

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-519975

(P2023-519975A)

(43)公表日 令和5年5月15日(2023.5.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 K	16/14 (2006.01)	C 0 7 K	16/14	Z N A	2 B 0 3 0
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 B 0 6 4
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 B 1 6 9
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 1 1
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全135頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-559586(P2022-559586)	(71)出願人	513045367 バイオタリス・エン・フェー
(86)(22)出願日	令和3年3月31日(2021.3.31)		ベルギー国、9 0 5 1・ヘント、プフェンストラート・1 1
(85)翻訳文提出日	令和4年11月25日(2022.11.25)	(74)代理人	110001173 弁理士法人川口国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/058548	(72)発明者	ベログラソバ, ナタリア
(87)国際公開番号	WO2021/198396		ベルギー国、9 0 5 2・ヘント、テクノロジーパーク・ズウェイナルデ・9 4
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)		、バイオタリス・エン・フェー気付ルベ, ヒルデ・アディ・ピエレッテ
(31)優先権主張番号	20167432.2	(72)発明者	ベルギー国、9 0 5 2・ヘント、テクノロジーパーク・ズウェイナルデ・9 4
(32)優先日	令和2年3月31日(2020.3.31)		、バイオタリス・エン・フェー気付スタンセンス, パトリック
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(72)発明者	スタンセンス, パトリック
(31)優先権主張番号	20218017.0		
(32)優先日	令和2年12月31日(2020.12.31)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		

(54)【発明の名称】 抗真菌ポリペプチド

(57)【要約】

本発明は、少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物に関し、前記ポリペプチドは、配列番号1~51若しくは101~111のいずれか1種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。本発明は、さらに、少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物に関し、前記ポリペプチドは、配列番号52~67又は112~122のいずれか1種に記載のアミノ酸配列を有するCDR1領域と、配列番号68~83又は123~133のいずれか1種に記載のアミノ酸配列を有するCDR2領域と、配列番号84~100又は134~144のいずれか1種に記載のアミノ酸配列を有するCDR3領域を含み、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。これらの組成物は抗真菌組成物として使用することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、真菌と結合することにより、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じることが可能である、前記組成物。

## 【請求項 2】

前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、前記真菌の少なくとも 1 種の細胞膜成分と特異的に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*) の細胞膜の脂質含有画分と結合することが可能であり、前記脂質含有画分が、ボトリチス・シネレアの菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数 (Rf) がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能である、前記方法。

10

## 【請求項 4】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 51 若しくは 101 ~ 111 のいずれか 1 種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。

20

## 【請求項 5】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 52 ~ 67 及び 112 ~ 122 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する CDR1 領域と、配列番号 68 ~ 83 及び 123 ~ 133 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する CDR2 領域と、CDR3 領域を含み、任意選択的に、前記 CDR3 領域が、配列番号 84 ~ 100 及び 134 ~ 144 から構成される群から選択される配列を有しており、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。

## 【請求項 6】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 52 に記載のアミノ酸配列を有する CDR1 領域と、配列番号 68 に記載のアミノ酸配列を有する CDR2 領域と、配列番号 84 に記載のアミノ酸配列を有する CDR3 領域を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。

30

## 【請求項 7】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 53 に記載のアミノ酸配列を有する CDR1 領域と、配列番号 69 に記載のアミノ酸配列を有する CDR2 領域と、配列番号 85 に記載のアミノ酸配列を有する CDR3 領域を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。

## 【請求項 8】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を有する CDR1 領域と、配列番号 70 に記載のアミノ酸配列を有する CDR2 領域と、配列番号 86 に記載のアミノ酸配列を有する CDR3 領域を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。

40

## 【請求項 9】

少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 51 若しくは 101 ~ 111 のいずれか 1 種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能であり、前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 51 又は 101 ~ 111 のいずれか 1 種に比較して正電荷の増加をもたらす 1 箇所以上の置換を含む、前記組成物。

50

## 【請求項 10】

前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、抗体又はその機能的断片である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、抗体の重鎖可変ドメイン ( $V_H$ 又は $V_{HH}$ ) 又はその機能的断片である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、前記真菌の少なくとも 1 種の細胞膜成分と特異的に結合する、請求項 4 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 13】

前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、ボトリチス・シネレアの細胞膜の脂質含有画分と結合することが可能であり、前記脂質含有画分が、ボトリチス・シネレアの菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数 ( $R_f$ ) がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能である、請求項 12 に記載の組成物。

10

## 【請求項 14】

前記組成物における前記少なくとも 1 種のポリペプチドの濃度が、0.0001 ~ 50 重量%である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 15】

農薬組成物である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

20

## 【請求項 16】

農芸化学的に適切な基剤及び/又は 1 種以上の適切なアジュバントをさらに含有する、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

前記真菌が、植物病原性真菌である、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記植物病原性真菌の属が、アルテルナリア属 (*Alternaria*)、アスコキタ属 (*Ascochyta*)、ボトリチス属 (*Botrytis*)、セルコスポラ属 (*Cercospora*)、コレトリカム属 (*Colletotrichum*)、ディプロディア属 (*Diplodia*)、エリシフェ属 (*Erysiphe*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、レプトスフェリア属 (*Leptosphaeria*)、ゲウmanoミセス属 (*Gaeumanomyces*)、ヘルミントスポリウム属 (*Helminthosporium*)、マクロフォミナ属 (*Macrophoma*)、ネクトリア属 (*Nectria*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ペロノスポラ属 (*Peronospora*)、フォーマ属 (*Phoma*)、フィマトトリカム属 (*Phymatotrichum*)、フィトフソラ属 (*Phytophthora*)、プラズモパラ属 (*Plasmopara*)、ポドスフェラ属 (*Podosphaera*)、プッチニア属 (*Puccinia*)、ピレノフォラ属 (*Pyrenophora*)、ピリクラリア属 (*Pyricularia*)、ピシウム属 (*Pythium*)、リゾクトニア属 (*Rhizoctonia*)、スクレロチウム属 (*Scerotium*)、スクレロチニア属 (*Sclerotinia*)、セプトリア属 (*Septoria*)、チエラビオプシス属 (*Thielaviopsis*)、ウンシヌラ属 (*Uncinula*)、ベンチュリア属 (*Venturia*)、バーティシリウム属 (*Verticillium*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ブルメリア属 (*Blumeria*)、ミコスフェレラ属 (*Mycosphaerella*)、ウスチラゴ属 (*Ustilago*)、メラムプソラ属 (*Melampsora*)、ファコスボラ属 (*Phakospora*)、モニリニア属 (*Monilinia*)、ムコール属 (*Mucor*)、リゾプス属 (*Rhizopus*)、及びアスペルギルス属 (*Aspergillus*) を含む群から選択される、請求項 17 に記載の組成物。

30

40

## 【請求項 19】

50

少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号１～５１若しくは１０１～１１１のいずれか１種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

【請求項２０】

少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号５２～６７及び１１２～１２２から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ１領域と、配列番号６８～８３及び１２３～１３３から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ２領域と、ＣＤＲ３領域を含み、任意選択的に、前記ＣＤＲ３領域が、配列番号８４～１００及び１３４～１４４から構成される群から選択される配列を有しており、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

10

【請求項２１】

少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号５２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１領域と、配列番号６８に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２領域と、配列番号８４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

【請求項２２】

少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号５３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１領域と、配列番号６９に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２領域と、配列番号８５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

20

【請求項２３】

少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号５４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１領域と、配列番号７０に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２領域と、配列番号８６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

30

【請求項２４】

抗真菌剤としての、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項２５】

植物の抗真菌剤としての、請求項２４に記載の使用。

【請求項２６】

植物又は前記植物の一部を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための方法であって、少なくとも、前記植物又は前記植物の一部を前記植物病原性真菌による前記感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物を前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む、前記方法。

40

【請求項２７】

収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための収穫後処置方法であって、前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を前記植物病原性真菌による前記感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物を前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む、前記方法。

【請求項２８】

植物病原性真菌の成長を阻害する又は植物病原性真菌を殺傷する方法であって、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物を植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施

50

用する工程を少なくとも含む、前記方法。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 30】

真菌と特異的に結合する及び / 又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドの作製方法であって、

真菌標的又は真菌標的に基づく若しくは由来する適切な抗原決定基（例えば、その抗原部分、その断片、その領域、そのドメイン、そのループ又は他のそのエピトープ）を動物に免疫する工程と；

ポリペプチド配列を発現する細胞収集物又はサンプルを前記免疫された動物から取得する工程と；

前記真菌標的と結合する及び / 又は前記真菌標的に対して親和性を有するアミノ酸配列を発現する細胞について、前記細胞収集物又はサンプルをスクリーニングする工程と；

( i ) 前記アミノ酸配列を単離する工程、又は ( i i ) 前記アミノ酸配列をコードする核酸配列を前記細胞収集物若しくはサンプルから単離する工程と；

前記アミノ酸配列を発現させる工程と

を含み、それにより、真菌と特異的に結合する及び / 又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドを作製する、前記方法。

10

【請求項 31】

前記真菌標的が、ボトリチス・シネレアの細胞膜の脂質含有画分であり、前記脂質含有画分が、ボトリチス・シネレアの菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数 ( R f ) がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能である、請求項 30 に記載の方法。

20

【請求項 32】

抗真菌組成物の製造方法であって、

請求項 30 又は 31 に記載の方法に従って抗真菌ポリペプチドを作製する工程と；

前記抗真菌ポリペプチドに 1 種以上の適切な基剤及び / 又は 1 種以上の適切なアジュバントを組み合わせる工程と

を含む、前記方法。

30

【請求項 33】

請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物部分、種子又は植物細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、真菌と結合することが可能な少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物と、前記少なくとも 1 種のポリペプチド自体に関する。本発明は、抗真菌剤としての前記組成物の使用にも関する。本発明はさらに、植物又は前記植物の一部を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための方法、収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための収穫後処置方法、及び植物病原性真菌の成長を阻害する又は植物病原性真菌を殺傷する方法として、前記組成物又は前記ポリペプチドを植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む方法に、関する。また、本発明は、抗真菌ポリペプチドの作製方法と、抗真菌組成物の製造方法にも関する。さらに、本発明は、トランスジェニック植物、植物部分、種子又は植物細胞にも関する。

40

【背景技術】

【0002】

患者及び動物のみならず栽培植物にも見られる病原性真菌感染症の存在と持続は、広域スペクトル抗真菌薬の選択圧と、現在入手可能な抗真菌薬の有効性が一般に不十分である

50

ことが主因であると思われる。

【0003】

ヒト及び動物において、侵襲性カンジダ症や侵襲性アスペルギルス症等の全身性真菌感染症は、種々の真菌病原体により生じると考えられ、例えば、強毒性のカンジダ属 (*Candida*) 菌種であるカンジダ・アルビカンス (*C. albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*C. tropicalis*) 及びカンジダ・クルセイ (*C. krusei*) と、低毒性の菌種であるカンジダ・パラプシロシス (*C. parapsilosis*) 及びトルロプシス・グラブラータ (*Torulopsis glabrata*) (別称カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)) が挙げられる。以前は、カンジダ・アルビカンスが集中治療室から得られる最も一般的な真菌分離株であったが、その後の報告によると、現在ではカンジダ・トロピカリス、カンジダ・グラブラータ、カンジダ・パラプシロシス及びカンジダ・クルセイがこのような分離株の約半数を占めている。非アルビカンス菌種の台頭は、従来の抗真菌薬に耐性のカンジダ属菌種の出現を意味する。

10

【0004】

従来、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・トロピカリス及びカンジダ・パラプシロシスは、全身抗真菌療法「ゴールドスタンダード」とみなされる抗真菌薬であるアムホテリシンBにより治療されていた。残念ながら、アムホテリシンBはそれ自体毒性が強く、その使用は、悪寒、発熱、筋肉痛又は血栓性静脈炎を含む副作用により制限されている。他の抗真菌薬としては、経口アゾール系薬剤 (ミコナゾール、ケトコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾール) と5-フルオロシトシンが挙げられる。しかし、カンジダ・クルセイやトルロプシス・グラブラータ等の真菌種はフルコナゾールに耐性であり、これらの菌種は、この薬剤を予防投与した患者で発生することが多い。さらに、カンジダ・アルビカンスのフルコナゾール耐性株も報告されている。従って、抗真菌治療薬の進歩にも拘わらず、真菌感染症の有効な治療薬の必要性は依然として喫緊の課題である。

20

【0005】

農業において、作物保護は、作物に噴霧したり、作物の灌水中に施用したり、土壌に注入することにより作物に施用される有害生物駆除剤の使用に大きく依存している。有害生物駆除剤は有機化学分子であることが多く、作物に繰り返し施用すると、漂流飛散、土壌残留又は地表若しくは地下水への流出により、作業中の農業労働者と環境のいずれにも毒性の脅威となる。人体及び環境への毒性が低いと同時に植物有害生物の有効な防除を提供する代替化合物を使用できるならば有利であろう。所定の植物有害生物標的に対して特異性をもつタンパク質有害生物駆除剤は、環境に存在する時間が短く、毒性の低いオフターゲット作用があると予想されるので、この点で非常に有利であると思われる。しかし、タンパク質又はペプチド有害生物駆除剤はほんの少数しか知られていない。例を挙げると、Bt毒素、レクチン、デフェンシン、ファバチン、タキプレシン、マガイニン、ハーピン (WO2010019442参照)、エンドウマメアルブミン1サブユニットb (PA1b) がある。しかし、これらのタンパク質有害生物駆除剤は、数個のジスルフィド結合により安定化されたコンパクトな構造の低分子ペプチドであるか、又は結晶形 (cry毒素) で存在する大型のタンパク質 (>300アミノ酸) である。実際に、生物学的製剤、特にタンパク質は、一般に安定性が著しく低く、特に圃場用の農薬製剤中でその有害生物駆除機能を維持できないため、有害生物駆除剤の開発には困難な構造であることが農業分野で知られている。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2010/019442号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

50

本発明者らは、有害生物、特に、限定されないが、例えば植物、動物又はヒト病原性真菌類等の植物、動物又はヒト病原性有害生物の標的に対して驚くほど高い特異性、親和性及び効力を有するポリペプチドを開発することに成功した。前記ポリペプチドは、真菌胞子の細胞膜の特定の脂質画分と結合することができる。前記ポリペプチドが結合するだけで胞子の成長の遅延及び/又は溶菌と破裂により菌糸体形成を防ぎ、殺真菌活性に十分である。従って、前記ポリペプチドは、殺真菌活性又は静真菌活性を有することができる。

【0008】

さらに、これらのポリペプチドは組成物中でその完全性、安定性及び活性を維持することができ、驚くべきことに、本願に開示するポリペプチドを含有する組成物を作物、動物又はヒトに施用することにより、有効な有害生物又は病原体防除を達成することができる

10

【0009】

本願に開示するポリペプチドの有効性と効力は、投与量低減が可能になること及び/又は同一用量でより有効な治療が可能になることを示唆している。これは、農薬用途と医薬用途のいずれにおいても望ましくない副作用の軽減と毒性の低減に繋がると考えられる。さらに、本願に開示するポリペプチド又は組成物をより少ない量又は投与量で施用することも可能になる。

【0010】

より具体的には、本発明者らは、本願で想定されるポリペプチドを有害生物又は病原体の分子構造に標的送達すると、前記病原体を効率的に防除できることを見出した。

20

【0011】

特に、本発明者らは、病原体による感染(の発生)又は病原体、特に真菌病原体との任意の他の生物学的相互作用に対して植物、動物又はヒトを予防、保護、処置又は治療することが可能なポリペプチドを開発した。従って、本発明は、(例えば、病原体による感染を介する)植物、動物又はヒトと病原体の生物学的相互作用による何らかの損傷に対して又はこのような相互作用への曝露に対して植物、動物又はヒトを有効に保護又は処置するために、ポリペプチド又はアミノ酸配列等の生体分子を使用できることを立証する。

【0012】

本発明のポリペプチド及び組成物は、単体製品、例えば抗真菌組成物等の単体組成物として使用することができる。

30

【0013】

本発明のポリペプチド及び組成物は、防御又は予防的に使用することができ、即ち、疾患が存在する前に初回の施用を行う。

【0014】

本発明のポリペプチド及び組成物は、接触型殺真菌剤として使用することができる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

従って、本発明によると、少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物が提供され、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。従って、前記ポリペプチドは、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じる。即ち、前記ポリペプチドが真菌と結合する結果、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じる。

40

【0016】

ポリペプチドも提供され、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。従って、前記ポリペプチドは、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じる。即ち、前記ポリペプチドが真菌と結合する結果、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じる。

【0017】

本発明のポリペプチド及び本発明で使用されるポリペプチドは、真菌の膜又は真菌の膜の成分と(特異的に)結合することができる。ある種の実施形態において、本発明のポリ

50

ペプチド及び本発明で使用されるポリペプチドは、真菌の細胞壁又は細胞壁の成分と（特異的に）結合しない。例えば、ある種の実施形態において、本発明のポリペプチド及び本発明で使用されるポリペプチドは、真菌のグルコシルセラミドと（特異的に）結合しない。

【 0 0 1 8 】

本発明は、少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物も提供し、前記少なくとも１種のポリペプチドは、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア（*Botrytis cinerea*）又は他の真菌）の細胞膜の脂質含有画分と結合することが可能である。前記脂質含有画分は、クロマトグラフィーにより取得可能であり得る。例えば、前記脂質含有画分は、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌糸を全脂質抽出物薄層

10

【 0 0 1 9 】

本発明は、ポリペプチドも提供し、前記少なくとも１種のポリペプチドは、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の細胞膜の脂質含有画分と結合することが可能である。前記脂質含有画分は、クロマトグラフィーにより取得可能であり得る。例えば、前記脂質含有画分は、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（*R<sub>f</sub>*）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により、取得可能であり得る。

20

【 0 0 2 0 】

さらに、本発明は少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物を提供し、前記ポリペプチドは、配列番号 1 ~ 5 1 及び 1 0 1 ~ 1 1 1 のいずれか 1 種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。

【 0 0 2 1 】

本発明によると、少なくとも１種のポリペプチドを含有する組成物も提供され、前記ポリペプチドは、

配列番号 5 2 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 8 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドは真菌と結合することが可能である；

30

配列番号 5 3 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 9 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドは真菌と結合することが可能である；

配列番号 5 4 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 7 0 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドは真菌と結合することが可能である；あるいは

配列番号 5 2 ~ 6 7 及び 1 1 2 ~ 1 2 2 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 8 ~ 8 3 及び 1 2 3 ~ 1 3 3 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 4 ~ 1 0 0 及び 1 3 4 ~ 1 4 4 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドは真菌と結合することが可能である。

40

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、配列番号 1 ~ 5 1 及び 1 0 1 ~ 1 1 1 のいずれか 1 種に記載のアミノ酸配列、又はそのいずれかに対して少なくとも約 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、真菌と結合することが可能なポリペプチドと；

配列番号 5 2 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 8 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3

50



領域を含み、真菌と結合することが可能なポリペプチドと；

配列番号 53 に記載のアミノ酸配列を有する CDR1 領域と、配列番号 69 に記載のアミノ酸配列を有する CDR2 領域と、配列番号 85 に記載のアミノ酸配列を有する CDR3 領域を含み、真菌と結合することが可能なポリペプチドと；

配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を有する CDR1 領域と、配列番号 70 に記載のアミノ酸配列を有する CDR2 領域と、配列番号 86 に記載のアミノ酸配列を有する CDR3 領域を含み、真菌と結合することが可能なポリペプチドと；

配列番号 52 ~ 67 及び 112 ~ 122 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する CDR1 領域と、配列番号 68 ~ 83 及び 123 ~ 133 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する CDR2 領域と、配列番号 84 ~ 100 及び 134 ~ 144 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を有する CDR3 領域を含み、真菌と結合することが可能なポリペプチドを提供する。

10

【0023】

本発明はさらに、配列番号 1 ~ 51 及び 101 ~ 111 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0024】

本発明はさらに、配列番号 1 ~ 10、12 ~ 51 及び 101 ~ 111 から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0025】

本発明はさらに、配列番号 52 ~ 67 及び 112 ~ 122 から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成される CDR1 領域と、配列番号 68 ~ 83 及び 123 ~ 133 から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成される CDR2 領域と、配列番号 84 ~ 100 及び 134 ~ 144 から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成される CDR3 領域を有するポリペプチドを提供する。

20

【0026】

本発明はさらに、配列番号 1 ~ 51 から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して 1 箇所まで、2 箇所まで、3 箇所まで、4 箇所まで若しくは 5 箇所までのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。前記アミノ酸置換は、前記ポリペプチドの総電荷を増加させてもよいし、前記ポリペプチドの総電荷を変化させなくてもよい。

30

【0027】

本発明はさらに、配列番号 1 ~ 10 及び 12 ~ 51 から構成される群から選択されるアミノ酸配列又は前記配列に対して 1 箇所まで、2 箇所まで、3 箇所まで、4 箇所まで若しくは 5 箇所までのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。前記アミノ酸置換は、前記ポリペプチドの総電荷を増加させてもよいし、前記ポリペプチドの総電荷を変化させなくてもよい。

【0028】

本発明のポリペプチドはいずれも組成物、例えば、農薬組成物で提供することができる。

40

【0029】

本願に開示する組成物は、少なくとも 1 種の抗体又はその機能的断片を含有することができ、限定されないが、例えば、重鎖抗体又はその機能的断片が挙げられる。

【0030】

本願に開示する組成物は、天然では軽鎖をもたない重鎖抗体の少なくとも 1 個の重鎖可変ドメイン (V<sub>H</sub>H) 又はその機能的断片を含有することができ、限定されないが、例えば、ラクダ重鎖抗体の重鎖可変ドメイン (ラクダ V<sub>H</sub>H) 又はその機能的断片が挙げられる。

【0031】

50

本願に開示する組成物は、従来の4本鎖抗体の少なくとも1個のラクダ化重鎖可変ドメイン（ラクダ化V<sub>H</sub>）、又はその機能的断片を含有することができる。

【0032】

本願に開示する組成物は、天然V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列（例えば、哺乳動物、特にヒトに由来する天然V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列）と厳密に同一の（即ち、配列同一性が100%の）アミノ酸配列をもたない抗体の少なくとも1個の重鎖可変ドメイン又はその機能的断片を含有することができる。

【0033】

本願に開示する組成物は、農薬組成物とすることができる。

【0034】

本願に開示する農薬組成物は、少なくとも真菌の少なくとも1種の細胞膜成分と特異的に結合するポリペプチドを含有することができる。

【0035】

本願に開示する組成物に含まれる前記ポリペプチドが結合する真菌の前記少なくとも1種の細胞膜成分は、タンパク質以外のものでもよい。

【0036】

本願に開示する農薬組成物における前記少なくとも1種のポリペプチドは、ヒト又は動物又は植物又はそのいずれかの一部を真菌病原体による感染又は真菌病原体との他の生物学的相互作用に対して保護又は処置するために有効な量で存在することができ、限定されないが、例えば、前記農薬組成物における前記ポリペプチドの濃度は0.0001~50重量%である。

【0037】

本願に開示する農薬組成物における前記少なくとも1種のポリペプチドは、限定されないが、任意選択的に、農芸化学的に適切な基剤及び/又は1種以上の適切なアジュバント等の適切な基剤及び/又は1種以上の適切なアジュバントと共に、水溶液で製剤化することができる。

【0038】

本願に開示する農薬組成物は、病原性真菌、即ち、植物病原性真菌と特異的に結合する少なくとも1種のポリペプチドを含有することができる。

【0039】

本願に開示する農薬組成物は、限定されないが、アルテルナリア属（*Alternaria*）、アスコキタ属（*Ascochyta*）、ボトリチス属（*Botrytis*）、セルコスボラ属（*Cercospora*）、コレトリカム属（*Colletotrichum*）、ディプロディア属（*Diplodia*）、エリシフェ属（*Erysiphe*）、フザリウム属（*Fusarium*）、レプトスフェリア属（*Leptosphaeria*）、ゲウマノミセス属（*Gaeumannomyces*）、ヘルミントスポリウム属（*Helminthosporium*）、マクロフォミナ属（*Macrophomina*）、ネクトリア属（*Nectria*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）、ペロノスポラ属（*Peronospora*）、フォーマ属（*Phoma*）、フィマトトリカム属（*Phymatotrichum*）、フィトフトラ属（*Phytophthora*）、プラズモパラ属（*Plasmopara*）、ポドスフェラ属（*Podosphaera*）、プッチニア属（*Puccinia*）、ピレノフォラ属（*Pyrenophora*）、ピリクラーリア属（*Pyricularia*）、ピシウム属（*Pythium*）、リゾクトニア属（*Rhizoctonia*）、スクレロチウム属（*Scerotium*）、スクレロチニア属（*Sclerotinia*）、セプトリア属（*Septoria*）、チエラビオプシス属（*Thielaviopsis*）、ウンシヌラ属（*Uncinula*）、ベンチュリア属（*Venturia*）、パーティシリウム属（*Verticillium*）、マグナポルテ属（*Magnaporthe*）、ブルメリア属（*Blumeria*）、ミコスフェレラ属（*Mycosphaerella*）、ウスチラゴ属（*Ustilago*）、メラムプソラ属（*Melampsora*）、ファコプソラ属（*Phakospora*）、モニリ

10

20

30

40

50

ニア属 ( *Monilinia* )、ムコール属 ( *Mucor* )、リゾプス属 ( *Rhizopus* )、及びアスペルギルス属 ( *Aspergillus* ) を含む群から選択される属の植物病原性真菌等の植物病原性真菌と特異的に結合する少なくとも 1 種のポリペプチドを含有することができる。

【 0 0 4 0 】

本願に開示する農薬組成物は、穀類、モロコシ、イネ、テンサイ、飼料ビート、果樹、堅果、オオバコ科又はブドウ、マメ科作物、油料作物、ウリ科植物、繊維植物、燃料作物、野菜、観賞植物、灌木、広葉樹、常緑樹、草類、コーヒー、チャ、タバコ、ホップ、コショウ、ゴム及びラテックス植物を含む群から選択される植物の真菌である真菌と特異的に結合する少なくとも 1 種のポリペプチドを含むことができる。

10

【 0 0 4 1 】

本願に開示する農薬組成物における前記少なくとも 1 種のポリペプチドは、少なくとも

【 化 1 】

QVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASRSIFSNAMDWYRQAPGKQREWVAGITRGGTTKYADSVKGRFTISRDNAKKK

VYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVLRGEQPWTRDYWGQGTQVTVSS (配列番号 1);

DVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASRSIFSNAMDWYRQAPGKQREWVAGITRGGTTKYADSVKGRFTISRDNAKKK

VYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVLRGEQPWTRDYWGQGTQVTVSS (配列番号 : 2);

QVQLQESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGTIFRPTAMGWYRQAPGKERELVATITTTGGSTKYADSVKGRFTISRGNAKNT

VYLQMSLKPEDTAVYYCNAQWVTRDYWGQGTQVTVSS (配列番号 : 3);

20

DVQLQESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGTIFRPTAMGWYRQAPGKERELVATITTTGGSTKYADSVKGRFTISRGNAKNT

VYLQMSLKPEDTAVYYCNAQWVTRDYWGQGTQVTVSS (配列番号 : 4);

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASISDRAFSRHMVGFWRQPPGKEREFVAAIGWTGRRTYYADSVKGRFTISRDNA

MNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASHFYSVSFEINDYDYWGQGTQVTVSS (配列番号 : 5); 及び/又は

DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASISDRAFSRHMVGFWRQPPGKEREFVAAIGWTGRRTYYADSVKGRFTISRDNA

MNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASHFYSVSFEINDYDYWGQGTQVTVSS (配列番号 : 6)

又はそのいずれかに対して少なくとも約 80% の配列同一性を有する配列を含むことができ、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。

30

【 0 0 4 2 】

本願に開示する農薬組成物における前記少なくとも 1 種のポリペプチドは、少なくとも配列 R S I F S I N A M D (配列番号 52) を有する C D R 1 領域と、配列 G I T R G G T T K (配列番号 68) を有する C D R 2 領域と、配列 L R G E Q P W T R D Y (配列番号 84) を有する C D R 3 領域のアミノ酸配列を含むことができ、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。

【 0 0 4 3 】

本願に開示する農薬組成物における前記少なくとも 1 種のポリペプチドは、少なくとも配列 G T I F R P T A M G (配列番号 53) を有する C D R 1 領域と、配列 T I T T G G S T K (配列番号 69) を有する C D R 2 領域と、配列 Q W G V R T R D Y (配列番号 85) を有する C D R 3 領域のアミノ酸配列を含むことができ、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。

40

【 0 0 4 4 】

本願に開示する農薬組成物における前記少なくとも 1 種のポリペプチドは、少なくとも配列 I S D R A F S R H V (配列番号 54) を有する C D R 1 領域と、配列 A I G W T G R R T Y (配列番号 70) を有する C D R 2 領域と、配列 S H F Y S V S F E I N D Y D (配列番号 86) を有する C D R 3 領域のアミノ酸配列を含むことができ、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。

【 0 0 4 5 】

本願に開示する農薬組成物における前記少なくとも 1 種のポリペプチドは、少なくとも

50

本願に開示する他のポリペプチドのいずれかのCDR1領域とCDR2領域とCDR3領域を含むことができる。

【0046】

本願に開示するポリペプチドは、一般に真菌と結合することが可能である。

【0047】

別の態様において、本発明は、抗真菌剤として使用するために真菌と特異的に結合する少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物を提供する。本発明はさらに、抗真菌剤として使用するために真菌と特異的に結合するポリペプチドも提供する。

【0048】

従って、本発明は、少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物を提供し、前記ポリペプチドは、

配列番号1～51及び101～111から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又はそのいずれかに対して少なくとも約80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドは、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である；あるいは、

配列番号52～67及び112～122から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1領域と、配列番号68～83及び123～133から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2領域と、配列番号84～100及び134～144から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3領域を含み、前記ポリペプチドは、真菌と結合することが可能である。本発明はさらに、抗真菌剤としての、本願に開示する組成物又はポリペプチドの使用を提供する。このような使用は、植物の抗真菌剤としての使用とすることができる。従って、本発明は、植物の抗真菌剤としての、真菌と特異的に結合する少なくとも1種のポリペプチドを含有する農薬組成物の使用を提供する。

【0049】

本発明において、抗真菌剤は静真菌剤及び/又は殺真菌剤とすることができる。

【0050】

本発明はさらに、本願に開示するポリペプチド配列のいずれかをコードする核酸配列を提供する。

【0051】

また、本発明は、植物又は植物の一部を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための方法として、本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む方法を、提供する。前記農薬組成物又はポリペプチドは、前記植物又は前記植物の一部を前記植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で施用することができる。

【0052】

これらの方法は、本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを、例えば1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド50g超の施用量で前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含むことができ、限定されないが、1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド75g超の施用量、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド100g超の施用量、又は特に1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド200g超の施用量が挙げられる。

【0053】

これらの方法は、本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド50g～100gの施用量で前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含むことができ、限定されないが、1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド50g～200gの施用量、特に1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド75g～175gの施用量、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物又はポリペプチド75g～150g又は1ヘクタール当たり75g～125gの施用量が挙げられる。

【0054】

本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドは、任意選択的に収穫後に噴霧、霧化、発泡、煙霧、ハイドロカルチャー栽培、水耕栽培、コーティング、液浸、及び/又は粉衣により、前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用することができる。

【0055】

本発明はさらに、収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための収穫後処置方法として、前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を前記植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で、本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む方法も、提供する。

【0056】

本発明はさらに、植物病原性真菌の成長を阻害する方法又は植物病原性真菌を殺傷する方法として、本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む方法も、提供する。

【0057】

これらの方法では、任意選択的に収穫後に噴霧、霧化、発泡、煙霧、ハイドロカルチャー栽培、水耕栽培、コーティング、液浸、及び/又は粉衣により、本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用することができる。

【0058】

さらに別の態様において、本発明は、真菌と特異的に結合する及び/又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドの作製方法を提供し、前記方法は、真菌標的、又は真菌に基づく若しくは由来する適切な抗原決定基（例えば、その抗原部分、その断片、その領域、そのドメイン、そのループ又は他のそのエピトープ）を動物に免疫する工程と；

ポリペプチド配列を発現する細胞収集物又はサンプルを前記免疫動物から取得する工程と；

前記真菌標的と結合する及び/又は前記真菌標的に対して親和性を有するアミノ酸配列を発現する細胞について、前記細胞収集物又はサンプルをスクリーニングする工程と；

(i) 前記アミノ酸配列を単離する工程、又は(ii) 前記アミノ酸配列をコードする核酸配列を前記細胞収集物若しくはサンプルから単離する工程と；

前記アミノ酸配列を発現させる工程とを含み、それにより、真菌と特異的に結合する及び/又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドを作製する。

【0059】

免疫は、粗脂質抽出物又は全脂質抽出物を使用して実施することができる。例えば、ある種の実施形態では、例えば、2:1及び1:2 (v/v) 比のクロロホルム:メタノールを使用して室温で真菌菌糸及び/又は分生子（例えば、フザリウム・オキシスポルム (Fusarium oxysporum) 又はボトリチス・シネレアの真菌菌糸及び/又は分生子) を抽出することができる。こうして調製した抽出物を合一し、乾燥し、免疫用の粗脂質抽出物又はTLEとすることができる。

【0060】

前記真菌標的は、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア）の細胞膜の脂質含有画分とすることができる。前記脂質含有画分は、クロマトグラフィーにより取得可能であり得る。例えば、前記脂質含有画分は、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数 (R<sub>f</sub>) がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により、取得可能であり得る。

【0061】

抗真菌組成物の製造方法も提供され、前記方法は、上記方法に従って抗真菌ポリペプチドを作製する工程と、前記抗真菌ポリペプチドに1種以上の適切な基剤及び/又は1種以

10

20

30

40

50

上の適切なアジュバントを組み合わせる工程とを含む。

【0062】

本願に記載するポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物部分、種子又は植物細胞も本発明により提供される。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】用量を段階的に増加させたVHH10G11Qの存在下における真菌成長をIncucyteによりモニターした結果を示す。

【図2】用量を段階的に増加させたVHH10G11Q及びVHH41D01の存在下における真菌成長をIncucyteによりモニターした結果を示す。

【図3】10G11のCDR領域における1アミノ酸置換（配列番号17～50）の抗真菌活性を示す。10G11活性との比較結果を示す。

【図4】10G11Q-Hisのhisタグ付き変異体（配列番号6及び配列番号17～50）の抗真菌活性を示す、10G11Q活性との比較結果を示す。

【図5】10G11分子のモデルタンパク質構造を3個のCDR領域の表示と共に示す。選択されたアミノ酸残基を棒モデルとしてリボン図に示す。

【図6】10G11電荷変異体の抗真菌活性を示す。10G11活性との比較結果を示す。

【図7】10G11電荷変異突然変異体9（配列番号14）のモデルタンパク質構造を3個のCDR領域の表示と共に示す。選択されたアミノ酸残基を棒モデルとしてリボン図に示す。

