいて優先的に切断するALP (アクロモバクター・リチカス (*Achromobacter lyticus*) Lys特異的プロテアーゼ) (Kjeldsen 他 (1996) *Gene* Vol. 170 (1) pp. 107-112)、およびGluにおいて優先的に切断するバシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) からのC-成分プロテアーゼ (Kakudo 他 (1992) *J. Biol. Chem.* Vol. 267 (33) pp. 23782-23788)。

#### 【0107】

10

20

30

40

50

消化的プロテアーゼ、特にトリプシン（前述）、また、ペプシン、キモトリプシン、および胰臓プロテアーゼは追加の有効なプロテアーゼである。キモトリプシンは芳香族アミノ酸およびLeu後を優先的に切断する。

#### 【0108】

特異的ターゲット部位を切断する他の好ましい方法は、化合物、例えば、X-M-/-Xを切断する臭化シアンまたはS-N-/-G-X（配列番号91）を切断するヒドロキシルアミンであるを使用することによる（Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1995; Harwood C. R. およびCutting S. M.（編者））。

なおそれ以上の特定の切断法をD-/-P（Asp-Pro）ペプチド結合に利用することができ、この結合は適当な温度において適当な時間の間弱酸（例えば、pH 2~3）で処理して切断することができる。適当な温度の例は40、50、60、70、または80 であり、そして適当な時間の例は数時間、例えば、0.25時間~5時間、0.5時間~2.5時間、1時間~3時間、1.5時間~2.5時間である。

#### 【0109】

ヌクレオチドレベルにおいて、遺伝暗号を参照することによって、当業者は、もちろん、上記切断可能なリンカー、ならびに下記ペプチド保護ドメインに相当するヌクレオチド配列を容易に推定することができる。また、この分野においてよく知られているように、ヌクレオチド配列を問題の宿主細胞のコドン使用頻度について最適化することができる。

#### 【0110】

##### 保護ペプチド

本発明は、また、抗微生物性ペプチドの組換え発現における、構成成分のアミノ酸残基の少なくとも50%がEおよび/またはDであることを特徴とする、いわゆるクエンチングドメイン、または保護ペプチド、または保護ドメインの使用に関する。このような保護ドメインの目的は、抗微生物性ペプチドが宿主細胞の生長を阻害する場合、抗微生物性ペプチドを一時的に不活性化することである。いったん十分な量のペプチドが產生されると、下にさらに説明するように、保護ペプチドを切断し、こうして抗微生物性ペプチドを再活性化する。保護ペプチドは合成的（人工的）であることが好ましい。

#### 【0111】

特定の態様において、保護ペプチドの中に含有されるアミノ酸残基の少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または少なくとも99%はDおよび/またはEである。なおそれ以上の特定の態様において、保護ペプチドは少なくとも1つのアミノ酸残基Dおよび/またはE、および必要に応じて、切断可能なリンカーから成る。

#### 【0112】

本発明のこの面の特定の、または選択的態様において、(1) 保護ペプチド中のDおよび/またはEアミノ酸残基の数はPおよび/またはK残基の数より大きい；(2) 保護ペプチドはC残基を含有しない；(3) 保護ペプチド中のアミノ酸残基の数は抗微生物性ペプチド中のアミノ酸残基の数よりも小さい；および/または (4) 保護ペプチドは細菌のプロテアーゼのインヒビターではない。

#### 【0113】

特定の態様において、保護ペプチドは抗微生物剤ではなく、かついざれかと言えば、シグナルペプチドではない。他の特定の態様において、保護ペプチドは抗微生物性ペプチドに密接するアミノ酸のストレッチである。保護ペプチドの長さはいっそう詳細に後述される。保護ペプチドおよび抗微生物性ペプチドは、5、8、10、12、15、20、25、または30アミノ酸までのアミノ酸のストレッチにより分離されている。

#### 【0114】

ペプチド保護ドメインをコードする核酸配列は、抗微生物性ペプチドをコードする核酸配列から上流または下流に存在することができる。それ以上の面において、本発明は、抗微生物性ペプチドをコードする第1核酸配列と、上に定義したペプチド保護ドメインをコードする第2核酸配列とを含んでなる構築物；ならびにこのような構築物を含んでなる組

10

20

30

40

50

換え宿主細胞；および組換え宿主細胞を培養し、そしてペプチドを回収することによって抗微生物性ペプチドを製造する方法に関し、前記方法は適当な切断剤、例えば、前述の切断剤を使用してペプチド保護ドメインを切断する工程を必要に応じて含んでなる。

【0115】

本発明のこれらのクエンチング面の特定の態様において、本発明の共発現に関して本明細書に記載するすべての事項はクエンチングの面にも適用される。これは、特に、例えば、抗微生物性ペプチド、制御配列、宿主細胞およびその他に関する。同様に、クエンチングの面に関して本明細書に記載するすべての事項は、本発明の共発現に適用される。

典型的には、保護ペプチドはペプチド結合により結合された、ある数の天然の、非天然のまたは修飾されたアミノ酸を含んでなるオリゴペプチドまたはペプチドである。特定の態様において、構成成分のアミノ酸は天然のL-アミノ酸である。

【0116】

典型的には、保護ペプチドは、1~100、1~95、1~90、1~85、1~80、1~75、1~70、1~65、1~60、1~55、1~50、1~45、1~40、1~35、1~30、1~25、1~20、1~15、または1~10アミノ酸残基を含んでなるか、あるいはから成る。

それ以上の特定の態様において、保護ペプチドは、1~100、2~100、3~100、4~100、5~100、6~100、7~100、8~100、9~100、または10~100アミノ酸残基を含んでなるか、あるいはから成る。

【0117】

追加の特定の態様において、保護ペプチドは、1~100、2~90、3~80、4~70、5~60、5~50、5~40、5~35、5~30、5~25、または5~20アミノ酸残基を含んでなるか、あるいはから成る。

本発明の保護ペプチドの非限定的例は次の通りである（慣用方向、N-末端が最初である）：E、D、ED、DE、DDE、EED、DED、EDE、DDEEE（配列番号92）、DDDEE（配列番号93）、DDDDE（配列番号94）、EEDDE（配列番号95）、DDEED（配列番号96）、EDEDE（配列番号97）、DDDEEE（配列番号98）、DEDEDE（配列番号99）、およびEEDDEE（配列番号100）。

【0118】

特定の態様において、保護ペプチドは下記の中から選択される：DP、DDDDDP（配列番号101）、EEEEEDP（配列番号102）、E、DE、DDE、DDDE（配列番号103）、DDDDE（配列番号94）、DEDEDEDP（配列番号104）、DDDGEEEGGDDDP（配列番号105）、およびDDDGDDDPDD（配列番号106）。

上記保護ペプチドのEを含有するものは、ちなみにまた切断可能なリンカーそれら自体である。なぜなら、例えば、バシラス・リヘニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）からのC-構成成分プロテアーゼはEのカルボキシル末端側において切断するであろうからである。

【0119】

上記保護ペプチドのDPを含むものは弱酸で切断可能である（上を参照）。

選択的に、またはさらに、これらの保護ペプチドは任意の適当なリンカーと組合わせて、抗微生物性ペプチドからの保護ペプチドの除去を可能とすることができます。

Dおよび/またはE残基の百分率の計算方法を保護ペプチドの選択した例について、下記表に記載する。

【0120】

10

20

30

40

## 【表1】

表1

保護ペプチド	アミノ酸数	D/E残基数	D/E残基%
DP	2	1	50
DDDDDP (配列番号101)	6	5	83
EEEEEDP (配列番号102)	7	6	86
DDDDE (配列番号94)	5	5	100
DEDEDED (配列番号104)	8	7	88
DDDGGEEEGGDDP (配列番号105)	14	9	64
DDDGDDDPDDDE (配列番号106)	14	10	71

10

20

30

40

50

## 【0121】

本発明の保護ペプチドは下記の工程により同定することができる：a) 少なくとも1つのDおよび/またはEを含んでなる保護ペプチドの候補を準備し、b) 保護ペプチドの候補をコードする第1 DNA配列と、抗微生物性ペプチドをコードする第2 DNA配列とを含んでなるDNA構築物を調製し、c) 宿主細胞をb) のDNA構築物で形質転換し、かつ形質転換された宿主細胞を培養してDNA構築物を発現させ、d) 形質転換された宿主細胞の生活能力および/または抗微生物性ペプチドの収量を推定し、そしてe) 保護ペプチドの候補を同定する。ここで保護ペプチドの候補は、工程b) に従いDNA構築物において、工程c) に従い宿主細胞の形質転換のために使用するとき、工程d) において推定して、宿主細胞の生活能力を増加させ、および/または抗微生物性ペプチドの収量を増加させる。

## 【0122】

形質転換された宿主細胞の生活能力は、この分野においてよく知られているように、例えば、450または600 nm、例えば、450 nmにおいて光学密度(OD)を測定することによって測定することができる。抗微生物剤、例えば、抗微生物性ペプチドの収量は、クーマッシャー染色SDSゲル上で、例えば、期待する分子量のバンドおよび、必要に応じて、バンドの強度を見ることによって推定することができる(実施例5参照)。

## 【0123】

発現ベクター

本発明は、また、抗微生物剤をコードする第1核酸配列、酵素をコードする第2異種核酸配列、および転写および翻訳停止シグナルを含んでなる組換え発現ベクターに関する。

## 【0124】

前述の種々の核酸配列および制御配列と一緒に結合させて、1または2以上の好都合な制限部位を包含することができる組換え発現ベクターを製造し、このような部位における酵素および抗微生物剤をコードする核酸配列の挿入または置換を可能とすることができる。選択的に、本発明の核酸配列は、核酸配列または核酸配列を含んでなる核酸構築物を適当な発現用ベクター中に挿入することによって、発現させることができる。発現ベクターをつくるとき、コーディング配列が発現のために適当な制御配列に作用可能に連鎖されるように、コーディング配列はベクター中に位置する。

