(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-528407
(P2024-528407A)
(43)公表日　令和6年7月30日(2024.7.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K	*7/08 (2006.01)*	C07K	7/08		2B051
C12N	*15/11 (2006.01)*	C12N	15/11	Z ZNA	4B065
C12N	*15/62 (2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C081
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		4C084
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		4H011

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全64頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-577284(P2023-577284)
(86)(22)出願日　令和4年6月16日(2022.6.16)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月6日(2024.2.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/072971
(87)国際公開番号　WO2022/266648
(87)国際公開日　令和4年12月22日(2022.12.22)
(31)優先権主張番号　63/202,559
(32)優先日　令和3年6月16日(2021.6.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/365,928
(32)優先日　令和4年6月6日(2022.6.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　511002799
ドナルド・ダンフォース・プラント・サイエンス・センター
Ｄｏｎａｌｄ Ｄａｎｆｏｒｔｈ Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｃｅｎｔｅｒ
アメリカ合衆国６３１３２ミズーリ州セント・ルイス、ノース・ウォーソン・ロード９７５番
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　シャー， ディリップ エム．
アメリカ合衆国 ミズーリ ６３１３２，セント ルイス， ノース ワーソン ロード ９７５， シー／オー ドナルド ダンフォース プラント サイエンス センター
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　修飾された抗微生物ペプチド

(57)【要約】
デフェンシンの修飾されたＣ末端断片を含む抗微生物デフェンシンペプチドバリアント及びそれをコードする核酸が開示される。デフェンシンバリアントペプチドを含む組成物及び植物及び脊椎動物対象の微生物感染並びに家畜飼料及び食料の汚染を制御するためのそれらの使用の方法も開示される。
【選択図】図５Ｂ

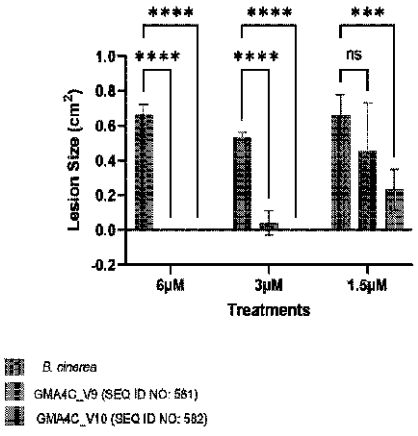


FIGURE 5B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
次のアミノ酸配列を含むペプチド
（ａ）修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５０）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４５）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４６）、ＧＸＣＸ３－８（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４７）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４８）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４９）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５１）又はＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５２）（前記ペプチドは、修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列におけるシステイン残基に対してＣ末端に位置する第２のＣ末端システイン残基をさらに含み、前記ペプチドは、少なくとも３の正味正荷電を有し、疎水性アミノ酸含量は少なくとも１８％である）；又は
（ｂ）配列番号１（前記ペプチドは、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１のデフェンシンペプチドの対応する全長配列を含まず；任意選択的に、前記ペプチドは、修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）を含み；及び／又は任意選択的に前記Ｃ末端システイン残基又はＣ末端アミノ酸残基はアミド化されている）。
【請求項２】
請求項１に記載のペプチドであって、（ｉ）参照デフェンシンＣ末端ペプチドのＮ末端及びＣ末端システインに対応する保存されたＣ１及びＣ４システイン残基（ここで、前記参照デフェンシンＣ末端ペプチドの保存されたＣ２及びＣ３システイン残基に対応するアミノ酸残基１６及び１８は、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン又はメチオニンで独立に置換され；任意選択的に前記デフェンシンペプチドバリアントは、少なくとも３の正味正荷電を有し、疎水性アミノ酸含量は少なくとも１８％である）；又は（ｉｉ）配列番号７、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５の全長にわたり少なくとも５０％、５５％、６０％、６８％、７５％、８２％又は９４％の配列同一性を有するアミノ酸配列（ここで、前記ペプチドは、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１のデフェンシンペプチドの対応する全長配列を含まない）を含み；任意選択的に、（ｉ）又は（ｉｉ）のペプチドが、前記２つのシステイン残基の間にジスルフィド結合を含む、ペプチド。
【請求項３】
（ｉ）３０アミノ酸残基以下；又は（ｉｉ）１５、１６若しくは１７～３０のアミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか、又はそれらからなる、請求項１又は２に記載のペプチド。
【請求項４】
請求項１又は２に記載のペプチドと、農業的に、薬学的に又は獣医学的に実行可能に許容可能な担体、希釈剤又は賦形と、を含む組成物。

【請求項５】
前記ペプチドが、約０．１、０．５、１．０若しくは５ｐｇ／ｍｌ～約１、５、２０、５０若しくは１００ｍｇ／ｍｌの濃度又は約０．１、０．５、１．０若しくは５ｐｇ／グラム～約１、５、２０、５０若しくは１００ｍｇ／グラムの濃度で提供され、任意選択的に少なくとも１００ｍＭの濃度のナトリウム塩及び／又は少なくとも２ｍＭの濃度のカルシウム塩を含む、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
植物病原性微生物による作物被害を予防又は軽減するための方法であって、植物、植物種子又は前記植物の他の部分を請求項４に記載の組成物の有効量と接触させるステップを含む、方法。
【請求項７】
前記植物病原性微生物が、フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）ｓｐ．、アルテルナリア（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）ｓｐ．、ベルティシリウム（Ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｉｕｍ）ｓｐ．、フィトフトラ（Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ）ｓｐ．、コレトトリカム（Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ）ｓｐ．、ボトリチス（Ｂｏｔｒｙｔｉｓ）ｓｐ．、セルコスポラ（Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ）ｓｐ．、ファコプソラ（Ｐｈａｋｏｐｓｏｒａ）ｓｐ． リゾクトニア（Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ）ｓｐ．、スクレロチニア（Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ）ｓｐ．、フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）ｓｐ．、フォーマ（Ｐｈｏｍａ）ｓｐ．、レプトスフェリア（Ｌｅｐｔｏｓｐｈａｅｒｉａ）ｓｐ．、ガエウマンノミセス（Ｇａｅｕｍａｎｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、プッチニア（Ｐｕｃｃｉｎｉａ）ｓｐ．セプトリア（Ｓｅｐｔｏｒｉａ）ｓｐ．、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）ｓｐ．、ラシオディプロディア（Ｄｉｐｌｏｄｉａ）ｓｐ．、フォモプシス（Ｐｈｏｍｏｐｓｉｓ）ｓｐ．、ミコスファエレラ（Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ）ｓｐ．、ゴロビノミセス（Ｇｏｌｏｖｉｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、エリシフェ（Ｅｒｉｓｙｐｈｅ）ｓｐ．、アルブゴ（Ａｌｂｕｇｏ）ｓｐ．、セトスファエリア（Ｓｅｔｏｓｐｈａｅｒｉａ）ｓｐ．、コクリオボルス（Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ）ｓｐ．、ヘルミントスポリウム（Ｈｅｌｍｉｎｔｈｏｓｐｏｒｉｕｍ）ｓｐ．、ディプロディア（Ｄｉｐｌｏｄｉａ）ｓｐ．又はステノカルペラ（Ｓｔｅｎｏｃａｒｐｅｌｌａ）ｓｐ．である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
機器及び請求項４に記載の組成物を含む医療機器であって、前記機器が、前記組成物で局所的にコーティングされている及び／又は前記組成物で含浸されている少なくとも１つの面を含む、医療機器。
【請求項９】
ステント、カテーテル、コンタクトレンズ、コンドーム、パッチ又は隔壁である、請求項８に記載の医療機器。
【請求項１０】
微生物感染の処置、予防又は阻害を必要とする対象において微生物感染を処置、予防又は阻害するための方法であって、請求項４に記載の組成物の有効量を前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項１１】
前記投与が、前記組成物の局所、経腸、非経口及び／又は静脈内導入を含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記対象が、ヒト、家畜、家禽、魚又はコンパニオン動物である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
前記微生物感染が、粘膜、眼、皮膚及び／又は爪の感染であり、前記組成物が、前記粘膜、眼、皮膚及び／又は爪に適用される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
前記微生物感染が皮膚糸状菌によるものであり、前記皮膚糸状菌が、任意選択的に、ト

リコフィトン・ルブルム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｒｕｂｒｕｍ）、トリコフィトン・インテルディジターレ（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｉｎｔｅｒｄｉｇｉｔａｌｅ）、トリコフィトン・ビオラセウム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｖｉｏｌａｃｅｕｍ）、トリコフィトン・トンスランス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｔｏｎｓｕｒａｎｓ）、トリコフィトン・ソウダネンス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｓｏｕｄａｎｅｎｓｅ）、トリコフィトン・メンタグロフィテス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）、ミクロスポルム・フラブム（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ　ｆｌａｖｕｍ）、エピデルモフィトン・フロッコスム（Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ　ｆｌｏｃｃｏｓｕｍ）及びミクロスポルム・ジプセウム（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ　ｇｙｐｓｅｕｍ）からなる群から選択される、請求項１０に記載の方法。

【請求項１５】

前記微生物感染が、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）、アポフィソミセス（Ａｐｏｐｈｙｓｏｍｙｃｅｓ）、クニンガメラ（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍｅｌｌａ）、サクセナエア（Ｓａｋｓｅｎａｅａ）、リゾムコール（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ）、シンセファロストルム（Ｓｙｎｃｅｐｈａｌｏｓｔｒｕｍ）、コケロミセス（Ｃｏｋｅｒｏｍｙｃｅｓ）、アクチノムコール（Ａｃｔｉｎｏｍｕｃｏｒ）、フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）、フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、ヒストプラズモシス（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍｏｓｉｓ）又はブラストミセス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ）種によるものである、請求項１０に記載の方法。

【請求項１６】

前記微生物感染が、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）種によるものであり、前記カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）種が、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）（Ｃ．アルビカンス（Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ））、Ｃ．アウリス（Ｃ．ａｕｒｉｓ）、Ｃ．グラブラタ（Ｃ．ｇｌａｂｒａｔａ）、Ｃ．パラシロシス（Ｃ．ｐａｒａｓｉｌｏｓｉｓ）、Ｃ．トロピカリス（Ｃ．ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）又はＣ．クルゼイ（Ｃ．ｋｒｕｓｅｉ）である、請求項１０に記載の方法。

【請求項１７】

微生物感染の処置、予防又は阻害を必要とする対象において微生物感染を処置、予防又は阻害する方法での使用のための、請求項４に記載の組成物。

【請求項１８】

前記対象が、ヒト、家畜、家禽、魚又はコンパニオン動物である、請求項１７に記載の組成物。

【請求項１９】

請求項４に記載の組成物で少なくとも部分的にコーティングされている、植物部分。

【請求項２０】

前記部分が種子であり、前記種子が、任意選択的に、トウモロコシ、ダイズ、小麦、米、綿、ブラッシカ（Ｂｒａｓｓｉｃａ）ｓｐ．又はトマト種子である、請求項１７に記載の植物部分。

【請求項２１】

果実、野菜又は花である、請求項　に記載の植物部分。

【請求項２２】

請求項１又は２に記載のペプチドを含むペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組み換えポリヌクレオチドであって、第１の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、前記第１の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドとは異種であるプロモーターを含むポリヌクレオチドに操作可能に連結され、任意選択的に、前記配列における何れのアミノ酸置換も、正味正荷電を向上させるか又は維持し、及び／又は前記ペプチドの疎水性を向上させるか又は維持する、組み換えポリヌクレオチド。

【請求項２３】

（ｉ）輸送ペプチド、空胞標的化ペプチド及び／又は小胞体標的化ペプチド；（ｉｉ）

色素体標的化ペプチド；及び／又は（ｉｉｉ）ポリアデニル化又は転写終結シグナルをコードするポリヌクレオチドさらに含み、（ｉ）、（ｉｉ）及び／又は（ｉｉｉ）のポリヌクレオチドが、前記抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結される、請求項２２に記載の組み換えポリヌクレオチド。

【請求項２４】

前記第１の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドが細胞の異種核又は色素体ゲノムに挿入され、前記異種核又は色素体ゲノムに位置する内在性プロモーターに操作可能に連結される、請求項２２に記載の組み換えポリヌクレオチド。

【請求項２５】

請求項１又は２に記載のペプチドを含むペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む植物核又は色素体ゲノムであって、前記ポリヌクレオチドが、前記核又は色素体ゲノムとは異種であり、前記ポリヌクレオチドが、前記核又は色素体ゲノムの内在性プロモーターに操作可能に連結される、植物核又は色素体ゲノム。

【請求項２６】

請求項２２に記載の組み換えポリヌクレオチドを含む細胞であって、任意選択的に細菌、酵母又は植物細胞である、細胞。

【請求項２７】

請求項２２に記載の組み換えポリヌクレオチドを含む、植物。

【請求項２８】

前記組み換えポリヌクレオチドを含み、任意選択的に、種子、幹、葉、根、塊茎、花又は果実である、請求項２７に記載の植物の植物部分。

【請求項２９】

（ｉ）請求項２７に記載の植物を自家受粉させるか又は交配させ；（ｉｉ）前記自家受粉又は前記交配からの植物の組み換えポリヌクレオチドを含む種子を収穫し、それにより植物病原性微生物による感染に対する耐性を植物にもたらす植物種子を作製するステップを含む、植物病原性微生物による感染に対する耐性を植物にもたらす植物種子を作製するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本願は、その全体において参照により本明細書中にそれぞれ組み込まれる、２０２２年６月６日提出の米国特許出願第６３／３６５，９２８号及び２０２１年６月１６日提出の米国特許出願第６３／２０２，５５９号の優先権を主張する。

【０００２】

政府の支援の声明

本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎにより授与されたＮａｔｉｏｎａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ ＥＡＧＥＲ Ａｗａｒｄ Ｎｕｍｂｅｒ １９５５４６１のもと、政府の支援によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【０００３】

配列リスト

Ｗｉｎｄｏｗｓオペレーティングシステムにおいて測定した場合に２９４，８７０バイトであり、２０２２年６月１５日に作成され、本明細書とともに電子提出されたファイル名「Ｐ１３５１１ＷＯ００＿ＳＴ２５」に含有される配列リストは、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【０００４】

病原性微生物（例えば真菌又は卵菌）から農業的に重要な作物を守ることは、作物収量の向上に重要である。微生物感染は、多湿である気候において特に問題であり、作物保管

中の大きな懸念事項となり得、このような感染の結果、微生物毒素による食料又は飼料の損傷及び汚染が起こり得る。残念ながら、現在の生育方法、収穫及び保管システムは、植物病原体感染を促進し得る。

【０００５】

植物病原体の制御は、別個の属の複数の微生物を同時に制御する必要があることによりさらに複雑化する。例えば、アルテルナリア（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）；アスコキタ（Ａｓｃｏｃｈｙｔａ）；アフェノミセス（Ａｐｈｅｎｏｍｙｃｅｓ）；ボトリチス（Ｂｏｔｒｙｔｉｓ）；セルコスポラ（Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ）；コレトトリカム（Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ）；ディプロディア（Ｄｉｐｌｏｄｉａ）；エリシフェ（Ｅｒｙｓｉｐｈｅ）；フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）；ゲウマノミセス（Ｇａｅｕｍａｎｏｍｙｃｅｓ）；ヘルミントスポリウム（Ｈｅｌｍｉｎｔｈｏｓｐｏｒｉｕｍ）；レプトスフェリア（Ｌｅｐｔｏｓｐｈａｅｒｉａ）、マクロフォミナ（Ｍａｃｒｏｐｈｏｍｉｎａ）；マグナポルテ（Ｍａｇｎａｐｏｒｔｈｅ）；ネクトリア（Ｎｅｃｔｒｉａ）；ペロノスポラ（Ｐｅｒｏｎｏｓｐｏｒａ）；フォーマ（Ｐｈｏｍａ）；ファコプソラ（Ｐｈａｋｏｐｓｏｒａ）、フィマトトリクム（Ｐｈｙｍａｔｏｔｒｉｃｈｕｍ）；フィトフトラ（Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ）；プラズモパラ（Ｐｌａｓｍｏｐａｒａ）；ポドスファエラ（Ｐｏｄｏｓｐｈａｅｒａ）；プッチニア（Ｐｕｃｃｉｎｉａ）；フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）；ピレノフォラ（Ｐｙｒｅｎｏｐｈｏｒａ）；ピリキュラリア（Ｐｙｒｉｃｕｌａｒｉａ）；リゾクトニア（Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ）；スクレロチウム（Ｓｃｌｅｒｏｔｉｕｍ）；スクレロチニア（Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ）；セプトリア（Ｓｅｐｔｏｒｉａ）；チエラビオプシス（Ｔｈｉｅｌａｖｉｏｐｓｉｓ）；ウンシヌラ（Ｕｎｃｉｎｕｌａ）；ベンチュリア（Ｖｅｎｔｕｒｉａ）；及びベルティシリウム（Ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｉｕｍ）種などの微生物は、全て認められている植物病原体である。

【０００６】

ある種の微生物（例えば、カビ、酵母及び二形成真菌を含む真菌又は卵菌）は、ヒト、家畜、コンパニオン動物、魚類などを含む様々な脊椎動物に対する病原体でもあり得る。皮膚糸状菌、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、コッキディオミセス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｍｙｃｅｓ）、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）、アポフィソミセス（Ａｐｏｐｈｙｓｏｍｙｃｅｓ）、クニンガメラ（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍｅｌｌａ）、サクセナエア（Ｓａｋｓｅｎａｅａ）、リゾムコール（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ）、シンセファロストルム（Ｓｙｎｃｅｐｈａｌｏｓｔｒｕｍ）、コケロミセス（Ｃｏｋｅｒｏｍｙｃｅｓ）、アクチノムコール（Ａｃｔｉｎｏｍｕｃｏｒ）、フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）、フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、ヒストプラズモシス（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍｏｓｉｓ）又はブラストミセス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ）種を含む微生物も重要な脊椎動物病原体である。

【０００７】

デフェンシンとして知られるタンパク質の一群は、植物病原体を阻害することが示されている。デフェンシンは、植物の自然免疫の重要な構成成分を構成する約４５～５４アミノ酸の小さなシステインに富むペプチドとして以前同定された（Ｔｈｏｍｍａ　ｅｔ　ａｌ．，２００２；Ｌａｙ　ａｎｄ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ，２００５；Ｖｒｉｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。植物において広く分布しているデフェンシンは、アミノ酸組成が大きく変動する。しかし、それらは全て、４又は５個の何れかの分子内ジスルフィド結合によって安定化されるコンパクトな形状を有する。植物デフェンシンは、保存されたＧＸＣＸ３－９Ｃ（Ｘは何れかのアミノ酸である）配列を含む保存されたガンマコアペプチドを含むものとして以前特徴が調べられている（Ｓａｇａｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１；Ｌａｃｅｒｄａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。以前特徴が調べられたガンマコアペプチドの三次元構造は、２つの逆平行β－シートからなり、内挿されるターン領域を有する（同書）。ある種のデフェンシンの抗微生物活性は、ガンマコアペプチドにおける正荷電アミノ酸残基の存在と相関があるとされている（Ｓｐｅｌｂｒｉｎｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌａ

ｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．，２００４；Ｓａｇａｒａｍ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。
【０００８】
植物デフェンシンは、植物防御におけるそれらの役割について広く研究されてきた。いくつかの植物デフェンシンは、マイクロモル濃度で広い範囲の微生物の増殖を阻害し（Ｂｒｏｅｋａｅｒｔ ｅｔ ａｌ．１９９５；Ｂｒｏｅｋａｅｒｔ ｅｔ ａｌ．１９９７；ｄａ Ｓｉｌｖａ Ｃｏｎｃｅｉｃａｏ ａｎｄ Ｂｒｏｅｋａｅｒｔ，１９９９）、トランスジェニック植物で発現させた場合、微生物病原体に対する強力な耐性を付与する（ｄａ Ｓｉｌｖａ Ｃｏｎｃｅｉｃａｏ ａｎｄ Ｂｒｏｅｋａｅｒｔ，１９９９；Ｔｈｏｍｍａ ｅｔ ａｌ．，２００２；Ｌａｙ ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，２００５）。ラディッシュ種子から単離された２つの小さなシステインに富むタンパク質、Ｒｓ－ＡＦＰ１及びＲｓ－ＡＦＰ２は、この純粋なタンパク質がインビトロ抗微生物アッセイ培地に添加された場合、多くの病原性微生物の増殖を阻害した（米国特許第５，５３８，５２５号明細書）。Ｒｓ－ＡＦＰ２タンパク質をコードする遺伝子を含有するトランスジェニックタバコ植物は、非形質転換植物よりも微生物による攻撃に対して強い耐性があることが分かった。
【０００９】
デフェンシン遺伝子は、マメ科植物メディカゴ・ツルンカツラ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ ｔｒｕｎｃａｔｕｌａ）においても同定されている（Ｈａｎｋｓ ｅｔ ａｌ．，２００５）。クローニングされたＭｔＤｅｆ２タンパク質は、インビトロ実験を通じて、抗微生物活性があまりないか又は全くないことが示された（Ｓｐｅｌｂｒｉｎｋ ｅｔ ａｌ．，２００４）。メディカゴ・ツルンカツラ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ ｔｒｕｎｃａｔｕｌａ）デフェンシンタンパク質ＭｔＤｅｆ４（米国特許第７，８２５，２９７号明細書；その全体において参照により本明細書中に組み込まれる）及びＭｔＤｅｆ５（国際公開第２０１４１７９２６０号パンフレット及び米国特許出願公開第２０１６０２０８２７８号明細書；両者ともその全体において参照により本明細書中に組み込まれる）は抗微生物活性を有する。ＭｔＤｅｆ４デフェンシンタンパク質のＣ末端の１６アミノ酸ＧＭＡ４－Ｃペプチドは、３μＭという低い濃度でフサリウム・グラミネアルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ）を阻害した（Ｓａｇａｒａｍ ｅｔ ａｌ．，２０１１）。
【００１０】
インビトロで強力な抗真菌活性を有する植物デフェンシンは、植物体において有効な疾患耐性を付与できないことがしばしばある。これにより、トランスジェニック作物における抗真菌剤としての商業的な開発が限定される。抗真菌植物デフェンシンは一般に陽イオン性であり、それらの配列中の陽イオン性残基は、陰イオン性真菌細胞膜との静電気的な相互作用によって真菌細胞エンベロープの通過を開始すると考えられる（Ｋｅｒｅｎｇａ ｅｔ ａｌ．，２０１９）。カリウム（Ｋ＋）は、必須の主要栄養素であり、また植物において最も豊富な陽イオンである。植物細胞の細胞質におけるＫ＋の濃度は、一貫して１００～２００ｍＭであり（Ｓｈａｂａｌａ ａｎｄ Ｐｏｔｔｏｓｉｎ，２０１０、アポプラストにおいて１０～２００ｍＭである（Ｗｈｉｔｅ ａｎｄ Ｋａｒｌｅｙ，２０１０）。カルシウムは必須の二次微量栄養素であり、その濃度は、植物の乾燥重量の０．１％～６％の範囲であり得る（Ｂｒｏａｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，２００３）。植物におけるナトリウム（Ｎａ＋）の濃度は、０．００１％～８％の範囲である（Ｍａｒｓｃｈｎｅｒ，１９９５）。Ｎａ＋は、塩類土壌において植物にとって必須の微量栄養素である。
【００１１】
現在まで特徴が調べられた多くの植物デフェンシンは、１００ｍＭ ＫＣｌ又は２ｍＭ $CaCl_2$などの高濃度の１価及び２価陽イオンでそれらの抗真菌活性を喪失する。しかし、ｐＨ７で＋１０．１の予想電荷を有するトウモロコシ植物デフェンシンＺｍＤ３２は、１００ｍＭ ＮａＣｌの存在下でカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）ｓｐ．及びＥ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）に対する阻害活性を示し、一方で、ｐＨ７で＋７．６の予想電荷を有するニコチアナ・ベンタミアナ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｂｅｎｔｈａｍｉａｎａ）植物デフェンシンＮｂＤ６は、１００ｍＭ ＮａＣｌの存在下でカンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉ

ｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）に対して阻害活性を示す（Ｋｅｒｅｎｇａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１２】

配列ＸＧＸＣＸＧＦＸＸＸＸ（Ｆ／Ｗ／Ｙ）ＸＸＸＸＣ（配列番号１）を含むペプチド（ここで、前記ペプチドは、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１のデフェンシンペプチドの対応する全長配列を含まず；任意選択的に、前記ペプチドは、配列番号３３で示される修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）、配列番号３４で示されるＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）を含み；及び／又は任意選択的に、Ｃ末端システイン残基又はＣ末端アミノ酸残基はアミド化されている）が提供される。配列番号３、４、５又は６の何れか１つの全長にわたり少なくとも７５％、８２％又は９４％の配列同一性を有するペプチドは、配列番号８と同一ではなく、任意選択的に前記配列の何れのアミノ酸置換も、中性ｐＨで正味正荷電を向上させるか若しくは維持し及び／又はペプチドの疎水性を向上させるか若しくは維持し、任意選択的に、Ｃ末端システイン残基がアミド化される。配列番号７、１２、１３、１４、１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１及び３２の全長にわたり少なくとも７５％、８２％又は９４％の配列同一性を有するペプチド（ここで、このペプチドは、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１と同一でなく、任意選択的に配列番号５、配列番号１３、１４、１５、１８、１９、２０、２２、２３、２６、２８、２９、３１又は３２のペプチドは、２つのシステイン残基の間にジスルフィド結合を含み、任意選択的に何れの置換も、中性ｐＨで正味正荷電を向上させるか若しくは維持し及び／又はペプチドの疎水性を向上させるか若しくは維持し、任意選択的にＣ末端システイン残基又はＣ末端アミノ酸残基がアミド化される）が提供される。参照デフェンシンＣ末端ペプチドのＮ末端及びＣ末端システインに対応する保存されたＣ１及びＣ４システイン残基を含むデフェンシンＣ末端ペプチドバリアント（ここで、参照デフェンシンＣ末端ペプチドの保存されたＣ２及びＣ３システイン残基は、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン又はメチオニンで独立に置換され；任意選択的にデフェンシンペプチドバリアントは、少なくとも３、３．５、４、５又は６の正味正荷電及び少なくとも１８％の疎水性アミノ酸含量を有する）が提供される。修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４５）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４６）、ＧＸＣＸ３－８（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４７）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４８）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４９）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５０）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５１）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）又はＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５２）を含むＣ末端デフェンシンペプチドバリアントが提供される。ある特定の実施形態では、上述のペプチドは抗微生物活性を示し、この抗微生物活性は任意選択的に、抗真菌又は抗細菌活性の

１つ以上である。上述のペプチドの何れか及び農業的に、薬学的に又は獣医学的に実行可能に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む組成物も提供される。微生物感染の処置、予防又は阻害を必要とする対象において微生物感染を処置、予防又は阻害することにおける使用のための上述のペプチドの何れかと、担体、希釈剤又は賦形剤と、を含む組成物も提供される。

【００１３】

（ｉ）植物病原性微生物による作物被害を防ぐか若しくは軽減するか又は（ｉｉ）植物、植物部分、種子、そこから得られた家畜飼料若しくはそこから得られた食料の望ましくない微生物による汚染を防ぐための方法であって、植物、植物種子又は前記植物の他の部分を上述の組成物の何れかの有効量と接触させるステップを含み、この組成物が任意選択的に農業的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む、方法も提供される。

【００１４】

上述の組成物の何れかで少なくとも部分的にコーティングされる種子を含む植物部分も提供され、ここで、この組成物は、任意選択的に農業的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む。

【００１５】

機器及び上述の組成物を含む医療機器であって、本組成物で局所的にコーティングされ及び／又は本組成物に浸漬される少なくとも１つの面を含み、この組成物が任意選択的に薬学的に又は獣医学的に実行可能に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む、医療機器も提供される。

【００１６】

上述の組成物の何れかの有効量を前記対象に投与することを含む、微生物感染の処置、予防又は阻害を必要とする対象において微生物感染を処置、予防又は阻害するための方法であって、この組成物が任意選択的に薬学的に又は獣医学的に実行可能に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む、方法も提供される。微生物又は酵母感染の処置、予防又は阻害を必要とする対象において微生物又は酵母感染を処置、予防又は阻害する方法における上述の組成物の何れかの何れかの（ａｎｙ　ｏｆ　ａｎｙ　ｏｆ）使用が提供される。微生物又は酵母感染の阻害を必要とする対象において微生物又は酵母感染を阻害するための薬剤又は組成物の製造における上述の第１の抗微生物ペプチド又はタンパク質の何れかの使用も提供される。

【００１７】

ポリヌクレオチドを含む組み換えポリヌクレオチド、上述のペプチドの何れかを含むペプチド（ここで、抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、前記第１の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドにとって異種であるプロモーターを含むポリヌクレオチドに操作可能に連結され、任意選択的に前記配列中の何れのアミノ酸置換もペプチドの正味正荷電及び／又は疎水性を向上させるか又は維持する）が提供される。

【００１８】

上述のペプチドの何れかを含む抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む植物核又は色素体ゲノム（ここで、ポリヌクレオチドは、核又は色素体ゲノムにとって異種であり、このポリヌクレオチドは、核又は色素体ゲノムの内在性プロモーターに操作可能に連結される）が提供される。

【００１９】

上述の組み換えポリヌクレオチド又はゲノムを含む、細胞、植物及び種子を含む植物部分が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１Ａ－１Ｂ】図１Ａ及び１Ｂは、ニコチアナ・ベンタミアナ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ　ｂｅｎｔｈａｍｉａｎａ）の葉における滴下接種アッセイを示す。異なる濃度のＧＭＡ４Ｃペプチドを用いたＢ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）に対する滴下接種アッセイのためにＮ．ベンタミアナ（Ｎ．ｂｅｎｔｈａｍｉａｎａ）の４週齢の葉を使用した。１Ａ．

滴下接種アッセイの画像による説明及び写真を両方とも白色光においてＣｒｏｐＲｅｐｏｒｔｅｒを用いて温置の４８時間後に撮った。損傷領域は、ＣｒｏｐＲｅｐｏｒｔｅｒ画像において赤色で示される。ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣ野生型対照（配列番号２）に対するデータは最も左のパネルにあり（「ＧＭＡ４Ｃ」と表示）、ＧＭＡ４ｃ＿Ｖ１Ａ（配列番号３）に対するデータは、左から２番目のパネルにあり、ＧＭＡ４ｃ＿Ｖ２Ａ（配列番号４）に対するデータは、左から３番目のパネルにあり、ＧＭＡ４ｃ＿Ｖ３Ａ（配列番号５）に対するデータは左から４番目のパネルにある。１Ｂ、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して４８時間後に病変を測定し、それらのサイズをグラフで示す。

【図２】図２は、保存されたＣ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４システイン（太字）を含む参照デフェンシンＣ末端ペプチドの非限定サブセットのアライメントを示す。保存されたガンマコアペプチドに下線を付す。

【図３】図３は、本明細書中で提供される、保存されたＣ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４システイン（太字）、ガンマ－コアコンセンサス及び様々な修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列を含む参照デフェンシンＣ末端ペプチドの非限定サブセットのアライメントを示す。保存されたガンマコアペプチドは下線を付し、修飾されたガンマ－コアコンセンサスペプチドにはない。

【図４】図４は、様々なＧＭＡ４Ｃデフェンシンペプチドバリアントの抗微生物活性を伴うデータの表を示す。

【図５Ａ－５Ｂ】図５Ａ、Ｂは、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ９（配列番号５８１）及びＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１０ペプチド（配列番号５８２）の抗真菌活性を示す滴下接種アッセイの結果を示す。ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１０は、６μＭで灰色カビ病の症状を完全に抑止する。図５Ｂにおいて、最も左側のバーは、非処理対照（「Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）」）に対するものであり、中央のバーはＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ９（配列番号５８１）処理、及び最も右側のバーはＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１０（配列番号５８２）処理である。３μＭ及び１．５μＭにおいて、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１０は、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ９よりも灰色カビ病の症状の軽減において有効性が高い。

【図６Ａ－６Ｂ】図６Ａ、Ｂは、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴ（配列番号５７７）、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ３（配列番号５７８）及びＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ４（配列番号５７９）の抗真菌活性を示す滴下接種アッセイの結果を示す。図６Ｂにおいて、最も左側のバーは、非処理対照（「Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）」）に対するものであり、左から２番目のバーはＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴ処理であり、左から３番目のバーはＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ３処理に対するものであり、左から４番目のバーはＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ４処理に対するものである。３μＭ及び６μＭでのＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ３及びＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ４は、灰色カビ病の症状を完全に抑止するが、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴは６μＭでのみ有効である。１．５μＭの濃度で、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ３は、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ４又はＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴよりも有効である。

【図７Ａ－７Ｂ】図７Ａ、Ｂは、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）に対するＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ１（配列番号５８３）及びＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ２（配列番号５８４）の抗真菌活性を示す滴下接種アッセイの結果を示す。図７Ｂにおいて、最も左側のバーは、処理対照（「Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）」）に対するものであり、中央のバーは、ＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ１（配列番号５８３）処理に対するものであり、最も右側のバーは、ＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ２（配列番号５８４）処理に対するものである。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

定義

「及び／又は」という用語は、本明細書中で使用される場合、他方を伴うか又は伴わない、２つの特定される特性又は構成要素のそれぞれの特定される開示であるものとして解釈されるべきである。従って、「及び／又は」という用語は、本明細書中で「Ａ及び／又はＢ」などの句で使用される場合、「Ａ及びＢ」、「Ａ又はＢ」、「Ａ」（単独）及び「Ｂ」（単独）を含むものとする。同様に、「及び／又は」という用語は、「Ａ、Ｂ及び／

又はＣ」などの句で使用される場合、次の実施形態：Ａ、Ｂ及びＣ；Ａ、Ｂ又はＣ；Ａ又はＣ；Ａ又はＢ；Ｂ又はＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；及びＣ（単独）のそれぞれを包含するものとする。

【００２２】

本明細書中で使用される場合、「対応する（ｃｏｒｒｅｓｐｏｎｄ）」、「対応すること（ｃｏｒｒｅｓｐｏｎｄｉｎｇ）」などの用語は、参照ペプチド配列（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１又は８９～１２２を含む参照デフェンシンＣ末端ペプチド配列）に対する任意のペプチド（例えばデフェンシンバリアントペプチド）におけるアミノ酸位置、突然変異及び／又は置換に関連して使用される場合、全て、あるペプチドが、参照配列とアラインされる場合に、参照アミノ酸配列中の残基とあるペプチド中の同じ位置を有する、あるペプチド配列中のアミノ酸残基を指す。ある特定の実施形態では、このアライメントは、デフェンシンバリアントペプチド及び参照デフェンシンＣ末端ペプチド配列のデフェンシンＣ末端ペプチドの４個の保存されたシステイン残基のアライメントである（例えば図２及び３で示される場合）。

【００２３】

本明細書中で使用される場合、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」及び「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ」）という語は、何れのさらなる指定されない特性も排除しないと同時にそれらが指す特性を少なくとも有するものとして解釈されるべきである。

【００２４】

ある語が単数形で提供される場合、この用語の複数形により記載される他の実施形態も提供される。

【００２５】

「抗微生物ペプチド」という句は、本明細書中で使用される場合、次の特徴、微生物細胞の増殖を阻害する、微生物細胞を死滅させる、胞子出芽、胞子形成又は接合などの微生物生活環のステージを破壊するか若しくは遅延させる、及び／又は植物若しくはヒト、家畜、家禽、魚若しくはコンパニオン動物（例えばイヌ又はネコ）を含む他の罹患し易い対象内での、微生物細胞感染、侵入又は拡散の破壊など、の何れかのうち１つ以上を示すペプチドを指す。

【００２６】

本明細書中で使用される場合、「酸性」又は「陰イオン性」という用語は、アスパラギン酸及びグルタミン酸などのアミノ酸を指すために交換可能に使用される。

【００２７】

本明細書中で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、各アミノ酸に特異的な側鎖（Ｒ基）とともに、アミノ（－NH_3）及びカルボキシラート（－CO_2）官能基を含有する有機化合物を指す。ポリペプチド中のアミノ酸残基は、ある特定の例において、本明細書により、次のような一文字アミノ酸コード：Ｇ－グリシン（Ｇｌｙ）；Ｐ－プロリン（Ｐｒｏ）；Ａ－アラニン（Ａｌａ）；Ｖ－バリン（Ｖａｌ）；Ｌ－ロイシン（Ｌｅｕ）；Ｉ－イソロイシン（Ｉｌｅ）；Ｍ－メチオニン（Ｍｅｔ）；Ｃ－システイン（Ｃｙｓ）；Ｆ－フェニルアラニン（Ｐｈｅ）；Ｙ－チロシン（Ｔｙｒ）；Ｗ－トリプトファン（Ｔｒｐ）；Ｈ－ヒスチジン（Ｈｉｓ）；Ｋ－リジン（Ｌｙｓ）；Ｒ－アルギニン（Ａｒｇ）；Ｑ－グルタミン（Ｇｌｎ）；Ｎ－アスパラギン（Ａｓｎ）；Ｅ－グルタミン酸（Ｇｌｕ）；Ｄ－アスパラギン酸（Ａｓｐ）；Ｓ－セリン（Ｓｅｒ）；又はＴ－スレオニン（Ｔｈｒ）で示される。

【００２８】

本明細書中で使用される場合、「塩基性」及び「陽イオン性」という用語は、アルギニン、ヒスチジン及びリジンなどのアミノ酸を指すために交換可能に使用される。

【００２９】

本明細書中で使用される場合、「陽イオン耐性」という句は、ＫＣ１又はＮａＣｌの非存在下でのデフェンシンペプチド又はデフェンシンペプチドバリアントの抗真菌活性と比

較した場合、ｌ００ｍＭ　ＫＣｌ又はｌ００ｍＭ　ＮａＣｌの存在下で、同等なインビトロ抗真菌若しくは抗微生物活性又は約１．５分の１、２分の１、３分の１若しくは４分の１までのインビトロでの抗真菌又は抗微生物活性の低下を示すデフェンシンペプチド又はデフェンシンペプチドバリアントを指す。

【００３０】

本明細書中で使用される場合、「コンセンサス配列」という句は、２つ以上の相同配列をアラインし、生成される配列の各位置で相同配列の保存されるか又は一連の代替であるかの何れかの、アミノ酸、デオキシリボ核酸又はリボ核酸残基を有する新しい配列を導き出すことによって生成されるアミノ酸、ＤＮＡ又はＲＮＡ配列を指す。

【００３１】

「微生物損傷に効果がある」、「微生物損傷に効果があるか又は制御する」又は「微生物損傷を制御する」という句は、本明細書中で使用される場合、微生物病原体による感染ゆえの作物植物又は作物植物製品に対する損傷の軽減を指す。より一般的に、これらの句は、作物植物における病原性微生物の存在により引き起こされる悪影響の軽減を指す。微生物増殖の悪影響は、何らかのタイプの植物組織損傷又は壊死、何らかのタイプの植物収量減少、作物植物製品の価値の何らかの低下及び／又は望ましくない微生物代謝産物若しくはマイコトキシンを含む微生物増殖副産物の産生を含むと理解される。

【００３２】

「デフェンシンペプチド」という句は、保存されたガンマコアペプチドを含むペプチドを指すために本明細書中で使用される。植物デフェンシンは、保存されたＧＸＣＸ３－９Ｃガンマコアペプチド配列（配列番号９）（Ｘは、何れかのアミノ酸残基である）（Ｌａｃｅｒｄａ　ｅｔ　ａｌ．）又は保存されたＧＸＣＸ３－１０Ｃバリアントガンマコアペプチド配列（配列番号１０）（Ｘは何れかのアミノ酸残基である）を含むものとして以前に特徴付けられている。ある特定の実施形態では、本明細書中で開示されるデフェンシンペプチドはまた、ＧＸＣＸ３－１２Ｃ（配列番号５９０）又はＧＸＣＸ３－１５Ｃ（配列番号５９１）を含む標準的ではないデフェンシンガンマコアペプチドも含み得る。従って、この開示において使用される場合、植物デフェンシン又はデフェンシン又はそれらの断片を含むＣ末端ペプチドは、保存されたＧＸＣＸ３－９Ｃ（配列番号９）、ＧＸＣＸ３－１０Ｃ（配列番号１０）、ＧＸＣＸ３－１２Ｃ（配列番号５９０）又はＧＸＣＸ３－１５Ｃ（配列番号５９１）ガンマコアペプチド配列（ここで、Ｘは何れかのアミノ酸残基である）を含み得る。デフェンシンペプチドは、抗微生物である、形質膜を透過性にし得る、リン脂質に結合し得る、スフィンゴ脂質に結合し得る、又はこれらの特性の何れかの組み合わせを示す、タンパク質を含む。デフェンシンペプチドは、天然又は非天然（例えば合成及び／又はキメラ）であり得る。

【００３３】

「デフェンシンペプチドバリアント」という句は、（ｉ）配列番号９又は１０の保存されたガンマコアペプチド及び起源となるデフェンシンペプチドにおける少なくとも１つのアミノ酸置換；又は（ｉｉ）修飾されたガンマコアバリアント配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４５）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４６）、ＧＸＣＸ３－８（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４７）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４８）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４９）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５０）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５１）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ

／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）又はＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５２）の何れかを含む修飾されたデフェンシンペプチドを説明するために本明細書中で使用される。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、全長デフェンシンペプチド未満である（例えば、（ｉ）３０アミノ酸残基以下；又は（ｉｉ）１５、１６若しくは１７～３０アミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか又はそれらからなるペプチド）。

【００３４】

「参照デフェンシンＣ末端ペプチド」という句は、保存されたＧＸＣＸ３－９Ｃガンマコアペプチド配列（配列番号９）、保存されたＧＸＣＸ３－１０Ｃバリアントガンマコアペプチド配列（配列番号１０）、非標準的ＧＸＣＸ３－１２Ｃ（配列番号５９０）ガンマコア配列又は非標準的ＧＸＣＸ３－１５Ｃ（配列番号５９１）ガンマコア配列及びガンマコアペプチド配列に対してＣ末端に位置する２つのさらなる保存されたシステイン残基（ここで、参照デフェンシンＣ末端ペプチドのＮ末端の最も近くに位置するシステインは、配列番号９又は配列番号１０のガンマコア配列のＮ－末端に対して最も近くに位置するシステインに対応する）を含む全長未満のデフェンシンペプチドを指すために本明細書中で使用される。参照デフェンシンＣ末端ペプチドの例としては、ＭｔＤｅｆ４　Ｃ末端ペプチド（配列番号８）、ＭｔＤｅｆ５Ａ　Ｃ末端ペプチド（配列番号１６）、ＭｔＤｅｆ５Ｂ　Ｃ末端ペプチド（配列番号４１）、ＭｔＤｅｆ６ペプチド（配列番号２１）、ＯｅＤｅｆ１　Ｃ末端ペプチド（配列番号２４）、ＯｅＤｅｆ７Ｃ末端ペプチド（配列番号２７）、ＳｂＤｅｆ１　Ｃ末端ペプチド（配列番号３０）、ＮａＤ１　Ｃ末端ペプチド（配列番号３７）、ＲｓＡＦＰ２　Ｃ末端ペプチド（配列番号３８）、ＤｍＡＭＰ１　Ｃ末端ペプチド（配列番号３９）及びＨｓＡＦＰ１（配列番号４０）が挙げられる。参照デフェンシンＣ末端ペプチドの他の例としては、配列番号８９～１２２が挙げられる。従って、参照デフェンシンＣ末端ペプチドは、４個の保存されたシステイン残基を含み、これらは本明細書中で、Ｃ１（両方のペプチドにおいて及びガンマコアペプチド配列において最もＮ末端）、Ｃ２（ガンマコアペプチド配列においてＣ１に対してＣ末端側に位置する）、Ｃ３（Ｃ２に対してＣ末端側）及びＣ４（Ｃ３に対してＣ末端側）と呼ばれる。保存されたガンマコアペプチド配列及びＣ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４システインを含む参照デフェンシンＣ末端ペプチドの非限定サブセットのアライメントを図２で示す。保存されたガンマコアペプチド配列及びＣ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４システイン、Ｃ１及びＣ２システインを含むガンマ－コアコンセンサス及び本明細書中で提供されるある種の修飾ガンマ－コアコンセンサス配列を含む参照デフェンシンＣ末端ペプチドの非限定サブセットのアライメントを図３で示す。配列番号１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチドに含有されるものを含む他の参照デフェンシンＣ末端ペプチド。

【００３５】

本明細書中で使用される場合、「編集する（ｅｄｉｔ）」、「編集すること（ｅｄｉｔｉｎｇ）」、「編集される（ｅｄｉｔｅｄ）」などの用語は、挿入、欠失及び／又はヌクレオチド置換がゲノムに導入される工程又は生成物を指す。このような工程は、ゲノムにおける１つ以上の部位の相同組み換え修復及び／又は非相同末端連結を誘導する方法を含む。

【００３６】

「遺伝子編集された植物」又は「編集された植物」という句は、本明細書中で、植物のゲノムＤＮＡにおいて１つ以上のヌクレオチド挿入、欠失、置換又は何れかのそれらの組み合わせを含む植物を指すために使用される。このような遺伝子編集された植物は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ介在編集、メガヌクレアーゼ介在編集、改変ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ介在編集などを含む技術によって構築され得る。