【図8】10G11電荷変異突然変異体11（配列番号16）のモデルタンパク質構造を3個のCDR領域の表示と共に示す。選択されたアミノ酸残基を棒モデルとしてリボン図に示す。

【図9】延長抗真菌アッセイの結果を示し、突然変異体3、9及び11と10G11分子の効果を示す。

【図10】全脂質抽出物に存在する4個の異なる画分の薄層クロマトグラフィー分離を示す。

【図11】蛍光分子DPDを含む種々の組成物のリポソームベシクルと10G11の結合の結果を示す。

【図12】画分3に対する10G11の結合プロファイルをバイオレイヤー干渉法（BLI）により求め、基準VHHと比較して示す。

【図13】10E11Q-His（配列番号86）、12C03Q-His（配列番号87）及び10G11Q-His（配列番号88）と画分3の結合をELISAにより検出した結果を示す。

【図14】未処理と10G11で処理後のボトリチス・シネレア（*Botrytis cinerea*）の顕微鏡画像を示す。処理後のボトリチス・シネレアの拡大図を右端に示す。

【図15】種々の化合物を施用後の草冠下部におけるアジア型ダイズさび病の%PESS EVの変化を示す。

【図16】種々の化合物を施用後の草冠中部におけるアジア型ダイズさび病の%PESS EVの変化を示す。

【図17】種々の化合物を施用後の草冠上部におけるアジア型ダイズさび病の%PESS EVの変化を示す。

【図18】種々の化合物を施用後のカボチャの炭疽病の重症度の変化を示す。

【図19】種々の化合物を施用後のブドウの房の灰色かび病（*Botrytis cinerea*）の重症度の変化を示す、

【図20】種々の化合物を施用後のブドウの葉のうどんこ病の重症度の変化を示す。

【図21】種々の化合物を施用後のブドウの房のうどんこ病の重症度の変化を示す。

【図22】種々の化合物を施用後のトマトのうどんこ病の重症度の変化を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 3】種々の化合物を施用後のトマトのうどんこ病の発生率の変化を示す。

【図 2 4】種々の化合物を施用後のイチゴのうどんこ病の重症度の変化を示す。

【図 2 5】種々の化合物を施用後のイチゴのうどんこ病の発生率の変化を示す。

【図 2 6】種々の化合物を施用後で収穫時の灰色かび病に感染したイチゴ果実数を示す。

【図 2 7】種々の化合物を施用後で収穫後のイチゴ果実の灰色かび病重症度の変化を示す。

【図 2 8】種々の化合物を施用後のイチゴのうどんこ病の重症度の変化を示す。

【図 2 9】Kdを求めるために使用したELISA吸収プロットを示す。

【図 3 0 - 1】本発明のポリペプチドの複数例の配列を示し、全長配列の配列番号と、FR1領域、CDR1領域、FR2領域、CDR2領域、FR3領域、CDR3領域及びFR4領域の位置とを示す。本図の配列と配列表の配列とに不一致がある場合には、本図の配列を優先する。 10

【図 3 0 - 2】本発明のポリペプチドの複数例の配列を示し、全長配列の配列番号と、FR1領域、CDR1領域、FR2領域、CDR2領域、FR3領域、CDR3領域及びFR4領域の位置とを示す。本図の配列と配列表の配列とに不一致がある場合には、本図の配列を優先する。

【図 3 0 - 3】本発明のポリペプチドの複数例の配列を示し、全長配列の配列番号と、FR1領域、CDR1領域、FR2領域、CDR2領域、FR3領域、CDR3領域及びFR4領域の位置とを示す。本図の配列と配列表の配列とに不一致がある場合には、本図の配列を優先する。 20

【図 3 0 - 4】本発明のポリペプチドの複数例の配列を示し、全長配列の配列番号と、FR1領域、CDR1領域、FR2領域、CDR2領域、FR3領域、CDR3領域及びFR4領域の位置とを示す。本図の配列と配列表の配列とに不一致がある場合には、本図の配列を優先する。

【図 3 0 - 5】本発明のポリペプチドの複数例の配列を示し、全長配列の配列番号と、FR1領域、CDR1領域、FR2領域、CDR2領域、FR3領域、CDR3領域及びFR4領域の位置とを示す。本図の配列と配列表の配列とに不一致がある場合には、本図の配列を優先する。

【図 3 1】CDR2全体を生殖細胞系列配列で置換した10G11と、CDR3領域全体を基準VHHのCDR3で置換した10G11の抗真菌活性を示す。10G11活性との比較結果を示す。 30

【0064】

配列表の説明

配列表は、少なくとも表9の下記配列を示す。

【0065】

【表 1】

VHH	全長配列 配列番号	CDR1 配列番号	CDR2 配列番号	CDR3 配列番号
10G11Q	1	52	68	84
10G11	2	52	68	84
10E11Q	3	53	69	85
10E11	4	53	69	85
12C03Q	5	54	70	86
12C03	6	54	70	86
突然変異体 1	7	55	68	84
突然変異体 2	8	52	71	84
突然変異体 3	9	52	68	87
突然変異体 4	10	55	71	87
突然変異体 5	11	55	71	87
突然変異体 6	12	56	68	84
突然変異体 7	13	52	68	88
突然変異体 8	14	56	68	88
突然変異体 9	15	57	68	84
突然変異体 10	16	52	68	89
突然変異体 11	17	57	68	89
シングル ALA 突然変異体 1	18	58	68	84
シングル ALA 突然変異体 2	19	59	68	84
シングル ALA 突然変異体 3	20	60	68	84
シングル ALA 突然変異体 4	21	61	68	84
シングル ALA 突然変異体 5	22	62	68	84
シングル ALA 突然変異体 6	23	63	68	84
シングル ALA 突然変異体 7	24	64	68	84
シングル ALA 突然変異体 8	25	65	68	84
シングル ALA 突然変異体 9	26	66	68	84
シングル ALA 突然変異体 10	27	67	68	84
シングル ALA 突然変異体 11	28	52	72	84
シングル ALA 突然変異体 12	29	52	73	84
シングル ALA 突然変異体 13	30	52	74	84
シングル ALA 突然変異体 14	31	52	75	84
シングル ALA 突然変異体 15	32	52	76	84
シングル ALA 突然変異体 16	33	52	77	84
シングル ALA 突然変異体 17	34	52	78	84
シングル ALA 突然変異体 18	35	52	79	84
シングル ALA 突然変異体 19	36	52	80	84
シングル ALA 突然変異体 20	37	52	81	84
シングル ALA 突然変異体 21	38	52	82	84
シングル ALA 突然変異体 22	39	52	83	84
シングル ALA 突然変異体 23	40	52	68	84
シングル ALA 突然変異体 24	41	52	68	90
シングル ALA 突然変異体 25	42	52	68	91
シングル ALA 突然変異体 26	43	52	68	92

10

20

30

40

50



シングルALA 突然変異体 27	44	52	68	93
シングルALA 突然変異体 28	45	52	68	94
シングルALA 突然変異体 29	46	52	68	95
シングルALA 突然変異体 30	47	52	68	96
シングルALA 突然変異体 31	48	52	68	97
シングルALA 突然変異体 32	49	52	68	98
シングルALA 突然変異体 33	50	52	68	99
シングルALA 突然変異体 34	51	52	68	100
10G11-A	101	112	123	134
10G11-B	102	113	124	135
10G11-C	103	114	125	136
10G11-D	104	115	126	137
10G11-E	105	116	127	138
10G11-F	106	117	128	139
10G11-G	107	118	129	140
10G11-H	108	119	130	141
10G11-I	109	120	131	142
10G11-J	110	121	132	143
10G11-K	111	122	133	144

表9:配列番号とポリペプチド及びCDR 配列の相関

10

20

## 【発明を実施するための形態】

## 【0066】

## 発明の詳細な説明

本明細書中で従来技術について言及する場合には、この従来技術がいずれかの国における一般常識を構成するという認識又は何らかの形の示唆とみなすものではなく、また、みなすべきではない。

## 【0067】

本明細書中に引用する全文献は、その開示内容全体を本願に援用する。特に他の定義がない限り、科学技術用語を含めて本発明を開示するのに使用する全用語は、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者に広く理解されている意味とする。

30

## 【0068】

以下、特定の実施形態について本発明を記載するが、本発明はこれらの実施形態に制限されず、特許請求の範囲のみに制限される。特許請求の範囲に参照符号を記載する場合には、請求の範囲を制限するものと解釈すべきではない。

## 【0069】

## 定義

本明細書及び特許請求の範囲において「含む」なる用語を使用する場合には、他の要素又は工程を排除するものではない。

## 【0070】

単数名詞に言及する際に例えば、「a」又は「an」、「the」等の不定冠詞又は定冠詞を使用する場合には、特に指定しない限り、この名詞の複数も含む。

40

## 【0071】

パラメーター、量、時間等の測定可能な数値に言及する際に本願で使用する「約」なる用語は、指定値の $\pm 10\%$ 以下、好ましくは $\pm 5\%$ 以下、より好ましくは $\pm 1\%$ 以下、さらに好ましくは $\pm 0.1\%$ 以下の変動を含むという意味であり、但し、このような変動は本願に開示する発明において適切なものとする。当然のことながら、「約」を付けた数値自体も具体的に好ましい数値として開示される。

## 【0072】

以下の用語又は定義は本発明の理解を助けることのみを目的とする。本願で特に定義し

50

ない限り、本願で使用する全用語は、本発明の当業者に使用されていると同一の意味である。当技術分野の定義及び用語について、実施者は特に、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Plainville, New York (1989); 及び Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999) を参照されたい。本願に記載する定義は、当技術分野における通常の知識を有する者に理解される範囲よりも狭い範囲であると解釈すべきではない。

【0073】

10

特に指定しない限り、当業者に自明の通り、具体的に詳細に記載しない全方法、工程、技術及び操作は、それ自体公知の方法で実施することができ、また、それ自体公知の方法で実施した。この点についても、例えば、標準ハンドブック、上記一般背景技術及び本願に引用する他の参考文献を参照されたい。

【0074】

本願で使用する「ポリペプチド」、「タンパク質」、「ペプチド」及び「アミノ酸配列」なる用語は同義に使用され、任意長のポリマー形のアミノ酸を意味し、コード化アミノ酸と非コード化アミノ酸、化学的又は生化学的に修飾又は誘導体化されたアミノ酸、及び修飾ペプチド主鎖を有するポリペプチドを含むことができる。

【0075】

20

本願で使用するアミノ酸残基は、その全文字表記により表す場合もあるし、標準3文字又は1文字アミノ酸コードに従って表す場合もある。

【0076】

本願で使用する「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、「核酸」なる用語は同義に使用され、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド又はそのアナログである任意長のポリマー形のヌクレオチドを意味する。ポリヌクレオチドは任意の三次元構造を有することができ、公知又は非公知の任意の機能を実施することができる。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子、遺伝子断片、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意配列の単離型DNA、調節領域、任意配列の単離型RNA、核酸プローブ、及びプライマーが挙げられる。前記核酸分子は直鎖状でも環状でもよい。

30

【0077】

本願で使用する「相同性」なる用語は、同一又は異なるタキソンに由来する2個の高分子間、特に2個のポリペプチド又はポリヌクレオチド間の少なくとも二次構造類似性を意味し、前記類似性は共通の祖先に起因する。従って、「相同」なる用語は、前記二次構造類似性及び任意選択的に三次構造類似性を有するこのような関係の高分子を意味する。2個以上のヌクレオチド配列を比較するには、当業者に公知の方法を使用して第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列の「配列同一性(の百分率)」を計算することができ、例えば、第1のヌクレオチド配列において第2のヌクレオチド配列の対応する位置のヌクレオチドと同一のヌクレオチドの数を第1のヌクレオチド配列における総ヌクレオチド数で割り、100%を掛ける方法や、NCBI Blast等の配列アラインメントの公知コンピューターアルゴリズムを使用する方法がある。2個のアミノ酸配列間の配列同一性を決定する際に、当業者は、アミノ酸残基を類似の化学構造の別のアミノ酸残基で置き換えても前記ポリペプチドの機能、活性又は他の生物学的性質に殆ど又は実質的に全く影響を生じないアミノ酸置換として一般に説明することができる所謂「保存的」アミノ酸置換を考慮することができる。可能な保存的アミノ酸置換は当業者に自明である。アミノ酸配列及び核酸配列は、その全長にわたって100%の配列同一性を有する場合に「厳密に同一である」と言う。

40

【0078】

50

抗体の文脈内において本願で使用する「相補性決定領域」又は「CDR」なる用語は、H（重）鎖又はL（軽）鎖のいずれかの可変領域（夫々VH及びVLと略称する）を意味し、抗原標的と特異的に結合することが可能なアミノ酸配列を含む。これらのCDR領域は、特定の抗原決定基構造に対する抗体の塩基特異性を決定する。このような領域は「超可変領域」とも呼ばれる。CDRは、可変領域内の不連続アミノ酸ストレッチに相当するが、分子種に関係なく、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域内のこれらの重要なアミノ酸配列の配置位置は、可変領域鎖のアミノ酸配列内に類似の位置を有することが分かっている。全ての標準的抗体の重鎖及び軽鎖可変領域は、夫々の軽（L）鎖及び重（H）鎖で相互に不連続な各々3個のCDR領域（L1、L2、L3、H1、H2、H3と呼ぶ）を有する。

10

**【0079】**

本願で使用する「親和性」なる用語は、ポリペプチド、特に抗体等の免疫グロブリン又はVHH等の免疫グロブリン断片が、抗原とポリペプチドの平衡をそれらの結合により形成される複合体の存在の側にシフトするように抗原と結合する程度を意味する。従って、例えば、抗原と抗体（断片）を比較的等しい濃度で合わせる場合には、高親和性の抗体（断片）は、得られる複合体の高濃度の側に平衡をシフトさせるように、利用可能な抗原と結合するであろう。タンパク質結合ドメインと抗原標的の親和性を表すために、解離定数が広く使用されている。一般的に、解離定数は $10^{-5}$  M未満である。解離定数は $10^{-6}$  M未満であることが好ましく、 $10^{-7}$  M未満であることがより好ましい。解離定数は $10^{-8}$  M未満であることが最も好ましい。

20

**【0080】**

本願で使用する「特異的に結合する」及び「特異的結合」なる用語は、一般に、ポリペプチド、特に抗体等の免疫グロブリン又はVHH等の免疫グロブリン断片が種々の抗原の均一な混合物中に存在する特定の抗原と優先的に結合する能力を意味する。所定の実施形態において、特異的結合相互作用は、試料中の望ましい抗原と望ましくない抗原を区別し、ある種の実施形態では、約10倍～100倍超又はそれ以上（例えば、約1000倍又は10,000倍超）の差で区別するであろう。

**【0081】**

従って、本願に開示するアミノ酸配列は、前記アミノ酸配列が特定の標的に対して（又は少なくともその1部分若しくは断片に対して）親和性を有する、特異性を有する、及び/又は特異的に関連するときに、前記標的と「特異的に結合する」と言う。

30

**【0082】**

本願に開示するアミノ酸配列の「特異性」は、親和性及び/又はアビディティに基づいて決定することができる。

**【0083】**

本願に開示するアミノ酸配列は、このアミノ酸配列が第2の該当標的抗原と結合する際の親和性の少なくとも5倍、例えば、少なくとも10倍、例えば、少なくとも100倍、好ましくは少なくとも1000倍の親和性で第1の該当標的抗原と結合するときに、「第2の該当標的抗原と比較して第1の該当標的抗原に特異的」とであると言う。従って、所定の実施形態において、本願に開示するアミノ酸配列が第2の該当標的抗原と比較して第1の該当標的抗原「に特異的」とであると言うときには、前記アミノ酸配列は、前記第1の該当標的抗原と（本願に定義するように）特異的に結合することができるが、前記第2の該当標的抗原とは結合することができない。

40

**【0084】**

本願で使用する「阻害する」、「抑制する」及び/又は「妨害する」なる用語は、該当標的抗原と特異的に結合し、該当標的抗原とその天然結合パートナーの相互作用を阻害、抑制及び/又は妨害するような本願に開示するアミノ酸配列（の使用）を意味する。「阻害する」、「抑制する」及び/又は「妨害する」なる用語は、該当標的抗原と特異的に結合し、適切なインビトロアッセイ、細胞アッセイ又はインビボアッセイを使用して測定した場合に前記該当標的抗原の生物学的活性を阻害、抑制及び/又は妨害するような本願に

50

開示するアミノ酸配列（の使用）を意味する場合もある。従って、「阻害する」、「抑制する」及び／又は「妨害する」とは、該当標的抗原と特異的に結合し、該当標的抗原が関与する１種以上の生物学的又は生理的機序、作用、応答、機能、経路又は活性を阻害、抑制及び／又は妨害するような本願に開示するアミノ酸配列（の使用）を意味する場合もある。本願に開示するアミノ酸配列の拮抗薬としてのこのような作用は、該当標的抗原に応じて、任意の適切な方法で及び／又は当技術分野で公知の任意の適切な（インビトロ、通常では細胞又はインビボ）アッセイを使用して測定することができる。

【 0 0 8 5 】

従って、より特定的には、本願に開示するアミノ酸配列を使用して「阻害する」、「抑制する」及び／又は「妨害する」とは、該当標的抗原とその天然結合パートナーの相互作用を阻害、抑制及び／又は妨害すること、あるいは該当標的抗原の活性を阻害、抑制及び／又は妨害すること、あるいは適切なインビトロ、細胞又はインビボアッセイを使用して測定した場合に、本願に開示するアミノ酸配列を使用しない以外は同一条件下で同一アッセイを使用して測定した該当標的抗原の活性に比較して、該当標的抗原が関与する１種以上の生物学的又は生理的機序、作用、応答、機能、経路又は活性を、例えば、少なくとも１０％、好ましくは少なくとも２０％、例えば、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％以上阻害、抑制及び／又は妨害することを意味することができる。さらに、「阻害する」、「抑制する」及び／又は「妨害する」とは、本願に開示するアミノ酸配列を使用しない以外は同一条件に比較して、その天然結合パートナーの１種以上に対する該当標的抗原の親和性、アピディティ、特異性及び／又は選択性の低下を誘導すること、及び／又は該当標的抗原が存在する媒体又は環境における１種以上の条件（例えば、pH、イオン強度、補因子の存在等）に対する該当標的抗原の感受性の低下を誘導することを意味する場合もある。本発明の文脈で、「阻害する」、「抑制する」及び／又は「妨害する」とは、該当標的抗原の活性のアロステリックな阻害、抑制及び／又は妨害を意味する場合もある。

【 0 0 8 6 】

本願に開示するアミノ酸配列の阻害若しくは拮抗活性又は亢進若しくは賦活活性は、可逆的でも不可逆的でもよいが、農芸化学的、薬学的及び薬理的用途では、一般的に可逆的に生じるであろう。

【 0 0 8 7 】

本願に開示するアミノ酸配列は、このアミノ酸配列が生産される宿主細胞及び／又は培地から抽出又は精製されているときに、本願で使用する「本質的に単離（型）（である）」とみなされる。

【 0 0 8 8 】

本願に開示するアミノ酸配列に関して、本願に開示するアミノ酸配列上に存在する「結合領域」、「結合部位」又は「相互作用部位」なる用語は、本願では、標的分子上に存在する特定部位、領域、遺伝子座、部分又はドメインの意味であり、前記特定部位、領域、遺伝子座、部分又はドメインは、前記標的分子との結合に関与する。従って、このような結合領域は、前記標的分子と結合しているときに前記アミノ酸配列と接触している前記標的分子の前記特定部位、領域、遺伝子座、部分又はドメインから本質的に構成される。

【 0 0 8 9 】

本願で使用する「植物」とは、植物全体又はその一部を意味し、新鮮な果樹、野菜及び種子を含む。植物又は植物部分は生きた植物又はその部分とすることができる。また、本願で使用する「植物」なる用語は、植物全体、前記植物及び植物部分の祖先及び子孫も含み、種子、苗条、茎、葉、根（塊茎を含む）、花、並びに組織及び器官を含み、上記の各々が該当遺伝子／核酸を含む。「植物」なる用語は、植物細胞、懸濁培養液、カルス組織、胚、分裂組織領域、配偶体、孢子体、花粉及び小孢子も含み、同様に上記の各々が該当遺伝子／核酸を含む。

【 0 0 9 0 】

適切な対照植物の選択は、実験構成の日常的部分であり、対応する野生型植物又は該当

10

20

30

40

50

遺伝子を含まない対応する植物が挙げられる。対照植物は、一般的に評価しようとする植物と同一植物種であるか、又は同一品種である。対照植物は、評価しようとする植物のヌル接合体でもよい。ヌル接合体は、分離によりトランスジーンを欠失する個体である。本願で使用する「対照植物」とは、植物全体だけでなく、種子と種子部分を含む植物部分も意味する。

#### 【0091】

本願で使用する「作物」とは、食糧、家畜飼料、燃料原料として又は任意の他の経済的目的で収穫される植物種又は品種を意味する。非限定的な1例として、前記作物は、トウモロコシ、コムギ、ライムギ、オオムギ及びエンバク、モロコシ、イネ、テンサイ及び飼料用ビート等の穀類、仁果類（例えば、リンゴ及びナシ）、柑橘類（例えば、オレンジ、レモン、ライム、グレープフルーツ又はマンダリンオレンジ）、核果類（例えば、モモ、ネクタリン又はプラム）、堅果類（例えば、アーモンドやクルミ）、ソフトフルーツ（例えば、サクランボ、イチゴ、ブラックベリー又はラズベリー）、オオバコ科又はブドウ等の果樹、マメ類、レンズマメ、エンドウマメ及びダイズ等のマメ科作物、ヒマワリ、ペニバナ、セイヨウアブラナ、キャノーラ種セイヨウアブラナ、ヒマシ又はオリーブ等の油料作物、キュウリ、メロン又はパンプキン等のウリ科植物、ワタ、アマ又はアサ等の繊維植物、サトウキビ、ミスカンザス (*miscanthus*) 又はスイッチグラス等の燃料作物、ジャガイモ、トマト、トウガラシ、レタス、ホウレンソウ、タマネギ、ニンジン、ナス、アスパラガス又はキャベツ等の野菜、花卉類（例えば、ペチュニア、ゼラニウム、バラ、チューリップ、ユリ、又はキク）、灌木、広葉樹（例えば、ポプラ又はヤナギ）及び常緑樹（例えば、針葉樹）等の観賞植物、ローングラス、ターフグラス又は飼料草等の草類、あるいは、コーヒー、チャ、タバコ、ホップ、コショウ、ゴム又はラテックス植物等の他の有用植物とすることができる。

#### 【0092】

本願で使用する「有害生物」とは、植物、動物、ヒト又はヒト関連に有害な生物であり、限定されないが、（以下に定義する）作物有害生物や、ゴキブリ、アリ等の家屋害虫等や、マラリア蚊等の疾病媒介生物が挙げられる。

#### 【0093】

「植物有害生物」、「植物病原体」又は「作物有害生物」は、本願では同義に使用され、具体的に植物、植物部分又は植物生産物、特に農業で使用される植物、植物部分又は植物生産物に損傷を生じる生物を意味する。なお、「植物有害生物」又は「作物有害生物」なる用語は、前記有害生物が植物を標的とし、害を及ぼすという意味で使用される。有害生物は、特に無脊椎動物に属し、例えば昆虫（農業害虫、観賞植物害虫、森林害虫を含む）が挙げられる。該当する作物有害生物の例としては、限定されないが、アブラムシ、ケムシ、ハエ、スズメバチ等、センチュウ類（土壤中で自由に生活するもの、又は特にネコブセンチュウ及びダイズシストセンチュウやジャガイモシストセンチュウ等のシストセンチュウ類のように植物の根に寄生する種）、ダニ類（例えば、ハダニ、ホコリダニ及びフシダニ）及び腹足類（デロセラ属種 (*Deroceras* spp.)、ミラックス属種 (*Milax* spp.)、タンドニア属種 (*Tandonia* sp.)、リマックス属種 (*Limax* spp.)、アリオン属種 (*Arion* spp.) 及びベロニセラ属種 (*Veronicella* spp.) 等のナメクジと、ヘリックス属種 (*Helix* spp.)、セルヌエラ属種 (*Cernuella* spp.)、テバ属種 (*Theba* spp.)、コクリセラ属種 (*Cochlicella* spp.)、アフリカマイマイ属種 (*Achatina* spp.)、オカモノアラガイ属種 (*Succinea* spp.)、オバクラミス属種 (*Ovachlamys* spp.)、アンフィブリマ属種 (*Amphibulima* spp.)、ザクリシア属種 (*Zachryisia* spp.)、オナジマイマイ属種 (*Bradybaena* spp.)、及びリンゴガイ属種 (*Pomacea* spp.) 等のカタツムリを含む)、病原性真菌類（子囊菌類 (*Ascomycetes*)（例えば、フザリウム属種 (*Fusarium* spp.)、チエラビオプシス属種 (*Thielaviopsis* spp.)、パーティシリウム属

10

20

30

40

50

種 (*Verticillium* spp.)、マグナポルテ属種 (*Magnaporthe* spp.)、担子菌類 (*Basidiomycetes*) (例えば、リゾクトニア属種 (*Rhizoctonia* spp.)、ファコブソラ属種 (*Phakospora* spp.)、プッチニア属種 (*Puccinia* spp.)、及び真菌様卵菌類 (fungus-like Oomycetes) (例えば、ピシウム属種 (*Pythium* spp.) 及びフィトフトラ属種 (*Phytophthora* spp.)) を含む)、細菌類 (例えば、ブルクホルデリア属種 (*Burkholderia* spp.)、及びキサントモナス属種 (*Xanthomonas* spp.) やシュードモナス属種 (*Pseudomonas* spp.) 等のプロテオバクテリア門菌)、ファイトプラズマ (*Phytoplasma*)、スピロプラズマ (*Spiroplasma*)、ウイルス類 (例えば、タバコモザイクウイルスやカリフラワーモザイクウイルス)、並びに原生動物が挙げられる。

【0094】

本願で使用する「微生物」とは、細菌、ウイルス、真菌、酵母等を意味し、「微生物性」とは、微生物に由来することを意味する。

【0095】

本願で使用する「真菌」とは、真菌門 (*Eumycota*) の群に属する真核生物を意味する。本発明における真菌なる用語は、卵菌門 (*Oomycota*) 等の真菌様生物も含む。卵菌門 (*Oomycota*) (又は卵菌綱 (*Oomycetes*)) は、真菌様真核微生物の別個の系統発生系列を形成する。この群は当初は真菌類に分類されたが、近年の見識によると、不等毛類 (*heterokonts*) 内の褐藻類や珪藻類等の光合成生物と比較的近縁であることが裏付けられている。

【0096】

本願で使用する「有害生物感染症」又は「有害生物病」とは、植物、動物又はヒト等の生体において有害生物に起因する任意の炎症性病態、疾患又は障害を意味する。

【0097】

本願で使用する「真菌感染症」又は「真菌病」とは、植物、動物又はヒト等の生体において真菌に起因する任意の炎症性病態、疾患又は障害を意味する。

【0098】

「活性物質」、「活性成分」又は「活性主成分」は本願では同義に使用され、任意の生物学的、生化学的又は化学的成分とその誘導体、断片又はそれに基づく化合物を意味し、微生物を含み、対象、特に植物、植物部分又は植物生産物で有害生物に対して一般的又は特定の作用を有しており、天然に存在するものでもよいし、製造により得られ、不可避的に製造工程に起因する不純物を含むものでもよい。

【0099】

本願で使用する「農薬」とは、(農業、園芸、花卉園芸及び家庭・庭園用を含む) 農芸化学産業での使用に適しているのみならず、望ましくない昆虫及び齧歯類を防除するための公衆衛生 / 有害生物防除業者用途、家庭用殺真菌剤及び殺虫剤等の家庭用途、並びに植物若しくは植物部分、作物、球根、塊茎、果樹を (例えば、有害生物、疾患又は害虫から) 保護するため、植物の成長を制御するため、好ましくは促進又は亢進させるため、及び / 又は植物、作物若しくは植物部分 (例えば、その果実、花、種子等) の収穫収率を向上させるための薬剤等の非作物関連用製品で使用するのにも適していることを意味する。このような物質の例は、当業者に自明であり、例えば、殺虫剤 (例えば、家庭用殺虫剤を含めた接触型殺虫剤又は浸透移行性殺虫剤)、除草剤 (例えば、家庭用除草剤を含めた接触型除草剤又は浸透移行性除草剤)、殺真菌剤 (例えば、家庭用殺真菌剤を含めた接触型殺真菌剤又は浸透移行性殺真菌剤)、殺線虫剤 (例えば、家庭用殺線虫剤を含めた接触型殺線虫剤又は浸透移行性殺線虫剤) 及び他の有害生物駆除剤又は殺生物剤 (例えば、昆虫又はカタツムリを殺傷する薬剤); 並びに肥料; 植物ホルモン等の成長調節剤; 微量栄養素、薬害軽減剤、フェロモン; 忌避剤; 昆虫ベイト; 及び / 又は標的植物 (例えば、保護しようとする植物又は防除しようとする植物) における又は前記植物による遺伝子発現 (及

び／又は他の生物学的若しくは生化学的プロセス)を調節(即ち、増加、減少、阻害、亢進及び／又は誘発)するために使用される活性主成分、例えば、核酸(例えば、RNAi技術の関連で使用されるような一本鎖又は二本鎖RNA)及びこの目的にそれ自体公知の因子、タンパク質、化学物質等が挙げられる。このような農薬の例は当業者に自明であり、限定されないが、例えば、グリホサート、パラコート、メトラクロール、アセトクロール、メソトリオン、2,4-D、アトラジン、グルホシネート、スルホサート、フェノキサプロップ、ペンジメタリン、ピクロラム、トリフルラリン、プロモキシニル、クロジナホップ、フルロキシピル、ニコスルフロン、ベンスルフロン、イマゼタピル、ジカンバ、イミダクロプリド、チアメトキサム、フィプロニル、クロルピリホス、デルタメトリン、ラムダシハロトリン、エンドスルファン、メタミドホス、カルボフラン、クロチアニジン、シペルメトリン、アバメクチン、ジフルフェニカン、スピノサド、インドキサカルブ、ピフェントリン、テフルトリン、アゾキシストロピン、チアメトキサム、テブコナゾール、マンコゼブ、シアゾファミド、フルアジナム、ピラクロストロピン、エポキシコナゾール、クロロタロニル、銅殺菌剤、トリフロキシストロピン、プロチオコナゾール、ジフェノコナゾール、カルベンダジム、プロピコナゾール、チオファネート、硫黄、ボスカリド及び他の公知農薬又は任意の適切なその組み合わせが挙げられる。

#### 【0100】

本願で使用する「農薬組成物」とは、本願に詳細に定義する農芸化学用の組成物であって、少なくとも1種の活性物質と、任意選択的に、農薬の最適な分散、霧化、付着、葉湿潤、分配、保持及び／又は取込みを助長する1種以上の添加剤を含有する組成物を意味する。本願中の詳細な説明から自明の通り、本願で使用する農薬組成物は、生物的防除剤又は生物的有害生物駆除剤(限定されないが、生物的殺生物剤、バイオスタティック剤、静真菌剤及び殺真菌剤を含む)を含み、これらの用語は本願では同義に使用される。従って、本願で使用する農薬組成物は、植物又は他の農業関連環境で(例えば、土壤中で)有害生物を防除するための活性成分、物質又は主成分として少なくとも1種の生体分子を含有する組成物を含む。本願に開示する農薬組成物で活性主成分として使用される生体分子の非限定的な例は、タンパク質(抗体及びその断片を含み、限定されないが、VHH等の抗体の重鎖可変ドメイン断片が挙げられる)、核酸配列、(多)糖類、脂質、ビタミン、ホルモン、糖脂質、ステロール、及びグリセロ脂質である。

#### 【0101】

非限定的な1例として、本願に開示する農薬組成物における添加剤としては、限定されないが、希釈剤、溶媒、アジュバント、界面活性剤、湿潤剤、展着剤、油類、固着剤、増粘剤、浸透剤、緩衝剤、酸性化剤、沈降防止剤、凍結防止剤、光防護剤、消泡剤、殺生物剤及び／又は飛散防止剤が挙げられる。

#### 【0102】

本願で使用する「バイオスタティック組成物」又は「バイオスタティック剤」とは、(本願に詳細に定義する)バイオスタティック用の任意の活性成分、物質若しくは主成分又は任意の活性成分、物質若しくは主成分を含有する組成物であって、少なくとも1種のバイオスタティック活性物質又は成分と、任意選択的に、前記活性物質又は成分の最適な分散、霧化、付着、葉湿潤、分配、保持及び／又は取込みを助長する1種以上の添加剤を含有する組成物を意味する。非限定的な1例として、このような添加剤は、希釈剤、溶媒、アジュバント、(イオン性)界面活性剤、湿潤剤、展着剤、油類、固着剤、増粘剤、浸透剤、緩衝剤、酸性化剤、沈降防止剤、凍結防止剤、光防護剤、消泡剤、殺生物剤、プロテアーゼインヒビター及び／又は飛散防止剤である。

#### 【0103】

本願で使用する「殺生物組成物」又は「殺生物剤」とは、(本願に詳細に定義する)殺生物用の任意の活性成分、物質若しくは主成分又は任意の活性成分、物質若しくは主成分を含有する組成物であって、少なくとも1種の殺生物活性物質又は成分と、任意選択的に、前記活性物質又は成分の最適な分散、霧化、付着、葉湿潤、分配、保持及び／又は取込みを助長する1種以上の添加剤を含有する組成物を意味する。非限定的な1例として、こ

のような添加剤は、希釈剤、溶媒、アジュバント、（イオン性）界面活性剤、湿潤剤、展着剤、油類、固着剤、増粘剤、浸透剤、緩衝剤、酸性化剤、沈降防止剤、凍結防止剤、光防護剤、消泡剤、殺生物剤、プロテアーゼインヒビター及び／又は飛散防止剤である。

【0104】

本願で使用する「静真菌組成物」又は「静真菌剤」とは、（本願に詳細に定義する）静真菌用の任意の活性成分、物質若しくは主成分又は任意の活性成分、物質若しくは主成分を含有する組成物であって、少なくとも1種の静真菌活性物質又は成分と、任意選択的に、前記活性物質又は成分の最適な分散、霧化、付着、葉湿潤、分配、保持及び／又は取込みを助長する1種以上の添加剤を含有する組成物を意味する。非限定的な1例として、このような添加剤は、希釈剤、溶媒、アジュバント、（イオン性）界面活性剤、湿潤剤、展着剤、油類、固着剤、増粘剤、浸透剤、緩衝剤、酸性化剤、沈降防止剤、凍結防止剤、光防護剤、消泡剤、殺生物剤、プロテアーゼインヒビター及び／又は飛散防止剤である。