## 【0125】

組換え発現ベクターは、組換えDNA手順に好都合に付すことができ、そして核酸配列を発現させることができる任意のベクター(例えば、プラスミドまたはウイルス)であることができる。典型的には、ベクターの選択は、ベクターを導入すべき宿主細胞とのベクターの適合性に依存するであろう。ベクターは線形または閉じた円形のプラスミドであることができる。

## 【0126】

ベクターは自律的に複製するベクター、すなわち、染色体外の実在物として存在するベクターであることができ、その複製は染色体の複製に対して独立である。このようなベクターの例は、プラスミド、染色体外因子、ミニ染色体、または人工的染色体である。ベクターは自己複製を保証する手段を含有することができる。選択的に、ベクターは、宿主細胞中に導入したとき、ゲノム中に組込まれ、そしてそれが組込まれている1または2以上の染色体と一緒に複製するものであることができる。さらに、単一のベクターまたはプラスミドまたは一緒にになって宿主細胞のゲノムの中に導入すべき全DNAを含有する2またはそれ以上のベクターまたはプラスミド、またはトランスポゾンを使用することができる。

## 【0127】

本発明のベクターは、形質転換された細胞の容易な選択を可能とする、1または2以上の選択可能なマーカーを含有することができる。選択可能なマーカーは、その産物が生物致死剤またはウイルスに対する耐性、重金属に対する耐性、栄養要求性株に対するプロトトロフィー、およびその他を提供する遺伝子である。細菌の選択可能なマーカーの例は次の通りである：バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) またはバシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) からのdal遺伝子、または抗生物質に対する耐性、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールまたはテトラサイクリンに対する耐性を与えるマーカー。酵母宿主細胞に適当なマーカーは、ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1、およびURA3である。

## 【0128】

フィラメント状真菌宿主細胞において使用する選択可能なマーカーは下記のものを包含するが、これらに限定されない：amdS (アセトアミダーゼ)、argB (オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、bar (ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)、hygB (ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、niaD (硝酸レダクターゼ)、pyrG (オロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ)、sC (硫酸アデニルトランスフェラーゼ)、trpC (アントラニレートシンターゼ)、ならびにそれらの同等物。アスペルギルス・ニヅランス (*Aspergillus nidulans*) またはアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) のamdSおよびpyrG遺伝子およびストレプトマイセス・ヒグロスコピカス (*Streptomyces hygroscopicus*) のbar遺伝子は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞において使用するために好ましい。

## 【0129】

本発明のベクターは、宿主細胞ゲノム中への安定な組込みまたはゲノムに対して独立に細胞中のベクターの自律的複製を可能とする、1または2以上の因子を含有することができる。

## 【0130】

宿主細胞ゲノム中への組込みのために、ベクターは、酵素をコードする核酸配列、または抗微生物剤をコードする核酸配列、または相同意または非相同意組換えによりベクターをゲノム中に安定に組込むベクターの任意の他の因子に頼ることができる。選択的に、ベクターは、相同意組換えにより組込みを宿主細胞ゲノム中に向ける追加の核酸配列を含有することができる。

## 【0131】

追加の核酸配列は、1または2以上の染色体中の1または2以上の正確な位置において宿主細胞ゲノム中にベクターを組込むことができる。正確な位置における組込みの確度を増加させるために、組込み因子は好ましくは十分な数の核酸、例えば、100~1,500塩基対、より好ましくは400~1,500塩基対、最も好ましくは800~1,500塩基対を含有し、これらは対応するターゲット配列と高度に相同意であって相同意組換えの確率を増加させる。組込み因子は、宿主細胞ゲノム中のターゲット配列と相同意である任意の配列であることができる。さらに、組込み因子は非エンコーディングまたはコーディング核酸配列であることができる。他方において、ベクターは非相同意組換えにより宿主細胞ゲノム中に組込むことができる。

## 【0132】

10

20

30

40

50

自律的複製のために、ベクターは問題の宿主細胞中でベクターを自律的に複製させる複製起点をさらに含んでなることができる。細菌の複製起点の例は、大腸菌 (*E. coli*) 中の複製を可能とするプラスミド pBR322、pUC19、pACYC177、およびpACYC184、およびバシラス (*Bacillus*) 中の複製を可能とするpUB110、pE194、pTA1060、およびpAM 1複製起点である。酵母菌宿主細胞において使用する複製起点の例は、2ミクロンの複製起点、ARS1、ARS4、ARS1とCEN3との組合せ、およびARS4とCEN6との組合せである。複製起点は、宿主細胞においてその機能を温度感受性とする突然変異を有するものであることができる（例えば、下記の文献を参照のこと：Ehrlich、1978、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433）。

## 【0133】

10

本発明の核酸配列の2以上のコピーを宿主細胞中に挿入して、遺伝子産物の産生を増加させることができる。核酸配列のコピー数は、宿主細胞ゲノム中に少なくとも1つ追加の配列のコピーを組込むか、あるいは細胞が選択可能なマーカー遺伝子の増幅したコピーを含有する場合、核酸配列をもつ増幅可能、選択可能なマーカーを含めることによって増加させることができ、これにより細胞を適当な選択可能な因子の存在下に培養することによって、核酸配列の追加のコピーを選択することができる。

前述の因子を結合して本発明の組換え発現ベクターを構成するために使用する手順はこの分野においてよく知られている（例えば、下記の文献を参照のこと：Sambrook 他、1989、前掲）。

## 【0134】

20

宿主細胞

本発明は、抗微生物剤をコードする第1核酸配列と、酵素をコードする第2異種核酸配列とを含んでなる組換え宿主細胞に関する。

## 【0135】

30

これらの宿主細胞は、抗微生物剤および酵素の組換え製造において好都合に使用される。対応する核酸配列を含んでなる少なくとも1つのベクターを宿主細胞の中に導入し、こうして1または2以上のベクターを染色体一体化物として、または前述した自己複製する染色体外ベクターとして維持する。用語「宿主細胞」は、複製間に起こる突然変異のために、親細胞と同一ではない親細胞の子孫を包含する。一般に、細胞の選択は抗微生物剤をコードする遺伝子、および/または酵素およびその源をコードする遺伝子に大きい程度に依存する。例えば、抗微生物剤の抗微生物活性により影響を受けないか、あるいは非常に制限された程度に影響を受けた宿主細胞を選択することができる。選択的に、ペプチドを前もってまたは一時的に不活性化（クエンチング）することによって、宿主細胞を抗微生物活性から保護する。なおさらに、一般に、真菌酵素を真菌宿主細胞中で発現させ、そして細菌酵素を細菌宿主細胞中で発現させることが好ましい。

## 【0136】

40

宿主細胞は単細胞微生物、例えば、原核生物、または非単細胞微生物、例えば、真核生物であることができる。

有効な単細胞は細菌細胞であり、これらは下記のものを包含するが、これらに限定されない：バシラス (*Bacillus*) 細胞、またはスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 細胞、または乳酸細菌の細胞；またはグラム陰性細菌、例えば、大腸菌 (*E. coli*) およびシードモナス (*Pseudomonas*) 種。乳酸細菌は下記のものを包含するが、これらに限定されない：属ラクトコッカス (*Lactococcus*)、ラクトバシラス (*Lactobacillus*)、レウコノストク (*Leuconostoc*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、ペジオコッカス (*Pediococcus*)、およびエンテロコッカス (*Enterococcus*)。

## 【0137】

50

細菌宿主細胞中へのベクターの導入は、例えば、下記により実施することができる：プロトプラストの形質転換（例えば、下記の文献を参照のこと：ChangおよびCohen、1979、Molecular General Genetics 168: 111-115）、コンピテント細胞の使用（例えば、下記の文献を参照のこと：YoungおよびSpizizln、1961、Journal of Bacteriology 81: 823-8

29、またはDubnauおよびDavidoff-Abelson、1971、*Journal of Molecular Biology* 56: 209-221)、エレクトロポレーション(例えば、下記の文献を参照のこと: ShigekawaおよびDower、*Biotechniques* 6: 742-751)、または複合化(例えば、下記の文献を参照のこと: KoehlerおよびThorne、1987、*Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278)。

宿主細胞は真核生物、例えば、非ヒト動物の細胞、昆虫細胞、植物細胞、または真菌細胞であることができる。

#### 【0138】

1つの特定の態様において、宿主細胞は真菌細胞である。「真菌」は、本明細書において使用するとき、下記のものを包含する: 子囊菌門(Ascomycota)、担子菌門(Basidiomycota)、ツボカビ菌門(Chytridiomycota)、および接合菌門(Zygomycota)(下記において定義されている: Hawksworth他、Alnsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi、第8版、1995、CAB International、University Press、英国ケンブリッジ)ならびに卵菌門(Oomycota)(下記の文献に記載されている: Hawksworth他、前掲、p. 171)およびすべての栄養胞子真菌(Hawksworth他、1995、前掲)。

10

#### 【0139】

特定の態様において、真菌宿主細胞は酵母細胞である。「酵母」は、本明細書において使用するとき、下記のものを包含する: 子囊胞子酵母(腸内細菌科(Enterobacteriaceae))、担子胞子酵母、および不完全菌類(Fungi Imperfecti)に属する酵母(blastomycetes)。酵母の分類は、この出願の目的に対して、将来において変化することがあるが、酵母はBiology and Activities of Yeastに記載されているように定義されるであろう(Skinner F. A. およびDavenport R. R. 編者、Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9、1980)。

20

#### 【0140】

酵母宿主細胞は、カンジダ(Candida)、ハンゼヌラ(Hansenula)、クライベロマイセス(Kluyveromyces)、ピキア(Pichia)、サッカロマイセス(Saccharomyces)、シゾサッカロマイセス(Scizosaccharomyces)、またはヤロウィア(Yarrowia)細胞であることができる。

20

#### 【0141】

真菌宿主細胞はフィラメント状真菌の細胞であることができる。「フィラメント状真菌」は、亜門の真菌門(Eumycota)および卵菌門(Oomycota)のすべてのフィラメントの形態を包含する(Hawksworth他、1995、前掲において定義されている)。フィラメント状真菌は、キチン、セルロース、グルカン、マンナン、および他の複合多糖から構成されている菌糸体壁により特徴づけられる。栄養成長は菌糸の伸長により、そして炭素異化作用は無条件的に好気性である。対照的に、酵母、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)による栄養成長は単細胞葉状体の発芽により、そして炭素異化作用は発酵的である。