【００３７】

「異種」という用語は、本明細書中で使用される場合、第１のポリヌクレオチドに操作

可能に連結される第２のポリヌクレオチドに関連して、（ｉ）第１のポリヌクレオチドの起源とは異なる起源由来の第２のポリヌクレオチド；（ｉｉ）第１のポリヌクレオチドと同じ起源に由来する第２のポリヌクレオチドであって、第１、第２又は両方のポリヌクレオチド配列がその元の形態から修飾されているもの；（ｉｉｉ）第１のポリヌクレオチドに対して、天然の細胞における第１及び第２ポリヌクレオチドのゲノム位置又は環境における順序及び／又は方向とは異なる順序及び／又は方向で又はゲノム位置若しくは環境において配置される第２のポリヌクレオチドを指すか；又は（ｉｖ）第２のポリヌクレオチドは、第１のポリヌクレオチドを含有する天然細胞で生じない。異種ポリヌクレオチドは、転写（例えばプロモーター及びエンハンサーエレメント）、転写産物量（例えば、イントロン、５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲ）、翻訳又はそれらの組み合わせを促進するポリヌクレオチド、並びにデフェンシンペプチドバリアント又はデフェンシンペプチド、スペーサーペプチド又は局在化ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、核又は色素体ゲノムは、第１のポリヌクレオチドを含み得、第２のポリヌクレオチドは、核又は色素体ゲノムにとって異種である。転写、転写産物量、翻訳又はそれらの組み合わせを促進する「異種」ポリヌクレオチド並びにデフェンシンペプチドバリアント又はデフェンシンペプチド、スペーサーペプチド又は局在化ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、細胞にとって自己であり得るが、天然の細胞でのゲノム位置若しくは環境における順序及び／又は方向とは異なるゲノム位置又は環境における順序及び／又は方向で配置され得る。転写、転写産物量、翻訳又はそれらの組み合わせを促進するポリヌクレオチド並びにデフェンシンペプチドバリアント又はデフェンシンペプチド、スペーサーペプチド又は局在化をコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが天然の細胞中で互いに対して操作可能に連結されない場合、もう一方のポリヌクレオチドと異種であり得る。異種ペプチド又はタンパク質には、ある細胞又は生物が天然で生じないのでその細胞又は生物において見られないペプチド又はタンパク質が含まれる。そのため、異種ペプチド又はタンパク質には、このペプチドが、天然で生じる場合に細胞又は生物において見出される、細胞内の位置、細胞外の位置、組織とは異なる、細胞内の位置、細胞外の位置に局在化するか、又は組織において発現される、ペプチド又はタンパク質が含まれる。異種ポリヌクレオチドには、ある細胞又は生物が天然で生じる場合にその細胞又は生物では見られないポリヌクレオチドが含まれる。

【００３８】

「植物病原性微生物の増殖を阻害する」、「微生物増殖を阻害する」などという句は、本明細書中で使用される場合、微生物増殖の何らかの測定可能な低下を生じさせる方法を指し、微生物増殖は、微生物細胞、胞子、分生子又は菌糸体の数及び／又は程度の何らかの測定可能な低下を含む。本明細書中で使用される場合、「植物病原性微生物の増殖を阻害する」は、植物における微生物増殖により引き起こされる悪影響の何らかの測定可能な低下を含むとも理解される。植物における微生物増殖の悪影響には、何らかのタイプの植物組織損傷又は壊死、何らかのタイプの植物収量の低下、作物植物製品の価値の何らかの低下及び／又は望ましくない微生物代謝産物又はマイコトキシンを含む微生物増殖副産物の産生が含まれる。本明細書中で使用される場合、「微生物増殖の阻害」などという句は、別段示されない限り、植物、ヒト又は動物での阻害を含み得る。

【００３９】

「パーセント同一性」又は「配列同一性」という句は、本明細書中で使用される場合、同一であるエレメント数を最大にするアライメントにおける、定められる長さの２つのＤＮＡ、ＲＮＡセグメント内で同一である配列中のエレメント（即ち、アミノ酸又はヌクレオチド）の数を指し、同一であるエレメントの数をアライメントされるセグメントの定められる長さ中の総エレメント数で除して、１００を乗じることによって計算される。

【００４０】

「トランスジェニック」という句は、核又はオルガネラゲノムの生物の又はその子孫生物のＤＮＡが１０以上のヌクレオチド長の外因性ＤＮＡ分子の挿入を含有する、生物又はその子孫を指す。「トランスジェニック植物」という句は、植物の又は子孫植物の核又は

色素体ゲノムのＤＮＡが１０以上のヌクレオチド長の外因性ＤＮＡ分子の導入を含有する、植物又はその子孫を指す。このような導入される外因性ＤＮＡ分子は、異種起源由来又は自己起源由来の天然、非天然物（例えば合成及び／又はキメラ）であり得る。

【００４１】

前述の定義の何れかが参照により本明細書中に組み込まれる何れかの特許又は非特許参考文献、本明細書中で引用される何れかの特許又は非特許参考文献又はその他で見られる何れかの特許又は非特許参考文献において提供される定義と合致しない範囲においては、前述の定義が本明細書中で使用されることが理解される。

【００４２】

さらなる説明

デフェンシンペプチドバリアントと呼ばれる抗微生物ペプチド及びタンパク質が本明細書中で提供される。抗微生物ペプチド及びタンパク質は、植物、家畜飼料又は食料に直接適用され得るか；デフェンシンペプチドバリアント又はタンパク質を産生する微生物の形態で植物に適用され得るか又は植物がデフェンシンペプチドバリアント又はタンパク質を産生するように遺伝子編集され得る。本開示はまた、組み換えられたか又は編集されたポリヌクレオチド、組み換えられたか又は編集されたポリヌクレオチドで形質転換された微生物及び植物、デフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質をコードする遺伝子編集された核又は色素体ゲノムを含む植物及び、植物病原性微生物を含む病原性微生物を制御することにおいて有用なデフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質を含む組成物にも関する。ある特定の実施形態では、２つのデフェンシンペプチドバリアント又はデフェンシンペプチドバリアント及び別のペプチド（デフェンシンペプチドバリアント又はデフェンシンペプチドを含む）を含むデフェンシンバリアントタンパク質は、デフェンシンバリアントタンパク質で見出される抗微生物ペプチドのうち１つのみを含有するタンパク質と比較した場合、微生物増殖の阻害の改善をもたらし得る。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質は、陽イオン耐性である。このような陽イオン耐性デフェンシンは、トランスジェニック作物における植物病原性微生物の有効な制御をもたらすことにおいて陽イオン感受性のデフェンシンよりも有効であり得る。本明細書中で提供される陽イオン耐性のデフェンシンは、植物組織の正常な陽イオンに富む生理的環境において機能し得る（例えば、真菌病原体を含む植物病原性微生物を阻害する）。本明細書中で提供される陽イオン耐性デフェンシンはまた、病原性微生物が感染した対象（例えばヒト又は動物）の正常な陽イオンに富む生理的環境において機能し得る（例えば真菌病原体を含む病原性微生物を阻害する）。

【００４３】

第１の抗真菌タンパク質をコードするポリヌクレオチドにとって異種であるプロモーターを含むポリヌクレオチドに操作可能に連結される第１の抗真菌ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組み換えポリヌクレオチドが本明細書中で提供される。ある特定の実施形態では、第１の抗真菌ペプチドは、デフェンシンペプチドバリアントである。

【００４４】

デフェンシンペプチドバリアントは、配列：Ｘａａ１－Ｇ－Ｘａａ３－Ｃ－Ｘａａ５－Ｘａａ６－Ｘａａ７－Ｘａａ８－Ｘａａ９－Ｘａａ１０－Ｘａａ１１－Ｘａａ１２－Ｘａａ１３－Ｘａａ１４－Ｘａａ１５－Ｘａａ１６－Ｘａａ１７－Ｘａａ１８－Ｘａａ１９－Ｘａａ２０－Ｘａａ２１－Ｘａａ２２－Ｘａａ２３（式中、Ｘａａ１は、Ｆ、Ｇ又は存在せず；Ｘａａ３は、Ａ、Ｇ、Ｙ、Ｈ、Ｓ、Ｒ又はＤａｂであり；Ｘａａ５は、Ｈ、Ｌ、Ｓ、Ｎ、Ｒ、Ｋ又はＤａｂであり；Ｘａａ６、Ｘａａ７、Ｘａａ８、Ｘａａ９、Ｘａａ１０、Ｘａａ１１、Ｘａａ１２、Ｘａａ１３、Ｘａａ１４及びＸａａ１５はそれぞれ独立にＲ、Ｋ、Ｈ、Ｎ、Ｄ、Ｆ、Ｇ、Ｑ、Ｐ、Ａ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、Ｙ、Ｓ又はＤａｂであり、Ｘａａ８、Ｘａａ９、Ｘａａ１０、Ｘａａ１１、Ｘａａ１２、Ｘａａ１３、Ｘａａ１４及び／又はＸａａ１５のうち１つ以上は存在しなくてもよく；Ｘａａ１６は、Ｃ、Ｖ、Ｗ、Ｙ又はＦであり；Ｘａａ１７は、Ｌ、Ｉ、Ｗ、Ｙ又はＦであり；Ｘａａ１８は、Ｃ、Ｖ、Ｗ、Ｙ又はＦであり；Ｘａａ１９は、Ｋ、Ｔ、Ｆ、Ｗ又はＹであり；Ｘａａ２０は、Ｒ、Ｋ、Ｔ

、Ｌ、Ｆ、Ｑ又はＤａｂであり、Ｘａａ２１は、Ｎ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｐ、Ｑ、Ｉ、Ｆ、Ｗ又はＹであり；Ｘａａ２２は、Ｎ、Ｈ、Ｋ、Ｐ、Ｑ、Ｉ、Ｆ、Ｗ、Ｙであるか又は存在せず；Ｘａａ２３はＣであり、任意選択的にアミド化され、Ｄａｂは、ジアミノ酪酸である）（配列番号１）を含むか、基本的にそれらからなるか又はそれらからなるペプチドを含む。ある特定の実施形態では、配列番号１を含むペプチドは、配列番号１のＣ末端に対してＣ末端側に存在する１つ以上のさらなるアミノ酸をさらに含み得、前記Ｃ末端アミノ酸は任意選択的にアミド化される。ある特定の実施形態では、配列番号１を含むペプチドは、修飾されたガンマコアバリアント配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）．ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）を含み得る。デフェンシンペプチドバリアントはまた、配列：Ｘａａ１－ＧＲＣ－Ｘａａ５－ＧＦＲＲＲ（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）ＸＸＸＣ－（NH_2）（式中、Ｘａａ１は、Ｆ、Ｇ又は存在せず；Ｘａａ５は、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ１４は、Ｔ、Ｆ、Ｗ又はＹであり；Ｘａａ１５は、Ｒ、Ｋ又はＤａｂであり；Ｘａａ１６は、Ｉ、Ｆ、Ｗ又はＹであり；Ｘａａ１７はＣであり、任意選択的にアミド化され、ここでＤａｂは、ジアミノ酪酸である）（配列番号１４）により包含されるペプチドも含む。デフェンシンペプチドバリアントは、配列Ｘａａ１－Ｇ－Ｘａａ２－Ｃ－Ｘａａ５－Ｘａａ６－Ｘａａ７－ＧＦ－Ｘａａ１０－Ｘａａ１１－Ｘａａ１２－（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）－Ｘａａ１６－Ｘａａ１７－Ｘａａ１８－Ｃ－（NH_2）（ここで、Ｘａａ１は、Ｆ、Ｇであるか又は存在せず、Ｘａａ３は、Ａ、Ｆ、Ｗ、Ｙであるか又は存在せず；Ｘａａ５は、Ｈ、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ６は、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ７は、Ｑ、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ１０は、Ｇ、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ１１は、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ１２は、Ａ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ１６は、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ１７は、Ｒ又はＫであり；Ｘａａ１８は、Ｒ又はＫであり；Ｃ末端システインは任意選択的にアミド化される）（配列番号１７）により包含されるペプチドをさらに含む。本明細書中で示されるデフェンシンバリアントペプチドは、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１の野生型デフェンシンペプチドの対応する全長配列を含まない。表１は、配列番号１、３～７　１１、１３及び１４のデフェンシンペプチドバリアント並びに配列番号２及び配列番号８のＧＭＡ４Ｃペプチドを示す。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントは、（ｉ）３０アミノ酸残基以下；又は（ｉｉ）１５、１６若しくは１７～３０アミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか又はそれらからなる。

【００４５】

【表１】

表1.デフェンシンペプチド及びデフェンシンペプチドバリアント

配列番号	ペプチド	配列[3]	正味荷電	疎水性
1	デフェンシンバリアントペプチド	$X_1GX_3CX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}C$-($NH_2$)(ここで、$X_1$は、F、Gであるか又は存在せず;$X_3$は、A、G、Y、H、S、R又はDabであり;$X_5$は、H、L、S、N、R、K又はDabであり;$X_6$、$X_7$、$X_8$、$X_9$、$X_{10}$、$X_{11}$、$X_{12}$、$X_{13}$、$X_{14}$及び$X_{15}$は、それぞれ独立にR、K、H、N、D、F、G、Q、P、A、I、L、V、Y、S又はDabであり、X_8、X_9、X_{10}、X_{11}、X_{12}、X_{13}、X_{14}及び/又はX_{15}のうち1つ以上は存在しなくてもよく;X_{16}は、C、V、W、Y又はFであり;X_{17}は、L、I、W、Y又はFであり;X_{18}は、C、V、W、Y又はFであり;X19は、K、T、F、W又はYであり;X_{20}は、R、K、T、L、F、Q又はDabであり、X_{21}は、N、H、K、R、P、Q、I、F、W又はYであり;X_{22}は、N、H、K、P、Q、I、F、W、Yであるか又は存在せず;C_{23}は任意選択的にアミド化されている)		
2	GMA4C_AC	GGRCRGFRRRCFCTTHC-NH_2	5.5	12%
3	GMA4C_V1A	GGRCKGFRRRCFCTRIC-NH_2	6	18%
4	GMA4C_V2A	GGRCRGFRRRCFCTRIC-NH_2	6	18%
5	GMA4C_V3A[1]	GGRCRGFRRRVFVTRIC-NH_2	6	29%
6	GMA4C_V4A	FGRCRGFRRRCFCWRWC-NH_2	6	29%
7	GMA4C_V5A[2]	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab)(Dab)CFCW(Dab)WC-NH_2	6	29%
8	GMA4AC	GRCRGFRRRCFCTTHC	5.5	12%
9	ガンマ-コアコンセンサス1	GXCX3-9C		
10	ガンマ-コアコンセンサス2	GXCX3-10C		
11	GMA4C_V4	FGRCRGFRRRCFCWRWC	6	29%
12	GMA4C_V5[2]	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab)(Dab)CFCW(Dab)WC		
13	GMA4C_V6A[1]	GGR**C**KGFRRRWFWTRI**C**-NH_2	6	29%
14	GMA4C_V7	XGR**C**KGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)XXX**C**-(NH_2)		

【００４６】

【表２】

配列番号	ペプチド	配列[3]	正味荷電	疎水性
15	GMA4C_V8A	GGR**C**KGFRRRW**Y**WTRI**C**-NH_2	6	29%
16	GMA5A	GACHRQGFGFACFCYKKC	3.5	33%
17	GMA5A_V1	XGXCXXXGFXXXXFXXXXC-(NH_2)		
18	GMA5A_V2_	GACHRQGFGFA(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)YKKC-(NH_2)	3.5	44%
19	GMA5A_V3	GACHRQGFGFAWFWYKKC-NH_2	3.5	44%
20	GMA5A_V4	GACHRQGFGFAFFFYKKC-NH_2	3.5	44%
21	GMA6C	GGRCRGFRRRCFCTRPC	+6	12%
22	GMA6C_V1	GGRCRGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y) TRPC-(NH_2)	+6	23.5%
23	GMA6C_V2	GGRCRGFRRRWFWTRPC-NH_2	+6	23.5%
24	GMAOe1C	GACLKNRHSKHYGCYCYYRHCY	5.5	32%
25	GMAOe1C_V1	GACLKNRHSKHYG(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)YYRHCY-(NH_2)	5.5	41%
26	GMAOe1C _V2	GACLKNRHSKHYGWFWYYRHCY-NH_2	5.5	41%
27	GMAOe7C	GGLCRGFRRRCFCTKHC	5.5	18%
28	GMAOe7C _V1	GGLCRGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)TKHC-(NH_2)	5.5	29%
29	GMAOe7C _V2	GGLCRGFRRRWFWTKHC-NH_2	5.5	29%
30	GMASb1C	GGYCSSRRQICKCTLQC	3	18%
31	GMASb1C _V1	GGYCSSRRQI(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)TLQC-(NH_2)	2	35%
32	GMASb1C _V2	GGYCSSRRQIWFWTLQC-NH_2	2	35%
33	**修飾されたガンマ-コアコンセンサス1**	GXCX3-8 (F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
34	**修飾されたガンマ-コアコンセンサス2**	GXCX3-9(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
35	GMA1C	GRCRDDFRCWCTKNC	+2	13%
36	GMA1C_V1	GR**C**RILFR**C**F**C**TKN**C**	+4	27%
37	GMANaD1C	GHCSKILRRCLCTKPC	+4.5	19%
38	GMARsAFP2C	GSCNYVFPAHKCICYFPC	+1.5	39%
39	GMADmAMP1C	GACHVRNGKHMCFCYFNC	+3	33%
40	GMAHsAFP1	GACHYQFPSVKCFCTQNC	+1.5	28%
41	GMA5B	GACHRQGIGFACFCKKKC	+4.5	28%

【００４７】

【表３】

配列番号	ペプチド	配列[3]	正味荷電	疎水性
42	GMAOe1_V3	GACLKNRHSKHYGFFWYYRHCY	+5.5	36%
43	修飾されたガンマ-コアコンセンサス3	GXCX3-8 (F/W/Y)		
44	修飾されたガンマ-コアコンセンサス4	GXCX3-9(F/W/Y)		
45	修飾されたガンマ-コアコンセンサス5	GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)		
46	修飾されたガンマ-コアコンセンサス6	GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)		
47	修飾されたガンマ-コアコンセンサス7	GXCX3-8(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M)		
48	修飾されたガンマ-コアコンセンサス8	GXCX3-10(L/V/I/M)(F/W/Y)(L/V/I/M)		
49	修飾されたガンマ-コアコンセンサス9	GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M)		
50	修飾されたガンマ-コアコンセンサス10	GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y)(F/W/Y/L/V/I/M)		
51	修飾されたガンマ-コアコンセンサス11	GXCX3-8(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)		
52	修飾されたガンマ-コアコンセンサス12	GXCX3-10(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)(F/W/Y/L/V/I/M)		
587	修飾されたガンマ-コアコンセンサス13	GXCX3-10(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
588	修飾されたガンマ-コアコンセンサス14	GXCX3-12(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
589	修飾されたガンマ-コアコンセンサス15	GXCX3-15(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)		
590	非標準的デフェンシンガンマコア1	GXCX3-12C		
591	非標準的デフェンシンガンマコア2	GXCX3-15C		

[1]バリンによる(GMA4C_V3A;配列番号5)又はトリプトファンによる(GMA4C_V6;配列番号13)、Xaa11及びXaa13でのシステインの置換は、残基4のシステインと残基17のシステインとの間にジスルフィド結合を伴う環状ペプチドをもたらし得る。

[2]Dab=ジアミノ酪酸

[3]アミド化の状況:-NH_2は、C末端アミド化ペプチドであり、-(NH2)は任意選択的にアミド化されたC末端ペプチドである。

【００４８】

ある特定の実施形態では、この開示のデフェンシンペプチドバリアントは、植物デフェンシンの抗真菌活性に関与するデフェンシンガンマ－コアペプチドを含有することを特徴とする。ガンマ－コアペプチドは一般的に、正味正荷電を含有し、少なくとも１個の疎水性アミノ酸を有する。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、ＧＸＣＸ３－９Ｃのガンマ－コアコンセンサス配列（式中、Ｘは、何れかのアミノ酸である）（配列番号９）を含み得る。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、ＧＸＣＸ３－１０Ｃのバリアントガンマ－コアコンセンサス配列を有するガンマ－コアペプチド（ここでＸは何れかのアミノ酸である）（配列番号１０）を含む。ある特定

の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、ＧＸＣＸ３－９Ｃ（配列番号９）又はＧＸＣＸ３－１０Ｃ（配列番号１０）のガンマ－コアコンセンサス配列を含み；ここでＸは、陽イオン性及び／又は疎水性アミノ酸から優先的に選択される。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、配列番号１を含み、ＧＸＣＸ３－９Ｃ（配列番号９）又はＧＸＣＸ３－１０Ｃ（配列番号１０）のガンマ－コアコンセンサス配列を含み；ここでＸは陽イオン性及び／又は疎水性アミノ酸から優先的に選択され、ここで配列番号１の可変（Ｘａａ）アミノ酸残基の何れも、配列番号３～７で見出される陽イオン性及び／又は疎水性アミノ酸の数を維持するか若しくは増加させるアミノ酸残基を含む。ガンマ－コアモチーフの外側の特異的なアミノ酸もリン脂質－及びスフィンゴ脂質－結合に関与する一方でガンマ－コアペプチドがリン脂質－及び／又はスフィンゴ脂質－結合に関与すると考えられる。配列番号１に関して、アミノ末端（又はある特定の実施形態ではデフェンシンペプチドバリアントにおける対応する領域）からの第１のシステイン（Ｃ１）と第２のシステイン（Ｃ２）との間の配列も抗微生物活性に寄与する。

【００４９】

本明細書中で提供されるバリアントデフェンシンＣ末端ペプチドを含むデフェンシンペプチドバリアントはまた、野生型デフェンシンＣ末端ペプチド配列の保存されたシステイン残基の１つ以上の置換も含み得る。置換され得る保存されたシステイン残基は、デフェンシンＣ末端ペプチドにおけるＣ１、Ｃ２、Ｃ３又はＣ４に対応し得、Ｃ１は、最もＮ末端側のシステインであり、Ｃ２は、２番目にＮ末端側のシステインであり、Ｃ３は、３番目にＮ末端側のシステインであり、Ｃ４は、最もＣ末端側のシステインであり；図２を参照されたい）。Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４の保存されたシステインを含む参照デフェンシンＣ末端ペプチドの非限定サブセットは、配列番号８のＧＭＡ４Ｃペプチド、配列番号１６のＭｔＤｅｆ５Ａペプチド、配列番号４１のＭｔＤｅｆ５Ａペプチド、配列番号２０のＭｔＤｅｆ６ペプチド、配列番号２３のＯｅＤｅｆ１ペプチド、配列番号２６のＯｅＤｅｆ７ペプチド、配列番号２９のＳｂＤｅｆ１ペプチド、ＮａＤ１　Ｃ末端ペプチド（配列番号３７）、ＲｓＡＦＰ２　Ｃ末端ペプチド（配列番号３８）、ＤｍＡＭＰ１　Ｃ末端ペプチド（配列番号３９）及びＨｓＡＦＰ１（配列番号４０）を含み、デフェンシンペプチドバリアントを得るために少なくともＣ２及び／又はＣ３の位置において置換され得る。Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４の保存されたシステインを含むさらなる非限定参照デフェンシンＣ末端ペプチドは、配列番号８９～１２２で示されるデフェンシンＣ末端ペプチドを含む。Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４の保存されたシステインを含むさらなる非限定参照デフェンシンＣ末端ペプチドは、配列番号１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチドにおいて含有されるデフェンシンＣ末端ペプチドを含む。

【００５０】

ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、ＧＸＣＸ３－９Ｃ（配列番号９）又はＧＸＣＸ３－１０Ｃ（配列番号１０）のカノニカルなガンマ－コアコンセンサス配列を欠く。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、配列番号９又は１０のガンマ－コアコンセンサス配列のＣ末端システイン残基（例えば参照配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１又は８９～１２２におけるＣ２）に対するトリプトファン、チロシン又はフェニルアラニンの置換を含む。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１又は８９～１２２）中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基の両方の置換を含む。Ｃ２及びＣ３のバリン置換を有するＧＭＡ４Ｃバリアントは、配列番号５で示される。Ｃ２及びＣ３のトリプトファン置換を有するＧＭＡ４Ｃバリアントは、配列番号１３で示される。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１又は８９～１２２）中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基のトリプトファン、チロシン又はフェニルアラニン置換を含む。