10

【0105】

本願で使用する「殺真菌組成物」又は「殺真菌剤」とは、（本願に詳細に定義する）殺真菌用の任意の活性成分、物質若しくは主成分又は任意の活性成分、物質若しくは主成分を含有する組成物であって、少なくとも1種の殺真菌活性物質又は成分と、任意選択的に、前記活性物質又は成分の最適な分散、霧化、付着、葉湿潤、分配、保持及び／又は取込みを助長する1種以上の添加剤を含有する組成物を意味する。非限定的な1例として、このような添加剤は、希釈剤、溶媒、アジュバント、（イオン性）界面活性剤、湿潤剤、展着剤、油類、固着剤、増粘剤、浸透剤、緩衝剤、酸性化剤、沈降防止剤、凍結防止剤、光防護剤、消泡剤、殺生物剤、プロテアーゼインヒビター及び／又は飛散防止剤である。

20

【0106】

本願で使用する「農薬用」とは、圃場栽培作物（例えば、農業）で使用するのに適した及び／又はそれを目的とする上記に定義した農薬（例えば、有害生物駆除剤、成長調節剤、栄養素／肥料、忌避剤、落葉剤等）の使用のみならず、温室栽培作物（例えば、園芸／花卉園芸）又は水耕栽培システム用の上記に定義した農薬（例えば、有害生物駆除剤、成長調節剤、栄養素／肥料、忌避剤、落葉剤等）の使用に加え、さらに、個人庭園用、家庭用（例えば、家庭用除草剤又は殺虫剤）、又は有害生物防除業者用（例えば、雑草防除等）等の非作物用途に適した及び／又はそれを目的とする上記に定義した農薬の使用を含む。

30

【0107】

本願で使用する「バイオスタティック（作用）」又は「バイオスタティック用」とは、植物有害生物や植物病原体等の有害生物の有害な活性を防除、調節又は妨害するため、例えば、限定されないが、植物、植物部分又は他の農業関連環境で（例えば、家庭用又は土壤中）前記有害生物の成長又は活性を阻害するため、前記有害生物の挙動を変化させるため、及び前記有害生物を忌避又は誘引するための（任意選択的に、本願に定義するバイオスタティック、殺生物、殺真菌又は静真菌組成物に含まれる）活性物質の任意の作用又は使用を含む。

【0108】

本願で使用する「殺生物（作用）」又は「殺生物用」とは、植物有害生物や植物病原体等の有害生物の有害な活性を防除、調節又は妨害するため、例えば、限定されないが、植物、植物部分又は他の農業関連環境で（例えば、家庭用又は土壤中）前記有害生物の成長又は活性を阻害するため、前記有害生物の挙動を変化させるため、及び前記有害生物を忌避又は誘引するための（任意選択的に、本願に定義する殺生物又は殺真菌組成物に含まれる）活性物質の任意の作用又は使用を含む。

40

【0109】

本願で使用する「静真菌（作用）」又は「静真菌用」とは、真菌の有害な活性を防除、調節又は妨害するため、例えば、限定されないが、植物、植物部分又は他の農業関連環境で（例えば、家庭用又は土壤中）前記真菌の成長又は活性を阻害するため、前記真菌の挙動を変化させるため、及び前記真菌を忌避又は誘引するための（任意選択的に、本願に

50



定義する殺真菌又は静真菌組成物に含まれる) 活性物質の任意の作用又は使用を含む。

【0110】

本願で使用する「殺真菌(作用)」又は「殺真菌用」とは、真菌の有害な活性を防除、調節又は妨害するため、例えば、限定されないが、植物、植物部分又は他の農業関連環境で(例えば、家庭用又は土壌中で)前記真菌を殺傷するため、前記真菌の成長又は活性を阻害するため、前記真菌の挙動を変化させるため、及び前記真菌を忌避又は誘引するための(任意選択的に、本願に定義する殺真菌組成物に含まれる)活性物質の任意の作用又は使用を含む。

【0111】

「殺有害生物活性」又は「殺生物活性」は本願では同義に使用され、有害生物の有害な活性を妨害することを意味し、限定されないが、前記有害生物を殺傷すること、前記有害生物の成長又は活性を阻害すること、前記有害生物の挙動を変化させること、前記有害生物を忌避又は誘引することが挙げられる。

10

【0112】

本願で使用する「バイオスタティック活性」とは、有害生物の有害な活性を妨害することを意味し、限定されないが、前記有害生物の成長又は活性を阻害すること、前記有害生物の挙動を変化させること、前記有害生物を忌避又は誘引することが挙げられる。

【0113】

活性成分、物質若しくは主成分、又は殺有害生物、殺生物若しくはバイオスタティック活性成分、物質若しくは主成分を含有する組成物若しくは薬剤の殺有害生物、殺生物又はバイオスタティック活性は、薬剤の(例えば、mg/mL等の濃度単位で表される)最小阻止活性(MIC)として表すことができるが、これに制限するものではない。

20

【0114】

本願で使用する「殺真菌活性」とは、真菌の有害な活性を妨害することを意味し、限定されないが、前記真菌を殺傷すること、前記真菌の成長又は活性を阻害すること、前記真菌の挙動を変化させること、及び前記真菌を忌避又は誘引することが挙げられる。

【0115】

本願で使用する「静真菌活性」とは、真菌の有害な活性を妨害することを意味し、限定されないが、前記真菌の成長又は活性を阻害すること、前記真菌の挙動を変化させること、及び前記真菌を忌避又は誘引することが挙げられる。

30

【0116】

活性成分、物質若しくは主成分、又は殺有害生物、殺生物若しくはバイオスタティック活性成分、物質若しくは主成分を含有する組成物若しくは薬剤の殺真菌又は静真菌活性は、薬剤の(例えば、mg/mL等の濃度単位で表される)最小阻止活性(MIC)として表すことができるが、これに制限するものではない。

【0117】

本願で使用する「基剤」とは、活性物質を適切に配合、添加、固定化、吸着、吸収、結合、被包、埋込、付着又は含有させることができる任意の固体、半固体又は液体基剤を意味する。このような基剤の非限定的な例としては、ナノカプセル、マイクロカプセル、ナノスフェア、マイクロスフェア、ナノ粒子、微粒子、リポソーム、ベシクル、ビーズ、ジェル、弱イオン樹脂粒子、リポソーム、渦巻型(cocleaate)送達担体、小顆粒、粒状体、ナノチューブ、パッキーボール、油中水エマルションの部分である水滴、水中油エマルションの部分である油滴、(例えば、シードシェル、木材チップ、パルプ、スフェア、ビーズ、シートの形状又は他の任意の適切な形状の)コルク、木材若しくは他の植物由来材料等の有機材料、紙若しくは板紙、タルク、クレー、微結晶セルロース、シリカ、アルミナ、ケイ酸塩及びゼオライト等の無機材料、又は微生物細胞(例えば、酵母細胞)又は適切なその画分若しくは断片が挙げられる。

40

【0118】

本願で使用する「抗体」なる用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体及びその断片(例えば、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、Fv及び親抗体の抗

50

原結合機能を維持する他の断片)を意味する。従って、抗体とは、免疫グロブリン若しくは糖タンパク質又はその断片若しくは部分を意味する場合もあるし、改変型免疫グロブリン様フレームワーク内に含まれる抗原結合部分を含むコンストラクトを意味する場合もあるし、非免疫グロブリン様フレームワーク若しくは足場を含むコンストラクト内に含まれる抗原結合部分を意味する場合もある。

【0119】

本願で使用する「モノクローナル抗体」なる用語は、均一な抗体集団を有する抗体組成物を意味する。この用語は、抗体種又は起源に関して制限されず、また、その作製方法により制限されるものでもない。この用語は、全長免疫グロブリンと、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、Fv及び前記抗体の抗原結合機能を維持する他の断片等の断片を含む。本発明では、任意の哺乳動物種のモノクローナル抗体を使用することができる。しかし、実際には、モノクローナル抗体を作製するために必要なハイブリッド細胞株又はハイブリドーマを作製するには、ラット又はマウス細胞株が入手し易いので、抗体は一般的にラット又はマウス由来のものになるであろう。

10

【0120】

本願で使用する「ポリクローナル抗体」なる用語は、不均一な抗体集団を有する抗体組成物を意味する。ポリクローナル抗体は、免疫動物又は選択されたヒトからの血清プールに由来することが多い。

【0121】

本願で使用する「抗体の重鎖可変ドメイン又はその機能的断片」とは、(i)天然では軽鎖をもたない重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン(以下、V<sub>HH</sub>とも言う)を意味し、限定されないが、ラクダ若しくはサメの重鎖抗体の重鎖の可変ドメインが挙げられ、又は(ii)従来の4本鎖抗体の重鎖の可変ドメイン(以下、V<sub>H</sub>とも言う)を意味し、限定されないが、従来の4本鎖抗体の重鎖の(本願で詳細に定義する)ラクダ化可変ドメイン(以下、ラクダ化V<sub>H</sub>とも言う)が挙げられる。

20

【0122】

以下に詳述するように、抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列及び構造は、限定されないが、当技術分野及び以下の文中で夫々「フレームワーク領域1」又は「FR1」、「フレームワーク領域2」又は「FR2」、「フレームワーク領域3」又は「FR3」、及び「フレームワーク領域4」又は「FR4」と呼ばれる4個のフレームワーク領域又は「FR」と、前記フレームワーク領域の間に配置され、当技術分野で夫々「相補性決定領域1」又は「CDR1」、「相補性決定領域2」又は「CDR2」、及び「相補性決定領域3」又は「CDR3」と呼ばれる3個の相補性決定領域又は「CDR」から構成されるとみなすことができる。

30

【0123】

同様に以下に詳述するように、(V<sub>HH</sub>又はV<sub>H</sub>を含む)抗体の重鎖可変ドメインにおけるアミノ酸残基の合計数は、110~130の範囲とすることができ、112~115が好ましく、113が最も好ましい。なお、抗体の重鎖可変ドメインの部分、断片又はアナログは、このような部分、断片若しくはアナログが(本願に定義する)殺有害生物活性、殺生物活性、バイオスタティック活性、殺真菌活性若しくは静真菌活性等の機能的活性(の少なくとも一部)を維持する限り、及び/又はこれらの部分、断片若しくはアナログが由来する抗体の元の重鎖可変ドメインの結合特異性(の少なくとも一部)を維持する限り、その長さ及び/又はサイズに関して制限されない。(本願に定義する)殺有害生物活性、殺生物活性、バイオスタティック活性、殺真菌活性若しくは静真菌活性等の機能的活性(の少なくとも一部)を維持する及び/又はこれらの部分、断片若しくはアナログが由来する抗体の元の重鎖可変ドメインの結合特異性(の少なくとも一部)を維持する部分、断片又はアナログを本願では重鎖可変ドメインの「機能的断片」とも言う。

40

【0124】

重鎖可変ドメインのアミノ酸残基のナンバリング方法は、Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989))により記載されている方法、

50

所謂「A b M定義」及び所謂「コンタクト定義」である。本願では、これをナンバリングシステムに採用する。

【0125】

あるいは、(V<sub>HH</sub>又はV<sub>H</sub>を含む)抗体の重鎖可変ドメインの可変ドメインのアミノ酸残基は、前出のRiechmannとMuyldermansの論文(例えば、前記参考文献の図2参照)でラクダに由来するV<sub>HH</sub>ドメインに適用されているように、Kabata(“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, Md., Publication No. 91)により記載されている重鎖可変ドメインの一般ナンバリングに従ってナンバリングすることができる。

10

【0126】

重鎖抗体とその可変ドメインの一般的な記載については、特に、一般背景技術として言及する以下の参考文献、即ち、Vrije Universiteit Brussel名義のWO94/04678、WO95/04079及びWO96/34103; Unilever名義のWO94/25591、WO99/37681、WO00/40968、WO00/43507、WO00/65057、WO01/40310、WO01/44301、EP1134231及びWO02/48193; Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB)名義のWO97/49805、WO01/21817、WO03/035694、WO03/054016及びWO03/055527; Algonomics N.V.及びAblynx NV名義のWO03/050531; National Research Council of Canada名義のWO01/90190; Institute of Antibodies名義のWO03/025020 (=EP1433793); 並びにAblynx名義のWO04/041867、WO04/041862、WO04/041865、WO04/041863、WO04/062551; Hamers - Casterman et al., Nature 1993 Jun. 3; 363(6428): 446-8を参照されたい。

20

【0127】

一般に、本願でその最も広義の意味で使用する「重鎖可変ドメイン」なる用語は、特定の生物起源又は特定の作製方法に制限されないことに留意すべきである。例えば、以下に詳述するように、本発明の重鎖可変ドメインは、(1)天然重鎖抗体のV<sub>HH</sub>ドメインを単離する; (2)天然4本鎖抗体のV<sub>H</sub>ドメインを単離する; (3)天然V<sub>HH</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列を発現させる; (4)天然V<sub>H</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列を発現させる; (5)任意の動物種、特にヒト等の哺乳動物種に由来する天然V<sub>H</sub>ドメインを(以下に記載するように)「ラクダ化」する、又はこのようなラクダ化V<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸を発現させる; (6)Wardら(前出)に記載されているような「ドメイン抗体」若しくは「Dab」を「ラクダ化」する、又はこのようなラクダ化V<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸を発現させる; (7)タンパク質、ポリペプチド又は他のアミノ酸配列を作製するための合成又は半合成技術を使用する; (8)核酸合成技術を使用してV<sub>HH</sub>又はV<sub>H</sub>をコードする核酸を作製した後に、こうして得られた核酸を発現させる; 及び/又は(9)上記の任意の組み合わせにより得ることができる。上記方法を実施するのに適切な方法及び技術は、本願の開示に基づいて当業者に自明であり、例えば、以下に詳述する方法及び技術が挙げられる。

30

40

【0128】

一方、特定の1実施形態によると、本願に開示する重鎖可変ドメインは、天然V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列(例えば、哺乳動物、特にヒトに由来する天然V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列)と厳密に同一の(即ち、配列同一性が100%の)アミノ酸配列をもたない。

【0129】

本願で使用する「有効量」及び「有効用量」なる用語は、1種以上の所望の結果を達成するために必要な量を意味する。

50

## 【 0 1 3 0 】

本願で使用する「測定する」、「実測する」、「評価する」、「モニターする」及び「アッセイする」なる用語は同義に使用され、定量的測定と定性的測定を含む。

## 【 0 1 3 1 】

本明細書に引用する全文献は、その開示内容全体を本願に援用する。特に他の定義がない限り、科学技術用語を含めて本発明を開示するのに使用する全用語は、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者に広く理解されている意味とする。さらに手引きとして、本発明の教示をよりよく理解するために用語の定義を加える。

## 【 0 1 3 2 】

## ポリペプチド

本願に開示するポリペプチドは、一般に真菌と結合することが可能である。従って、前記ポリペプチドは、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じる。即ち、前記ポリペプチドが真菌と結合する結果、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じる。

## 【 0 1 3 3 】

本発明のポリペプチド及び本発明で使用されるポリペプチドは、真菌の膜又は真菌の膜の成分と（特異的に）結合することができる。ある種の実施形態において、本発明のポリペプチド及び本発明で使用されるポリペプチドは、真菌の細胞壁又は細胞壁の成分と（特異的に）結合しない。例えば、ある種の実施形態において、本発明のポリペプチド及び本発明で使用されるポリペプチドは、真菌のグルコシルセラミドと（特異的に）結合しない。

## 【 0 1 3 4 】

前記ポリペプチドは、例えば、フザリウム・オキシスポルム又は他の真菌の脂質含有画分等の真菌の細胞膜の脂質含有画分と（特異的に）結合することが可能である。（ボトリチス・シネレア又は他の真菌の）前記脂質含有画分は、クロマトグラフィーにより取得可能であり得る。前記クロマトグラフィーは、真菌菌糸及び/又は分生子から得られた粗脂質抽出物（本願では、全脂質抽出物又はTLEとも言う）で実施することができる。前記クロマトグラフィーは、例えば、薄層クロマトグラフィー又は順相フラッシュクロマトグラフィーとすることができる。前記クロマトグラフィー（例えば、薄層クロマトグラフィー）は、基板上、例えば、シリカゲルをコーティングしたガラス上で実施することができる。前記クロマトグラフィーは、クロロホルム/メタノール混液（例えば、85/15% v/v）を溶離液として使用して実施することができる。

## 【 0 1 3 5 】

例えば、前記脂質含有画分は、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌糸及び/又は分生子を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能であり得る。

## 【 0 1 3 6 】

より特定の実施形態において、前記脂質含有画分は、シリカをコーティングしたガラススライド上でクロロホルム/メタノール混液（例えば、85/15% v/v）を溶離液として使用して全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌糸及び/又は分生子を分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能であり得る。

## 【 0 1 3 7 】

あるいは、前記画分は、順相フラッシュクロマトグラフィーを使用して取得することができる。このような方法において、前記方法は、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌糸及び/又は分生子を全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【0138】

より特定の実施形態において、前記脂質含有画分は、TLEをジクロロメタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )とMeOHに溶解し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (例えば、85/15%, v/v)を溶離液として使用する全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより真菌(例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌)の菌系及び/又は分生子を分画する工程と、その後、前記画分をフィルターにより濾過する工程とを含む方法により取得可能であり得る。

## 【0139】

より特定の実施形態において、前記脂質含有画分は、前記TLEをジクロロメタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )とMeOHに溶解し、前記TLEを順相フラッシュカートリッジ(例えば、15 $\mu\text{m}$ 粒子を充填したフラッシュカートリッジ)にロードし、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85/15%, v/v)を溶離液として前記カラムに送液する全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより、真菌(例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌)の菌系及び/又は分生子を分画する工程と、前記画分をフィルター(例えば、ナイロンメンブレンを装着した0.45 $\mu\text{m}$ シリンジフィルター)で濾過する工程と、前記画分を乾燥する工程とを含む方法により取得可能であり得る。

10

## 【0140】

前記ポリペプチドと前記画分の結合又は前記ポリペプチドと前記画分の相互作用を試験する前に、前記クロマトグラフィーからの画分を処理することができる。例えば、前記画分を含むリボソームを調製することができる。このような方法は、薄膜水和法を含むことができる。例えばこのような方法では、1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン(DPH)の添加下で薄膜水和法を使用してリボソームを調製することができる。ポリペプチド結合前後の蛍光の変化により(又は適切な対照を参照することにより)、前記ポリペプチドの結合による膜の結合及び/又は破壊を測定することができる。

20

## 【0141】

従って、ある種の実施形態において、本発明のポリペプチド及び本発明で使用されるポリペプチドは、真菌の細胞膜の脂質含有クロマトグラフィー画分と(特異的に)結合することができ、任意選択的に、前記ポリペプチドの結合を試験する前に、前記脂質含有クロマトグラフィー画分をリボソームに調製する。

## 【0142】

前記ポリペプチドと真菌の脂質含有画分の結合は、任意の適切な方法、例えば、バイオレイヤー干渉法により確認することができる。前記脂質含有画分との特異的相互作用を試験することができる。1例として、例えば薄膜水和法を使用して前記画分をリボソームに調製する際に、前記ポリペプチドが前記脂質画分を破壊できるか否かを確認することができる。

30

## 【0143】

クロマトグラフィーを利用する方法では、クロマトグラフィー工程の前に抽出工程を実施することができる。例えば、真菌菌系及び/又は分生子を抽出工程に供し、粗脂質抽出物又は全脂質抽出物を得ることができ、この抽出物でクロマトグラフィーを実施する。例えば、ある種の実施形態では、例えば、2:1及び1:2(v/v)比のクロロホルム:メタノールを使用して室温で真菌菌系及び/又は分生子(例えば、フザリウム・オキシスポルム又はボトリチス・シネレアの真菌菌系及び/又は分生子)を抽出することができる。こうして調製した抽出物を合して乾燥し、粗脂質抽出物又はTLEとすることができる。

40

## 【0144】

従って、ある種の実施形態において、前記ポリペプチドは、真菌(例えば、フザリウム・オキシスポルム又はボトリチス・シネレア)の細胞膜の脂質含有画分と(特異的に)結合することが可能であり、前記真菌の細胞膜の前記脂質含有画分は、クロマトグラフィーにより取得される又は取得可能である。前記クロマトグラフィーは、順相フラッシュクロマトグラフィー又は薄層クロマトグラフィーとすることができる。前記ポリペプチドと前

50

記脂質含有画分の結合は、バイオレイヤー干渉法により測定することができる。ある種の実施形態において、前記クロマトグラフィー工程は、真菌試料に由来する真菌菌系及び／又は分生子から脂質を抽出する工程を含む方法により取得される又は取得可能な粗脂質画分で実施することができる。前記抽出工程は、2：1及び1：2（v/v）比のクロロホルム：メタノールを使用して2個の抽出物を得た後、これらの抽出物を合することができる。

【0145】

薄層クロマトグラフィーに関連する方法において、前記クロマトグラフィーは、前記真菌の菌系を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含むことができる。

10

【0146】

薄層クロマトグラフィーに関連するある種の方法において、前記クロマトグラフィーは、シリカをコーティングしたガラス上でクロロホルム／メタノール混液（例えば、85／15% v/v）を溶離液として使用して真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び／又は分生子を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含むことができる。

【0147】

順相フラッシュクロマトグラフィーに関連する方法において、前記クロマトグラフィーは、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び／又は分生子を全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する行程を含むことができる。

20

【0148】

順相フラッシュクロマトグラフィーに関連するある種の方法において、前記クロマトグラフィーは、前記TLEをジクロロメタン（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>）とMeOHに溶解し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>／MeOH（例えば、85／15% v/v）を溶離液として使用する全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び／又は分生子を分画する工程と、その後、前記画分をフィルターにより濾過する工程とを含むことができる。

30

【0149】

順相フラッシュクロマトグラフィーに関連するある種の方法において、前記クロマトグラフィーは、前記TLEをジクロロメタン（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>）とMeOHに溶解し、前記TLEを順相フラッシュカートリッジ（例えば、15 μm粒子を充填したフラッシュカートリッジ）にロードし、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>／MeOH（85／15% v/v）を溶離液として前記カラムに送液する全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び／又は分生子を分画する工程と、前記画分をフィルター（例えば、ナイロンメンブレンを装着した0.45 μmシリンジフィルター）で濾過する工程と、前記画分を乾燥する工程とを含むことができる。

40

【0150】

ある種の態様において、本発明は、配列番号1～51及び101～111から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0151】

1態様において、本発明は、配列番号1～10、12～51及び101～111から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも9

50

5%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0152】

1態様において、本発明は、配列番号1~6から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0153】

1態様において、本発明は、配列番号1、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

10

【0154】

1態様において、本発明は、配列番号2、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0155】

1態様において、本発明は、配列番号3、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

20

【0156】

1態様において、本発明は、配列番号4、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0157】

1態様において、本発明は、配列番号5、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

30

【0158】

1態様において、本発明は、配列番号6、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0159】

別の態様において、本発明は、配列番号52~67及び112~122から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と；配列番号68~83及び123~133から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と；配列番号84~100及び134~144から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域とを含むポリペプチドを提供する。

40

【0160】

別の態様において、本発明は、配列番号52、53及び54から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と；

50









構成される C D R 3 領域；

配列番号 1 1 3 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 2 4 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 3 5 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

配列番号 1 1 4 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 2 5 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 3 6 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

配列番号 1 1 5 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 2 6 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 3 7 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

10

配列番号 1 1 6 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 2 7 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 3 8 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

配列番号 1 1 7 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 2 8 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 3 9 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

配列番号 1 1 8 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 2 9 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 4 0 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

配列番号 1 1 9 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 3 0 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 4 1 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

20

配列番号 1 2 0 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 3 1 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 4 2 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；

配列番号 1 2 1 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 3 2 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 4 3 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域；あるいは

配列番号 1 2 2 を含むか又は同配列から構成される C D R 1 領域と、配列番号 1 3 3 を含むか又は同配列から構成される C D R 2 領域と、配列番号 1 4 4 を含むか又は同配列から構成される C D R 3 領域

30

を含むポリペプチドを提供する。

#### 【 0 1 6 2 】

ある種の実施形態において、前記 C D R 3 領域は、( C D R 3 領域を無関係の C D R 3、即ち、真菌と結合しないもので置き換えることにより実証されるように) 活性を失わずに置換し易いので、前記ポリペプチドは、上記ポリペプチドの特定の C D R 1 配列と C D R 2 配列のみを含むことができる。従って、前記 C D R 3 領域配列は任意である。一般に、前記ポリペプチドは、(例えば、構造完全性を確実に維持するために) C D R 3 領域を含むことができるが、前記 C D R 3 領域の配列はさほど重要ではない。例えば、前記ポリペプチドは、C D R 1 領域と、C D R 2 領域と、C D R 3 領域を含むことができ、前記 C D R 1 領域及び C D R 2 領域は各々本願に明記する配列を含むか又は同配列から構成されるが、前記 C D R 3 領域は任意の配列(例えば、8 ~ 16 アミノ酸残基長を有する任意の配列)を含む。

40

#### 【 0 1 6 3 】

本願に記載するポリペプチドは、所定のフレームワーク領域配列を有することが適切である。例えば、前記ポリペプチドは、配列番号 1 4 9、1 5 0、1 5 4、1 5 5、1 5 8 及び 1 5 9 から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域 1 ( F R 1 ) 配列と、配列番号 1 5 1、1 5 6 及び 1 6 0 から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域 2 ( F R 2 ) 配列と、配列番号 1 5 2、1 5 7 及び 1 6 1 から構成される群から選択される配列を含

50

むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3 (FR3) 配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4 (FR4) 配列とを含むことができる。

【0164】

ある種の実施形態において、例えば、本願で10G11と呼ぶクローン(10G11Q、突然変異体1~11のいずれか又はシングルALA突然変異体1~34のいずれか、突然変異体10G11-A~10G11Kのいずれかを含む)の任意のポリペプチド又は前記クローンに由来する任意のポリペプチドに関連するポリペプチドと、これらのポリペプチドに対して任意の特定の配列同一性又は任意の置換を有する任意のポリペプチドは、配列番号149及び150から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域1 (FR1) 配列と、配列番号151を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域2 (FR2) 配列と、配列番号152を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3 (FR3) 配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4 (FR4) 配列とを含むことができる。

10

【0165】

ある種の実施形態において、例えば、本願で10E11と呼ぶクローン(10E11Qを含む)の任意のポリペプチド又は前記クローンに由来する任意のポリペプチドに関連するポリペプチドと、これらのポリペプチドに対して任意の特定の配列同一性又は任意の置換を有する任意のポリペプチドは、配列番号154及び155から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域1 (FR1) 配列と、配列番号156を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域2 (FR2) 配列と、配列番号157を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3 (FR3) 配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4 (FR4) 配列とを含むことができる。

20

【0166】

ある種の実施形態において、例えば、本願で12C03と呼ぶクローン(12C03Qを含む)の任意のポリペプチド又は前記クローンに由来する任意のポリペプチドに関連するポリペプチドと、これらのポリペプチドに対して任意の特定の配列同一性又は任意の置換を有する任意のポリペプチドは、配列番号158及び159から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域1 (FR1) 配列と、配列番号160を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域2 (FR2) 配列と、配列番号161を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3 (FR3) 配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4 (FR4) 配列とを含むことができる。

30

【0167】

前記CDR領域と前記フレームワーク領域は、Kabatナンバリングシステムに従って定義することができる。

【0168】

ある種の実施形態において、前記ポリペプチドは、80~200残基長とすることができる。

40

【0169】

本発明のポリペプチドは、組成物(例えば、農薬組成物)として提供することができる。

【0170】

少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物

1態様において、本発明者らは、有害生物と特異的に結合することができる少なくとも1種のポリペプチドを含有する農薬組成物を提供した。重要な点として、前記有害生物の特定の分子構造とこのように相互作用することにより、本願に開示する組成物は、前記植物病原体の成長を阻害、妨害又は抑制するように、前記植物病原体の1種以上の生物学的活性を阻害、妨害又は抑制することが可能である。所定の実施形態において、本願に開示

50

する農薬組成物は、前記組成物に含まれ、有害生物と特異的に結合することができる少なくとも1種のポリペプチドの特異的相互作用により、植物有害生物を殺傷することが可能である。

【0171】

従って、本願に開示する農薬組成物は、植物有害生物の標的に存在する結合部位と結合し、前記有害生物の天然の生物学的活性（限定されないが、例えば成長）及び/又は前記有害生物の構造標的が関与する1種以上の生物学的経路に作用することにより、前記植物有害生物の生物学的機能を調節（例えば、低下又は阻害）するために使用することができる。

【0172】

さらに、本願に開示する少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物は、当技術分野で公知の従来の免疫グロブリン及び非免疫グロブリン結合剤に勝るいくつかの追加利点がある。実際に、所定の実施形態において、本願に開示するアミノ酸配列は、単離型重鎖免疫グロブリン可変ドメインであり、従来の4本鎖抗体よりも強力且つ安定であるため、(1)投与量が減り、投与頻度が減るため、副作用が低減し、(2)安定性の改善により、投与経路の選択が広がる。重鎖免疫グロブリン可変ドメインは寸法が小さいため、膜を通過し、他の大型のポリペプチド及びタンパク質では接近できない生理的区画、組織及び臓器に侵入することができる。

【0173】

特定の非限定的な1実施形態において、本願に開示する組成物に含まれる前記少なくとも1種のポリペプチドは、免疫グロブリン折り畳みを含むか又は適切な条件（例えば生理的条件）下で（折り畳みにより）免疫グロブリン折り畳みを形成することが可能なポリペプチドとすることができる。特に、Halaby et al., J. (1999) Protein Eng. 12, 563-71の論考を参照されたい。このようなポリペプチド配列は、免疫グロブリン折り畳みを形成するように適正に折り畳まれたときに、標的又は抗原と（本願に定義するように）特異的に結合できることが好ましく、本願に定義する親和性（本願に詳述するような $K_D$ 値（実値又は見掛け値）、 $K_A$ 値（実値又は見掛け値）、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度あるいは $IC_{50}$ 値として測定及び/又は表記されると適切である）で有害生物標的又は有害生物抗原と結合できることがより好ましい。また、このようなポリペプチド配列の部分、断片、アナログ、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体も、免疫グロブリン折り畳みを含むように、又は適切な条件下で免疫グロブリン折り畳みを形成できるように選択することが好ましい。

【0174】

特定の実施形態において、本発明は、植物有害生物、より特定的には植物真菌を防除するための農薬組成物又は生物的有害生物駆除組成物を提供し、前記組成物は、80~200アミノ酸の少なくとも1種のポリペプチド又はアミノ酸配列を活性物質として含有する。なお、本願で使用する「80~200アミノ酸」とは、80から200までを意味し、即ち、80アミノ酸の量と200アミノ酸の量を含む。従って、「80~200アミノ酸」は、「80アミノ酸から200アミノ酸まで」と同義に使用することができる。

【0175】

所定の他の実施形態において、本発明は、植物有害生物を防除するための農薬組成物として、80~200アミノ酸の少なくとも2種の（異なる）ポリペプチド又は少なくとも2種の（異なる）アミノ酸配列を活性物質として含有する組成物を提供する。

【0176】

さらに他の実施形態において、本発明は、植物有害生物を防除するための農薬組成物として、80~200アミノ酸の少なくとも3種の（異なる）ポリペプチド又は少なくとも3種の（異なる）アミノ酸配列を活性物質として含有する組成物を提供する。種々のポリペプチドの他の組み合わせも想定される。

【0177】

本発明に係る農薬組成物は、上記に定義した植物有害生物を防除するための本願に定義

10

20

30

40

50

する農薬組成物であり、即ち、前記農薬組成物、より特定的には、前記農薬組成物に含まれる上記活性物質は、1種以上の植物、好ましくは作物に対する1種以上の植物有害生物の有害な作用を妨害することができ、好ましくは抑制又は阻止することができる。

【0178】

本願に開示する組成物に含まれる前記ポリペプチド又はアミノ酸配列は、天然ポリペプチド又はアミノ酸配列とすることもできるし、天然ポリペプチドに由来することもできるし、あるいは、完全に人工的に設計又は合成することもできる。前記ポリペプチド又はアミノ酸配列は、免疫グロブリンをベースとすることもできるし、限定されないが、微生物タンパク質、プロテアーゼインヒビター、毒素、フィブロネクチン、リポカリン、一本鎖逆平行コイルドコイルタンパク質又はリピートモチーフタンパク質等のタンパク質に存在するドメインをベースとすることもできる。本願に記載するアミノ酸長の範囲のこのようなポリペプチドの非限定的な例としては、炭水化物結合ドメイン(CBD)(Blake et al(2006) J. Biol. Chem. 281, 29321-29329)、重鎖抗体(hcAb)、シングルドメイン抗体(sdAb)、ミニボディ(Tramontano et al(1994) J. Mol. Recognition 7, 9-24)、ラクダ重鎖抗体の可変ドメイン(VHH)、新規抗原受容体の可変ドメイン(VNAR)、アフイボディ(Nygren P. A. (2008) FEBS J. 275, 2668-2676)、アルファボディ(WO2010066740参照)、人工アンキリンリピートドメイン(DARPs)(Stump et al(2008) Drug Discovery Today 13, 695-701)、アンチカリン(Skerra et al(2008) FEBS J. 275, 2677-2683)、ノッティン(Kolmar et al(2008) FEBS J. 275, 2684-2690)及び人工CH2ドメイン(ナノ抗体、Dimitrov DS(2009) mAbs 1, 26-28参照)が挙げられる。特に、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、1本のポリペプチド鎖から構成され、翻訳後修飾されていない。より特定的には、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、生得免疫系又は養子免疫系に由来し、好ましくは生得免疫系又は養子免疫系のタンパク質に由来する。さらにより特定的には、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、免疫グロブリンに由来する。最も特定的には、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、4個のフレームワーク領域と3個の相補性決定領域、又は(通常では前記相補性決定領域の少なくとも1個を形成するアミノ酸残基の少なくとも一部を含む)任意の適切なその断片を含む。特に、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、好ましくは微生物組換え発現システムにおいて高収率で生産し易く、その後、単離及び/又は精製するのに好都合である。特に、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、DARPs、ノッティン、アルファボディ及びVHHから構成される群から選択される。より特定的には、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、アルファボディ及びVHHから構成される群から選択される。最も特定的には、本願に開示するポリペプチド又はアミノ酸配列は、VHHである。

【0179】

特に、本願に開示する組成物に含まれる前記少なくとも1種のポリペプチドは、1本のポリペプチド鎖から構成することができ、翻訳後修飾されていない。より特定的には、本願に開示する組成物に含まれる前記少なくとも1種のポリペプチドは、生得免疫系又は養子免疫系に由来することができ、好ましくは生得免疫系又は養子免疫系のタンパク質に由来することができる。さらにより特定的には、本願に開示する組成物に含まれる前記少なくとも1種のポリペプチドは、免疫グロブリンに由来することができる。最も特定的には、本願に開示する組成物に含まれる前記少なくとも1種のポリペプチドは、4個のフレームワーク領域と3個の相補性決定領域、又は(通常では前記相補性決定領域の少なくとも1個を形成するアミノ酸残基の少なくとも一部を含む)任意の適切なその断片を含むことができる。特に、本願に開示する組成物に含まれる前記少なくとも1種のポリペプチドは、好ましくは微生物組換え発現システムにおいて高収率で生産し易く、その後、単離及び/又は精製するのに好都合である。

