

(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2017-517498

(P2017-517498A)

(43) 公表日 平成29年6月29日(2017.6.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 36/81 (2006.01)	A 6 1 K 36/81	4 C 0 8 8
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/137 (2006.01)	A 6 1 K 31/137	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-564054 (P2016-564054)	(71) 出願人	512330503
(86) (22) 出願日	平成27年4月24日 (2015.4.24)		ヘキシマ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月1日 (2016.12.1)		オーストラリア連邦 3086 ビクトリア州 プレンティアー ロード ラ トローブ ユニバーシティ レベル 4 エルアイエムエス 2 ラ トローブ インスティテュート フォー モレキュラー サイエンス
(86) 国際出願番号	PCT/AU2015/050195	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02015/161348		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成27年10月29日 (2015.10.29)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	2014901480		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成26年4月24日 (2014.4.24)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 山口 裕孝
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 薬剤および治療方法

(57) 【要約】

本開示は、全体として、ヒトおよび動物対象における病原体侵入を制御する方法、ならびに当該制御に有用な植物抽出物を含む薬剤および製剤および細胞に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、ヒトまたは動物対象内または対象上の病原体の増殖または侵入を阻害する方法：該病原体を、該病原体の増殖または侵入を阻害するのに有効な併用量の、植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体と、(i) プロテイナーゼ阻害剤または(ii) 化学殺病原体剤もしくは静病原体剤のいずれかとの組み合わせの有効量に接触させる工程。

【請求項 2】

前記ディフェンシンと前記プロテイナーゼ阻害剤または化学剤との組み合わせが、該組み合わせで使用されるのと同じ個々の用量でそれぞれを単独で使用する場合と比較して相乗的である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記植物ディフェンシンが透過性ディフェンシンである、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記透過性ディフェンシンが、NaD1、TPP3、PhD1、PhD1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036からなるリストより選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記透過性ディフェンシンが、ナス科(Solanaceous)クラスIIディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体である、請求項3に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記ディフェンシン変異体が、ナス科クラスIIディフェンシン由来の対応するループ1Bと置き換わっているクラスIディフェンシン由来のループ1Bを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記ディフェンシン変異体が、HXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107からなるリストより選択される、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記プロテイナーゼ阻害剤が、セリンまたはシステインプロテイナーゼ阻害剤である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記プロテイナーゼ阻害剤が、NaPI、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、HvCPI6、SICys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、StPin1A、At2g38870、CI-1B、CI-2、At2g43510およびBPTIからなるリストより選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記化学剤が、シクロピロクス、テルピナフィン、フェンプロピモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド(aganocide)、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアル、ウンデシレン酸、 α -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤からなるリストより選択される、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記エキノキャンディンがカスポファンギンである、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記病原体が真菌病原体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記真菌生物が、アルテルナリア属(Alternaeria spp)、アスペルギルス属(Aspergillus spp)、カンジダ属(Candida spp)、フザリウム属(Fusarium spp)、トリコフィトン属(Trichophyton spp)、クリプトコックス属(Cryptococcus spp)、ヒストプラズマ属(Histoplasma spp)、ミクロスポルム属(Microsporium spp)、ペニシリウム属(Peni

50

cillium spp)、ニューモシスチス属 (*Pneucystis* spp)、トリコスボロン属 (*Trichosporon* spp)、スケドスポリウム属 (*Scedosporium* spp)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces* spp)、アクレモニウム属 (*Acremonium* spp)、スタキボトリス属 (*Stachybotrys* spp)およびデマチアセウス属 (*Dermatiaceae*) カビの菌種からなるリストより選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記真菌生物が、アルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・パラシチカス (*Aspergillus paraciticus*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・デュブリニエンシス (*Candida dubliniensis*)、カンジダ・ファマタ (*Candida famata*)、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)、カンジダ・ギリエルモンディ (*Candida guilliermondii*)、カンジダ・ハエムロニイ (*Candida haemulonii*)、カンジダ・ケフィール (*Candida kefyr*)、カンジダ・クルーセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・ルシタニアエ (*Candida lusitaniae*)、カンジダ・ノルベジェンシス (*Candida norvegensis*)、カンジダ・パラブシローシス (*Candida parapsilosis*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンジダ・ビスワナシイ (*Candida viswanathii*)、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・ソラニ (*Fusarium solani*)、フザリウム・モノリフォルメ (*Fusarium moniliforme*)、トリコフィトン・ルブラム (*Trychophyton rubrum*)、トリコフィトン・メンタグロフィテス (*Trychophyton mentagrophytes*)、トリコフィトン・インタージギターレ (*Trychophyton interdigitales*)、トリコフィトン・トンズランス (*Trychophyton tonsurans*)、クリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*)、クリプトコックス・グルビイ (*Cryptococcus grubii*)、ミクロスポルム・カニス (*Microsporum canis*)、ミクロスポルム・ジブセウム (*Microsporum gypseum*)、ペニシリウム・マルネッフェイ (*Penicillium marneffeii*)、トリコスボロン・ベイゲリ (*Trichosporon beigeli*)、トリコスボロン・アサヒ (*Trichosporon asahii*)、トリコスボロン・インキン (*Trichosporon inkin*)、トリコスボロン・アステロイデス (*Trichosporon asteroides*)、トリコスボロン・クタネウム (*Trichosporon cutaneum*)、トリコスボロン・ドメスティカム (*Trichosporon domesticum*)、トリコスボロン・ムコイデス (*Trichosporon mucoides*)、トリコスボロン・オボイデス (*Trichosporon ovoides*)、トリコスボロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、トリコスボロン・ロウビエリ (*Trichosporon loubieri*)、トリコスボロン・ジャポニカム (*Trichosporon japonicum*)、スケドスポリウム・アピオスペルムム (*Scedosporium apiospermum*)、スケドスポリウム・プロリフィカンズ (*Scedosporium prolificans*)、ペシロミセス・バリオッティ (*Paecilomyces variotii*)、ペシロミセス・リラシヌス (*Paecilomyces lilacinus*)、アクレモニウム・ストリクタム (*Acremonium strictum*)、クラドフィアロフォラ・バンチアナ (*Cladophialophora bantiana*)、ワンギエラ・デルマチチジス (*Wangiella dermatitidis*)、ラミクロリディウム・オボボイデウム (*Ramichloridium obovoideum*)、ケトミウム・アトロブルネウム (*Chaetomium atrobrunneum*)、ダクチラリア・ガロパバム (*Dactylaria gallopavum*)、バイポラリス属 (*Bipolaris* spp)、エクセロヒルム・ロストラツム (*Exserohilum rostratum*) ならびにアブシジア・コリムピフェラ (*Absidia corymbifera*)、アボフィソミセス・エレガンス (*Apophysomyces elegans*)、ムコール・インディカス (*Mucor indicus*)、リゾムコール・プシルス (*Rhizomucor pusillus*)、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*)、カニングハメラ・パーソレチアエ (*Cunninghamella bertholletiae*)、コケロミセス・レクルパタス (*Cokeromyces recurvatus*)、サクセネア・バシフォルミス (*Saksenaia vasiformis*)、シンセファラストラム・ラセモサム (*Syncephalastrum racemosum*)、バシジオボラス・ラナラム (*Basidiobolus ranarum*)、コニディオボルス・コロナトゥス (*Conidiobolus coronatus*) / コニディオボルス・インコングルース (*Conidiobolus incon*

10

20

30

40

50

gruus)、ブラストミセス・デルマチチジス(*Blastomyces dermatitidis*)、コクシディオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)、コクシディオイデス・ボサダシイ(*Coccidioides posadasii*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、パラコクシディオイデス・ブラジリエンシス(*Paracoccidioides brasiliensis*)、シュードアレシェリア・ボイジイ(*Pseudallescheria boydii*)およびスポロトリクス・シェンキイ(*Sporothrix schenckii*)からなるリストより選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記ディフェンシンおよび他の薬剤が、ヒトまたは動物に局所適用される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項16】

前記ディフェンシンおよび他の薬剤が、ヒトまたは動物に非局所適用される、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記ディフェンシンおよび/または前記プロテイナーゼ阻害剤が、遺伝子改変された微生物によって産生されるまたは植物もしくは細胞の抽出物により提供される、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

植物ディフェンシンまたはその機能性合成もしくは天然誘導体もしくは変異体と、プロテイナーゼ阻害剤または抗病原体特性を有する化学剤のいずれかとの組み合わせ、ならびに1つまたは複数の薬学的に許容される担体、希釈剤および/または賦形剤を含む、製剤。

20

【請求項19】

前記植物ディフェンシンが透過性ディフェンシンである、請求項18に記載の製剤。

【請求項20】

前記透過性ディフェンシンが、クラスIIナス科ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体である、請求項18に記載の製剤。

【請求項21】

局所用製剤である、請求項18に記載の製剤。

【請求項22】

前記プロテイナーゼ阻害剤が、NaPI、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、HvCPI6、SICys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、StPin1A、At2g38870、CI-1B、CI-2、At2g43510およびBPTIより選択される、請求項18に記載の製剤。

30

【請求項23】

前記化学剤が、シクロピロクス、テルピナフィン、フェンプロピモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアル、ウンデシレン酸、 α -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤である、請求項18に記載の製剤。

40

【請求項24】

前記エキノキャンディンがカスポファンギンである、請求項18に記載の製剤。

【請求項25】

ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤の供給源としての細胞抽出物または植物抽出物を含む、請求項18に記載の製剤。

【請求項26】

ヒトまたは動物対象の病原体の治療または予防のための医薬の製造における、請求項18~25のいずれか一項に記載の製剤の使用。

【請求項27】

病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、該病原体を、NaD1、TPP3、PhD1、Ph

50

D1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036からなるリストより選択される植物ディフェンシンまたはHXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107からなるリストより選択されるディフェンシンの変異体もしくは誘導体と、プロテイナーゼ阻害剤または抗病原体特性を有する化学剤との組み合わせの有効量に接触させる工程を含み、該ディフェンシンと該プロテイナーゼ阻害剤または該化学剤のいずれかとの組み合わせが、該組み合わせで使用されるのと同じ個々の用量でそれぞれを単独で使用する場合と比較して抗病原体活性を促進する、前記方法。

【請求項 28】

病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、該病原体を、NaD1、TPP3、PhD1、PhD1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036からなるリストより選択される植物ディフェンシンまたはHXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107からなるリストより選択されるディフェンシンの変異体もしくは誘導体と、NaPI、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、HvCPI6、SlCys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、StPin1A、At2g38870、Cl-1B、Cl-2、At2g43510およびBPTIからなるリストより選択されるプロテイナーゼ阻害剤またはシクロピロクス、テルビナフィン、フェンプロビモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアル、ウンデシレン酸、 β -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤からなるリストより選択される化学剤のいずれかとの組み合わせの有効量に接触させる工程を含み、該ディフェンシンと他の薬剤との組み合わせが、該組み合わせで使用されるのと同じ個々の用量でそれぞれを単独で使用する場合と比較して抗病原体活性を促進する、前記方法。

【請求項 29】

真菌病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、該真菌病原体を、NaD1、TPP3、PhD1、PhD1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036からなるリストより選択される植物ディフェンシンまたはHXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107からなるリストより選択されるディフェンシンの変異体もしくは誘導体と、NaPI、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、StPin1A、HvCPI6、SlCys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、At2g38870、Cl-1B、Cl-2、At2g43510およびBPTIからなるリストより選択されるプロテイナーゼ阻害剤またはシクロピロクス、テルビナフィン、フェンプロビモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアル、ウンデシレン酸、 β -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤からなるリストより選択される化学剤のいずれかとの組み合わせの有効量に接触させる工程を含み、該ディフェンシンと他の薬剤との組み合わせが該病原体の増殖の阻害を促進する、前記方法。

【請求項 30】

前記エキノキャンディンがカスポファンギンである、請求項27または29に記載の方法。

【請求項 31】

前記組み合わせが相乗的である、請求項27～30のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

出願情報

本願は、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、2014年4月24日に出願された、「Agents and methods of treatment」を表題とするオーストラリア仮特許出願第2