ある特定の実施形態では、本明細書中で示されるデフェンシンペプチドバリアントは、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１、８９～１２２）中のＣ２残基とＣ３残基との間に位置するアミノ酸位置のトリプトファン、チロシン又はフェニルアラニン残基をさらに含み得る。参照Ｃ末端デフェンシンペプチド中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基のトリプトファン、チロシン又はフェニルアラニン置換を含む本明細書中で示されるデフェンシンペプチドバリアントは、修飾されているガンマコアバリアント配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）を含み得る。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントは、（ｉ）３０アミノ酸残基以下；又は（ｉｉ）１５、１６若しくは１７～３０アミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか、それらからなる。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントは、Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４の保存されたシステイン（例えば配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１、８９～１２２、又は配列番号１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチドにおいて含有される）を含むデフェンシンペプチドのＣ末端に対応するペプチドを含むか、基本的にそれらからなるか、それらからなり、ここで、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基のトリプトファン、チロシン又はフェニルアラニン置換の結果、修飾されているガンマコアバリアント配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）を含むデフェンシンバリアントペプチドが得られ得、任意選択的に参照デフェンシンＣ末端ペプチドの保存されたＣ１及びＣ４システインに対応するちょうど２個のシステイン残基を有するペプチドを含む。

【００５１】

ある特定の実施形態では、ＧＸＣＸ３－９Ｃ（配列番号９）又はＧＸＣＸ３－１０Ｃ（配列番号１０）のカノニカルなガンマ－コアコンセンサス配列を欠くさらなるデフェンシンペプチドバリアントが提供される。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、配列番号９又は１０のガンマ－コアコンセンサス配列のＣ末端システイン残基に対するトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン又はメチオニンの置換を含む（例えば、参照配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１又は８９～１２２において又は配列番号１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチドにおいて含有されるＣ２）。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン又はメチオニン残基での、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１又は８９～１２２、又は配列番号１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチド内に含有される）中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基の両方の独立した置換を含む。ある特定の実施形態では、本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン又はメチオニン残基での、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１又は８９～１２２、又は配列番号

１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチド内に含有される）中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基の置換を含む。ある特定の実施形態では、本明細書中で示されるデフェンシンペプチドバリアントは、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１、８９～１２２、又は配列番号１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチド内に含有される）中のＣ２残基とＣ３残基との間に位置するアミノ酸位置においてトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン又はメチオニン残基をさらに含み得る。参照Ｃ末端デフェンシンペプチド中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基の独立したトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン又はメチオニオン（ｍｅｔｈｉｏｎｉｏｎｅ）置換を含む本明細書中で示されるデフェンシンペプチドバリアントは、その結果、修飾されたガンマコアバリアント配列ＧＸＣＸ３－１０（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４８）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４９）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５０）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５１）又はＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５２）を含むデフェンシンバリアントペプチドが生じ得る。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントは、（ｉ）３０アミノ酸残基以下；又は（ｉｉ）１５、１６若しくは１７～３０アミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか、それらからなる。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントは、Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３及びＣ４の保存されたシステインを含むデフェンシンペプチドのＣ末端に対応するペプチド（例えば、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１、８９～１２２、又は配列番号１２３～４３４及び４３６～５７６の全長デフェンシンペプチドに含有される）を含むか、基本的にそれらからなるか、それらからなり、参照Ｃ末端デフェンシンペプチド中のＣ２及びＣ３残基に対応するＣ２及びＣ３残基の独立したトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン又はメチオニン置換の結果、配列番号４８、４９、５０、５１又は５２の修飾されたガンマコアバリアント配列を含むデフェンシンバリアントペプチドが生じ得、任意選択的に参照デフェンシンＣ末端ペプチドの保存されたＣ１及びＣ４システインに対応するちょうど２個のシステイン残基を有するペプチドを含む。

【００５２】

ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５の全長にわたり少なくとも７０％、７５％、８０％、８２％、８５％、９０％、９２％、９４％、９５％又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ペプチドは、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０、４１、１２３～４３４又は４３６～５７６のデフェンシンペプチドの対応する全長又はＣ末端配列を含まない。ある特定の実施形態では、配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５の全長にわたり少なくとも７０％、７５％、８０％、８２％、８５％、９０％、９２％、９４％、９５％又は１００％の配列同一性を有するこのようなデフェンシンペプチドバリアントは、ＧＸＣＸ３－９Ｃ（配列番号９）又はＧＸＣＸ３－１０Ｃ（配列番号１０）のガンマ－コアコンセンサス配列をさらに含み；ここで、Ｘは何れかのアミノ酸であるか又はＸは、陽イオン性及び／又は疎水性アミノ酸から選択される。ある特定の実施形態では、配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５の全長にわたり少なくとも７０％、７５％、８０％、８２％、８５％、９０％、９２％、９４％、９５％又は１００％の配列同一性を

有するこのようなデフェンシンペプチドバリアントは、修飾されたガンマコアバリアント配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４５）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４６）、ＧＸＣＸ３－８（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４７）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４８）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４９）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５０）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５１）又はＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５２）をさらに含む。ある特定の実施形態では、このようなデフェンシンペプチドバリアントは、配列番号３～７、２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５の全長にわたり少なくとも７０％、７５％、８０％、８２％、８５％、９０％、９２％、９４％、９５％又は１００％の配列同一性を有し、中性ｐＨで少なくとも約５．８の正味正荷電及び／又は少なくとも約１５％の疎水性パーセンテージを有する。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントの第１の構造特性は、中性ｐＨでの正味正荷電である。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、中性ｐＨで少なくとも＋２、＋３、＋３．５、＋４、＋５、＋６、＋７、＋８、＋９又は＋１０の正味正荷電を有する。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、中性ｐＨで少なくとも＋３、＋３．５、＋４、＋５、＋６又は＋７～約＋８、＋９又は＋１０の正味正荷電を有する。ある特定の実施形態では、このようなデフェンシンペプチドバリアントの疎水性パーセンテージは、少なくとも約１５％～３０％、約１６％～１９％又は約２８％～３０％である。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントは、（ｉ）３０個のアミノ酸残基以下；又は（ｉｉ）１５、１６若しくは１７～３０個のアミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか、それらからなる。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントの何れも、ちょうど２個のシステイン残基を有するペプチドを含み、任意選択的に参照デフェンシンＣ末端ペプチドの保存されたＣ１及びＣ４システインに対応する２個のシステイン残基を含む。

【００５３】

ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントは、中性ｐＨでペプチドの正味正荷電を向上させるか若しくは維持する、及び／又はペプチドの疎水性を向上させるか若しくは維持するアミノ酸置換を含む。中性ｐＨでペプチドの正味正荷電を維持し得る配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５におけるアミノ酸置換は、リジン、アルギニン又はＤａｂ（ジアミノ酪酸）又は中性ｐＨで正に荷電している他の非天然アミノ酸からなる群から選択される異なるアミノ酸残基での、配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５における、リジン、アルギニン又はＤａｂ（ジアミノ酪酸）残基の置換を含む。中性ｐＨで正味正荷電を向上させ得る配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５におけるアミノ酸置換は、リジン、アルギニン、Ｄａｂ（ジアミノ酪酸）又は中性ｐＨで正に荷電している他の非天然アミノ酸残基からなる群から選択される異なるアミノ酸残基での配列番号３～７、１２

、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５における極性（例えばシステイン又はスレオニン）又は非極性（例えばグリシン）残基の置換を含む。ペプチドの疎水性を維持し得る配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５におけるアミノ酸置換は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン又はメチオニンからなる群から選択される異なるアミノ酸残基での配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５におけるグリシン、バリン、フェニルアラニン又はイソロイシン残基の置換を含む。ペプチドの疎水性を向上させ得る配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５におけるアミノ酸置換は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、フェニルアラニン又はイソロイシンからなる群から選択される異なるアミノ酸残基での配列番号３～７、１２～１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５における極性（例えばシステイン又はスレオニン）残基の置換を含む。ある特定の実施形態では、ペプチドの正味正荷電又は疎水性を向上させるか又は維持するこのような置換は、ＧＸＣＸ３－９Ｃ（配列番号９）又はＧＸＣＸ３－１０Ｃ（配列番号１０）のガンマ－コアコンセンサス配列を有するデフェンシンペプチドバリアントを含む。ある特定の実施形態では、ペプチドの正味正荷電又は疎水性を向上させるか又は維持するこのような置換は、修飾されたガンマコアバリアント配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）を有するデフェンシンペプチドバリアントを含む。ある特定の実施形態では、ペプチドの正味正荷電又は疎水性を向上させるか又は維持するこのような置換は、修飾されたガンマコアバリアント配列を有するデフェンシンペプチドバリアントを含み、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１又は配列番号５２の修飾されたガンマコアバリアント配列を含み得る。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントは、（ｉ）３０アミノ酸残基以下；又は（ｉｉ）１５、１６若しくは１７～２２、２４、１６、２８若しくは３０アミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか、それらからなる。ある特定の実施形態では、上述のデフェンシンペプチドバリアントの何れも、ちょうど２個のシステイン残基を有するペプチドを含み、任意選択的に参照デフェンシンＣ末端ペプチドの保存されたＣ１及びＣ４システインに対応する２個のシステイン残基を含む。

【００５４】

ある特定の実施形態では、上述又は他のバリアントデフェンシンペプチドバリアント配列の何れかにおける１つ以上のアミノ酸は、電荷及び極性が元のアミノ酸と類似する別のアミノ酸で置換され、即ち保存的アミノ酸置換である。デフェンシンペプチドバリアント又はタンパク質又はデフェンシンペプチド配列内のアミノ酸に対する置換は、元来のアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。アミノ酸は、次の４つの群に分けられ得る：（１）酸性アミノ酸；（２）塩基性アミノ酸；（３）中性極性アミノ酸；及び（４）中性非極性アミノ酸。これらの様々な群内の代表的なアミノ酸としては、（１）酸性（陰イオン性、負荷電）アミノ酸、例えばアスパラギン酸及びグルタミン酸など；（２）塩基性（陽イオン性、正荷電）アミノ酸、例えばアルギニン、ヒスチジン及びリジンなど；（３）中性極性アミノ酸、例えばグリシン、セリン、スレオニン、システイン、シス

チン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンなど；（４）中性非極性（疎水性）アミノ酸、例えばアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンなどが挙げられる。デフェンシンペプチド配列内の保存的アミノ酸変化は、これらの群のうち１つ内のあるアミノ酸を同じ群内の別のアミノ酸で置換することによりなされ得る。デフェンシンペプチドバリアントの生物学機能同等物は、１０個以下の保存的アミノ酸変化、７個以下の保存的アミノ酸変化又は５、４、３、２若しくは１個の保存的アミノ酸変化を有し得る。従って、コードヌクレオチド配列（例えば、遺伝子、プラスミドＤＮＡ、ｃＤＮＡ又は合成ＤＮＡ）は、デフェンシンペプチドバリアントの生物学的機能同等形態をコードすることを可能にする、対応する塩基置換を有する。（ｉ）中性非極性（疎水性）アミノ酸残基での中性極性アミノ酸残基の置換；又は（ｉｉ）中性極性アミノ酸残基での中性非極性（疎水性）アミノ酸残基の置換を含むデフェンシンペプチドバリアントにおけるある特定の半保存的置換も提供される。特に、疎水性アミノ酸残基での中性極性チロシン残基の半保存的置換が提供される。デフェンシンペプチドバリアントの生物学的機能同等物は、１０個以下の半保存的アミノ酸変化、７個以下の半保存的アミノ酸変化又は５、４、３、２若しくは１個の半保存的アミノ酸変化を有し得る。

【００５５】

上述のデフェンシンペプチドバリアントの何れかをコードする核酸分子も本明細書中で提供される。上述の核酸分子を含む組み換えＤＮＡ分子も本明細書中で提供され、特に上述の核酸分子に操作可能に連結される異種プロモーターを含む組み換えＤＮＡ分子も本明細書中で提供される。

【００５６】

本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、植物エンドプロテイナーゼを含むエンドプロテイナーゼによる切断の影響を受けにくいスペーサーペプチド配列を介して別のデフェンシンペプチドバリアント、デフェンシン又は抗微生物ペプチドに操作可能に連結され得る。多量体又はマルチドメインタンパク質においてペプチドを連結するこのようなペプチドリンカー配列が開示されている（Ａｒｇｏｓ，１９９０；Ｇｅｏｒｇｅ　ＲＡ，Ｈｅｒｉｎｇａ（２００２））。スペーサードメインとして使用され得る多量体又はマルチドメインタンパク質からの適切なペプチド配列の例としては、免疫グロブリンからの免疫グロブリンヒンジ領域、ピルビン酸デヒドロゲナーゼにおけるリポイルとＥ３結合ドメインとの間のリンカー（Ｔｕｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｈ，１９９３）、システインプロテイナーゼにおける中央ドメインとＣ末端ドメインとの間のリンカー（Ｐ９；Ｍｏｔｔｒａｍ　ｅｔ　ａｈ，１９８９）及びそれらの機能的な変異体が挙げられる。デフェンシンバリアントタンパク質での使用のためのスペーサーペプチドは、全体的又は部分的合成ペプチド配列でもあり得る。このような合成スペーサーペプチドは、少なくとも１つのデフェンシンペプチドバリアントと別のペプチド（デフェンシンペプチドバリアント又はデフェンシンペプチドを含む）との間の柔軟な連結を提供するように、及び内在性の植物エンドプロテイナーゼ又は他のエンドプロテイナーゼによる切断に耐性になるように設計される。ある特定の実施形態では、合成スペーサーペプチドの長さは、約３、４、８、１０、１２又は１６～約２０、２４、２８、３０、４０又は５０アミノ酸残基長の間であり得る。ある特定の実施形態では、合成スペーサーペプチドは、グリシンに富む又はグリシン／セリンを含有するペプチド配列を含み得る。文献（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）に記載のタンパク質ドメインの柔軟な連結に適切な本組成物及びペプチドの設計は、本明細書中で提供されるデフェンシンバリアントタンパク質におけるスペーサーペプチドとしての使用に順応させ得る。それらの全体において本明細書中で参照によりそれぞれ組み込まれる米国特許出願公開第２０１９０１９４２６８号明細書及び同第２０１９０１８５８７７号明細書に記載のデフェンシン単量体を連結するために有用なスペーサーペプチドも、本明細書中で開示されるデフェンシンペプチドバリアントを他のデフェンシンペプチドバリアント、デフェンシン、抗微生物ペプチド又は他のペプチドに連結させるために使用され得る。

【００５７】
本明細書中で提供されるデフェンシンペプチドバリアントは、植物エンドプロテイナーゼを含むエンドプロテイナーゼによる切断に影響を受け易いリンカーペプチド配列を介して別のデフェンシンペプチドバリアント、デフェンシン又は抗微生物ペプチドに操作可能に連結され得る。ある特定の実施形態では、得られるデフェンシンバリアントタンパク質は、エンドプロテイナーゼがデフェンシンバリアントタンパク質を切断して少なくとも１つのデフェンシンペプチドバリアント及び別のペプチド（デフェンシンペプチドバリアント又はデフェンシンペプチドを含む）を提供するように細胞で発現され得る。このようなデフェンシンバリアントタンパク質は、リンカーペプチドを切断するエンドプロテイナーゼを有する細胞区画（例えば細胞質、ミトコンドリア、色素体、空胞又は小胞体）又は細胞外スペース（即ちアポプラストに対する）において提供され得る。切断可能なリンカーペプチドは、国際公開第２０１４０７８９００号パンフレット、Ｖａｓｉｖａｒａｍａ ａｎｄ Ｋｉｒｔｉ，２０１３ａ，Ｆｒａｎｑｏｉｓ ｅｔ ａｌ，Ｖａｓｉｖａｒａｍａ ａｎｄ Ｋｉｒｔｉ，２０１３ｂ及び国際公開第２０１７１２７５５８号パンフレットで開示され、本明細書中で提供されるデフェンシンバリアントタンパク質において使用され得る。

【００５８】
単子葉植物、双子葉植物又はその両方におけるデフェンシンペプチドバリアントの発現を提供する発現カセットが構築され得る。このようなデフェンシンペプチドバリアント発現カセット構築は、植物発現ベクター又は植物のゲノムの何れかにおいて達成され得る。発現カセットは、様々なプロモーター、コード（例えばデフェンシンペプチドバリアントをコードする）及びポリアデニル化配列が操作可能に連結されるＤＮＡコンストラクトである。一般に、発現カセットは一般的に、ポリアデニル化又はターミネーター領域に操作可能に連結される関心対象の配列に操作可能に連結されるプロモーターを含む。単子葉植物における組み換え又は編集されたポリヌクレオチドの発現を含むある特定の例において、イントロン配列を含むことも有用でもあり得る。イントロン配列が含まれる場合、これは一般的に、組み換え又は編集されたポリヌクレオチドの５’非翻訳リーダー領域に置かれる。ある特定の例において、転写産物の安定性を促進するため又は転写産物の効率的翻訳を進めるために組み換え又は編集されたポリヌクレオチドにおいて特異的な５’非翻訳配列を組み込むことも有用であり得る。その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第１０２５３３２８号明細書で開示されるものを含む、植物における他のデフェンシンペプチド又はタンパク質の発現のための発現カセット及びベクターは、トランスジェニック植物におけるデフェンシンペプチドバリアントの発現に対して順応させ得る。デフェンシンペプチドバリアント発現ベクターの何れも、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）介在性の形質転換、リゾビウム（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）介在性の形質転換、シノリゾビウム（Ｓｉｎｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）介在性の形質転換、粒子介在性の形質転換、ＤＮＡトランスフェクション、ＤＮＡエレクトロポレーション又は「ｗｈｉｓｋｅｒｓ」が介在する形質転換などの方法を介して宿主植物の染色体に導入され得る。導入遺伝子を導入する上述の方法は、米国特許出願公開第２００５０２８９６７３号明細書（トウモロコシのアグロバクテリウム介在性形質転換）、米国特許第７，００２，０５８号明細書（ダイズのアグロバクテリウム介在性形質転換）、米国特許第６，３６５，８０７号明細書（米の粒子介在性形質転換）及び米国特許第５，００４，８６３号明細書（綿のアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）介在性形質転換）に記載され、これらのそれぞれは、それらの全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

【００５９】
ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントをコードする組み換え又は編集されたポリヌクレオチドを含む植物は、（例えば、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥＮ又はジンクフィンガーヌクレアーゼが介在する遺伝子編集による）植物のゲノムへの異種ＤＮＡの部位特異的な挿入を提供する技術を使用することによって得られ得る。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントをコードするそのゲノム内で配列を作製する

ために、少なくともデフェンシンペプチドバリアントをコードするＤＮＡ断片は、植物細胞、組織、部分又は植物全体に対してゲノムに部位特異的に組み込まれる。メガヌクレアーゼ又はジンクフィンガーヌクレアーゼなどの部位特異的なヌクレアーゼを用いて植物ゲノムの特異的な部位で外来ＤＮＡを挿入するための方法の例は、少なくともＶｏｙｔａｓ，２０１３で開示される。クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）－関連（Ｃａｓ）－ガイドＲＮＡ技術及びＣａｓエンドヌクレアーゼを用いて植物ゲノムへと外来ＤＮＡを挿入するための方法の例は、少なくともＳｖｉｔａｓｈｅｖ ｅｔ ａｌ．，２０１５；Ｍｕｒｏｖｅｃ ｅｔ ａｌ．，２０１７；Ｋｕｍａｒ ａｎｄ Ｊａｉｎ，２０１５；及び米国特許出願公開第２０１５００８２４７８号明細書により開示され、これは具体的にその全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

【００６０】

酵母におけるデフェンシンペプチドバリアントの発現も本明細書中で具体的に企図される。様々な酵母属における異種タンパク質の産生のための発現ベクターの構築がよく確立されている。一般に、このような発現ベクターは一般的に、ポリアデニル化又はターミネーター領域に操作可能に連結される関心対象の配列に操作可能に連結されるプロモーターを含む。異種遺伝子をうまく発現させるために使用されてきた酵母属の例としては、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、クルベロマイセス（Ｋｌｕｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ハンスエラ（Ｈａｎｓｕｅｌａ）、ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）、サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、シゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）及びヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）が挙げられる。サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）に対する発現ベクター及び形質転換系の一般的な説明は、Ｋｉｎｇｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５）で見出される。サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）以外の酵母に有用な発現ベクター及び形質転換系は、Ｒｅｉｓｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９０）に記載される。その全体において参照により本明細書中に組み込まれる、米国特許第１０２５３３２８号明細書で開示されるものを含む、酵母における他のデフェンシンペプチド又はタンパク質の発現のための発現カセット及びベクターは、酵母におけるデフェンシンペプチドバリアントの発現に順応させ得る。

【００６１】

細菌におけるデフェンシンペプチドバリアントの発現も本明細書中で具体的に企図される。様々な細菌系における異種タンパク質の産生のための発現ベクターの構築が記載されている。一般に、このような発現ベクターは一般的に、原核ターミネーター領域に操作可能に連結される関心対象のペプチド配列（例えば、デフェンシンバリアントペプチドのｎ－末端のシグナル輸送ペプチド領域）をコードする配列に操作可能に連結されるプロモーターを含む。異種遺伝子をうまく発現させるために使用されてきた細菌属の例としては、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、アルカリジェネス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、アゾトバクター（Ａｚｏｔｏｂａｃｔｅｒ）、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、ラクトコッカス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ストレプトミセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）及びシュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）が挙げられる。ジスルフィド結合を含み、本明細書中で提供されるデフェンシンバリアントペプチドの発現での使用のために順応させ得るタンパク質の産生に有用なＥ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）発現系としては、Ｋｕｄｄｕｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｐｒｏｇ ２３：１５２０－１５２８．ｄｏｉ：１０．１００２／ｂｔｐｒ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５０８、Ｋｉｅｄｚｉｅｒｓｋａ ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ Ｐｕｒｉｆ ６０，８２－８８，Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ ４７，５７９－５８７，Ｂｕｃｈｋｏ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７，１６１１－１６２３，Ｍａｒｑｕｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｊ Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ １０６，１６４０－１６４８及びＰａｚｇｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ Ｐｕｒ ４９，１－８に記載のものが挙げられる。Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）でのデフェンシンペ

プチドの発現に順応させ得るジスルフィド結合を含むタンパク質を発現させるための系としては、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第２０２０／０１７２９１５号明細書及びＢｅｒｋｍｅｎ，Ｍ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ Ｐｕｒｉｆ．２０１２；８２（１）：２４０－５１．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｐｅｐ．２０１１．１０．００９において開示されるものが挙げられる。

【００６２】

ジスルフィド結合を含むタンパク質の産生に有用であり、本明細書中で提供されるデフェンシン変異体ペプチドの発現での使用に順応させ得る発現のための他の細菌発現系としては、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第１０，６０４，７６１号明細書に記載のものが挙げられる。