10

20

30

40

50

## 【0180】

特定の実施形態によると、本発明は、有害生物抗原又は有害生物標的（限定されないが、例えば、真菌抗原又は真菌標的）と結合するのに特に適した多数のアミノ酸残基ストレッチ（即ち、低分子ペプチド）を提供する。

## 【0181】

これらのアミノ酸残基ストレッチは、特に本願に開示するポリペプチドの抗原結合部位（の一部）を形成するように、このポリペプチド中に存在すること及び／又は組込むことができる。これらのアミノ酸残基ストレッチは、有害生物標的に対して産生させた重鎖抗体等の抗体又は $V_H$ 若しくは $V_{HH}$ 配列の $CDR$ 配列として最初に作製された（又は本願に詳述するように、このような $CDR$ 配列に基づく及び／又は由来することができる）ので、これらのアミノ酸残基ストレッチを本願では一般に「 $CDR$ 配列」（即ち、夫々 $CDR1$ 配列、 $CDR2$ 配列、及び $CDR3$ 配列）とも言う。しかし、これらのアミノ酸残基ストレッチにより、本願に開示するポリペプチドが真菌抗原又は真菌標的等の有害生物標的と特異的に結合できる限り、その最も広義の意味での本発明は、これらのアミノ酸残基ストレッチが本願に開示するポリペプチドにおいて有することができる特定の構造役割又は機能に制限されないことに留意すべきである。従って、一般に、その最も広義の意味での本発明は、真菌抗原又は真菌標的等の有害生物標的と結合することができ、本願に記載するような $CDR$ 配列の組み合わせを含むポリペプチドを含有する農薬組成物に関する。

## 【0182】

従って、特定の非限定的な実施形態において、本願に開示するポリペプチドは、本願に記載する $CDR1$ 配列、 $CDR2$ 配列及び $CDR3$ 配列から構成される群から選択される少なくとも1種のアミノ酸配列を含むポリペプチドとすることができる。特に、本願に開示するポリペプチドは、少なくとも1個の抗原結合部位を含むことができ、前記抗原結合部位は、本願に記載する $CDR1$ 配列、 $CDR2$ 配列及び $CDR3$ 配列の少なくとも1種の組み合わせを含む。

## 【0183】

本願に開示する農薬組成物に含まれ、これらの $CDR$ 配列組み合わせの1種を有する全てのポリペプチドは、有害生物標的又は有害生物抗原と（本願に定義するように）特異的に結合できるように選択されること、より特定的には、特に溶液中に前記ポリペプチド $10^{-8}$ モル/リットル以下の解離定数（ $K_d$ ）で植物病原体の標的と特異的に結合できることが好ましい。

## 【0184】

解離定数（ $K_d$ ）は、 $ELISA$ の結果に基づいて推定することができる。 $ELISA$ のような平衡解析では、平衡結合応答から $K_d$ を計算することができる。 $ELISA$ プレートウェルに標的抗原をコーティングし、標的抗原がポトリチス・シネレアの膜の脂質含有画分であり得る場合、このような方法はさらに、標的抗原と結合する濃度範囲のポリペプチドを使用することができる。 $ELISA$ が一般に前記ポリペプチドと前記標的抗原の結合を表す各ポリペプチド濃度の定量的吸着測定値を提供する場合、ポリペプチドの前記濃度範囲は、例えば、 $0.5 \mu M$ 、 $1 \mu M$ 、 $2.5 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 及び $10 \mu M$ とすることができる。使用される最適な濃度範囲は、標的抗原に対するポリペプチドの親和性に応じて変動し得る。吸収値をポリペプチド濃度の対数変換に対してプロットすると、 $ELISA$ により測定した対応する吸収値からシグモイド曲線が得られる。このシグモイド曲線を利用して $IC_{50}$ 値を求めることができる。この $IC_{50}$ がポリペプチドの濃度であり、対応する吸収値がシグモイド関数の最大値により推定される飽和値の50%である場合、 $K_d$ は $1/K_a$ により推定することができ、前記式中、会合定数（ $K_a$ ）は $1/IC_{50}$ として推定することができる。従って、 $K_d$ は、50%の結合飽和度で平衡に達する分析物濃度に対応する。一般に、これらの計算には、コンピュータ計算法を使用することができる。例えば、これは $GraphPad$ を使用して実施することができる。ある種の実施形態において、前記 $K_d$ は、表面プラズモン共鳴法（ $SPR$ ）により測定することができる。

10

20

30

40

50

## 【0185】

前記IC50は、例えば、フザリウム・オキシスポルム及び/又はボトリチス・シネレアの孢子発芽及び/又は菌糸体成長阻害のIC50（即ち、孢子発芽及び/又は菌糸体成長の50%を阻害する濃度（ $\mu\text{M}$ ））とすることができる。ある種の実施形態において、前記ポリペプチドは、孢子発芽及び/又は菌糸体成長阻害のIC50が約10 $\mu\text{M}$ 未満、例えば、約1 $\mu\text{M}$ 未満である。

## 【0186】

前記Kdは、本願の別段に記載するように得ることができる脂質含有画分（即ち、クロマトグラフィー法により得られ、フザリウム・オキシスポルム又はボトリチス・シネレア等の真菌に由来する脂質含有画分とすることができるもの）との結合のKdとすることができる。前記ポリペプチドのKdは、約10 $\mu\text{M}$ 未満、例えば、約1 $\mu\text{M}$ 未満とすることができる。前記Kdは、任意の適切な方法により求めることができる。例えば、前記Kdは、例えばOctetでバイオレイヤー干渉法（BLI）により求めることができる。Kdを求めるために使用されるアッセイは、ELISAアッセイとすることができる。

10

## 【0187】

ポリペプチドと有害生物標的の特異的結合は、それ自体公知の任意の適切な方法で確認することができ、例えば、バイオパニング、スキャッチャード（Scatchard）解析及び/又は放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）及びサンドイッチ競合アッセイ等の競合結合アッセイ、並びに当技術分野で公知の種々のその変法が挙げられる。

20

## 【0188】

好ましい1実施形態において、80~200アミノ酸のポリペプチドは、特定の有害生物標的分子に対する親和性選択により得られ、前記ポリペプチドは、前記有害生物標的分子に対する親和性が高く、一般的に、前記ポリペプチドとその有害生物標的分子の結合の解離定数は10<sup>-5</sup>M未満であり、前記解離定数は10<sup>-6</sup>M未満がより好ましく、前記解離定数は10<sup>-7</sup>M未満がさらに好ましく、前記解離定数は10<sup>-8</sup>M未満が最も好ましい。

## 【0189】

特定の実施形態において、本願に開示する組成物に含まれる前記少なくとも1種のポリペプチドは、前記植物病原性真菌に対する最小発育阻止濃度（MIC）値が、溶液中に前記可変ドメイン1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である。

30

## 【0190】

特定の植物有害生物標的に対する親和性選択により得られ、約0.00001~1 $\mu\text{M}$ の最小発育阻止濃度で作物有害生物の成長及び/又は活性を阻害することが可能な80~200アミノ酸又は上記に開示したようなサブレンジのポリペプチドも本願に開示する。特定の実施形態において、前記最小発育阻止濃度は、0.0001~1 $\mu\text{M}$ 、0.001~1 $\mu\text{M}$ 、0.01~1 $\mu\text{M}$ 、0.1~1 $\mu\text{M}$ 、0.0001~0.1 $\mu\text{M}$ 、0.001~0.1 $\mu\text{M}$ 、0.01~0.1 $\mu\text{M}$ 、0.00001~0.01 $\mu\text{M}$ 、0.0001~0.01 $\mu\text{M}$ 、又は0.001~0.01 $\mu\text{M}$ である。他の特定の実施形態において、前記最小発育阻止濃度は、約0.0001~約1 $\mu\text{M}$ 、約0.001~約1 $\mu\text{M}$ 、約0.01~約1 $\mu\text{M}$ 、約0.1~約1 $\mu\text{M}$ 、約0.0001~約0.1 $\mu\text{M}$ 、約0.001~約0.1 $\mu\text{M}$ 、約0.01~約0.1 $\mu\text{M}$ 、約0.00001~約0.01 $\mu\text{M}$ 、約0.0001~約0.01 $\mu\text{M}$ である。

40

## 【0191】

最小発育阻止濃度又はMIC値は、インキュベーション後に前記作物又は植物有害生物の可視的成長を阻害するポリペプチド等の物質の最低濃度である。例えば、最小殺真菌濃度（MFC）は、24時間以内に真菌接種材料の成長を妨害し、前記接種材料を少なくとも99~90%減少させるポリペプチドの最低濃度とみなされる。MFC（最小殺真菌濃度）は寒天プレート上で測定することができるが、真菌の種類とアッセイ条件に応じて従来通りに液体中で（例えばマイクロウェルプレートで）測定することもできる。

50



## 【 0 1 9 2 】

他の特定の実施形態において、本願に開示する組成物は、  
 配列番号 5 2 に記載の配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 8 に記載の配列を有する  
 C D R 2 領域と、配列番号 8 4 に記載の配列を有する C D R 3 領域の組み合わせを含む（  
 と共に真菌と結合することが可能な）ポリペプチド；又は  
 配列番号 5 3 に記載の配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 9 に記載の配列を有する  
 C D R 2 領域と、配列番号 8 5 に記載の配列を有する C D R 3 領域の組み合わせを含む（  
 と共に真菌と結合することが可能な）ポリペプチド；又は  
 配列番号 5 4 に記載の配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 7 0 に記載の配列を有する  
 C D R 2 領域と、配列番号 8 6 に記載の配列を有する C D R 3 領域の組み合わせを含む（  
 と共に真菌と結合することが可能な）ポリペプチド；又は  
 配列番号 5 2 ~ 6 7 及び 1 1 2 ~ 1 2 2 から構成される群から選択される配列を有する C  
 D R 1 領域と、配列番号 6 8 ~ 8 3 及び 1 2 3 ~ 1 3 3 から構成される群から選択される  
 配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 4 ~ 1 0 0 及び 1 3 4 ~ 1 4 4 から構成される  
 群から選択される配列を有する C D R 3 領域の組み合わせを含む（とと共に真菌と結合す  
 ることが可能な）ポリペプチド；又は  
 配列番号 1 ~ 5 1 から構成される群から選択されるアミノ酸配列又はそのいずれかに対し  
 て少なくとも約 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む（とと共に真菌と結合す  
 ることが可能な）ポリペプチドを、少なくとも含有する。

## 【 0 1 9 3 】

特定の実施形態において、本願に開示する組成物における前記ポリペプチドは、4 個の  
 フレームワーク領域（夫々 F R 1 ~ F R 4 ）と 3 個の相補性決定領域（夫々 C D R 1 ~ C  
 D R 3 ）を含む、又はこれらから構成される、又はこれらから本質的に構成される重鎖可  
 変ドメインであり、あるいは、（通常では、本願に詳述するような C D R の少なくとも 1  
 個を形成するアミノ酸残基の少なくとも一部を含む）このような重鎖可変ドメインの任意  
 の適切な断片である。前記フレームワーク領域の配列は可変でもよいし、特定でもよい。

## 【 0 1 9 4 】

本願に開示するポリペプチドは、特に、例えば重鎖抗体等の抗体とすることができる。  
 他の特定の実施形態において、本願に開示するポリペプチドは、従来の 4 本鎖抗体に由来  
 する抗体の重鎖可変ドメイン配列（限定されないが、例えば、ヒト抗体に由来する V<sub>H</sub> 配  
 列）又は（本願に定義する）所謂「重鎖抗体」に由来する（本願に定義する）所謂 V<sub>H</sub>H  
 配列とすることができる。

## 【 0 1 9 5 】

特定の実施形態において、本願に開示する組成物は、少なくとも抗体又はその機能的断  
 片（限定されないが、例えば、ラクダ重鎖抗体又はその機能的断片）に由来する重鎖可変  
 ドメイン配列を含み、従って、前記可変ドメインは、例えばラクダ重鎖抗体の重鎖可変ド  
 メイン（V<sub>H</sub>H）とすることができる。

## 【 0 1 9 6 】

なお、本発明は、本願に開示する組成物に含まれるポリペプチド（又はこれを発現させ  
 るために使用される本発明のヌクレオチド配列）の起源に関して制限されず、また、前記  
 ポリペプチド又はそのヌクレオチド配列を作製又は取得する（又は取得した）方法に関し  
 てても制限されない。従って、本願に開示する組成物におけるポリペプチドは、（任意の適  
 切な種に由来する）天然ポリペプチド又は合成若しくは半合成ポリペプチドとすることが  
 できる。本発明の特定の非限定的な実施形態において、前記ポリペプチドは、（任意の適  
 切な種に由来する）天然免疫グロブリン配列又は合成若しくは半合成免疫グロブリン配列  
 であり、限定されないが、「ラクダ化」免疫グロブリン配列に加え、（例えば、合成、ラン  
 ダム又は天然免疫グロブリン配列から出発する）親和性成熟、C D R グラフティング、  
 ベニアリング、種々の免疫グロブリン配列に由来する断片の結合、オーバーラップするプ  
 ライマーを使用した P C R アセンブリ、及び当業者に周知の同様の免疫グロブリン配列作  
 製技術、又は上記のいずれかの適切な組み合わせ等の技術により得られた免疫グロブリン

配列が挙げられる。

【0197】

本願に開示する組成物のポリペプチド配列は、特にドメイン抗体（又はドメイン抗体として使用するのに適した重鎖可変ドメイン）、シングルドメイン抗体（又はシングルドメイン抗体として使用するのに適した重鎖可変ドメイン）、又は「dAb」（又はdAbとして使用するのに適した重鎖可変ドメイン）、他のシングル可変ドメイン、又はそのいずれか1種の任意の適切な断片とすることができる。（シングル）ドメイン抗体の一般的な説明については、上記に引用した従来技術とEP 0 368 684も参照されたい。「dAb」なる用語については、例えば、Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341(6242): 544-6)、Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11): 484-490と、例えば、Domantis Ltd. 名義のWO06/030220、WO06/003388及び他の公開特許出願を参照されたい。

10

【0198】

従って、特定の実施形態において、本発明は、（一般）構造  
FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4  
を有するポリペプチドを提供し、上記式中、FR1～FR4は夫々フレームワーク領域1～4を表し、CDR1～CDR3は夫々相補性決定領域1～3を表し、本願に詳細に定義する通りである。

20

【0199】

特に、本発明は、ある種の特定の実施形態において、真菌標的等の有害生物標的に特異的であり、配列番号1～51のアミノ酸配列の少なくとも1種と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば、少なくとも90%又は少なくとも95%又は少なくとも98%又はそれ以上の配列同一性を有する少なくとも1種のポリペプチドを含有する農薬組成物、及びこのようなアミノ酸配列をコードする核酸配列を提供する。

【0200】

本願に開示するある種の特に好ましいポリペプチド配列は、真菌等の有害生物と結合することができる及び/又はそれに対して特異的であり、配列番号1～51のアミノ酸配列の少なくとも1種とのアミノ酸同一性が少なくとも90%（例えば、少なくとも95%又は少なくとも97%）であり、基準配列（即ち、特定の配列番号の配列）と比較した配列変動がCDR領域のみに存在するポリペプチド配列である。本願に開示するある種の特に好ましいポリペプチド配列は、真菌等の有害生物と結合することができる及び/又はそれに対して特異的であり、配列番号1～51のアミノ酸配列の少なくとも1種とのアミノ酸同一性が少なくとも90%（例えば、少なくとも95%又は少なくとも97%）であり、基準配列（即ち、特定の配列番号の配列）と比較した配列変動がフレームワーク領域のみに存在するポリペプチド配列である。他の実施形態では、基準配列（即ち、特定の配列番号の配列）と比較した配列変動がCDR領域及び/又はフレームワーク領域に存在することができる。ある種の実施形態では、基準配列（即ち、特定の配列番号の配列）と比較した配列変動がCDR3領域に存在することができる。

30

40

【0201】

この場合も、このようなポリペプチドは、任意の適切な方法で任意の適切な起源から得られ、例えば、天然V<sub>HH</sub>配列（即ち、適切な種のラクダに由来するもの）又は合成若しくは半合成重鎖可変ドメインとすることができ、限定されないが、「ラクダ化」免疫グロブリン配列（特に、ラクダ化重鎖可変ドメイン配列）に加え、本願に詳述するような（例えば、合成、ランダム又は天然免疫グロブリン配列から出発する）親和性成熟、CDRグラフティング、ベニアリング、種々の免疫グロブリン配列に由来する断片の結合、オーバーラップするプライマーを使用したPCRアセンブリ、及び当業者に周知の同様の免疫グロブリン配列作製技術、又は上記のいずれかの適切な組み合わせ等の技術により得られた免疫グロブリン配列が挙げられる。

50

## 【0202】

当然のことながら、本願に開示する農薬組成物又は生物的防除組成物は、保存中と利用中のいずれでも安定しており、即ち、前記農薬組成物の保存及び/又は利用条件下で、前記農薬組成物の完全性が維持され、このような条件としては、高温、凍結解凍サイクル、pH又はイオン強度の変化、UV照射、有害な化学物質の存在等が挙げられる。80~200アミノ酸及び本願に記載する種々のサブレンジのポリペプチドは、前記農薬組成物中で安定に維持されること、即ち、前記農薬組成物の保存及び/又は利用条件下で、前記ポリペプチドの完全性と有害生物駆除活性が維持されることがより好ましく、このような条件としては、高温、凍結解凍サイクル、pH又はイオン強度の変化、UV照射、有害な化学物質の存在等が挙げられる。80~200アミノ酸及び本願に記載する種々のサブレンジのポリペプチドは、前記農薬組成物を周囲温度で2年間保存した場合又は前記農薬組成物を54で2週間保存した場合に、前記農薬組成物中で安定に維持されることが最も好ましい。本発明の農薬組成物は、少なくとも約70%の活性を維持することが好ましく、少なくとも約80%の活性を維持することがより好ましく、少なくとも約90%以上の活性を維持することが最も好ましい。任意選択的に、前記農薬組成物中の他の成分に起因する有害な作用又は保存中若しくは施用中の有害な作用から前記ポリペプチドを保護するために、前記ポリペプチドを本願に定義する基剤に配合することができる。適切な基剤の例としては、限定されないが、アルギン酸塩、ガム、デンプン、 $\beta$ -シクロデキストリン、セルロース、ポリ尿素、ポリウレタン、ポリエステル、微生物細胞又はクレーが挙げられる。

10

20

## 【0203】

前記農薬組成物は任意の型の製剤とすることができ、好ましい製剤は、粉末、粉末水和剤、顆粒水和剤、水分散性粒剤、乳剤、濃厚乳剤、粉剤、懸濁剤、濃厚懸濁剤、サスポエマルション(懸濁剤と乳剤の混合物)、カプセル懸濁剤、水性分散液、油性分散液、エアゾル、ペースト剤、フォーム剤、スラリー又は濃厚フロアブル剤である。

## 【0204】

80~200アミノ酸及び上記種々のサブレンジのポリペプチドは、本発明に係る農薬組成物又は生物的防除組成物における唯一の活性物質でもよいが、前記農薬組成物は、前記ポリペプチド又はアミノ酸配列(又は本願に開示する少なくとも1種、少なくとも2種若しくは少なくとも3種のポリペプチド若しくはアミノ酸配列)に加え、1種以上の他の農薬を含有することも可能である。このような他の農薬又は生物的防除組成物は、植物有害生物に対して前記ポリペプチド又はアミノ酸配列と異なる作用を有するものでもよいし、前記ポリペプチド又はアミノ酸配列と相乗作用を有するものでもよいし、所定の植物に対する前記ポリペプチド又はアミノ酸配列の活性を改変するものでもよい。適切な他の農薬は、除草剤、殺虫剤、殺真菌剤、殺線虫剤、殺ダニ剤、殺細菌剤、殺ウイルス剤、植物成長調節剤、薬害軽減剤等とすることができる。このような農薬は化学物質でもよいし、生体物質、例えば微生物でもよい。農薬としては、限定されないが、グリホサート、パラコート、メトラクロール、アセトクロール、メソトリオン、2,4-D、アトラジン、グルホシネート、スルホサート、フェノキサプロップ、ベンジメタリン、ピクロラム、トリフルラリン、プロモキシニル、クロジナホップ、フルロキシピル、ニコスルフロン、ベン

30

40

50

他の公知農薬又は任意の適切なその組み合わせが挙げられる。

【0205】

適切な他の農薬は、微生物等の生体物質とすることができ、例えば、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 菌株、バチルス属 (*Bacillus*) 菌株又はストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) 菌株が挙げられる。

【0206】

ポリペプチド配列の変異体を含む組成物

所定の態様では、本願に開示する農薬組成物に含まれるポリペプチドを任意選択的に改変し、例えば、(前記ポリペプチドが有する)正電荷の量を増加することができる。即ち、前記ポリペプチドの正電荷の量を増加できるように、一般的には1箇所以上のアミノ酸置換により、前記ポリペプチドを改変することができる。従って、アミノ酸を(置換されるこのアミノ酸に比較して)正電荷量の多いアミノ酸で置換することができる。2箇所以上のこのような置換を行うこともでき、例えば、2箇所、3箇所、4箇所又は5箇所のこのような置換を行うことができる。ある種の実施形態では、1箇所まで、2箇所まで、3箇所まで、4箇所まで又は5箇所までのこのような置換を行うことができる。このような置換は、一般的にはCDR領域、例えば、CDR1領域、CDR2領域又はCDR3領域で行うことができる。

10

【0207】

前記ポリペプチドに他の置換を行ってもよい。例えば、前記ポリペプチドの電荷に全体として影響を与えない置換を行うことができる。本発明者らは、正電荷の増加が抗真菌作用の改善に相関し得ることを意外にも見出したので、前記置換は前記ポリペプチドの総電荷を減少させないようにすると有利である。

20

【0208】

他の置換も考えられる。例えば、前記ポリペプチドはD残基又はQ残基から開始することができる。本発明者らは、前記ポリペプチドの1位の残基(即ち、フレームワーク1領域配列の最初の残基)にQも使用できるが、Dにすると、前記ポリペプチドの抗真菌性を改善できることを意外にも見出した。従って、本願に開示する全ての特定のポリペプチド配列(配列番号1~51又は101~111のいずれか1種の配列を有する全ペプチドを含む)について、1位の残基はQ残基でもよいが、ある種の実施形態では、D残基とすることが好ましい。10G11Q等のポリペプチドの呼称は、前記ポリペプチドがQ残基から開始することを表す。10G11(末尾にQなし)等のポリペプチドの呼称は、前記ポリペプチドがD残基から開始することを表す。本願では、10G11を10G11Q1Dと言う場合もある(1位をQからDに置換することを表す表記法)。

30

【0209】

ある種の実施形態において、本発明は、配列番号1~51から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又はそのいずれかに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%若しくは少なくとも約95%若しくは少なくとも約98%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。所与の配列番号に対して特定の配列同一性%を有する全てのポリペプチドは、基準配列と同一の総電荷を持つことができ、又は基準配列よりも多くの正電荷を持つことができる。所与の配列番号に対して特定の配列同一性%を有する全てのポリペプチドは、基準配列よりも多くの負電荷を持たないようにすると有利である。

40

【0210】

ある種の実施形態において、本発明は、配列番号1~51から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して1箇所まで、2箇所まで、3箇所まで、4箇所まで若しくは5箇所までのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

【0211】

ある種の実施形態において、本発明は、配列番号1~10及び12~51から構成され

50

る群から選択されるアミノ酸配列、又はそのいずれかに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%若しくは少なくとも約95%若しくは少なくとも約98%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。所与の配列番号に対して特定の配列同一性%を有する全てのポリペプチドは、基準配列と同一の総電荷を持つことができ、又は基準配列よりも多くの正電荷を持つことができる。所与の配列番号に対して特定の配列同一性%を有する全てのポリペプチドは、基準配列よりも多くの負電荷を持たないようにすると有利である。

**【0212】**

ある種の実施形態において、本発明は、配列番号1~10及び12~51から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して1箇所まで、2箇所まで、3箇所まで、4箇所まで若しくは5箇所までのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

10

**【0213】**

ある種の実施形態において、本発明は、配列番号1~6から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又はそのいずれかに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%若しくは少なくとも約95%若しくは少なくとも約98%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。所与の配列番号に対して特定の配列同一性%を有する全てのポリペプチドは、基準配列と同一の総電荷を持つことができ、又は基準配列よりも多くの正電荷を持つことができる。所与の配列番号に対して特定の配列同一性%を有する全てのポリペプチドは、基準配列よりも多くの負電荷を持たないようにすると有利である。

20

**【0214】**

ある種の実施形態において、本発明は、配列番号1~6から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して1箇所まで、2箇所まで、3箇所まで、4箇所まで若しくは5箇所までのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチドを提供する。

**【0215】**

前記ポリペプチドにおける全てのアミノ酸置換は、前記ポリペプチドの総電荷を増加させてもよいし、前記ポリペプチドの総電荷を変化させなくてもよい。ある種の実施形態では、如何なるアミノ酸置換も、前記ポリペプチドの総電荷を減少させない。

30

**【0216】**

前記ポリペプチドにおける全てのアミノ酸置換は、前記ポリペプチド配列中の何処に存在していてもよい。任意選択的に、前記アミノ酸置換はCDR領域に制限されてもよいし（このような実施形態において、前記ポリペプチドは元のフレームワーク領域配列を維持する）、CDR領域に制限されなくてもよい。ある種の実施形態において、前記配列における全ての置換又は変異は、CDR領域又は（Kabatナンバリングシステムにより定義した場合に）CDR領域のいずれかの側の2アミノ酸残基までのいずれかの残基に存在することができる。ある種の実施形態において、前記配列における全ての置換又は変異は、CDR領域又は（Kabatナンバリングシステムにより定義した場合に）CDR領域のいずれかの側の1アミノ酸残基までのいずれかの残基に存在することができる。ある種の実施形態において、前記配列における全ての置換又は変異は、CDR領域又は（Kabatナンバリングシステムにより定義した場合に）CDR3領域のN末端に隣接する残基に存在することができる。

40

**【0217】**

本発明は、（前記ポリペプチドに与える機能的影響を調べるために前記ポリペプチドの総電荷を改変させた）本願で突然変異体1~5と呼ぶ特定の突然変異体と、アラニン以外で置換された位置もあるが、アラニンスキャニングに供した本願で「シングルALA突然変異体」1~34と呼ぶ突然変異体を提供する。本発明は、本願に開示するポリペプチド

50

配列の他の突然変異体又は変異体にも及び、例えば、他の置換を有するもの、又は置換の種々の組み合わせを有するもの、又は前記ポリペプチド配列中の種々の位置に置換を有するものが挙げられる。本願に開示するポリペプチド配列の如何なる突然変異体又は変異体も、基準配列と比較して正電荷を減少させないようにすると適切である。場合により、本願に開示するポリペプチド配列の突然変異体又は変異体は、総正電荷を増加させることができる。

【0218】

前記ポリペプチドの総電荷は、置換又は変異の前後に計算することができ、前記ポリペプチドの電荷は、配列に置換又は変異を導入する前後とも同一 pH の水溶液中で計算される。

10

【0219】

前記ポリペプチドの総電荷は、当業者に公知の任意の適切な方法に従って計算することができる。例えば、電荷は、EXPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 等の無料オンラインツールに従って計算することができる。

【0220】

前記ポリペプチドの電荷は、pH 7 で計算することが好ましい。一般に、前記ポリペプチドは、(pH 7 で) 総電荷が正となるであろう。前記配列における置換又は変異により、(pH 7 で) 総電荷が減少しないことが好ましい。ある種の実施形態では、前記配列における置換又は変異により (pH 7 で) 前記ポリペプチドの正の総電荷が増加するであろう。

20

【0221】

前記ポリペプチドの電荷又は総電荷は、前記ポリペプチドの等電点 (pI) に影響を与えるであろう。ポリペプチドの等電点は、分子が正味電荷をもたない pH である。一般に、前記ポリペプチドは pI が 7 よりも大きく、pH 7 で総電荷が正になると判断される。前記配列における置換又は変異により pI が低下しないことが好ましい。ある種の実施形態では、前記配列における置換又は変異により pI が上昇するであろう。

【0222】

本発明は、特定位置の突然変異又は置換が可能な所定の配列を有するポリペプチド (及びポリペプチドを含有する組成物) も提供する。このような突然変異体としては、本願で 10G11-A ~ 10G11-K と呼ぶものが挙げられる。

30

【0223】

例えば、1実施形態において、本発明は、以下の配列：

【化2】

**X<sub>1</sub>VQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>FX<sub>5</sub>INAMDWYRQAPGKQREWVAGITX<sub>6</sub>GGTT**  
**X<sub>7</sub>YADSVKGRFTISRDNAKKKVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVLX<sub>8</sub>GEQPX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>DYWGQGTQ**  
**VTVSS**

を含むポリペプチドを提供し、上記配列中、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub> ~ X<sub>11</sub>は各々独立して任意の天然アミノ酸である (配列番号 101、本願では 10G11-A とも言う)。

40

【0224】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub> ~ X<sub>11</sub>は各々独立してE又はD以外の任意の天然アミノ酸である (配列番号 102、本願では 10G11-B とも言う)。

【0225】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立してG、A、V、M、L、I、K、R又はHであり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub>及びX<sub>10</sub>は各々独立してE又はD以外の任意の天然アミノ酸である (配列番号 103、

50

本願では10G11-Cとも言う)。

【0226】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立してA、K、R又はHであり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub>及びX<sub>10</sub>は各々独立してE又はD以外の任意の天然アミノ酸である(配列番号104、本願では10G11-Dとも言う)。

【0227】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立してA、K、R又はHであり、X<sub>3</sub>、X<sub>5</sub>及びX<sub>10</sub>は各々独立して電荷をもたない極性アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸(即ち、S、T、C、P、N、Q、K、R又はH)であり、X<sub>4</sub>は非極性脂肪族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸(即ち、I、G、A、V、M、L、K、R又はH)であり、X<sub>9</sub>は芳香族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸(即ち、W、F、Y、K、R又はH)である(配列番号105、本願では10G11-Eとも言う)。

10

【0228】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立してA、K、R又はHであり、X<sub>3</sub>及びX<sub>5</sub>は各々独立してS、K、R又はHであり、X<sub>4</sub>はI、K、R又はHであり、X<sub>9</sub>はW、K、R又はHであり、X<sub>10</sub>はT、K、R又はHである(配列番号106、本願では10G11-Fとも言う)。

【0229】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立して、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub>及びX<sub>10</sub>は各々独立して(配列番号107、本願では10G11-Gとも言う)。

20

【0230】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立してRであり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub>及びX<sub>10</sub>は各々独立して任意の天然アミノ酸である(配列番号108、本願では10G11-Hとも言う)。

【0231】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立してRであり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub>及びX<sub>10</sub>は各々独立してE又はD以外の任意の天然アミノ酸である(配列番号109、本願では10G11-Iとも言う)。

30

【0232】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々独立してRであり、X<sub>3</sub>、X<sub>5</sub>及びX<sub>10</sub>は各々独立して電荷をもたない極性アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸(即ち、S、T、C、P、N、Q、K、R又はH)であり、X<sub>4</sub>は非極性脂肪族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸(即ち、I、G、A、V、M、L、K、R又はH)であり、X<sub>7</sub>はKであり、X<sub>9</sub>は芳香族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸(即ち、W、F、Y、K、R又はH)である(配列番号110、本願では10G11-Jとも言う)。

【0233】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub>はD又はQであり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>8</sub>及びX<sub>11</sub>は各々Rであり、X<sub>3</sub>及びX<sub>5</sub>及びX<sub>10</sub>は各々S、K、R又はHであり、X<sub>4</sub>はI、K、R又はHであり、X<sub>7</sub>はKであり、X<sub>9</sub>はW、K、R又はHであり、X<sub>10</sub>はT、K、R又はHである(配列番号111、本願では10G11-Kとも言う)。

40

【0234】

ある種の実施形態において、本発明は、配列X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>F X<sub>5</sub>INAMDを含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列GITX<sub>6</sub>GGTTX<sub>7</sub>を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、配列LX<sub>8</sub>GEQPX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>DYを含むか又は同配列から構成されるCDR3領域を含むポリペプチドを提供し、上記配列中、X<sub>2</sub>~X<sub>11</sub>は各々独立して任意の天然アミノ酸である(従って、CDR1領域、CDR2領域

50

及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 2、1 2 3 及び 1 3 4 の配列を有する)。

【0 2 3 5】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub> ~ X<sub>11</sub> は各々独立して E 又は D 以外の任意の天然アミノ酸である (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 3、1 2 4 及び 1 3 5 の配列を有する)。

【0 2 3 6】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して G、A、V、M、L、I、K、R 又は H であり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub> 及び X<sub>10</sub> は各々独立して E 又は D 以外の任意の天然アミノ酸である (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 4、1 2 5 及び 1 3 6 の配列を有する)。

10

【0 2 3 7】

ある種の実施形態において、X<sub>1</sub> は D 又は Q であり、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して A、K、R 又は H であり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub> 及び X<sub>10</sub> は各々独立して E 又は D 以外の任意の天然アミノ酸である (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 5、1 2 6 及び 1 3 7 の配列を有する)。

【0 2 3 8】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して A、K、R 又は H であり、X<sub>3</sub>、X<sub>5</sub> 及び X<sub>10</sub> は各々独立して電荷をもたない極性アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸 (即ち、S、T、C、P、N、Q、K、R 又は H) であり、X<sub>4</sub> は非極性脂肪族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸 (即ち、I、G、A、V、M、L、K、R 又は H) であり、X<sub>9</sub> は芳香族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸 (即ち、W、F、Y、K、R 又は H) である (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 6、1 2 7 及び 1 3 8 の配列を有する)。

20

【0 2 3 9】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して A、K、R 又は H であり、X<sub>3</sub> 及び X<sub>5</sub> は各々独立して S、K、R 又は H であり、X<sub>4</sub> は I、K、R 又は H であり、X<sub>9</sub> は W、K、R 又は H であり、X<sub>10</sub> は T、K、R 又は H である (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 7、1 2 8 及び 1 3 9 の配列を有する)。(配列番号 1 0 6)。

【0 2 4 0】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub> 及び X<sub>10</sub> は各々独立して (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 8、1 2 9 及び 1 4 0 の配列を有する)。(配列番号 1 0 7)。

30

【0 2 4 1】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して R であり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub> 及び X<sub>10</sub> は各々独立して任意の天然アミノ酸である (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 1 9、1 3 0 及び 1 4 1 の配列を有する)。(配列番号 1 0 8)。

【0 2 4 2】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して R であり、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub> 及び X<sub>10</sub> は各々独立して E 又は D 以外の任意の天然アミノ酸である (従って、C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域は夫々配列番号 1 2 0、1 3 1 及び 1 4 2 の配列を有する)。(配列番号 1 0 9)。