10

20

30

40

50

014901480号に関連し、その優先権を主張する。

【0002】

背景

本開示は、全体として、ヒトおよび動物対象における病原体侵入を制御する方法、ならびに当該制御に有用な植物抽出物を含む薬剤および製剤および細胞に関する。

【背景技術】

【0003】

分野

関連分野の解説

本明細書において著者によって参照されている刊行物の書誌情報は、詳細な説明の最後にアルファベット順にまとめられている。

10

【0004】

本明細書における任意の先行技術の参照は、この先行技術が任意の国において共通の一般知識の一部を形成していることの承認または何らかの形式の示唆ではなく、かつそのように解釈されるべきではない。

【0005】

病原体の侵入は、ヒトおよび動物において深刻な健康問題を引き起こし得る。これらの健康問題は、ヒトおよび動物の医療費をさらに上昇させる原因となる。予防的手段でさえも、大きな財政出動を必要とする。

20

【0006】

例えば、家禽を含む動物の病原体、例えば真菌病原体に起因する農業的損失は農産業における大きな問題であり、これらの損失を抑えるための殺真菌剤の局所適用に毎年数百万ドルが費やされている。

【0007】

ヒト医学および獣医学において殺真菌剤を含む化学殺病原体剤および抗生物質性の殺病原体剤が成功を収めているが、これらの薬剤の利用の増加は病原体の耐性株の発生の選択圧を提供する。ヒトおよび動物病原体の侵入の制御の代替メカニズムを開発することまたは既存の薬剤をより効果的に運用することが必要とされていることは明らかである。

【0008】

植物は、病原体侵入に対して一定の自然保護を提供する様々なシステムを進化させた。これらの自然免疫システムは、構成性または既形成および誘導性の両方の要素を含む。今日まで、非植物宿主に対する植物自然免疫システムの要素の適用可能性については十分な認識が得られていない。これらの要素の例は、植物免疫の構成性および誘導性の両方の局面において大きな役割を果たす小さな、ジスルフィド豊富なタンパク質である。それらは、それらのシステイン配置に基づくファミリーに分類することができ、チオニン、スナキン (snakin)、ソーマチン様タンパク質、ヘベインおよびノッチン型タンパク質、脂質転移タンパク質、ヘアピニンおよびシクロチドならびにディフェンシンを含む。

30

【0009】

植物ディフェンシンは、4~5つのジスルフィド結合を有する小さな (45~54アミノ酸) 塩基性タンパク質である (Janssen et al. (2003) Biochemistry 42(27):8214-8222 (非特許文献1))。それらは、3本鎖、逆平行の β -シートが3つのジスルフィド結合により β -ヘリックスにつながれシステイン安定化モチーフを形成する共通のジスルフィド結合パターンおよび共通の折りたたみ構造を共有している。第4のジスルフィド結合もNおよびC末端に加わり、それによって極めて安定な構造を形成する。抗細菌活性、タンパク質合成阻害ならびに β -アミラーゼおよびプロテアーゼ阻害を含む様々な機能がディフェンシンに起因している (Colilla et al. (1990) FEBS Lett 270(1-2):191-194 (非特許文献2); Bloch and Richardson (1991) FEBS Lett 279(1):101-104 (非特許文献3))。

40

【0010】

ディフェンシンの構造は、システイン残基間の領域として定義される7つの「ループ」からなる。ループ1は、第1の β -ストランド (1A) および最初の2つの不変システイン残基

50

間の、この α -ストランドを α -ヘリックス (1B) に接続するフレキシブル領域の大部分を含む。ループ2、3および4の最初の部分 (4A) は α -ヘリックスを構成し、残りのループ (4B-7) は α -ストランド2および3ならびにそれらを接続するフレキシブル領域 (α -ヘアピン領域) を構成する (van der Weerden et al. (2013) Cell Mol Life Sci 70(19): 3545-3570 (非特許文献4))。植物ディフェンシンのこのヘアピン領域は、様々なクラスの多くの抗微生物ペプチドに見られる α -コアモチーフを形成する (Yount and Yeaman (2005) Protein Pept Lett 12(1):49-67 (非特許文献5))。

【0011】

それらの保存された構造にもかかわらず、植物ディフェンシンは非常に低い配列同一性しか共有しておらず、完全に保存されているのは8つのシステイン残基だけである。これらのシステイン残基は、それらの存在、および位置がディフェンシン間で保存されていることから、一般に「不変システイン残基」と呼ばれる。配列類似性に基づき、植物ディフェンシンは、異なるグループに分類され得る。各グループ内で、配列相同性は比較的高いが、グループ間のアミノ酸類似性は低い (van der Weerden et al. (2013) Cell Mol Life Sci 70(19): 3545-3570 (非特許文献4))。

10

【0012】

植物ディフェンシンは2つの大クラスに分けることができる。クラスIディフェンシンは、小胞体 (ER) シグナル配列およびそれに続く成熟ディフェンシンドメインからなる。クラスIIディフェンシンは、約33アミノ酸のC末端プロドメインまたはプロペプチド (CTPP) を有するより大きな前駆体として産生される。今日までに同定されているクラスIIディフェンシンの大部分は、ナス科 (Solanaceous) 植物種において見出されている。

20

【0013】

クラスIIナス科ディフェンシンは、花組織において発現される。それらは、観賞用タバコであるニコチアナ・アラタ (Nicotiana glauca) の花において高濃度で発現されるNaD1を含む (Lay et al. (2003) Plant Physiol 131(3):1283-1293 (非特許文献6))。このペプチドの抗真菌活性は、細胞壁への結合、細胞膜の透過および菌糸の細胞質へのこのペプチドの侵入 (van der Weerden et al. (2008) J Biol Chem 283(21): 14445-14452 (非特許文献7)) ならびに活性酸素種の誘導 (Hayes et al. (2014) Cell Mol Life Sci. February 2014, on line ISSN 1420-682X (非特許文献8)) を伴う。

30

【0014】

クラスIIナス科ディフェンシンは、様々な程度に対植物真菌活性を有する。いくつかのクラスIディフェンシンは、非常に低い抗真菌活性を示す。これに対して、非植物病原体における植物ディフェンシンの効果に関しては、ごくわずかに研究しかなされていない。

【0015】

非常に多様な配列を有するディフェンシンは、異なる作用機構を通じて作用する。細胞膜の透過は、多くのディフェンシンで観察される共通の特徴である。しかし、透過機構および細胞死におけるその役割は、異なるディフェンシン間で相違する。いくつかのディフェンシンは、高濃度で膜透過するが、完全な増殖阻害に必要とされる濃度ではそうならない。実際、有意な膜透過に必要とされるこれらのタンパク質の濃度は、増殖阻害に必要とされるものの約20倍である。これらのタンパク質は、増殖阻害に必要とされる濃度でわずかに膜透過するが、それは長時間 (>150分) の後である。これはおそらく、このときより後に起こる真菌の細胞死の結果である。透過のアッセイには、米国特許出願第12/535,443号 (特許文献1) に記載されているSYTOX緑色アッセイが成功裏に使用されている。

40

【0016】

いくつかの他の植物ディフェンシンと異なり、植物ディフェンシンNaD1は、IC50に相当する濃度で有意に膜透過する。NaD1による透過は、15分以内に始まり、80分後にその最大に達する (van der Weerden et al. (2010) J Biol Chem 285(48):37513-37520 (非特許文献9))。NaD1はまた、増殖阻害を引き起こさない低濃度で一定の膜透過を示す (van der Weerden et al. (2008) J Biol Chem 283(21):14445-14452 (非特許文献7))。ディフェンシン間の透過キネティクスの違いは、そのタンパク質の作用機構の違いに起因する

50

と考えられる。したがって、透過アッセイを使用する上で、適当なディフェンシンを選択する必要がある。

【0017】

ヒトおよび動物における病原体の感染および侵入をより効果的に管理するためのプロトコルを開発する必要がある。抗生物質剤の使用が少ないまたはその使用を必要としない病原体の制御をより効果的に促進する能力は、結局のところ、病原体の耐性株が発生する可能性を減少させるであろう。これは、病因および保健施設においてだけでなく、高密度動物施設でも特別な関心事となっている。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0018】

【特許文献1】米国特許出願第12/535,443号

【非特許文献】

【0019】

【非特許文献1】Janssen et al. (2003) Biochemistry 42(27):8214-8222

【非特許文献2】Colilla et al. (1990) FEBS Lett 270(1-2):191-194

【非特許文献3】Bloch and Richardson (1991) FEBS Lett 279(1):101-104

【非特許文献4】van der Weerden et al. (2013) Cell Mol Life Sci 70(19): 3545-3570

0

【非特許文献5】Yount and Yeaman (2005) Protein Pept Lett 12(1):49-67

20

【非特許文献6】Lay et al. (2003) Plant Physiol 131(3):1283-1293

【非特許文献7】van der Weerden et al. (2008) J Biol Chem 283(21): 14445-14452

【非特許文献8】Hayes et al. (2014) Cell Mol Life Sci. February 2014, on line IS SN 1420-682X

【非特許文献9】van der Weerden et al. (2010) J Biol Chem 285(48):37513-37520

【発明の概要】

【0020】

要旨

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、配列番号 (SEQ ID NO) によって表される。SEQ ID NOは、数値的に、配列識別子<400>1 (SEQ ID NO:1)、<400>2 (SEQ ID NO:2) 等に対応する。配列識別子の概要は、表1に提供されている。配列表は、特許請求の範囲の後に提供される。

30

【0021】

本開示は、ヒトまたは動物対象内または対象上の病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、病原体を、病原体の増殖または侵入を阻害するのに有効な併用量の植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体および(i)プロテイナーゼ阻害剤または(ii)化学殺病原体剤もしくは静病原体剤のいずれかの組み合わせの有効量に接触させる工程を含む方法、を教示する。1つの態様において、ディフェンシンおよび(i)プロテイナーゼ阻害剤または(ii)化学剤の組み合わせは、当該組み合わせで使用されるのと同じ個々の用量でそれぞれを単独で使用する場合と比較して相乗効果を有する。

40

【0022】

1つの態様において、植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体は、透過性ディフェンシンである。これらは、クラスIディフェンシンおよびクラスIIナス科 (Solanaceous) ディフェンシンを含む。例は、NaD1 (Q8GTM0)、TPP3 (AAA80496)、PhD1 (Q8H6Q1)、PhD1A (SEQ ID NO:36)、PhD2 (Q8H6Q0)、FST (p32026)、NoD173 (SEQ ID NO:37)、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036を含む。1つの態様において、透過性ディフェンシンは、その機能性天然または合成誘導体または変異体である。合成変異体の例は、クラスIディフェンシン由来のループ1Bがナス科クラスIIディフェンシン由来のループ1Bと

50

置き換わっているものを含む。これらは、HXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107を含む。

【 0 0 2 3 】

「プロテイナーゼ阻害剤」という表現は、植物プロテイナーゼ阻害剤または非植物源のプロテイナーゼ阻害剤および活性形態へのプロセッシングを必要とする前駆体を含む。プロテイナーゼ阻害剤がディフェンシンとの製剤の作製に使用される場合、前駆体形態は、使用前に活性化される。プロテイナーゼ阻害剤の例は、セリンおよびスレオニンプロテイナーゼ阻害剤、例えば、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、HvCPI6、SlCys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、StPin1A、At2g38870、Cl-1B、Cl-2、At2g43510およびBPTIを含む。

【 0 0 2 4 】

「化学剤」という表現は、タンパク質性および非タンパク質性の化学分子を含む。化学殺病原体剤または静病原体剤は、シクロピロクス、テルビナフィン、フェンプロピモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド (aganocide)、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアルおよびウンデシレン酸からなるリストより選択される殺真菌剤を含む。エキノキャンディン殺真菌剤の例は、カスポファンギンである。化学細胞壁シンターゼ阻害剤もまた、本発明で企図されている。タンパク質性殺病原体剤または静病原体剤は、 α -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤ならびに他の細胞壁シンターゼ阻害剤を含む。