【００６３】

１つ以上の今回の単離され、精製された、抗微生物デフェンシンペプチドバリアント又は生物学的に機能的なその同等物の、抗微生物植物又は抗微生物ヒト若しくは獣医学、病原性微生物阻害量（「抗微生物有効量」）の何れかを含む、農業、薬学又は獣医学用途のための抗微生物組成物も提供される。このような組成物は、本明細書中で開示されるデフェンシンペプチドバリアント又はタンパク質のうち１つ又は何れかの組み合わせと、農業的に、薬学的に又は獣医学的に実行可能に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤と、を含み得る。以下で示されるように、農業及び治療の文脈に関連する他の構成成分もこのような組成物中に含まれ得る。植物、ヒト又は動物微生物感染と関連があるデフェンシンペプチドバリアントに感受性がある病原性微生物の増殖を阻害するか又はそれらを死滅させるために、抗微生物組成物を使用し得る。このような抗微生物組成物は、局所投与のために処方され得、植物、植物環境（土壌を含む）又はヒト又は動物の何れかに局所的に適用され得る。本組成物の経腸、非経口及び／又は静脈内投与のためにこのような抗微生物組成物を処方し、それを必要とする対象に投与し得；このような対象は、ヒト、家畜、家禽、魚又はコンパニオン動物であり得る。デフェンシンペプチドバリアントは、単独で、互いとの何れかの組み合わせで、処方され得、非限定例であるポリエン抗微生物剤；イミダゾール、トリアゾール及びチアゾール抗微生物剤；アリルアミン；及びヒト及び獣医学で日常的に使用されるエキノキャンディンなど従来の他の抗微生物治療化合物と組み合わせてこれらの何れかをさらに処方し得る。それを必要とするヒト又は動物対象へのデフェンシンペプチドバリアントを含む組成物の投与は、局所適用、経腸投与、非経口投与及び／又は静脈内投与を含む多岐にわたる経路を介して遂行され得る。抗微生物ペプチド及び組成物は、次のものを含む微生物病原体又は汚染物を制御するために使用され得る：（ｉ）植物又は動物の細菌病原体（この細菌病原体は任意選択的に腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）の群のメンバーであり、任意選択的にこの細菌病原体は、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）ｓｐ．、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）ｓｐ．又はリステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）ｓｐ．である）；（ｉｉ）フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）ｓｐ．、アルテルナリア（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）ｓｐ．、アフェノミセス（Ａｐｈｅｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、ベルティシリウム（Ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｉｕｍ）ｓｐ．、フィトフトラ（Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ）ｓｐ．、コレトトリカム（Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ）ｓｐ．、ボトリチス（Ｂｏｔｒｙｔｉｓ）ｓｐ．、セルコスポラ（Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ）ｓｐ．、ファコプソラ（Ｐｈａｋｏｐｓｏｒａ）ｓｐ． リゾクトニア（Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ）ｓｐ．、スクレロチニア（Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ）ｓｐ．、フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）ｓｐ．、フォーマ（Ｐｈｏｍａ）ｓｐ．、レプトスフェリア（Ｌｅｐｔｏｓｐｈａｅｒｉａ）ｓｐ．、ガエウマンノミセス（Ｇａｅｕｍａｎｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、プッチニア（Ｐｕｃｃｉｎｉａ）ｓｐ． セプトリア（Ｓｅｐｔｏｒｉａ）ｓｐ．、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）ｓｐ．、ラシオディプロディア（Ｌａｓｉｏｄｉｐｌｏｄｉａ）ｓｐ．、フォモプシス（Ｐｈｏｍｏｐｓｉｓ）ｓｐ．、ミコスファエレラ（Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ）ｓｐ．、ゴロビノミセス（Ｇｏｌｏｖｉｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、エリシフェ（Ｅｒｉｓｙｐｈｅ）ｓｐ．、アルブゴ（Ａｌｂｕｇｏ）ｓｐ．、セトスファエリア（Ｓｅｔｏｓｐｈａｅｒｉａ）ｓｐ．、コクリオ

ボルス（Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ）ｓｐ．、ヘルミントスポリウム（Ｈｅｌｍｉｎｔｈｏｓｐｏｒｉｕｍ）ｓｐ．、ディプロディア（Ｄｉｐｌｏｄｉａ）ｓｐ．又はステノカルペラ（Ｓｔｅｎｏｃａｒｐｅｌｌａ）ｓｐ．であるもの；（ｉｉｉ）アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）、アポフィソミセス（Ａｐｏｐｈｙｓｏｍｙｃｅｓ）、クニンガメラ（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍｅｌｌａ）、サクセナエア（Ｓａｋｓｅｎａｅａ）、リゾムコール（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ）、シンセファロストルム（Ｓｙｎｃｅｐｈａｌｏｓｔｒｕｍ）、コケロミセス（Ｃｏｋｅｒｏｍｙｃｅｓ）、アクチノムコール（Ａｃｔｉｎｏｍｕｃｏｒ）、フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）、フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、ヒストプラズモシス（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍｏｓｉｓ）、コッキディオミセス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｍｙｃｅｓ）又はブラストミセス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ）種；（ｉｖ）カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）種（カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）種は、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）（Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ）、Ｃ．アウリス（Ｃ．ａｕｒｉｓ）、Ｃ．グラブラタ（Ｃ．ｇｌａｂｒａｔａ）、Ｃ．パラプシロシス（Ｃ．ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）、Ｃ．トロピカリス（Ｃ．ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）又はＣ．クルゼイ（Ｃ．ｋｒｕｓｅｉ）である）；又は（ｖ）皮膚糸状菌は、トリコフィトン・ルブルム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｒｕｂｒｕｍ）、トリコフィトン・インテルディジターレ（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｉｎｔｅｒｄｉｇｉｔａｌｅ）、トリコフィトン・ビオラセウム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｖｉｏｌａｃｅｕｍ）、トリコフィトン・トンスランス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｔｏｎｓｕｒａｎｓ）、トリコフィトン・ソウダネンス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｓｏｕｄａｎｅｎｓｅ）、トリコフィトン・メンタグロフィテス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）、ミクロスポルム・フラブム（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ　ｆｌａｖｕｍ）、エピデルモフィトン・フロッコスム（Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ　ｆｌｏｃｃｏｓｕｍ）及びミクロスポルム・ジプセウム（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ　ｇｙｐｓｅｕｍ）からなる群から任意選択的に選択される。

【００６４】

本発明のデフェンシンペプチドバリアント分子単独の何れかを含むか又は何らかの組み合わせで含む農業組成物は、例えばＷｉｎｎａｃｋｅｒ－Ｋｕｃｈｌｅｒ（１９８６）Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｆｏｕｒｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｖｏｌｕｍｅ　７，Ｈａｎｓｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ，Ｍｕｎｉｃｈ；ｖａｎ　Ｆａｌｋｅｎｂｅｒｇ（１９７２－１９７３）Ｐｅｓｔｉｃｉｄｅ　Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎ．Ｙ．；及びＫ．Ｍａｒｔｅｎｓ（１９７９）Ｓｐｒａｙ　Ｄｒｙｉｎｇ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ，Ｔｈｉｒｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｇ．Ｇｏｏｄｗｉｎ，Ｌｔｄ．，Ｌｏｎｄｏｎ．Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ　ａｉｄｓに記載のように処方され得、例えば担体、不活性物質、界面活性剤、溶媒及び他の添加物など、当技術分野でまた周知であり、例えばＷａｔｋｉｎｓ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｉｎｓｅｃｔｉｃｉｄｅ　Ｄｕｓｔ　Ｄｉｌｕｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｃａｒｒｉｅｒｓ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｄａｒｌａｎｄ　Ｂｏｏｋｓ，Ｃａｌｄｗｅｌｌ，Ｎ．Ｊ．，ａｎｄ　Ｗｉｎｎａｃｋｅｒ－Ｋｕｃｈｌｅｒ（１９８６）Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｆｏｕｒｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｖｏｌｕｍｅ　７，Ｈａｎｓｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ，Ｍｕｎｉｃｈに記載されている。これらの処方物を使用して、完成した処方物又はタンク混合物の形態で、本発明のデフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質と他の殺虫活性物質、肥料及び／又は成長調節物質などとの混合物を調製することも可能である。

【００６５】

単独又は他の活性物質との組み合わせの何れでも、本発明の抗微生物デフェンシンペプチドバリアントは、約３．０～約９．０の範囲のｐＨにて約０．１ｐｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍｌ又は約５ｐｇ／ｍｌ～約５ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度で対象又は植物に適用され得る。このような組成物は、例えば約１ｍＭ～１Ｍ、約１０ｍＭ～約１００ｍＭ又は約１

５ｍＭ～約５０ｍＭのリン酸緩衝液を使用して緩衝化し得る。低緩衝液濃度の場合、イオン強度を向上させるために塩を添加し得る。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質を含む組成物において、約１ｍＭ～約１Ｍ、約１ｍＭ、５ｍＭ又は１０ｍＭ～約２０ｍＭ、５０ｍＭ、１００ｍＭ、１５０ｍＭ又は２００ｍＭ又は約１０ｍＭ～約１００ｍＭの範囲のＮａＣｌを含むナトリウム塩を添加又は提供し得る。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質を含む組成物において、約１ｍＭ、５ｍＭ又は１０ｍＭ～約２０ｍＭ、５０ｍＭ、１００ｍＭ、１５０ｍＭ又は２００ｍＭの範囲のＫＣ１を含むカリウム塩を添加又は提供し得る。ある特定の実施形態では、デフェンシンペプチドバリアントを含む組成物において、約０．１ｍＭ、０．５ｍＭ又は１ｍＭ～約２ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ又は２０ｍＭの範囲の$CaCl_2$を含むカルシウム塩を添加又は提供し得る。

【００６６】

本発明のデフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質が合わせられ得る多くの従来の微生物抗生物質及び化学抗微生物剤（例えば抗真菌剤）がＷｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｗａｌｋｅｒ（１９８３）Ｔｈｅ Ｐｅｓｔｉｃｉｄｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｃｒｏｐ Ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ Ｃｏｕｎｃｉｌに記載されている。これらは、例えば、ポリオキシン、ニッコマイシン、カルボキシアミド、芳香族炭水化物、カルボキシン、モルホリン、ステロール生合成の阻害剤及び有機リン化合物を含む。さらに、アゾール、トリアゾール及びエキノキャンディン殺真菌剤も使用され得る。本発明の抗微生物ペプチド及びタンパク質と組み合わせて処方され得る他の活性成分としては、例えば、殺虫剤、誘引剤、滅菌剤、ダニ駆除剤、殺線虫剤及び除草剤が挙げられる。その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第５，４２１，８３９号明細書は、本発明の抗微生物デフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質などの物質が処方され得る多くの活性物質の包括的なまとめを含有する。

【００６７】

本明細書中に包含される農業的に有用な抗微生物組成物はまた、デフェンシンペプチドバリアント及びタンパク質を産生可能であり、根、苗条、葉又は植物の他の部分を含め、植物にコロニー形成し得る細菌及び微生物細胞などの宿主細胞の形態のものも含む。「植物にコロニー形成する微生物」という用語は、植物それ自身及び／又は植物環境の何れかの部分にコロニー形成可能であり、植物及び／又は植物環境において本発明のデフェンシンバリアント抗微生物ペプチド及びタンパク質を発現し得るものを含む微生物を指すために本明細書中で使用される。植物にコロニー形成する微生物は、植物環境において植物と相利共生的又は有害でない関係で存在し得るものである。その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第５，２２９，１１２号明細書は、本明細書中で開示されるデフェンシンバリアント抗微生物ペプチド及びタンパク質に適用可能な、抗微生物ペプチド及びタンパク質を発現させるために改変され得る様々な植物にコロニー形成する微生物及びその使用方法を開示する。植物における微生物増殖の阻害において有用な本発明で開示されるデフェンシンバリアント抗微生物ペプチド及びタンパク質を発現する植物においてコロニー形成する微生物としては、バチルス・スリンギエンシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ）、バチルス・イスラエレンシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｉｓｒａｅｌｅｎｓｉｓ）及びバチルス・サブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）を含むバチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）ｓｐｐ．、カンジダツス・リベリバクター・アシアティクス（Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｌｉｂｅｒｉｂａｃｔｅｒ ａｓｉａｔｉｃｕｓ）；シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ｓｐｐ．；アルスロバクター（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ）ｓｐｐ．、アゾスピリルム（Ａｚｏｓｐｙｒｉｌｌｕｍ）ｓｐｐ．、クラビバクター（Ｃｌａｖｉｂａｃｔｅｒ）ｓｐｐ．、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）ｓｐｐ．；アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ｓｐｐ．、例えばＡ．ラジオバクター（Ａ．ｒａｄｉｏｂａｃｔｅｒ）、リゾビウム（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）ｓｐｐ．、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）ｓｐｐ．アゾトバクター（Ａｚｏｔｏｂａｃｔｅｒ）ｓｐｐ．、アゾスピリルム（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）ｓｐｐ．、クレ

ブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）ｓｐｐ．、アルカリゲネス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）ｓｐｐ．、リゾバクテリウム（Ｒｈｉｚｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ｓｐｐ．、キサントモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）ｓｐｐ．、ラルストニア（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）ｓｐｐ．及びフラボバクテリウム（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）ｓｐｐ．からなる群から選択される細菌が挙げられる。ある特定の実施形態では、微生物は、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）及びピキア・メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ　ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）からなる群から選択される酵母である。ある特定の実施形態では、植物にコロニー形成する微生物は、内部寄生性の細菌又は微生物であり得る。本発明のデフェンシンペプチドバリアント分子を根圏に適用する場合、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属からの根圏コロニー形成細菌は特に有用であり、特にフルオレセント・シュードモナド（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｄｓ）、例えばシュードモナス・フルオレセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）であり、これは、植物根圏において及び多数の植物の根の表面にコロニー形成することにおいて特に競合的である。適切な葉面（葉）コロニー形成細菌の例は、Ｐ．プチダ（Ｐ．ｐｕｔｉｄａ）、Ｐ．シリンガエ（Ｐ．ｓｙｒｉｎｇａｅ）及びエルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）種である。

【００６８】

実施形態

次の番号の実施形態は本開示の一部を形成する：

１ａ．配列番号１を含むペプチドであって、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１のデフェンシンペプチドの対応する全長配列を含まず、任意選択的に、配列番号３３で示される修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）、配列番号３４で示されるＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）を含み；及び／又は任意選択的にＣ末端システイン残基又はＣ末端アミノ酸残基がアミド化される、ペプチド。

【００６９】

１ｂ．配列番号３、４、５又は６の何れか１つの全長にわたり少なくとも５０％、５５％、６０％、６８％、７５％、８２％又は９４％の配列同一性を有し、配列番号８とは同一ではないペプチドであって、任意選択的に、前記配列中の何れのアミノ酸置換も、中性ｐＨで正味正荷電を向上させるか若しくは維持し、及び／又は前記ペプチドの疎水性を向上させるか若しくは維持し、任意選択的に前記Ｃ末端システイン残基がアミド化される、ペプチド。

【００７０】

１ｃ．配列番号７、１２、１３、１４、１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５の全長にわたり少なくとも５０％、５５％、６０％、６８％、７５％、８２％、９４％、９５％又は１００％の配列同一性を有するペプチドであって、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１と同一ではなく、任意選択的に、配列番号５、配列番号１３、１４、１５、１８、１９、２０、２２、２３、２６、２８、２９、３１、３２、４２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５のペプチドが、２個のシステイン残基の間にジスルフィド結合を含み、任意選択的に何れの置換も、中性ｐＨで正味正荷電を向上させるか若しくは維持し、及び／又はペプチドの疎水性を向上させるか若しくは維持し、任意選択的に、前記Ｃ末端システイン残基又はＣ末端システイン残基がアミド化される、ペプチド。

【００７１】

１ｄ．参照デフェンシンＣ末端ペプチドのＮ末端及びＣ末端システインに対応する保存されたＣ１及びＣ４システイン残基を含むデフェンシンＣ末端ペプチドバリアントであっ

て、前記参照デフェンシンＣ末端ペプチドの保存されたＣ２及びＣ３システイン残基が、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン又はメチオニンで独立に置換され；任意選択的に、少なくとも３、３．５、４、５又は６の正味正荷電及び少なくとも１８％の疎水性アミノ酸含量を有する、デフェンシンＣ末端ペプチドバリアント。

【００７２】

１ｅ．修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４５）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４６）、ＧＸＣＸ３－８（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４７）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４８）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４９）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５０）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５１）又はＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５２）を含む、Ｃ末端デフェンシンペプチドバリアントであって、任意選択的に、前記ペプチドが保存されたＣ４システイン残基をさらに含み、任意選択的に、修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列中のシステイン残基が保存されたＣ４システイン残基とともにジスルフィド結合を形成し、及び／又は任意選択的に少なくとも３、３．５、４、５又は６の正味正荷電及び少なくとも１８％の疎水性アミノ酸含量を有する、Ｃ末端デフェンシンペプチドバリアント。

【００７３】

１ｆ．修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３３）、ＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号３４）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８７）、ＧＸＣＸ３－１２（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号５８８）、ＧＸＣＸ３－１５（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（（配列番号５８９）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４３）又はＧＸＣＸ３－９（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（配列番号４４）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４５）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４６）、ＧＸＣＸ３－８（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４７）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４８）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号４９）、ＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５０）、ＧＸＣＸ３－８（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５１）又はＧＸＣＸ３－１０（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（Ｆ／Ｗ／Ｙ／Ｌ／Ｖ／Ｉ／Ｍ）（配列番号５２）を含むペプチドであって、修飾されたガンマ－コアコンセンサス配列中のシステイン残基に対してＣ末端に位置する第２のＣ末端システイン残基をさらに含み、少なくとも３、３．５、４、５又は６の正味正荷電及び少なくとも１８％の疎水性アミノ酸含量を有し、任意選択的に、２つのシステイン残基の間にジスルフィド結合を含む、ペプチド。

【００７４】

２．実施形態１ａ、１ｂ、１ｃ、１ｄ、１ｅ又は１ｆに記載のペプチドであって、（ｉ）配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５からなる群から選択され；任意選択的に、配列番号５、配列番号１３、配列番号１４、１５、１８、１９、２０、２２、２３、２６、２８、２９、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５のペプチドが２個のシステイン残基の間にジスルフィド結合を含む、アミノ酸配列；（ｉｉ）配列番号７、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、１５、１７～２０、２２、２３、２５、２６、２８、２９、３１、３２、１８、１９、２０、２２、２３、２６、２８、２９、３２、４２、５７８、５７９、５８１、５８２、５８４又は５８５の全長にわたり少なくとも５０％、５５％、６０％、６８％、７５％、８２％、９４％、９５％又は１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列（ここで、前記ペプチドは、配列番号８、１６、２０、２３、２６、２９、３７、３８、３９、４０又は４１のデフェンシンペプチドの対応する全長配列を含まず；任意選択的に、前記ペプチドは、２個のシステイン残基の間にジスルフィド結合を含む）を含むか；又は（ｉｉｉ）抗微生物活性を示す、ペプチド。

【００７５】

３．実施形態１ａ、１ｂ、１ｃ、１ｄ、１ｅ、１ｆ又は２に記載のペプチドであって、（ｉ）３０アミノ酸残基以下；（ｉｉ）１５、１６又は１７～３０アミノ酸残基；又は（ｉｉｉ）１５、１６又は１７～３０アミノ酸残基を含むか、基本的にそれらからなるか又はそれらからなり、２個のシステイン残基を含有する、ペプチド。

【００７６】

４．実施形態１ａ、１ｂ、１ｃ、１ｄ、１ｅ又は１ｆ～３の１つの何れかに記載のペプチドと、農業的に、薬学的に又は獣医学的に実行可能に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤と、を含む組成物。

【００７７】

５．前記ペプチドが、約０．１、０．５、１．０又は５ｐｇ／ｍｌ～約１、５、２０、５０又は１００ｍｇ／ｍｌの濃度又は約０．１、０．５、１．０又は５ｐｇ／グラム～約１、５、２０、５０又は１００ｍｇ／グラムの濃度で提供され、任意選択的に、少なくとも１００ｍＭの濃度でナトリウム塩及び／又は少なくとも２ｍＭの濃度でカルシウム塩を含む、実施形態４に記載の組成物。

【００７８】

６．（ｉ）植物病原性微生物による作物被害を防ぐか若しくは軽減するか；又は（ｉｉ）植物、植物部分、種子、それらから得られる家畜飼料又はそれらから得られる食料の望ましくない微生物による汚染を防ぐための方法であって、植物、植物種子、前記植物の他の部分、それらから得られる家畜飼料又はそれらから得られる食料を実施形態４又は実施形態５に記載の組成物の有効量と接触させるステップを含む、方法。

【００７９】

７．前記植物病原性微生物又は望ましくない微生物が、（ｉ）任意選択的に腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）群のメンバーであり、任意選択的にサルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）ｓｐ．、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）ｓｐ．又はリステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）ｓｐ．である、植物又は動物の細菌病原体；又は（ｉｉ）フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）ｓｐ．、アルテルナリア（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）ｓｐ．、アフェノミセス（Ａｐｈｅｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、ベルティシリウム（Ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｉｕｍ）ｓｐ．、フィトフトラ（Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ）ｓｐ．、コレトトリカム（Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ）ｓｐ．、ボトリチス（Ｂｏｔｒｙｔｉｓ）ｓｐ．、セルコスポラ（Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ）ｓｐ．、ファコプソラ（Ｐｈａｋｏｐｓｏｒａ）ｓｐ．　リゾクトニア（Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ）ｓｐ．、スクレロチニア（Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ）ｓｐ．、フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）ｓｐ．、フォーマ（Ｐｈｏｍａ）ｓｐ．、レプトスフェリア（Ｌｅｐｔｏｓｐｈａｅｒｉａ）ｓｐ．、ガエウマン

ノミセス（Ｇａｅｕｍａｎｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、プッチニア（Ｐｕｃｃｉｎｉａ）ｓｐ．セプトリア（Ｓｅｐｔｏｒｉａ）ｓｐ．、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）ｓｐ．、ラシオディプロディア（Ｌａｓｉｏｄｉｐｌｏｄｉａ）ｓｐ．、フォモプシス（Ｐｈｏｍｏｐｓｉｓ）ｓｐ．、ミコスファエレラ（Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ）ｓｐ．、ゴロビノミセス（Ｇｏｌｏｖｉｎｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、エリシフェ（Ｅｒｉｓｙｐｈｅ）ｓｐ．、アルブゴ（Ａｌｂｕｇｏ）ｓｐ．、セトスファエリア（Ｓｅｔｏｓｐｈａｅｒｉａ）ｓｐ．、コクリオボルス（Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ）ｓｐ．、ヘルミントスポリウム（Ｈｅｌｍｉｎｔｈｏｓｐｏｒｉｕｍ）ｓｐ．、ディプロディア（Ｄｉｐｌｏｄｉａ）ｓｐ．又はステノカルペラ（Ｓｔｅｎｏｃａｒｐｅｌｌａ）ｓｐ．である、実施形態６に記載の方法。

【００８０】

８．機器及び実施形態４又は５に記載の組成物を含む医療機器であって、前記組成物で局所的にコーティングされる及び／又は含浸される少なくとも１つの面を含む、医療機器。

【００８１】

９．ステント、カテーテル、コンタクトレンズ、コンドーム、パッチ又は隔壁である、実施形態８に記載の医療機器。

【００８２】

１０．微生物感染の処置、予防又は阻害を必要とする対象において微生物感染を処置、予防又は阻害するための方法であって、実施形態４又は５に記載の組成物の有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