40

【0 2 4 3】

ある種の実施形態において、X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>8</sub> 及び X<sub>11</sub> は各々独立して R であり、X<sub>3</sub>、X<sub>5</sub> 及び X<sub>10</sub> は各々独立して電荷をもたない極性アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸 (即ち、S、T、C、P、N、Q、K、R 又は H) であり、X<sub>4</sub> は非極性脂肪族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸 (即ち、I、G、A、V、M、L、K、R 又は H) であり、X<sub>7</sub> は K であり、X<sub>9</sub> は芳香族アミノ酸又は正電荷をもつアミノ酸 (即ち、W、F、Y、

50



K、R又はH)である(従って、CDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域は夫々配列番号121、132及び143の配列を有する)。(配列番号110)。

【0244】

ある種の実施形態において、 $X_2$ 、 $X_6$ 、 $X_8$ 及び $X_{11}$ は各々Rであり、 $X_3$ 及び $X_5$ 及び $X_{10}$ は各々S、K、R又はHであり、 $X_4$ はI、K、R又はHであり、 $X_7$ はKであり、 $X_9$ はW、K、R又はHであり、 $X_{10}$ はT、K、R又はHである(従って、CDR1領域、CDR2領域及びCDR3領域は夫々配列番号122、133及び144の配列を有する)。(配列番号111)。

【0245】

その変異体も含めて本願に開示する全てのポリペプチドは、組成物(例えば、農薬組成物)に配合することができる。

10

【0246】

一般に、本発明はポリペプチドの変異体にも及ぶが、前記ポリペプチドはその機能的特性を維持することができ、あるいはその機能的特性を改善することができる。例えば、前記変異体は、真菌と(特異的に)結合することが可能であり得る。より具体的には、前記変異体は、真菌の膜又は真菌の膜の成分と(特異的に)結合することが可能であり得る。ある種の実施形態において、前記変異体は、真菌の細胞壁又は細胞壁の成分と結合しない。例えば、ある種の実施形態において、前記変異体ポリペプチドは、真菌のグルコシルセラミドと(特異的に)結合しない。

【0247】

前記変異体は、真菌(例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌)の細胞膜の脂質含有画分と結合可能であり得る。前記脂質含有画分は、クロマトグラフィーにより取得可能であり得る。例えば、前記脂質含有画分は、真菌(例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌)の菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数(Rf)がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能であり得る。

20

【0248】

前記変異体はさらに、真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じることができる。即ち、前記変異体ポリペプチドが真菌と結合する結果、前記真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じる。

30

【0249】

ある種の実施形態において、前記変異体は、実質的に同一条件下で測定した場合に、基準ポリペプチドのIC50以下のIC50で真菌の胞子の成長の遅延及び/又は前記真菌の胞子の溶菌を生じることができる。前記IC50は、例えば、フザリウム・オキシスポルムの胞子発芽及び/又は菌糸体成長の50%を阻害する濃度( $\mu\text{M}$ )とすることができる。

【0250】

ある種の実施形態において、前記変異体は、実質的に同一条件下で測定した場合に、基準ポリペプチドのKD以下のKDで真菌(例えば、真菌の膜又は真菌の膜の成分)と(特異的に)結合することができる。

40

【0251】

ある種の実施形態において、前記変異体は、実質的に同一条件下で測定した場合に、真菌成長について基準ポリペプチドのMIC以下のMICを(特異的に)示すことができる。

【0252】

所定の態様において、本願に開示する農薬組成物に含まれるポリペプチドは、任意選択的に、1個以上のリンカーを介して1個以上の他の基、部分又は残基と機能的に連結することができる。これらの1個以上の他の基、部分又は残基は、他の該当標的と結合する役割を果たすことができる。当然のことながら、このような他の基、残基又は部分及び/又は結合部位は、本願に開示するポリペプチド(及び/又は前記ポリペプチドが存在する組

50

成物)に他の機能性を提供してもしなくてもよいし、本願に開示するポリペプチドの特性を変化させてもさせなくてもよい。このような基、残基、部分又は結合部位は、例えば、生物学的に活性であり得る化学基でもよい。

【0253】

これらの基、部分又は残基は、特定の実施形態において、本願に開示する組成物におけるポリペプチドのN末端又はC末端と連結することができる。

【0254】

特定の実施形態において、本願に開示する農薬組成物における前記ポリペプチドは、化学的に修飾されていてもよい。例えば、このような修飾としては、1個以上の官能基、残基又は部分を重鎖可変ドメインに導入又は連結する方法が挙げられる。これらの基、残基又は部分は、前記ポリペプチドに1種以上の望ましい特性又は機能を付与することができる。このような官能基の例は当業者に自明である。

10

【0255】

例えば、このような官能基をポリペプチドに導入又は連結すると、前記ポリペプチドの溶解度及び/若しくは安定性の向上、前記ポリペプチドの毒性の低減、又は前記ポリペプチドの望ましくない副作用の解消若しくは軽減、並びに/又は他の有利な特性が得られる。

【0256】

特定の実施形態において、前記1個以上の基、残基、部分は、1個以上の適切なリンカー又はスペーサーを介して前記ポリペプチドに連結されている。

20

【0257】

他の特定の実施形態では、本願に開示する農薬組成物における2分子以上の標的特異的ポリペプチドを相互に連結又は相互に結合することができる。特定の実施形態では、1個以上の適切なリンカー又はスペーサーを介して前記2分子以上のポリペプチドを相互に連結する。本願に開示する種々の重鎖ポリペプチドのカップリングで使用するのに適したスペーサー又はリンカーは当業者に自明であり、一般に、ペプチド及び/又はタンパク質を連結するために当技術分野で使用される任意のリンカー又はスペーサーとすることができる。

【0258】

特に適切なリンカー又はスペーサーとしては、限定されないが、例えば、グリシンリンカー、セリンリンカー、混合グリシン/セリンリンカー、グリシンリッチリンカー、セリンリッチリンカー、あるいは、主に極性ポリペプチド断片、又はグルタルアルデヒドや、任意選択的にPEGスペーサーを介したマレイミド若しくはNHSエステル等のホモ若しくはヘテロ二官能性化学架橋化合物から構成されるリンカー等のポリペプチドリッパが挙げられる。

30

【0259】

例えば、ポリペプチドリッパ又はスペーサーは、1~30、特に1~10アミノ酸残基等の1~50アミノ酸長を有する適切なアミノ酸配列とすることができる。当然のことながら、前記リンカーの長さ、フレキシビリティの程度及び/又は他の特性は、ポリペプチドの特性に何らかの影響を与え、限定されないが、有害生物標的に対する親和性、特異性又はアビディティが挙げられる。当然のことながら、2個以上のリンカーを使用する場合には、これらのリンカーは同一でも異なるものでもよい。本発明の文脈及び開示において、当業者は、過度の実験の負担を払わずに、本願に開示する重鎖可変ドメインをカップリングさせる目的で最適なリンカーを決定することができよう。

40

【0260】

ポリペプチド配列の断片を含有する組成物

本発明は、本願に開示する組成物に含まれるポリペプチドの部分、断片、アナログ、突然変異体、変異体、及び/若しくは誘導体、並びに/又はこのような部分、断片、アナログ、突然変異体、変異体、及び/若しくは誘導体の1個以上を含むか又はこれらから本質的に構成されるポリペプチドも包含し、但し、これらの部分、断片、アナログ、突然変異

50

体、変異体、及び/又は誘導体は、本願で想定される目的に適切なものとする。本発明に係るこのような部分、断片、アナログ、突然変異体、変異体、及び/又は誘導体も、有害生物標的（例えば、植物病原性真菌等の真菌）と特異的に結合することができる。

#### 【0261】

##### 標的

特定の実施形態において、本願に開示する組成物に含まれるポリペプチドは、真菌抗原又は真菌標的等の特定の有害生物標的に対する親和性選択により得られる。特定の有害生物標的に対する親和性選択により適切なポリペプチドを得るには、例えば、その表面にポリペプチドを発現する細胞（例えば、バクテリオファージ）のセット、収集物又はライブラリーを、有害生物駆除剤の標的となることが当技術分野で知られている有害生物標的分子との結合についてスクリーニングすることにより実施することができ、これらの全工程はそれ自体公知の方法で実施することができ、本質的に以下の非限定的な工程、即ち、a) 有害生物駆除剤の標的となることが知られている有害生物標的分子の単離溶液又は懸濁液を得る工程と、b) 前記標的分子に対してポリペプチドライブラリーからファージ又は他の細胞をバイオニングする工程と、c) 標的分子と結合するファージ又は他の細胞を単離する工程と、d) 個々の結合性ファージ又は他の細胞からポリペプチドインサートをコードするヌクレオチド配列を決定する工程と、e) 組換えタンパク質発現を使用してこの配列に応じた量のポリペプチドを生産する工程と、f) 前記有害生物標的に対する前記ポリペプチドの親和性を測定する工程と、任意選択的に、g) 前記有害生物のバイオアッセイで前記ポリペプチドの有害生物駆除活性を試験する工程とを含む。前記ポリペプチドと前記有害生物標的分子の親和性を測定するためには種々の方法を使用することができ、例えば、Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載されているように、当技術分野における常法である酵素免疫測定法(ELISA)又は表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイが挙げられる。ポリペプチドとその有害生物標的分子の親和性を表すためには解離定数が広く使用されている。一般的に、ポリペプチドとその有害生物標的分子の結合の解離定数は、 $10^{-5}$  M未満であり、前記解離定数は $10^{-6}$  M未満がより好ましく、前記解離定数は $10^{-7}$  M未満がさらに好ましく、前記解離定数は $10^{-8}$  M未満が最も好ましい。

#### 【0262】

本願に開示する有害生物標的分子は、有害生物の内部又は表面に存在し、結合及び/又は阻害されると、前記有害生物が死滅するか又はその成長若しくは活性が阻止、阻害又は抑制される分子である。このような適切な標的分子は、既存の文献又は特許データベースから当業者が容易に検索可能であり、限定されないが、ネコブセンチュウ類の適切な有害生物標的分子として16D10等の分泌型寄生タンパク質(Huang et al (2006) PNAS 103:14302-14306)、鞘翅目(コウチュウ目)、半翅目(カメムシ目)、双翅目(ハエ目)の昆虫種とセンチュウ類の適切な有害生物標的分子としてV-ATPaseプロトンポンプ(Knight AJ and Behm CA (2011) Ex. Parasitol. Sept 19)、灰色かび病菌(B. cinerea)とイネいもち病菌(M. grisea)の適切な真菌有害生物標的分子としてテラスパニンPLS1(Gourgues et al (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 297:1197)又は抗真菌標的としてプロトンポンプATPase(Manavathu EK et al (1999) Antimicrob Agents and Chemotherapy, Dec p. 2950)が挙げられる。当然のことながら、好ましい有害生物標的分子は、(細胞内有害生物標的とは対照的に)細胞外空間で接近可能である。

#### 【0263】

より特定的には、本願に開示する農薬組成物の前記少なくとも1種のポリペプチドが結合する有害生物標的は、有害生物の細胞膜成分とすることができる。本願で使用する有害

生物の細胞膜成分は、前記有害生物の細胞の細胞膜リン脂質二重層又はリン脂質二重層に埋め込まれたタンパク質のいずれかに含まれるか又はその一部である（即ち、少なくとも一部がリン脂質二重層に会合、存在、連結又は結合している）任意の成分とすることができる。特定の実施形態において、有害生物の細胞膜成分は、リン脂質、糖タンパク質、炭水化物又はコレステロールとすることができる。

【0264】

特定の実施形態において、本願に開示する組成物における前記少なくとも1種のポリペプチドが特異的に結合する有害生物の細胞膜成分は、タンパク質以外のものである。

【0265】

従って、特定の実施形態において、本願に開示する組成物における前記少なくとも1種のポリペプチドが特異的に結合する有害生物の細胞膜成分は、例えば、リン脂質、炭水化物、又はコレステロール等の脂質である。

【0266】

所定の特定の実施形態において、本発明の農薬組成物における前記ポリペプチドが結合する標的は、細胞壁成分以外のものである。

【0267】

所定の特定の実施形態において、本発明の農薬組成物における前記ポリペプチドが結合する標的は、キチン以外のものである。

【0268】

好ましい実施形態において、本願に開示する農薬組成物又は生物的防除組成物により防除される植物有害生物は、上記に定義した植物病原性真菌等の真菌である。真菌は植物に非常に有害であり、作物の実質的な収穫量減少をもたらす可能性がある。植物病原性真菌としては、壊死性真菌と生体栄養性真菌が挙げられ、子囊菌類、担子菌類及び卵菌類が挙げられる。

【0269】

植物病原性真菌の例は当技術分野で公知であり、限定されないが、アルテルナリア属 (*Alternaria*)、アスコキタ属 (*Ascochyta*)、ボトリチス属 (*Botrytis*)、セルコスポラ属 (*Cercospora*)、コレトトリカム属 (*Colletotrichum*)、ディプロディア属 (*Diplodia*)、エリシフェ属 (*Erysiphe*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、レプトスフェア属 (*Leptosphaeria*)、ゲウマノミセス属 (*Gaeumannomyces*)、ヘルミントスポリウム属 (*Helminthosporium*)、マクロフォミナ属 (*Macrophomina*)、ネクトリア属 (*Nectria*)、オイジウム属 (*Oidium*)、ペロノスポラ属 (*Peronospora*)、ファコプソラ属 (*Phakopsora*)、フォーマ属 (*Phoma*)、フィマトトリカム属 (*Phymatotrichum*)、フィトフトラ属 (*Phytophthora*)、プラズモパラ属 (*Plasmopara*)、ポドスフェラ属 (*Podosphaera*)、プッチニア属 (*Puccinia*)、プシウム属 (*Puthium*)、ピレノフォラ属 (*Pyrenophora*)、ピリクラリア属 (*Pyricularia*)、ピシウム属 (*Pythium*)、リゾクトニア属 (*Rhizoctonia*)、スクレロチウム属 (*Scerotium*)、スクレロチニア属 (*Sclerotinia*)、セプトリア属 (*Septoria*)、チエラビオプシス属 (*Thielaviopsis*)、ウンシヌラ属 (*Uncinula*)、ベンチュリア属 (*Venturia*)、及びパーティシリウム属 (*Verticillium*) から構成される群から選択されるものが挙げられる。本発明の農薬組成物で防除することができる植物真菌感染症の具体例としては、ブドウやイチゴ等の果樹及び野菜のうどんこ病と灰色かび病 (*Botrytis cinerea*) が挙げられる。本発明の農薬組成物で防除することができる植物真菌感染症の他の具体例としては、穀類のオオムギうどんこ病 (*Erysiphe graminis*)、ウリ科植物のうどんこ病 (*Erysiphe cichoracearum* 及び *Sphaerotheca fuliginea*)、リングのうどんこ病 (*Podosphaera leucotricha*)、例えばイチゴのう

10

20

30

40

50

どんこ病 (*Podosphaera aphanis*)、例えばキュウリのうどんこ病 (*Podosphaera xanthii*)、例えばトマトのうどんこ病 (*Oidium neolycopersici*)、ブドウのうどんこ病 (*Uncinula necator*)、穀類のブチニア属菌種病 (*Puccinia* sp.)、ワタ、ジャガイモ、イネ及びローングラスのリゾクトニア属菌種病 (*Rhizoctonia* sp.)、穀類及びサトウキビのウスチラゴ属菌種病 (*Ustilago* sp.)、リンゴの黒星病 (*Venturia inaequalis*) (瘡痂病)、穀類のヘルミントスポリウム属菌種病 (*Helminthosporium* sp.)、コムギのふ枯病 (*Septoria nodorum*)、コムギの葉枯病 (*Septoria tritici*)、オオムギの雲形病 (*Rhynchosporium secalis*)、イチゴ、トマト及びブドウの灰色かび病 (*Botrytis cinerea*)、ラッカセイの褐斑病 (*Cercospora arachidicola*)、タバコのべと病 (*Peronospora tabacina*)、又は種々の作物のべと病 (*Peronospora*)、コムギ及びオオムギの眼紋病 (*Pseudocercospora herpotrichoides*)、オオムギの網斑病 (*Pyrenophora teres*)、イネのいもち病 (*Pyricularia oryzae*)、ジャガイモ及びトマトの疫病 (*Phytophthora infestans*)、種々の植物のフザリウム属菌種病 (*Fusarium* sp.) (例えば、萎凋病 (*Fusarium oxysporum*)) 及びパーティシリウム属菌種病 (*Verticillium* sp.)、ブドウのべと病 (*Plasmopara viticola*)、果樹及び野菜のアルテルナリア属菌種病 (*Alternaria* sp.)、キュウリのべと病 (*Pseudoperonospora cubensis*)、バナナのシガトカ病 (*Mycosphaerella fijiensis*)、ヒヨコマメのアスコキタ属菌種病 (*Ascochyta* sp.)、キャノーラ種セイヨウアブラナのレプトスフェリア属菌種病 (*Leptosphaeria* sp.)、種々の作物のファコプソラ属菌種病 (*Phakopsora* spp.) (例えば、大豆サビ病 (*Phakopsora pachyrhizi*))、並びにコレトリカム属菌種病 (*Colleotrichum* sp.) (例えば、カボチャの炭疽病の病原となり得るコレトリカム・オルビキュラーレ (*Colleotrichum orbiculare*)) が挙げられる。本発明に係る組成物は、通常の状態感受性の菌種と耐性の菌種に対して活性であり、植物病原性真菌の生活環の全段階又は一部の段階に対して活性である。

【0270】

特定の実施形態において、本願に開示する農薬組成物は、アルテルナリア属 (*Alternaria*)、アスコキタ属 (*Ascochyta*)、ボトリチス属 (*Botrytis*)、セルコスボラ属 (*Cercospora*)、コレトリカム属 (*Colleotrichum*)、ディプロディア属 (*Diplodia*)、エリシフェ属 (*Erysiphe*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、レプトスフェリア属 (*Leptosphaeria*)、ゲウマノミセス属 (*Gaeumanomyces*)、ヘルミントスポリウム属 (*Helminthosporium*)、マクロフォミナ属 (*Macrophomina*)、ネクトリア属 (*Nectria*)、オイジウム属 (*Oidium*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ペロノスポラ属 (*Peronospora*)、フォーマ属 (*Phoma*)、フィマトトリカム属 (*Phymatotrichum*)、フィトフトラ属 (*Phytophthora*)、プラズモパラ属 (*Plasmopara*)、ポドスフェラ属 (*Podosphaera*)、ブチニア属 (*Puccinia*)、ピレノフォラ属 (*Pyrenophora*)、ピリクタリア属 (*Pyricularia*)、ピシウム属 (*Pythium*)、リゾクトニア属 (*Rhizoctonia*)、スクレロチウム属 (*Scerotium*)、スクレロチニア属 (*Sclerotinia*)、セプトリア属 (*Septoria*)、チエラビオプシス属 (*Thielaviopsis*)、ウンシヌラ属 (*Uncinula*)、ベンチュリア属 (*Venturia*)、パーティシリウム属 (*Verticillium*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ブルメ

リア属 (*Blumeria*)、ミコスフェレラ属 (*Mycosphaerella*)、ウスチラゴ属 (*Ustilago*)、メラムプソラ属 (*Melampsora*)、ファコプソラ属 (*Phakopsora*)、モニリニア属 (*Monilinia*)、ムコール属 (*Mucor*)、リゾプス属 (*Rhizopus*)、及びアスペルギルス属 (*Aspergillus*) を含む群から選択される属の植物病原性真菌に特異的である。

【0271】

所定の特定の実施形態において、本願に開示する組成物は、ボトリチス属 (*Botrytis*)、フザリウム属 (*Fusarium*) 又はペニシリウム属 (*Penicillium*) の真菌種の真菌の標的 (例えば、真菌の細胞膜成分) と特異的に結合するポリペプチドを、少なくとも含有する。

10

【0272】

特定の実施形態において、本発明は、有害生物の細胞膜の構造分子成分に特異的なポリペプチドを含有する農薬組成物を提供する。

【0273】

特定の実施形態において、本発明は、有害生物の細胞膜のタンパク質以外の構造分子成分に特異的なポリペプチドを含有する農薬組成物を提供する。

【0274】

さらに別の特定の実施形態において、植物有害生物は植物病原性細菌であり、限定されないが、(イネ褐条病の病原である) アシドボラクス・アベナエ亜種アベナエ (*Acidovorax avenae subsp. avenae*)、(カトレヤ褐斑細菌病の病原である) アシドボラクス・アベナエ亜種カトレヤエ (*Acidovorax avenae subsp. cattleyae*)、(コンニャク葉枯病の病原である) アシドボラクス・コンジャシ (*Acidovorax konjacii*)、(メロン毛根病の病原である) アグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*)、(根頭がん腫病の病原である) アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、(カーネーション斑点細菌病の病原である) ブルクホルデリア・アンドロポゴニス (*Burkholderia andropogonis*)、(カーネーション萎凋細菌病の病原である) ブルクホルデリア・カリオフィリ (*Burkholderia caryophylli*)、(シンビジウム褐斑細菌病の病原である) ブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、(グラジオラス首腐病の病原である) ブルクホルデリア・グラディオリ・パソパー・グラディオリ (*Burkholderia gladioli pv. gladioli*)、(イネもみ枯細菌病の病原である) ブルクホルデリア・グルメ (*Burkholderia glumae*)、(イネ苗立枯細菌病の病原である) ブルクホルデリア・プランタリイ (*Burkholderia plantarii*)、(トマトかいよう病の病原である) クラビバクター・ミシガネンシス亜種ミシガネンシス (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*)、(ジャガイモ輪腐病の病原である) クラビバクター・ミシガネンシス亜種セペドニカス (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*)、(ジャガイモ粘性腐敗病の病原である) クロストリジウム属菌種 (*Clostridium spp.*)、(タマネギかいよう病の病原である) クルトバクテリウム・フラクムファシエンス (*Curtobacterium flaccumfaciens*)、(ナシ火傷病の病原である) エルウィニア・アミロボラ (*Erwinia amylovora*)、(イネ内穎褐変病の病原である) エルウィニア・アナナス (*Erwinia ananas*)、(ジャガイモ黒脚病の病原である) エルウィニア・カロトボラ亜種アトロセプティカ (*Erwinia carotovora subsp. atroseptica*)、(野菜軟腐病の病原である) エルウィニア・カロトボラ亜種カロトボラ (*Erwinia carotovora subsp. carotovora*)、(タロイモ苗立枯細菌病の病原である) エルウィニア・クリサンテミ (*Erwinia chrysanthemi*)、(イネ株腐病の病原である) エルウィニア・クリサンテミ・

20

30

40

50

パソバー・ジアエ (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*)、(フジこぶ病の病原である)エルウィニア・ハービコラ・パソバー・ミレットイエ (*Erwinia herbicola* pv. *milletiae*)、(キク斑点細菌病の病原である)シュードモナス・チコリイ (*Pseudomonas cichorii*)、(トマト茎えそ細菌病の病原である)シュードモナス・コルガータ (*Pseudomonas corrugate*)、(イネ葉鞘褐変病の病原である)シュードモナス・フスコバギナエ (*Pseudomonas fuscovaginae*)、(キャベツ軟腐病の病原である)シュードモナス・マルギナリス・パソバー・マルギナリス (*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*)、(サトウキビ条斑病の病原である)シュードモナス・ルブリスバルビカンス (*Pseudomonas rubrisubalbicans*)、(テンサイ斑点細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・アプタタ (*Pseudomonas syringae* pv. *aptata*)、(ライグラスかさ枯病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・アトロプルプレア (*Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea*)、(クリかいよう病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・カスターネア (*Pseudomonas syringae* pv. *castaneae*)、(ダイズ斑点細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・グリシネ (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)、(キュウリ斑点細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・ラクリマンズ (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*)、(キャベツ黒斑細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・マクリコラ (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*)、(クワ縮葉細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・モリ (*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)、(スモモかいよう病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・モルスプルノルム (*Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*)、(イネかさ枯病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・オリゼ (*Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*)、(インゲンマメかさ枯病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・ファセオリコラ (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)、(エンドウ斑点細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・ピシ (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*)、(ゴマ斑点細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・セサメ (*Pseudomonas syringae* pv. *sesame*)、(エンバクすじ枯細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・ストリアファシエンス (*Pseudomonas syringae* pv. *striafaciens*)、(アズキ褐斑細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・シリング (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)、(タバコ野火病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・タバキ (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)、(チャ赤焼病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・テア (*Pseudomonas syringae* pv. *theae*)、(トマト斑葉細菌病の病原である)シュードモナス・シリングエ・パソバー・トマト (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)、(インゲンマメ褐斑細菌病の病原である)シュードモナス・ビリディフラバ (*Pseudomonas viridiflava*)、(萎凋細菌病の病原である)ラルストニア・ソラナケアルム (*Ralstonia solanacearum*)、(オーチャードグラス黄色ゴム病の病原である)ラサイバクター・ラサイー (*Rathayibacter rathayi*)、(ジャガイモ瘡痂病の病原である)ストレプトマイセス・スカビエス (*Streptomyces scabies*)、(サツマイモ立枯病の病原である)ストレプトマイセス・イポモエア (*Streptomyces ipomoea*)、(サトウキビ白すじ病の病原である)キサントモナス・アルビリネアンス (*Xanthomonas albilineans*

)、(ライムギ条斑細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・セレアリス(*Xanthomonas campestris* pv. *cerealis*)、(黒腐病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・カンペストリス(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、(カンキツかいよう病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・シトリ(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*)、(キュウリ褐斑細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・ククルピタエ(*Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*)、(ダイズ葉焼病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・グリシネス(*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)、(ストック黒腐病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・インカナエ(*Xanthomonas campestris* pv. *incanae*)、(ワタ角斑病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・マルバセアルム(*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*)、(マンゴーかいよう病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・マンギフェラエインディカエ(*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae indicae*)、(タバコ黄がさ細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・メレア(*Xanthomonas campestris* pv. *mellea*)、(ゴボウ黒斑細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・ニグロマキュランス(*Xanthomonas campestris* pv. *nigromaculans*)、(インゲンマメ葉焼病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・ファセオリ(*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*)、(インゲンマメ茎腐病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・ピシ(*Xanthomonas campestris* pv. *pisi*)、(モモせん孔細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・プルニ(*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*)、(ダイコン斑点細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・ラファニ(*Xanthomonas campestris* pv. *raphani*)、(ヒマシ斑点細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・リシニ(*Xanthomonas campestris* pv. *ricini*)、(チャかいよう病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・テイコラ(*Xanthomonas campestris* pv. *theicola*)、(オーチャードグラス斑点細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・トランスルセンス(*Xanthomonas campestris* pv. *translucens*)、(トマト斑点細菌病の病原である)キサントモナス・カンペストリス・パソパー・ベシカトリア(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)、(イネ白葉枯病の病原である)キサントモナス・オリゼ・パソパー・オリゼ(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)が挙げられる。

【0275】

さらに別の実施形態において、本発明の農薬製剤は、農業、園芸、森林、庭園及びレジャー施設で遭遇する昆虫、クモ形類、蠕虫類、ウイルス、センチュウ類及び軟体動物等の植物有害生物を防除するために使用することもできる。本発明に係る組成物は、通常の状態感受性の種と耐性の種に対して活性であり、発生の全段階又は一部の段階に対して活性である。これらの植物有害生物としては、節足動物門(*Arthropoda*)、特にクモ形類の有害生物が挙げられ、例えば、アシフトコナダニ属種(*Acarus* spp.)、アケリア・シェルドニ(*Aceria sheldoni*)、アクロプス属種(*Aculops* spp.)、アクルス属種(*Aculus* spp.)、キララマダニ属種(*Amblyomma* spp.)、アンフィテトラニクス・ビエネンシス(*Amphitetranychus viennensis*)、ナガヒメダニ属種(*Argas* spp.)、ウシマダニ亜属種(*Boophilus* spp.)、プレビパルプス属種



(*Brevipalpus* spp.)、クローバーピラハダニ(*Bryobia praetiosa*)、セントルロイデス属種(*Centruroides* spp.)、コリオプテス属種(*Chorioptes* spp.)、ワクモ(*Dermanyssus gallinae*)、ヤケヒョウヒダニ(*Dermatophagoides pteronyssius*)、コナヒョウヒダニ(*Dermatophagoides farinae*)、カクマダニ属種(*Dermacentor* spp.)、アケハダニ属種(*Eotetranychus* spp.)、エピトリメルス・ピリ(*Epitrimerus pyri*)、トウヨウハダニ属種(*Eutetranychus* spp.)、ユキヤナギハマキフシダニ属種(*Eriophyes* spp.)、ハロチデウス・デストルクトル(*Halotydeus destructor*)、ヘミタルソネムス属種(*Hemitarsonemus* spp.)、イボマダニ属種(*Hyalomma* spp.)、マダニ属種(*Ixodes* spp.)、ゴケグモ属種(*Latrodectus* spp.)、イトグモ属種(*Loxosceles* spp.)、メタテトラニクス属種(*Metatetranychus* spp.)、ヌフェルサ属種(*Nuphersa* spp.)、ツメハダニ属種(*Oligonychus* spp.)、ヒメダニ属種(*Ornithodoros* spp.)、イエダニ属種(*Ornithonyssus* spp.)、マルハダニ属種(*Panonychus* spp.)、ミカンサビダニ(*Phyllocoptruta oleivora*)、チャノホコリダニ(*Polyphagotarsonemus latus*)、キュウセンヒゼンダニ属種(*Psoroptes* spp.)、コイタマダニ属種(*Rhipicephalus* spp.)、ネダニ属種(*Rhizoglyphus* spp.)、ヒゼンダニ属種(*Sarcoptes* spp.)、イスラエルゴールドスコープオン(*Scorpio maurus*)、ステノタルソネムス属種(*Stenotarsonemus* spp.)、ホコリダニ属種(*Tarsonemus* spp.)、ナミハダニ属種(*Tetranychus* spp.)、ベヨビス属種(*Vaejovis* spp.)、バサテス・リコペルシチ(*Vasates lycopersici*)が挙げられる。

## 【0276】

さらに他の例は、シラミ亜目(*Anoplura*(シラミ目(*Phthiraptera*))であり、例えば、ダマリニア属種(*Damalinia* spp.)、ケモノジラミ属種(*Haematopinus* spp.)、リノグナツス属種(*Linognathus* spp.)、ヒトジラミ属種(*Pediculus* spp.)、ケジラミ(*Ptirus pubis*)、トリコデクテス属種(*Trichodectes* spp.)が挙げられる。

## 【0277】

さらに他の例は、ムカデ綱(*Chilopoda*)であり、例えば、ツチムカデ属種(*Geophilus* spp.)、スクティゲラ属種(*Scutigera* spp.)が挙げられる。

## 【0278】

さらに他の例は、鞘翅目(コウチュウ目)(*Coleoptera*)であり、例えば、ヒゲナガハムシ(*Acalymma vittatum*)、インゲンマメゾウムシ(*Acanthoscelides obtectus*)、コイチャコガネ属種(*Adoretus* spp.)、アゲラスティカ・アルニ(*Agelastica alni*)、カバイロコメツキ属種(*Agriotes* spp.)、ガイマイゴミムシダマシ(*Alphitobius diaperinus*)、アンフィマロン・ソルスチチアリス(*Ampihimallon solstitialis*)、イエシバンムシ(*Anobium punctatum*)、ゴマダラカミキリ属種(*Anoplophora* spp.)、ハナゾウムシ属種(*Anthonomus* spp.)、マルカツオブシムシ属種(*Anthrenus* spp.)、ホソクチゾウムシ属種(*Apion* spp.)、カンショコガネ属種(*Apogonia* spp.)、セマルキスイ属種(*Atomaria* spp.)、ヒメカツオブシ属種(*Attagenus* spp.)、インゲンマメゾウム

シ (*Bruchidius obtectus*)、ブルクス属種 (*Bruchus* spp.)、カメノコハムシ属種 (*Cassida* spp.)、ピーンリーフビートル (*Cerrotoma trifurcata*)、サルゾウムシ属種 (*Ceutorrhynchus* spp.)、ヒサゴトビハムシ属種 (*Chaetocnema* spp.)、クレオヌス・メンジクス (*Cleonus mendicus*)、コノデルス属種 *Conoderus* spp.)、コスモポリテス属種 (*Cosmopolites* spp.)、コステリトラ・ゼアランディカ (*Costelytra zealandica*)、クテニセラ属種 (*Ctenicera* spp.)、シギゾウムシ属種 (*Curculio* spp.)、ヤナギシリジロゾウムシ (*Cryptorrhynchus lapathi*)、シリンドロコブツルス属種 (*Cylindrocopturus* spp.)、カツ 10  
 オブシムシ属種 (*Dermestes* spp.)、ジアブロチカ属種 (*Diabrotica* spp.)、ジコクロシス属種 (*Dichocrocis* spp.)、ジロボデルス属種 (*Diloboderus* spp.)、エピラクナ属種 (*Epilachna* spp.)、エピトリクス属種 (*Epitrix* spp.)、ファウスチヌス属種 (*Faustinus* spp.)、セマルヒョウホンムシ (*Gibbium psylloides*)、ハイマダラノメイガ (*Hellula undalis*)、ヘテロニクス・アラトル (*Heteronychus arator*)、ヘテロニクス属種 (*Heteronyx* spp.)、ヒラモルファ・エレガンス (*Hylamorpha elegans*)、オウシュウイエカミキリ (*Hylotrupes bajulus*)、アル 20  
 ファルファタコゾウムシ (*Hypera postica*)、ヒポテナムス属種 (*Hypothenemus* spp.)、ラクノステルナ・コンサギネア (*Lachnosterna consanguinea*)、クビボソハムシ属種 (*Lema* spp.)、コロラドハムシ (*Leptinotarsa decemlineata*)、ロイコプテラ属種 (*Leucoptera* spp.)、イネミズゾウムシ (*Lissorhopterus oryzophilus*)、カツオゾウムシ属種 (*Lixus* spp.)、ルペ 30  
 ロデス属種 (*Luperodes* spp.)、リクツス属種 (*Lycetus* spp.)、メガセリス属種 (*Megascelis* spp.)、クシコメツキ属種 (*Melanotus* spp.)、メリゲテス・アエネウス (*Meligethes aeneus*)、コフキコガネ属種 (*Melolontha* spp.)、ミグドルス属種 (*Migdolus* spp.)、ヒゲナガカミキリ属種 (*Monochamus* spp.)、 40  
 ナウバクツス・キサントグラフス (*Naupactus xanthographus*)、ゴールデンスパイダービートル (*Niptus hololeucus*)、サイカブト (*Oryctes rhinoceros*)、ノコギリヒラタムシ (*Oryzaephilus surinamensis*)、イネミズゾウムシ (*Oryzaphagus oryzae*)、オチオリンクス属種 (*Otiorrhynchus* spp.)、コアオ 50  
 ハナムグリ (*Oxycetonia jucunda*)、フェドン・コクレアリエ (*Phaedon cochleariae*)、フィロファガ属種 (*Phyllophaga* spp.)、キスジノミハムシ属種 (*Phyllotreta* spp.)、マメコガネ (*Popillia japonica*)、プレムノトリペス属種 (*Premnotrypes* spp.)、プロステファヌス・トルンカツス (*Prostephanus t* 40  
*runcatus*)、ナガスネトビハムシ属種 (*Psylliodes* spp.)、プチヌス属種 (*Ptinus* spp.)、リゾビウス・ベントラリス (*Rhizobius ventralis*)、コナナガシンクイ (*Rhizopertha dominica*)、コクゾウムシ属種 (*Sitophilus* spp.)、スフェノフォルス属種 (*Sphenophorus* spp.)、ジンサンシバンムシ (*Stegobium paniceum*)、ステルネクス属種 (*Sternechus* spp.)、シンフィレテス属種 (*Symphyletes* spp.)、タニメクス属種 (*Tanymercus* spp.)、チャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*)、コクヌストモドキ属種 (*Tribolium* spp.)、マダラカツオブシムシ属種 (*Trogoderma* spp.)、チキウス属種 (*Tychius* spp.)、ト 50