30

#### 【0142】

フィラメント状真菌宿主細胞の例は、下記のものを包含するが、これらに限定されない種の細胞である: アクレモニウム(Acremonium)、アスペルギルス(Aspergillus)、フザリウム(Fusarium)、フミコラ(Humicola)、ケカビ(Mucor)、ミセリオフトラ(Myceliophthora)、ニューロスボラ(Neurospora)、ペニシリウム(Penicillium)、チエラビア(Thielavia)、トリポクラジウム(Tolypocladium)、またはトリコデルマ(Trichoderma)。

40

#### 【0143】

真菌細胞は、それ自体知られている方法におけるプロトプラストの形成、プロトプラストの形質転換、および細胞壁の再生を包含する方法により形質転換することができる。アスペルギルス(Aspergillus)宿主細胞の形質転換に適当な手順は下記の文献に記載されている: EP 238 023およびYelton他、1984、*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474。フザリウム(Fusarium)種の形質転換に適当な方法は下記の文献に記載されている: Malardier他、1989、*Gene* 78: 147-156およびWO 96/00787。

50

酵母は下記の文献に記載されている手順を使用して形質転換することができる: BeckerおよびGuarente、編者、Abelson J. N. およびSimon M. I. 、Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology、Methods in Enzymology Vol. 194、pp. 182-187、Academic Press, Inc.、New York; Ito他、1983、Journal of Bacteriology 153: 163; およびHinnen他、1978、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920。

【0144】

特定の態様において、宿主細胞は微生物宿主細胞であり、上に定義した細菌宿主細胞および真菌宿主細胞を包含する。

【0145】

製造方法

本発明は、また、酵素および抗微生物剤を製造する方法に関し、この方法は (a) 酵素および抗微生物剤の製造を実施する条件下に、本発明の宿主細胞を培養し、そして (b) 酵素および/または抗微生物剤を回収することを含んでなる。

【0146】

本発明の製造方法において、この分野において知られている方法に従い酵素および抗微生物剤の製造に適当な栄養培地中で細胞を培養する。例えば、震盪フラスコ培養、小規模または大規模の発酵（連続的、バッチ式、供給バッチ式、または固体状態の発酵を包含する）により、ポリペプチドの発現および/または単離を可能とする適当な培地中でかつ条件下に実施される実験室または工業的発酵槽において、細胞を培養することができる。炭素源および窒素源および無機塩を含んでなる適当な栄養培地中で、この分野において知られている手順を使用して、培養を実施する。適当な培地は商業的供給会社から入手可能であるか、あるいは発表された組成に従い調製することができる（例えば、American Type Culture Collectionのカタログ）。

【0147】

酵素および抗微生物剤が栄養培地中に分泌される場合、それらを培地から直接回収することができる。それらが分泌されない場合、それらは細胞ライゼイトから回収することができる。

【0148】

問題の酵素に対して特異的である、この分野において知られている方法を使用して、酵素を検出することができる。これらの検出方法は特異的抗体の使用、酵素-産物の形成、または酵素-基質の消失を包含することができる。例えば、酵素アッセイを使用して、本明細書に記載する酵素の活性を決定することができる。抗微生物剤はペプチド上の1または2以上のエピトープに対して向けられた抗体を使用して検出できるか、あるいはペプチドを抗微生物活性により検出することができる。

【0149】

上記において「酵素およびペプチド」と普通に言及される生成物の例は次の通りである：

a) 融合生成物、これは簡単にAMP-ENZと表示するが、上に説明したように、AMPおよびENZの順序は逆にすることができる、そして個々のAMPおよびENZの実在物の数および種類は変化させることができる；

b) 別々の実在物としてのAMPおよびENZ（上に説明したように、数および種類は変化する）；

c) 別々の実在物としてのAMP-QおよびENZ、発現AMP-QはAMP分子に対する保護（クエンチング）ドメインの結合を表示する（再び、上に説明したように、数および種類は変化する）；

d) 融合生成物AMP-Q-ENZ（上に説明したように、数、種類、相対位置およびその他は変化する）。

【0150】

必要に応じて、酵素のみを回収することができ、抗微生物剤のみを回収することができるか、あるいは両方の生成物を回収することができる。

10

20

30

40

50

これらの生成物はこの分野において知られている方法により回収することができる。例えば、それらは下記を包含するが、これらに限定されない手順により回収することができる：遠心、濾過、抽出、噴霧乾燥、蒸発、または沈殿。

【0151】

生成物はこの分野において知られている種々の手順により精製することができ、このような手順は下記を包含するが、これらに限定されない：クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティ、疎水性、クロマトフォーカシング、およびサイズ排除）、電気泳動手順（例えば、調製用等電点電気泳動）、示差溶解度（例えば、硫酸アンモニウム沈降法）、SDS-PAGE、または抽出（例えば、下記の文献を参照のこと：Protein Purification, J. C. JansonおよびLars Ryden、編者、VCH Publishers、New York、1989）。

10

【0152】

酵素および抗微生物剤を2つの明確な生成物として発現させるとき、それらは、例えば、濾過により分離し、次いでこれらの一方または両方のそれ以上の精製は、所望ならばまたは必要に応じて、前述したように慣用経路に従うことができる。

【0153】

酵素および抗微生物剤を製造する方法の特定の態様において、この方法は、融合生成物を切断する工程、すなわち、融合生成物の抗微生物剤部分および酵素部分を分離する工程を含んでなる。これは適当な切断剤（それらの例は前述されている）を使用して実施することができる。切断工程は回収手順の前、間、または後に実施することができるか、あるいは切断は回収後の任意の時間に、例えば、最終ユーザーまたは融合生成物の購入者により、例えば、生成物の意図する最終用途の直前に、または中間生成物、例えば、動物飼料添加物を製造する手順における1工程として実施することができる。

20

【0154】

他の態様において、動物飼料中の融合生成物の使用に関して、融合生成物は摂取前にまったく切断されないが、問題の動物の消化系中の消化プロテアーゼおよび/または化学的/物理的条件は切断し、そして動物による消化時に、活性酵素および抗微生物剤の分子はそれに応じて *in vivo* 放出される。消化プロテアーゼは、このような態様のために適当な切断剤の例である。

【0155】

本発明の方法のなおそれ以上の態様において、保護ペプチド、またはそれらの一部分は切断工程において抗微生物性ペプチド部分から分離され、この工程は前述の切断工程を同一であることができるか、あるいは別の追加の切断工程であることができる。

30

本発明の方法のそれ以上の特定の態様は、追加の酵素および/または抗微生物剤の分子を回収手順から生ずる生成物に添加する工程を含んでなる。これは、1または2以上の抗微生物剤と1または2以上の酵素との間の必要なモル比を有する生成物を得る目的を有する。

【0156】

植物

本発明は、また、回収可能な量で酵素および抗微生物剤を発現し、産生するように、本発明の酵素および抗微生物剤をコードする核酸配列で形質転換された、トランスジェニック植物、植物部分、または植物細胞に関する。酵素および抗微生物剤は植物または植物部分から回収できる。選択的に、これらの生成物を含有する植物または植物部分は、食物または飼料の品質を改良するために、例えば、栄養価、味の良さ、および流動学的性質を改良するために、または抗栄養因子を破壊するために使用できる。

40

特定の態様において、酵素および抗微生物剤は種子中の内乳貯蔵小胞に対してターゲッティングされる。これは適当なシグナルペプチドをもつ前駆体としてそれを合成することによって得ることができる、下記の文献を参照のこと：Horvath 他、PNAS、Feb. 15、2000、Vol. 97、No. 4、pp. 1914-1919。

【0157】

トランスジェニック植物は、双子葉植物（a dicot）または单子葉植物（a monocot）またはそれらの操作された変種であることができる。单子葉植物の例は、イネ科植物、例え

50

ば、ナカハグサ (イチゴツナギ、イネ科、イチゴツナギ科)、飼料の草、例えば、フェスツカ (*festuca*)、ロリウム (*loliu*m)、温帯イネ科植物、例えば、アグロスチス (*Agrostis*)、および穀物、例えば、コムギ、カラスムギ、ライムギ、オオムギ、イネ、モロコシ、ライ小麦 (コムギ (*Triticum*) の安定化されたハイブリッド) およびライムギ (*Secale*)、およびトウモロコシ (コーン) である。

## 【0158】

双子葉植物の例は、タバコ、マメ科植物、例えば、ヒマワリ (*Helianthus*)、ワタ (*Gossypium*)、ハウチワマメ、ジャガイモ、テンサイ、エンドウマメ、ソラマメ・インゲン・ササゲの類およびダイズ、およびアブラナ科植物 (*Brassicaceae*)、例えば、カリフラワー、ナタネ、および密接に関係するモデル生物アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*) である。例えば、下記の文献に記載されている低フィチン酸塩植物は操作された植物の例である：米国特許第5,689,054号および米国特許第6,111,168号。

## 【0159】

植物部分の例は、幹、カルス、葉、根、果実、種子、および塊茎である。また、特定の植物組織、例えば、葉緑体、アポプラスト、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシソーム、および細胞質は植物部分であると考えられる。さらに、いかなる植物細胞も、組織由来が何であっても、植物部分であると考えられる。

また、このような植物、植物部分および植物細胞の子孫は本発明の範囲内に含まれる。

## 【0160】

この分野において知られている方法に従い、本発明の酵素および抗微生物剤を発現するトランスジェニック植物または植物細胞を構築することができる。簡単に述べると、本発明の酵素および抗微生物剤をコードする1または2以上の発現構築物を植物宿主ゲノム中に組込み、そして生ずる修飾された植物または植物細胞をトランスジェニック植物または植物細胞に増殖させることによって、植物または植物細胞を構築する。

## 【0161】

好都合には、発現構築物は核酸構築物であり、これは本発明の酵素および抗微生物剤をコードする核酸配列を含んでなり、この核酸配列は選択した植物または植物部分中の核酸配列の発現に必要な適当な調節配列に作用可能に連鎖されている。さらに、発現構築物はそれが組込まれている宿主細胞を同定するために有効な選択可能なマーカーと、問題の植物中に構築物を導入するために必要なDNA配列とを含んでなる（後者は使用すべきDNA導入法に依存する）。

