

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-518478
(P2025-518478A)

(43)公表日 令和7年6月17日(2025.6.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/415 (2006.01)	C 0 7 K	14/415	Z N A	4 B 0 1 8
A 2 3 L	33/105 (2016.01)	A 2 3 L	33/105		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/29 (2006.01)	C 1 2 N	15/29		4 H 0 1 1
A 0 1 H	5/00 (2018.01)	A 0 1 H	5/00	A	4 H 0 4 5
A 0 1 H	5/10 (2018.01)	A 0 1 H	5/10		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全48頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2024-565906(P2024-565906)			(71)出願人	524407152
(86)(22)出願日	令和5年5月10日(2023.5.10)				カボス ナチュラルズ エヌバイ
(85)翻訳文提出日	令和6年12月18日(2024.12.18)				CABOSSE NATURALS NV
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/062397				ベルギー国 1 5 0 0 ハレ ブリュッセ
(87)国際公開番号	WO2023/217847				ルセステーンヴェーク 4 5 0
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)			(74)代理人	100147485
(31)優先権主張番号	22172622.7				弁理士 杉村 憲司
(32)優先日	令和4年5月10日(2022.5.10)			(74)代理人	230118913
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)				弁護士 杉村 光嗣
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100119079
	最終頁に続く				弁理士 伊藤 佐保子
				(72)発明者	ガビ コップ
					ベルギー国 1 5 0 0 ハレ ブリュッセ
					ルセステーンヴェーク 4 5 0
				(72)発明者	ヘルウィグ ベルナエルト
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗菌活性を有するペプチド

(57)【要約】
本発明は、ペプチドを対象とする。前記ペプチドは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2 に対して少なくとも95%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する。本発明は、また、前記ペプチドを含む組成物および特定の用途を開示する。
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO. 1 によるアミノ酸配列、SEQ ID NO. 2 と 98 % 以上の配列同一性を示すアミノ酸配列、または SEQ ID NO. 2 と最大で 2 つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する、ペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドは、SEQ ID NO. 1 または SEQ ID NO. 2 によるペプチドである、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

前記ペプチドは、その N 末端にシグナルペプチドを含む、請求項 1 または 2 に記載のペプチド。 10

【請求項 4】

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

【請求項 5】

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

【請求項 6】

前記活性は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する活性であるか、ならびに／または真菌に対する活性であり、前記真菌は好ましくは菌糸真菌 (hyphal fungi) および酵母である、請求項 5 に記載のペプチド。 20

【請求項 7】

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

【請求項 8】

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

【請求項 9】

前記ペプチドは、アフィニティタグを備える、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のペプチド。 30

【請求項 10】

SEQ ID NO. 1 もしくは SEQ ID NO. 2 と 95 % 以上の配列同一性を示すペプチド、または SEQ ID NO. 1 もしくは SEQ ID NO. 2 と最大で 5 つのアミノ酸が異なるペプチドと、賦形剤とを有する、組成物。

【請求項 11】

前記ペプチドは、SEQ ID NO. 3 と 95 % 以上の配列同一性を示すシグナルペプチド、または SEQ ID NO. 3 による配列を有するシグナルペプチドを含む、請求項 10 に記載の組成物。 40

【請求項 12】

前記組成物は液体、半固体、固体、もしくはガス状の組成物であり、および／または前記組成物は、剤形が、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、エアロゾル、ペースト、シロップ、懸濁液、乳濁液、もしくは溶液である、請求項 10 または 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

治療用のペプチドまたは組成物であって、SEQ ID NO. 1 もしくは SEQ ID NO. 2 と 95 % 以上の配列同一性を示すペプチド、または SEQ ID NO. 1 もしくは SEQ ID NO. 2 と最大 5 以下のアミノ酸が異なるペプチドあるいは請求項 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を示すシグナルペプチド、またはSEQ ID NO. 3による配列を有するシグナルペプチドを含む、請求項13に記載の治療用のペプチドまたは組成物。

【請求項15】

細菌感染症および／または真菌感染症の治療を必要とする対象において使用するペプチドまたは組成物であって、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なる、ペプチドあるいは請求項10～12に記載の組成物。

【請求項16】

前記ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を示すシグナルペプチド、またはSEQ ID NO. 3による配列を有するシグナルペプチドを含む、請求項15に記載の用途のペプチドまたは組成物。

【請求項17】

前記対象はヒトまたは動物である、請求項15～16に記載の用途のペプチドまたは組成物。

【請求項18】

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチドの使用、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大5以下のアミノ酸が異なるペプチドの使用、あるいは請求項10～11に記載の組成物の使用であって、作物保護における飼料もしくは食品添加物としての使用、除染剤としての使用、防腐剤としての使用、または化粧用途における使用。

【請求項19】

前記ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を示すシグナルペプチド、またはSEQ ID NO. 3による配列を有するシグナルペプチドを含む、請求項18に記載の使用。

【請求項20】

前記ペプチドまたは前記組成物は、植物における病原体の防除に使用されるペプチドまたは組成物であって、前記植物は好ましくは作物である、請求項18～19のいずれかに記載の使用。

【請求項21】

前記病原体は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または真菌の群から選択される、請求項20に記載の使用。

【請求項22】

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大5以下のアミノ酸が異なるペプチドを得る方法であって、前記ペプチドはリコンビナントペプチド、合成ペプチド、またはテオブロマカカオから抽出もしくは沈殿したものである、方法。

【請求項23】

前記ペプチドはカカオ豆スラリーから抽出される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチドのコード配列、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるペプチドのコード配列を含むベクターであって、任意に、N末端にシグナルペプチドの配列を含むベクターにおいて、前記シグナルペプチドの配列はSEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を有し、前記ベクターは発現系における前記ペプチドの発現を可能にするように設計されている、ベクター。

【請求項25】

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

10

20

30

40

50

【請求項 26】

請求項 25 に記載のトランスジェニック植物を生産する方法であって、前記方法は、前記ペプチドをエンコードする核酸を植物細胞に導入すること、それにより前記ペプチドを発現する形質転換植物細胞を作製し、前記形質転換植物細胞をトランスジェニック植物に再生する工程を含む、方法。

【請求項 27】

請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のペプチドまたは組成物によりコーティングされた、植物の種子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

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

20

【0003】

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

【0004】

抗菌ペプチド (AMPs) は、動物、植物、昆虫、および微生物中に存在する多様な天然化合物群である。これらのペプチドは、(他の) 微生物に対する防御を担っており、そのため、化学防腐剤の代替品としてさらに利用することができる。しかし、これらのペプチドは、自然界における入手性が乏しく、生産コストが高いこと、安定性が低いこと、および適切な治療製品への配合が複雑であることから、植物、ヒト、および／または動物の微生物蔓延治療における使用は今日まで限定されている。したがって、作物保護における抗菌ペプチドの使用ならびにヒトおよび獣医学における治療目的での抗菌ペプチドの使用も、まだ限られている。

30

【0005】

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

40

【0006】

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

50

【0007】

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

【0008】

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

【0009】

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

【0010】

エクアドルは上品な風味のココアの最も重要な生産国であり、世界の生産量のおよそ50%を占める。エクアドルで生産される上品な風味のココアの種類は、主に*Nacional* (しばしば*National*または*Arriba*とも言われる) 種に属する。エクアドルでは、香り高く伝統的な*Nacional cocoa*に加えて、CCN-51というココアクローン (*cocoa clone*) が1960年代から栽培されている。*Nacional*とは異なり、CCN-51は芳香が弱いため、バルクココアタイプ (*bulk cocoa type*) とされている。しかし、CCN-51は気候条件の変化への耐性が高く、様々な病原菌に対する抵抗力があり、他のココア種よりも収穫量が多い。そのため、CCN-51ハイブリッドは、エクアドルの農家の栽培に非常に人気がある。米国特許第2004/0172683号には、ココア豆の種子から得られる、ココア風味の要因となるポリペプチドについて記載されている。

【0011】

ココア風味増強剤としてココアやチョコレートの製造に使用されるビシリン由来ペプチドは、国際公開第2002/086125 A2号により知られている。

【0012】

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

【発明の概要】

【0013】

本発明およびその各実施形態は、上述した1つまたは複数のデメリットに対する解決策の提供に貢献する。この目的のため、本発明は、請求項1に記載の、抗菌活性を有するペ

10

20

30

40

50

プチドに関する。より具体的には、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチドを提供する。このペプチドは、テオブロマカカオから得られる、または組換えもしくは合成的に産生されるものであり、驚くべきことに、広範な病原体に対して抗細菌活性および／または抗真菌活性を有することが見出された。このペプチドの好ましい実施形態は、請求項2～9のいずれかに示される。

【0014】

第2の態様において、本発明は、請求項10に記載のペプチドを含む組成物に関する。この組成物の好ましい実施形態は、請求項11および12に示される。

【0015】

第3の態様において、本発明は、請求項13に記載の治療目的のペプチドの使用に関する。この使用における好ましい実施形態は、請求項14～21のいずれかに示される。より詳細には、このペプチドは、ヒト、動物、または植物における、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／もしくは真菌の感染に使用され、当該真菌は好ましくは菌糸真菌(hyphal fungi)または酵母である。

【0016】

第4の態様において、本発明は、請求項22および23に記載の当該ペプチドを得る方法に関する。

【0017】

第5の態様において、本発明は、当該ペプチドの発現を可能にする、当該ペプチドのコード配列を含む請求項24に記載のベクターに関し、請求項25に記載のトランスジェニック植物、および請求項26に記載のトランスジェニック植物を得る方法に関する。

【0018】

最後の態様において、本発明は、請求項27に記載の、当該ペプチドでコーティングされた種子に関する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】二次元(2D)SDSポリアクリルアミドゲル上で分離した後のココア豆から分離したタンパク質を示す図である。横方向の間隔は、等電点(pI、pH4-7)に基づき、縦方向の間隔は、その分子量に基づく。ハイライトしたスポットを、図2Aに表したように、ペプチドマスフィンガープリンティングで分析した。左の数字は、参照マーカーの分子量(kDa)を示す。

【図2】MALDI-TOF分析で測定したペプチドマスフィンガープリンティングフラグメントの検出および配列位置の代表的なスキームを示す図である。図2(A)において、下線を引いたアミノ酸配列は、ココアタンパク質の2D SDSポリアクリルアミドゲルから得られた、SEQ ID NO. 1によるペプチドのトリプシン消化産物として同定されたものである。図2Bの下線を引いたアミノ酸配列は、SDSポリアクリルアミドゲルから得たSEQ ID NO. 2によるリコンビナントペプチドのトリプシン消化産物として同定されたものである。