ラカミキリ属種 (*Xylotrechus* spp.)、ザブルス属種 (*Zabrus* spp.) が挙げられる。

【0279】

さらに他の例は、トビムシ目 (*Collembola*) であり、例えば、シロトビムシ (*Onychiurus armatus*) が挙げられる。

【0280】

さらに他の例は、ヤスデ綱 (*Diplopoda*) であり、例えば、ヘビヤスデ (*Blaniulus guttulatus*) が挙げられる。

【0281】

さらに他の例は、双翅目 (ハエ目) (*Diptera*) であり、例えば、ヤブカ属 (*Aedes* spp.)、アグロミザ属種 (*Agromyza* spp.)、アナストレファ属種 (*Anastrepha* spp.)、ハマダラカ属種 (*Anopheles* spp.)、ハリオタマバエ属種 (*Asphondylia* spp.)、バクトセラ属種 (*Bactrocera* spp.)、ビビオ・ホルツタヌス (*Bibio hortulanus*)、ホオアカクロバエ (*Calliphora erythrocephala*)、チチュウカイミバエ (*Ceratitis capitata*)、ユスリカ属種 (*Chironomus* spp.)、オビキンバエ属種 (*Chrysomyia* spp.)、メクラアブ属種 (*Chrysops* spp.)、コクリオミヤ属種 (*Cochliomyia* spp.)、コンタリニア属種 (*Contarinia* spp.)、ヒトクイバエ (*Cordylobia anthropophaga*)、イエカ属種 (*Culex* spp.)、サシバエ属種 (*Culicoides* spp.)、ハボシカ属種 (*Culiseta* spp.)、ウサギヒフバエ属種 (*Cuterebra* spp.)、オリーブミバエ (*Dacus oleae*)、ダシネウラ属種 (*Dasyneura* spp.)、デリア属種 (*Delia* spp.)、ヒトヒフバエ (*Dermatobia hominis*)、シヨウジョウバエ属種 (*Drosophila* spp.)、エキノクネムス属種 (*Echinocnemus* spp.)、ヒメイエバエ属種 (*Fannia* spp.)、ウマバエ属種 (*Gasterophilus* spp.)、ツエツエバエ属種 (*Glossina* spp.)、ゴマフアブ属種 (*Haematopota* spp.)、ヒドレリア属種 (*Hydrellia* spp.)、ヒレミア属種 (*Hylemyia* spp.)、ヒッポボスカ属種 (*Hyppobosca* spp.)、ウシバエ属種 (*Hypoderma* spp.)、リリオミザ属種 (*Liriomyza* spp.)、キンバエ属種 (*Lucilia* spp.)、ルツオミア属種 (*Lutzomia* spp.)、マンソニア属種 (*Mansonina* spp.)、イエバエ属種 (*Musca* spp.)、ネザラ属種 (*Nezara* spp.)、エストルス属種 (*Oestrus* spp.)、オシネラ・フリット (*Oscinella frit*)、ペゴミア属種 (*Pegomyia* spp.)、サシチョウバエ属種 (*Phlebotomus* spp.)、フォルビア属種 (*Phorbia* spp.)、クロキンバエ属種 (*Phormia* spp.)、プロジプロシス属種 (*Prodiplosis* spp.)、ニンジンサビバエ (*Psila rosae*)、ラゴレチス属種 (*Rhagoletis* spp.)、ニクバエ属種 (*Sarcophaga* spp.)、シムリウム属種 (*Simulium* spp.)、サシバエ属種 (*Stomoxys* spp.)、アブ属種 (*Tabanus* spp.)、タニア属種 (*Tannia* spp.)、テタノプス属種 (*Tetanops* spp.)、ガガンボ属種 (*Tipula* spp.) が挙げられる。

【0282】

さらに他の例は、カメムシ亜目 (*Heteroptera*) であり、例えば、アナサ・トリスチス (*Anasa tristis*)、アンテスティオプシス属種 (*Antestiopsis* spp.)、ボイセア属種 (*Boisea* spp.)、ブリッスス属種 (*Blissus* spp.)、カロコリス属種 (*Calocoris* spp.)、コミドリチビトピカスミカメ (*Campylomma livida*)、カベレリウス属種

(*Cavelerius* spp.)、トコジラミ属種(*Cimex* spp.)、エリ  
 ホコリ属種(*Collaria* spp.)、メクラカメムシ(*Creontiades  
 dilutus*)、ダシヌス・ピペリス(*Dasynus piperis*)、ジケロブ  
 ス・フルカツス(*Dichelops furcatus*)、ジコノコリス・ヘウェッチ  
 (*Diconocoris hewetti*)、ジスデルクス属種(*Dysdercus  
 spp.*)、ユースキスツス属種(*Euschistus* spp.)、ユーリガステル  
 属種(*Eurygaster* spp.)、ヘリオペルチス属種(*Heliopeleti  
 s* spp.)、ホルシアス・ノビレルス(*Horcias nobilellus*)、  
 クモヘリカメムシ属種(*Leptocorisa* spp.)、ヘリカメムシ(*Lept  
 oglossus phyllopus*)、マキバカスミカメ属種(*Lygus* spp 10  
 .)、マクロペス・エクスカバツス(*Macropes excavatus*)、カスミ  
 カメムシ科(*Miridae*)、モナロニオン・アタラツム(*Monalonion a  
 tratum*)、ネザラ属種(*Nezara* spp.)、オエバルス属種(*Oebal  
 us* spp.)、カメムシ科(*Pentomidae*)、ピエスマ・カドラタ(*Pie  
 sma quadrata*)、ピエゾドルス属種(*Piezodorus* spp.)、  
 トピカスミカメ属種(*Psallus* spp.)、シューダシスタ・ペルセ(*Pseu  
 dacysta perseae*)、ロドニウス属種(*Rhodnius* spp.)、カ  
 カオカスミカメムシ(*Sahlbergella singularis*)、スカプトコ  
 リス・カスタネア(*Scaptocoris castanea*)、スコチノフォラ属種  
 (*Scotinophora* spp.)、ナシゲンバイ(*Stephanitis n 20  
 ashi*)、チブラカ属種(*Tibraca* spp.)、オオサシガメ属種(*Tria  
 toma* spp.)が挙げられる。

【0283】

さらに他の例は、ヨコバイ亜目(*Homoptera*)であり、例えば、アキルトシフ  
 オン属種(*Acyrtosipon* spp.)、アクロゴニア属種(*Acrogon  
 ia* spp.)、エネオラミア属種(*Aeneolamia* spp.)、アゴノセナ  
 属種(*Agonosцена* spp.)、カタバミコナジラミ属種(*Aleurode  
 s* spp.)、アレウロロブス・バロデンシス(*Aleurolobus barod  
 ensis*)、アレウロトリクス属種(*Aleurothrixus* spp.)、アム  
 ラスカ属種(*Amrasca* spp.)、アヌラフィス・カルドゥイ(*Anuraph 30  
 is cardui*)、アオニディエラ属種(*Aonidiella* spp.)、アフ  
 アノスティグマ・ピリ(*Aphanostigma pin*)、ワタアブラムシ属種(*A  
 phis* spp.)、フタテンヒメヨコバイ(*Arboridia apicalis*)、  
 アスピディエラ属種(*Aspidiella* spp.)、アスピジオツス属種(*A  
 spidiotus* spp.)、アタヌス属種(*Atanus* spp.)、ジャガイ  
 モヒゲナガアブラムシ(*Aulacorthum solani*)、ベミシア属種(*Be  
 misia* spp.)、ムギワラギクオマルアブラムシ(*Brachycaudus  
 helichrysi*)、ブラキコルス属種(*Brachycolus* spp.)、  
 ダイコンアブラムシ(*Brevicoryne brassicae*)、カリギボナ・マ  
 ルギナタ(*Calligypona marginata*)、カルネオセファラ・フルギ 40  
 ダ(*Carneocephala fulgida*)、サトウキビコナフキツノアブラム  
 シ(*Ceratovacuna lanigera*)、コガシラアワフキムシ科(*Cer  
 copidae*)、ロウムシ属種(*Ceroplastes* spp.)、イチゴケナガ  
 アブラムシ(*Chaetosiphon fragaefolii*)、キオナスピス・テ  
 ガレンシス(*Chionaspis tegalensis*)、クロリタ・オヌキイ(*C  
 hlorita onukii*)、クルミアブラムシ(*Chromaphis jugl  
 andicola*)、クリソムファルス・フィクス(*Chrysomphalus fi  
 cus*)、トウモロコシヨコバイ(*Cicadulina mbila*)、コッコミチル  
 ス・ハリ(*Coccomytilus halli*)、コックス属種(*Coccus* s  
 pp.)、クリプトミズス・リビス(*Cryptomyzus ribis*)、ダルブル 50

ス属種 (*Dalbulus* spp.)、ジアレウロデス属種 (*Dialeurodes* spp.)、ジアフォリナ属種 (*Diaphorina* spp.)、ジアスピス属種 (*Diaspis* spp.)、ワラジカイガラムシ属種 (*Drosicha* spp.)、ジサフィス属種 (*Dysaphis* spp.)、ジスミコックス属種 (*Dysmicoccus* spp.)、ミドリヒメヨコバイ属種 (*Empoasca* spp.)、エリオソマ属種 (*Eriosoma* spp.)、エリトロネウラ属種 (*Erythronoura* spp.)、ユーセリス・ビロバツス (*Euscelis bilobatus*)、フェリシア属種 (*Ferrisia* spp.)、ゲオコックス・コフェアエ (*Geococcus coffeae*)、ヒエログリフス属種 (*Hieroglyphus* spp.)、ホマロジスカ・コアグラタ (*Homalodisca coagulata*)、モモコフキアブラムシ (*Hyalopterus arundinis*)、ワタフキカイガラムシ属種 (*Icerya* spp.)、イジオセルス属種 (*Idiocerus* spp.)、イジオスコプス属種 (*Idioscopus* spp.)、ヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus*)、タマカタカイガラムシ属種 (*Lecanium* spp.)、カキカイガラムシ属種 (*Lepidosaphes* spp.)、ニセダイコンアブラムシ (*Lipaphis erysimi*)、マクロシフム属種 (*Macrosiphum* spp.)、マハナルバ属種 (*Mahanarva* spp.)、ヒエノアブラムシ (*Melanaphis sacchari*)、メトカルフィエラ属種 (*Metcalfiella* spp.)、ムギウスイロアブラムシ (*Metopolophium dirhodum*)、モネリア・コスタリス (*Monellia costalis*)、モネリオプシス・ペカニス (*Monelliopsis pecanensis*)、ミズス属種 (*Myzus* spp.)、レタスヒゲナガアブラムシ (*Nasonovia ribisnigri*)、ネフォテティクス属種 (*Nephotettix* spp.)、トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*)、オンコメトピア属種 (*Oncometopia* spp.)、オルテジア・プレロング (*Orthezia praelonga*)、ヤマモモコナジラミ (*Parabemisia myricae*)、パラトリオザ属種 (*Paratrioza* spp.)、クロホシカイガラムシ属種 (*Parlatoria* spp.)、ペムフィグス属種 (*Pemphigus* spp.)、トウモロコシウンカ (*Peregrinus maidis*)、ワタカイガラモドキ属種 (*Phenacoccus* spp.)、ドロノキワタアブラムシ (*Phloeomyzus passerinii*)、ホップイボアブラムシ (*Phorodon humuli*)、フィロキセラ属種 (*Phylloxera* spp.)、ハランナガカイガラムシ (*Pinnaspis aspidistrae*)、プラノコックス属種 (*Planococcus* spp.)、ナシガタカタカイガラムシ (*Protopulvinaria pyriformis*)、クワシロカイガラムシ (*Pseudaulacaspis pentagona*)、クワコナカイガラムシ属種 (*Pseudococcus* spp.)、シラ属種 (*Psylla* spp.)、プテロマルス属種 (*Pteromalus* spp.)、ピリラ属種 (*Pyrilla* spp.)、カドラスピジオツス属種 (*Quadraspidiotus* spp.)、ギガスナンベイオオゼミ (*Quesada gigas*)、ラストロコックス属種 (*Rastrococcus* spp.)、ロパロシフム属種 (*Rhopalosiphum* spp.)、サイセチア属種 (*Saissetia* spp.)、スカフォイデス・チタヌ (*Scaphoides titanus*)、ムギミドリアブラムシ (*Schizaphis graminum*)、ヤシクビレマルカイガラムシ (*Selenaspidus articulatus*)、ソガタ属種 (*Sogata* spp.)、セジロウンカ (*Sogatella furcifera*)、ソガトデス属種 (*Sogatodes* spp.)、スチクトセファラ・フェスチナ (*Stictoccephala festina*)、テナラファラ・マラエンシス (*Tenalaphara malayensis*)、チノカリス・カリエフォリエ (*Tinocallis caryaefoliae*)、トマスピス属種 (*Tomaspis* spp.)、トクソプテラ属種 (*Toxoptera* spp.)、トリアロイ

10

20

30

40

50

ロデス属種 (*Trialeurodes* spp.)、トリオザ属種 (*Triozas* spp.)、チフロシバ属種 (*Typhlocyba* spp.)、ナガカイガラムシ属種 (*Unaspis* spp.)、ブドウネアブラムシ (*Viteus vitifolii*)、ジジナ属種 (*Zygina* spp.) が挙げられる。

【0284】

さらに他の例は、膜翅目(ハチ目) (*Hymenoptera*) であり、例えば、ヒメハキリアリ属種 (*Acromyrmex* spp.)、カブラハバチ属種 (*Athalia* spp.)、ハキリアリ属種 (*Atta* spp.)、マツハバチ属種 (*Diprion* spp.)、ミハバチ属種 (*Hoplocampa* spp.)、ケアリ属種 (*Lasius* spp.)、イエヒメアリ (*Monomorium pharaonis*)、ヒアリ (*Solenopsis invicta*)、コヌカアリ属種 (*Tapinoma* spp.)、スズメバチ属種 (*Vespa* spp.) が挙げられる。

10

【0285】

さらに他の例は、ワラジムシ目 (*Isopoda*) であり、例えば、オカダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*)、ホンワラジムシ (*Oniscus asellus*)、ワラジムシ (*Porcellio scaber*) が挙げられる。

【0286】

さらに他の例は、シロアリ目 (*Isoptera*) であり、例えば、コプトテルメス属種 (*Coptotermes* spp.)、コルニテルメス・クムランス (*Cornitermes cumulans*)、クリプトテルメス属種 (*Cryptotermes* spp.)、インシシテルメス属種 (*Incisitermes* spp.)、ミクロテルメス・オベシ (*Microtermes obesi*)、オドントテルメス属種 (*Odontotermes* spp.)、ヤマトシロアリ属種 (*Reticulitermes* spp.) が挙げられる。

20

【0287】

さらに他の例は、鱗翅目(チョウ目) (*Lepidoptera*) であり、例えば、オオケンモン (*Acronicta major*)、アドクソフィエス属種 (*Adoxophyes* spp.)、ナカジロシタバ (*Aedia leucomelas*)、アグロチス属種 (*Agrotis* spp.)、アラバマ属種 (*Alabama* spp.)、クルミマダラメイガ (*Amyelois transitella*)、アナルシア属種 (*Anarsia* spp.)、アンチカルシア属種 (*Anticarsia* spp.)、アルジロピオセ属種 (*Argyroplote* spp.)、ヨトウガ (*Barathra brassicae*)、ユウレイセセリ (*Borbo cinnara*)、コットンリーフパーフォレーター (*Bucculatrix thurberiella*)、ブパルス・ピニアリウス (*Bupalus piniarius*)、ブッセオラ属種 (*Busseola* spp.)、カコエキア属種 (*Cacoecia* spp.)、チャノハマキホソガ (*Caloptilia theivora*)、カプア・レチクラナ (*Capua reticulana*)、コドリング (*Carpocapsa pomonella*)、モモシンクイガ (*Carposina niponensis*)、ケマトビア・ブルマタ (*Chematobia brumata*)、キロ属種 (*Chilo* spp.)、コリストネウラ属種 (*Choristoneura* spp.)、クリシア・アンビゲラ (*Clysia ambiguella*)、クナファロセルス属種 (*Cnaphalocerus* spp.)、クネファシア属種 (*Cnephasia* spp.)、コノボモルファ属種 (*Conopomorpha* spp.)、コノトラケルス属種 (*Conotrachelus* spp.)、コピタルシア属種 (*Copitarsia* spp.)、シジア属種 (*Cydia* spp.)、ダラカ・ノクツイデス (*Dalacanoctuides*)、ジアファニア属種 (*Diaphania* spp.)、サトウキビメイガ (*Diatraea saccharalis*)、エアリアス属種 (*Earias* spp.)、エクジトロファ・アウランチュム (*Ecdytolopha aurantium*)、モロコシマダラメイガ (*Elasmopalpus lignosellus*)

30

40

50

)、エルダナ・サッカリナ (*Eldana saccharina*)、エフェスチア属種 (*Ephestia* spp.)、エピノチア属種 (*Epinochia* spp.)、リンゴウスチャイロハマキ (*Epiphyas postvittana*)、エチエラ属種 (*Etiella* spp.)、ユーリア属種 (*Eulia* spp.)、ブドウホソハマキ (*Eupoecilia ambiguella*)、ユーブロクチス属種 (*Euproctis* spp.)、ユーキソア属種 (*Euxoa* spp.)、フェルチア属種 (*Feltia* spp.)、ハチノスツヅリガ (*Galleria mellonella*)、グラシラリア属種 (*Gracillaria* spp.)、グラフォリタ属種 (*Grapholitha* spp.)、ヘジレプタ属種 (*Hedylepta* spp.)、ヘリコベルバ属種 (*Helicoverpa* spp.)、ヘリオチス属種 (*Heliothis* spp.)、チャイロマルハキバガ (*Hofmannophila pseudospretella*)、ホモエオソマ属種 (*Homoeosoma* spp.)、ホモナ属種 (*Homona* spp.)、ヒポノメウタ・パデラ (*Hyponomeuta padella*)、カキノヘタムシガ (*Kakivoria flavofasciata*)、ラフィグマ属種 (*Laphygma* spp.)、ラスペイレシア・モレスト (*Laspeyresia molesta*)、ナスノメイガ (*Leucinodes orbonalis*)、ロイコプテラ属種 (*Leucoptera* spp.)、リトコレチス属種 (*Lithocolletis* spp.)、リトファネ・アンテナタ (*Lithophane antennata*)、ロベシア属種 (*Lobesia* spp.)、ロキサグロチス・アルビコスタ (*Loxagrotis albicosta*)、リマントリア属種 (*Lymantria* spp.)、リオネチア属種 (*Lyonetia* spp.)、オビカレハ (*Malacosoma neustria*)、マメノメイガ (*Maruca testulalis*)、ヨトウガ (*Mamestra brassicae*)、モシス属種 (*Mocis* spp.)、アワヨトウ (*Mythimna separata*)、ニムフラ属種 (*Nymphula* spp.)、オイケチクス属種 (*Oiketicus* spp.)、オリア属種 (*Oria* spp.)、オルタガ属種 (*Orthaga* spp.)、オストリニア属種 (*Ostrinia* spp.)、イネクビボソハムシ (*Oulema oryzae*)、マツキリガ (*Panolis flammnea*)、イチモンジセセリ属種 (*Parnara* spp.)、ベクチノフォラ属種 (*Pectinophora* spp.)、ペリロイコプテラ属種 (*Perileucoptera* spp.)、フトリメア属種 (*Phthorimaea* spp.)、ミカンハモグリガ (*Phyllocnistis citrella*)、キンモンホソガ属種 (*Phyllonorycter* spp.)、モンシロチョウ属種 (*Pieris* spp.)、プラチノタ・スツルタナ (*Platynota stultana*)、ノシメダラメイガ (*Plodia interpunctella*)、プルシア属種 (*Plusia* spp.)、コナガ (*Plutella xylostella*)、プレイス属種 (*Prays* spp.)、プロデニア属種 (*Prodenia* spp.)、プロトパルセ属種 (*Protoparce* spp.)、シューダレチア属種 (*Pseudaletia* spp.)、ソイビーンルーパー (*Pseudoplusia includens*)、アワノメイガ (*Pyrausta nubilalis*)、サンフラワールーパー (*Rachiplusia nu*)、スコエノビウス属種 (*Schoenobius* spp.)、シルポファガ属種 (*Scirpophaga* spp.)、スコチア・セゲツム (*Scotia segetum*)、セサミア属種 (*Sesamia* spp.)、スパルガノチス属種 (*Sparganothis* spp.)、スポドプテラ属種 (*Spodoptera* spp.)、スタトモポダ属種 (*Stathmopoda* spp.)、ストモプテリクス・サブセシベリア (*Stomopteryx subsecivella*)、シナンテドン属種 (*Synanthedon* spp.)、テシア・ソラニボラ (*Tecia solanivora*)、テルメシア・ゲマタリス (*Thermesia gemmatalis*)、イガ (*Tinea pellionella*)、コイガ (*Tineola bisselliella*)、トルトリクス属種 (*Tortrix* spp.

10

20

30

40

50

.)、ジウタンガ (*Trichophaga tapetzella*)、トリコブルシア属種 (*Trichoplusia* spp.)、トマトキバガ (*Tuta absoluta*)、ピラコラ属種 (*Virachola* spp.) が挙げられる。

【0288】

さらに他の例は、直翅目 (バッタ目) (*Orthoptera*) であり、例えば、ヨーロッパイエコオロギ (*Acheta domesticus*)、トウヨウゴキブリ (*Blatta orientalis*)、チャバネゴキブリ (*Blattella germanica*)、ジクロプルス属種 (*Dichroplus* spp.)、グリロタルパ属種 (*Gryllotalpa* spp.)、マデラゴキブリ (*Leucophaea maderae*)、トノサマバッタ属種 (*Locusta* spp.)、メラノプルス属種 (*Melanoplus* spp.)、ペリプラネタ属種 (*Periplaneta* spp.)、ヒトノミ (*Pulex irritans*)、サバクトビバッタ (*Schistocerca gregaria*)、チャオビゴキブリ (*Supella longipalpa*) が挙げられる。

【0289】

さらに他の例は、ノミ目 (*Siphonaptera*) であり、例えば、セラトフィルス属種 (*Ceratophyllus* spp.)、クテノセファリデス属種 (*Ctenocephalides* spp.)、スナノミ (*Tunga penetrans*)、ケオプスネズミノミ (*Xenopsylla cheopis*) が挙げられる。

【0290】

さらに他の例は、コムカデ目 (*Symphyla*) であり、例えば、ミソコムカデ属種 (*Scutigerebella* spp.) が挙げられる。

【0291】

さらに他の例は、アザミウマ目 (*Thysanoptera*) であり、例えば、クサキイロアザミウマ (*Anaphothrips obscurus*)、バリオトリプス・ビフォルミス (*Baliothrips biformis*)、ドレパノトリス・レウテリ (*Drepanothrips reuteri*)、エネオトリプス・フラベンス (*Enneothrips flavens*)、フランクリニエラ属種 (*Frankliniella* spp.)、ヘリオトリプス属種 (*Heliothrips* spp.)、クリバナアザミウマ (*Hercinothrips femoralis*)、リピフォロトリプス・クルエンタツス (*Rhipiphorothrips cruentatus*)、シルトトリプス属種 (*Scirtothrips* spp.)、テニオトリプス・カルダモニ (*Taeniothrips cardamoni*)、トリプス属種 (*Thrips* spp.) が挙げられる。

【0292】

さらに他の例は、シミ目 (*Zygentoma* (= *Thysanura*)) であり、例えば、セイヨウシミ (*Lepisma saccharina*)、マダラシミ (*Thermobia domestica*) が挙げられる。

【0293】

別の実施形態では、軟体動物門 (*Mollusca*)、特に、二枚貝綱 (*Bivalvia*) の類、例えば、ドレイセナ属種 (*Dreissena* spp.) の有害生物も重要な植物有害生物である。

【0294】

別の実施形態では、腹足綱 (*Gastropoda*) の類の有害生物も重要な植物有害生物であり、例えば、アニオン属種 (*Anion* spp.)、ビオンファラリア属種 (*Biomphalaria* spp.)、ブリヌス属種 (*Bulinus* spp.)、デロセラス属種 (*Deroceras* spp.)、ガルバ属種 (*Galba* spp.)、リムナエ属種 (*Lymnaea* spp.)、オンコメラニア属種 (*Oncomelelania* spp.)、リンゴガイ属種 (*Pomacea* spp.)、スクシネア属種 (*Succinea* spp.) が挙げられる。

10

20

30

40

50



## 【0295】

さらに別の実施形態では、線形動物門(Nematoda)の植物有害生物、即ち、植物に寄生して植物に損傷を生じるセンチュウ類を意味する植物寄生性センチュウ類が重要な植物有害生物である。植物センチュウ類は、植物寄生性センチュウ類と、土壤中で生活するセンチュウ類を含む。植物寄生性センチュウ類としては、限定されないが、キシフィネマ属種(Xiphinema spp.)、ロンギドルス属種(Longidorus spp.)、及びトリコドルス属種(Trichodorus spp.)等の外部寄生虫；チレンクルス属種(Tylenchulus spp.)等の半寄生虫；プラチレンクス属種(Pratylenchus spp.)、ラドフォルス属種(Radopholus spp.)、及びスクテロネルナ属種(Scutellonerna spp.)等の移動性内部寄生虫；ヘテロデラ属種(Heterodera spp.)、グロボデラ属種(Globodera spp.)、及びメロイドギネ属種(Meloidogyne spp.)等の定着性寄生虫、並びにジチレンクス属種(Ditylenchus spp.)、アフエレンコイデス属種(Aphelenchoides spp.)、及びヒルシュマニエラ属種(Hirschmaniella spp.)等の茎・葉内部寄生虫が挙げられる。さらに、有害な根寄生性土壌センチュウ類は、ヘテロデラ(Heterodera)属若しくはグロボデラ(Globodera)属のシスト形成センチュウ類、及びノ又はメロイドギネ(Meloidogyne)属のネコブセンチュウ類である。これらの属の有害な種は、例えば、ネコブセンチュウ(Meloidogyne incognata)、ダイズシストセンチュウ(Heterodera glycines)、ジャガイモシロシストセンチュウ(Globodera pallida)、及びジャガイモシストセンチュウ(Globodera rostochiensis)である。植物有害生物として重要なさらに他の重要な属としては、ロチレンクルス属種(Rotylenchulus spp.)、パラトリコドルス属種(Paratrichlodorus spp.)、キタネグサレセンチュウ(Pratylenchus penetrans)、バナナネモグリセンチュウ(Radopholus similis)、ナミクキセンチュウ(Ditylenchus dipsaci)、ミカンネセンチュウ(Tylenchulus semipenetrans)、キシフィネマ属種(Xiphinema spp.)、ブルサフェレンクス属種(Bursaphelenchus spp.)等、特にアフエレンコイデス属種(Aphelenchoides spp.)、ブルサフェレンクス属種(Bursaphelenchus spp.)、ジチレンクス属種(Ditylenchus spp.)、グロボデラ属種(Globodera spp.)、ヘテロデラ属種(Heterodera spp.)、ロンギドルス属種(Longidorus spp.)、メロイドギネ属種(Meloidogyne spp.)、プラチレンクス属種(Pratylenchus spp.)、バナナネモグリセンチュウ(Radopholus similis)、トリコドルス属種(Trichodorus spp.)、ミカンネセンチュウ(Tylenchulus semipenetrans)、キシフィネマ属種(Xiphinema spp.)が挙げられる。

## 【0296】

さらに別の実施形態において、植物有害生物はウイルスであり、本発明の農薬製剤は、植物におけるウイルス感染症を治療すること又はウイルス感染力を抑制することを目的とし、植物ウイルスは、アルファモウイルス、アレキシウイルス、アルファクリプトウイルス、アナラウイルス、アブスカウイロイド、アウレウスウイルス、アベナウイルス、アブサンウイロイド、バドナウイルス、ベゴモウイルス、ベニウイルス、ベータクリプトウイルス、ベータフレキシウイルス科、プロモウイルス、バイモウイルス、カピロウイルス、カーラウイルス、カルモウイルス、カウリモウイルス、カベモウイルス、チェラウイルス、クロステロウイルス、コカドウイロイド、コレウイロイド、コモウイルス、クリニウイルス、ククモウイルス、クルトウイルス、シトラブドウイルス、ジアントウイルス、エナモウイルス、ウンブラウイルス及びB型サテライトウイルス、ファバウイルス、フィジウイルス、フロウイルス、ホルデイウイルス、ホスツウイロイド、イダエオウイルス、イラ

ーウイルス、イボモウイルス、ルテオウイルス、マクロモウイルス、マクルウイルス、マラフィウイルス、マストレウイルス、ナノウイルス、ネクロウイルス、ネポウイルス、ヌクレオラブドウイルス、オレアウイルス、オフィオウイルス、オリザウイルス、パニコウイルス、ペクルウイルス、ペツウイルス、フィトレオウイルス、ポレロウイルス、ポモウイルス、ポスピウイロイド、ポテックスウイルス、ポティウイルス、レオウイルス、ラブドウイルス、リモウイルス、サドワウイルス、S b C M V様ウイルス、セクイウイルス、ソベモウイルス、テヌイウイルス、T N s a t V様サテライトウイルス、トバモウイルス、トボクウイルス、トスポウイルス、トリコウイルス、トリティモウイルス、ツングロウイルス、ティモウイルス、ウンブラウイルス、バリコサウイルス、ピティウイルス、又はワイカウイルスから選択される。

10

## 【0297】

## 標的抗原の形態

農薬及び生物的防除用として、本願に開示する組成物のポリペプチドは、数種の異なる形態の有害生物標的（例えば、真菌標的）に特異的であり得る、又はこれらの標的と特異的に結合できることが本願の開示に基づいて理解されよう。本願に開示する組成物のポリペプチドは、それらの有害生物標的の多数の天然又は合成アナログ、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片と結合することも予想されよう。より特定的には、本願に開示する組成物のポリペプチドは、少なくともこれらのポリペプチドが結合する天然標的の結合部位、部分又はドメインを（依然として）含んでいる前記標的のアナログ、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片と結合することが予想される。

20

## 【0298】

## 製剤

本願に開示する農薬組成物又は生物的防除組成物に含まれるポリペプチド含量は広い範囲を取ることができ、一般に、抑制しようとする特定の作物有害生物に応じて特定のポリペプチドの濃度範囲を調節することは製造業者に委ねられると想定される。

## 【0299】

特定の実施形態において、本発明は、少なくとも1種のポリペプチドを含有する農薬組成物を提供し、前記重鎖可変ドメインは、植物又は前記植物の一部を前記植物病原体による感染又は前記植物病原体との他の生物学的相互作用に対して保護又は処置するために有効な量で存在する。

30

## 【0300】

特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、少なくとも0.0001重量%とすることができる。

## 【0301】

特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、50重量%までとすることができる。

## 【0302】

特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.0001～50重量%とすることができる。

## 【0303】

特定の実施形態において、本発明は、少なくとも1種のポリペプチドを含有する農薬組成物を提供し、前記農薬組成物における前記少なくとも1種のポリペプチドの濃度は、0.001～50重量%である。

40

## 【0304】

さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.001～50重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.01～50重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.1～50重量%とすることができる。

## 【0305】

50

さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、1～50重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、10～50重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.0001～40重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.001～40重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.01～40重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.1～40重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、1～40重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.0001～30重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.001～30重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.01～30重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.1～30重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、1～30重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.0001～10重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.001～10重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.01～10重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.1～10重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、1～10重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.0001～1重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.001～1重量%とすることができる。さらに別の特定の実施形態において、前記農薬組成物に含まれる前記ポリペプチドの濃度は、0.01～1重量%とすることができる。さらに別の特定の

【0306】

特定の実施形態において、本願に開示する農薬組成物は、水溶液に製剤化される少なくとも1種のポリペプチドを含有する。

【0307】

他の特定の実施形態において、本願に開示する農薬組成物は、少なくとも1種のポリペプチドを含有しており、さらに、農芸化学的に適切な基剤及び/又は1種以上の適切なアジュバントを含有する。

【0308】

本発明に係る組成物は、上記抗有害生物ポリペプチドに加え、植物及び/又は植物部分の有害生物処置に許容可能な固体若しくは液体基剤、及び/又は同じく植物及び/又は植物部分の有害生物処置に許容可能な界面活性剤を含有することができる。特に、不活性な慣用基剤及び慣用界面活性剤を使用することができる。これらの組成物は、処理しようとする植物及び/又は植物部分に浸漬又は適切な装置の使用により即時施用可能な組成物だけでなく、植物及び/又は植物部分に施用する前に希釈する必要がある市販濃厚組成物にも対応する。

【0309】

本発明に係るこれらの農薬組成物はさらに、例えば、保護コロイド、接着剤、増粘剤、

チキソトロップ剤、浸透剤、安定剤、金属イオン封鎖剤、保形剤、フレーバー剤、呈味増強剤、糖類、甘味剤、着色剤等の任意の種類他の成分を含有することができる。より一般には、活性物質、即ち、前記少なくとも1種の重鎖可変ドメインに、通常の製剤化技術に対応する任意の固体又は液体添加剤を添加することができる。

【0310】

本発明に係るこれらの農薬組成物はさらに、例えば、他の抗細菌又は抗真菌活性成分等の任意の種類他の活性成分を含有することができる。

【0311】

本開示における「基剤」なる用語は、植物及び/又は1箇所以上の植物部分へのその施用を助長するために抗有害生物活性物質に加えられる天然又は合成の有機又は無機物質を意味する。従って、この基剤は、一般に不活性であり、農業分野で許容可能でなければならぬ。基剤は固体(クレー、天然又は合成ケイ酸塩、シリカ、樹脂、ロウ、固形肥料等)でもよいし、液体(水、アルコール類、特にブタノール等)でもよい。