【 0 0 2 5 】

驚くべきことに、植物ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学殺病原体剤もしくは静病原体剤の一方の組み合わせが抗病原体活性を促進することが、本願で決定されている。ディフェンシン、プロテイナーゼ阻害剤および化学剤の各々の抗病原体活性は、ディフェンシンが他の2つの薬剤のいずれかと組み合わせて使用される場合に強化される。1つの態様において、この強化は、ディフェンシンとプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかの間の相乗的相互作用から生じる。

【 0 0 2 6 】

病原体には真菌が含まれる。真菌には酵母が含まれる。1つの態様において、病原体は、ヒトまたは動物の真菌病原体である。哺乳動物、例えばヒトを含む動物の真菌病原体は、アルテルナリア属 (*Alternaria* spp)、アスペルギルス属 (*Aspergillus* spp)、カンジダ属 (*Candida* spp)、フザリウム属 (*Fusarium* spp)、トリコフィトン属 (*Trichophyton* spp)、クリプトコックス属 (*Cryptococcus* spp)、ヒストプラズマ属 (*Histoplasma* spp)、ミクロスポルム属 (*Microsporium* spp)、ペニシリウム属 (*Penicillium* spp)、ニューモシスチス属 (*Pneumocystis* spp)、トリコスポロン属 (*Trichosporon* spp)、スケドスポリウム属 (*Scedosporium* spp)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces* spp)、アクレモニウム属 (*Acremonium* spp)、スタキボトリス属 (*Stachybotrys* spp) およびデマチアセウス (*Dermatiaceae*) カビの菌種を含む。哺乳動物および特にヒトを含む特定の動物の病原体は、アルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・パラシチカス (*Aspergillus paraciticus*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・デュブリニエンシス (*Candida dubliniensis*)、カンジダ・ファミタ (*Candida famata*)、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)、カンジダ・ギリエルモンディ (*Candida guilliermondii*)、カンジダ・ハエムロニイ (*Candida haemulonii*)、カンジダ・ケフィール (*Candida kefyr*)、カンジダ・クルーセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・ルシタニアエ (*Candida lusitanae*)、カンジダ・ノルベジェンシス (*Candida norvegensis*)、カンジダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンジダ・ビスワナシイ (*Candida viswanathii*)、フザリウム・オキシスポラム (*Fus*

10

20

30

40

50

arium oxysporum)、フザリウム・ソラニ (*Fusarium solani*)、フザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*)、トリコフィトン・ルブラム (*Trychophyton rubrum*)、トリコフィトン・メンタグロフィテス (*Trychophyton mentagrophytes*)、トリコフィトン・インタージギターレ (*Trychophyton interdigitales*)、トリコフィトン・トンズランス (*Trychophyton tonsurans*)、クリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*)、クリプトコックス・グルビイ (*Cryptococcus grubii*)、ミクロスポルム・カニス (*Microsporum canis*)、ミクロスポルム・ジプセウム (*Microsporum gypseum*)、ペニシリウム・マルネッフェイ (*Penicillium marneffeii*)、トリコスポロン・ベイゲリ (*Trichosporon beigelii*)、トリコスポロン・アサヒ (*Trichosporon asahii*)、トリコスポロン・インキン (*Trichosporon inkin*)、トリコスポロン・アステロイデス (*Trichosporon asteroides*)、トリコスポロン・クタネウム (*Trichosporon cutaneum*)、トリコスポロン・ドメスティカム (*Trichosporon domesticum*)、トリコスポロン・ムコイデス (*Trichosporon mucoides*)、トリコスポロン・オボイデス (*Trichosporon ovoides*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、トリコスポロン・ロウビエリ (*Trichosporon loubieri*)、トリコスポロン・ジャポニカム (*Trichosporon japonicum*)、スケドスポリウム・アピオスベルム (*Scedosporium apiospermum*)、スケドスポリウム・プロリフィカンズ (*Scedosporium prolificans*)、ペシロミセス・バリオッティ (*Paecilomyces variotii*)、ペシロミセス・リラシヌス (*Paecilomyces lilacinus*)、アクレモニウム・ストリクタム (*Acremonium strictum*)、クラドフィアロフォラ・バンチアナ (*Cladophialophora bantiana*)、ワンギエラ・デルマチチジス (*Wangiella dermatitidis*)、ラミクロリディウム・オボボイデウム (*Ramichloridium obovoideum*)、ケトミウム・アトロブルネウム (*Chaetomium atrobrunneum*)、ダクチラリア・ガロパバム (*Dactylaria gallopavum*)、バイボラリス属 (*Bipolaris* spp.)、エクセロヒルム・ロストラツム (*Exserohilum rostratum*) ならびにアブシジア・コリムビフェラ (*Absidia corymbifera*)、アポフィソミセス・エレガンス (*Apophysomyces elegans*)、ムコール・インディカス (*Mucor indicus*)、リゾムコール・プシルス (*Rhizomucor pusillus*)、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*)、カニングハメラ・パーソレチアエ (*Cunninghamella bertholletiae*)、コケロミセス・レクルパタス (*Cokeromyces recurvatus*)、サクセネア・バシフォルミス (*Saksenaia vasiformis*)、シンセファラストラム・ラセモサム (*Syncephalastrum racemosum*)、バシジオボラス・ラナラム (*Basidiobolus ranarum*)、コニディオボルス・コロナトゥス (*Conidiobolus coronatus*) / コニディオボルス・インコングルース (*Conidiobolus incongruus*)、ブラストミセス・デルマチチジス (*Blastomyces dermatitidis*)、コクシディオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、コクシディオイデス・ボサダシイ (*Coccidioides posadasii*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*)、シュードアレシェリア・ボイジイ (*Pseudallescheria boydii*) およびスポロトリクス・シェンキイ (*Sporothrix schenckii*) を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかは、ヒトもしくは動物に局所適用され得るまたはヒトもしくは動物に全身投与され得る。ディフェンシンおよび / またはプロテイナーゼ阻害剤はまた、植物抽出物を含む細胞抽出物の一部として提供され得る。これは、例えば、ハーブ製剤、例えばボディおよびヘアウォッシュにおいて有用である。

【 0 0 2 8 】

ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤もしくは化学剤のいずれかの両方を含む製剤または各々がディフェンシンまたはプロテイナーゼ阻害剤もしくは化学剤の一方を含む製剤の組み合わせが、本明細書でさらに教示されている。製剤はその後、使用前または使用中に組み合わせられる。「製剤」という表現は、細胞抽出物または植物抽出物を含む。

【 0 0 2 9 】

ヒトまたは動物の病原体侵入の治療または予防のための医薬の製造における植物ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかの使用が、本明細書で実現されている。

【0030】

治療され得るヒトは、任意の年齢のヒトを含む。治療され得る動物は、家畜動物、コンパニオン動物、研究試験動物および野生動物を含む。

【0031】

各々が植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体ならびにプロテイナーゼ阻害剤および/または化学剤の一方または両方を各々別個のコンパートメントに含むコンパートメントを含むキットもまた、本明細書に教示されている。適当なディフェンシンおよび様々な要素の最適濃度を同定するためのアッセイもまた、本開示により企図されている。

10

【0032】

別の態様においては、正常フローラの属または種に属する微生物が、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤等のタンパク質を産生するよう遺伝子操作される。そのような微生物は、抗真菌化学剤と共に使用され得る腸領域または皮膚表面領域にコロニー形成するプロバイオティックとして使用され得る。あるいは、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤は、植物を含む細胞の抽出物として提供される。

【0033】

(表1) 配列識別子の概要

20

配列番号	説明
1	最C末端不変システイン残基で終わるかつ該残基を含むNaD1のC末端アミノ酸配列
2	クラスIIナス科ディフェンシンループ1B領域の修飾アミノ酸配列
3	クラスIIナス科ディフェンシンループ1B領域の修飾アミノ酸配列
4	クラスIIナス科ディフェンシンループ1B領域の修飾アミノ酸配列
5	クラスIIナス科ディフェンシンループ1B領域の修飾アミノ酸配列
6	クラスIIナス科ディフェンシンループ1B領域の修飾アミノ酸配列
7	NaD1由来のループ1Bのアミノ酸配列
8	HXP4タンパク質のアミノ酸配列
9	全長HXL001タンパク質のアミノ酸配列
10	全長HXL002タンパク質のアミノ酸配列
11	全長HXL004タンパク質のアミノ酸配列
12	全長HXL007タンパク質のアミノ酸配列
13	全長HXL008タンパク質のアミノ酸配列
14	全長HXL013タンパク質のアミノ酸配列
15	HXP34タンパク質のアミノ酸配列
16	HXP35タンパク質のアミノ酸配列
17	HXP37タンパク質のアミノ酸配列
18	HXP58タンパク質のアミノ酸配列
19	HXP72タンパク質のアミノ酸配列
20	HXP91タンパク質のアミノ酸配列
21	HXP92タンパク質のアミノ酸配列

10

20

30

40

配列番号	説明
22	HXP95タンパク質のアミノ酸配列
23	HXP107タンパク質のアミノ酸配列
24	全長HXL015タンパク質のアミノ酸配列
25	成熟HXL012タンパク質のアミノ酸配列
26	成熟HXL001タンパク質のアミノ酸配列
27	成熟HXL002タンパク質のアミノ酸配列
28	成熟HXL004タンパク質のアミノ酸配列
29	成熟HXL007タンパク質のアミノ酸配列
30	成熟HXL008タンパク質のアミノ酸配列
31	成熟HXL013タンパク質のアミノ酸配列
32	成熟HXL015タンパク質のアミノ酸配列
33	成熟HXL009タンパク質のアミノ酸配列
34	成熟HXL035タンパク質のアミノ酸配列
35	成熟HXL036タンパク質のアミノ酸配列
36	成熟PhD1Aタンパク質のアミノ酸配列
37	成熟NoD173タンパク質のアミノ酸配列

10

20

【発明を実施するための形態】

【0034】

詳細な説明

30

本明細書を通じて、文脈がそうでないことを必要としない限り、「含む (comprise)」という語または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」等の派生語は、言及されている要素もしくは成分もしくは方法の工程または要素もしくは成分もしくは方法の工程の群を含むが、任意の要素もしくは成分もしくは方法の工程または要素もしくは成分もしくは方法の工程の群を排除しないことを暗示しているものと理解されたい。

【0035】

本明細書で使用される場合、「a」、「an」および「the」という単数形は、文脈がそうでないことを明確に示していない限り、複数の局面を含む。したがって、例えば、「ディフェンシン (a defensin)」という表現は、単一のディフェンシンおよび2つ以上のディフェンシンを含み；「薬剤 (an agent)」という表現は、単一の薬剤および2つ以上の薬剤を含み；「本開示 (the disclosure)」という表現は、本開示によって教示される単一および複数の局面を含む、等である。本明細書で教示および実現される局面は、「発明」という用語に包含される。すべてのそのような局面は、本発明の範囲内で実現される。

40

【0036】

プロトコルは、ヒトおよび動物対象における病原体侵入の管理を容易にするために構築されている。このプロトコルは、プロテイナーゼ阻害剤または化学殺病原体剤もしくは静病原体剤のいずれかと組み合わせたの植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体の使用を含む。植物ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤がヒトまたは動物対象に感染する病原体に対する効果的な治療および予防プロトコルを実現することが、本明細書に提示されている。1つの態様において、ディフ

50

ェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤の一方または他方の効果は、相乗的である。

【0037】

したがって、ヒトまたは動物対象における病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、病原体を、病原体の増殖または侵入を阻害するのに有効な併用量の、植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体および(i)プロテイナーゼ阻害剤または(ii)化学殺病原体剤もしくは静病原体剤のいずれかの組み合わせの有効量に接触させる工程を含む方法が、本明細書で実現されている。上記のように、1つの態様において、ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤の組み合わせは、その組み合わせで使用されるのと同じ個々の用量でそれぞれを単独で使用する場合と比較して相乗的である。。便宜上、ヒトおよび動物対象は、「宿主」、「個体」、「標的」、「レシピエント」または「患者」とも称され得る。ディフェンシン、プロテイナーゼ阻害剤および化学物質は、各々「薬剤」とまたは集合的に「薬剤」と称され得る。薬剤は、純粋な形態であり得るまたは細胞もしくは細胞抽出物中に含まれ得る。1つの態様において、化学物質は、細胞抽出物または植物抽出物に添加される。