【図3】SEQ ID NO. 2によるペプチドを含むサンプルのLC-MS結果を示す図である。検出されたペプチドの質量は、非還元サンプル(図3A)および還元サンプル(図3B)の両方において15.3 kDaであった。

【図4】乳酸脱水素酵素(LDH)リリースアッセイによる、Candida albicansおよびHaCat細胞に対する、SEQ ID NO. 2によるペプチドの細胞毒性を示す図である。各実験は、ペプチドを異なる濃度で用いて1時間培養した10,000個の細胞を用いて行った。

【発明の詳細な説明】

【0020】

本発明は、医療用または製薬学的用途の有効成分としての、ペプチドまたは当該ペプチドを含む組成物に関する。本発明において、ペプチドは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2によるアミノ酸配列を有する。さらに、本発明は、ペプチドの使

10

20

30

40

50

用、ペプチドを得る方法、およびペプチドの発現を可能にするベクターに関する。

【0021】

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

【0022】

本明細書において、以下の用語は以下の意味を有する。

【0023】

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

10

【0024】

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

【0025】

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

20

【0026】

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

30

【0027】

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

【0028】

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

40

【0029】

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

【0030】

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

50

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

【0031】

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

【0032】

本明細書で使用される、ココア豆「スラリー」は、ココアバターを分離した後の粉碎したココアニブマス (cocoa nib mass) と定義する。

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

第1の態様において、本発明はペプチドに関し、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2にと80%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する。好ましくは、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2と、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上、または、より好ましくは100%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する。好ましい実施形態において、ペプチドは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2と95%以上の同一性を示すアミノ酸配列を有する。

【0036】

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

10

20

30

40

50

nlm.nih.gov/)で公開されている。

【0037】

別の実施形態では、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2の配列と、最大で24つ、より好ましくは最大で23つ、よりさらに好ましくは最大で22つ、よりさらに好ましくは最大で22つ、よりさらに好ましくは最大で21つ、よりさらに好ましくは最大で20つ、よりさらに好ましくは最大で19つ、よりさらに好ましくは最大で18つ、よりさらに好ましくは最大で17つ、よりさらに好ましくは最大で16つ、よりさらに好ましくは最大で15つ、よりさらに好ましくは最大で14つ、よりさらに好ましくは最大で13つ、よりさらに好ましくは最大で12つ、よりさらに好ましくは最大で11つ、よりさらに好ましくは最大で10つ、よりさらに好ましくは最大で9つ、よりさらに好ましくは最大で8つ、よりさらに好ましくは最大で7つ、よりさらに好ましくは最大で6つ、よりさらに好ましくは最大で5つ、よりさらに好ましくは最大で4つ、よりさらに好ましくは最大で3つ、よりさらに好ましくは最大で2つ、よりさらに好ましくは最大で1つのアミノ酸残基が異なる。

10

【0038】

一実施形態において、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 1によるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO. 2と98%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列もしくはSEQ ID NO. 2と最大2以下のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する。

【0039】

あるいは、本発明のペプチドは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2による配列同一性を有する。

20

【0040】

本明細書で考慮されるペプチドのアミノ酸配列変異体は、置換変異体、挿入変異体、または欠失変異体あることができる。欠失変異体は、ペプチドにおいて、機能にとって重要でない可能性のある1つまたは複数の残基を欠く。置換変異体は、一般的に、ペプチド内の1つまたは複数の部位に代替のアミノ酸を含み、タンパク質分解開裂に対する安定性等、ポリペプチドの1つまたは複数の特性を調整するように設計することができる。置換は、好ましくは保存的置換であり、すなわち、あるアミノ酸が類似の大きさならびに類似の側鎖もしくは類似の置換基を持つアミノ酸と置換されていることである。保存的置換は当該技術分野では公知であり、例えば、アラニンからグリシン、バリン、またはロイシンへの変化；アルギニンからリシンへの変化；アスパラギンからグルタミンへの変化；システインからメチオニンへの変化；グルタミンからアスパラギンへの変化；グルタミン酸からアスパラギン酸への変化；グリシンからプロリンへの変化；ヒスチジンからグルタミン、チロシン、アルギニン、リシン、アスパラギンまたはシステインへの変化；イソロイシンからロイシンまたはバリンへの変化；ロイシンからバリンまたはイソロイシンへの変化；リシンからアルギニンへの変化；フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニンへの変化；セリンからスレオニンへの変化；スレオニンからセリンへの変化；トリプトファンからフェニルアラニンへの変化；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへの変化；バリンからイソロイシンまたはロイシンへの変化等がある。

30

【0041】

好ましくは、本発明のペプチドは、テオブロマカカオに由来するか、またはテオブロマカカオから単離される。より詳細には、本発明のペプチドは、テオブロマカカオのビシリンタンパク質のN末端領域に由来する。ビシリンは、いくつかの植物種に存在し、植物種に特徴づけられる貯蔵タンパク質であり、例えば、Ananas comosus、Arachis hypogaea、Beta vulgaris、Capsicum annuum、Capsicum chinense、Carya illinoensis、Chenopodium quinoa、Corchorus olitorius、Cucurbita maxima、Fragaria vesca、Glycine max、Gossypium arboreum、Herrania umbratica、Hordeum vulgare、Jatropha curcas、Jugla

40

50

10

20

30

40

50

50

50

あるいは、限定するものではないが、ペプチドは、ヒスチジンとグルタミン残基とが交互に並ぶHQTAG（HQHQHQ）、ヒスチジンとアルパラギンとが交互に並ぶHNタグ（HNHNHNHNHNHN）、HATタグ（KDHLIHNVHKEEHAHAHNK）、ALFAタグ（SRLEEEELRRRLTE）、Aviタグ（GLNDIFEAQKIEWHE）、Cタグ（EPEA）、カルモジュリンタグ（KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL）、ポリグルタミン酸タグ、ポリアルギニンタグ、Eタグ（GAPVPYPDPLEPR）、FLAGタグ（DYKDDDDDK）、HAタグ（YPYDVPDYA）、Mycタグ（EQKLISEEDL）、NEタグ（TKENPRSNQEESYDDNES）、Rho1D4タグ（TETSQVAPA）、Sタグ、SBPタグ

(DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP)、Streptタグ(WSHPQFEK)等によりタグ化することができる。

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

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

【0051】

限定するものではないが、本発明のペプチドは、以下を含む群から選択される真菌に対して活性がある。Ajellomyces属菌、Aspergillus属菌、Basidiobolus属菌、Blastomyces属菌、Candida属菌、Coccidioides属菌、Conidiobolus属菌、Cryptococcus属菌、Emmonsia属菌、Histoplasma属菌、Hanseniaspora属菌、Lacazia属菌、Paracoccidioides属菌、Pneumocyst

is 属菌、Sporothrix 属菌、Stachybotrys 属菌、Talaromyces 属菌、Acrocallymma 属菌、Aecidium 属菌、Albonectria 属菌、Allodus 属菌、Alternaria 属菌、Amphobotrys 属菌、Apiosporina 属菌、Armillaria 属菌、Blumeria 属菌、Botryotinia 属菌、Botrytis 属菌、Ceratosystis 属菌、Colletotrichum 属菌、Cryptosporiopsis 属菌、Exobasidium 属菌、Fusarium 属菌、Hypocrea 属菌、Leptosphaeria 属菌、Magnaporthe 属菌、Melampsora 属菌、Meyerozyma 属菌、Monilinia 属菌、Mycosphaerella 属菌、Microsphaera 属菌、Mucor 属菌、Penicillium 属菌、Pichia 属菌、Phytophthora 属菌、Saccharomyces 属菌、Sporobolomyces 属菌、Plasmodiophora 属菌、Podosphaera 属菌、Puccinia 属菌、Pythium 属菌、Rhizoctonia 属菌、Sclerotinia 属菌、Septoria 属菌、Taphrina 属菌、Thanatephorus 属菌、Torulaspora 属菌、Uromyces 属菌、Ustilago 属菌、Venturia 属菌、または Verticillium 属菌等。

10

【0052】

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

20

【0053】

ある実施形態において、上記組成物は、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すか、あるいはSEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2による配列と最大で5つのアミノ酸が異なるペプチドと、賦形剤とを含む。

【0054】

本明細書に記載の組成物のいくつかの実施形態において、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を有するシグナルペプチドを含む、またはSEQ ID NO. 3による配列を有する。

【0055】

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

30

40

【0056】

いくつかの実施形態において、組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む。好みに応じて、当該賦形剤は、フィラー、バインダー、崩壊剤、甘味剤、コーティング剤、潤滑剤 (lubricants)、および／または滑剤 (glidants) から選択される。希釈剤またはフィラーは、固体組成物の体積を増加させ、組成物を含む剤形を、患者および介護者が扱いやすくすることができる。本発明による錠剤に適した希釈剤としては、例えば、結晶セルロース (例えば、Avicel (登録商標))、微細セルロース、ラクトース、デンプン、アルファ化デンプン、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、砂糖、デキストレート類、デキストリン、デキストロース、第二リン酸カルシウム二水和物、リ

50

ン酸三カルシウム、カオリン、炭酸マグネシウム、酸化マグネシウム、マルトデキストリン、マンニトール、ポリメタクリレート（例えば、Eudragit（登録商標））、塩化カリウム、粉末セルロース、塩化ナトリウム、ソルビトール、タルク等がある。

【0057】

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

10

【0058】

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

20

【0059】

滑剤を添加することで、非圧縮固形組成物の流動性を改善し、投与精度を向上させることができる。滑剤として機能する賦形剤としては、コロイド状二酸化ケイ素、三ケイ酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、粉末セルロース、デンプン、タルク、リン酸三カルシウム等がある。

【0060】

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

30

【0061】

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

40

【0062】

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

【0063】

ある実施形態、特に組成物が農業用である場合において、当該賦形剤は、農業適合性賦形剤である。当該「農業適合性担体」または「農業適合性賦形剤」は、溶媒と見なすこと

50

ができ、一般に不活性であるが、農業において許容できるものである必要がある。したがって、語句「農業適合性」は、耕作地で日常的に使用しても、生産者の植栽設備に干渉せず、作物の発育または耕作地域における所望の生態学的バランスに悪影響を及ぼすことのない物質を意味する。

【0064】

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

【0065】

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

【0066】

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

【0067】

本明細書に記載のペプチドは、 $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.1 \sim 45 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.1 \sim 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.1 \sim 35 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ま

しくは0.1~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.1~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または、好ましくは0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で組成物中に配合することができる。