【００８３】

１１．前記投与が、前記組成物の、局所、経腸、非経口及び／又は静脈内導入を含む、実施形態１０に記載の方法。

【００８４】

１２．前記対象が、ヒト、家畜、家禽、魚又はコンパニオン動物である、実施形態１０又は１１に記載の方法。

【００８５】

１３．前記微生物感染が、粘膜、眼、皮膚及び／又は爪への感染であり、前記組成物が、粘膜、眼、皮膚、及び／又は爪に適用される、実施形態１２に記載の方法。

【００８６】

１４．前記微生物感染が皮膚糸状菌よるものであり、前記皮膚糸状菌が任意選択的に、トリコフィトン・ルブルム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｒｕｂｒｕｍ）、トリコフィトン・インテルディジターレ（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｉｎｔｅｒｄｉｇｉｔａｌｅ）、トリコフィトン・ビオラセウム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｖｉｏｌａｃｅｕｍ）、トリコフィトン・トンスランス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｔｏｎｓｕｒａｎｓ）、トリコフィトン・ソウダネンス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｓｏｕｄａｎｅｎｓｅ）、トリコフィトン・メンタグロフィテス（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）、ミクロスポルム・フラブム（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ　ｆｌａｖｕｍ）、エピデルモフィトン・フロッコスム（Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ　ｆｌｏｃｃｏｓｕｍ）及びミクロスポルム・ジプセウム（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ　ｇｙｐｓｅｕｍ）からなる群から選択される、実施形態１０～１３の何れか１つに記載の方法。

【００８７】

１５．前記微生物感染が、（ｉ）任意選択的に腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）群のメンバーであり、任意選択的にサルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）ｓｐ．、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）ｓｐ．又はリステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）ｓｐ．；又は（ｉｉ）アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）、アポフィソミセス（Ａｐｏｐｈｙｓｏｍｙｃｅｓ）、クニンガメラ（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍｅｌｌａ）、サクセナエア（Ｓａｋｓｅｎａｅａ）、リゾム

コール（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ）、シンセファロストルム（Ｓｙｎｃｅｐｈａｌｏｓｔｒｕｍ）、コケロミセス（Ｃｏｋｅｒｏｍｙｃｅｓ）、アクチノムコール（Ａｃｔｉｎｏｍｕｃｏｒ）、フィチウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）、フサリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、ヒストプラズモシス（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍｏｓｉｓ）、コッキディオミセス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｍｙｃｅｓ）又はブラストミセス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ）種である動物の細菌病原体による、実施形態１０～１３の何れか１つに記載の方法。

【００８８】

１６．前記微生物感染が、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）種によるものであり、前記カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）種が、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）（Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ）、Ｃ．アウリス（Ｃ．ａｕｒｉｓ）、Ｃ．グラブラタ（Ｃ．ｇｌａｂｒａｔａ）、Ｃ．パラプシロシス（Ｃ．ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）、Ｃ．トロピカリス（Ｃ．ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）又はＣ．クルゼイ（Ｃ．ｋｒｕｓｅｉ）である、実施形態１０～１３の何れか１つに記載の方法。

【００８９】

１７．微生物感染の処置、予防又は阻害を必要とする対象において微生物感染を処置、予防又は阻害する方法における使用のための、実施形態４又は５に記載の組成物。

【００９０】

１８．前記対象が、ヒト、家畜、家禽、魚又はコンパニオン動物である、実施形態１７に記載の組成物。

【００９１】

１９．実施形態４又は５に記載の組成物で少なくとも部分的にコーティングされる、植物部分。

【００９２】

２０．種子であり、前記種子が、任意選択的に、トウモロコシ、ダイズ、小麦、米、綿、ブラッシカ（Ｂｒａｓｓｉｃａ）ｓｐ．又はトマト種子である、実施形態１９に記載の植物部分。

【００９３】

２１．果実、野菜又は花である、実施形態１９に記載の植物部分。

【００９４】

２２．実施形態１ａ、１ｂ、１ｃ、１ｄ、１ｅ、１ｆ、２又は３に記載の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組み換えポリヌクレオチドであって、前記第１の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドが前記第１の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドにとって異種であるプロモーターを含むポリヌクレオチドに操作可能に連結され、任意選択的に前記配列中の何れのアミノ酸置換も、正味正荷電を向上させるか若しくは維持し、及び／又はペプチドの疎水性を向上させるか若しくは維持する、組み換えポリヌクレオチド。

【００９５】

２３．（ｉ）輸送ペプチド、空胞を標的とするペプチド及び／又は小胞体を標的とするペプチド；（ｉｉ）色素体標的化ペプチド；及び／又は（ｉｉｉ）ポリアデニル化又は転写終結シグナルをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態２２に記載の組み換えポリヌクレオチドであって、（ｉ）、（ｉｉ）及び／又は（ｉｉｉ）のポリヌクレオチドが前記抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結される、組み換えポリヌクレオチド。

【００９６】

２４．前記第１の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、細胞の異種核又は色素体ゲノムに挿入され、異種核又は色素体ゲノムに位置する内在性プロモーターに操作可能に連結される、実施形態２２又は２３に記載の組み換えポリヌクレオチド。

【００９７】

２５．実施形態１ａ、１ｂ、１ｃ、１ｄ、１ｅ、１ｆ、２又は３に記載の抗微生物ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む植物核又は色素体ゲノムであって、前記ポリヌ

クレオチドが前記核又は色素体ゲノムにとって異種であり、前記ポリヌクレオチドが前記核又は色素体ゲノムの内在性プロモーターに操作可能に連結される、植物核又は色素体ゲノム。

【００９８】

２６．任意選択的に細菌、酵母又は植物細胞である、実施形態２２に記載の組み換えポリヌクレオチド又は実施形態２５に記載のゲノムを含む細胞。

【００９９】

２７．実施形態２２に記載の組み換えポリヌクレオチド又は実施形態２５に記載のゲノムを含む、植物。

【０１００】

２８．前記組み換えポリヌクレオチド又はゲノムを含み、種子、茎、葉、根、塊茎、花又は果実である、実施形態２６に記載の植物の植物部分。

【０１０１】

２９．（ｉ）実施形態２２に記載の植物を自家受粉させるか又は交配させ；（ｉｉ）前記自家受粉又は交配から前記植物の組み換えポリヌクレオチドを含む種子を収穫し、それにより植物病原性微生物による感染に対する耐性を植物に提供する植物種子を生成させるステップを含む、植物病原性微生物による感染に対する耐性を植物に提供する植物種子を生成させるための方法。

【０１０２】

参照文献

Ａｒｇｏｓ，（１９９０）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．Ｆｅｂ ２０；２１１（４）：９４３－５８．
Ｂｒｏａｄｌｅｙ，Ｍ．Ｒ．，Ｂｏｗｅｎ，Ｈ．Ｃ．，Ｃｏｔｔｅｒｉｌｌ，Ｈ．Ｌ．，Ｈａｍｍｏｎｄ，Ｊ．Ｐ．，Ｍｅａｃｈａｍ，Ｍ．Ｃ．，Ｍｅａｄ，Ａ．，ａｎｄ Ｗｈｉｔｅ，Ｐ．Ｊ．（２００３）．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｂｏｔａｎｙ ５４，１４３１－１４４６
Ｂｕｃｈｋｏ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７，１６１１－１６２３．
Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ ４７，５７９－５８７．
Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１３）Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．；６５（１０）：１３５７－１３６９．
ｄａ Ｓｉｌｖａ Ｃｏｎｃｅｉｃａｏ，Ａ．，ａｎｄ Ｂｒｏｅｋａｅｒｔ，Ｗ．Ｆ．（１９９９）．Ｐｌａｎｔ Ｄｅｆｅｎｓｉｎｓ．Ｉｎ Ｐａｔｈｏｇｅｎｅｓｉｓ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｉｎ ｐｌａｎｔｓ，Ｓ．Ｍｕｔｈｕｋｒｉｓｈｎａｎ，ｅｄ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ），ｐｐ．２４７－２６０．
Ｆｒａｎｑｏｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ（２００２）１２８：１３４６－１３５８．
Ｇｅｏｒｇｅ ＲＡ，ａｎｄ Ｈｅｒｉｎｇａ（２００２）Ｊ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．１５（１１）：８７１－８７９．
Ｈａｎｋｓ，Ｊ．Ｎ．，ｅｔ ａｌ．，（２００５）．Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５８，３８５－３９９．
Ｋｅｒｅｎｇａ ＢＫ，ｅｔ ａｌ．，（２０１９）Ｆｒｏｎｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１０：７９５．ｄｏｉ：１０．３３８９／ｆｍｉｃｂ．２０１９．００７９５
Ｋｉｅｄｚｉｅｒｓｋａ，ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ Ｐｕｒｉｆ ６０，８２－８．
Ｋｉｎｇｓｍａｎ ＳＭ，ｅｔ ａｌ．，（１９８５）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｇｅｎｅｔ Ｅｎｇ Ｒｅｖ．３：３７７－４１６．
Ｋｕｄｄｕｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７）．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｐｒｏｇ ２３３：１５２０－１５２８．ｄｏｉ：１０．１００２／ｂｔｐｒ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５０８．

Kumar, V. and Jain, M. (2015) J Exp Bot 66:47-57.
Lacerda et ah, Frontiers in Microbio. (2014) 5 (116):1-10.
Lay, F. T., and Anderson, M. A. (2005) Curr Protein Pept Sci 6, 85-101.
Marques et al. (2008) J Appl Microbiol 106, 1640-1648.
Mottram et al., FEBS Lett. (1989) 258 (2):211-215.
Murovec et al., Plant Biotechnol J. 2017 Aug;15 (8):917-926.
Pazgier et al. (2006) Protein Expr Pur 49, 1-8.
Reiser J, et al., (1990) Adv Biochem Eng Biotechnol.;43:75-102.
Sagaram et al., (2011) PLOS ONE 6:el8550.
Sagaram et al., (2013) PLoS ONE, 8 (12):e82485.
Shabala, S., and Pottosin, I. I. (2010) Signal. Commun. Plants 87-110.
Svitashev et al., (2015) Plant Physiology, 169 (2):931-945.
Spelbrink, R. G., et al., (2004). Plant Physiol 135, 2055-2067.
Terras, F. R., et al., (1992). J Biol Chem 267, 15301-15309.
Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A., and Thevissen, K. (2002). Planta 216, 193-202.
Turner et al., (1993) Protein Eng. 6 (1):101-108.
Voytas, D. Annual Review of Plant Biology, Vol. 64:327-350, 2013.
Vasivarama and Kirti (2013a) Plant Cell Tiss Organ Cult, 115:309-319.
Vasivarama and Kirti (2013b) Funct Integr Genomics 13:435-443.
Vriens, K., et al. Molecules 2014, 19, 12280-12303;doi:10.3390/moleculesl908122 80.
White, P., and Karley, A. (2010). Potassium. In Cell Biology of Metals and Nutrients;Hell, R., Mendel, R. R., Eds.;Springer:Berlin/Heidelberg, Germany., 199-224

【実施例】

【0103】

実施例1

Biomatik Inc, Canadaにより粗製ペプチド（GMA4C-AC、GMA4C_V1、GMA4C_V2及びGMA4C_V3）が化学合成され、GMA4C_V4及びGMA4C_V5はAlan Scientific Inc.（USA）により合成され、C-18逆相HPLC（Agilent Technologies, U

ＳＡ）においてアセトニトリル／水混合液の直線的勾配を使用してこれらをさらに精製した。ＨＰＬＣ分画を凍結乾燥し、ヌクレアーゼ不含水中で再懸濁した。製造者のプロトコール（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ＵＳＡ）に従い行われたＢＣＡアッセイを使用して、各ペプチドの濃度を決定した。ＳＦＭ培地中のアッセイにおいて抗真菌活性を決定した。ＳＦＭ培地は、K_2HPO_4（２．５ｍＭ）、$MgSO_4$（５０μＭ）、$CaCl_2$（５０μＭ）、$FeSO_4$（５μＭ）、$CoCl_2$（０．１μＭ）、$CuSO_4$（（０．１μＭ）、Na_2MoO_4（２μＭ）、H_3BO_3（０．５μＭ）、ＫＩ（０．１μＭ）、$ZnSO_4$（０．５μＭ）、$MnSO_4$（０．１μＭ）、グルコース（１０ｇ／リットル）、アスパラギン（１ｇ／リットル）、メチオニン（２０ｍｇ／リットル）、ミオイノシトール（２ｍｇ／リットル）、ビオチン（０．２ｍｇ／リットル）、チアミン－ＨＣＬ（１ｍｇ／リットル）及びピリドキシン－ＨＣＬ（０．２ｍｇ／リットル）、ｐＨ７．０）を含む。

【０１０４】

【表４】

表 2.ペプチドの抗真菌活性

ペプチド	配列番号	*B.シネレア* *(B.cinerea)* MIC(μM)	*F.グラミネアルム* *(F.graminearum)* MIC(μM)	*F.オキシスポルム* *(F.oxysporum)* MIC(μM)	*P.カプシシ* *(P.capsici)* MIC(μM)
GMA4C_AC [1]	**2**	1.5-3.0	3	6	1.5
GMA4C_V1A	**3**	1.5	3	6	3
GMA4C_V2A	**4**	3	3-6	-	-
GMA4C_V3A	**5**	1.5	3	-	-
GMA4C_V4 非アミド化	**11**	1.5	3	-	-
GMA4C_V5 非アミド化	**12**	1.5	3	-	-
GMA4C_V6A	**13**	0.75	1.5	-	-

[1]C-末端がアミド化される。

【０１０５】

【表５】

表 3.GMA4C 野生型及びバリアントペプチドの比較

ペプチド名	配列番号	*B.シネレア (B.cinerea)*に対するMIC値 (μM)	*F.グラミネアルム (F.graminearum)* に対する MIC 値 (μM)	塩耐性	コメント
GMA4C_AC	2	3	6	+	化学合成、アミド化
GMA4C_V1A	3	1.5	3	++	化学合成、アミド化
GMA4C_V2A	4	3	6	++	化学合成、アミド化
GMA4C_V3A	4	3	3	++	化学合成、アミド化
GMA4C_V4A	6	1.5	1.5	+++	化学合成、アミド化
GMA4C_V5A	7	3	3	+	化学合成、アミド化
GMA4C_V6A	13	0.75	1.5	+++	化学合成、アミド化

【０１０６】

低陽イオン条件でのインビトロでの抗真菌活性：ＧＭＡ４Ｃバリアント ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１Ａ、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ３Ａ、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ４Ａ及びＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ５Ａは、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）、Ｆ．グラミネアルム（Ｆ．ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ）、Ｆ．オキシスポルム（Ｆ．ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）及びＰ．カプシシ（Ｐ．ｃａｐｓｉｃｉ）に対する、インビトロでの野生型ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣ対照についての抗真菌活性同等物を示す。ＧＭＡ４Ｃバリアント ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ２Ａは、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）及びＦ．グラミネアルム（Ｆ．ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ）に対して、インビトロでの野生型ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣ対照と比較して抗真菌活性が２分の１に低下する。ＧＭＡ４Ｃ＿ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ６Ａは、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）に対して、インビトロでの野生型ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣ対照と比較して抗真菌活性の４倍の上昇を示す。

【０１０７】

植物体における抗真菌活性。取り外されたニコチアナ・ベンタミアナ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｂｅｎｔｈａｍｉａｎａ）の葉に適用した場合、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１Ａ及びＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ３Ａは、図１Ａ及び１Ｂで示されるように、ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣ又はＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ２Ａよりも、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）により引き起こされる灰色カビ病の症状の軽減において強力である。トマト葉に適用される場合、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１Ａは、ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣよりも、Ｐ．カプシシ（Ｐ．ｃａｐｓｉｃｉ）により引き起こされる疾患症状の軽減において効果が高い。

【０１０８】

陽イオン存在下でのインビトロでの抗真菌活性。１００ｍＭ ＮａＣｌ、１００ｍＭ ＫＣｌ又は２ｍＭ $CaCl_2$の存在下でＢ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）に対する抗真菌活性について試験した場合、ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣを含むペプチドの全てが、１００ｍＭ ＮａＣｌ又は１００ｍＭ ＫＣｌの存在下でそれらの抗真菌活性を保持する。しかし、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１Ａ及びＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ４Ａは、ＧＭＡ４Ｃ＿ＡＣよりも活性が２倍強力である。２ｍＭ $CaCl_2$の存在下で、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１Ａ及びＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ４Ａのみが６μＭで真菌増殖を阻害し、一方で植物デフェンシンＭｔＤｅｆ４又はＯｅＤｅｆ１などの他のペプチドは、この濃度では殆ど活性を示さない。

【０１０９】
【表６】

表 4.GMA4C 及びそのバリアントは、塩の存在下で *B.シネレア(B.cinerea)*に対する抗真菌活性を保持する。

ペプチド	配列番号	SFM MIC(μM)[1]	SFM+100mM NaCl MIC(μM)[1]	SFM+100mM KCl MIC(μM)[1]	SFM+2mM $CaCl_2$ MIC(μM)[1]
GMA4C_AC [1]	2	3	3	6	>6 (6 で少し出芽)
GMA4C_V1A	3	3	1.5	3	6
GMA4C_V2A	4	6	3	6	>6
GMA4C_V3A	5	3	1.5-3	>6	>6
GMA4C_V4A	6	1.5-3	1.5	1.5	3-6
GMA4C_V4 非アミド化	11	3	3	3	6
GMA4C_V5A	7	6	6	>6	>6
GMA4C_V5 非アミド化	12	6	6	>6	>6 (非常に感受性が高い)
GMA4C_V6A	13	1.5	0.75-1.5	1.5-3	3-6

[1] 最小発育阻止濃度(MIC)は、本化合物、タンパク質又はペプチドを欠く増殖培地中での微生物の増殖と比較して微生物の顕著な増殖がないペプチドの濃度である。

【０１１０】
ヒト真菌病原体に対する抗真菌活性：ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１Ａ及びＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ３Ａは、陽イオンに富むＲＰＭＩ培地中でＣ．アウリス（Ｃ．ａｕｒｉｓ）及びＣ．グラブラタ（Ｃ．ｇｌａｂｒａｔａ）に対する抗真菌活性を示すが、親ＭｔＤｅｆ４デフェンシンは活性を示さない。
【０１１１】

【表７】

表 5.Roswell Park Memorial Institute 1640 培地(RPMI 培地;グルタミン及びフェノールレッドを含むが炭酸水素塩は含まない)の組成

構成成分	水、g/L	構成成分	水、g/L
L-アルギニン(遊離塩基)	0.2	ビオチン	0.0002
L-アスパラギン(無水)	0.05	D-パントテン酸	0.00025
L-アスパラギン酸	0.02	塩化コリン	0.003
L-シスチン*2HCl	0.0652	葉酸	0.001
L-グルタミン酸	0.02	ミオ-イノシトール	0.035
L-グルタミン	0.3	ナイアシンアミド	0.001
グリシン	0.01	PABA	0.001
L-ヒスチジン(遊離塩基)	0.015	ピリドキシン HCl	0.001
L-ヒドロキシプロリン	0.02	リボフラビン	0.0002
L-イソロイシン	0.05	チアミン HCl	0.001
L-ロイシン	0.05	ビタミン B_{12}	0.000005
L-リジン*HCl	0.04	硝酸カルシウム H_2O	0.01
L-メチオニン	0.015	塩化カリウム	0.4
L-フェニルアラニン	0.015	硫酸マグネシウム(無水)	0.04884
L-プロリン	0.02	塩化ナトリウム	6
L-セリン	0.03	リン酸ナトリウム二塩基性(無水)	0.8
L-スレオニン	0.02	D-グルコース	2
L-トリプトファン	0.005	グルタチオン、還元型	0.001
L-チロシン*2Na	0.02883	フェノールレッド、Na	0.0053
L-バリン	0.02		

【０１１２】

【表８】

表 6.GMA4C_V1A 及び GMA4C_V3A は、*カンジダ・アウリス(Candida auris)*及び *C. グラブラタ(C.glabrata)*に対して RPMI 培地中でインビトロで抗真菌活性を示す。

ペプチド	*カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)* MIC(μg/ml)[1]	*カンジダ・アウリス (Candida auris)* MIC(μg/ml)[1]	*カンジダ・グラブラタ (Candida glabrata)* MIC(μg/ml)[1]
MtDef4	>46.9	46.9	>46.9
GMA4C_V1A	46.9	11.9	11.9
GMA4C_V3A	>46.9	23.9	23.9

[1] 最小発育阻止濃度(MIC)は、本化合物、タンパク質又はペプチドを欠く増殖培地中での微生物の増殖と比較して微生物の顕著な増殖がないタンパク質又はペプチドの濃度である。

【０１１３】

実施例２．病原性微生物に対するＧＭＡ４Ｃ－バリアントの活性

抗真菌活性に対する試験は、ペプチドには強度が半分のポテトデキストロースブロスを使用し、対照薬抗真菌フルコナゾール及びボリコナゾールにはＲＰＭＩを使用した。ＭＩＣを測定するためにＣＬＳＩ　Ｍ２７及びＭ３８法を使用した。最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）は、本化合物、タンパク質又はペプチドを欠く増殖培地中での微生物の増殖と比較して微生物の顕著な増殖がない、本化合物、タンパク質又はペプチドの濃度である。

【０１１４】

全ての試験は、０．１６５Ｍ　ＭＯＰＳで緩衝化されたＲＰＭＩ中で行った。ポテトデキストロースブロス中のペプチドに対する濃度範囲は、０．０６～２ｍｃｇ／ｍｌであり、フルコナゾールに対する濃度範囲は、０．１２５～６４ｍｃｇ／ｍｌであり、ボリコナゾールに対する濃度範囲は、０．０３～１６ｍｃｇ／ｍｌであった。ＭＩＣを２４～７２時間で決定した。

【０１１５】

【表９】

表 7.ポテトデキストロースブロスに対する処方

ポテトデキストロースブロス	
値	**成分及び条件**
1000 ml	水
4g(200g のインフューズされた (infused)ジャガイモから)	ジャガイモ(スライスして、皮を剥き、洗浄)
20 g	グルコース
pH 5.6	最終 pH
25 C	温度

【０１１６】

【表１０】

表 8.GMA4C バリアントについての MIC 値。フルコナゾール及びボリコナゾールに対するデータを伴う完全な表を図 4 で提供する。

種(分離株)	分離株番号	GMA4C_V1A 100%	GMA4C_V2A 100%	GMA4C_V4A 100%	GMA4C_V5A 100%
C.パラプシロシス (C.parapsilosis)	ATCC 22019	4	8	8	8
C.クルゼイ(C.krusei)	ATCC 6258	8	16	8	8
P.バリオティイ (P.variotii)	MYA-363	4	8	8	4
カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)	SC5314	8	16	8	16
	ATCC 90028	8	16	8	16
	CA3	8	16	8	8
カンジダ・アウリス (Candida auris)	DI17-47	8	16	8	16
	DI17-48	8	16	8	16
	DI17-46	8	16	8	16
アスペルギルス・フミガツス(Aspergillus fumigatus)	AF293	32	32	16	32
	DI15-106	>32	>32	16	>32
	DI15-116	>32	>32	32	>32
フサリウム(Fusarium)	F1(*F.オキシスポルム (F.oxysporum)*)	4	8	8	8
	F2(*F.オキシスポルム (F.oxysporum)*)	4	16	8	16
	F4(*F.ソラニ (F.solani)*)	4	8	8	8
コクシジオイデス (Coccidioides)sp.	Cocci1	8	8	4	2
	Cocci2	4	16	16	16
	DI17-143	8	16	16	16