10

【0038】

1つの態様において、特定のディフェンシン、プロテイナーゼ阻害剤または化学殺病原体剤もしくは静病原体剤単独の阻害効果は、ディフェンシンがプロテイナーゼ阻害剤または化学剤と共に使用される場合に有意に強化される。したがって、1つの態様において、その組み合わせは相乗的である。

20

Greco et al. (1995) Pharmacol Rev. 47:331-385は、2つの薬剤の併用が各々を単独でアッセイした場合の相加的効果よりも大きい活性を有することに基づき相乗作用のカテゴリーを定義している。したがって、本明細書で採用される定義は、一緒に作用する2つの薬剤の併用効果が単独で作用する個々の薬剤の和よりも大きい限り、すべてのそのような状況を含む。さらに、薬剤の組み合わせは、一緒に作用するそれらの薬剤の併用効果が単独で作用する個々の成分の和よりも大きくなる、濃度を含むがこれに限定されない条件セットが存在する場合に、その用語が本明細書で意図するところの相乗的であるとみなされる。Richer (1987) Pestic Sci 19:309-315は、相乗作用の証明を行う数学的アプローチを記載している。このアプローチは、2つの阻害性薬剤XおよびYの併用下での阻害レベルの観測値(I_o)と、それらの併用効果を測定するために使用されたのと同じそれぞれの濃度で別々に作用するXまたはYの各々から得られる相加的効果の期待値(E_e)を比較するためにリンベル式を使用する。相加的阻害率(%) E_e は、 $X + Y - XY/100$ として算出され、ここでXおよびYは阻害率(%)として表される。相乗作用は、 $I_o > E_e$ の場合に存在する。

30

【0039】

相乗作用は、相乗作用スケールで表され得る。1つの態様において、15までの値、例えば0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14は、有意な相乗作用を表さず；15~30の値、例えば15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29は、低い相乗作用を表し；30~60の値、例えば30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59または60は、中程度の相乗作用を表し；60を超える値は、高い相乗作用を表す。「60を超える値」は、61、70、80、90および100ならびにその間の任意の値を含む61~100を含む。

40

【0040】

上記のように、「相乗作用効果」は、開示されるプロトコルにおいて2つ以上の薬剤が、単独で作用する各薬剤の個々の効果の和よりも大きな併用効果を生じる場合に見られる。この効果は、効能、安定性、速度および/または毒性レベルの1つまたは複数であり得る。本明細書に記載されるように、病原体増殖の阻害は、少なくとも1つの植物ディフェンシンとプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のうちの少なくとも一方との併用下で測定された場合に、それ以外では同一条件下の各薬剤(ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれか)の個々の特定濃度範囲の存在下で測定された阻害の和より

50

も大きいときに、相乗的とみなされる。相乗的とみなされるために、2つの薬剤のあらゆる濃度の組み合わせで相加的效果よりも大きな効果が観測される必要はないことが理解されるであろう。2つの薬剤の相乗作用効果は、特定の濃度の組み合わせの下で観測され、他では観測されないことがある。例えば、病原体への侵入が毒性を律速する場合、ディフェンシンの存在は、特にプロテイナーゼ阻害剤または化学剤の濃度が阻害に関して非最適である場合にも、相乗作用をもたらし得る。1つの態様において、ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤の一方または両方の濃度が非最適である。同様に、相乗作用は、前記薬剤のうち1つまたは2つが最大の観測可能な阻害を達成する高レベル（最大レベル）で存在する場合に、埋没し得る。ディフェンシンとプロテイナーゼ阻害剤/化学剤との組み合わせの一般的なシステムは、従って、相乗作用がすべての条件下で観測されない場合でさえも相乗作用の可能性が存在するという理由で、「相乗的」と称される。植物ディフェンシンとプロテイナーゼ阻害剤または化学剤との間の相乗作用は、少なくともいくつかの用量において、単独で作用する個々の薬剤によって得ることができるよりもより大きな病原体阻害を提供する。いくつかの例において、ディフェンシンまたは他の薬剤のうち一方は、他方と組み合わせられるまで、特定の病原体に対して測定可能な効果を有さない。したがって、本発明は、抗生物質または化学剤に対する依存性が低い、病原体侵入からの宿主の高い保護を提供する。これは、ヒトおよび動物のヘルスケアシステムに対する抑制された投入費用、病原体に対する広範囲の活性ならびに耐性の拡散の可能性の減少を意味する。したがって、後者に関して、殺病原体剤耐性病原体株の発生の選択圧が大きく減少し、それによってそれらの薬剤の商業的寿命の延長ならびに耐性病原体の増殖の抑制および病原体の多耐性株の発生の可能性の減少が実現される。

10

20

30

40

50

【0041】

「病原体阻害」は、対照と比較しての病原体増殖の減少（または生存力の喪失）によって測定される、病原体殺傷および病原体抑制の両活性を含む。病原体増殖は、その病原体に依存する当技術分野で公知の多くの異なる方法によって測定され得る。糸状菌の増殖を測定する広く使用されている方法は、例えば、適切な増殖培地中で胞子を発芽させ、測定可能な増殖を達成するのに十分な時間インキュベートし、そして指定インキュベート時間後に培養物中の増加した光学密度を測定することを要する。光学密度は、増殖が大きいほど上昇する。典型的に、真菌の増殖が、発病に必要となる。したがって、病原体増殖の阻害は、真菌疾患からの保護の適当な指標を提供する、すなわち、この指標が大きいほど保護が効果的である。

【0042】

本発明との関係で言う「感染の予防」は、ディフェンシンとプロテイナーゼ阻害剤または化学剤との組み合わせを有するヒトまたは動物が病原体感染もしくは疾患症状もしくは上記のすべてを回避するまたはディフェンシン、ディフェンシンとプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかとの組み合わせに暴露されなかった宿主と比較した場合に宿主・病原体相互作用の自然な結果として減少したもしくは最小限のもしくは低頻度の病原体感染もしくは疾患症状もしくは上記のすべてを示すことを意味する。すなわち、病原体は、疾患および/または関連する疾患症状を引き起こさないよう予防されるまたは減少する。感染および/または症状は、本明細書に教示されるプロトコルで治療されなかった宿主と比較して少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%もしくは80%またはそれ以上減少する。減少率は、宿主および病原体に適した任意の便利な手段によって決定され得る。

【0043】

したがって、ディフェンシンとプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかとの組み合わせられた作用は、他の阻害活性の中でも特に、病原体増殖、複製、感染および/もしくは維持を阻害すること、ならびに/または病原体の侵入の症状の改善を誘導することである。

【0044】

ヒトおよび動物の保護（疾患の予防または治療）は、最初に、インビトロ研究アッセイ

(例えば、病原体阻害アッセイ)を、その後に動物研究および最終的にはヒト臨床試験を用いて試験され得る。

【0045】

「接触」は、ヒトまたは動物対象への局所もしくは全身投与または適用後のディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかの組み合わせへの病原体の暴露を含む。したがって、ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤もしくは化学剤のいずれかはヒトもしくは動物対象の表面領域に局所適用され得る、またはそれらはヒトもしくは動物対象に全身投与され得る。加えて、いくつかの要素、例えばディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤は、微生物によって産生され得る。別の態様において、正常フローラの属または種に属する微生物が、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤等のタンパク質を産生するよう遺伝子操作される。そのような微生物は、抗真菌化学剤と共に使用され得る腸領域または皮膚表面領域にコロニー形成するプロバイオティックとして使用され得る。あるいは、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤は、植物抽出物を含む細胞抽出物として提供される。植物は、生来的にディフェンシンもしくはプロテイナーゼ阻害剤もしくは両方を産生し得るまたは一方もしくは他方もしくは両方を産生するよう操作され得る。

10

【0046】

1つの態様において、ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかは、例えば局所製剤、ヘアもしくはボディウォッシュ溶液または適当な宿主への全身投与に適した製剤として、共に配合される。局所製剤は、水溶液、液体製剤、トニック、点眼剤、点耳剤、ウォッシュ、スプレー、ペイント、粉末、分散物、霧状製剤、ドゥーシェ、クリーム、軟膏、リップスティック、ゲル、スラッジ、ペースト、パッチ、含浸バンデージ等を含む。ディフェンシンおよび任意でプロテイナーゼ阻害剤を含む細胞抽出物または植物抽出物を含む製剤が、本明細書で企図されている。殺真菌剤も添加され得る。

20

【0047】

ヒトまたは動物対象内または対象上での病原体の増殖または侵入を阻害するのに使用するための、植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体およびプロテイナーゼ阻害剤または化学殺病原体剤もしくは静病原体剤のいずれかを含む製剤が、本明細書で実現されている。

【0048】

1つの態様において、第1のコンパートメントが植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体を含み、第2のコンパートメントがプロテイナーゼ阻害剤または化学殺病原体剤もしくは静病原体剤の一方を含み、任意で第3またはさらなるコンパートメントが賦形剤、担体または希釈剤を含み、使用の際に、第1および第2のコンパートメントの内容物がヒトもしくは動物対象または表面への適用前または適用中に混合される、複数のコンパートメントを含む治療用キットが、本明細書に教示されている。1つの態様において、ディフェンシン、プロテイナーゼ阻害剤および化学剤の3つすべてが別個の容器に含まれる。あるいは、キットは、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤を発現するよう操作された凍結乾燥形態または他の再構成可能な形態の微生物を含む。キットは次に、抗病原体特性を有する化学剤を含むコンパートメントを含み得る。ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤はまた、特定の供給源から精製され得るまたは植物細胞抽出物中に存在する。

30

40

【0049】

病原体阻害を促進するよう作用するように組み合わせで使用される、ヒトまたは動物対象内または対象上での病原体の増殖または侵入を阻害するのに使用するためのディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体およびプロテイナーゼ阻害剤または抗病原体特性を有する化学剤のいずれが、本明細書に記載され本明細書で実現されている。1つの態様において、この組み合わせは相乗的である。

【0050】

「植物ディフェンシン」という表現は、文脈が明らかにそうでないことを示していない

50

限り、その機能性天然または合成誘導体または変異体を含む、本明細書で企図されている適当なディフェンシンの例は、透過性ディフェンシン、ナス科クラスIIディフェンシンおよびそれらの機能性天然または合成誘導体または変異体を含む。

【0051】

本明細書で使用されるディフェンシンは、本明細書において、その供給源に依存して、「天然」ディフェンシン、「修飾」ディフェンシン、「変異型」ディフェンシン、「変異」ディフェンシンまたは「キメラ」ディフェンシンを表し得る。

【0052】

1つの態様において、透過性ディフェンシンは、クラスIIナス科ディフェンシンである。1つの態様において、ディフェンシンは、ディフェンシンのN末端部分において、第1の-ストランド（-ストランド1）および-ヘリックスの間のループ領域で修飾される。1つの態様において、ループ領域は、第2の不変システイン残基の6アミノ酸N末端またはその等価物を含む。この領域は、「ループ1B」と定義される。クラスIIナス科ディフェンシンは、成熟ドメインの比較的保存されたC末端部分によって他のディフェンシンと区別される。「クラスIIナス科ディフェンシン」という表現は、NaD1成熟ドメインのC末端部分、NaD1成熟ドメインにおける最C末端不変システインで終わり該システインを含む約20連続アミノ酸残基を含むNaD1のC末端部分（例えば、SEQ ID NO:1）に対して少なくとも70%のアミノ酸配列類似性を有する任意のディフェンシンを含む。「少なくとも70%」は、少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%を意味する。

10

20

【0053】

1つの態様において、クラスIIナス科ディフェンシンのループ1Bアミノ酸配列は、一文字アミノ酸表記法を用いて言う、

X_1 がA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはその天然に存在する修飾型であり、

X_2 がA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはその天然に存在する修飾型であり、

X_3 がA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはその天然に存在する修飾型であり、

X_4 がA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはその天然に存在する修飾型であり、

30

X_5 がA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはその天然に存在する修飾型であり、および/または