【0068】

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

【0069】

別の実施形態では、組成物は0.1重量%以上のペプチドを含み、より好ましくは、0.5重量%以上、1重量%以上、2重量%以上、3重量%以上、4重量%以上、5重量%以上、6重量%以上、7重量%以上、8重量%以上、9重量%以上、10重量%以上、11重量%以上、12重量%以上、13重量%以上、14重量%以上、15重量%以上、16重量%以上、17重量%以上、18重量%以上、19重量%以上、20重量%以上、21重量%以上、22重量%以上、23重量%以上、24重量%以上、25重量%以上、26重量%以上、27重量%以上、28重量%以上、29重量%以上、30重量%以上、31重量%以上、32重量%以上、33重量%以上、34重量%以上、35重量%以上、36重量%以上、37重量%以上、38重量%以上、39重量%以上、40重量%以上、41重量%以上、42重量%以上、43重量%以上、44重量%以上、45重量%以上、46重量%以上、47重量%以上、48重量%以上、49重量%以上、50重量%以上、51重量%以上、52重量%以上、53重量%以上、54重量%以上、55重量%以上、56重量%以上、57重量%以上、58重量%以上、59重量%以上、60重量%以上、61重量%以上、62重量%以上、63重量%以上、64重量%以上、65重量%以上、66重量%以上、67重量%以上、68重量%以上、69重量%以上、70重量%以上、71重量%以上、72重量%以上、73重量%以上、74重量%以上、75重量%以上、76重量%以上、77重量%以上、78重量%以上、79重量%以上、80重量%以上、81重量%以上、82重量%以上、83重量%以上、84重量%以上、85重量%以上、86重量%以上、87重量%以上、88重量%以上、89重量%以上、90重量%以上、91重量%以上、92重量%以上、93重量%以上、94重量%以上、95重量%以上、96重量%以上、97重量%以上、98重量%以上、99重量%以上または99.5重量%以上のペプチドを含む。

【0070】

第3の態様において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、治療的使用に適している。

【0071】

ある実施形態において、治療的使用のためのペプチドまたは組成物は、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すか、またはS

10

20

30

40

50

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有するペプチドを含む。

【0072】

さらなる実施形態において、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を有するシグナルペプチドを含むか、またはSEQ ID NO. 3による配列を有する。

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

ある実施形態において、それを必要とする対象における細菌感染および／または真菌感染の治療に使用するためのペプチドまたは組成物は、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すか、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2による配列と最大で5アミノ酸異なるペプチドを含む。

【0076】

さらなる実施形態において、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を有するシグナルペプチドを含む、またはSEQ ID NO. 3による配列を有する。

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

別の実施形態において、本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、飼料または食品添加物として作物保護における使用、防腐剤および／または除染剤としての医薬品用途のための使用に適している。

【0080】

10

20

30

40

50

ある実施形態において、当該ペプチドまたはペプチド組成物は、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なる配列を有するペプチドを含む。

【0081】

さらなる実施形態において、当該ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を有するシグナルペプチドを含むか、またはSEQ ID NO. 3による配列を有する。

【0082】

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

【0083】

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

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

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

【0087】

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

10

20

30

40

50

pida、Bertholletia excelsea、Beta vulgaris
 、Brassica属、Cadaba farinosa、Camellia sine
 nsis、Canna indica、Cannabis sativa、Capsic
 um属、Carex elata、Carica papaya、Carissa ma
 crocarpa、Carya属、Carthamus tinctorius、Cas
 tanea属、Ceiba pentandra、Cichorium endivia
 、Cinnamomum属、Citrullus lanatus、Citrus属、C
 ocos属、Coffea属、Colocasia esculenta、Cola属、
 Corchorus属、Coriandrum sativum、Corylus属、C
 rataegus属、Crocus sativus、Cucurbita属、Cucu
 mis属、Cynara属、Daucus carota、Desmodium属、Di
 mocarpus longan、Dioscorea属、Diospyros属、Ec
 hinochloa属、Elaeis属、Eleusine coracana、Era
 grostis tef、Erianthus属、Eriobotrya japoni
 ca、Eucalyptus属、Eugenia uniflora、Fagopyru
 m属、Fagus属、Festuca arundinacea、Ficus cari
 ca、Fortunella属、Fragaria属、Ginkgo biloba、G
 lycine属、Gossypium hirsutum、Helianthus属、H
 emerocallis fulva、Hibiscus属、Hordeum属、Ipo
 moea batatas、Juglans属、Lactuca sativa、Lat
 hyrus属、Lens culinaris、Linum usitatissimu
 m、Litchi chinensis、Lotus属、Luffa acutang
 ula、Lupinus属、Luzula sylvatica、Lycopersico
 n属、Macrotyloma属、Malus属、Malpighia emargin
 ata、Mammea americana、Mangifera indica、Ma
 nihot属、Manilkara zapota、Medicago sativa、
 Melilotus属、Mentha属、Miscanthus sinensis、M
 omordica属、Morus nigra、Musa属、Nicotiana属、O
 lea属、Opuntia属、Ornithopus属、Oryza属、Panicum
 miliaceum、Panicum virgatum、Passiflora ed
 ulis、Pastinaca sativa、Pennisetum属、Persea
 属、Petroselinum crispum、Phalaris arundina
 cea、Phaseolus属、Phleum pratense、Phoenix属、
 Phragmites australis、Physalis属、Pinus属、Pi
 stacia vera、Pisum属、Poa属、Populus属、Prosopi
 s属、Prunus属、Psidium属、Punica granatum、Pyrus
 communis、Quercus属、Raphanus sativus、Rhe
 um rhabarbarum、Ribes属、Ricinus communis、R
 ubus属、Saccharum属、Salix属、Sambucus属、Secale
 cereale、Sesamum属、Sinapis属、Solanum属、Sorgh
 um bicolor、Spinacia属、Syzygium属、Tagetes属、
 Tamarindus indica、Theobroma cacao (テオブロマカ
 カオ)、Trifolium属、Tripsacum dactyloides、Tri
 ticosedale rimpai、Triticum属、Tropaeolum
 minus、Tropaeolum majus、Vaccinium属、Vicia属
 、Vigna属、Viola odorata、Vitis属、Zea mays、Zi
 zania palustris、Ziziphus属に属し、これらの子孫および雑種
 を含む。

10

20

30

40

50

【0088】

本明細書に記載のペプチドまたは組成物は、植物、植物の一部、または当該植物を構成

する基質もしくは当該植物の宿主となる基質への導入に適しており、これにより当該植物に病原体抵抗性または病害防除性を付与する。当該導入は、人為的であってもよい。

【0089】

ペプチドまたはその組成物を植物等に導入する方法としては、植物および／もしくは植物の一部ならびに／または当該植物を生育させる生育培地の処理、種子への接種、種子のコーティング、植物または植物の一部への直接接種、植物または植物の一部（例えば、穂）に噴霧または湿潤させること等が挙げられる。ペプチドまたは組成物が導入される植物の種類に応じて適切な方法を選択することができる。

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

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

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示されるペプチドを得るための方法に関し、ここで、当該ペプチドは、リコンビナントペプチド、合成ペプチド、またはテオブロマカカオから抽出もしくは沈殿したものである。

【0097】

ある実施形態において、本明細書に開示される方法は、SEQ ID NO. 1もしくは

10

20

30

40

50

はSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有するペプチドを得るために使用される。ここで、当該ペプチドは、リコンビナントペプチド、合成ペプチド、またはテオブロマカカオから抽出もしくは沈殿したものである。

【0098】

CCN-51テオブロマカカオという品種が、本発明のペプチドを高い水準で有し、したがって、好適な抽出技術および沈殿技術、次いで最適化されたクロマトグラフィー技術および従来公知の他の方法を使用して、CCN-51カカオ豆から本発明のペプチドを効率的に精製できることが見出された。したがって、本発明は、抗菌活性を示すペプチドの単離のための、CCN-51ココア豆、特に非発酵CCN-51ココア豆の直接的な価値化のための解決策を提供する。

10

【0099】

好ましい実施形態において、非発酵および／または発酵乾燥カカオ豆を使用して、本明細書に開示されるペプチドを抽出する。別の実施形態では、任意の形態のテオブロマカカオの組織／器官を抽出して、本発明のペプチドを得る。本発明の範囲から逸脱することなく、カカオポッドおよび／またはカカオ豆の外皮、葉、茎、および根を、本発明のペプチドの抽出のための植物材料として使用できると理解されたい。別の実施形態において、本明細書に開示されるペプチドは、任意の加工されたテオブロマカカオ材料から抽出または沈殿することができる。

20

【0100】

ある実施形態において、選択されたカカオ栽培農園から収集されたカカオ植物材料を使用して、本明細書に記載のペプチドを単離する。好ましくは、サンプルを4℃で保存し、さらなる処理を行う。あるいは、サンプルは、処理前に-80℃で保存する。

【0101】

ペプチドの抽出には、非発酵の、十分に乾燥した豆を使用することができる。通常、非発酵豆から、粘液質のパルプを好ましくは拭き取りにより除去する。滅菌メス、鉗子、および／またはその他適切な器具を用いて、種皮を剥離する。

【0102】

豆は、脂質が豊富であり、好ましい実施形態では、カカオ豆を脱脂してからペプチド抽出を行う。一実施形態では、挽いたカカオ豆をアセトン中で脱脂し、残渣の粉末豆を乾燥し、次いで水性バッファー中で抽出することができる。抽出中に非常に冷たいアセトンをゆっくりと添加することで、酵素の不活性化は低減される。

30

【0103】

ある実施形態では、カカオ豆を脱殻してから、ペプチド抽出を行う。脱殻した豆材料は、殻やパルプ等、これらに限定されない他のココアの部位と比較して、ペプチドの抽出性が最も良い。

【0104】

ココア豆は、適当なミル、グラインダー、または乳鉢と乳棒を使用して微粉碎する。使用する装置は、好ましくは、冷雰囲気、冷凍室により予冷するか、または液体窒素により冷却する。粉碎した粉末は、通常、4℃を超えない温度、好ましくは0℃を超えない温度、最も好ましくは-20℃で保存して、さらなる処理を行う。

40

【0105】

別の実施形態では、凍結された植物材料を使用して、本明細書に記載のペプチドを抽出する。全ての作業は0℃～4℃（すなわち、冷蔵庫、または氷上）で行う。抽出手順は迅速に行い、細胞の破壊時に放出される潜在的に有害な化合物および酵素への目的のタンパク質の暴露を最小限にする。