【０１１７】

【表１１】

表9.SFMにおける植物真菌病原体に対するGMA4C野生型及びそのバリアントの抗真菌活性

配列番号	ペプチド	配列	MIC(μM) ボトリチス・シネレア (Botrytis cinerea)	MIC(μM) フサリウム・グラミネアルム (Fusarium graminearum)
2	GMA4C_AC	GGRCRGFRRRCFCTTHC-NH_2	3	3
3	GMA4C_V1A	GGRCKGFRRRCFCTRIC-NH_2	3	3
4	GMA4C_V2A	GGRCRGFRRRCFCTRIC-NH_2	6	3-6
5	GMA4C_V3A[1]	GGRCRGFRRRVFVTRIC-NH_2	3	3
6	GMA4C_V4A	FGRCRGFRRRCFCWRWC-NH_2	1.5	--
7	GMA4C_V5A[2]	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab) (Dab)CFCW(Dab)WC-NH_2	6	--
8	GMA4AC	GRCRGFRRRCFCTTHC	6	6
11	GMA4C_V4	FGRCRGFRRRCFCWRWC	3	3
12	GMA4C_V5[2]	FG(Dab)C(Dab)GF(Dab) (Dab) (Dab)CFCW(Dab)WC	6	3
13	GMA4C_V6[1]	GGR**C**KGFRRRWFWTRI**C**-NH_2	0.75	1.5
14	GMA4C_V7	XGR**C**KGFRRR(F/W/Y)(F/W/Y)(F/W/Y)XXX**C**-(NH_2)	--	--
15	GMA4C_V8	GGR**C**KGFRRRW**Y**WTRI**C**-NH_2	--	--

【０１１８】

【表１２】

表 10.SFM+塩における植物真菌病原体に対する GMA4C 野生型及びそのバリアントの抗真菌活性

ペプチド (配列番号)	SFM MIC(μM)	SFM+100mM NaCl MIC(μM)	SFM+100mM KCl MIC(μM)	SFM+2mM $CaCl_2$ MIC(μM)
GMA4C_AC (配列番号 2)	3	3	6	>6 (数個が 6 で出芽)
GMA4C_V1A (配列番号 3)	3	1.5	3	6
GMA4C_V2A (配列番号 4)	6	3	6	>6
GMA4C_V3A (配列番号 5)	3	1.5-3	>6	>6
GMA4C_V4A (配列番号 6)	1.5-3	1.5	1.5	3-6
GMA4C_V4 非アミド化 (配列番号 11)	3	3	3	6
GMA4C_V5A (配列番号 7)	6	6	>6	>6
GMA4C_V5 非アミド化 (配列番号 12)	6	6	>6	>6 (非常に感受性が高い)
GMA4C_V6A (配列番号 13)	1.5	0.75-1.5	1.5-3	3-6

【０１１９】

【表１３】

表 11 半強度のポテトデキストロースブロス中でのヒト酵母病原体に対するペプチドの抗真菌活性

ペプチド	*カンジダ・アルビカンス* *(Candida albicans)* (33795)	*カンジダ・アウリス* *(Candida auris)* (38883)	*カンジダ・グラブラタ* *(Candida glabrata)* (38827)
	MIC(μM)	MIC(μM)	MIC(μM)
MtDef4 [1]	1.1	1.1	0.55
GMA4C_V1A (配列番号 3)	11.2	11.2	11.2
GMA4C_V3A (配列番号 5)	2.8	5.6	2.8

[1] 全長 MtDef4 タンパク質は、米国特許第 7,825,297 号明細書に記載される。

【０１２０】

このアッセイで使用される全ての病原体分離株は、抗真菌薬フルコナゾールに対して耐性がある。半強度ポテトデキストロースブロス中で抗真菌アッセイを行った。

【０１２１】

【表１４】

表12 GMA4C_v3 又はMtDef4/フルコナゾールの組み合わせの相乗的(又は相加的)効果

	GMA4C_V3A(配列番号 5)/フルコナゾール			
	MIC 単独	組み合わせでの MIC	FICI[1]	**説明**
	μg/ml (μM)	**μg/ml (μM)**		
C.アルビカンス (C.albicans)	11.7/64 (4.2/206)	2.9/8(1.4/25.8)	0.375	**相乗的**
C.グラブラタ (C.glabrata)	11.7/64 (4.2/206)	5.9/8 (2.8/25.8)	0.625	**相加的**
全長 MtDef4[2] タンパク質/フルコナゾール				
	MIC 単独	組み合わせでの MIC	FICI [1]	**説明**
	μg/ml (μM)	**μg/ml (μM)**		
C.アルビカンス (C.albicans)	5.9/64 (1.1/206)	2.9/2 (0.55/6.45)	0.53	**相加的**
C.グラブラタ (C.glabrata)	2.9/64 (1.1/206)	1.5/64 (0.28/206)	1.5	**差はない**
結論:GMA4C_v3 は、フルコナゾールと組み合わせた薬物耐性 *C.アルビカンス(C.albicans)*に対する抗真菌活性の相乗的な促進を示す。				

[1]FICI は、フラクショナル阻害濃度インデックス(Fractional Inhibitory Concentration Index)である。これは、MIC_A 組み合わせ/MIC 単独+MIC_B 組み合わせ/MIC_B 単独(ここで、MIC_A 組み合わせは、組み合わせでの薬剤 A の MIC であり、MIC_A 単独は、薬剤 A 単独の MIC である)として計算される。薬剤 A はペプチド(GMAC_V3A)であり、薬剤 B は、上の表のフルコナゾールである。薬剤 A は全長 MtDef4 タンパク質であり、薬剤 B は、下の表のフルコナゾールにおけるフルコナゾール(Fluconazole in fluconazole)である。

[2] 全長 MtDef4 タンパク質は、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第 7,825,297 号明細書に記載されている。

【０１２２】

【表１５】

表 13.ヒト爪病原体(*トリコフィトン(Tricophyton)*spp.)及びアスペルギルス症(*アスペルギルス・フミガツス(Aspergillus fumigatus)*)に対するペプチドの抗真菌活性(μM 単位の MIC)。

ペプチド (配列番号)	*トリコフィトン・ルブルム (Tricophyton rubrum) (23014)*	*トリコフィトン・メタグロフィテス (Tricophyton metagrophytes) (26103)*	*アスペルギルス・フミガツス (Aspergillus fumigatus) (36843)*
MtDef4 [1]	2.2	1.1	>8.9
GMA4C_V1A (配列番号 3)	11.2	11.2	22.4
GMA4C_V3A (配列番号 5)	5.6	5.6	11.2
OeDef1 [2]	3.8	3.8	>7.6
OeDef1_V3 (配列番号 42)	4.0	4.0	>7.9

[1] 全長 MtDef4 タンパク質は、米国特許第 7,825,297 号明細書に記載されている。

[2] 全長 OeDef1 デフェンシンタンパク質は、国際公開第 2020/146373 号パンフレットに記載されている。

【０１２３】

【表１６】

表 14 *カンジダ(Candida)*spp.及びアスペルギルス症*(アスペルギルス・フミガツス (Aspergillus fumigatus))*に対するGMA4Cバリアントの抗真菌活性(μM単位のMIC)。

種	分離株	GMA4C_V1A (配列番号 3)	GMA4C_V2A (配列番号 4)	GMA4C_V4 (配列番号 11)	GMA4C_V5 (配列番号 12)
カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)	SC5314	3.8	7.6	3.8	7.6
	ATCC 90028	3.8	7.6	3.8	7.6
	CA3	3.8	7.6	3.8	3.8
カンジダ・パラプシロシス (Candida parapsilosis)	ATCC 22019	1.9	3.8	3.8	3.8
カンジダ・アウリス (Candida auris)	DI17-47	3.8	7.6	3.8	7.6
	DI17-48	3.8	7.6	3.8	7.6
	DI17-46	3.8	7.6	3.8	7.6
アスペルギルス・フミガツス (Aspergillus fumigatus)	AF293	15.2	15.2	7.6	15.2
	DI15-106	>15.2	>15.2	7.6	>15.2
	DI15-116	>15.2	>15.2	15.2	>15.2
フサリウム (Fusarium)	F1(*F.オキシスポルム (F.oxysporum)*)	3.8	3.8	3.8	3.8
	F2(*F.オキシスポルム (F.oxysporum)*)	3.8	7.6	3.8	7.6
	F4(*F.ソラニ(F.solani)*)	3.8	3.8	3.8	3.8
コクシジオイデス (Coccidioides) sp.	Cocci1	3.8	3.8	1.9	0.9
	Cocci2	1.9	7.6	7.6	7.6
	DI17-143	1.9	7.6	7.6	7.6

【０１２４】

実施例３．ヒト細菌病原体に対するＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１Ａの抗微生物活性

サルモネラ・チフィムリウムｖａｒ．コペンハーゲン（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ Ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ ｖａｒ．Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ）、腸内毒素原性Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）－Ｆ４及びリステリア・モノサイトゲンス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｓ）（Ｆ５２４４）株をＬＢ寒天プレート上で３７℃にて一晩増殖させた。少数の細菌をプレートから擦り取り、Ｍｕｅｌｌｅｒ－Ｈｉｎｔｏｎ（ＭＨ）増殖培地に添加し、対数期まで増殖させた。１～３ｘ１０^{6}ＣＦＵ／ｍＬまで細胞を希釈し、ポリプロピレン９６ウェルプレートにおいて５０ｕｌを各ウェルに添加した。合成されたペプチドＧＭ

Ａ４Ｃ＿Ｖ１Ａを０．２％ＢＳＡ、０．０１％酢酸溶液中で希釈し、０．２、０．４、０．８０、１．６、３．２５、７．５、１５、３０及び６０及び１２０μＭの濃度まで添加した。次に、各ペプチド溶液の５０μｌを細菌細胞の５０μｌに添加した。プレートをパラフィルムで被覆し、３７℃で一晩温置した。ＭＨ培地単独のＯＤ$_{600}$ｎｍ値及びペプチドがないＭＨ培地中の細菌増殖のそれと比較して、各濃度でのＯＤ$_{600}$ｎｍ値に基づいて細菌増殖阻害が決定された濃度。最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）は、ペプチドを欠く増殖培地中での微生物の増殖と比較して微生物の顕著な増殖がないペプチドの濃度である。

【０１２５】

【表１７】

表 15.GMA4C_V1A(配列番号 3)の抗菌活性

各細菌病原体の増殖阻害が観察されたGMA4C_V1Aの濃度(μM)			
ペプチド	***S.チフィムリウム* var. コペンハーゲン (*S.Typhimurium* var.Copenhagen)**	**腸内毒素原性 *E.コリ(E.coli)*-F4**	***L.モノサイトゲネス* (*L.monocytogenes*) F5244**
GMA4C_V1	15-60	7.5-60	15-30

【０１２６】

実施例４．デフェンシンペプチド断片の抗微生物活性

８０～８５％純度の粗製化学合成デフェンシン由来ペプチドは、Ｂｉｏｍａｔｉｋ Ｉｎｃ，Ｃａｎａｄａ又はＡｌａｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．，ＵＳＡから得た。Ｃ－１８逆相ＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ，Ｓｉｎｇａｐｏｒｅ）を使用して、各ペプチドをさらに精製した。本ペプチドを含有するＨＰＬＣ分画を凍結乾燥し、ヌクレアーゼ不含水中で再懸濁した。それらの正確な定量のために、製造者のプロトコール（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いてＢＣＡアッセイを使用して濃度を決定した。

【０１２７】

ボトリチス・シネレア（Ｂｏｔｒｙｔｉｓ ｃｉｎｅｒｅａ）Ｔ－４、アルテルナリア・アルテルナータ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ）、セルコスポラ・ソジナ（Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｓｏｊｉｎａ）及びコレトトリカム・グロエオスポリオイデス（Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ ｇｌｏｅｏｓｐｏｒｉｏｉｄｅｓ）の真菌株を表１６で示されるそれらの個々の通常の増殖培地中でそれぞれ培養した。滅菌水で真菌増殖プレートをフラッディングする（ｆｌｏｏｄｉｎｇ）ことによって、真菌胞子を回収した。Ｍｉｒａｃｌｏｔｈの２層を通じて胞子懸濁液をろ過し、１３，６００ｒｐｍで１分間、遠心分離し、洗浄し、低塩合成真菌培地（ＳＦＭ）中で再懸濁した（米国特許第６，３１６，４０７号明細書）。血球計数器を使用して所望の胞子数まで胞子懸濁液を調整した。

【０１２８】

【表１８】

表16

菌種	胞子生成のための培地	培養条件
B.シネレア (B.cinerea)	20% V8	7-25 日、25℃
アルテルナリア・アルテルナータ (Alternaria alternata)	10%ポテト-デキストロース寒天	7-15 日、25℃
セルコスポラ・ソジナ(Cercospora sojina)	20% V8	25℃で 12hr 点灯 /12hr 暗
コレトトリカム・グロエオスポリオイデス (Colletotrichum gloeosporioides)	10%ポテト-デキストロース寒天	7-15 日、25℃

【０１２９】

９６ウェルプレートアッセイを使用して、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）、Ａ．アルテルナータ（Ａ．ａｌｔｅｒｎａｔａ）、Ｃ．ソジナ（Ｃ．ｓｏｊｉｎａ）及びＣ．グロエオスポリオイデス（Ｃ．ｇｌｏｅｏｓｐｏｒｉｏｉｄｅｓ）真菌病原体に対する短縮されたデフェンシン由来ペプチド及びそれらのバリアントの抗真菌活性を分光測定により決定した（Ｓａｇａｒａｍ ｅｔ ａｌ．，（２０１１）ＰＬｏＳ ＯＮＥ ６：ｅ１８５５０．ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．００１８５５０）。４５μＬの（約10^5個のＢ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）胞子／ｍｌ）胞子懸濁液を含有するマイクロタイタープレートの各ウェルに０．３７５、０．７５、１．５、３、１２μＭの濃度の４５マイクロリットルのペプチドを添加した。４８ｈ後、（Ｔｅｃａｎ Ｉｎｆｉｎｉｔｅ Ｍ２００ ＰｒｏＴｅｃａｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）マイクロプレートリーダーを使用して５９５ｎｍでの吸光度を測定することによって、定量的な真菌増殖阻害を決定した。レサズリン細胞生存能アッセイを使用して、真菌細胞生存能を決定した（Ｃｈａｄｈａ ａｎｄ Ｋａｌｅ，（２０１５）Ｌｅｔｔ Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ６１，２３８－２４４，Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，（２０１９）Ｍｏｌ Ｐｌａｎｔ Ｍｉｃｒｏｂｅ Ｉｎｔｅｒａｃｔ ３２，１６４９－１６６４）。４８ｈにわたる病原体／ペプチド混合物の温置後、１０μｌの０．１％レサズリン溶液を各ウェルに添加し、一晩再温置した。青からピンク又は無色へのレサズリンの色の変化は、生きている真菌細胞の存在を示した。青色の変化が観察されなかったペプチドの最小濃度として各ペプチドのＭＩＣ値を決定した。ＳＦＭ及び上記のような１００ｍＭ ＮａＣｌ、１００ｍＭ又は２ｍＭ $CaCl_2$を補給したＳＦＭ中でデフェンシン由来ペプチド及びそれらのバリアントのＭＩＣ値も決定した。

【０１３０】

既に記載されているようにＮ．ベンタミアナ（Ｎ．ｂｅｎｔｈａｍｉａｎａ）Ｎｂ１の取り外された葉を使用して、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）に対する各デフェンシン由来ペプチド及びそのバリアントの半インプランタ抗真菌活性を決定した（Ｌｉ ｅｔ

ａｌ．，（２０１９）Ｍｏｌ Ｐｌａｎｔ Ｍｉｃｒｏｂｅ Ｉｎｔｅｒａｃｔ ３２、１６４９－１６６４；Ｖｅｌｉｖｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，（２０２０）Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ．１１７、１６０４３－１６０５４）。１．５μＭ、３μＭ及び６μＭの濃度で各ペプチドを試験した。４８時間にわたる室温での各ペプチド／真菌胞子混合物の温置後、白色光下で葉の写真を撮影した。ＣｒｏｐＲｅｐｏｒｔｅｒ（ＰｈｅｎｏＶａｔｉｏｎ，Ｗａｇｅｎｉｎｇｅｎ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を使用して、高解像度蛍光画像も撮影した。これらの画像は、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）感染により冒された疾患領域のＦｖ／ＦＭ（ｐｈｏｔｏｓｙｓｔｅｍ ＩＩの最大量子収量）計算値を示した。画像における色は、組織損傷度の変動を示すクラスＩからクラスＶ（０．０００～０．７００）の範囲の５つの異なるクラスを示す。各画像中の緑色は、０．６００～≧０．７００の範囲のクラスＶに相当し、これは葉の表面の健康な領域を示す。その一方、赤色は０．０００～０．１６０の範囲のクラスＩに相当し、重度の損傷又は罹患した葉の表面を示す。

【０１３１】

デフェンシン由来ペプチドの、一次アミノ酸配列、長さ、正味荷電及疎水性アミノ酸のパーセンテージを表１７で示す。これらのペプチドは、植物デフェンシン、ＯｅＤｅｆ１、ＭｔＤｅｆ４、ＭｓＤｅｆ１及びＭｔＤｅｆ５Ａ由来である。正味荷電及び疎水性を向上させるために、各ペプチドの野生型配列におけるアミノ酸置換を行った。さらに、偽環状にするために、ジスルフィド結合を特異的なバリアントに導入した。単一ジスルフィド結合を形成し得るペプチド及び偽環状ペプチドは、表１７の「ジスルフィド結合」カラムにおいて「＋」として示される。全てのペプチドがカルボキシ末端アミド基も保有する。

【０１３２】

【表１９】

表17.デフェンシン由来ペプチドのアミノ酸配列、長さ、正味荷電及び%疎水性アミノ酸。ジスルフィド結合の存在は必要な場合示される。

ペプチド	配列(ジスルフィドの存在)	配列番号	長さ	正味荷電	% 疎水性アミノ酸
GMAOe1C (WT)	GACLKNRHSKHYGCYCYYRHCY-NH_2	577	22	4.5	32
GMAOe1C_V3	GACLKNRHSKHYGWFWYYRHCY-NH_2 (ジスルフィド+)	578	22	4.5	41
GMAOe1C_V4	GACLKNRHSKHYGFFWYYRHCY-NH_2 (ジスルフィド+)	579	22	4.5	41
GMA4AC	GR**C**RGFRRR**C**F**C**TTH**C**-NH_2	580			
GMA4C_V9	GGR**C**KGFLRRFWFTRI**C**-NH_2 (ジスルフィド+)	581	17	5	35
GMA4C_V10	GGR**C**KGFRRRWYWTRI**C**-NH_2 (ジスルフィド+)	582	17	6	29
GMA1C_V1	SGRCRILFRCFCTKNC-NH_2	583	16	4	25
GMA1C_V2	SGRCRILFRWFWTKNC-NH_2 (ジスルフィド+)	584	16	4	37
GMA1C_V3	SGRCRILFRWYFTKNC-NH_2 (ジスルフィド+)	585	16	4	37
GMA5CA_WT	GACHRQGFGFACFCYKKC-NH_2	586	18	3.5	28
GMA5CA_V3	GACHRQGFGFAWFWYKKC-NH_2 (ジスルフィド+)	19	18	3.5	39
GMA5CA_V4	GACHRQGFGFAFFFYKKC-NH_2 (ジスルフィド+)	20	18	3.5	39

【０１３３】

各デフェンシン由来ペプチド及びそのバリアントの最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）値を決

定した（表１８）。陽イオンの存在が正荷電デフェンシンと負荷電真菌膜との間の静電気的相互作用を顕著に弱めるという仮説が立てられている（Ｃｈｕ ｅｔ ａｌ．，（２０１３）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ５７：４０５０－４０５２）。従って、発明者らは、１００ｍＭ ＮａＣｌ、１００ｍＭ ＫＣｌ又は２ｍＭ $CaCl_2$を補給したＳＦＭ中のＢ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）に対する各ペプチドの抗真菌活性を決定した（表１８）。

【０１３４】

【表２０】

表 18.*ボトリチス・シネレア(Botrytis cinerea)*に対するデフェンシン由来ペプチドの MIC 値

ペプチド	配列番号	MIC(μM) SFM	MIC(μM) (SFM+ 100mM NaCl)	MIC(μM) (SFM+ 100mM KCl)	MIC(μM) (SFM+ 2mM $CaCl_2$)
GMAOe1C_WT	577	3	3-6	6-12	>12
GMAOe1C_V3	578	1.5	2-3	6-12	3-6
GMAOe1C_V4	579	1.5	6	6-12	6-12
GMA4AC	580	3	ND[1]	ND	ND
GMA4C_V9	581	3	3	6-12	12
GMA4C_V10	582	3	3	3-6	3
GMA1C	35	>12	>12	>12	>12
GMA1C_V1	583	>6	>6	>12	--
GMA1C_V2	584	1.5-3	3	>12	3
GMA1C_V3	585	1.5	3	>12	6
GMA5CA_WT	586	6	>12	>12	>12
GMA5CA_V3	19	3	>12	>12	>12
GMA5CA_V4	20	3	>12	>12	>12

[1]ND は決定されていない。

【０１３５】

アルテルナリア・アルテルナータ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ）、セルコスポラ・ソジナ（Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｓｏｊｉｎａ）及びコレトトリカム・グロエオスポリオイデス（Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ ｇｌｏｅｏｓｐｏｒｉｏｉｄｅｓ）に対してもデフェンシン由来ペプチドのＭＩＣ値を試験した（表１９）。

【０１３６】

【表２１】

表 19.*アルテルナリア・アルテルナータ(Alternaria alternata)*、*セルコスポラ・ソジナ(Cercospora sojina)*及び*コレトトリカム・グロエオスポリオイデス(Colletotrichum gloeosporioides)*に対する抗真菌ペプチドの*インビトロ*抗真菌活性

ペプチド	配列番号	*アルテルナリア・アルテルナータ (Alternaria alternata)*	*セルコスポラ・ソジナ (Cercospora sojina)*	*コレトトリカム・グロエオスポリオイデス (Colletotrichum gloeosporioides)*
GMA4AC_WT	580	>12	>12	>12
GMA 4C_V9	581	>12	6	>12
GMA 4C_V10	582	>12	6	>12
GMA5CA_WT	586	6	12	>12
GMA5CA_V3	19	3	6	>12
GMA5CA_V4	20	3	6	>12