## 【0162】

調節配列、例えば、プロモーターおよびターミネーター配列および必要に応じてシグナルまたはトラシット配列の選択は、例えば、抗微生物剤および酵素を発現しようとする時間、場所、および方法に依存して決定される。例えば、遺伝子の発現は構成的または誘導可能であるか、あるいは発育、段階または組織特異的であり、そして遺伝子産物を特定の組織または植物部分、例えば、種子または葉にターゲッティングすることができる。調節配列は、例えば、下記の文献に記載されている：Tague 他、1988、*Plant Physiology* 86: 506。

## 【0163】

構成的発現のために、35S-CaMVプロモーターを使用することができる (Franck 他、1980、*Cell* 21: 285-294)。器官特異的プロモーターは、例えば、次の通りである：貯蔵シンク組織、例えば、種子、ジャガイモ塊茎、および果実からのプロモーター (EdwardsおよびCoruzzi、1990、*Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303)、または代謝シンク組織、例えば、分裂組織からのプロモーター (Ito 他、1994、1994、*Plant Mol. Biol.* 24: 863-878)、種子特異的プロモーター、例えば、イネからのグルテリン、プロラミン、グロブリン、またはアルブミンのプロモーター (Wu 他、1998、*Plant and Cell Physiology* 39: 885-889)、ソラマメ・ナンテンハギ (*Vicia faba*) からのレグミンB4および未知の種子タンパク質遺伝子からのソラマメ・ナンテンハギ (*Vicia faba*) プロモーター (Conrad 他、1998、*Journal of Plant Physiology* 152: 708-711)、種子油ボディタンパク質からのプロモータ

10

20

30

40

50

— (Chen 他、1998、*Plant and Cell Physiology* 39: 935-941)、ブラシカ・ナップス (*Brassica napus*) からの貯蔵タンパク質napAプロモーター、またはこの分野において知られている、例えば、WO 91/14772に記載されている、任意の他の種子特異的プロモーター。

【0164】

さらに、プロモーターは次のものであることができる：葉特異的プロモーター、例えば、イネまたはトマトからのrbcsプロモーター (Kyozuka 他、1993、*Plant Physiology* 102: 991-1000)、クロレラウイルスアデニンメチルトランスフェラーゼ遺伝子プロモーター (MitraおよびHiggins、1994、*Plant Molecular Biology* 26: 85-93)、またはイネからのaIdP遺伝子プロモーター (Kagaya 他、1995、*Molecular and General Genetics* 248: 668-674)、または傷誘導性プロモーター、例えば、ジャガイモpin2プロモーター (Xu 他、1993、*Plant Molecular Biology* 22: 573-588)。

【0165】

また、プロモーターエンハンサー因子を使用して、植物中の酵素および抗微生物剤のより高い発現を達成することができる。例えば、プロモーターエンハンサー因子はプロモーターと、本発明の酵素および抗微生物剤をコードする核酸配列との間に配置されたイントロンであることができる。例えば、Xu 他、1993、前掲には、発現を増強するためにイネアクチン1遺伝子の第1イントロンを使用することが開示されている。

【0166】

なおさらに、コドン使用頻度を問題の植物種のために最適化して、発現を改良することができる (前述のHorvath 他、参照)。

選択可能なマークーおよび発現構築物の任意の他の部分を、この分野において入手可能なものから選択することができる。

【0167】

核酸構築物をこの分野において知られている慣用技術、例えば、下記の技術に従い植物ゲノム中に組込む：アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 仲介形質転換、ウイルス仲介形質転換、マイクロインジェクション、粒子衝撃、バイオリスチック (biolistic) 形質転換、およびエレクトロポレーション (Gasser 他、*Science* 244: 1293; Potrykus、1990、*Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto 他、1989、*Nature* 338: 274)。

【0168】

現在、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 仲介遺伝子転移は、トランスジェニック双子葉植物を発生させるために選択される方法である (概観については下記の文献を参照のこと：HooykasおよびSchilpercort、1992、*Plant Molecular Biology* 19: 15-38)。しかしながら、それは単子葉植物の形質転換に使用することができるが、他の形質転換法は一般にこれらの植物のために好ましい。現在、トランスジェニック単子葉植物を発生させるために選択する方法は、胚カルスまたは発育する胚の粒子衝撃 (形質転換性DNAで被覆した微視的金またはタンゲステン粒子) である (Christou、1992、*Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto、1994、*Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil 他、1992、*Bio/Technology* 10: 667-674)。単子葉植物の別の形質転換法は、下記の文献に記載されているようにプロトプラスト形質転換に基づく：Omirulleh 他、1993、*Plant Molecular Biology* 21: 415-428。

【0169】

形質転換後、当業者によく知られている方法に従い、その中に発現構築物を組込んで有する形質転換体を選択し、全植物に再生させる。

本発明は、また、下記工程を含んでなる本発明の酵素および抗微生物剤を製造する方法に関する：(a) 抗微生物剤および酵素の產生を促す条件下にエンコーディング核酸配列を含んでなるトランスジェニック植物または植物細胞を培養し、そして (b) これらを回収する。

【0170】

動物

また、本発明は、トランスジェニック、非ヒト動物およびそれらの生成物または要素に

10

20

30

40

50

関し、それらの例は体液、例えば、乳および血液、器官、筋肉組織、および動物細胞である。例えば、哺乳動物細胞中で、タンパク質を発現させる技術はこの分野において知られており、例えば、下記の文献を参照のこと：ハンドブック *Protein Expression: A Practical Approach*、HigginsおよびHames（編者）、Oxford University Press (1999)、および遺伝子転写、RNAプロセシング、および翻訳後のプロセシングに関するこのシリーズの3冊の他のハンドブック。

#### 【0171】

一般的に言えば、トランスジェニック動物を得るために、酵素および抗微生物剤をコードする核酸構築物で選択した動物の選択した細胞を形質転換して、酵素および抗微生物剤を発現させ、産生させる。抗微生物剤および酵素を動物から、例えば、雌の動物の乳から回収するか、あるいはそれらを動物それ自体の利益のために、例えば、動物の消化を促進するために発現することができる。動物の例は、動物飼料と題する節で後述する。

#### 【0172】

動物の乳から抗微生物剤および酵素を回収する目的でトランスジェニック動物を産生するために、エンコーディング核酸配列を、例えば、適当な乳タンパク質のプロモーターと、必要な核酸配列とを含んでなる、1または2以上のトランスジーン発現ベクターを使用することによって、問題の動物の受精卵中に挿入することができる。トランスジーン発現ベクターを受精卵中にマイクリインジェクトし、好ましくは染色体の中に永久的に組込む。いったん卵が生長しかつ分割し始めると、潜在的胚を代理母中に移植し、そしてトランスジーンを担持する動物を同定する。次いで生ずる動物を慣用の飼育により増殖させることができる。酵素および抗微生物剤を動物の乳から精製することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：Meade H. M. 他 (1999): *Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, Gene expression systems: Using nature for the art of expression*、J. M. FernandezおよびJ. P. Hoeffner（編者）、Academic Press。

#### 【0173】

選択的に、抗微生物剤および酵素をコードするトランスジーンを包む異種トランスジーン構築物を包含する核酸配列を、その体細胞および/または生殖細胞のゲノム中に担持する、トランスジェニック非ヒト動物を産生するために、トランスジーンを第1調節配列に作用可能に連鎖させて、唾液腺特異的発現を達成することができる (WO 00/064247に開示されている)。

#### 【0174】

##### 組成物

なお他の面において、本発明は、前述した、必要に応じて保護ペプチドをもつ（例えば、AMP-(Q)-ENZ）、抗微生物剤および酵素の融合生成物を含んでなる組成物に関する。

これらの組成物はこの分野において知られている方法に従い調製することができ、そして液状または乾燥組成物の形態であることができる。例えば、それらは粒体または微小粒体の形態であることができる。組成物に添加すべき酵素および抗微生物剤は、この分野において知られている方法に従い安定化することができる。

本発明の酵素および抗微生物剤の好ましい使用の例を後述する。

#### 【0175】

##### 動物飼料

用語「動物」は、人間を含む、すべての動物を包含する。動物の例は、非反芻動物、および反芻動物である。反芻動物は、例えば、動物、例えば、ヒツジ、ヤギ、ウマ、およびウシ、例えば、肉牛、雌牛、および若い仔ウシを包含する。特定の態様において、動物は非反芻動物である。非反芻動物は下記のものを包含する：单胃動物、例えば、ブタまたはイノシシ（子豚、生長しているブタ、および雌豚を包含するが、これらに限定されない）；家禽、例えば、シチメンチョウ、雌アヒルおよびニワトリ（ブロイラーひなを包含するが、これらに限定されない）；若い仔ウシ；および魚（サケ、マス、テラピア、ナマズおよびコイを包含するが、これらに限定されない）；および甲殻類（シュリンプおよびブローンを包含するが、これらに限定されない）。

10

20

30

40

50

## 【0176】

用語「飼料」または「飼料組成物」は、動物の摂取に適當な、または意図される化合物、調製物、混合物、または組成物を意味する。

本発明に従う使用において、酵素および抗微生物剤は飼料の前に、後に、またはそれと同時に動物に供給することができる。後者は好ましい。

特定の態様において、酵素および抗微生物剤は、それらが飼料に添加される形態において、または飼料添加物に含められるとき、十分に規定される。「十分に規定される」は、調製物がサイズ排除クロマトグラフィーにより決定して、少なくとも50%の純度であることを意味する(WO 01/58275の実施例12参照)。他の特定の態様において、調製物は、この方法により決定して、少なくとも60、70、80、85、90、92、94、または少なくとも95%の純度である。

10

## 【0177】

十分に規定された調製物は好都合である。例えば、妨害性または汚染する他の成分を本質的に含まない抗微生物剤および酵素の調製物を飼料に正しく投与することは非常に容易である。用語「正しく投与する」は、特に、終始一貫したかつ一定の結果を得るという目的、および必要な効果に基づいて投与量を最適化する可能性を意味する。