【0106】

ある実施形態では、液体窒素を組織に接触させることなく、カカオ豆を粉碎する。試料の凍結状態を確実に保つために、乳鉢／ミルおよび／または粉碎機を液体窒素の浅いプー

50

ル（例えば、標準的なポリスチレン製の箱の蓋の中）に置いてもよい。一度も凍結されていない材料を、氷冷バッファー中で直接粉碎してもよい。一実施形態では、組織ホモジナイザーを使用して、一度も凍結されていない非発酵のココア豆を粉碎する。別の実施形態では、酸で洗浄した砂を加え、ブレンダーまたは乳鉢と乳棒によりココア豆を粉碎する。混合時に発泡が問題となることがあるが、*n*-オクタノールまたは当該技術分野で知られている他の適切な有機溶媒を数滴添加することで、ある程度の制御を達成することができる。

【0107】

ある実施形態では、好ましくはpH8の抽出バッファーを使用して抽出を行う。バッファーは、単離されたペプチドの、pHおよびイオン強度の両方の観点からの安定性を維持する。使用されるバッファーの非限定的な例としては、N-2-ヒドロキシエチルピペラジンN-2-エタンスルホン酸（HEPES）、リン酸塩、2-（N-モルホリノ）-エタンスルホン酸（MES）、トリサミノメタン（TRIS）、TAEバッファー（トリス塩基、酢酸、およびEDTA）、TBE（トリス塩基、ホウ酸、およびEDTA）、あるいは、これらの混合物であって、アセトン、フェノールまたは他の適切な溶媒等の混合液中における混合物が挙げられる。当業者には、カカオの品種、抽出工程における発酵豆または非発酵豆の使用に応じて、バッファーの選択および種類は最適化されることを理解されたい。本発明の範囲から逸脱することなく、ペプチドの抽出には、当該技術分野において一般的に使用されている任意の適切なバッファーを採用することができる。植物材料および／またはココア豆の単位重量当たりの、抽出バッファーの使用量は、植物材料の種類およびペプチド濃度に依存する。本発明の一実施形態によれば、植物材料および／またはカカオ豆の重量に対するバッファー量の比率を高くする（例えば、10：1）ことにより、より良好な抽出を達成することができる。

【0108】

ある実施形態では、本明細書に記載のペプチドを抽出するプロセスにおいて、まず、サンプル抽出物を濃縮する。濃縮は、沈殿、適切なクロマトグラフィー技術、または当該技術分野で公知の任意の他の方法によって行うことができる。ある実施形態においては、10%～20%のグリセロール（v/v）を抽出バッファーに添加して、ペプチドの安定性を確保する。

【0109】

ある実施形態では、抽出バッファーに抗酸化剤を添加することで、ペプチドの酸化を防止し、遊離スルフヒドリル基の還元状態を維持し、フェノール等の他の成分の酸化を低減する。このような酸化防止剤の非限定的な例としては、ジチオスレイトール（DTT）、β-メルカプトエタノール、アスコルビン酸が挙げられ、状況によっては、亜ジチオン酸ナトリウムのような強力な還元剤が挙げられる。別の実施形態では、1つ以上の還元剤を使用することができ、限定はしないが、例えば、DTTとβ-メルカプトエタノールとを組み合わせ使用することができる。

【0110】

ある実施形態では、バッファーに洗浄剤を添加することで、膜の破壊と膜タンパク質の可溶化を促進する。いくつかの非限定的な例としては、ドデシル硫酸ナトリウム（例えば0.1～1.0%）、Tween 80（例えば0.1%～1%）、Triton X-100（例えば0.1%～1%）、3-〔（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ〕-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート（CHAPS）、オクチルグリコシド、またはこれらの混合物が挙げられる。当業者は、初期に経験的試験を行って、得られたピシリン（前駆体）ペプチドの抽出物中における濃度を最大にするための界面活性剤の最適な組み合わせを決定する必要があることを理解されたい。

【0111】

ポリビニルポリピロリドン（PVPP）、可溶性ポリビニルピロリドン（PVPP）、および／またはポリエチレングリコール等の保護剤を使用して、本発明の抗菌ペプチドヘタニン等のポリフェノールが結合することを防止することができる。保護剤はこれらに限

定されないことを理解されたい。

【0112】

さらに、抗菌ペプチドの抽出中に任意のプロテイナーゼ阻害剤をバッファーに添加して、抽出後のタンパク質の分解を制御することができる。プロテイナーゼ阻害剤のいくつかの非限定的な例は、フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSE）、ウシ膵臓トリプシン阻害剤（アプロチニンとしても知られている）、4-（2-アミノエチル）-ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、1,10-フェナントロリン-トランス-エポキシスクシニル-L-ロイシル-アミド-（4-グアニジノ）ブタン、2,2-ビピリジル-トランス-エポキシスクシニル-L-ロイシル-アミド-（4-グアニジノ）ブタン、アンチペインおよびロイペプチン、ペプスタチン、アスパラギン酸プロテイナーゼ、市販のプロテイナーゼ阻害剤（例えば、Roche社から錠剤の形態で提供されているもの、Sigma社から溶液として提供されているもの）、植物用に調整したこれらの阻害剤のカクテルを含むもの等が挙げられる。

10

【0113】

特に好ましい実施形態では、アルカリ性環境下で、酸化防止剤としてジチオスレイトール（DTT）、および陰イオン界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を添加したTris-HClバッファーを使用して、任意にプロテイナーゼ阻害剤カクテルの存在下で、抽出を行う。

【0114】

抽出／インキュベーション時間は、抽出混合物、および植物材料中の抗菌ペプチド濃度に基づいて最適化し、15分～48時間、好ましくは30分以上、最も好ましくは1時間以上、さらに好ましくは5時間以下、最も好ましくは3時間以下の範囲で変更することができる。抽出温度は、40℃を超過しないことが好ましく、室温（23℃）を超過しないことが好ましく、15℃を超過しない温度で抽出を行うことが最も好ましい。

20

【0115】

ある実施形態では、本明細書に開示されるペプチドは、ココア豆から単離することができる。ココア豆は、発酵または非発酵であることができる。別の、またはさらなる実施形態では、これらは乾燥および／または非乾燥カカオ豆であることができる。好ましい実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、非発酵の乾燥カカオ豆から単離することができる。ある実施形態では、ココア豆を粉碎し、殻を除去し、ニブをエクスペラーで圧搾する。これにより、バターとスラリーとの混合物が得られる。スラリーは、いくつかの実施形態においてペプチド抽出に使用する。

30

【0116】

他のカカオ植物部位をペプチド抽出に使用する実施形態では、抽出物中のタンパク質を安定化させるために、緩衝剤、酸化防止剤、プロテアーゼ阻害剤等の多数の保護剤を使用する。抽出溶媒の量は、タンパク質抽出物の希釈を避けるため、適度な最小限に抑える。カカオの果実は酸性で、ポリフェノールを多く含むため、pHを維持するために高濃度のバッファーが必要である。

【0117】

本発明による抽出工程によって得られるタンパク質抽出物は、好ましくは、沈降、遠心分離、ろ過、または残留植物材料から遊離したタンパク質抽出物を得るために一般的に使用される他の任意の技術を用いて分離する。ミラクロス等に限定されないが、布を通じたる過を使用することができる。別の実施形態では、非常に丈夫で、洗浄して再利用できるため、ナイロンメッシュフィルターが好ましい。

40

【0118】

ある実施形態では、ろ過は大型フラッシュクロマトグラフィーカラムを通じて行う。このようにして、大量生産中にタンパク質と結合する様々な低分子ポリフェノールをタンパク質から分離することができる。

【0119】

粗アッセイ用の小組織サンプルの調製では、小型ゲルろ過カラムを用いて抽出物を脱塩

50

することができ、小型ゲルろ過カラムは、Amersham Biosciences 社製の PD-10 や NAP カラム、等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0120】

別の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、等電点沈殿によってココア豆から分離する。典型的には、この沈殿は、当該技術分野で公知の任意の適切な方法によって、炭水化物、脂肪、および／または油のような望ましくないフラクションを除去した後に行う。このステップにより、植物材料の残りの部分のタンパク質を濃縮する。

【0121】

本発明によれば、当該部分を特定の pH のバッファーに溶解し、その pH をタンパク質の等電点まで下げることによってタンパク質を沈殿させることができる。好ましい実施形態では、抽出物からのタンパク質は、硫酸アンモニウム溶液、好ましくは 10～20 wt % の濃度の硫酸アンモニウム溶液、最も好ましくは 12～14 wt % の濃度の硫酸アンモニウム溶液を用いて沈殿させる。タンパク質は、遠心分離によってタンパク質沈殿物から回収する。

【0122】

さらに好ましい実施形態では、沈殿／抽出したタンパク質を、電気泳動によってさらに分離する。特に好ましい実施形態では、電気泳動分離は二次元電気泳動である。電気泳動は、ポリアクリルアミドゲル中で行うことが好ましい。ある実施形態において、電気泳動は、15 % SDS-PAGE ゲル中で行う。電気泳動はペプチドの高純度化を可能にし、労力とコストのかかる非電気泳動技術の欠点を解消する。垂直場は、主に分子量に基づく場内での移動度によってタンパク質を「分離」する。

【0123】

さらなる実施形態では、分離の後に電気溶出等を行い、これによりペプチドをゲルの表面に引き寄せることで、ペプチドの抽出とその後の分析が可能になる。ある実施形態において、ペプチドに対応するバンドは、電気泳動ゲルから切り出され、Tris-EDTA で洗浄し、超音波処理および遠心分離によって抽出する。

【0124】

さらに好ましい実施形態では、凍結乾燥または真空遠心分離によって目的のペプチドを乾燥する。あるいは、ペプチドを適当な薬剤で沈殿させることもできる。凍結乾燥および／または沈殿させたペプチドは、任意に蒸留水および／または他の適切な溶媒に再懸濁し、さらなる分析に使用する。

【0125】

別の実施形態では、抽出または沈殿したペプチドを濃縮する。好ましくは、ペプチドは、標準的な塩または有機溶媒沈殿により濃縮する。あるいは、揮発性バッファー（例えば、炭酸アンモニウム）に対する透析によって、フィルターベースの濃縮器を使用することによって、またはイオン交換クロマトグラフィーによってペプチドを濃縮する。抽出物／沈殿物の濃縮は時間がかかる重要なプロセスであり、したがって、これらのプロセス中にペプチドがポリフェノールやプロテイナーゼに曝されないように特別な注意を払う必要があることは、当業者には公知である。

【0126】

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

【0127】

さらに好ましい実施形態では、ペプチドは、他のペプチドから実質的に遊離している。

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

【0128】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を有する、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有するペプチドのコード配列を含むベクターに関し、任意で、N末端シグナルペプチドの配列を含み、シグナルペプチド配列は、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を有する、またはSEQ ID NO. 3による配列であり、ここで、ベクターは、発現系における当該ペプチドの発現を可能にするように設計される。好ましい実施形態では、ベクターは、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2と96%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、より好ましくは99%、あるいはより好ましくは100%の同一性を有するペプチドのコード配列からなる。ある実施形態では、ベクターは、前の実施形態に開示されたような精製タグを含む。