10

【0312】

界面活性剤は、イオン型若しくは非イオン型の乳化剤、分散剤若しくは湿潤剤又はこのような界面活性剤の混合物とすることができる。例えば、ポリアクリル酸塩、リグノスルホン酸塩、フェノールスルホン酸又はナフタレンスルホン酸塩、エチレンオキシドと脂肪アルコール又は脂肪酸又は脂肪アミンの重縮合物、置換フェノール(特に、アルキルフェノール又はアリールフェノール)、スルホコハク酸エステル塩、タウリン誘導体(特にアルキルタウレート)、ポリオキシエチレン化フェノール又はアルコールのリン酸エステル、脂肪酸とポリオールのエステル、上記化合物の硫酸、スルホン酸及びリン酸官能基含有誘導体が挙げられる。不活性基剤が非水溶性の場合と、施用溶剤が水の場合には、少なくとも1種の界面活性剤の存在が一般に必須である。

20

【0313】

本願に開示する農薬組成物は、それ自体がかなり多様な固体又は液体形態である。

【0314】

固体組成物形態としては、(活性物質の含量を100%までとすることができる)粉剤と粒剤、特に、押出、圧縮、造粒した担体の含侵、粉末を出発材料として使用する造粒により得られるものが挙げられる(これらの場合に、これらの粒剤中の活性物質の含量は0.5~80%である)。このような固体組成物は任意選択的に、所望の施用タイプに応じて、例えば、水で希釈することにより粘度を増減した液体形態で使用することができる。

30

【0315】

液体組成物形態又は施用時に液体組成物を構成するように意図された形態としては、溶液剤、特に水溶性濃厚剤、乳剤、濃厚懸濁剤、粉末水和剤(又は噴霧粉末)、油剤及びロウ剤が挙げられる。

【0316】

噴霧により施用することができる濃厚懸濁剤は、沈殿を形成しない安定な流動物が得られるように製造され、通常では、10~75%の活性物質と、0.5~15%の界面活性剤と、0.1~10%のチキソトロップ剤と、0~10%の適切な添加剤(例えば、消泡剤、腐食防止剤、安定剤、浸透剤及び接着剤)と、基剤として、水又は活性物質が溶けない若しくは溶けにくい有機液体を含有し、沈殿を防ぎ易くするため又は水のゲル化防止として何らかの有機固体又は無機塩を基剤に溶解してもよい。

40

【0317】

本願に開示する農薬組成物はそのまま使用することもできるし、それらの製剤として使用することもできるし、それらから製造された使用形態で使用することもでき、例えば、エアゾルディスペンサー、カプセル懸濁剤、常温煙霧剤、高温煙霧剤、カプセル化粒剤、細粒剤、種子処理用濃厚フロアブル剤、即時使用溶液剤、粉剤、濃厚乳剤、水中油型乳剤、油中水型乳剤、粗粒剤、粗粒剤、油分散性粉末、油混和性濃厚フロアブル剤、油混和性液剤、泡状剤、ペースト剤、有害生物駆除剤をコーティングした種子、濃厚懸濁剤(濃厚フロアブル剤)、懸濁剤-乳剤-濃厚剤、可溶性濃厚剤、懸濁剤、可溶性粉末、粒剤、水

50

溶性粒剤又は錠剤、種子処理用水溶性粉末、粉末水和剤、活性化合物を含侵させた天然及び合成材料、種子用のポリマー材料とジャケットによるマイクロカプセル化、マイクロカプセル化生体材料粒子、例えば、WO2018/201160、WO2018/201161及びWO2019/060903に記載されているものに加え、ULV常温・高温煙霧剤、(加圧)ガス、ガス発生剤、植物ロッドレット、乾式種子処理用粉末、種子処理用溶液、高濃度微量(ULV)液剤、高濃度微量(ULV)懸濁剤、水分散性粒剤又は錠剤、スラリー処理用水分散性粉末が挙げられる。

【0318】

これらの製剤は、活性化合物又は活性化合物の組み合わせを、例えば慣用増量剤等の慣用添加剤と混合し、さらに溶剤若しくは希釈剤、乳化剤、分散剤、及び/又は結合剤若しくは定着剤、湿潤剤、撥水剤、必要に応じて乾燥剤及びUV安定剤、着色剤、顔料、消泡剤、保存剤、二次増粘剤、接着剤、ギベレリン及び水並びに他の加工助剤と混合することにより公知方法で製造される。

10

【0319】

これらの組成物は、処理しようとする植物又は種子に噴霧装置や散粉装置等の適切な装置により即時施用可能な組成物だけでなく、作物に施用する前に希釈する必要がある市販濃厚組成物も含む。

【0320】

植物保護又は処置方法

所定の態様において、本発明は、植物又は植物の一部を植物病原体による感染又は植物病原体との他の生物学的相互作用に対して保護又は処置するための方法として、少なくとも本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む方法を提供する。前記組成物又はポリペプチドは、前記植物又は前記植物の一部を前記植物病原体による感染又は前記植物病原体との生物学的相互作用に対して保護又は処置するために有効な条件下で施用することができる。

20

【0321】

特定の実施形態において、これらの方法は、本願に開示する農薬組成物を、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物50g超の施用量、限定されないが、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物75g超の施用量、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物100g超の施用量、又は特に1ヘクタール当たり前記農薬組成物200g超の施用量で前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む。

30

【0322】

特定の実施形態において、これらの方法は、本願に開示する農薬組成物を、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物50g~200gの施用量、限定されないが、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物50g~200gの施用量、特に1ヘクタール当たり前記農薬組成物75g~175gの施用量、例えば、1ヘクタール当たり前記農薬組成物75g~150g又は1ヘクタール当たり75g~125gの施用量で前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む。

【0323】

さらに別の実施形態において、本発明は、植物有害生物を防除又は抑制する方法として、本発明に係る農薬組成物又は生物的防除組成物を、例えば、1ヘクタール当たり前記ポリペプチド50g未満の施用量で作物等の植物又は植物若しくは作物の一部に施用する工程を含む方法を提供する。特定の実施形態において、前記施用量は、ポリペプチド45g/ha未満、40g/ha未満、35g/ha未満、30g/ha未満、25g/ha未満、20g/ha未満、15g/ha未満、10g/ha未満、5g/ha未満、1g/ha未満、又はそれ以下である。

40

【0324】

当然のことながら、作物と植物有害生物の環境圧に応じて、農業従事者は施用量を変えることができる。これらの施用量の変動は、特定の農薬組成物に添付されるテクニカルシートに明記されている。

50

## 【0325】

さらに別の実施形態において、本発明は、植物有害生物の防除又は抑制における本発明の農薬組成物又は生物的防除組成物の使用を提供する。

## 【0326】

さらに別の実施形態において、本発明は、植物有害生物の防除又は抑制における本発明のポリペプチドの使用を提供する。

## 【0327】

本発明に係る農薬組成物又は生物的防除組成物又はポリペプチドを作物に施用するには、農薬組成物又は生物的防除組成物を作物に施用するのに適した任意の方法を使用して実施することができ、限定されないが、噴霧（低濃度多量（HV）、高濃度少量（LV）及び高濃度微量（ULV）噴霧）、刷毛塗布、包帯、点滴、コーティング、ディッピング、浸漬、散布、煙霧、小滴として施用、ミスト又はエアゾルが挙げられる。

10

## 【0328】

従って、特定の実施形態において、本願に開示する植物又は植物の一部を植物病原体による感染又は植物病原体との他の生物学的相互作用に対して保護又は処置するための方法は、例えば、噴霧、霧化、発泡、煙霧、ハイドロカルチャーでの栽培、水耕栽培、コーティング、液浸、及び/又は粉衣により、前記農薬組成物を前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む。

## 【0329】

所定の特定の実施形態において、本発明は、植物病原体の成長を阻害、妨害、抑制又は防除する方法として、少なくとも本願に開示する農薬組成物を植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む方法を提供する。

20

## 【0330】

所定の他の実施形態において、本発明は、植物病原体を殺傷する方法として、少なくとも本願に開示する農薬組成物又はポリペプチドを植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む方法を提供する。

## 【0331】

あるいは、本発明に係る農薬組成物の施用量、即ち、前記作物に施用される前記農薬組成物の量は、本発明に係る農薬組成物又は生物的防除組成物に含まれるポリペプチドを1ヘクタール当たり50g未満、45g未満、40g未満、35g未満、30g未満、25g未満、20g未満、20g未満、15g未満、10g未満、5g未満、1g未満又は1g未満の量で前記作物に施用するような量とする。

30

## 【0332】

本願に開示する方法によると、前記農薬組成物又は生物的防除組成物を作物に1回施用することもできるし、1回毎に間隔を空けて2回以上施用することもできる。本発明の方法によると、本発明に係る農薬組成物又は生物的防除組成物を前記作物に単独で施用することもできるし、他の材料、好ましくは他の農薬組成物又は生物的防除組成物との混合物として施用することもできるし、あるいは、本発明に係る農薬組成物又は生物的防除組成物を他の材料、好ましくは他の農薬組成物又は生物的防除組成物と別々に異なる時点で同一作物に施用することもできる。本発明の方法によると、本発明に係る農薬組成物又は生物的防除組成物を前記作物に予防的に施用することもできるし、あるいは、処置しようとする特定の作物で標的有害生物が同定されてから施用することもできる。

40

## 【0333】

本願に開示する農薬組成物は、上記方法により、植物、作物又は前記植物の1箇所以上の部分に直接施用することができ、例えば、収穫前又は収穫後の段階で植物全体に直接又は前記植物の1箇所以上の部分に直接施用することができる。収穫前の施用は収穫後に効果を生じることができる。所定の他の実施形態において、本願に開示する農薬組成物は、上記方法により、前記植物の1箇所以上の部分に直接施用することができ、例えば、葉柄、葉、塊茎、茎、苗条、種子、果実、根、花、穀粒、芽等に直接施用することができる。

## 【0334】

50

本願に開示する処置方法は、貯蔵物を植物病原体の攻撃に対して保護する分野で使用することもできる。この処置方法では、本発明の組成物の施用を収穫前に行ってもよいし、収穫後でもよい。本発明によると、「貯蔵物」なる用語は、植物又は動物起源の天然物質と、自然生活環から取り出され、長期保護が望まれるそれらの加工物を意味するとみなされる。植物又はその部分（例えば、葉柄、葉、塊茎、種子、果実又は穀粒）等の植物起源の貯蔵物は、収穫したばかりの状態でも保護することもできるし、予備乾燥、湿潤、粉碎、摩砕、圧搾又は焙焼等の加工形態でも保護することもできる。また、木材も貯蔵物の定義に含まれ、建築用木材、送電塔及び柵等の未加工木材でもよいし、家具又は木製品等の完成品でもよい。動物起源の貯蔵物は、獣皮、革、毛皮、被毛等である。本発明に係る組成物は、腐食、変色又はカビ等の不利益な作用を防ぐことができる。「貯蔵物」とは、植物起源の天然物質とその加工物を意味するとみなすことが好ましく、仁果類、核果類、ソフトフルーツ及び柑橘類等の果樹とその加工物を意味するとみなすことがより好ましい。

10

## 【0335】

本願に開示する農薬組成物は、収穫前又は収穫後の段階で、上記方法により植物、作物又は前記植物の1箇所以上の部分に間接的に施用することもでき、例えば、植物全体に間接的に又は前記植物の1箇所以上の部分に間接的に施用することもできる。本願に開示する農薬組成物は収穫間際に施用することができ、例えば、収穫の約3週間前、例えば、収穫の2週間前又は収穫の1週間前又は収穫前1週間以内に施用できる。収穫前の施用は収穫後に効果を生じることができる。従って、所定の実施形態では、本願に開示する農薬組成物を上記方法により植物、作物又は前記植物の1箇所以上の部分に間接的に施用することができ、例えば、前記植物又は前記植物の前記1箇所以上の部分が生育している又は貯蔵されている環境又は媒体（限定されないが、例えば、大気、土壌、水耕栽培、ハイドロカルチャー）に前記農薬組成物を施用することや、前記植物又は前記植物の前記1箇所以上の部分が生育している又は貯蔵されている液体媒体（例えば、水性液体媒体又は水）に施用することができる。

20

## 【0336】

本願に開示する農薬組成物は、統合的有害生物管理アプローチの一環として直接施用することができる。

## 【0337】

従って、本願の文脈では当然のことながら、本願に開示する農薬組成物による植物又は植物部分の処理は、直接実施されることもあるし、例えば、灌水（灌注）、点滴灌漑、噴霧、気化、霧化、撒布、散粉、発泡、散布により、及び粉末として、通常の処理方法により、その環境、生息場所又は貯蔵場所を処理することにより実施されることもある。さらに、前記組成物を高濃度微量法により施用することも可能であるし、活性化化合物製剤又は活性化化合物自体を土壌に注入することも可能である。

30

## 【0338】

特定の実施形態において、本願に開示する植物又は植物の一部を植物病原体による感染又は植物病原体との他の生物学的相互作用に対して保護又は処置するための方法は、収穫前又は収穫後の段階で、前記農薬組成物を前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を含む。

40

## 【0339】

特定の実施形態によると、前記収穫した生産物は、果樹、花卉、堅果又は野菜であり、不可食果皮をもつ果樹又は野菜が好ましく、アボカド、バナナ、プランテン、レモン、グレープフルーツ、メロン、オレンジ、パイナップル、キウイフルーツ、グアバ、マンダリンオレンジ、マンゴー、カボチャ、イチゴ、ブドウ及びパンプキンから選択されるものが好ましく、バナナ、オレンジ、レモン及びモモがより好ましく、特にバナナである。他の特定の実施形態によると、前記収穫した生産物は、観賞植物の切花であり、アルストロメリア属 (*Alstroemeria*)、カーネーション、キク属 (*Chrysanthemum*)、フリージア属 (*Freesia*)、ガーベラ属 (*Gerbera*)、グラジオラス属 (*Gladiolus*)、カスミソウ属種 (*Gypsophila spec*)、

50

ヒマワリ属 (*Helianthus*)、アジサイ属 (*Hydrangea*)、ユリ属 (*Lilium*)、リシアンサス属 (*Lisianthus*)、バラ及び夏花から選択されるものが好ましい。

【0340】

本願に開示する農薬組成物を施用することができる植物種は、例えば、限定されないが、トウモロコシ、ダイズ、アルファルファ、ワタ、ヒマワリ、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) (例えば、キャノーラ種セイヨウアブラナ)、カブラ (*Brassica rapa*)、カラシナ (*B. juncea*) (例えば (フィールド) マスタード) 及びアビシニアガラシ (*Brassica carinata*) 等のナタネ油種子、ヤシ科種 (*Arecaceae* sp.) (例えば、アブラヤシ、ココナツ)、イネ、コムギ、テンサイ、サトウキビ、エンバク、ライムギ、オオムギ、キビ及びモロコシ、ライコムギ、アマ、堅果類、ブドウ及びつる植物、並びに種々の植物学分類に属する種々の果樹及び野菜が挙げられ、例えば、バラ科種 (*Rosaceae* sp.) (例えば、リンゴ及びナシ等の仁果類に加え、アンズ、サクランボ、アーモンド、プラム及びモモ等の核果類と、イチゴ、ラズベリー、アカフサスグリ、クロフサスグリ及びセイヨウスグリのベリー類)、スグリ亜科種 (*Ribesioideae* sp.)、クルミ科種 (*Juglandaceae* sp.)、カバノキ科種 (*Betulaceae* sp.)、ウルシ科種 (*Anacardiaceae* sp.)、ブナ科種 (*Fagaceae* sp.)、クワ科種 (*Moraceae* sp.)、モクセイ科種 (*Oleaceae* sp.) (例えばオリーブの木)、マタタビ科種 (*Actinidaceae* sp.)、クスノキ科種 (*Lauraceae* sp.) (例えば、アボカド、シナモン、樟脳)、バショウ科種 (*Musaceae* sp.) (例えば、バナナの木及びプランテン)、アカネ科種 (*Rubiaceae* sp.) (例えば、コーヒー)、ツバキ科種 (*Theaceae* sp.) (例えば、チャ)、アオギリ科種 (*Sterculiaceae* sp.)、ミカン科種 (*Rutaceae* sp.) (例えば、レモン、オレンジ、マンダリンオレンジ及びグレープフルーツ)、ナス科種 (*Solanaceae* sp.) (例えば、トマト、ジャガイモ、トウガラシ、パプリカ、ナス、タバコ)、ユリ科種 (*Liliaceae* sp.)、キク科種 (*Compositae* sp.) (例えば、レタス、アーティチョーク及びルートチコリー、エンダイブ又はチコリーを含むチコリー)、セリ科種 (*Umbelliferae* sp.) (例えば、ニンジン、パセリ、セロリ及びセルリアック)、ウリ科種 (*Cucurbitaceae* sp.) (例えば、ガーキンを含むキュウリ、パンプキン、スイカ、カラバッシュ及びメロン)、ネギ科種 (*Alliaceae* sp.) (例えば、リーキ及びタマネギ)、アブラナ科種 (*Cruciferae* sp.) (例えば、白キャベツ、赤キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、芽キャベツ、チンゲンサイ、コールラビ、ラディッシュ、ホースラディッシュ、クレス及びハクサイ)、マメ科種 (*Leguminosae* sp.) (例えば、ピーナツ、エンドウマメ、レンズマメ及びマメ類、例えばインゲンマメ及びソラマメ)、アカザ科種 (*Chenopodiaceae* sp.) (例えば、スイスチャード、飼料ビート、ハウレンソウ、ビーツ)、アマ科種 (*Linaceae* sp.) (例えば、ヘンプ)、アサ科種 (*Cannabaceae* sp.) (例えば、カンナビス)、アオイ科種 (*Malvaceae* sp.) (例えば、オクラ、カカオ)、ケシ科 (*Papaveraceae*) (例えば、ケシ)、キジカクシ科 (*Asparagaceae*) (例えばアスパラガス)、ターフグラス、ローングラス、牧草及びステビア (*Stevia rebaudiana*) を含めて庭園及び森林における有用植物及び観賞植物、並びに各場合にこれらの植物の遺伝子改変種が挙げられる。

【0341】

本願に開示する処置方法の好ましい1実施形態において、前記作物は、圃場作物、草類、果樹及び野菜、ローングラス、樹木並びに観賞植物から構成される群から選択される。

【0342】

従って、所定の態様において、本発明は、収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を

10

20

30

40

50



植物病原体による感染又は植物病原体との他の生物学的相互作用に対して保護又は処置するための収穫後処置方法として、少なくとも前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を前記植物病原体による感染又は前記植物病原体との生物学的相互作用に対して保護又は処置するために有効な条件下で、本願に開示する農薬組成物を前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分に直接又は間接的に施用する工程を含む方法も提供する。特定の実施形態によると、前記収穫した生産物は、果樹、花卉、堅果又は野菜であり、不可食果皮をもつ果樹又は野菜が好ましく、アボカド、バナナ、プランテン、レモン、グレープフルーツ、メロン、オレンジ、パイナップル、キウイフルーツ、グアバ、マンダリンオレンジ、マンゴー及びパンプキンから選択されるものが好ましく、バナナ、オレンジ、レモン及びモモがより好まし、特にバナナである。他の特定の実施形態によると、前記収穫した生産物は、観賞植物の切花であり、アルストロメリア属 (*Alstroemeria*)、カーネーション、キク属 (*Chrysanthemum*)、フリージア属 (*Freesia*)、ガーベラ属 (*Gerbera*)、グラジオラス属 (*Gladiolus*)、カスミソウ属種 (*Gypsophila spec*)、ヒマワリ属 (*Helianthus*)、アジサイ属 (*Hydrangea*)、ユリ属 (*Lilium*)、リシアンサス属 (*Lisianthus*)、バラ及び夏花から選択されるものが好ましい。他の特定の実施形態によると、前記収穫した生産物は、刈り取られた牧草又は樹木である。

10

## 【0343】

収穫後障害は、例えば、皮目斑点、葉焼け、老化損傷、ピターピット、ヤケ病、蜜入り、褐変、維管束障害、CO<sub>2</sub>障害、CO<sub>2</sub>又はO<sub>2</sub>欠乏、及び軟化である。

20

## 【0344】

真菌病は、例えば、以下の真菌類、即ち、ミコスフェレラ属菌種 (*Mycosphaerella spp.*)、例えば、ミコスフェレラ・ムサエ (*Mycosphaerella musae*)、ミコスフェレラ・フラガリアエ (*Mycosphaerella fragariae*)、ミコスフェレラ・シトリ (*Mycosphaerella citri*)；ムコール属菌種 (*Mucor spp.*)、例えば、ムコール・ピリフォルミス (*Mucor piriformis*)；モニリニア属菌種 (*Monilinia spp.*)、例えば、モニリニア・フルクチゲナ (*Monilinia fructigena*)、モニリニア・ラクサ (*Monilinia laxa*)；フォモプシス属菌種 (*Phomopsis spp.*)、例えば、フォモプシス・ナタレンシス (*Phomopsis natalensis*)；コレトトリカム属菌種 (*Colletotrichum spp.*)、例えば、コレトトリカム・ムサエ (*Colletotrichum musae*)、コレトトリカム・グロエオスポリオイデス (*Colletotrichum gloeosporioides*)、コレトトリカム・ココデス (*Colletotrichum coccodes*)；バーティシリウム属菌種 (*Verticillium spp.*)、例えば、バーティシリウム・テオブロマエ (*Verticillium theobromae*)；ニグロスポラ属菌種 (*Nigrospora spp.*)；ボトリチス属菌種 (*Botrytis spp.*)、例えば、ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*)；ディプロディア属菌種 (*Diplodia spp.*)、例えば、ディプロディア・シトリ (*Diplodia citri*)；ペジキュラ属菌種 (*Pezizula spp.*)；アルテルナリア属菌種 (*Alternaria spp.*)、例えば、アルテルナリア・シトリ (*Alternaria citri*)、アルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)；セプトリア属菌種 (*Septoria spp.*)、例えば、セプトリア・デプレッサ (*Septoria depressa*)；ベンチュリア属菌種 (*Venturia spp.*)、例えば、ベンチュリア・イナエカリス (*Venturia inaequalis*)、ベンチュリア・ピリナ (*Venturia pyrina*)；リゾプス属菌種 (*Rhizopus spp.*)、例えば、リゾプス・ストロニフェル (*Rhizopus stolonifer*)、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*)；グロメレラ属菌種 (*Glomerella spp.*)、例えば、グロメレラ・シングラータ (*Glom*

30

40

50

*erebella cingulata*); スクレロチニア属菌種 (*Sclerotinia* spp.), 例え、スクレロチニア・フルクチコーラ (*Sclerotinia fruiticola*); セラトシスチス属菌種 (*Ceratocystis* spp.), 例え、セラトシスチス・パラドキサ (*Ceratocystis paradoxa*); フザリウム属菌種 (*Fusarium* spp.), 例え、フザリウム・セミテクタム (*Fusarium semitectum*), フザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*), フザリウム・ソラニ (*Fusarium solani*), フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*); クラドスポリウム属菌種 (*Cladosporium* spp.), 例え、クラドスポリウム・フルバム (*Cladosporium fulvum*), クラドスポリウム・クラドスポリオイデス (*Cladosporium cladosporioides*), クラドスポリウム・ククメリナム (*Cladosporium cucumerinum*), クラドスポリウム・ムサエ (*Cladosporium musae*); ペニシリウム属菌種 (*Penicillium* spp.), 例え、ペニシリウム・フニコロサム (*Penicillium funiculosum*), ペニシリウム・エクспанサム (*Penicillium expansum*), ペニシリウム・ディジタタム (*Penicillium digitatum*), ペニシリウム・イタリカム (*Penicillium italicum*); フィトフトラ属菌種 (*Phytophthora* spp.), 例え、フィトフトラ・シトロフトラ (*Phytophthora citrophthora*), フィトフトラ・フラガリアエ (*Phytophthora fragariae*), フィトフトラ・カクトラム (*Phytophthora cactorum*), フィトフトラ・パラシチカ (*Phytophthora parasitica*); ファシジオピクニス属菌種 (*Phacydiopycnis* spp.), 例え、ファシジオピクニス・マリラム (*Phacydiopycnis malirum*); グロエオスポリウム属菌種 (*Gloeosporium* spp.), 例え、グロエオスポリウム・アルバム (*Gloeosporium album*), グロエオスポリウム・ペレナンス (*Gloeosporium perennans*), グロエオスポリウム・フルクチゲナム (*Gloeosporium fructigenum*), グロエオスポリウム・シングラータ (*Gloeosporium singulata*); ゲオトリカム属菌種 (*Geotrichum* spp.), 例え、ゲオトリカム・カンディダム (*Geotrichum candidum*); フリクテナ属菌種 (*Phlyctaena* spp.), 例え、フリクテナ・バガブンダ (*Phlyctaena vagabunda*); シリンドロカルボン属菌種 (*Cylindrocarpon* spp.), 例え、シリンドロカルボン・マイル (*Cylindrocarpon mail*); ステムフィリウム属菌種 (*Stemphyllium* spp.), 例え、ステムフィリウム・ベシカリウム (*Stemphyllium vesicarium*); チエラビオプシス属菌種 (*Thielaviopsis* spp.), 例え、チエラビオプシス・パラドキシ (*Thielaviopsis paradoxy*); アスペルギルス属菌種 (*Aspergillus* spp.), 例え、アスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*), アスペルギルス・カルボナリウス (*Aspergillus carbonarius*); ネクトリア属菌種 (*Nectria* spp.), 例え、ネクトリア・ガリゲナ (*Nectria galligena*); セルコスボラ属菌種 (*Cercospora* spp.), 例え、セルコスボラ・アングレシ (*Cercospora angreci*), セルコスボラ・アピイ (*Cercospora apii*), セルコスボラ・アトロフィリフォルミス (*Cercospora atrofiliiformis*), セルコスボラ・ムサエ (*Cercospora musae*), セルコスボラ・ゼアエマイジス (*Cercospora zeae-maydis*) を病原とすることができる。

【0345】

他の態様において、本発明は、例え、バイオスタティック剤又は有害生物駆除剤 (限

定されないが、静真菌剤又は殺真菌剤が挙げられる)等の有害生物防除剤としての、本願に開示する農薬組成物の使用を提供する。

【0346】

特定の実施形態において、本発明に係る方法により防除される植物有害生物は、上記に定義した植物病原性真菌である。本発明に係る方法の適用の結果として、病巣数、病巣サイズ、及び真菌病原体の孢子形成程度の全てを低減させることができる。

【0347】

医療用途

所定の他の実施形態において、本発明は、ヒト若しくは動物を有害生物、特に真菌による感染に対して保護若しくは治療するための方法、又は有害生物、特に真菌によるヒト若しくは動物の感染症の治療方法として、少なくとも有害生物(限定されないが、例えば、真菌)と特異的に結合する本発明の少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物を前記ヒト若しくは動物又は前記ヒト若しくは動物の一部に直接又は間接的に施用又は投与する工程を含む方法を提供する。前記組成物は、前記ヒト又は動物を前記有害生物に対して保護又は治療するために有効な条件下で施用することができる。

10

【0348】

従って、本発明は、対象において有害生物に起因する少なくとも1種の疾患及び/又は障害(例えば、真菌に起因する疾患及び/又は障害)の予防及び/又は治療方法で使用するための、有害生物標的と特異的に結合する本発明のポリペプチドを提供する。本発明はさらに、対象において有害生物に起因する少なくとも1種の疾患及び/又は障害(例えば、真菌に起因する疾患及び/又は障害)の予防及び/又は治療方法で使用するための、本発明の組成物を提供する。本発明はさらに、対象において有害生物に起因する感染症(例えば、真菌感染症)の予防及び/又は治療方法で使用するための、有害生物標的と特異的に結合する本発明のポリペプチドを提供する。本発明はさらに、対象において有害生物に起因する感染症(例えば、真菌感染症)の予防及び/又は治療方法で使用するための、有害生物標的と特異的に結合する本発明の組成物を提供する。特定の実施形態において、本発明はさらに、有害生物に起因する少なくとも1種の疾患及び/又は障害の予防及び/又は治療方法として、治療等を必要とする対象に、薬学的に活性な量の本願に開示する1種以上のアミノ酸配列、ポリペプチド及び/又は医薬組成物を投与する工程を含む方法を提供する。特に、前記薬学的に活性な量は、結合させた有害生物の1種以上の生物学的活性又は経路を阻害、妨害又は抑制するために(前記アミノ酸配列又はポリペプチドの循環濃度を生じるために)十分な量とすることができる。

20

30

【0349】

従って、所定の態様において、本発明は、有害生物(例えば真菌)に起因する疾患及び/又は障害に罹患した動物又はヒト等の対象において有害生物防除剤として使用するための、有害生物と特異的に結合する少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物を提供する。

【0350】

特定の実施形態において、前記有害生物防除剤は、バイオスタティック剤又は有害生物駆除剤である。特定の実施形態において、前記有害生物防除剤は、静真菌剤又は殺真菌剤である。

40

【0351】

また、所定の態様において、本発明は、有害生物に起因する疾患及び/又は障害の予防及び/又は治療方法として、

- (a) 本願に開示するアミノ酸配列、ポリペプチド又は組成物を準備する工程と、
- (b) 有害生物に起因する前記疾患及び/又は障害に罹患した患者に前記アミノ酸配列、ポリペプチド又は医薬組成物を投与する工程とを含む方法を提供する。

【0352】

本願に開示するポリペプチド及び前記ポリペプチドを含有する組成物の有効性は、対象とする特定疾患又は障害に応じて、それ自体公知の任意の適切なインビトロアッセイ、細

50

胞アッセイ、インビボアッセイ及び／若しくは動物モデル、又はその任意の組み合わせを使用して試験することができる。適切なアッセイと動物モデルは当業者に自明であり、下記実験セクション及び本願に引用する従来技術で使用されているアッセイ及び動物モデルを利用できる。当業者は一般に、有害生物標的若しくは有害生物抗原との結合、又は有害生物標的若しくは有害生物抗原の活性に影響を与えるその能力、及び／又はそれらが関与する生物学的機序、さらには有害生物抗原に関連する１種以上の疾患及び障害に対するそれらの治療及び／又は予防効果について、本願に開示するアミノ酸配列及びポリペプチドを試験するために、適切なインビトロアッセイ、細胞アッセイ又は動物モデルを選択することができる。

**【 0 3 5 3 】**

10

**医薬組成物**

さらに別の態様において、本発明は、本願に開示する１種以上のアミノ酸配列、ポリペプチド及び／又は核酸配列と、任意選択的に少なくとも１種の薬学的に許容される基剤を含有する医薬組成物（本願では、本発明の医薬組成物とも言う）を提供する。所定の特定の実施形態によると、本願に開示する医薬組成物はさらに、任意選択的に少なくとも１種の他の薬学的に活性な化合物を含有することができる。

**【 0 3 5 4 】**

本発明の医薬組成物は、本願に開示するポリペプチドと有害生物標的を結合させ、真菌等の有害生物に関連する疾患及び障害の診断、予防及び／又は治療に使用することができる。

20

**【 0 3 5 5 】**

特に、本発明は、温血動物、特に哺乳動物、より特定的にはヒトにおける予防、治療及び／又は診断用に適したポリペプチドを含有する医薬組成物を提供する。

**【 0 3 5 6 】**

本発明はさらに、本願に開示するポリペプチドと有害生物標的を結合させ、例えば真菌等の有害生物に関連する１種以上の疾患、障害又は病態の予防及び／又は治療又は診断において獣医学的目的に使用することができる本願に開示するアミノ酸配列及びポリペプチドを含有する医薬組成物も提供する。

**【 0 3 5 7 】**

一般に、医薬用として、本願に開示するポリペプチドは、本願に開示する少なくとも１種のポリペプチドと、少なくとも１種の薬学的に許容される基剤、希釈剤又は賦形剤及び／又はアジュバントと、任意選択的に１種以上の他の薬学的に活性なポリペプチド及び／又は化合物を含有する医薬製剤又は組成物として製剤化することができる。このような製剤は、経口、非経口、局所投与又は吸入による投与に適切であると思われる。従って、本願に開示するアミノ酸配列若しくはポリペプチド及び／又はこれらを含有する組成物は、同じく使用する特定の医薬製剤又は組成物に応じて、例えば、経口、腹腔内、例えば静脈内、皮下、筋肉内、経皮、局所、坐剤、吸入により投与することができる。臨床医は、適切な投与経路と、このような投与で使用するのに適した医薬製剤又は組成物を選択することができる。

30

**【 0 3 5 8 】**

前記医薬組成物はさらに、適切な結合剤、崩壊剤、甘味剤又はフレーバー剤を含有することができる。錠剤、丸剤又はカプセル剤には例えば、ゼラチン、ロウ又は糖等をコーティングすることができる。さらに、本願に開示するアミノ酸配列及びポリペプチドは、徐放製剤及びデバイスに組み込むこともできる。

40

**【 0 3 5 9 】**

注射又は輸液に適した医薬品剤形としては、滅菌水溶液若しくは水性分散液、又は活性成分を含み、滅菌注射若しくは輸液溶液若しくは分散液の即時調製に適応し、任意選択的にリポソームに封入された滅菌粉末が挙げられる。いずれの場合も、最終的な剤形は製造・保存条件下で無菌、流動性及び安定でなければならない。液体基剤又は担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポ

50

リエチレングリコール等)、植物油、非毒性グリセリルエステル類、及び適切なその混合物を含む溶媒又は液体分散媒とすることができる。任意選択的に抗細菌薬及び抗真菌薬等を加えることができる。

【0360】

本願に開示するアミノ酸配列及びポリペプチドの有用な投与量は、動物モデルにおけるそのインビトロ活性とインビボ活性を比較することにより決定することができる。マウス及び他の動物における有効投与量をヒトに外挿する方法は、当業者に公知である。

【0361】

予防及び/又は治療に必要な本願に開示するアミノ酸配列及びポリペプチドの量は、選択される特定のアミノ酸配列又はポリペプチドだけでなく、投与経路、治療する病態の種類、及び患者の年齢と健康状態によっても変動すると思われ、最終的に主治医又は臨床医の裁量に委ねられよう。本願に開示するアミノ酸配列及びポリペプチドの投与量は、標的細胞、腫瘍、組織、移植組織又は臓器によっても変動し得る。

10

【0362】

本願に開示するアミノ酸配列若しくはポリペプチド及び/又はこれらを含む組成物は、予後診断、診断、予防又は治療の対象となる疾患又は障害の予防及び/又は治療に適した治療レジメンに従って投与される。臨床医は一般に適切な治療レジメンを決定することができる。一般に、治療レジメンは、本願に開示する1種以上のアミノ酸配列若しくはポリペプチド又はこれらを含む1種以上の組成物を1種以上の薬学的に有効な量又は用量で投与することを含むであろう。

20

【0363】

所望用量を単回又は適当な間隔で複数回に分けて投与するように適切に提供することができる(各回の用量をさらに複数回に分けてもよい)。投与レジメンは、長期(即ち、少なくとも2週間、例えば、数箇月又は数年間)又は毎日投与を含むことができる。