X_6 がA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはその天然に存在する修飾型である、

配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ （SEQ ID NO:2）に修飾され、ここでアミノ酸配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ は、修飾の前のクラスIIナス科ディフェンシン由来のループ1Bのアミノ酸配列に対応しない。

【0054】

1つの態様において、クラスIIナス科ディフェンシンのループ1B配列は、

X_1 がN、G、D、H、K、A、E、Q、T、P、L、M、SもしくはRであり、

40

X_2 がK、R、G、H、L、N、F、I、S、TもしくはYであり、

X_3 がW、Y、H、L、G、FもしくはPであり、

X_4 がP、K、S、R、H、T、E、V、N、Q、DもしくはGであり、

X_5 がS、K、Y、F、GもしくはHであり、および/または

X_6 がP、V、L、T、A、F、N、K、R、M、G、H、IもしくはYである、

である配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ （SEQ ID NO:3）に修飾され、ここでアミノ酸配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ は、修飾の前のクラスIIナス科ディフェンシン由来のループ1Bのアミノ酸配列に対応しない。

【0055】

1つの態様において、クラスIIナス科ディフェンシンのループ1B配列は、

50

X_1 が N、H、Q、D、K もしくは E であり、
 X_2 が R、H、T、K もしくは G であり、
 X_3 が F、H、Y もしくは W であり、
 X_4 が P、K、S もしくは R であり、
 X_5 が G もしくは F であり、および / または
 X_6 が P、V、I もしくは N である、

である配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (SEQ ID NO:4) に修飾され、ここでアミノ酸配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ は、修飾の前のクラスIIナス科ディフェンシン由来のループ1Bのアミノ酸配列に対応しない。

【0056】

10

「 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 」という表現は、ループ1B領域に対応する6個の連続するアミノ酸残基を意味する。

【0057】

1つの態様において、人工的に作製されたまたは修飾されたディフェンシンは、SEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列を含む。この配列において、ループ1B領域は、

X_1 が L、F、S、I、A、H、Y、Q、D、K または G からなるリストより選択されるアミノ酸であり、

X_2 が S、V、F、I、K、L、A、P、N、T、R、H または G からなるリストより選択されるアミノ酸であり、

X_3 が A、F、W、N、I、S、Y、P、L または H からなるリストより選択されるアミノ酸であり

20

、

X_4 が K、G、E、R、A、P、F、Q、V または S からなるリストより選択されるアミノ酸であり

、

X_5 が M、G、K、D、S、Y、P、E、N または F からなるリストより選択されるアミノ酸であり

、および

X_6 が V、T、M、S、W、A、P、G、E、K、L、H、I または N からなるリストより選択されるアミノ酸である、

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ と定義される。

【0058】

1つの態様において、人工的に作製されたまたは修飾されたディフェンシンは、SEQ ID NO:6に示されるアミノ酸配列を含む。この配列において、ループ1B領域は、

30

X_1 が N、H、Q、D、K または E からなるリストより選択されるアミノ酸であり、

X_2 が R、H、T、K または G からなるリストより選択されるアミノ酸であり、

X_3 が F、H、Y または W からなるリストより選択されるアミノ酸であり、

X_4 が P、K、S または R からなるリストより選択されるアミノ酸であり、

X_5 が G または F からなるリストより選択されるアミノ酸であり、および

X_6 が P、V、I または N からなるリストより選択されるアミノ酸である、

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ と定義される。

【0059】

クラスIIナス科ディフェンシンであるNaD1の場合、ループ1Bアミノ酸配列は、NTFPGI (SEQ ID NO:7) である。その結果、NTFPGIは、NがA、R、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはそれらの天然に存在する修飾型の一つによって置換され、TがA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、W、YもしくはVまたはそれらの天然に存在する修飾型の一つによって置換され、FがA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、P、S、T、W、YもしくはVまたはそれらの天然に存在する修飾型の一つによって置換され、PがA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、S、T、W、YもしくはVまたはそれらの天然に存在する修飾型の一つによって置換され、GがA、R、N、D、C、Q、E、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVまたはそれらの天然に存在する修飾型の一つによって置換され、および / またはIがA、R、N、D、C、Q、E、G、H、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVの一つによって置換され、ただしループ1Bアミノ酸配列はNaD1由来のループ1B

40

50

に対応しないように修飾される。ループ1B配列は、単一のアミノ酸変化を有し得るまたは2もしくは3もしくは4もしくは5もしくは全6つのアミノ酸が変更され得る。

【0060】

クラスIIナス科ディフェンシンは、ループ1B領域に対する任意の数のアミノ酸変化単独またはそれと他の変異との組み合わせによって修飾され得る。他の変異は、アミノ酸置換、付加および/または欠失を含む。ループ1B領域外の変異は、1~約50の数であり得る。

「変化」は、クラスIIナス科ディフェンシンのループ1B領域への、あるディフェンシン由来のループ1B領域の移植を含む。その供給源は、クラスIディフェンシンループ1Bまたは別のクラスIIディフェンシン由来のループ1Bであり得る。これらの局面は、少なくとも1つのヒトまたは動物病原体に対する修飾されたディフェンシンおよび他の薬剤の併用の強化された抗病原体活性が維持されるという条件に基づく。1つの態様において、抗病原体活性は、活性のレベルもしくは範囲、安定性および/または透過性の観点で、修飾前のクラスIIディフェンシンに対して強化される。1つの態様において、抗病原体活性は、活性のレベルもしくは範囲、安定性および/または透過性の観点で、クラスIIディフェンシンの修飾前のペプチドに対して強化される。

【0061】

したがって、抗病原体活性を有する変異型ディフェンシンを生成するようN末端部分の-ストランド1と-ヘリックスの間のループ領域が単一または複数のアミノ酸置換、付加および/または欠失によって修飾された、修飾されたクラスIIナス科ディフェンシン骨格を含む人工的に作製されたディフェンシンと共に抗病原体特性を有するプロテイナーゼ阻害剤または化学剤を使用することが、本発明に含まれる。1つの態様において、ループ領域は、第2の不変システイン残基のN末端側の6アミノ酸残基によって定義されるループ1Bである。任意のディフェンシンにおけるその等価領域が、本明細書で企図されている。

【0062】

適当なディフェンシンの例は、NaD1、TPP3、PhD1、PhD1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001 (SEQ ID NO:26)、HXL002 (SEQ ID NO:27)、HXL004 (SEQ ID NO:28)、HXL007 (SEQ ID NO:29)、HXL008 (SEQ ID NO:30)、HXL009 (SEQ ID NO:33)、HXL012 (SEQ ID NO:25)、HXL013 (SEQ ID NO:31)、HXL015 (SEQ ID NO:32)、HXL035およびHXL036を含む。合成ディフェンシン変異体の例は、HXP4 (SEQ ID NO:8)、HXP34 (SEQ ID NO:15) およびHXP35 (SEQ ID NO:16) を含む。変異型ディフェンシンの他の例は、HXP37 (SEQ ID NO:17)、HXP58 (SEQ ID NO:18)、HXP72 (SEQ ID NO:19)、HXP91 (SEQ ID NO:20)、HXP92 (SEQ ID NO:21)、HXP95 (SEQ ID NO:22) およびHXP107 (SEQ ID NO:23) を含む。

【0063】

病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、病原体を、NaD1、TPP3、PhD1、PhD1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036からなるリストより選択される植物ディフェンシンまたはHXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107からなるリストより選択されるディフェンシンの誘導体もしくは変異体ならびに抗病原体特性を有するプロテイナーゼ阻害剤または化学剤の組み合わせの有効量に接触させる工程を含み、ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤の組み合わせが、当該組み合わせで使用されるのと同じ個々の用量でそれぞれを単独で使用する場合と比較して抗病原体活性を促進する、前記方法が、本明細書に教示されている。

【0064】

1つの態様において、薬剤は、相乗的に作用する。

【0065】

適当なプロテイナーゼ阻害剤は、セリンおよびスレオニンプロテイナーゼ阻害剤、例えば、NaPI、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、HvCPI6、SlCys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、StPin1A、At2g38870、CI-1B、CI-2、At2g43510およびBPTIを含む。

【0066】

「化学剤」という表現は、タンパク質性および非タンパク質性の化学分子を含む。化学

10

20

30

40

50

殺病原体剤または静病原体剤は、シクロピロクス、テルビナフィン、フェンプロピモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアルおよびウンデシレン酸からなるリストより選択される殺真菌剤を含む。エキノキャンディン殺真菌剤の例は、カスポファンギンである。化学細胞壁シンターゼ阻害剤もまた、本発明で企図されている。タンパク質性殺病原体剤または静病原体剤は、 α -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤ならびに他の細胞壁シンターゼ阻害剤を含む。

【0067】

病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、病原体を、NaD1、TPP3、PhD1、PhD1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036からなるリストより選択される植物ディフェンシンまたはHXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107からなるリストより選択されるディフェンシンの変異体もしくは誘導体ならびにNaPI、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、HvCPI6、SlCys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、StPin1A、At2g38870、Cl-1B、Cl-2、At2g43510およびBPTIからなるリストより選択されるプロテイナーゼ阻害剤またはシクロピロクス、テルビナフィン、フェンプロピモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン（例えば、カスポファンギン）、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアル、ウンデシレン酸、 α -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤からなるリストより選択される化学剤のいずれかの組み合わせの有効量に接触させる工程を含み、ディフェンシンおよび他の薬剤の組み合わせが、その組み合わせで使用されるのと同じ個々の用量でそれぞれを単独で使用する場合と比較して抗病原体活性を促進する方法が、本明細書に教示されている。1つの態様において、この組み合わせは相乗的である。

【0068】

1つの態様において、病原体は真菌である。

【0069】

真菌病原体の増殖または侵入を阻害する方法であって、真菌病原体を、病原体の阻害または増殖を促進するディフェンシンおよび他の薬剤の組み合わせの、NaD1、TPP3、PhD1、PhD1A、PhD2、FST、NoD173、HXL001、HXL002、HXL004、HXL007、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015、HXL035およびHXL036からなるリストより選択される植物ディフェンシンまたはHXP4、HXP34、HXP35、HXP37、HXP58、HXP72、HXP91、HXP92、HXP95およびHXP107からなるリストより選択されるディフェンシンの変異体もしくは誘導体ならびにNaPI、NaCys1、NaCys2、NaCys3、NaCys4、HvCPI6、SlCys9、Oc-1a、Oc-1b、Oc-1c、Oc-1d、StPin1A、At2g38870、Cl-1B、Cl-2、At2g43510およびBPTIからなるリストより選択されるプロテイナーゼ阻害剤またはシクロピロクス、テルビナフィン、フェンプロピモルフ、ケトコナゾール、イントラコナゾール、フルコナゾール、アモロルフィン、アンホテリシン、アゾール、ポリエン、エキノキャンディン（例えば、カスポファンギン）、アリルアミン、グリセオフルビン、トルナフタート、ベンゾオキサボロール、アガノシド、フルシトシン、ハロプロギン、ポリゴジアル、ウンデシレン酸、 α -グルカンシンターゼ阻害剤およびキチンシンターゼ阻害剤からなるリストより選択される化学剤のいずれかの組み合わせの有効量に接触させる工程を含む方法が、本明細書に教示されている。1つの態様において、この組み合わせは相乗的である。

【0070】

本発明の方法は、対象の治療もしくは予防において有用である。「対象」という用語は、任意の年齢のヒトまたは動物、例えば家畜動物（例えば、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ、ロバ、ラマ、アルパカもしくは家禽（例えば、ニワトリ、アヒル、シチメンチョウ、キジ

10

20

30

40

50

、クジャク))、コンパニオン動物(例えば、イヌもしくはネコ)、研究試験動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモットもしくはハムスター)または捕獲野生動物(例えば、カンガルー、タスマニアデビルもしくは野生ネコ科動物)を含む。「ヒト」または「動物」は、その一部分、例えば指、つま先、爪、目、耳、口、鼻、鼻腔、蹄、生殖組織、肺、皮膚および頭皮を含む。