10

【0129】

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

20

【0130】

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

【0131】

一般に、目的のアミノ酸配列をコードするDNAは発現ベクターに含まれ、場合によっては、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を有するペプチドをエンコードするように、5'または3'末端で別のコード配列にインフレームで連結され、任意にN末端にSEQ ID NO. 3を含む。全コード配列は、プロモーターがコード配列の発現を駆動するように、プロモーターに作動可能に連結される。本明細書において、コード配列は「標的遺伝子」ともいう。

30

【0132】

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

40

【0133】

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

50

つである。lacプロモーターと同様にIPTGによって誘導可能である。

【0134】

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

【0135】

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

10

【0136】

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

【0137】

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

20

【0138】

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

【0139】

ある実施形態では、トランスジェニック植物は、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有するペプチドを発現する。さらなる実施形態において、ペプチドは、N末端シグナルペプチドの配列を含み、シグナルペプチド配列は、SEQ ID NO. 3と95%の配列同一性を有する。

30

【0140】

さらなる実施形態では、トランスジェニック植物は、SEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2と96%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、より好ましくは99%、あるいはより好ましくは100%の同一性を有するペプチドを発現する。

【0141】

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

40

【0142】

本発明によれば、植物細胞は、種々の公知の遺伝子工学的な方法（*Agrobacterium tumefaciens* 形質転換、Tiプラスミド、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクトイルガン、PEG媒介形質転換等）により、DNA構築物で形質転換させることができる。本明細書で使用する遺伝子工学的な方法は、所望の形質または特性を発現する遺伝子組換え植物を再生するために、外来DNA配列の植物細胞への導入に使用する任意の方法として理解されたい。

【0143】

本発明の一実施形態において、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を有し、任意にN末端にSEQ ID NO. 3を含むペプ

50

チドをコードするDNA配列、および他の植物種由来のホモログをコードするDNAは、成熟タンパク質を産生するプレタンパク質をコードするDNA配列と組み合わせて使用することができる。このプレタンパク質はネイティブなペプチド配列を含み、タンパク質を特定の細胞区画（例えば、アポプラストや液胞）に標的化する。これらのコード配列は、植物細胞での強力な発現を確実にする植物プロモーター配列にライゲーションすることができる。このプロモーター配列は、ほとんどの植物細胞またはすべての植物細胞におけるタンパク質の強力な構成的発現を保証し得、微生物感染の影響を受けやすい特定の組織または細胞における発現を保証するプロモーターであり得、また、感染プロセス中の発現の強力な誘導を保証するプロモーターであり得る。これらのタイプの遺伝子カセットはまた、抗菌タンパク質をコードするmRNAの効率的な産生および安定化を確実にするため、抗菌タンパク質をコードする領域の3'に転写終結およびポリアデニル化配列を含む。本明細書に開示される抗菌ペプチドの効率的な発現は、その個々のDNA配列を、はるかに大きなペプチドをコードする配列に組み込むことにより促進され得る。

10

【0144】

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

20

30

【0145】

本開示はまた、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有し、任意にN末端シグナルペプチドの配列を含むペプチドを発現し、シグナルペプチド配列は、SEQ ID NO. 3と95%の配列同一性を有する、トランスジェニック植物を得る方法に関する。

40

【0146】

本方法は、以下の工程を含む：

(a) 任意選択で、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なる配列を有するペプチドをコードする核酸配列を単離または合成する工程、

および核酸配列を適切な発現ベクターに組み込む工程、

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

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

50

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

【0147】

本明細書に開示される方法の、ある実施態様では、遺伝子クローニング法等の当該分野で公知の任意の方法を用いてペプチドをコードする核酸配列を単離する。遺伝子クローニングの非限定的な例としては、PCRベースのクローニングおよび制限酵素ベースのクローニングが挙げられる。

【0148】

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

10

【0149】

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

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

20

【0150】

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

【0151】

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

30

【0152】

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

【0153】

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

40

【0154】

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

【0155】

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

50

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

【0156】

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

【実施例】

【0157】

(実施例1：ペプチドの抽出、精製、同定)

ココアハイブリッドCCN-51由来のココア豆サンプルを、エクアドルの小規模で伝統的な、創業30年以上のカカオ農園から収集した。サンプルは、Barry Callebaut AGから非発酵および発酵／乾燥の形で提供された。非発酵サンプルはドライアイスで輸送し、到着後-80℃で保管した。一方、発酵乾燥サンプルは、4℃で輸送され、さらなる処理のために保管された。非発酵豆の粘液質パルプを拭き取り、種皮を滅菌メスで剥離した。発酵豆の種皮を鉗子で取り除いた。豆はRetsch Grindomix GM200 ナイフミルを用いて、10,000rpmで微粉碎した。粉碎した粉末をそのまま使用した（または-20℃で保存し、さらに処理した）。

【0158】

微粉碎した粉末から250mgを2mLのポリプロピレン製微量遠心チューブに移し、1mLのタンパク質抽出バッファー（100mM Tris HCl、1%DTT、1%SDS、pHは8.1に調整、プロテアーゼ阻害剤カクテルは製造元の指示に従った）に懸濁した。混合物を60秒間十分にボルテックスし、4℃で穏やかに振とうしながら60分間インキュベートした後、卓上型5810R遠心機で13,200rpm、20分間、4℃で遠心した。タンパク質画分を含む上清をピペティングで新しいカップに静かに移し、-20℃で保存してさらに分析した。

【0159】

抽出したカカオタンパク質の含有量は、「Analytical Biochemistry」1976; 72: 248-54に開示されているBradford MMによる方法を用いて評価した。

【0160】

Bradford法によって、10μLの希釈タンパク質溶液に300μLのBradford試薬をマイクロタイタープレートに加え、短時間ボルテックスした。室温で10分間インキュベートした後、吸光度を595nmで3回測定した。抽出したタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを用いた標準曲線から濃度範囲1~1500μg/mLで定量した。

【0161】

抽出したココアタンパク質および／またはペプチドを、SDS-PAGEを用いて分子量に応じて分離した。すなわち、タンパク質サンプル25μLを、追跡色素としてプロモフェノールブルーを含む6Xサンプルバッファー5μLと混合した。混合物を95℃で5分間加熱し、12.5%または15%（w/v）のアクリルアミドを含むSDS-PAGEゲル（83mm×65mm×1mm）にロードした。電気泳動は130Vで90分間行った。電気泳動後、ゲルをCoomassie（登録商標）Blue（45%（v/v）メタノール、10%酢酸、2.93 x 10⁻³ M Coomassie（登録商標）Brilliant Blue G-250）で20分間染色するか、あるいはTownbinらによって先にProc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354に記載されている方法でPVDF膜に電気泳動した。プロットをPBST中の5%（w/v）牛乳で4℃で一晩処理した。その後、タンパク質プロットを、5%（w/v）粉乳を含むPBSTで1:2,000に希釈したポリクローナル抗体でプローブし、室温で2時間（h）インキュベートした。さらに、プロットを穏やかに振とうしながら室温で5分ずつ6回洗浄した。その後、プロットをHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体で、5%（w/v

10

20

30

40

50

）粉乳を含むPBST中で1：10，000に希釈し、室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プロットをPBSTで6回洗浄し、それぞれ5分間、室温で穏やかに振とうした。最後に、MrukとChengがSpermatogenesis, 2011, 1, 121-122に記載したように、過酸化水素存在下、ルミノールを基質として、間接的に結合したHRPをその酵素活性により検出した。

【0162】

二次元電気泳動に進む前に、Ready Prep™ 2Dクリーンアップキットを用いて全タンパク質抽出物を精製した。イオン性洗剤、脂質、フェノール化合物のような妨害物質を除去するために、総タンパク質抽出物を、メーカーが推奨する当該キットを用いて精製した。キットに付属の洗浄バッファーで沈殿と洗浄を行った後、タンパク質サン

10

【0163】

カカオタンパク質の2次元ゲル電気泳動は、等電点集束とそれに続くSDS-PAGEによって行った。このために、80 µgのタンパク質を固定化pH勾配（IPG）ストリップ（7 cm、pH 3-10）に塗布し、室温で14時間浸漬した。Bio-Rad Protean（登録商標）i12™ IEF Cell（50 V、70分；150 V、20分；300 V、15分；600 Vへのグラジエント、10分；600 V、15分；1,500 Vへのグラジエント、10分；1,500 V、30分；3,000 Vへのグラジエント、20分；3,000 V、210分；50 Vで一時的停止）で等電点電気泳動を行った。次に、6.48 × 10⁻² M DTTと0.216 Mヨードアセトアミド溶液を平衡化バッファー（6 M尿素、30%（w/v）グリセロール、69.2 × 10⁻³ M SDS、0.05 M Tris-HClバッファー、pH 8.8）に溶解し、IPGストリップを室温で15分間平衡化した。分子量分離は、Bio-Rad Mini-Protean（登録商標）Tetra System（110 V、10分間、さらに130 V）を用いて、12.5%または15%ポリアクリルアミドゲルで行った。タンパク質の分子量は、ポリアクリルアミドゲル中での視覚的な動きと、アミノ酸配列の予測重量によって評価した。染色と脱染の後、得られた2DゲルをEpson Scannerでスキャンした。

20

【0164】

スキャンした2Dゲルは、ImageMaster 2D Platinum software 6.0 software（GE Healthcare）で処理した。その際、全サンプルについて、自動スポット検出パラメーターの設定をSmooth=6、Saliency=100、Min Area=5とした。検出した非タンパク質スポット、すなわちストリークや塵埃を含む汚染アーチファクトは、手動によるスポット選択時に除去した。デフォルトでスポット単位でスポットボリュームをバックグラウンド減算し、スポット境界上の最低10パーセンタイルのピクセル値を、スポット境界内の他のすべてのピクセル値から除外した。2Dゲルセットのマッチングには、マスターゲルという参照サンプルを定義し、異なるゲル間で同一のタンパク質スポットを同定できるようにした。得られたマッチレポートには、個々の2Dゲル中のマッチしたスポットと、マスターゲル中の対応するスポットが、それぞれの正規化された相対スポット体積とともにリストアップされている。

30

40

【0165】

目的のタンパク質スポットを2Dゲルから切り出し、細かく刻み、50%ACN（v/v）を含む100 µLの0.05 M重炭酸アンモニウムバッファーで15分間2回洗浄した。500 µLのアセトニトリルを加えてゲル片を脱水し、室温で10分間インキュベートした。デカンテーションと短時間の風乾の後、サンプルにトリプシン消化バッファーを加え、先に確立したように55℃で30分間インキュベートした。サンプルは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-TOF質量分析（MALDI-TOF-MS）分析に直接使用した。