【０１３７】

Ｎ．ベンタミアナ（Ｎ．ｂｅｎｔｈａｍｉａｎａ）の取り外された葉を使用することによって、Ｂ．シネレア（Ｂ．ｃｉｎｅｒｅａ）に対するＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ９、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１０、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴ、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ３、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ４、ＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ１及びＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ２ペプチドの半インプランタ抗真菌活性を決定した。１．５μＭ、３μＭ及び６μＭの濃度の各ペプチドを液滴として葉に適用し、新鮮調製した分生子接種物を本ペプチドの各液滴にすぐに適用した。病変サイズを測定することによって、ペプチドなしの対照と比較して、接種の４８時間後に灰色カビ病症状の軽減について葉を評価した。ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ９及びＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１０ペプチドは両方とも灰色カビ病の症状の軽減において有効である。しかし、１．５μＭ及び３μＭの低濃度で、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ１０は、ＧＭＡ４Ｃ＿Ｖ９よりも、灰色カビ病の症状の軽減において有効である（図５）。

【０１３８】

ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴ、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ１、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ２の抗真菌活性を試験するためにも、滴下接種アッセイを行った。この結果から、３及び６μＭの濃度でのＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ１及びＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ２が灰色カビ病の症状を完全に抑止したが、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴは６μＭでのみ有効であったことが明らかになった。１．５μＭの濃度で、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ３は、ＧＭＡＯｅ１Ｃ＿Ｖ４又はＧＭＡＯｅ１Ｃ＿ＷＴよりも有効である（図６）。

【０１３９】

ＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ１及びＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ２の抗真菌活性を試験するためにも滴下接種アッセイを行った（図６）。３μＭ及び６μＭのＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ２は、灰色カビ病の症状を完全に抑止した。ＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ１は、これらの濃度で疾患症状を軽減できなかった。１．５μＭの濃度で、ＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ２はＧＭＡ１Ｃ＿Ｖ１よりも有効であった（図７）。

【０１４０】

上の結果から、これらの短縮されたデフェンシン由来ペプチドに導入される修飾（例えばアミノ酸置換）のパネルは、野生型短縮ペプチドよりも高い抗真菌活性を付与することが示される。

【０１４１】

本開示の幅及び範囲は、上記の例の何れによっても限定されるべきではない。

【図面】

【図１Ａ】

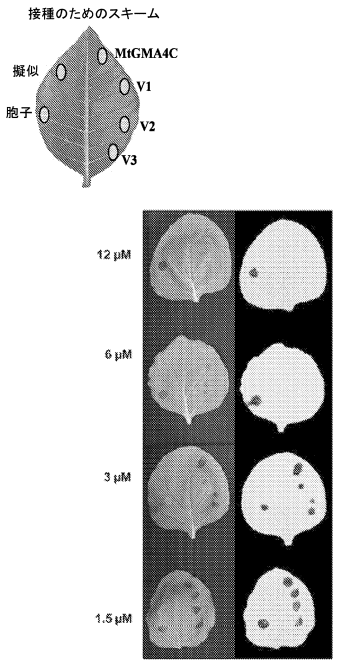


図1A

【図１Ｂ】

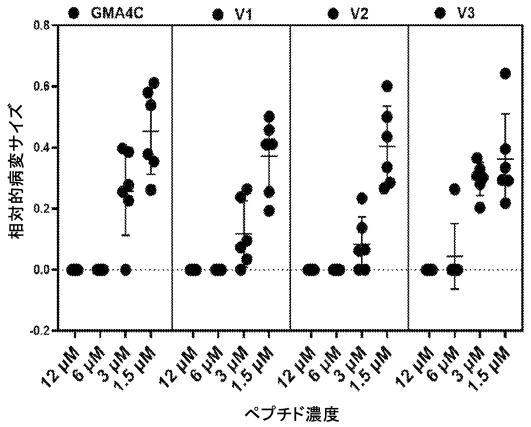


図1B

【図２】

起源	名称	ペプチド配列	配列番号
		C1 C2 C3 C4	
メディカゴ・サティバ(Medicago sativa)	MsDef1	GRCRDDFR-----CWCTKN-C	35
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef4	GRCRGFRRR----CFCTTH-C	8
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef5A	GACHRQGFGFA--CFCYKK-C	16
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef5B	GACHRQGIGFA--CFCKKK-C	41
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef6	GRCRGFRRR----CFCTRP-C	21
オレア・エウロパエア(Olea europaea)	OeDef1	GACLKNRHSKHYGCYCYYRHCY	24
オレア・エウロパエア(Olea europaea)	OeDef7	GLCRGFRRR---CFCTKH-C	27
ソルグム・ビコロル(Sorghum bicolor)	SbDef1	GYCSSRRQI----CKCTLQ-C	30
ニコチアナ・アラタ(Nicotiana alata)	NaD1	GHCSKILRR----CLCTKP-C	37
ラファヌス・サチブム(Raphanus sativum)	RsAFP2	GSCNYVFPAHK--CICYFP-C	38
ダーリア・メルキイ(Dahlia merckii)	DmAMP1	GACHVRNGKHM--CFCYFN-C	39
ヘウケラ・サングイネア(Heuchera sanguinea)	HsAFP1	GACHYQFPSVK--CFCTQN-C	40

図2

【図３】

起源	名称	ペプチド配列	配列番号
		C1 C2 C3 C4	
メディカゴ・サティバ(Medicago sativa)	MsDef1	GRCRDDFR-----CWCTKN-C	35
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef4	GRCRGFRRR----CFCTTH-C	8
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef5A	GACHRQGFGFA--CFCYKK-C	16
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef5B	GACHRQGIGFA--CFCKKK-C	41
メディカゴ・ツルンカツラ(Medicago truncatula)	MtDef6	GRCRGFRRR----CFCTRP-C	21
オレア・エウロパエア(Olea europaea)	OeDef1	GACLKNRHSKHYGCYCYYRHCY	24
オレア・エウロパエア(Olea europaea)	OeDef7	GLCRGFRRR----CFCTKH-C	27
ソルグム・ビコロル(Sorghum bicolor)	SbDef1	GYCSSRRQI----CKCTLQ-C	30
ニコチアナ・アラタ(Nicotiana alata)	NaD1	GHCSKILRR----CLCTKP-C	37
ラファヌス・サチブム(Raphanus sativum)	RsAFP2	GSCNYVFPAHK--CICYFP-C	38
ダーリア・メルキイ(Dahlia merckii)	DmAMP1	GACHVRNGKHM--CFCYFN-C	39
ヘウケラ・サングイネア(Heuchera sanguinea)	HsAFP1	GACHYQFPSVK--CFCTQN-C	40
マルス・バッカタ(Malus baccata)		GKCSLLTRT----CMCTKK-C	94
トリチカム・ディコッコイデス(Triticum dicoccoides)		GKCDHRR------CVCTKG-C	96
ピルス(Pyrus)sp.クロス		GHCSVLTRA----CVCTKK-C	97
セサマム・インディクム(Sesamum indicum)		GSCKGFLLR----CICFKD-C	104
バニラ・プラニフォリア(Vanilla planifola)		GHCSRREQHKIF CIC	108
ブラキポディウム・ディスタチヨン(Brachypodium distachyon)		GNCDGAVRR----CKCSRE-C	112
セタリア・イタリカ(Setaria italica)		GFCKGFFHRE---CMCTKD-C	121
セタリア・イタリカ(Setaria italica)		GECRFHGGLLRR-CFCNKL-C	122
ガンマ-コアコンセンサス1		GXCXXXXXXXX-C	9
ガンマ-コアコンセンサス2		GXCXXXXXXXXXC	10
Mod.ガンマ-コアコンセンサス5		GXCXXXXXXX---X	45
Mod.ガンマ-コアコンセンサス8		GXCXXXXXXXXX	46
Mod.ガンマ-コアコンセンサス1		GXCXXXXXXX--XXX	33
Mod.ガンマ-コアコンセンサス2		GXCXXXXXXXX-XXX	34
Mod.ガンマ-コアコンセンサス11		GXCXXXXXXX--XXX	51
Mod.ガンマ-コアコンセンサス12		GXCXXXXXXXXXXXX	52

図3

【図４】

種（分離株）	分離株番号	GMA4C_V1A 100%	GMA4C_V2A 100%	GMA4C_V4A 100%	GMA4C_V5A 100%	フルコナゾール 100%	ポリコナゾール 100%
C.パラプシロシス(Caparapsilosis)	ATCC 22019	4	8	8	8	2	---
C.クルーゼイ(Cdrusei)	ATCC 6258	8	16	8	8	64	---
P.パストリアニ(Ppastorianii)	MYA-363	4	8	8	4	16	0.125
カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)	SC5314	8	16	8	16	>64	---
	ATCC 90028	8	16	8	16	4	---
カンジダ・アウリス(Candida auris)	CJA3	8	16	8	8	1	---
	D117-47	8	16	8	16	>64	---
	D117-48	8	16	8	16	8	---
	D117-46	8	16	8	16	>64	---
アスペルギルス・フミガツス(Aspergillus fumigatus)	AF293	32	32	16	32	>64	0.5
	D115-106	>32	>32	16	>32	---	>16
	D115-116	>32	>32	32	>32	---	4
フザリウム(Fusarium)	F.ビチチシスボルタム(F.oxysporum)	4	8	8	8	---	4
	F.ビチチシスボルタム(F.oxysporum)	4	16	8	16	---	4
	F.ソラニ(F.solani)	4	8	8	8	---	>16
コクシジオイデス(Coccidioidesfen)	Cocci1	8	8	4	2	16	---
	Cocci2	4	16	16	16	64	---
	D177-143	8	16	16	16	16	---

図4

【図５Ａ】

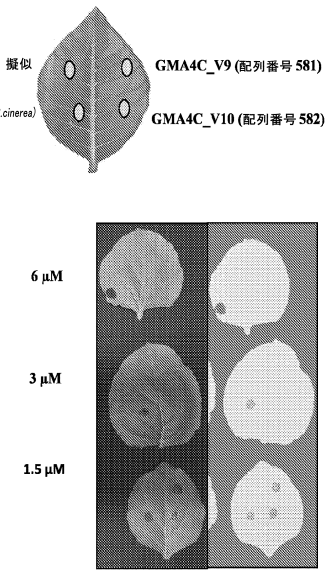


図5A

【図５Ｂ】

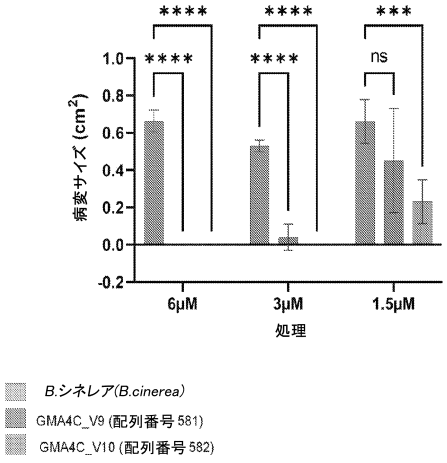


図 5B

【図６Ａ】

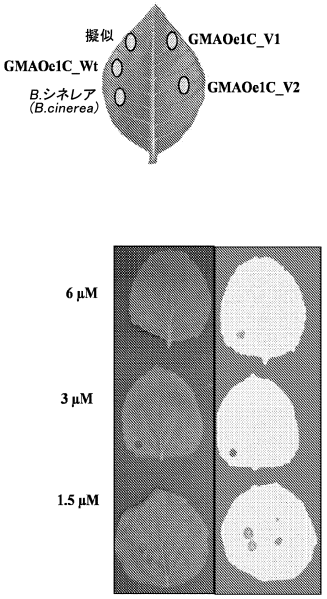


図6A

【図６Ｂ】

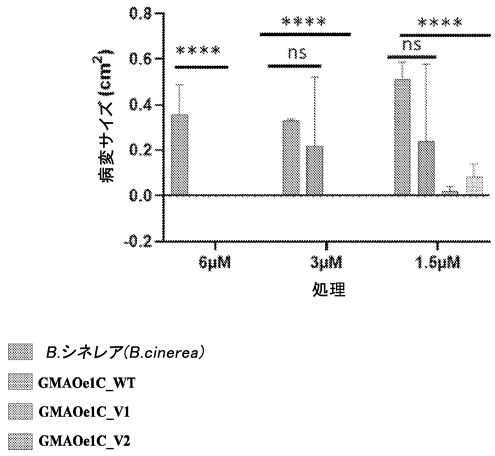


図6B

【図７Ａ】

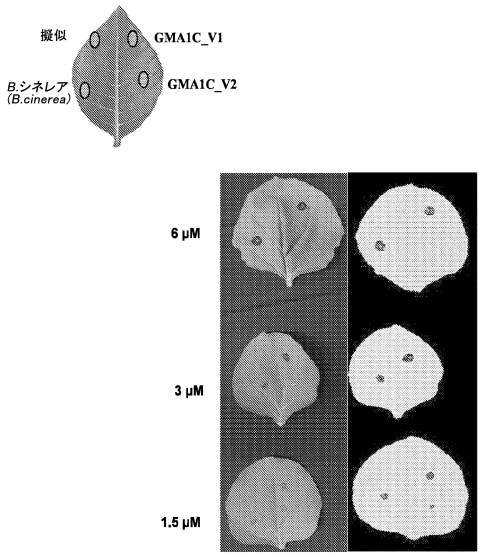


図7A

【図７Ｂ】

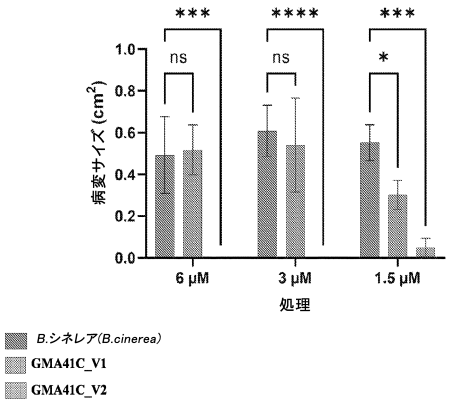


図7B

【配列表】

<u>２０２４５２８４０７０００００１．ａｐｐ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/72971

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A01N 37/46; A61K 38/10; A61K 38/03; C07K 7/08; C12N 15/82 (2022.01)
ADD.
CPC - INV. A61K 38/10; C12N 15/8279; A01N 37/46; A61K 38/03; C07K 7/08
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/156457 A1 (DONALD DANFORTH PLANT SCIENCE CENTER) 14 September 2017; paragraphs [0006], [0079], [0081]; Claim 4	1-29
A	US 2006/0026710 A1 (ALI, HS et al.) 02 February 2006; abstract; page 36, SEQ ID NO: 50	1-29
A	US 2003/0217382 A1 (ANDERSON, MA et al.) 20 November 2003; paragraphs [0014], [0018], [0048]-[0051], [0065]; Table 1	1-29
A	(SHA, AH ET AL.). "Defensin-like protein isoform 1 precursor [Glycine max]" . Genbank entry (online). National Center for Biotechnology Information. Retrieved From The Internet: [URL: Https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001336659.1]. 26 April 2021; pages 1-2	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 October 2022 (25.10.2022)	NOV 03 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/72971

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

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, claims 1-29, SEQ ID NO: 3 (peptide sequence).

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/72971

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, claims 1-29, SEQ ID NO: 3 (peptide sequence) are directed to antimicrobial peptides, polynucleotides encoding said peptides, and compositions, methods, devices, plants, plant genomes, and cells comprising said peptides and polynucleotides.

The peptides, polynucleotides, compositions, methods, devices, plants, plant genomes, and cells of Claims 1-2 (each in-part) and 3-29 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise a encompassing SEQ ID NO: 3 (exemplary peptide sequence selected in accordance with the specification). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass a peptide sequence indicated by the specification of the instant PCT application to be a preferred embodiment based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional peptide sequences, with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 4 (peptide sequence).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the peptide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a peptide, wherein said peptide does not comprise the corresponding full-length sequence of the defensin peptide of SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, or 41; a composition comprising said peptide and an agriculturally, pharmaceutically, or veterinary-practicably acceptable carrier, diluent, or excipient; a method for preventing or reducing crop damage by a plant pathogenic microbe comprising the step of contacting a plant, a plant seed, or other part of said plant with an effective amount of said composition; a medical device comprising said composition, wherein the device comprises at least one surface that is topically coated and/or impregnated with the composition; a plant part that is at least partly coated with said composition; a recombinant polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a sequence comprising said peptide, wherein the polynucleotide encoding the first antimicrobial peptide is operably linked to a polynucleotide comprising a promoter which is heterologous to the polynucleotide encoding the first antimicrobial peptide; a plant nuclear or plastid genome comprising a polynucleotide encoding a sequence comprising said peptide, wherein the polynucleotide is heterologous to the nuclear or plastid genome and wherein the polynucleotide is operably linked to an endogenous promoter of the nuclear or plastid genome; a cell comprising said recombinant polynucleotide; a plant comprising said recombinant polynucleotide; a plant part of said, wherein the plant part comprises the recombinant polynucleotide; and a method for producing plant seed that provides plants resistant to infection by a plant pathogenic microbe that comprises the steps of: (i) selfing or crossing said plant; and (ii) harvesting seed that comprises the recombinant polynucleotide of the plant from the self or cross, thereby producing plant seed that provide plants resistant to infection by a plant pathogenic microbe; these shared technical features are previously disclosed by WO 2017/156457 A1 to DONALD DANFORTH PLANT SCIENCE CENTER (hereinafter "Danforth'457") in view of WO 2020/146368 A1 to DONALD DANFORTH PLANT SCIENCE CENTER (hereinafter "Danforth'368")

Danforth'457 discloses a peptide (defensin polypeptide; claim 4), wherein said peptide does not comprise the corresponding full-length sequence of the defensin peptide of SEQ ID NO: 8, 16, 20, 23, 26, 29, 37, 38, 39, 40, or 41 (the polypeptide may have the sequence of SEQ ID NOs: 57, 111, or 112 of the Danforth'457 reference, none of which are identical to any of these sequences from the instant PCT application; claim 4); a composition comprising said peptide and an agriculturally, pharmaceutically, or veterinary-practicably acceptable carrier, diluent, or excipient (agricultural or pharmaceutical compositions comprising the polypeptide and a carrier; paragraph [00127]; claim 73); a method for preventing or reducing crop damage by a plant pathogenic microbe comprising the step of contacting a plant, a plant seed, or other part of said plant with an effective amount of said composition (agricultural or pharmaceutical compositions comprising the antifungal polypeptide, which can be applied directed to a plant; paragraphs [0003], [00127]; claim 74); a plant part that is at least partly coated with said composition (applying the composition to a plant part, which would result in a plant part that is at least partly coated with said composition; claim 74); a recombinant polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a sequence comprising said peptide (a recombinant polynucleotide encoding a polypeptide comprising a defensin polypeptide; claim 4), wherein the polynucleotide encoding the first antimicrobial peptide is operably linked to a polynucleotide comprising a promoter which is heterologous to the polynucleotide encoding the first antimicrobial peptide (wherein the polynucleotide is operably associated with at least one heterologous polynucleotide that promotes transcription, transcript abundance, translation, or a combination thereof (promoter); claim 4); a plant nuclear or plastid genome (a plant nuclear or plastid genome; claim 55) comprising a polynucleotide encoding a sequence comprising said peptide (a recombinant nucleic acid molecule encoding the polypeptide; claims 4, 55), wherein the polynucleotide is heterologous to the nuclear or plastid genome (a transgenic plant (polynucleotide is heterologous to the nuclear or plastid genome); claim 55) and wherein the polynucleotide is operably linked to an endogenous promoter of the nuclear or plastid genome (promoters induced by fungal infections in the plant (endogenous promoter); paragraph [0088]); a cell comprising said recombinant polynucleotide (a transformed host cell comprising the recombinant nucleic acid molecule encoding the polypeptide; claims 4, 39); a plant comprising said recombinant polynucleotide (a transgenic plant comprising the recombinant nucleic acid molecule encoding the polypeptide; claims 4, 41); a plant part of said plant, wherein the plant part comprises the recombinant polynucleotide (a transgenic plant part of the transgenic plant, wherein the plant part comprises the recombinant nucleic acid encoding the polypeptide; claims 4, 48); and a method for producing plant seed that provides plants resistant to infection by a plant pathogenic microbe that comprises the steps of: (i) selfing or crossing said plant; and (ii) harvesting seed that comprises the recombinant polynucleotide of the plant from the self or cross, thereby producing plant seed that provide plants resistant to infection by a plant pathogenic microbe (a method for producing transgenic plant seed that provide

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/72971

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

plants resistant to infection by a plant pathogenic fungus that comprises the steps of: (i) selfing or crossing the transgenic plant, and (ii) harvesting seed that comprises the recombinant nucleic acid molecule of the transgenic plant from the self or cross, thereby producing transgenic plant seed that provide plants resistant to infection by a plant pathogenic fungus; claim 60).

Danforth'457 does not disclose a medical device comprising said composition, wherein the device comprises at least one surface that is topically coated and/or impregnated with the composition.

Danforth'368 discloses a medical device comprising said composition, wherein the device comprises at least one surface that is topically coated and/or impregnated with the composition (Medical devices comprising the devices and any of the previously identified compositions, wherein the device comprises at least one surface that is topically coated and/or impregnated with any of the compositions are provided; paragraph [0022]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the disclosure of Danforth'457 to incorporate a medical device comprising said composition, wherein the device comprises at least one surface that is topically coated and/or impregnated with the composition, as taught by Danforth'368, as Danforth'457 discloses an antimicrobial peptide, Danforth'368 discloses a medical device coated with an antimicrobial peptide, and this combination would provide the capability of using the antimicrobial peptide to prevent microbial growth on surfaces of the medical device.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the combination of the Danforth'457 and Danforth'368 references, unity of invention is lacking.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/72971

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		4H045
A01H	*1/00 (2006.01)*	A01H	1/00	A	
A01H	*5/10 (2018.01)*	A01H	5/10		
A01H	*5/04 (2018.01)*	A01H	5/04		
A01H	*5/12 (2018.01)*	A01H	5/12		
A01H	*5/02 (2018.01)*	A01H	5/02		
A01H	*5/08 (2018.01)*	A01H	5/08		
A01H	*1/02 (2006.01)*	A01H	1/02	Z	
A61K	*38/16 (2006.01)*	A61K	38/16		
A61K	*38/10 (2006.01)*	A61K	38/10		
A61P	*31/00 (2006.01)*	A61P	31/00		
A61L	*29/08 (2006.01)*	A61L	29/08	100	
A01G	*7/00 (2006.01)*	A01G	7/00	604Z	
A01C	*1/08 (2006.01)*	A01C	1/08		
A01N	*37/46 (2006.01)*	A01N	37/46		
A01P	*3/00 (2006.01)*	A01P	3/00		

,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＷＩＮＤＯＷＳ

(72)発明者　テトリヤ， ミーナクシ
アメリカ合衆国 ミズーリ ６３１３２， セント ルイス， ノース ワーソン ロード ９７５， シー／オー ドナルド ダンフォース プラント サイエンス センター

Ｆターム（参考）　2B051 AA01 AB01 BA09 BB20
4B065 AA01X AA01Y AA72X AA72Y AA88X AA88Y AB01 AC14 CA24 CA43 CA44 CA47 CA53
4C081 AC08 AC09 BA14 CD112
4C084 AA02 BA01 BA18 BA19 CA13 MA55 MA56 MA58 MA60 MA63 MA66 NA14 ZB32
4H011 AA01 AA03 BB06 DA13 DD03
4H045 AA10 AA30 BA17 BA41 CA40 EA06 EA20 EA34 EA60 FA74