【0071】

哺乳動物、例えばヒトを含む動物の真菌病原体は、アルテルナリア属、アスペルギルス属、カンジダ属、フザリウム属、トリコフィトン属、クリプトコックス属、ヒストプラズマ属、ミクロスポルム属、ペニシリウム属、ニューモシスチス属、トリコスボロン属、スケドスポリウム属、ペシロミセス属、アクレモニウム属、スタキボトリス属およびデマチアセウスカビの菌種を含む。哺乳動物および特にヒトを含む特定の動物の病原体は、アルテルナリア・アルテルナータ、アスペルギルス・フミガタス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ニデュランシス、アスペルギルス・パラシチカス、カンジダ・アルビカンシス、カンジダ・デュブリニエンシス、カンジダ・ファマタ、カンジダ・グラブラータ、カンジダ・ギリエルモンディ、カンジダ・ハエムロニイ、カンジダ・ケフィー、カンジダ・クルーセイ、カンジダ・ルシタニアエ、カンジダ・ノルベジェンシス、カンジダ・パラブシローシス、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・ビスワナシイ、フザリウム・オキシスポラム、フザリウム・ソラニ、フザリウム・モニリフォルメ、トリコフィトン・ルブラム、トリコフィトン・メンタグロフィテス、トリコフィトン・インタージギターレ、トリコフィトン・トンズランシス、クリプトコックス・ネオフォルマンス、クリプトコックス・ガッティ、クリプトコックス・グルビイ、ミクロスポルム・カニス、ミクロスポルム・ジブセウム、ペニシリウム・マルネッフェイ、トリコスボロン・ベイゲリ、トリコスボロン・アサヒ、トリコスボロン・インキン、トリコスボロン・アステロイデス、トリコスボロン・クタネウム、トリコスボロン・ドメスティカム、トリコスボロン・ムコイデス、トリコスボロン・オボイデス、トリコスボロン・ブルランシス、トリコスボロン・ロウビエリ、トリコスボロン・ジャボニカム、スケドスポリウム・アピオスペルムム、スケドスポリウム・プロリフィカンシス、ペシロミセス・バリオッティ、ペシロミセス・リラシヌス、アクレモニウム・ストリクタム、クラドフィアロフォラ・バンチアナ、ワンギエラ・デルマチチジス、ラミクロリディウム・オボボイデウム、ケトミウム・アトロブルネウム、ダクチラリア・ガロパラム、バイボラリス属、エクセロヒルム・ロストラツムならびにアブシジア・コリムビフェラ、アボフィソミセス・エレガンシス、ムコール・インディカス、リゾムコール・ブシルス、リゾプス・オリゼ、カニングハメラ・バーソレチアエ、コケロミセス・レクルバタス、サクセネア・バシフォルミス、シンセファラストラム・ラセモサム、バシジオボラス・ラナラム、コニディオボルス・コロナトウス/コニディオボルス・インコングルース、プラストミセス・デルマチチジス、コクシディオイデス・イミチス、コクシディオイデス・ボサダシイ、ヒストプラズマ・カブスラーツム、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス、シュードアレシェリア・ボイジイおよびスポロトリクス・シェンキイを含む。

【0072】

本明細書に教示されるディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または化学剤のいずれかの組み合わせは、ヒトおよび動物における病原体疾患または感染を撃退するのに有用である。したがって、本明細書は、病原体の治療または予防のためのプロトコルを教示する。このプロトコルは、ヒトおよび獣医学的用途を有する。本明細書に記載されるディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または抗病原体特性を有する化学剤のいずれかの組み合わせに病原体を暴露する、病原体を撃退するプロセスがさらに提供される。ディフェンシンおよび/またはペプチドの一方または両方が、組成物の形態で使用され得る。

【0073】

本明細書に教示される別の局面は、1つまたは複数の薬学的または獣医学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と共に、植物ディフェンシンまたはその機能性天然もしくは合成誘導体もしくは変異体およびプロテイナーゼ阻害剤または抗病原体特性を有する化学

剤のいずれかを含む組成物である。別の態様においては、一方がディフェンシンを含み、一方が他の薬剤を含む、2つの組成物が使用される。1つの態様において、組成物は、スプレー、ミスト、マイクロもしくはナノ粒子、水溶液、ウォッシュ、トニック、分散物、霧状製剤、ドゥーシェ、リップスティック、スラッジ、粉末、クリーム、軟膏、ゲル、パッチ、含浸バンデージ、液体、製剤、ペイントまたは組成物の局所もしくは全身用形態を含むその他の適当な分散媒体の形態である。「全身用形態」は、経口、静脈内、末梢内、皮下、くも膜下、頭蓋内、腔または直腸投与に適した形態を含む。組成物は、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤の一方もしくは他方または両方を含む細胞抽出物または植物抽出物を含む。化学剤は、組成物に添加され得る。

【0074】

本明細書に記載されるディフェンシンおよび他の薬剤を含む組成物は、通常、担体、賦形剤、希釈剤、保存剤、安定化剤および/または固体もしくは液体添加物を含む。

【0075】

組成物は、意図される投与方法に依存して、様々な形態をとり得る。ヒトまたは動物対象に対しては、通常、しかし排他的にはなく、局所組成物が使用される。組成物を調製する際、有用な媒体、例えば水、グリコール、オイル、アルコール、保存剤および/または着色剤が使用され得る。組成物は、液体調製物、例えば懸濁物、エリキシルおよび溶液の形態をとり得る。担体、例えばデンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤等も使用され得る。組成物はまた、粉末、カプセルおよび錠剤の形態であり得る。

【0076】

エアゾールまたはスプレーによって投与される場合、組成物は、医薬製剤の分野において周知の技術にしたがい調製され、そしてベンジルアルコールもしくは他の適当な保存剤、バイオアベイラビリティを向上させる吸収促進剤、フッ化炭素および/または当技術分野で公知の他の可溶化もしくは分散剤を用いて、生理食塩水中の溶液として調製され得る。

【0077】

ディフェンシンおよび他の薬剤の有効用量は、用いられる個々の組み合わせ、投与様式、治療する病原体および病原体侵入の重篤度によって異なり得る。したがって、ディフェンシンおよびペプチドを使用する投薬計画は、対象のタイプ、種、年齢、体重、性別および医学的状态；治療する状態の重篤度；投与経路；および用いられるその個々のディフェンシンを含む様々な要因にしたがって選択される。通常の技能を有する医師、臨床医または獣医は、病原体侵入を防止する、対抗するまたはその進行を停止させるために必要とされるディフェンシンの有効量を容易に決定し、必要に応じて処方することができる。徐放製剤もまた、本明細書で企図されている。

【0078】

ドラジェコアは、適当なコーティングと共に提供される。この目的で、任意でアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボールゲル、ポリエチレングリコールおよび/または二酸化チタン、ラッカー溶液ならびに適当な有機溶媒または溶媒混合物を含み得る濃縮糖溶液が使用され得る。識別のためまたは活性化合物の異なる組み合わせを特徴づけるために、染料または色素が錠剤またはドラジェ用コーティングに添加され得る。

【0079】

ディフェンシン・薬剤調製物は、ゼラチンから製造されるプッシュフィットカプセルならびにゼラチンおよび可塑剤、例えばグリセロールまたはソルビトールから製造される軟質密封カプセルを含む。プッシュフィットカプセルは、充填剤、例えばラクトース、結合剤、例えばデンプンおよび/または滑沢剤、例えばタルクもしくはステアリン酸マグネシウムおよび任意で安定化剤と共に活性成分を含み得る。軟質カプセルにおいて、活性化合物は、適当な液体、例えば脂肪油、液体パラフィンまたは液体ポリエチレングリコール中に溶解または懸濁され得る。加えて、安定化剤が添加され得る。

【0080】

10

20

30

40

50

別の態様において、正常フローラの属または種に属する微生物が、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤等のタンパク質を産生するよう遺伝子操作される。そのような微生物は、抗真菌化学剤と共に使用され得る腸領域または皮膚表面領域にコロニー形成するプロバイオティックとして使用され得る。あるいは、ディフェンシンおよび/またはプロテイナーゼ阻害剤は、細胞抽出物として提供される。

【0081】

別の局面は、病原体に感染したまたは病原体が侵入した哺乳動物、例えばヒト対象を含む動物を治療または予防するプロトコルまたは方法であって、対象に、本明細書に記載される植物ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または抗病原体特性を有する化学剤のいずれかを含む組成物の抗病原体有効量を適用する工程を含む方法またはプロトコルを提供する。

10

【0082】

「適用」という用語は、接触および暴露を含む。

【0083】

上記ディフェンシンおよびペプチドは、例えばペプチドまたはタンパク質合成装置を用いる、1つまたは複数のアミノ酸残基の標準的な段階的付加を用いてそのアミノ酸配列に基づき製造され得る。あるいは、ディフェンシンおよびペプチドは、組み換え手段によって作製され得るまたは天然供給源から精製されるまたは植物もしくはその他の生物学的供給源由来の抽出物中に存在する。例えば、抽出物は、ボディウォッシュまたはシャンプーにおいて使用され得る。

20

【0084】

上記のように、ディフェンシンおよび他の薬剤の組み合わせは、改善されたまたは強化された抗病原体活性を示す。

【0085】

さらに別の局面は、ヒトもしくは動物対象上または内での病原体侵入を減少または制御する方法であって、植物ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤または抗病原体特性を有する化学剤のいずれかの組み合わせを、ヒトまたは動物上の潜在的感染表面領域に局所適用する工程を含む方法を提供する。したがって、動物および特に哺乳動物、例えばヒトの抗病原体薬が、本明細書で企図されている。1つの態様において、この薬は、粉末、スプレー、噴霧物、ナノ粒子、ゲル、ペースト、含浸バンデージ、ペイント、エアロゾル、ドレンチまたはその他の液体の形態である。抗病原体製剤はまた、徐放組成物であり得る。この製剤は、感染した対象を治療するためにまたは予防薬として使用され得る。1つの例において、製剤は、爪、頭皮、目、耳、鼻腔、ひづめ、生殖組織、肺および皮膚領域、例えばつま先間の真菌感染または侵入を予防または治療するために使用される。

30

【0086】

本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」は、「含む (including)」、「含む (containing)」または「により特徴づけられる」と同義語であり、そして包括的またはオープンエンド型であり、追加の不特定の要素または方法の工程を排除しない。本明細書で使用される場合、「からなる」は、特許請求の範囲の要素によって特定されていないあらゆる要素、工程または成分を排除する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規の特徴に実質的に影響しない物質または工程を排除しない。本明細書における「含む (comprising)」という用語のあらゆる使用は、特に組成物の成分の記載またはデバイスの要素の記載において、言及されている成分または要素から本質的になるまたはそれらからなる組成物および方法を包含することが理解される。本明細書に例示的に記載されている本開示は、本明細書に具体的に開示されていない任意の要素または要素群、制限または制限群なしに適切に実施され得る。

40

【0087】

マーカッシュ群または他の群が本明細書で使用される場合、その群のすべての個々のメンバーならびにその群のすべての組み合わせおよび可能性のある下位的組み合わせが、個々に、その開示の中に含まれることが意図されている。

50

【 0 0 8 8 】

本明細書で範囲について言及される場合、言及されている範囲内のすべての部分範囲および言及されている範囲内のすべての整数値が、各部分範囲および整数値が言及されているかのごとく、意図されていることが意図されている。