しかしながら、動物飼料において使用するために、酵素および抗微生物剤は純粹である必要がない; それは、例えば、追加の酵素および/または追加の剤を含むことができる。

## 【0178】

調製物は(a)直接飼料に添加する(または直接タンパク質の処理プロセスにおいて使用する)ことができるか、あるいはそれは1種または2種以上の中間組成物、例えば、飼料添加物またはプレミックスに添加し、引き続いてこれらを飼料に添加する(または処理プロセスにおいて使用する)ことができる。前述の純度は、(a)または(b)に従い使用するかどうかにかかわらず、もとの酵素および抗微生物剤調製物の純度を意味する。

20

## 【0179】

動物飼料は、通常、植物性タンパク質、例えば、マメ科植物および穀物に由来するタンパク質、例えば、マメ科(Fabaceae) (Leguminosae)、アブラナ科(Cruciferaceae)、アカザ科(Chenopodiaceae)、およびイネ科(Poaceae)の植物の材料、例えば、ダイズ粉末、ハウチマメ粉末およびナタネ粉末を含んでなる。また、飼料は動物性タンパク質、例えば、食肉および骨粉、および/または魚粉を含んでなることができる。

30

## 【0180】

特定の態様において、植物性タンパク質はマメ科(Fabaceae)の1種または2種以上の植物、例えば、ダイズ、ハウチマメ、エンドウマメ、またはソラマメ・インゲン・ササゲの類に由来する。

他の特定の態様において、植物性タンパク質はアカザ科(Chenopodiaceae)の1種または2種以上の植物、例えば、ビート、テンサイ、ホウレンソウまたはキノアに由来する。

植物性タンパク質源の他の例は、ナタネ、ヒマワリの種子、ワタの種子、およびキャベツである。

## 【0181】

ダイズは好ましい植物性タンパク質源である。

植物性タンパク質源の他の例は、穀物、例えば、オオムギ、コムギ、ライムギ、カラスムギ、トウモロコシ(トウモロコシ)、イネ、ライ小麦、およびモロコシである。

40

特定の態様において、酵素および抗微生物剤は動物飼料の栄養価、すなわち、例えば、成長速度および/または体重増加および/または飼料変換率(すなわち、摂取した飼料重量/体重増加)を改良する。

## 【0182】

酵素および抗微生物剤は、任意の形態で、比較的純粹な生成物として、または動物飼料への添加を意図する他の成分との混合物として、すなわち、動物飼料添加物の形態、例えば、いわゆる動物飼料のプレミックスの形態で、飼料に添加することができる。

それ以上の面において、本発明は、動物飼料において使用する組成物、例えば、動物飼

50

料、および動物飼料添加物、例えば、プレミックスに関する。

【0183】

本発明の酵素および抗微生物剤を別として、本発明の動物飼料添加物は、少なくとも1種の脂溶性ビタミン、および/または少なくとも1種の水溶性ビタミン、および/または少なくとも1種の微量ミネラル、および/または必要に応じて少なくとも1種のマクロミネラルを含有する。

さらに、任意の飼料添加物成分は、着色剤、例えば、カロチノイド、例えば、-カロチノイド、アスタキサンチン、およびルテイン；芳香化合物；安定剤；ポリ不飽和脂肪酸；反応性酸素発生種である。

【0184】

通常、脂溶性ビタミンおよび水溶性ビタミン、ならびに微量ミネラルは飼料への添加に意図される、いわゆるプレミックスの一部分を形成するが、マクロミネラルは通常別々に飼料に添加される。これらの組成物のタイプのいずれも、本発明の酵素および抗微生物剤で濃縮されたとき、本発明の動物飼料添加物である。

これらの成分の非限定的リストは次の通りである：

脂溶性ビタミンの例は、ビタミンA、ビタミンD3、ビタミンE、およびビタミンK、ビタミンK3である。

【0185】

水溶性ビタミンの例は、ビタミンB12、ビオチンおよびコリン、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニアシン、葉酸およびパントテン酸塩、例えば、Ca-D-パントテン酸塩である。

微量ミネラルの例は、マンガン、亜鉛、鉄、銅、ヨウ素、セレン、およびコバルトである。

マクロミネラルの例は、カルシウム、リンおよびナトリウムである。

【0186】

ポリ不飽和脂肪酸の例は、C18、C20およびC22ポリ不飽和脂肪酸、例えば、アラキドン酸、ドコソヘキサン酸、エイコサペンタン酸および-リノール酸である。

反応性酸素発生種の例は、化学物質、例えば、過臭素酸塩、過硫酸塩、または過炭酸塩；および酵素、例えば、オキシダーゼ、オキシゲナーゼまたはシンターゼである。

本発明による動物飼料組成物は50～800 g/kgの粗タンパク質含量を有し、さらに本発明の少なくとも1種の酵素および抗微生物剤を含んでなる。

【0187】

粗タンパク質含量は窒素 (N) × 係数6.25として計算される、すなわち、粗タンパク質 (g/kg) = N (g/kg) × 6.25。窒素含量はKjeldahl法により決定される (A. O. A. C., 1984, *Official Methods of Analysis* 第14版、Association of Official Analytical Chemists、ワシントンD.C.)。

特定の態様において、本発明の動物飼料組成物は少なくとも1種の上に定義した植物性タンパク質またはタンパク質源を含有する。また、それは動物性タンパク質、例えば、食肉および骨粉、および/または魚粉を典型的には0～25%の量で含有することができる。

【0188】

なおそれ以上の特定の態様において、本発明の動物飼料組成物は0～80%のトウモロコシ；0～80%のモロコシ；0～70%のコムギ；および/または0～70%のオオムギ；および/または0～30%のカラスムギ；および/または0～40%の大穀かす；および/または0～10%の魚粉；および/または0～20%のホエーを含有する。

【0189】

動物飼料は、例えば、マッシュ飼料（非ペレット化）またはペレット化飼料として製造することができる。典型的には、微粉碎された飼料物質を混合し、そして十分な量の必須ビタミンおよびミネラルを問題の種についての規格に従い添加する。酵素および抗微生物剤は固体状または液状の配合物として添加することができる。例えば、固体状配合物は典型的には混合工程の前または間に添加し、そして液状調製物は典型的にはペレット化工程後

10

20

30

40

50

に添加される。また、酵素および抗微生物剤は飼料添加物またはプレミックスの中に混入することができる。

【0190】

これらは本発明の特定の態様である：

i) ペプチドをコードする第1核酸配列、前記ペプチドはa) 100以下のアミノ酸を含んでなり、そしてb) 抗微生物活性を有する；およびii) 酵素をコードする第2核酸配列を含んでなる少なくとも1種の核酸構築物を含んでなる組換え宿主細胞；好ましくは組換え宿主細胞は第1核酸構築物と、第2核酸構築物とを含んでなり、ここでi) 第1核酸構築物はペプチドをコードする第1核酸配列を含んでなり、そしてii) 第2核酸構築物は酵素をコードする核酸構築物を含んでなる；より好ましくは組換え宿主細胞は、i) ペプチドをコードする第1核酸配列と、ii) 酵素をコードする第2核酸配列とを含んでなる核酸構築物を含んでなる。

【0191】

上に定義したペプチドをコードする第1核酸配列と、請求項1に定義した酵素をコードする第2核酸配列を含んでなる核酸構築物、これらの核酸配列は適当な発現宿主における酵素および抗微生物剤の発現を指令する1または2以上の制御配列に作用可能に連鎖されている。

下記の工程を含んでなる上に定義した酵素およびペプチドを製造する方法：(a) 前述した組換え宿主細胞を培養して、酵素およびペプチドを含んでなる上清を調製し、そして(b) 酵素および/またはペプチドを回収する。

【0192】

酵素、100以下のアミノ酸の抗微生物性ペプチド、および切断可能なリンカーを含んでなる融合生成物。

(a) 少なくとも1種の上に定義した融合生成物、(b) 少なくとも1種の脂溶性ビタミン、および/または(c) 少なくとも1種の水溶性ビタミン、および/または(d) 少なくとも1種の微量ミネラルを含んでなる動物飼料添加物。

50～800 g/kgの粗タンパク質含量を有し、そして少なくとも1種の上に定義した融合生成物を含んでなる動物飼料組成物。

【0193】

上に定義した酵素および抗微生物剤を発現することができる、トランスジェニック植物、または植物部分。

上に定義した酵素および抗微生物剤を発現することができる、トランスジェニック、非ヒト動物、または生成物、またはそれらの要素。

動物飼料における上に定義した融合生成物の使用。

ペプチドの収量を改良しおよび/または全生産経済性を改良するツールとしてのペプチドおよび酵素の共発現の使用。

【0194】

100以下のアミノ酸を含んでなる抗微生物性ペプチドの組換え発現における、保護ペプチドドメイン中に含有されるアミノ酸残基の少なくとも50%がDおよび/またはEである、保護ペプチドドメインの使用；ここで好ましくはペプチド保護ドメインは1～100アミノ酸残基を含んでなる。

アミノ酸残基の少なくとも50%がD(Asp)および/またはE(Glu)であり、そしてペプチドが保護活性を有する、ペプチド、好ましくは単離されたペプチド、ならびに対応する核酸。

【0195】

少なくとも1つのD(Asp)および/またはE(Glu)を含んでなる保護ペプチドを同定する方法：この方法は下記の工程を含んでなる：a) 少なくとも1つのDおよび/またはEを含んでなるペプチド保護候補のライブラリーを準備し；b) ペプチド保護候補のライブラリーのメンバーをコードする第1 DNA配列と、抗微生物性ペプチドをコードする第2 DNA配列とを含んでなるDNA構築物のライブラリーを調製し；c) 宿主細胞をb) のDNA構築物のライブ