50

【0166】

ペプチドパターンのスペクトロメトリー同定のため、ペプチドを15 mMのTCEPで還元するか、または還元しない形で使用した。ペプチドは、ナローボアガードカラムZorbax 300SB-C8（内径2.1 mm x 12.5 mm、粒子径5 μm）を装着したProsheli 300SB-C8カラム（内径1 mm x 75 mm、粒子径5 μm）にロードした。タンパク質を、95%溶媒A（0.1%ギ酸（FA）、0.05%トリフルオロ酢酸（TFA）、水）から90%溶媒B（0.1%FA、0.05%TFA、アセトニトリル）への直線的な5分間のグラジエントによってカラムから溶出させ、次いで90%溶媒Bで3分間洗浄し、2分間で5%溶媒Bに戻し、2.5分間の平衡化を行った。質量分析計は、600~4000 m/zの質量範囲において、60000の分解能（m/z 400）でMSモードで操作した。AGCは1E7に設定し、1秒間トラップを満たすようにした。ソースの設定は、SID 15 V、キャピラリー温度325℃、電圧4.2 kVに設定した。

10

【0167】

記録されたスペクトルは、Freestyleソフトウェア（Thermo fisher scientific、USA）のXtract™アルゴリズムでデコンボリューションした。

【0168】

（結果）

CCN-51カカオ品種の豆から単離した全タンパク質画分から、本明細書で開示されるペプチドを同定した。カカオ豆から分離したタンパク質を2D分離した後、15 kDaに相当するスポットを切り出し、トリプシン消化した（図1）。消化されたペプチドはMALDI-TOF-MS分析で同定した（図2A）。SEQ ID NO. 2のリコンビナントペプチドをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ゲルから切り出し、トリプシン消化にかけた結果、図2Bに示すMALDI-TOF-MSペプチドフィンガープリントを得た。SEQ ID NO. 2によるペプチドを含む還元サンプルと非還元サンプルとの両方において、インタクトなマスフィンガープリントを用いて15.3 kDaの質量を検出した。SEQ ID NO. 2によるサンプルのLC-MS結果を図3に示す。

20

【0169】

（実施例2： リコンビナントペプチドの生産）

CCN-51カカオ豆の胚から全DNAを抽出し、プライマーForward__BamH1-5' CGCGGATCCTATGGCAGAAACAATAT3' およびReverse__Kpn1-5' CGCGTACCTTTGTGATTATGGTAATT3' を用いてペプチドをコードするヌクレオチド配列を増幅した。この結果、300 bpのDNA（目的のDNA）が増幅された。

30

【0170】

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

40

50

チドを含まないペプチドを過剰発現する細胞は37℃で5時間インキュベートした。

【0171】

リコンビナントペプチドは実施例1に記載したように精製し、同定した。

【0172】

(実施例3：ペプチドの合成)

SEQ ID NO. 1およびSEQ ID NO. 2と同一の配列のペプチドは、Seramun Diagnostica GmbH (ハイデゼー、ドイツ)により化学合成された。

【0173】

(実施例4：最小阻害濃度(MIC)アッセイ)

MICアッセイは、化合物が微生物集団の増殖を阻害する最低濃度を決定する。本明細書に記載のペプチドの抗菌力を、国際公開第1998/027805号で議論されている2つの他のAMP、TcAMP1およびTcAMP2、ならびに抗生物質または殺菌剤の活性と比較した。いくつかの細菌種および真菌種に対して比較MICアッセイを実施した(表1)。

【0174】

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

【0175】

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

【0176】

MICアッセイでは、細菌と真菌をそれぞれの培地を用いた寒天平板で培養した。前培養は、それぞれの液体培地5mlに単一の細菌コロニーまたは真菌の薄片を接種して調製した。600nmの光学密度(OD)を1~5日後に測定し、OD600が1になるように調整した。この細胞懸濁液を用いて1:500希釈液を調製し、1mlあたり約2×10⁶の微生物細胞に対応させた。

【0177】

MICを評価するため、試験抗菌ペプチドで96ウェルプレートで調製した。各ウェルには、100 μlの微生物細胞培養液、90 μlの培養培地、10 μlのペプチドまたは対応する希釈度のコントロールを入れた。プレートは各被験菌に最適な増殖温度で一晩(ON)培養した(表1)。結果は目視で評価し、増殖の有無に基づいてMICを決定した。

【0178】

表1は、様々な抗菌ペプチドのMICアッセイで試験された生物である。種名、分類、増殖条件を示す。DSMはGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ、Braunschweig、Germany)の注文番号である。SFはJena Microbial Resource Collection (JMRC、Jena、Germany)から入手した生物を指す。

【0179】

【表 1】

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

10

20

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

30

【0180】

(結果)

本発明によるペプチドはすべて、試験したすべての生物に対して強い抗菌活性を示した。

【0181】

真菌種に対する S E Q I D N O . 1、S E Q I D N O . 2、S E Q I D N O . 4、S E Q I D N O . 6 および S E Q I D N O . 7 によるペプチドについて得られた M I C 値を表 2 に示す。本発明のペプチドはすべて、先行技術のペプチドよりも低濃度で真菌の増殖をより効率的に阻害した。

40

【0182】

表 2 は、真菌類を試験菌とし、本発明のペプチド (S E Q I D N O . 1、N O . 2、N O . 4) および先行技術のペプチド (S E Q I D N O . 6、N O . 7) を用いた M I C アッセイの結果である。クロトリマゾールを参照として用いた。

【0183】

50

【表 2】

真菌	最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	クロトリマゾール	本発明のペプチドによるSEQ ID NO. 1	本発明のペプチドによるSEQ ID NO. 2	本発明のペプチドによるSEQ ID NO. 4	先行技術のペプチドによるSEQ ID NO. 6	先行技術のペプチドによるSEQ ID NO. 7
<i>Candida albicans</i>	3.1	0.4	3.1	0.4	13.1	12.75
<i>Ceratosystis paradoxa</i>	0.4	5	6.25	1	4.8	4.7
<i>Botrytis cinerea</i>	6.25	6.25	6.25	3.1	14.5	12.75
<i>Leptosphaeria maculans</i>	0.4	3.75	6.25	4.1	37.9	9.4
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	3.1	1.9	4.5	2	13.12	10.68
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	25	10.25	19.3	1.5	27.2	23.5
<i>Verticillium dahliae</i>	1.56	1.6	3.1	1.55	14.5	12.7

10

20

【0184】

SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6およびSEQ ID NO. 7によるペプチドの細菌種に対するMIC値を表3に示す。本発明のペプチドはすべて細菌の増殖を阻害し、SEQ ID NO. 1、NO. 2およびNO. 4によるペプチドは、試験したすべての細菌種において先行技術のペプチドよりも効率的であった。

【0185】

表3は、細菌種を試験生物とし、本発明のペプチド（SEQ ID NO. 1、NO. 2、NO. 4）および先行技術のペプチド（SEQ ID NO. 6、NO. 7）を用いたMICアッセイの結果である。ゲンタマイシンおよびストレプトマイシンを参照として用いた。

30

【0186】

【表 3】

細菌	最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						
	ゲンタマイシン	ストレプトマイシン	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO. 4	SEQ ID NO. 6	SEQ ID NO. 7
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.8	>125	3.1	7.1	1.8	13	13.6
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.4	7.8	3.1	7.1	1.8	3.25	13.6
<i>Pantoea agglomerans</i>	1.56	NA	1.1	1.9	1	7.9	9.45
<i>E. coli</i>	1	NA	3.1	6.2	NA	NA	NA

40

50

【0187】

(実施例5：体液中でのペプチドの安定性)

ヒツジ血液アッセイ

C. albicans に対する、本明細書に開示したペプチドの血液中での挙動を試験するために、in vitro 実験を行った。ヒト血液から分離した C. albicans を用いた (DSMZ 6569)。SEQ ID NO. 1 によるペプチドを 1 mg / ml の濃度に調整し、ヒツジの血液と等量混合した。この混合物を 30℃で一晩インキュベートした。血液の固形部分を除去するために、混合物を遠心分離し、得られた血漿上清を MIC に使用した。

【0188】

尿アッセイ

C. albicans に対する、本明細書に開示されたペプチドの尿中での挙動を試験するために、in vitro 実験を行った。SEQ ID NO. 1 によるペプチドを 1 mg / ml の濃度に調整し、等量の合成尿またはヒト尿と混合した。これらの混合物を 30℃で一晩インキュベートした。尿の固形部分を除去するために、混合物を遠心分離し、得られた上清を MIC に使用した。

【0189】

牛乳アッセイ

Listeria monocytogenes に対する、3.5%脂肪の牛乳中での本明細書に開示したペプチドの挙動を試験するために、in vitro 実験を行った。SEQ ID NO. 1 によるペプチドを 1 mg / ml の濃度に調整し、等量の牛乳と混合した。この混合物を 37℃で一晩培養した。牛乳の固形部分を除去するために、混合物を遠心分離し、得られた上清を MIC に使用した。

【0190】

(結果)

ペプチドをヒツジの血液と混合すると、C. albicans の細胞増殖を阻害する能力の低下が観察された。しかしながら、本明細書に記載のペプチドは、ヒツジの血液中では 25 µg / ml で依然として活性を示した (表 4)。

【0191】

C. albicans の細胞増殖を阻害する能力は、ペプチドを尿と混合することによって、それほど影響されなかった。合成尿では 2 µg / ml のペプチドで、ヒト尿では 5 µg / ml のペプチドで効率的な抗菌活性が得られ、対照条件では 0.4 µg / ml であった (表 4)。

【0192】

同様に、ペプチドを牛乳と混合した場合、L. monocytogenes の増殖を阻害する濃度は、牛乳を含まない条件での 3.2 µg / ml から 80 µg / ml に増加した (表 4)。

【0193】

このペプチドは、体液中の細菌や酵母の増殖を阻害する能力を完全に失うことはなく、治療的使用に適していることが示唆された。

【0194】

表 4 は、本発明のペプチド (SEQ ID NO. 1) をヒツジの血液、尿または牛乳と混合したときの MIC アッセイの結果である。対照は体液を含まないペプチドであり、カスポファンギンとテトラサイクリンを参照として用いた。

【0195】

10

20

30

40

50

【表 4】

試験生物	条件	最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Candida albicans</i>	対照	0.4
	カスポファンギン	0.5
	ヒツジ血液	25
	合成尿	2
	人間の尿	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	対照	3.1
	テトラサイクリン	1.6
	牛乳	80