【 0 0 8 9 】

透過性ディフェンシンが最適な透過を提供する濃度範囲と共に同定された後、それは、選択された病原体に対して異なるペプチドとの組み合わせを用いて試験される。

【 実施例 】

【 0 0 9 0 】

ここからは、本明細書で開示され実現される局面を、以下の非限定的な実施例の中で説明する。

【 0 0 9 1 】

方法

ピキア・パストリスからのディフェンシンの精製

単一のpPINK-ディフェンシンP.パストリスPichiaPink (商標)株1コロニーを使用して、250mLフラスコ中25mLの (Invitrogen Pichia Expression Manualに記載される) BMG培地に接種し、それを30 の振盪インキュベーター (140 rpm) 内で2~3日間インキュベートする。この培養物を使用して1Lバッフル付きフラスコ中200mLのBMGに接種し、それを一晩30 の振盪インキュベーター (140 rpm) に設置する。この細胞を遠心分離 (2,500 x g、10分間、4) によって収集し、5Lバッフル付きフラスコ中1LのBMM培地に再懸濁し、28 の振盪インキュベーターにおいて3日間インキュベートする。この培養物を、t=24および48時間で誘導する。発現培地を遠心分離 (6000 rpm、20分間) によって細胞から分離する。この培地を、100mMリン酸カリウム緩衝液、pH 6.0で事前平衡化されたSPセファロースカラム (1cm x 1cm, Amersham Biosciences) に適用する前にpH 3.0に調整する。次いでこのカラムを100mLの100mMリン酸カリウム緩衝液、pH 6.0で洗浄し、結合したタンパク質を、500mMのNaClを含む10 x 10mLの100mMリン酸カリウム緩衝液で溶出する。溶出されたタンパク質を、遠心分離カラムを用いて1mLに濃縮し、滅菌milli Q超純水を用いて5回洗浄する。ピキア発現ディフェンシンのタンパク質濃度を、タンパク質標準としてウシ血清アルブミン (BSA) を用いるピシンコニン酸 (BCA) タンパク質アッセイ (Pierce Chemical Co.) を用いて決定する。

【 0 0 9 2 】

プロテイナーゼ阻害剤の調製

総RNAを、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いてトマト (Solanum lycopersicum) の葉から抽出した。次いでcDNAを、SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて合成した。C末端伸長を欠くSlCys9の成熟形態 (Genbankアクセッション番号AF198388) (以前はtSlCys9と呼ばれていたが (Girard et al. (2007) New Phytol 173: 841-851)、本明細書ではSlCys9Nと称する) をコードするDNAを増幅し、SacIIおよびSacIを用いてpHUE発現ベクター (Cantanzariti et al. (2004) Protein Science 13:1331-1339) に挿入した。HvCPI6の場合、ゲノムDNAを、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いてオオムギ (Hordeum vulgare) の葉から抽出した。HvCPI6の成熟形態 (Genbankアクセッション番号AJ748341) をコードするDNAを増幅し、SacIIおよびSacIを用いてpHUE発現ベクター (Cantanzariti et al. (2004) 前記) に挿入した。プラスミドDNAを単離し、次いでこれを使用して大腸菌Tuner (DE3) pLysS (Novagen) 細胞を形質転換した。

【 0 0 9 3 】

単一コロニーの大腸菌Tuner (DE3) pLysS (Novagen) を使用して、アンピシリン (0.1 mg/mL)、クロラムフェニコール (0.34 mg/mL)、テトラサイクリン (0.1 mg/mL) およびカナマイシン (0.015 mg/mL) を含む2YT培地 (10mL、16 g/Lトリプトン、10g/L酵母エキス、5 g/L NaCl) に接種し、37 で振盪しながら一晩増殖させた。この培養物を使用して、アンピシリン (0.1 mg/mL)、クロラムフェニコール (0.34 mg/mL)、テトラサイクリン

ン (0.1 mg/mL) およびカナマイシン (0.015 mg/mL) を含む2YT培地 (500 mL) に接種し、次いでこれを約1.0の光学密度 (600nm) になるまで4時間増殖させた。次いでIPTGを添加し (0.5 mM終濃度)、培養物を37℃でさらに4時間増殖させた。細胞を遠心分離 (4,000 g、4分、20分間) によって収集し、ネイティブ溶解緩衝液 (細胞培養物1リットルあたり20 mL、50 mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、10 mM イミダゾール、pH 8.0) に再懸濁し、そして-80℃で凍結させた。次いで細胞を解凍し、4分、20分間、リゾチーム (25 mLの再懸濁細胞あたり5 mg) を用いて処理した。次いでDNase I (125 µL、20%グリセロール中2 mg/mL、75 mM NaCl) およびMgCl₂ (125 µL、1M) を添加し、サンプルを揺動プラットフォーム上で、室温で40分間インキュベートした。次いでサンプルを氷上で2 x 30秒間超音波処理し (出力80%、Branson sonifier 450)、遠心分離 (20,000g、4分、30分間) した。次いでヘキサヒスチジンタグ付加されたユビキチン融合タンパク質 (His6-Ub-SICys9N/HVCP16) を、製造元の指示にしたがいNi-NTA樹脂 (1.5 mL ~ 約25 mLネイティブタンパク質抽出物、Qiagen) を用いたネイティブ条件下での固定化金属親和性クロマトグラフィー (IMAC) によってタンパク質抽出物から精製した。組み換えタンパク質を、溶出緩衝液 (250mMイミダゾール、200mM NaCl、50mM NaH₂PO₄、pH 8.0) を用いて溶出させた。イミダゾールは、溶出させたタンパク質を、50mM Tris Cl、100mM NaCl、pH 8.0で平衡化させた充填済みSephadex G50ゲル濾過カラム (PD-10、Amersham) に適用することによって除去した。

10

【0094】

ヘキサヒスチジンタグ付加ユビキチンを、脱ユビキチン化酵素6H.Usp2-cc (Cantanzariti et al. (2004) Protein Sci 13:1331-1339) を用いて組み換えタンパク質から切断した。切断されたタグは、脱ユビキチン化プロテアーゼ阻害剤を用いる別のラウンドのIMACによって非結合タンパク質として除去した。次いでこれを逆相HPLCによってさらに精製した。

20

【0095】

組み換えHvCPI6およびSICys9Nを、H₂O中の10倍ストック溶液として調製した。ウシ臍臓トリプシン阻害剤 (BPTI) を、Sigmaから購入し (製品番号T0256)、これを希釈してH₂O中の10倍ストック溶液にした。

【0096】

化学殺真菌剤の調製

化学殺真菌剤は、商業的に入手し、H₂O中の10xストック溶液 (カスポファンギンおよびフェンプロピモルフ) としてまたはメタノール中の100xストック (テルビナフィン) として調製した。

30

【0097】

胞子の調製

胞子は、酵母エキスパプトンデキストロス寒天 (カンジダ・アルビカンズ、クリプトコックス・ガッティ - 1.5 x 10⁶) または1/2強度サブローデキストロス寒天 (トリコフィトン・インタージギターレ、ミクロスポルム・フルバム 5 x 10⁴) 上で増殖させた胞子形成真菌種から単離する。胞子を、1/2強度ジャガイモデキストロスブロス (PDB) を添加することによってプレートから取り出す。胞子濃度を、ヘマトサイトメーターを用いて測定する。

40

【0098】

抗真菌アッセイ

抗真菌アッセイを、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて行った。ウェルに10 µLのフィルター滅菌済み (0.22 µmシリンジフィルター、Millipore) ディフェンシン (各終濃度の10xストック) または水、10 µLのフィルター滅菌済み (0.22 µmシリンジフィルター、Millipore) プロテイナーゼ阻害剤もしくは化学殺真菌剤 (各終濃度の10xストック) または水および80 µLの1/2強度PDB 1mLあたり5 x 10³個の胞子を添加した。このプレートを24℃でインキュベートした。真菌増殖を、マイクロタイタープレートリーダー (SpectraMax Pro M2; Molecular Devices) を用いて595nmでの光学密度 (A595) を測定することによってアッセイした。試験ディフェンシンの非存在下での真菌の光学密度 (OD) が0.

50

2のODに達するまで増殖を続けた。各試験を2回行った。

【0099】

相乗作用は、ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤（またはディフェンシンおよび化学殺真菌剤）の組み合わせによってもたらされる真菌増殖阻害率（％）の観測値（ I_o 値）と、ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤（またはディフェンシンおよび化学殺真菌剤）のそれぞれの真菌増殖阻害率（％）の和に基づくディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤（またはディフェンシンおよび化学殺真菌剤）の予想される真菌増殖阻害率（％）（Richer et al. (1987) 前記によって使用されるリンベル式にしたがい計算される E_e 値）との間の差として分類される。差 $I_o - E_e$ が相乗値である。15までの相乗値は、有意でない相乗作用を意味し、15～30は、低レベルの相乗作用であり、30～60は、中レベルの相乗作用であり、>60は高レベルの相乗作用である。相乗作用の計算は、表2～7に示されており、表中、上記のように、 E_e は、阻害率（％）として表されるリンベル式にしたがう相加的反応から予想される効果であり、 I_o は、観察された阻害率（％）である。相乗作用は、 I_o 値が E_e 値よりも高い場合に存在する。

10

【0100】

実施例1

透過性ディフェンシンおよびプロテイナーゼ阻害剤

ディフェンシンは、透過性ディフェンシンであるナス科クラスIIディフェンシン（NaD1）、人工変異型ディフェンシン（HXP4）およびクラスIディフェンシン（HXL001、HXL004、HXL008、HXL012、HXL013、HXL015）を含む。これらを、プロテイナーゼ阻害剤BPTI、HvCPI6またはS1Cys9Nと組み合わせる。結果が表2～5に示されている。

20

【0101】

カンジダ・アルビカンスの相乗的阻害の結果を表2に示す。

【0102】

（表2）カンジダ・アルビカンス

透過性 ディフェンシン	プロテイナーゼ 阻害剤	阻害期待値	阻害観測値	相乗作用
NaD1 (2 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	29.7	94.1	64.4
	HvCPI6 (2.5 μ M)	0.0	64.7	64.7
	SlCys9N (2.5 μ M)	31.9	94.8	62.9
HXP4 (2 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	16.2	100	83.8
	HvCPI6 (2.5 μ M)	15.9	93.5	77.6
	SlCys9N (2.5 μ M)	33	92.4	59.4
HXL001 (4 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	2.6	72.6	70.1
	HvCPI6 (2.5 μ M)	59.2	84.2	25.0
	SlCys9N (2 μ M)	68.1	85.0	16.9
HXL004 (2 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	9.6	91.2	81.6
	HvCPI6 (2.5 μ M)	63.6	93.5	29.9
	SlCys9N (2.5 μ M)	55.2	81.8	26.6
HXL008 (2 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	0.0	100.0	100.0
	HvCPI6 (2.5 μ M)	14.8	63.8	49.0
	SlCys9N (2.5 μ M)	30.2	98.9	68.7
HXL012 (4 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	14.8	89.7	74.9
	HvCPI6 (2.5 μ M)	12.3	100.0	87.7
	SlCys9N (2.5 μ M)	34.5	97.3	62.8
HXL013 (1 μ M)	HvCPI6 (2.5 μ M)	10.1	100.0	89.9
	SlCys9N (2.5 μ M)	13.8	100.0	86.2
HXL015 (1 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	28.1	100.0	71.9
	HvCPI6 (2.5 μ M)	0.0	100.0	100.0
	SlCys9N (2.5 μ M)	0.0	94.7	94.7

10

20

【 0 1 0 3 】

クリプトコックス・ガッティの相乗的阻害の結果を表3に示す。

【 0 1 0 4 】

30

(表3) クリプトコックス・ガッティ

透過性 ディフェンシン	プロテイナーゼ 阻害剤	阻害期待値	阻害観測値	相乗作用
NaD1 (2 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	22.0	95.6	73.7
	HvCPI6 (2.5 μ M)	32.1	96.2	64.1
	SlCys9N (2.5 μ M)	0.0	98.8	98.8
HXP4 (0.5 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	48.8	97.4	48.6
	HvCPI6 (2.5 μ M)	18.6	97.4	78.8
	SlCys9N (2.5 μ M)	0.0	99.3	99.3

40

【 0 1 0 5 】

トリコフィトン・インタージギターレの相乗的阻害の結果を表4に示す。

【 0 1 0 6 】

(表4) トリコフィトン・インタージギターレ

透過性 ディフェンシン	プロテイナーゼ 阻害剤	阻害期待値	阻害観測値	相乗作用
NaD1 (1 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	57.9	89.1	31.2
	HvCPI6 (2.5 μ M)	33.5	71.6	38.1
	SlCys9N (2.5 μ M)	28.1	81.1	53.0
HXP4 (0.5 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	32.9	69.0	36.1
	HvCPI6 (2.5 μ M)	31.1	56.8	25.7
	SlCys9N (2.5 μ M)	9.7	53.0	43.4
HXL001 (0.5 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	36.9	67.4	30.5
	HvCPI6 (2.5 μ M)	32.5	84.7	52.2
	SlCys9N (2.5 μ M)	16.8	70.2	53.4