10

20

30

40

50

ラリーで形質転換し、形質転換された宿主細胞を培養してDNA構築物を発現させ；d) 形質転換された宿主細胞の生活能力を推定し、および/または分析し、および/または抗微生物性ペプチドの収量を推定し、および/または分析し；そしてe) 工程b) に従うDNA構築物において、工程c) に従う宿主細胞の形質転換のために使用して、工程d) に従い推定し、および/または分析したとき、宿主細胞の生活能力を増加させ、および/または抗微生物性ペプチドの収量を増加させるペプチド保護候補を同定する；ならびにこのような方法により得ることができる、および/または得られた保護ペプチド。

## 【0196】

本明細書に記載しあつ特許請求されている本発明は、本明細書に開示する特定の態様により範囲を限定されない。なぜなら、これらの態様は本発明のいくつかの面の例示を意図しているからである。任意の同等の態様は本発明の範囲内に包含されることを意図する。事実、それらの本明細書に示されかつ記載された態様に加えて種々の変更は、上記説明から当業者にとって明らかとなるであろう。また、このような変更は添付された特許請求の範囲に入ることを意図する。矛盾する場合、定義を含む本発明の開示がコントロールするであろう。

## 【0197】

種々の参考文献が本明細書において引用されており、それらの開示は引用することによって本明細書の一部とされる。

## 【実施例】

## 【0198】

一般に、本発明の実験の部分において使用されている種々の標準的プロトコルについては、Sambrook、Fritsch、およびManiatis、1989を参照されたい。

実施例1. 抗微生物活性のアッセイ

このアッセイは、ノビスピリン (Novispirin) およびPR39の抗微生物活性のアッセイに有効である。それは下記の文献に記載されているプロトコルに基づく：Lehrer 他 (1991) J. Immunol. Methods 137: 167-173。

## 【0199】

選択したターゲット細菌、例えば、大腸菌 (E. coli) ATCC 10536、またはバシラス・サチリス (B. subtilis) ATCC 6633 ( $10^6$  コロニー形成単位 (CFU) を  $10 \text{ ml}$  の下に横たわるアガロース (1%の低電気浸透アガロース、0.03%のトリプチカーゼダイズプロス、 $10 \text{ mM}$  のリン酸ナトリウム、pH 7.4、37 ) に添加した。この懸濁液をINTEGRIDペトリ皿 (Becton Dickinson Labware、ニュージャージー州) 中の固化した。3 mmのゲル・パンチャ (Gel Puncher) を使用して、下に横たわるアガロース中に孔を開けた (Amersham Pharma Biotech. スウェーデン国)。抗微生物活性を示すことが期待される試料を孔に添加し、37 において3時間インキュベートした。オーバーレイ (LB培地、7.5%の寒天) を上部に注ぎ、このプレートを37 において一夜インキュベートした。抗微生物活性はウェルの回りに透明ゾーンとして見られた。 $10 \text{ ml}$  の $0.2 \text{ mM}$  の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プロミド；チアゾリルブルー) を添加することによって、生きている細胞を対比染色した。

## 【0200】

実施例2. 大腸菌 (E. coli) における封入体として抗微生物剤の発現のためのクエンチングドメインの使用

PR39は、抗微生物活性に基づいてブタ腸管から本来単離された、プロリンおよびアルギニンに富んだペプチドである (Argerberth B 他、J. Biochem. 202、849-54 (1991))。PR39の成熟形態は下記の39アミノ酸から構成されている：RRRPRPPYLPRPRPPPPFPRLPPRIPPGFPPRFPPRF (配列番号65)

## 【0201】

封入体中の、例えば、PR39のような抗微生物性ペプチドの発現は、完全には理解されない理由のために、証明が困難であった。その実験において、本発明の種々のペプチド保護ドメインを使用して、発現レベルに対する効果を我々は評価した。

10

20

30

40

50

pET31b+発現ベクター系 (NOVAGENから商業的に入手可能である) 中で、下記の融合構築物を作った：

PHM300:KSI-NG-PR39

PHM370:KSI-DP-PR39

PHM360:KSI-DDDDDP (配列番号101)-PR39 (配列番号65)

PHM350:KSI-EEEEEDP (配列番号102)- PR39 (配列番号65)

#### 【0202】

KSIは、問題のペプチドまたはタンパク質の不溶性封入体として発現を促進することが知られている、ケトステロイドイソメラーゼの不溶性フラグメントである。KSIはpET31b+発現ベクター系の一部分を形成する。

10

PR39は成熟PR39ペプチド (配列番号65) のアミノ酸配列を表示する。

DP (Asp-Pro) 、DDDDDP (Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Pro) (配列番号101) 、およびEEEEEDP (Glu-Glu-Glu-Glu-Asp-Pro) (配列番号102) は、本発明のペプチド保護ドメインの例である。

#### 【0203】

NG (Asn-Gly) は、本発明の保護ドメインではないリンカーの例である。

組換えプラスミドを大腸菌 (*Escherichia coli*) 株B121-DE3 (pET31b+キットの一部分を形成する) の中に形質転換し、そしてPR39の発現をIPTG誘導およびSDS-PAGEにより評価した。結果は、構築物PHM300に比較して、構築物PHM 370、360および350からの発現が増加したことを明瞭に示した。なおさらに、発現レベルは、構築物PHM360およびPHM370に比較して構築物PHM350により、そして構築物PHM370に比較して構築PHM360により、明瞭に増加した。

20

発現後、生ずる融合生成物を弱酸で処理することによって切断することができ (切断部位: D-/-P) 、これにより抗微生物性ペプチドはその抗微生物活性を再び獲得する。

#### 【0204】

#### 実施例3. 大腸菌 (*E. coli*) スイサイド発現系における抗微生物剤の発現におけるクエンチングドメインの使用

この実施例において、WO 00/73433 (特に実施例1参照) に開示されているスイサイド発現系 (SES) を使用する。

30

使用する宿主細胞は大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP 10 (これはInvitrogenから商業的に入手可能である) (araBAD<sup>-</sup>、araEFGH<sup>+</sup>) である。

#### 【0205】

系列pHH (プラスミドpBAD/gIII使用する) のプラスミドは、大腸菌 (*E. coli*) の周辺質空間への抗微生物性ペプチドの輸出を可能とし、ここからペプチドは細胞膜と相互作用することができる。プラスミドpBAD/gIIIはInvitrogenから商業的に入手可能である。それは、大腸菌 (*E. coli*) における緊密に調節された組換え発現のために設計された、pUC由来発現ベクターである。このプラスミドは大腸菌 (*E. coli*) に対して毒性であるペプチドおよびタンパク質のクローニングを可能とする。なぜなら、成長培地中でインデューサーの非存在において、組換えペプチドの発現は起こらないからである。しかしながら、転写、それゆえペプチド合成を広範に誘導することができる。

40

#### 【0206】

系列pHHにおいて、問題のポリペプチド/タンパク質の分泌を仲介するために、pBAD/gIII中の遺伝子IIIシグナル配列は誘導可能なプロモーターの前に位置する。遺伝子IIIはpIIIをコードし、pIIIはフィラメント状ファージfdからの小さいキャプシドタンパク質の1つである。pIIIは18アミノ酸、N-末端のシグナル配列を使用して合成され、そして膜中への挿入のために細菌のSec系を要求する。シグナル配列は内膜を横切った後除去され、こうして成熟ペプチドを残す。NcoI制限部位は配列切断部位の直ぐ後に続く。

#### 【0207】

1または2以上の抗微生物性ペプチドをコードする1または2以上の遺伝子を、pHH系列のプラスミド中にNcoI-XbaIフラグメントとして挿入する。PR39の場合において、これはペ

50

ペチドのN-末端 (CCATGG) にアミノ酸MAを導入させる。自然のコドン使用頻度は保持される。

P39に対する5つの異なるN-末端のエクステンションを構築する、すなわち、E、DDE、DDDE (配列番号103) およびDDDDE (配列番号94)。

【0208】

標準的PCR反応において特異的前方向プロモーターを一般的に逆方向プライマー-pBAD-Revと組合わせて使用してPCRにより、これらのPR39誘導体を作った。両方のプライマーは後述される。PCR録型は、野生型PR39 (wtPR39)、配列番号65をコードするpHHプラスミドであった。

PCRフラグメントを精製し、NcoIおよびXbaIで制限し、pHH中の対応する部位中にクローニングした。プライマー-pBAD-forwおよびpBAD-revを使用してDNA配列決定により、これらの構築物の配列を確認した (下記参照)。

【0209】

SES系における試験からの結果は、wt PR39の阻害に比較して、PR39の5つの誘導体の各々が阻害を減少させたことであった。阻害の減少は抗微生物活性の減少を示し、それゆえ効率的クエンチングを示す。また、下記の系列のN-末端のエクステンションに沿って、阻害の段階的減少が観測された: E、DE、DDE、DDDE (配列番号103) およびDDDDE (配列番号94)。換言すると、最大の阻害はEで、次いでDEで、次いでDDEで、次いでDDDE (配列番号103) で観測されたが、DDDDE (配列番号94) はこの実施例において観測された最小の阻害を示した。

【0210】

5つのPR-39誘導体を増幅し、配列決定するために使用したプライマーは次の通りである:

pHH1531 (E-PR39)

プライマー-pHH1531-Forw:

catagcaccatggaaaggagacgtcccgaccccatatggcc (配列番号66)

pHH1532 (DE-PR39)

プライマー-pHH1532-Forw:

catagcaccatggatgaaaggagacgtcccgaccccatatggcc (配列番号67)

【0211】

pHH1533 (DDE-PR39)

プライマー-pHH1533-Forw:

catagcaccatggacatgaaaggagacgtcccgaccccatatggcc (配列番号68)

pHH1534 (DDDE-PR39)

プライマー-pHH1534-Forw:

catagcaccatggatgacatgaaaggagacgtcccgaccccatatggcc (配列番号69)

【0212】

pHH1535 (DDDDE-PR39)

プライマー-pHH1535-Forw:

catagcaccatggacatgacatgaaaggagacgtcccgaccccatatggcc (配列番号70)

pBAD-forw:

CCATAAGATTAGCGGATCCTACC (配列番号71)

pBAD-rev:

CTCTCATCCGCCAAACAGCC (配列番号72)