10

20

【0196】

(実施例6：土壌スラリー中でのMICアッセイ)

Erwinia amylovora に対する、本明細書に開示したペプチドの土壌スラリー中での挙動を試験するために、*in vitro* 実験を行った。土壌スラリーは、5 g の土壌を 20 ml の水に混合することにより生成した。この混合物をオーバーヘッドシェーカーで 1 時間インキュベートした。固形分を遠心分離で除去し、得られた上清（土壌スラリーという）を MIC 測定に使用した。等量の SEQ ID NO. 1 によるペプチド（8 mg / ml）と土壌スラリーを混合し、28 °C で一晩インキュベートした。この混合物を *Erwinia amylovora* に対する MIC に用いた。

30

【0197】

(結果)

本明細書に記載したペプチドは、土壌スラリー中 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ で、対照条件の 15 $\mu\text{g} / \text{ml}$ と比較して細菌の増殖を阻害した。土壌中で細菌増殖を阻害する能力を完全に失わないことから、本明細書に記載のペプチドは農業用に適している。

【0198】

(実施例7：技術的表面へのペプチドの適用性)

Candida albicans に対する、本明細書に開示したペプチドの技術的表面上での挙動を試験するための実験を行った。

【0199】

セラミック（孔径 1100 μm ）、ステンレス、シリコンの表面について、バイオフィルムリアクターで、この生物のバイオフィルム形成を試験した。それぞれのリアクターに、3 種類の表面のディスクが入った 4 本のディスクを入れ、ネジで締め付けた。すべてのディスクを装着したまま、システムをオートクレーブ滅菌した。297 mL の SU 培地を各リアクターに充填し、3 mL の *C. albicans*（膺分離株）の SU 前培養液（OD₆₀₀ = 0.1）を添加した。バイオフィルムリアクターは 30 °C、200 rpm 攪拌で培養した。対照、0 日目からのペプチド濃縮力カオ抽出物による処理と、3 日目からの同抽出物による処理の、合計 3 つのバイオリアクターシステムを運転した。力カオ抽出物の最終総タンパク質濃度は 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ であった。

40

【0200】

50

1日目、3日目、5日目、7日目に、各反応物からディスクの茎を取り出した。ディスクのネジを外し、2 mLのSUに浸した。これらの液体をSU培地で希釈し、 10^{-1} ～ 10^{-5} の希釈系列を調製した。この希釈液をYPD固形培地上にプレートし、30℃で48時間培養した。プレート上に形成されたコロニーを数え、コロニー形成単位(CFU)/cm²ディスクを算出した。

【0201】

(結果)

すべての試験表面で、C. albicansの増殖は観察されなかった。これらの結果は、本明細書に開示されたペプチドが、表面殺菌剤または除染剤として非常に安定で有効であることを示唆している。

【0202】

(実験8：酵母および哺乳動物細胞におけるin vitroアッセイ)

ペプチドの増殖抑制効果が静微生物的性質か殺微生物的性質かを調べるために、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出アッセイを、選択したモデル生物としてC. albicans(腫分離株)およびヒトケラチノサイト(HaCaT)細胞で行った。LDHは多くの細胞種に存在する酵素である。細胞膜の損傷によって、LDHが細胞培養液中に放出され、その後の結合酵素発色反応により検出・定量することができる。

【0203】

HaCaT細胞は、4.5 g/Lグルコース、2 mM L-グルタミン、10%ウシ胎児血清(FCS)を添加したDMEM培地で、37℃、8%CO₂で培養した。細胞は、約20 mLのDMEMを入れた75 cm²の細胞培養フラスコで培養した。培地は週に2回交換した。コンフルエントが90%以上に達したら、1:10の割合で継代した。継代液は、EDTA(0.05%ストック)とトリプシン(0.1%ストック)の1:1混合液で、Ca²⁺とMg²⁺を含まないPBS溶液であった。

【0204】

LDH細胞毒性アッセイCyQUANT(登録商標)(Invitrogen、番号C20300およびC20301)は、同社が提供するプロトコルにしたがって実施した。最適播種密度は、キットに記載されている標準プロトコルにしたがって、HaCaT細胞またはC. albicans細胞について100 μLあたり10,000個と決定した。細胞をSEQ ID NO. 2に従ったペプチドに1.95 μg/mLから250 μg/mLの濃度で1時間または一晩曝露し、LDH放出を検出した。細胞毒性は、同社から提供された以下の式を用いて算出した。%細胞毒性 = [(ペプチドで処理したLDH活性)/(最大LDH活性) - (自然なLDH活性(Spontaneous LDH activity))] * 100。自然なLDH活性は未処理(加水)サンプルで測定し、最大LDH活性はキットサプライヤーから提供された溶解剤で測定した。

【0205】

(結果)

検出した標的生物C. albicansの細胞死は、0～250 μg/mLの範囲で直線的であり、試験したタンパク質の最高濃度では92%の細胞毒性を示した(図4)。対照的に、このペプチドでHaCaT細胞を処理しても、LDHの放出はほとんど誘導されなかった。HaCaT細胞に対するペプチドの細胞毒性は、ペプチド濃度125 μg/mLまでは0%～1%であり、ペプチド濃度250 μg/mLでは6%に達した(図4)。

【0206】

本発明は、先に述べたどのような実現形態にも限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲を再評価することなく、提示した作製例にいくつかの修正を加えることができるものと思われる。例えば、本発明の好ましい実施形態は、テオブロマカカオのCCN-51品種に向けられているが、さらなる加工に十分な量のビシリンを産生するカカオ品種であれば、本発明の範囲から逸脱することなく使用することができる。

【0207】

(実施例9：非発酵カカオ豆からのペプチド抽出)

本明細書で開示するペプチドを、非発酵だが十分に乾燥したカカオ豆から単離した。カカオ豆をビーンブレイカーで機械的に破碎し、ニブと殻の混合物を得た。殻を取り除き、脱殻したニブをエクスペラーに移した。これにより、バターとスラリーの混合物が得られ、これを16,600×g、40℃で10分間遠心分離して分離した。上部に集まったバター画分は捨て、固形スラリーペレットを粉碎し、次の使用まで4℃で保存した。

【0208】

その後、3つの方法でペプチドを抽出した。

【0209】

(方法1：PEB(タンパク質抽出バッファー)抽出)

粉碎したスラリーペレットを50℃のウォーターバスで10分間予熱し、タンパク質抽出バッファー(100mM Tris、1%SDS、1%DTT、pH8.1)に溶解した。溶解したスラリーペレットを攪拌下、室温で1時間インキュベートした後、16,600×gで20分間遠心した。ペプチドを含む液相を集め、透析または限外ろ過(Centricon Plus-70、Merck Chemicals GmbH、an affiliate of Merck KGaA、Darmstadt、Germany)で精製し、PEBの成分を除去した。

【0210】

(方法2：PEB抽出と酸沈殿)

粉碎したスラリーペレットを方法1と同様に処理した、すなわち、粉碎スラリーペレットを50℃の水浴中で10分間予熱した後、PEBに溶解した。次いで、溶解したスラリーペレットを攪拌下、室温で1時間インキュベートし、次いで16,600×gで20分間遠心分離した。ペプチド含有液相を回収し、酸沈殿に供し、等電点に基づいてタンパク質ミックス中の本発明のペプチドを濃縮した。これにより、タンパク質抽出物のpHを1Mのクエン酸で6.0に下げ、濃い灰色から赤色に変色させた。この混合物を16,600×gで10分間遠心分離した。上清を捨て、超音波処理でタンパク質ペレットをPEBに再懸濁した。この後、5kDa MWCOの限外ろ過(Centricon Plus-70、Merck Chemicals GmbH、an affiliate of Merck KGaA、Darmstadt、Germany)で有害物質を除去した。

【0211】

(方法3：熱抽出)

粉碎したスラリーペレットを、ペレットと水の比が1:4w/vの水道水中で、攪拌下10分間60℃に加熱した。得られた混合物を10℃で20分間、16,600×gで遠心分離した。

1~3のいずれかの方法で抽出した後に得られたペプチド含有上清を回収し、SDS-PAGEおよびMICにより定量または分析した。タンパク質抽出液は、適用前に凍結乾燥または真空遠心し、さらに濃縮(up-concentration)した。

配列表

SEQ ID NO. 1 (本発明のある実施形態のペプチド)

YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCCEQRCER
EYKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQQQCCQRK
CWEQYKEQERGEHENYHNHKKN

SEQ ID NO. 2 (本発明のある実施形態のペプチド)

YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCCEQRCER
EYKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQQQCCQRK
CWEQYKEQERGEHENYHNHKK

SEQ ID NO. 3 (本発明のある実施形態のシグナルペプチド)

MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA

SEQ ID NO. 4 (本発明のある実施形態のペプチド)

MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA YGRKQYERDPRQ

QYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCEREYKEQQRQQEEE
LQRQYQQCQGRQCQEQQQGQREQQQCQRKQWEQYKEQERGE
HENYHNHKKN

SEQ ID NO. 5 (本発明のある実施形態のペプチド)

MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSAAYGRKQYERDPRQ
QYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCEREYKEQQRQQEEE
LQRQYQQCQGRQCQEQQQGQREQQQCQRKQWEQYKEQERGE
HENYHNHKK

SEQ ID NO. 6 (先行技術のペプチド)

YERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCERCEREYKEQ
QRQQEEE

SEQ ID NO. 7 (先行技術のペプチド)

LQRQYQQCQGRQCQEQQQGQREQQQCQRKQWEQYKEQERGE
HENYHNHKKNRSEEEEGQQR

SEQ ID NO. 8 (Forward_BamH1 forward primer)

CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT

SEQ ID NO. 9 (Reverse_Kpn1 forward primer)

CGCGGTACCTTTGTGATTATGGTAATT

SEQ ID NO. 10 (HQタグ)

HQHQQH

SEQ ID NO. 11 (HNタグ)

HNHNHNHNHNHNHN

SEQ ID NO. 12 (HATタグ)

KDHLIHNVHKEEHAHAHNK

SEQ ID NO. 13 (ALFAタグ)

SRLEEEELRRRLTE

SEQ ID NO. 14 (A vi タグ)

GLNDIFEAQKIEWHE

SEQ ID NO. 15 (C-タグ)

EPEA

SEQ ID NO. 16 (Calmodulin-タグ)

KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL

SEQ ID NO. 17 (E-タグ)

GAPVPYPDPLEPR

SEQ ID NO. 18 (FLAG-タグ)

DYKDDDDK

SEQ ID NO. 19 (HA-タグ)

YPYDVPDYA

SEQ ID NO. 20 (Myc-タグ)