10

【 0 1 0 7 】

ミクロスポラム・フルバムの相乗的阻害の結果を表5に示す。

【 0 1 0 8 】

(表5) ミクロスポラム・フルバム

透過性 ディフェンシン	プロテイナーゼ 阻害剤	阻害期待値	阻害観測値	相乗作用
NaD1 (0.5 μ M)	BPTI (0.625 μ M)	34.3	52.9	18.6
	HvCPI6 (0.625 μ M)	19.0	43.8	24.8
	SlCys9N (5 μ M)	40.7	79.9	39.2

20

【 0 1 0 9 】

実施例2

透過性ディフェンシンおよび殺真菌剤

ディフェンシンは、透過性ディフェンシンであるナス科クラスIIディフェンシン (NaD1)、人工変異型ディフェンシン (HXP4) およびクラスIディフェンシン (HXL001、HXL002、HXL004、HXL008、HXL009、HXL012、HXL013、HXL015) を含む。これらを、化学殺真菌剤カスポファンギン、フェンプロピモルフおよびテルビナフィンと組み合わせる。

【 0 1 1 0 】

30

カンジダ・アルビカンスの相乗的阻害の結果を表6に示す。

【 0 1 1 1 】

(表6) カンジダ・アルビカンス

殺真菌剤	透過性 ディフェンシン	阻害期待値	阻害観測値	相乗作用
カスポファンギン (2 ng/ml)	NaD1 (1 μ M)	1.2	61.7	60.5
	HXL004 (1 μ M)	14.0	92.3	78.3
	HXL013 (1 μ M)	4.3	90.8	86.5
	HXP4 (1.5 μ M)	14.5	64.5	50.0
カスポファンギン (4 ng/ml)	HXL001 (2.5 μ M)	11.7	73.4	61.7
	HXL002 (2.5 μ M)	6.1	40.8	34.7
	HXL009 (2.5 μ M)	3.7	65.2	61.5
	HXL012 (2.5 μ M)	0	51.2	51.2
フェンプロピモルフ (2 ug/ml)	HXP4 (1.5 μ M)	15	97.6	82.6
	HXL008 (2 μ M)	46.7	87.3	40.6
	HXL015 (1 μ M)	19	71.8	52.8
テルビナフィン (4 ng/ml)	HXP4 (1.5 μ M)	44.8	82.7	37.9

40

【 0 1 1 2 】

50

実施例3

非透過性ディフェンシンおよび殺真菌剤

表7は、非透過性ディフェンシンを使用した場合に相乗作用がないことまたはほとんどないことを示している。

【0113】

(表7) カンジダ・アルビカンズ

殺真菌剤	非透過性 ディフェンシン	阻害期待値	阻害観測値	相乗作用
カスポファンギン (2 ng/ml)	DmAMP1 (1 μ M)	18.5	30.0	11.5
	RsAFP2(1 μ M)	1.7	19.0	17.3

10

【0114】

当業者は、本明細書に記載されている開示内容が詳細に記載されているもの以外の改変または変更も受け入れることができることを理解するであろう。本開示はすべてのそのような改変および変更を企図していることが理解されるべきである。本開示はまた、本明細書中で言及されているまたは示されている工程、特徴、組成物および化合物のすべてを個別にまたは集合的に、ならびに上記工程または特徴または組成物または化合物の任意の2つ以上の任意およびすべての組み合わせを実現する。

【0115】

参考文献一覧

20

Bloch and Richardson (1991) *FEBS Lett* 279(1):101-104

Bevan *et al.* (1983) *Nucleic Acids Res* 11(2):369-385

Catanzariti *et al.* (2004) *Protein Sci* 13:1331-1339

Colilla *et al.* (1990) *FEBS Lett* 270(1-2):191-194

10

Girard *et al.* (2007) *New Phytol* 173:841-851

Greco *et al.* (1995) *Pharmacol Rev.* 47:331-385

Herrera-Estrella *et al.* (1983) *EMBO J* 2:987-995

20

Janssen *et al.* (2003) *Biochemistry* 42(27):8214-8222

Klee *et al.* (1985) *Bio/Technology* 3:637-642

Lay *et al.* (2003) *Plant Physiol* 131(3):1283-1293

Nilsson *et al.* (1989) *Cell* 58:707

30

Richer (1987) *Pestic Sci* 19:309-315

Spelbrink *et al.* (2004) *Plant Physiol* 135(4):2055-2067

van der Weerden *et al.* (2008) *J Biol Chem* 283(21):14445-14452

40

Yount and Yeaman (2005) *Protein Pept Lett* 12(1):49-67

【手続補正書】

【提出日】平成28年12月22日(2016.12.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017517498000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050195
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 38/16 (2006.01) A01N 65/38 (2009.01) A01N 37/18 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Databases: WPI, EPODOC, MEDLINE, HCAPLUS, AGRICOLA, BIOSIS, EMBASE. Keywords: Hexima, Anderson M, Van der Werden N, Plant or permeabilizing Defensin, antifungal, antimicrobial, antiviral, pathogen, prote[in]ase inhibitors and like terms.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 16 June 2015		Date of mailing of the international search report 16 June 2015
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer PAMPA RAY AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2967

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2015/050195
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/106759 A1 (HEXIMA LIMITED) 16 August 2012 Paragraphs 20, 46, 50, 53, 141, 87, 88, Tables 6 and 7, Example 15, Claims	1-10, 12-23, 25-29, 31
X	WO 2010/015024 A1 (HEXIMA LIMITED) 11 February 2010 Paragraphs 12, 13, 18, 20	1-9, 12-15, 17-22, 25-29, 31
X	WO 2002/063011 A1 (HEXIMA LTD) 15 August 2002 Abstract, Page 4, lines 12-21	18-22, 25, 27-29, 31
X	WO 2009/094719 A1 (HEXIMA LIMITED) 06 August 2009 Abstract, paragraphs 18-21, 63 and 205	1-7, 10-14, 18-21, 23, 24, 26-31
A	WO 2008/128289 A1 (HEXIMA LIMITED) 30 October 2008 The Whole Document	1-31
A	WO 2012/027209 A2 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC) 01 March 2012 The Whole Document	1-31
A	CARVALHO, A. de O. and GOMES, V.M. 'Plant Defensins and Defensin-Like Peptides-Biological Activities and Biotechnological Applications', Current Pharmaceutical Design, 2011, vol. 17, pages 4270-4293 The Whole Document	1-31
A	VAN DER WEERDEN, N.L. and ANDERSON, M.A. 'Plant Defensins: Common Fold, Multiple Functions'. Fungal Biology Reviews, 2013, vol. 26, pages 121-131 The Whole Document	1-31
P,X	WO 2014/078900 A1 (HEXIMA LIMITED) 30 May 2014 Paragraphs 26-28, 31, 32, 37, 38, 40, 45, 112, claims 13, 30, 38	1-9, 12-15, 17-22, 25-29, 31
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050195	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2012/106759 A1	16 August 2012	AU 2012214102 A1	11 Apr 2013
		AU 2012214102 B2	07 Aug 2014
		AU 2014204445 A1	31 Jul 2014
		CA 2825118 A1	16 Aug 2012
		CN 103392002 A	13 Nov 2013
		EP 2673365 A1	18 Dec 2013
		JP 2014506461 A	17 Mar 2014
		KR 20140022802 A	25 Feb 2014
		NZ 613433 A	27 Mar 2015
		SG 192063 A1	30 Aug 2013
		US 2014130209 A1	08 May 2014
WO 2010/015024 A1	11 February 2010	AR 072910 A1	29 Sep 2010
		AU 2009279367 A1	11 Feb 2010
		AU 2009279367 B2	11 Jun 2015
		CA 2733267 A1	11 Feb 2010
		CN 102131393 A	20 Jul 2011
		CN 104522032 A	22 Apr 2015
		MX 2011001368 A	30 May 2011
		US 2010095408 A1	15 Apr 2010
		US 2013263326 A1	03 Oct 2013
		US 2013267459 A1	10 Oct 2013
		US 2013269059 A1	10 Oct 2013
		US 2015067917 A1	05 Mar 2015
		UY 32035 A	29 Jan 2010
WO 2002/063011 A1	15 August 2002	AU 2002229407 B2	29 Jan 2004
		CA 2437606 A1	15 Aug 2002
		CN 1496403 A	12 May 2004
		CN 1496403 B	08 Dec 2010
		CN 101029308 A	05 Sep 2007
		CN 101029308 B	25 Jul 2012
		EP 1366168 A1	03 Dec 2003
		EP 1366168 B1	18 May 2011
		NZ 523345 A	30 Apr 2004
		US 2003217382 A1	20 Nov 2003
		US 7041877 B2	09 May 2006

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2015/050195	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 2005150004 A1	07 Jul 2005
		US 7297840 B2	20 Nov 2007
		US 2006156433 A1	13 Jul 2006
		US 7544861 B2	09 Jun 2009
		US 2010218280 A1	26 Aug 2010
		US 8252898 B2	28 Aug 2012
		US 2013047299 A1	21 Feb 2013
		US 8722968 B2	13 May 2014
		US 2006150276 A1	06 Jul 2006
		US 2009069545 A1	12 Mar 2009
		US 2014208461 A1	24 Jul 2014
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/050195	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2009/094719 A1	06 August 2009	AR 075257 A1	23 Mar 2011
		AU 2009208392 A1	06 Aug 2009
		AU 2009208392 B2	28 Mar 2013
		CA 2712290 A1	06 Aug 2009
		CN 101965131 A	02 Feb 2011
		CN 101965131 B	05 Nov 2014
		MX 2010008292 A	04 Nov 2010
		NZ 587136 A	12 Jan 2012
		US 2009197809 A1	06 Aug 2009
WO 2008/128289 A1	30 October 2008	AR 066406 A1	19 Aug 2009
		AU 2008241364 A1	30 Oct 2008
		AU 2008241364 B2	21 Mar 2013
		BR PI0810233 A2	29 Oct 2014
		CA 2684575 A1	30 Oct 2008
		CN 101848938 A	29 Sep 2010
		EP 2148889 A1	03 Feb 2010
		EP 2762498 A1	06 Aug 2014
		MX 2009011287 A	18 Feb 2010
		NZ 580505 A	31 Mar 2011
		US 2009083880 A1	26 Mar 2009
		ZA 200907123 A	28 Jul 2010
WO 2012/027209 A2	01 March 2012	CA 2807785 A1	01 Mar 2012
		CN 103154252 A	12 Jun 2013
		MX 2013001783 A	03 Apr 2013
		US 2012054911 A1	01 Mar 2012
		US 8865967 B2	21 Oct 2014
WO 2014/078900 A1	30 May 2014	AU 2013350317 A1	21 May 2015
		CA 2891989 A1	30 May 2014
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/5375 (2006.01)	A 6 1 K 31/5375	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
C 0 7 K 14/415 (2006.01)	C 0 7 K 14/415	

(81) 指定国 AP(BW, 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, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 バン ダー ベールデン ニコル
オーストラリア連邦 3 0 5 8 ビクトリア州 コブルク ベリー ストリート 4 4 ユニット
3

(72) 発明者 アンダーソン マリリン アン
オーストラリア連邦 3 0 3 6 ビクトリア州 キーラー ガーデン アベニュー 2 5

(72) 発明者 ペイン ジェニファー
オーストラリア連邦 3 0 8 1 ビクトリア州 ハイデルベルクハイツ アーノルド ストリート
9

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA22 AA23 AA24 BA01 BA08 BA17 BA19 BA20 BA28
BA44 CA13 CA53 DA41 DC32 NA05 NA14 ZB31 ZC202 ZC75
4C086 AA01 AA02 BC73 MA03 MA04 NA05 NA14 ZB31 ZC75
4C088 AB48 BA16 BA35 CA03 NA05 NA14 ZB31 ZC75
4C206 AA01 AA02 FA07 MA03 MA04 NA05 NA14 ZB31 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA14 BA17 BA19 BA21 CA11 CA30 DA56 EA20
FA74 GA21