【0213】

実施例4. 酵母における抗微生物剤の発現および分泌におけるクエンチングドメインの使用

この実施例において、特異的クエンチングドメインを使用する酵母サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) における2つの異なる抗微生物性ペプチド、ノビスピリン (Novispirin) およびPR39の発現および分泌を例示する。

10

20

30

40

50

ノビスピリンG10は下記のアミノ酸から構成されている抗微生物性ペプチドである: KNL RRIIRKGHIIKKYG (配列番号73)。

【0214】

最初の5つの異なるPR39融合構築物を作った、すなわち、E-PR39、DE-PR39、DDE-PR39、DDDE (配列番号103)-PR39およびDDDDE (配列番号94)-PR39。

いくつかのプロテアーゼはブルタミン酸残基 (E) 後に特異的に切断するので、付加したクエンチングドメインをAMPから遊離させて、AMPの抗微生物活性をモニターすることができる。

標準的PCR反応において下に示す特異的前方向プライマーおよび一般的逆方向プライマーを使用して、PR39誘導体を増幅した。使用したPCR錠型は実施例3において発生させたものであった。

10

20

30

40

50

【0215】

【表2】

表2

誘導体	PCR錠型	Fwdプライマー	Revプライマー
pHH3857 (E-PR39)	pHH1531	pHH3857 fwd	pBAD rev
pHH3858 (DE-PR39)	pHH1532	pHH3858 fwd	pBAD rev
pHH3859 (DDE-PR39)	pHH1533	pHH3859 fwd	pBAD rev
pHH3860 (DDDE-PR39)	pHH1534	pHH3860 fwd	pBAD rev
pHH3861 (DDDDE-PR39)	pHH1535	pHH3861 fwd	pBAD rev

【0216】

プライマー配列

pHH3857 fwd:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAACGCCGAAAGGAGACGTCCCCGACCCCC (配列番号74)

pHH3858 fwd:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAACGCCGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCCC (配列番号75)

30

【0217】

pHH3859 fwd:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAACGCCGACGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCCC (配列番号76)

pHH3860 fwd:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAACGCCGATGACGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCCC (配列番号77)

pHH3861 fwd:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAACGCCGACGATGACGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCCC (配列番号78)

【0218】

生ずる5つのPCRフラグメントを精製し、C<sub>la</sub>IおよびXbaIで制限し、適当な酵母発現ベクター、例えば、商業的に入手可能なベクターpYES2中にクローニングした。5つの誘導体をDNA配列決定により確認し、PED/LiAcプロトコルを使用してサッカロマイセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) の適当な株中に形質転換した。

40

【0219】

期待した分子量をもつ明確なバンドが、ペプチドの発現を示す5つの培養物の各々において観察された。再び、クエンチングドメインがより長くなるほど、抗微生物性ペプチドの産生量がより多くなるように思われ、有効性は下記の順序で増加した: E < DE < DDE < DDDE < DDDDE。制御プラスミド (抗微生物性ペプチドをもたない) を収容する酵母細胞の上清において、バンドは観測されなかった。

【0220】

PR-39をコードする試料は、トリシンSDS-PAGEゲル上で予測したサイズの明確なバンドを示した (SchaggerおよびVon Jagow (87) Anal. Biochem. 166, 368-379)。

C-成分プロテアーゼで消化する前に、実施例1に記載されているように抗微生物活性について分析した上清において、抗微生物活性は検出されなかった。しかし抗微生物性ペプチドからクエンチングドメインを分離した後、PR39をコードする透明ゾーンが観察された。対照試料において、透明ゾーンは観測されなかった。

#### 【0221】

前述と同一の方法において、それ以上の構築物を酵母中で作り、これらは抗微生物性ペプチドの満足すべき発現および分泌を可能とすることが見出された。それ以上の構築物は次の通りであった：

pHH3864: E-ノビスピリン (配列番号73)  
 pHH3865: DDE-ノビスピリン (配列番号73)  
 pHH3866: DDDDE (配列番号94)-ノビスピリン (配列番号73)  
 pHH3879: DEDEDEDP (配列番号104)-ノビスピリン (配列番号73)  
 pHH3880: DEDEDEDP (配列番号104)-PR-39 (配列番号65)  
 pHH3883: DDDGGEEEGGDDDP (配列番号105)-PR-39 (配列番号65)  
 pHH3884: DDDGGDDDDPDDDE (配列番号106)-PR-39 (配列番号65)。

#### 【0222】

##### 実施例5. クエンチングドメインと抗微生物剤との間の距離の外挿

抗微生物性ペプチドとクエンチングドメインとの間の並進距離の効果を研究するために、2つの新しい構築物を作った。実施例4に記載するものに類似する発現構成、すなわち、產生されるペプチドの分泌を可能とする -リーダーを利用するpYES2由来ベクターを使用した。

#### 【0223】

1つの構築物において、pHH3891、すなわち、8アミノ酸グリシンのリンカーをPR-39 (配列番号65) とクエンチングドメインDDDDE (配列番号94)との間に挿入した。他の構築物において、pHH3892、すなわち、12アミノ酸グリシンのリンカーを使用した。プラスミドを標準の分子生物学的方により構築し、DNA配列決定により確認し、実施例4に記載されているように酵母の中に形質転換した。

#### 【0224】

pHH3891 (配列番号117):  
 DDDDE-GGGGGGGGE-RRRPRPPYLPRPRPPPFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFP  
 pHH3892 (配列番号118):  
 DDDDE-GGGGGGGGGGGGE-RRRPRPPYLPRPRPPPFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFP

#### 【0225】

2構築物の各々の2つの独立形質転換体を酵母最小培地SC中で増殖させ (参照: Methods in Yeast Genetics 2000 A p. 174, Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Dan Burke, ISBN 0-87969-588-9/0879695889) (2%のグルコースを補充した)、そして35において震盪させながら3日間インキュベートした。上清を収集し、製造業者 (Invitrogen、米国カリフォルニア州カリスバッド) が推奨するようにBis-Trisゲル上で分析した。

#### 【0226】

すべての4つの上清は6 kDaの見掛けの、期待したサイズをもつペプチドであった。

pHH3891およびpHH3892において產生されたペプチドは、それぞれ6006 Daおよび6234 Daの理論的分子量 (MW) を有する。

これらの結果は、AMPとクエンチングドメイン (保護ペプチド)との間の並進距離に関する柔軟性を示す。

#### 【0227】

##### 実施例6. 酵素および抗微生物剤の共発現

この実施例において、融合タンパク質として、ペクチン酸リアーゼ酵素および2つの抗微生物性ペプチドのいずれかの組換え細菌の共発現、およびそれらからの分泌を例示する

10

20

30

40

50

。

## 【0228】

バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) に由来するペクチン酸リアーゼをコードする遺伝子 (WO 00/75344の配列番号2のアミノ酸28~341) およびa) アスペルギルス・ギガンテウス (*Aspergillus giganteus*) からの抗真菌性ペプチド (AFP) (WO 94/01459の配列番号2) 、またはb) G10ノビスピリンと表示する抗微生物性ペプチド (米国特許第6,492,328号の配列番号17を有する人工的ペプチド) を作り、バシラス・サチリス (*B. subtilis*) の染色体上のamyE遺伝子座中にクロラムフェニコール耐性遺伝子catと一緒に挿入した。使用したバシラス・サチリス (*B. subtilis*) 宿主はWB600asnと表示するプロテアーゼ欠如株であった (J. Bact. 1991, p. 4952-4958に記載されているバシラス・サチリス (*B. subtilis*) WB600のクロラムフェニコール感受性誘導体)。上記a) およびb) に従う融合タンパク質の両方は培養プロセス中に分泌された。

10

## 【0229】

発現カセットはcryIII Aプロモーターの前のバシラス・アミロリクファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) からのamyQプロモーター + バシラス・スリンジエンシス (*Bacillus thuringiensis*) からのmRNA安定化因子であった (参照: 米国特許第6,255,076号、特にその第19図に示されているpDG268 neo系)。

## 【0230】

下記のDNAフラグメントを調製した:

(A) シャイン・ダルガノ配列 (SD) およびシグナルペプチドは、バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) (ATCC 14580) のamyL遺伝子、すなわち、下記のSbaIおよびPstIテイルをもつプライマー1および2により増幅されたPCRフラグメントに由來した:

プライマー1:

tatagagctCCATTGAAAGGGGAGGAGAATC-3' (配列番号107)

プライマー2:

tataCTGCAGAACATGAGGCAGCAAGAAGATGAGC-3' (配列番号108);

## 【0231】

(B) また、ペクチン酸リアーゼ遺伝子のコーディング領域は、バシラス・リヘニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) (ATCC 14580)、すなわち、下記のPstIおよびNheIテイルをもつプライマー3および4により増幅されたPCRフラグメントに由來した:

30

プライマー3:

tataCTGCAGCCGCGGCAGCTTCTGCCCTAAC-3' (配列番号109)

プライマー4:

tataGCTAGCTGGATTGATTTGCCGACTCCG-3' (配列番号110);

## 【0232】

(C1) NheIおよびMluIテイルをもつAFP配列 (配列番号111のヌクレオチド1066~1218) のコーディング領域を含有する合成遺伝子。

40

プライマー5:

tataaacgcgTCTAGCAGTGGCACTTG-3' (配列番号113)

(C2) NheIおよびMluIテイルをもつG10ノビスピリン配列 (配列番号114のヌクレオチド1236~1289) のコーディング領域を含有する合成遺伝子。

プライマー:

tataaacgcgTTATCCGTATTTCTTAATG-3' (配列番号116)

## 【0233】

3つのフラグメント ((A) + (B) + (C1))、または ((A) + (B) + (C2)) を制限酵素消化 (NheI + MluI) 後に組立て、DNA連結およびPCR増幅 (PP1223-9 PCRプライマー1 + プライマー5、DNA鑄型: フラグメント(A) + (B) + (C1) の連結)、(PP1331-2 PCRプライマー1 + プライマー6、DNA鑄型: フラグメント(A) + (B) + (C2) の連結)、および最後にpDG268neoプラスミドのベクター部分中にSacI MluIフラグメントとして挿入した (ユニ-