EQKLISEEDL

SEQ ID NO. 21 (NE-タグ)

TKENPRSNQEESYDDNES

SEQ ID NO. 22 (Rho1D4タグ)

TETSQVAPA

SEQ ID NO. 23 (S-タグ)

KETAATAKFERQHMDS

SEQ ID NO. 24 (SBPタグ)

DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP

SEQ ID NO. 25 (Strep-タグ)

WSHPQFEK

10

20

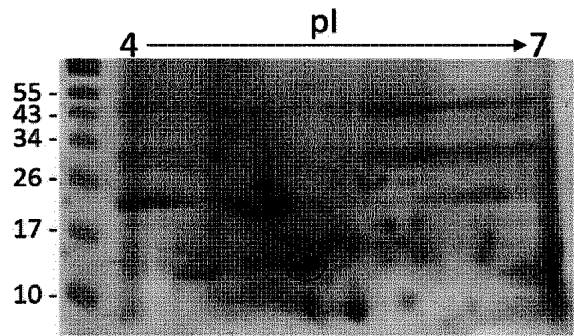
30

40

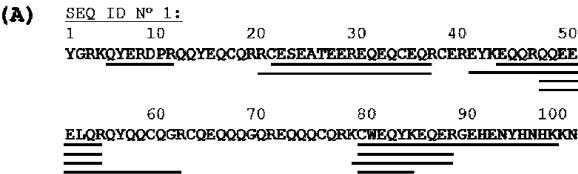
50

【図面】
【図 1】

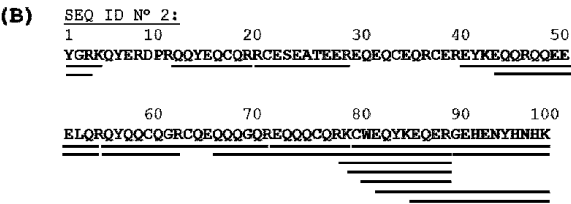
FIG. 1



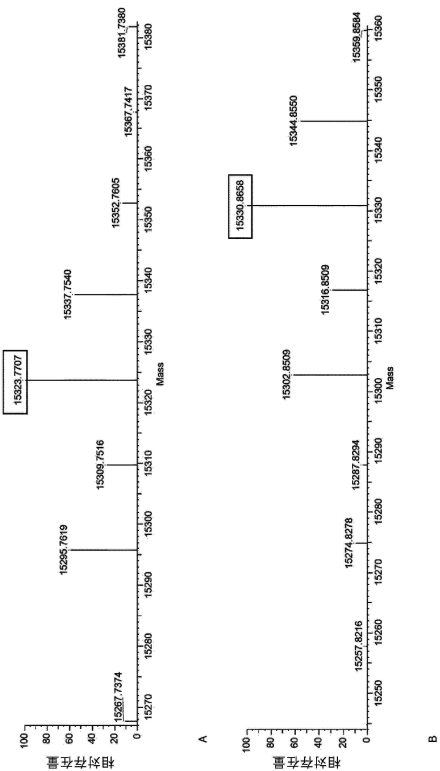
【図 2 (A)】



【図 2 (B)】



【図 3】



10

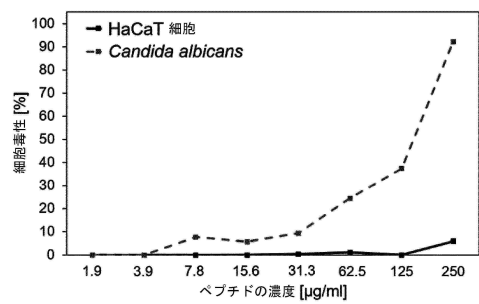
20

30

40

50

【 図 4 】



10

20

【 配 列 表 】

2025518478000001.xml

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年3月8日(2024.3.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO. 1によるアミノ酸配列、SEQ ID NO. 2と98%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列、またはSEQ ID NO. 2と最大で2つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を有する、ペプチド。

10

【請求項2】

前記ペプチドはSEQ ID NO. 1またはSEQ ID NO. 2によるペプチドである、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

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

【請求項4】

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

20

【請求項5】

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

【請求項6】

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

【請求項7】

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

30

【請求項8】

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

【請求項9】

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるペプチドと、賦形剤とを有する、組成物。

【請求項10】

前記ペプチドは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を示すシグナルペプチド、またはSEQ ID NO. 3による配列を有するシグナルペプチドを含む、請求項9に記載の組成物。

40

【請求項11】

前記組成物は液体、半固体、固体、もしくはガス状の組成物であり、および／または前記組成物は、剤形が、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、エアロゾル、ペースト、シロップ、懸濁液、乳濁液、もしくは溶液である、請求項9または10に記載の組成物。

【請求項12】

治療用のペプチドまたは組成物であって、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1

50

もしくはSEQ ID NO. 2と最大5以下のアミノ酸が異なるペプチドあるいは請求項9～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記ペプチドは、そのN末端でシグナルペプチドと融合しており、前記シグナルペプチドは、好ましくは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 3による配列を有する、請求項12に記載の治療用のペプチドまたは組成物。

【請求項14】

細菌感染症および／または真菌感染症の治療を必要とする対象において使用するペプチドまたは組成物であって、SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なる、ペプチドあるいは請求項9～11に記載の組成物。

【請求項15】

前記ペプチドは、そのN末端でシグナルペプチドと融合しており、前記シグナルペプチドは、好ましくは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 3による配列を有する、請求項14に記載の用途のペプチドまたは組成物。

【請求項16】

前記対象はヒトまたは動物である、請求項14～15に記載の用途のペプチドまたは組成物。

【請求項17】

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチドの使用、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大5以下のアミノ酸が異なるペプチドの使用、あるいは請求項9～11に記載の組成物の使用であって、作物保護における飼料もしくは食品添加物としての使用、除染剤としての使用、防腐剤としての使用、または化粧用途における使用。

【請求項18】

前記ペプチドは、そのN末端でシグナルペプチドと融合しており、前記シグナルペプチドは、好ましくは、SEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を示す、またはSEQ ID NO. 3による配列を有する、請求項17に記載の使用。

【請求項19】

前記ペプチドまたは前記組成物は、植物における病原体の防除に使用されるペプチドまたは組成物であって、前記植物は好ましくは作物である、請求項17～18のいずれかに記載の使用。

【請求項20】

前記病原体は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または真菌の群から選択される、請求項19に記載の使用。

【請求項21】

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチド、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大5以下のアミノ酸が異なるペプチドを生産する方法であって、前記ペプチドを、組換え技術により、合成技術により、またはテオブロマカカオからの抽出もしくは沈殿により、生産する、方法。

【請求項22】

前記ペプチドはカカオ豆スラリーから抽出される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

SEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と95%以上の配列同一性を示すペプチドのコード配列、またはSEQ ID NO. 1もしくはSEQ ID NO. 2と最大で5つのアミノ酸が異なるペプチドのコード配列を含むベクターであって、任

10

20

30

40

50

意に、N末端にシグナルペプチドの配列と融合しているベクターにおいて、前記シグナルペプチドの配列は、好ましくはSEQ ID NO. 3と95%以上の配列同一性を有し、前記ベクターは発現系における前記ペプチドの発現を可能にするように設計されている、ベクター。

【請求項24】

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

【請求項25】

請求項24に記載のトランスジェニック植物を生産する方法であって、前記方法は、前記ペプチドをエンコードする核酸を植物細胞に導入すること、それにより前記ペプチドを発現する形質転換植物細胞を作製し、前記形質転換植物細胞をトランスジェニック植物に再生する工程を含む、方法。

10

【請求項26】

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

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/EP2023/062397
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K A01N A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/086125 A2 (NESTLE SA [CH]; KOCCHAR SUNIL [CH] ET AL.) 31 October 2002 (2002-10-31) examples 1-4 claim 2; sequence 2 -----	1, 5-8, 22
A	WO 98/27805 A1 (COOPERATIVE RESEARCH CENTRE FO [AU]; MANNERS JOHN MICHAEL [AU] ET AL.) 2 July 1998 (1998-07-02) page 3, line 26 - page 4, line 31; sequence 7 examples 1-18 ----- -/--	1-27

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

☒ See patent family annex.

*** Special categories of cited documents :**

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

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

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

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

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 2023

Date of mailing of the international search report

11/08/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, Jürg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062397

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHN P. MARCUS ET AL: "Peptide Fragments From Plant Vicilins Expressed in Escherichia Coli Exhibit Antimicrobial Activity In Vitro", PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER., vol. 26, no. 2, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 75-87, XP055592751, NL ISSN: 0735-9640, DOI: 10.1007/s11105-008-0024-9 figure 2; table 2 -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/062397

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02086125	A2	31-10-2002	AT 328084 T	15-06-2006
			DE 60211887 T2	14-06-2007
			EP 1253200 A1	30-10-2002
			EP 1385960 A2	04-02-2004
			ES 2264481 T3	01-01-2007
			US 2004172683 A1	02-09-2004
			US 2007204365 A1	30-08-2007
			WO 02086125 A2	31-10-2002

WO 9827805	A1	02-07-1998	AT 343927 T	15-11-2006
			BR 9713772 A	21-03-2000
			CA 2274730 A1	02-07-1998
			CN 1244769 A	16-02-2000
			DE 69736904 T2	21-06-2007
			EP 1006785 A1	14-06-2000
			ES 2277363 T3	01-07-2007
			JP 2001510995 A	07-08-2001
			KR 20000057699 A	25-09-2000
			NZ 336337 A	26-05-2000
			US 2002168392 A1	14-11-2002
			US 2003171274 A1	11-09-2003
			WO 9827805 A1	02-07-1998

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 0 1 P 3/00 (2006.01)	A 0 1 P 3/00	
A 0 1 N 37/46 (2006.01)	A 0 1 N 37/46	
A 0 1 N 65/34 (2009.01)	A 0 1 N 65/34	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

ベルギー国 1 5 0 0 ハレ ブリュッセルセステーンヴェーク 4 5 0

(72)発明者 マシアス ウルリッヒ

ドイツ国 2 8 7 5 9 ブレーメン カンプス リング 1

(72)発明者 ニコライ クネルト

ドイツ国 2 8 7 5 9 ブレーメン カンプス リング 1

(72)発明者 ネハ クマリ

ドイツ国 0 1 4 5 4 ラーデベルク アム ヴァル 4 5 セー

F ターム (参考) 4B018 MD57 ME09 MF01

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA20 BA21 BA23 CA15 CA53 CA59
DA42 NA14 ZB351 ZB352

4H011 AA01 AA03 BB06 BB22

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA21 CA33 EA01 EA06 EA29 FA20
FA74 GA01