50

ク *Mu*l 部位は *pDG268neo* プラスミド中のサビナーゼ遺伝子の C-末端部分中に位置した)。

【 0 2 3 4 】

次いで、*amyE* 配列でフランクされた上記発現カセットおよび *cat* 遺伝子をもつプラスミドを、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) VB600 のコンピテント細胞に移した。クロラムフェニコール耐性形質転換体の間で、*amyE* 遺伝子中に挿入された正しい発現カセットをもつコロニーを単離し、挿入されたペクチン酸リアーゼの遺伝子配列を DNA 配列決定により確認した。

【 0 2 3 5 】

PP1223-9 バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) 株において、ペクチン酸リアーゼはアスペルギルス・ギガンテウス (*Aspergillus giganteus*) からの AFP をコードする DNA 配列にインフレームで融合されている。PP1223-9 (配列番号 112 のアミノ酸 1 ~ 368) から分泌された融合タンパク質は、培養プロスを SDS-PAGE ゲル上に流すことによって、正しいサイズ (40 kDa) の主要なバンドとして同定された：

【 0 2 3 6 】

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAAAASALNSGKVNP10LAALK  
NKNANTPLK11IYVNGTITTSNTSASKIDVKDVS12NSIVGSGTKGELKGIGIKIWRANNIIIRNLKIHEVASGDKDAIGIEG  
PSKNIW13VDHNELYHSLNVD14KDYYDGLFDVKRDAEYITFSWNYVHDG15WKSMLGSSSDSDN16YNRTITFHHNWFENLNSRVPS  
FRFGE17GEHIYNNYFN18FNKIIDSGINSRMGARIRIENNL19FENAKDPIV20SWYSSSPGYWHV21SNNKFVNSRGSMPTTSTTTYNPPY  
SYSLDN22VDNV23VKSIVKQNAGVG24GKINPASEATYP25PGKCYKKDNICKYKAQSGKTGICKCYVKRC26PRDGAKCDL27DSYKGKCHC  
(配列番号 112)。配列番号 112 に対応する DNA フラグメントは、配列番号 111 の PP1223-9 *SacI Mu*l フラグメントである。

【 0 2 3 7 】

配列番号 112 の N-末端のシグナルペプチド (下線が引かれている) は、成熟融合ペプチドの分泌の前に切断される。下線が引かれている C-末端のテイル領域は AFP である。成熟ペクチン酸リアーゼの部分はイタリックで示されている。

PP1331-2 バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) 株において、ペクチン酸リアーゼをより長いリンカー (負に帯電したアミノ酸のストレッチ) をコードする DNA 配列および G 10 ノビスピリンにインフレームで融合される。PP1331-2 (配列番号 115 のアミノ酸 1 ~ 392) から分泌された融合タンパク質は、培養プロスを SDS-PAGE ゲル上に流すことによって、正しいサイズ (43 kDa) の主要なバンドとして同定された：

【 0 2 3 8 】

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAAAASALNSGKVNP30LAALK  
NKNANTPLK31IYVNGTITTSNTSASKIDVKDVS32NSIVGSGTKGELKGIGIKIWRANNIIIRNLKIHEVASGDKDAIGIEG  
PSKNIW33VDHNELYHSLNVD34KDYYDGLFDVKRDAEYITFSWNYVHDG35WKSMLGSSSDSDN36YNRTITFHHNWFENLNSRVSS  
FRFGE37GEHIYNNYFN38FNKIIDSGINSRMGARIRIENNL39FENAKDPIV40SWYSSSPGYWHV41SNNKFVNSRGSMPTTSTTTYNPPY  
SYSLDN42VDNV43VKSIVKQNAGVG44GKINPASLDK45REAEACEEERRDEPDERDAQVEHNAREAEADAEAVGPEAFADED  
LDPWE46KNLRR47IIRKG48IHI49IKKG50 (配列番号 115)。

【 0 2 3 9 】

配列番号 115 の N-末端のシグナルペプチド (下線が引かれている) は、成熟融合ペプチドの分泌の前に切断される。下線が引かれている C-末端のテイル領域は G10 ノビスピリンである。成熟ペクチン酸リアーゼの部分はイタリックで示されている。配列番号 115 に対応する DNA フラグメントは、配列番号 114 の PP1331-2 *SacI Mu*l DNA フラグメントである。

【 配列表 】

[2007504810000001.app](http://www.jpo.go.jp/2007504810000001.app)

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT																	
International Application No CT/DK2004/000605																	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N5/10 A23K1/17 C07K14/47 C12N15/62 C12N9/90 A23K1/00 C12N15/82 A01K67/027 C07K1/107																	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N																	
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBL, Sequence Search, PAJ																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category <sup>a</sup></th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 96/14413 A (AGENNIX INC) 17 May 1996 (1996-05-17) cited in the application the whole document</td> <td style="padding: 2px;">1-13</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">OKAMOTO MASAJI ET AL: "Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants" PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 39, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 57-63, XP000917897 ISSN: 0032-0781 cited in the application the whole document</td> <td style="padding: 2px;">1-13</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="padding: 2px;">-/-</td> <td style="padding: 2px;"></td> </tr> </tbody> </table>						Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 96/14413 A (AGENNIX INC) 17 May 1996 (1996-05-17) cited in the application the whole document	1-13	X	OKAMOTO MASAJI ET AL: "Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants" PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 39, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 57-63, XP000917897 ISSN: 0032-0781 cited in the application the whole document	1-13		-/-	
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	WO 96/14413 A (AGENNIX INC) 17 May 1996 (1996-05-17) cited in the application the whole document	1-13															
X	OKAMOTO MASAJI ET AL: "Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants" PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 39, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 57-63, XP000917897 ISSN: 0032-0781 cited in the application the whole document	1-13															
	-/-																
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *S* document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report														
15 November 2004			23/11/2004														
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer  Kools, P														

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DK2004/000605

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/54336 A (KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY ;KIM SUN CHANG (KR); HONG SEUNG SUH) 3 December 1998 (1998-12-03) cited in the application the whole document -----	14-16
Y	WO 96/28559 A (UNIV BRITISH COLUMBIA) 19 September 1996 (1996-09-19) cited in the application page 6, line 26 - page 7, line 20 -----	14-16
A	SHI JISHU ET AL: "Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 40, no. 1, 1996, pages 115-121, XP002276091 ISSN: 0066-4804 the whole document -----	1-21
A	MORREALE GIACOMO ET AL: "Continuous processing of fusion protein expressed as an Escherichia coli inclusion body." JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, vol. 786, no. 1-2, 25 March 2003 (2003-03-25), pages 237-246, XP002276090 ISSN: 1387-2273 (ISSN print) the whole document -----	1-21
A	GACZYNSSKA MARIA ET AL: "Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity." BIOCHEMISTRY, vol. 42, no. 29, 29 July 2003 (2003-07-29), pages 8663-8670, XP002276092 ISSN: 0006-2960 (ISSN print) the whole document -----	1-21
A	SARMASIK ALIYE ET AL: "Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens" MARINE BIOTECHNOLOGY (NEW YORK), vol. 4, no. 3, May 2002 (2002-05), pages 310-322, XP002276093 ISSN: 1436-2228 abstract -----	11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DK2004/000605

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9614413	A 17-05-1996	US 5571697 A		05-11-1996
		AU 4279896 A		31-05-1996
		CA 2204246 A1		17-05-1996
		CN 1171815 A		28-01-1998
		DE 871724 T1		02-06-1999
		EP 0871724 A1		21-10-1998
		ES 2127164 T1		16-04-1999
		JP 10509317 T		14-09-1998
		WO 9614413 A1		17-05-1996
		US 6080559 A		27-06-2000
		US 5955316 A		21-09-1999
WO 9854336	A 03-12-1998	KR 263583 B1		01-08-2000
		AU 719037 B2		04-05-2000
		AU 7788798 A		30-12-1998
		CA 2261569 A1		03-12-1998
		CN 1127569 B		12-11-2003
		EP 0923647 A1		23-06-1999
		JP 3362050 B2		07-01-2003
		JP 2002502246 T		22-01-2002
		WO 9854336 A1		03-12-1998
		US 6183992 B1		06-02-2001
WO 9628559	A 19-09-1996	US 5789377 A		04-08-1998
		CA 2215362 A1		19-09-1996
		EP 0815247 A1		07-01-1998
		WO 9628559 A1		19-09-1996
		JP 11503006 T		23-03-1999
		US 5688767 A		18-11-1997

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/19		4 B 0 6 5	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21		4 H 0 4 5	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/00	A		
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/02			
<b>C 0 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	19/00			
<b>A 2 3 K</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 2 3 K	1/00	Z		
<b>A 2 3 K</b>	<b>1/165</b>	<b>(2006.01)</b>	A 2 3 K	1/165	C		
<b>A 2 3 K</b>	<b>1/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A 2 3 K	1/16	3 0 3 F		

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

- (72)発明者 イエンセン, エイネア ベチ  
デンマーク国, デーコー- 2 8 3 0 ビルム, ベルンハル オルセンスバイ 1 6
- (72)発明者 ヘーゲンハウグ, ハンス-ヘンリク クリストンセン  
デンマーク国, デーコー- 2 8 4 0 ホルテ, コン バルデマルスバイ 1 6
- (72)発明者 ハンセン, ペテル カンプ  
デンマーク国, デーコー- 4 3 2 0 レイレ, ストレ ステンサイエル 2 2
- (72)発明者 ペデルセン, ポウル エリク  
デンマーク国, デーコー- 2 8 6 0 セボルウ, マリエボルウアレ 3 3
- (72)発明者 ミギン, ペル ホルセ  
デンマーク国, デーコー- 2 8 6 0 セボルウ, セボルウ パーク アレ 6 0

F ターム(参考) 2B150 AB10 AC37 DC23 DE01 DF11 DH35  
4B024 AA01 BA07 BA67 BA80 CA05 CA07 DA06 DA12 HA06  
4B050 CC03 DD02 LL02  
4B063 QA18 QQ07 QQ79 QR48 QR76 QS05  
4B064 AG01 CA19 CC24 DA01  
4B065 AA15Y AA26X AA80X AB01 BA02 CA24 CA27 CA43  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 EA07 FA74