【0364】

本願に開示するアミノ酸配列又はポリペプチドは、特に病態の重症度と治療する患者に基づいて医療従事者により決定される量で投与されるであろう。一般的に、適応疾患毎に、(例えば輸液により)連続的に又は1日1回若しくは1日の間に複数回に分けて1日体重1kg当たり投与する量を指定する最適投与量が決定されよう。臨床医は、一般に、本願に言及する因子に応じて適切な一日用量を決定することができる。特定の症例では、臨床医が、例えば、上記因子と自身の専門的判断に基づき、これらの量から外れるように選択してもよいことも自明である。

30

【0365】

特に、本願に開示するアミノ酸配列又はポリペプチドは、本願に言及する疾患及び障害の予防及び/又は治療に使用される又は使用することができる他の薬学的に活性な化合物又は主成分と併用することができ、その結果として相乗作用を生じても生じなくてもよい。このような化合物及び主成分並びにその投与経路と医薬製剤又は組成物の例は、臨床医に自明である。

【0366】

本発明の組成物は、公知抗真菌薬と併用することができる。適切な抗真菌薬としては、限定されないが、アゾール類(例えば、フルコナゾール、イトラコナゾール)、ポリエン類(例えば、アムホテリシンB)、フルシトシン、及びスクアレンエポキシダーゼ阻害薬(例えば、テルビナフィン)が挙げられる[ref 57も参照]。組成物を公知抗ウイルス薬と併用してもよく、例えば、HIVプロテアーゼインヒビター、2',3'-ジデオキシヌクレオシド(例えば、DDC、DDI)、3'-アジド-2',3'-ジデオキシヌクレオシド(AZT)、3'-フルオロ-2',3'-ジデオキシヌクレオシド(FLT)、2',3'-ジデヒドロ-2',3'-ジデオキシヌクレオシド(例えば、D4C、D4T)とその炭素環誘導体(例えば、カルボビル)、2'-フルオロ-ara-2',3'-ジデオキシヌクレオシド、1,3-ジオキサラン誘導体(例えば、2',3'-ジデオキシシル-3'-チアシチジン)、オキセタノシンアナログとその炭素環誘導体(例えばシクロプト

40

50

- G) 並びに 9 - ( 2 - ホスホニルメトキシエチル ) アデニン ( P M E A ) 及び 9 - ( 3 - フルオロ - 2 - ホスホニルメトキシプロピル ) アデニン ( F P M P A ) 誘導体、テトラヒドロイミダゾ [ 4 , 5 , 1 j k ] [ 1 , 4 ] - ベンゾジアゼピン - 2 ( 1 H ) オン ( T I B O ) 、 1 - [ ( 2 - ヒドロキシエトキシ ) メチル ] - 6 - ( フェニルチオ ) チミン ( H E P T ) 、 ジピリド [ 3 , 2 - b : 2 ' , 3 ' - e ] - [ 1 , 4 ] ジアゼピン - 6 - オン ( ネビラピン ) とピリジン - 2 ( 1 H ) オン誘導体、 3 T C 等が挙げられる。

#### 【 0 3 6 7 】

前記アミノ酸配列、ポリペプチド及び医薬組成物は、動物又はヒトにおけるカンジダ・アルビカンス ( *C. albicans* ) 等のカンジダ属 ( *Candida* ) 菌種 ; クリプトコックス・ネオフォルマンズ ( *C. neoformans* ) 等のクリプトコッカス属 ( *Cryptococcus* ) 菌種 ; エンテロコッカス・フェカリス ( *E. faecalis* ) 等のエンテロコッカス属 ( *Enterococcus* ) 菌種 ; 肺炎球菌 ( *S. pneumoniae* ) 、 ストレプトコッカス・ミュータンス ( *S. mutans* ) 、 ストレプトコッカス・アガラクティエ ( *S. agalactiae* ) 及びストレプトコッカス・ピオゲネス ( *S. pyogenes* ) 等のレンサ球菌属 ( *Streptococcus* ) 菌種 ; リーシュマニア・メジャー ( *L. major* ) 及びリーシュマニア・インファンタム ( *L. infantum* ) 等のリーシュマニア属 ( *Leishmania* ) 菌種 ; アカントアメーバ・カステラーニ ( *A. castellanii* ) 等のアカントアメーバ属 ( *Acanthamoeba* ) 菌種 ; アスペルギルス・フミガタス ( *A. fumigatus* ) 及びアスペルギルス・フラバス ( *A. flavus* ) 等のアスペルギルス属 ( *Aspergillus* ) 菌種 ; ニューモシスチス・カリニ ( *P. carinii* ) 等のニューモシスチス属 ( *Pneumocystis* ) 菌種 ; マイコバクテリウム・ツベルクロシス ( *M. tuberculosis* ) 等のマイコバクテリウム属 ( *Mycobacterium* ) 菌種 ; シュードモナス・エルギノーサ ( *P. aeruginosa* : 緑膿菌 ) 等のシュードモナス属 ( *Pseudomonas* ) 菌種 ; スタフィロコッカス・アウレウス ( *S. aureus* : 黄色ブドウ球菌 ) 等のブドウ球菌属 ( *Staphylococcus* ) 菌種 ; サルモネラ・ティフィムリウム ( *S. typhimurium* ) 等のサルモネラ属 ( *Salmonella* ) 菌種 ; コクシジオイデス・イミチス ( *C. iminitis* ) 等のコクシジオイデス属 ( *Coccidioides* ) 菌種 ; トリコフィトン・ベルコーサム ( *T. verrucosum* ) 等のトリコフィトン属 ( *Trichophyton* ) 菌種 ; プラストミセス・デルマチジス ( *B. dermatidis* ) 等のプラストミセス属 ( *Blastomyces* ) 菌種 ; ヒストプラズマ・カプスラツム ( *H. capsulatum* ) 等のヒストプラズマ属 ( *Histoplasma* ) 菌種 ; パラコクシジオイデス・ブラシリエンシス ( *P. brasiliensis* ) 等のパラコクシジオイデス属 ( *Paracoccidioides* ) 菌種 ; ピシウム・インシジオスム ( *P. insidiosum* ) 等のピシウム属 ( *Pythium* ) 菌種 ; 及び大腸菌 ( *E. coli* ) 等のエシェリキア属 ( *Escherichia* ) 菌種等の感染症の治療に特に有用である。前記アミノ酸配列、ポリペプチド及び医薬組成物は、限定されないが、カンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症、皮膚真菌症、スポロトリコーシス及び他の深在性真菌症、プラストミセス症、ヒストプラズマ症、コクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症、ニューモシスチス肺炎、鷲口瘡、結核、抗酸菌症、呼吸器感染症、猩紅熱、肺炎、膿痂疹、リウマチ熱、敗血症、菌血症を伴う敗血症、皮膚及び内臓リーシュマニア症、アカントアメーバ角膜感染症、角膜炎、嚢胞性線維症、腸チフス、胃腸炎及び溶血性尿毒症症候群等の疾患の治療に特に有用である。抗カンジダ・アルビカンス ( *C. albicans* ) 活性は、エイズ患者における感染症の治療に特に有用である。

#### 【 0 3 6 8 】

前記ポリペプチドの生産・製造方法

本発明はさらに、前記ポリペプチド配列の作製又は生成方法と、これらのポリペプチド配列をコードする核酸、並びにこれらのポリペプチド配列を含む宿主細胞、製品及び組成物の生産方法も提供する。このような方法の好ましい非限定的な例は、本願の詳細な説明

から自明である。

【0369】

当業者に自明の通り、本願に開示するポリペプチド配列の特に有用な作製方法の1例は、一般に、

(a) 本願に開示するポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列又は前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター若しくは遺伝子コンストラクトを発現させる工程と、

(b) 任意選択的に、前記ポリペプチド配列を単離及び/又は精製する工程とを含む。

【0370】

本願で想定される特定の実施形態において、前記有害生物特異的ポリペプチド配列は、アミノ酸配列のランダムライブラリーを作製する工程と、有害生物標的と特異的に結合することが可能なアミノ酸配列について、このライブラリーをスクリーニングする工程とを含む方法により、取得することができる。

10

【0371】

従って、特定の実施形態において、本願に開示するポリペプチド配列の作製方法は、

a) アミノ酸配列のセット、収集物又はライブラリーを準備する工程と；

b) 前記有害生物標的と結合する及び/又は前記有害生物標的に対して親和性を有するアミノ酸配列について、前記セット、収集物又はライブラリーをスクリーニングする工程と

c) 前記有害生物標的と結合する及び/又は前記有害生物標的に対して親和性を有するアミノ酸配列を単離する工程とを含む。

20

【0372】

このような方法において、ポリペプチド配列の前記セット、収集物又はライブラリーは、アミノ酸配列の任意の適切なセット、収集物又はライブラリーとすることができる。例えば、アミノ酸配列の前記セット、収集物又はライブラリーは、(本願に記載する)免疫グロブリン断片配列のセット、収集物又はライブラリーとすることができ、例えば、免疫グロブリン断片配列のナイーブセット、収集物若しくはライブラリー；免疫グロブリン断片配列の合成若しくは半合成セット、収集物若しくはライブラリー；及び/又は親和性成熟に供した免疫グロブリン断片配列のセット、収集物若しくはライブラリーが挙げられる。

【0373】

この方法の特定の実施形態において、アミノ酸配列の前記セット、収集物又はライブラリーは、例えば、有害生物標的又は有害生物標的に基づく若しくは由来する適切な抗原決定基(例えば、その抗原部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ)を適切に免疫した哺乳動物に由来する免疫グロブリン断片配列の免疫セット、収集物又はライブラリーとすることができる。特定の1態様において、前記抗原決定基は、細胞外部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープとすることができる。

30

【0374】

上記方法では、スクリーニングを容易にする等の目的で、ポリペプチド配列の前記セット、収集物又はライブラリーをファージ、ファージミド、リボソーム又は適切な微生物(例えば、酵母)の表面に提示させることができる。アミノ酸配列(のセット、収集物又はライブラリー)を提示・スクリーニングするのに適した方法、技術及び宿主生物は、例えば、本願の詳細な開示に基づいて、当業者に自明である。Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)におけるHoogenboomによる論考も参照されたい。

40

【0375】

他の実施形態において、本願に開示するポリペプチド配列の作製方法は、

a) ポリペプチド配列を発現する細胞収集物又はサンプルを準備する工程と；

b) 有害生物標的と結合することができる及び/又は有害生物標的に対して親和性を有するアミノ酸配列を発現する細胞について、前記細胞収集物又はサンプルをスクリーニングする工程と；

50

c) (i) 前記アミノ酸配列を単離するか、又は(ii) 前記アミノ酸配列をコードする核酸配列を前記細胞から単離した後に、前記アミノ酸配列を発現させる工程とを、少なくとも含む。

【0376】

前記細胞収集物又はサンプルは、例えば、B細胞の収集物又はサンプルとすることができる。また、本方法において、前記細胞サンプルは、真菌標的又は真菌標的に基づく若しくは由来する適切な抗原決定基(例えば、その抗原部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ)を適切に免疫した哺乳動物に由来することができる。特定の1実施形態において、前記抗原決定基は、細胞外部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープとすることができる。

10

【0377】

他の実施形態において、有害生物標的に特異的なポリペプチド配列の作製方法は、

- a) ポリペプチド又はアミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、収集物又はライブラリーを準備する工程と；
- b) 前記有害生物標的と結合することができる及び/又は前記有害生物標的に対して親和性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列について、核酸配列の前記セット、収集物又はライブラリーをスクリーニングする工程と；
- c) 前記核酸配列を単離した後に、前記アミノ酸配列を発現させる工程とを、少なくとも含むことができる。

【0378】

上記方法において、前記有害生物標的は、真菌(例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌)の細胞膜の脂質含有画分とすることができる。前記脂質含有画分は、クロマトグラフィーにより取得可能であり得る。例えば、前記脂質含有画分は、真菌(例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌)の菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数(Rf)がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能であり得る。

20

【0379】

上記方法において、アミノ酸配列をコードする核酸配列の前記セット、収集物又はライブラリーは、例えば、免疫グロブリン断片配列のナープセット、収集物若しくはライブラリーをコードする核酸配列のセット、収集物若しくはライブラリー；免疫グロブリン断片配列の合成若しくは半合成セット、収集物若しくはライブラリーをコードする核酸配列のセット、収集物若しくはライブラリー；及び/又は親和性成熟に供した免疫グロブリン断片配列のセット、収集物若しくはライブラリーをコードする核酸配列のセット、収集物若しくはライブラリーとすることができる。

30

【0380】

特に、このような方法において、核酸配列の前記セット、収集物又はライブラリーは、(V<sub>H</sub>ドメイン又はV<sub>H</sub>Hドメイン等の)ポリペプチドのセット、収集物又はライブラリーをコードする。例えば、核酸配列の前記セット、収集物又はライブラリーは、ドメイン抗体若しくはシングルドメイン抗体のセット、収集物若しくはライブラリー、又はドメイン抗体若しくはシングルドメイン抗体として機能することが可能なアミノ酸配列のセット、収集物若しくはライブラリーをコードすることができる。特定の実施形態において、ヌクレオチド配列の前記セット、収集物又はライブラリーは、V<sub>H</sub>H配列のセット、収集物又はライブラリーをコードする。

40

【0381】

上記方法では、スクリーニングを容易にする等の目的で、ヌクレオチド配列の前記セット、収集物又はライブラリーをファージ、ファージミド、リボソーム又は適切な微生物(例えば、酵母)の表面に提示させることができる。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列(のセット、収集物又はライブラリー)を提示・スクリーニングするのに適した方法、技術及び宿主生物は、例えば、本願の詳細な開示に基づいて、当業者に自明である。

Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)

50



)におけるH o o g e n b o o mによる論考も参照されたい。

【0382】

本発明はさらに、上記方法により、あるいは、上記方法の1種を含み、さらに、少なくとも前記免疫グロブリン配列のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を決定する工程と；例えば、宿主細胞若しくは宿主生物での発現又は化学合成法等のそれ自体公知の方法で前記アミノ酸配列を発現させる又は合成する工程とを含む方法により取得可能であるか又は取得されるポリペプチド配列に関する。

【0383】

ポリペプチド配列の単離

場合により、本願で想定される真菌標的と特異的に結合するアミノ酸配列の生産方法はさらに、有害生物標的に対して検出可能な結合親和性又は検出可能なインビトロ作用を有する少なくとも1種のポリペプチドを前記アミノ酸配列ライブラリーから単離する工程をさらに含むことができる。

【0384】

これらの方法はさらに、有害生物標的に対して検出可能な結合親和性を有する又はその活性に対して検出可能なインビトロ作用を有する少なくとも1種のポリペプチドをコードする配列を増幅する工程を含むことができる。例えば、本願に記載する方法の選択工程から得られた特定のアミノ酸配列を提示するファージクローンを、宿主細菌の再感染と増殖培地でのインキュベーションにより増幅することができる。

【0385】

特定の実施形態において、これらの方法は、有害生物標的と結合することが可能な1種以上のアミノ酸配列の配列を決定する工程を含むことができる。

【0386】

アミノ酸配列のセット、収集物又はライブラリーに含まれるポリペプチド配列が適切な細胞又はファージ又は粒子の表面に提示される場合には、前記アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を前記細胞又はファージ又は粒子から単離することが可能である。こうして、選択されたアミノ酸配列ライブラリーメンバーのヌクレオチド配列を日常的なシーケンシング法により決定することができる。

【0387】

他の特定の実施形態において、本願で想定されるポリペプチドの生産方法は、適切な条件下で前記ヌクレオチド配列を宿主生物で発現させ、実際の所望のアミノ酸配列を得る工程を含む。この工程は、当業者に公知の方法により実施することができる。

【0388】

さらに、こうして得られ、有害生物標的に対して検出可能な結合親和性を有する又はその活性に対して検出可能なインビトロ作用を有するポリペプチド配列は、任意選択的に、その配列を同定した後に、可溶性タンパク質コンストラクトとして合成することができる。

【0389】

例えば、上記方法により取得される、取得可能である又は選択されるポリペプチド配列は、当技術分野で公知の組換え法又は化学合成法を使用して合成することができる。また、上記方法により取得される、取得可能である又は選択されるアミノ酸配列は、遺伝子組換え技術により生産することもできる。従って、上記方法により取得される、取得可能である又は選択されるポリペプチド配列の合成方法は、有害生物標的に対して検出可能な結合親和性を有する又はその活性に対して検出可能なインビトロ作用を有するアミノ酸配列をコードする核酸又はベクターを宿主細胞に形質転換又は感染させる工程を含むことができる。従って、有害生物標的に対して検出可能な結合親和性を有する又はその活性に対して検出可能なインビトロ作用を有するアミノ酸配列は、組換えDNA法により作製することができる。アミノ酸配列をコードするDNAは、従来の手順を使用することにより容易に合成することができる。DNAが作製されたら、発現ベクターに導入した後、組換え宿主細胞中及び/又はこれらの組換え宿主細胞が存在する培地中でアミノ酸配列の発現を得

10

20

30

40

50

るために、大腸菌又は任意の適切な発現システム等の宿主細胞に前記ベクターを形質転換又はトランスフェクトすることができる。

【0390】

当然のことながら、タンパク質発現・精製分野における当業者に公知の通り、適切な発現システムを使用して発現ベクターから生産されたポリペプチドに（一般的にはアミノ酸配列のN末端又はC末端に）例えばHisタグ又は精製を容易にするための他の配列タグを付加してもよい。

【0391】

宿主細胞への核酸又はベクターの形質転換又はトランスフェクションは、当業者に公知の種々の手段により実施することができ、リン酸カルシウムDNA共沈法、DEAE-デキストランによるトランスフェクション、ポリブレンによるトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム融合法、リポフェクション、プロトプラスト融合法、レトロウイルス感染及びパーティクルガン法が挙げられる。

10

【0392】

所望のポリペプチド配列の発現に適した宿主細胞は、インビトロ又はインビボのどちらに位置するかに関係なく、任意の真核又は原核細胞（例えば、大腸菌等の細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞、及び昆虫細胞）とすることができる。例えば、宿主細胞は、トランスジェニック植物又は動物に位置することができる。

【0393】

従って、本願はさらに、有害生物標的に対して検出可能な結合親和性を有する又はその活性に対して検出可能なインビトロ作用を有するポリペプチド配列の生産方法として、このようなアミノ酸配列をコードする核酸配列又はベクターを宿主細胞に形質転換、トランスフェクト又は感染させる工程と、適切な条件下で前記アミノ酸配列を発現させる工程とを含む方法を提供する。本願はさらに、有害生物標的に対して検出可能な結合親和性を有する又はその活性に対して検出可能なインビトロ作用を有するポリペプチド配列の生産方法として、前記ポリペプチドをコードする核酸配列又はベクターを導入した宿主細胞を準備する工程と、適切な条件下でポリペプチドを発現させる工程とを含む方法を提供する。本発明の方法はさらに、前記ポリペプチドを単離する工程、例えば、（例えば、宿主細胞を溶菌させる工程の後に）細胞培養培地又は発酵ブロス又は宿主細胞の内部から前記ポリペプチドを単離する工程を含むことができる。

20

30

【0394】

さらに別の実施形態において、本発明はさらに、本願に開示する農薬組成物又は生物的防除組成物の製造（同義語として「又は生産」）方法を提供する。

【0395】

特定の実施形態において、本発明は、本願に開示する農薬組成物の製造方法として、  
- 有害生物と特異的に結合する少なくとも1種のポリペプチドを取得する工程と、  
- 前記ポリペプチド又はその機能的断片を農薬組成物に製剤化する工程とを少なくとも含む方法を提供する。

【0396】

これらの方法の特定の実施形態において、有害生物と特異的に結合する少なくとも1種のポリペプチドを取得する工程は、  
(a) 有害生物と特異的に結合するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させる工程と、任意選択的に、  
(b) 前記ポリペプチドを単離及び/又は精製する工程とを含む。

40

【0397】

これらの方法の他の特定の実施形態において、有害生物と特異的に結合する少なくとも1種のポリペプチドを取得する工程は、  
a) ポリペプチド配列のセット、収集物又はライブラリーを準備する工程と；  
b) 有害生物と特異的に結合する及び/又は有害生物に対して親和性を有する配列につい

50

て、ポリペプチド配列の前記セット、収集物又はライブラリーをスクリーニングする工程と、任意選択的に、

c) 有害生物と特異的に結合する及び/又は有害生物に対して親和性を有する前記ポリペプチド配列を単離する工程とを含む。

【0398】

本願はさらに、本願に開示する農薬組成物又は生物的防除組成物の製造(同義語として「又は生産」)方法として、有害生物駆除活性を有する80~200アミノ酸又は上記に定義した他の適切なサブレンジのアミノ酸配列又はポリペプチドを少なくとも1種の慣用農薬補助剤と共に製剤化する工程を含む方法を提供する。

【0399】

適切な製造方法は当技術分野で公知であり、限定されないが、高せん断又は低せん断混合法、湿式又は乾式粉砕法、ドリップキャスト法、カプセル化法、乳化法、コーティング法、粉衣法、ピリング法、押出造粒法、流動層造粒法、共押出法、噴霧乾燥法、噴霧冷却法、霧化法、付加重合又は重縮合法、界面重合法、*in situ*重合法、コアセルベーション法、噴霧カプセル化、溶融分散冷却法、溶媒蒸発法、相分離法、溶媒抽出法、ゾルゲル重合法、流動層コーティング法、パンコーティング法、溶融法、受動的又は能動的吸収又は吸着法が挙げられる。

【0400】

具体的に、本願に開示する80~200アミノ酸又は上記に定義した他の適切なサブレンジのアミノ酸配列又はポリペプチドは、化学合成法により製造することができる。

【0401】

さらに、80~200アミノ酸又は上記に定義した他の適切なサブレンジのアミノ酸配列又はポリペプチドを組換え微生物発現システムによりインビトロで作製し、その後の使用に備えて単離できることも開示する。このようなアミノ酸配列又はポリペプチドは、粗細胞ライセート、懸濁液、コロイド等でもよいし、あるいは、慣用農薬補助剤と共に製剤化する前に、精製、純化、緩衝及び/又はさらに処理してもよい。

【0402】

具体的に、組換え法は一般に、目的のアミノ酸配列、タンパク質又はポリペプチドを発現するDNA分子を、前記DNA分子に対して異種の発現システムに挿入する方法である(即ち、通常ではこのようなDNA分子は前記宿主に存在しない)。前記異種DNA分子を発現システム又はベクターに適正な向きで正しい読み枠に挿入する。ベクターは、挿入されるタンパク質コーディング配列の転写と翻訳に必要な成分を含む。DNAの転写はプロモーターの存在に依存する。同様に、原核細胞中におけるmRNAの翻訳は、真核細胞のシグナルとは異なる適正な原核細胞シグナルの存在に依存する。遺伝子発現の最大化に関する論考については、Roberts and Lauer, *Methods in Enzymology* 68:473(1979)参照。利用される特定の調節配列に関係なく、Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, N.Y. (1989)に記載されているような当技術分野における標準クローニング手順を使用してDNA分子をベクターにクローニングする。前記タンパク質をコードする単離型DNA分子が発現システムにクローニングされると、宿主細胞に取込まれる準備が整う。このような取込みは、ベクター/宿主細胞システムに応じて種々の形質転換法により実施することができる。適切な宿主細胞としては、限定されないが、細菌、ウイルス、酵母、哺乳動物細胞、昆虫、植物等が挙げられる。任意選択的に、前記組換え宿主細胞は、天然又は組換え型の機能的III型分泌装置を発現する宿主細胞とすることができる。これは、US6,596,509に詳細に記載されている。機能的III型分泌装置を発現する結果として、前記細胞は前記ポリペプチドを発現し、その後、前記タンパク質を培養培地に分泌するであろう。この結果、ポリペプチドの単離・精製を簡易化することができる。前記組換え宿主細胞を適切な発酵チャンバーで増殖させることができ、前記宿主細胞の増殖と前記ポリペプチドの発現を最適化す

10

20

30

40

50

る温度及び栄養条件下で増殖させることが好ましい。当業者は、特定の宿主細胞に最適な条件を決定することができる。発酵後、例えば、細菌懸濁液を例えば約2～5倍量の緩衝液で希釈し、pHを約5.5～10、より好ましくはpH約7～9、さらに好ましくはpH約8.0に調整することができる。適切な緩衝液は当技術分野で周知であり、例えば、リン酸カリウム緩衝液やTris-EDTA緩衝液が挙げられる。緩衝液の濃度は、約0.001mM～約0.5Mとすることができる。pH調整後、(細菌)懸濁液を約60～130の温度、好ましくは約95～125の温度まで熱処理する。熱処理は任意の適切な時間実施することができる。1実施形態では、熱処理を約5分間～約30分間実施する。加熱した懸濁液を次に冷却する。適切な冷却温度は、限定されないが、約35～55、好ましくは約45である。冷却後、細菌懸濁液中の細菌細胞を必要に応じて溶解させ、ポリペプチドを遊離させる。細胞溶解は、例えば細菌懸濁液をリゾチームと接触させることにより実施することができる。リゾチームの濃度は、約2ppm～100ppmとすることができる。あるいは、高圧又は超音波処理等の非化学的方法により細胞溶解を行ってもよく、どちらの方法も当技術分野における通常の知識を有する者に周知である。細胞溶解後に細菌懸濁液をインキュベートすることが望ましいと思われる。適切なインキュベーション時間は変動し得る。例えば、細菌懸濁液を約40～42の温度で約30～45分間インキュベートすると望ましいと思われる。溶菌後、前工程の熱処理に起因する細胞破片と変性タンパク質を除去することにより、所望のポリペプチドをさらに抽出することができる。1実施形態では、抽出物を約10～20分間遠心し、細胞破片をある程度除去する。適切な遠心速度は約4,000～20,000rpmとすることができる。スピンドウン時間は約10分間～20分間とすることができる。その後、熱処理と上清の遠心によりさらに細胞破片を除去し、総固形分を約60%超、70%超、80%超、90%超又は95%超除去することにより、細胞破片を実質的に含まない液体抽出物を得る。この後熱処理は、約60の温度で約2時間まで、約100で約10分間、又は15psiの圧力下に約121で約5分間実施することができる。これらの温度と時間は他の条件に応じて変動し得る。本願に開示するアミノ酸配列又はポリペプチドを含有する安定な液体組成物の製造方法はさらに、殺生物剤と、任意選択的に、プロテアーゼインヒビター及び非イオン性界面活性剤の一方又は両方を前記液体抽出物に導入し、前記ポリペプチドを含有する液体組成物を得る工程を含む。1実施形態では、非イオン性界面活性剤を加えずにプロテアーゼインヒビターを前記液体抽出物に導入する。別の実施形態では、プロテアーゼインヒビターを加えずに非イオン性界面活性剤を前記液体抽出物に導入する。別の実施形態では、プロテアーゼインヒビターと非イオン性界面活性剤の両方を前記液体抽出物に導入する。さらに別の実施形態では、プロテアーゼインヒビターも非イオン性界面活性剤も前記液体抽出物に導入しない。あるいは、例えば、HPLC分析法又は特定のタンパク質若しくはポリペプチドの量を定量することができる他の適切な方法を使用して本願に開示する液体組成物の安定性を評価することができる。本願に開示する組成物における前記アミノ酸配列又はポリペプチドの安定性は、熟成後の液体組成物中のタンパク質の量を、調製したばかりの液体組成物の量又は同一組成物で実施された過去の定量と比較することにより測定することができる。タンパク質安定性の測定は、その活性の維持に強く相關する。

10

20

30

40

#### 【0403】

慣用農薬補助剤は当技術分野で周知であり、限定されないが、水性若しくは有機溶媒、緩衝剤、酸性化剤、界面活性剤、湿潤剤、展着剤、粘着付与剤、固着剤、基剤、充填剤、増粘剤、乳化剤、分散剤、金属イオン封鎖剤、沈降防止剤、融合助剤、レオロジー改質剤、消泡剤、光防護剤、凍結防止剤、殺生物剤、浸透剤、鉱物油若しくは植物油、顔料及び飛散防止剤又はその任意の適切な組み合わせが挙げられる。

#### 【0404】

さらに別の実施形態において、本発明は、所定の植物有害生物標的に対する親和性選択により得られ、植物有害生物の成長及び/又は活性を約0.00001～1μMの最小発育阻止濃度で阻害することが可能な80～200アミノ酸又は上記に開示したサブレンジ

50

のポリペプチドを提供する。

【0405】

本願に開示する植物を真菌による感染に対して保護、予防、治療又は処置するための方法の特定の実施形態において、本願に開示するポリペプチド又は組成物は、噴霧、霧化、発泡、煙霧、ハイドロカルチャー/水耕栽培、コーティング、液浸、及び/又は粉衣により、前記植物に直接又は間接的に施用される。

【0406】

核酸配列

別の態様において、本発明は、本願に開示するポリペプチド配列（又は適切なその断片）をコードする核酸配列を提供する。これらの核酸配列は、ベクター又は遺伝子コンストラクト又はポリヌクレオチドの形態とすることもできる。本願に開示する核酸配列は、合成若しくは半合成配列、ライブラリー（特に、発現ライブラリー）から単離されたヌクレオチド配列、オーバーラップするプライマーを使用してPCRにより作製されたヌクレオチド配列、又はそれ自体公知のDNA合成技術を使用して作製されたヌクレオチド配列とすることができる。

10

【0407】

本発明は、本願に開示するいずれかのポリペプチドをコードする核酸配列を含む。例えば、本発明は、配列番号1～161から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列とその変異体（例えば、前記配列に対してアミノ酸置換又は所定の同一性百分率を有するもの）を含む。

20

【0408】

コンストラクト、ベクター、宿主細胞

本願に開示する遺伝子コンストラクトはDNAでもRNAでもよいが、二本鎖DNAが好ましい。本発明の遺伝子コンストラクトはさらに、目的の宿主細胞若しくは宿主生物の形質転換に適した形態でもよいし、目的の宿主細胞のゲノムDNAに組込むのに適した形態でもよいし、目的の宿主生物における独立した複製、維持及び/又は遺伝に適した形態でもよい。例えば、本発明の遺伝子コンストラクトは、例えば、プラスミド、コスミド、YAC、ウイルスベクター又はトランスポゾン等のベクターの形態とすることができる。特に、ベクターは発現ベクター、即ち、（例えば、適切な宿主細胞、宿主生物及び/又は発現システムで）インピトロ及び/又はインピボ発現を可能にするベクターとすることができる。

30

【0409】

従って、さらに別の態様において、本発明は、本発明の1種以上の核酸配列を含むベクターも提供する。

【0410】

さらに別の態様において、本発明は、本願に開示する1種以上のアミノ酸配列を発現する又は発現することが可能な宿主又は宿主細胞を提供する。本発明のアミノ酸配列、ポリペプチドの発現に適した宿主又は宿主細胞の例は、当業者に自明である。

【0411】

本願はさらに、80～200アミノ酸又は上記に記載したサブレンジのポリペプチドが、本願に定義する農薬組成物又は生物的防除組成物中で安定に維持されること、即ち、ポリペプチドの完全性と本願に定義する有害生物駆除活性が農薬組成物の保存及び/又は利用条件下で維持されることを開示し、このような条件としては、高温、凍結解凍サイクル、pH又はイオン強度の変化、UV照射、有害な化学物質の存在等が挙げられる。80～200アミノ酸のこれらのポリペプチドは、前記農薬組成物を周囲温度で2年間保存した場合又は前記農薬組成物を54℃で2週間保存した場合に、前記農薬組成物中で安定に維持されることが最も好ましい。特に、農薬組成物に含まれる80～200アミノ酸のポリペプチドは、前記農薬組成物中で周囲温度にて2年間保存後、又は前記ポリペプチドを含有する農薬組成物を54℃で2週間保存した場合に、少なくとも約70%の活性を維持し、より特定のには、少なくとも約70%～80%の活性、最も特定のには、約80%～9

40

50

0%の活性を維持する。

【0412】

本願に開示する方法で使用するためのさらに別の実施形態において、本願は、80~200アミノ酸のポリペプチドをコードする核酸配列を開示し、前記ポリペプチドは、特定の植物病原性標的に対する親和性選択により得られ、前記ポリペプチドは、約0.00001~1μMの最小発育阻止濃度で作物有害生物の成長及び/又は活性を阻害することが可能である。

【0413】

機能的に連結された以下のDNA成分、即ち、a)植物発現プロモーターと、b)転写されると、ポリペプチドに翻訳することが可能なmRNA分子となるDNA領域と、c)前記植物の細胞内で機能する転写終結及びポリアデニル化シグナルを含む3'末端領域を含むキメラ遺伝子も開示する。

10

【0414】

「キメラ遺伝子」又は「キメラコンストラクト」とは、プロモーター（例えば、植物発現プロモーター）又は調節核酸配列がmRNAをコードする核酸配列と機能的に連結又は結合され、調節核酸配列が植物細胞等の細胞に導入されると、前記結合された核酸コーディング配列の転写又は発現を調節できるように構成された組換え核酸配列である。キメラ遺伝子の調節核酸配列とこのように結合される核酸配列とは、自然界では通常では機能的に連結されていない。

【0415】

本発明において、「植物プロモーター」は、植物細胞におけるコーディング配列セグメントの発現を介在する調節成分を含む。植物で発現させるために、核酸分子は、正しい時点で必要な空間的発現パターンで遺伝子を発現する適切なプロモーターと機能的に連結されているか又はこのようなプロモーターを含む必要がある。

20

【0416】

本願で使用する「機能的に連結」なる用語は、プロモーター配列が目的の遺伝子の転写を開始できるように、プロモーター配列と目的の遺伝子が機能的に連結されていることを意味する。

【0417】

植物発現プロモーターは、植物でトランスジーンの発現を誘導することが可能な核酸配列を含む。植物発現プロモーターの例は、少なくとも1個の細胞、組織又は臓器において、成長・発生段階の必ずしも全部ではないとしてもその大部分の間に大半の環境条件下で転写活性状態にある構成的プロモーターであり、他のプロモーターは誘導性プロモーターであり、他の例は組織特異的プロモーターであり、さらに他の例は非生物的ストレス誘導性プロモーターである。

30

【0418】

キメラ遺伝子（又は発現カセット）は、植物に形質転換されると、核酸を発現し、その結果としてタンパク質が発現される。

【0419】

上述した発現カセット（又はキメラ遺伝子）を含む組換えベクターも開示する。

40

【0420】

「ターミネーター」なる用語は、一次転写産物の3'プロセッシング及びポリアデニル化と転写終結を指示する転写ユニットの末端のDNA配列である調節配列を意味する。ターミネーターは、天然遺伝子、種々の他の植物遺伝子、又はT-DNAに由来することができる。付加するターミネーターは、例えば、ノパリンシンターゼ又はオクトパインシンターゼ遺伝子、あるいは別の植物遺伝子、又はあまり好ましくはないが、任意の他の真核遺伝子に由来することができる。

【0421】

「選択マーカー」、「選択マーカー遺伝子」又は「レポーター遺伝子」は、本発明の核酸コンストラクトをトランスフェクト又は形質転換される細胞の同定及び/又は選択を容

50

易にするように、それらが発現される細胞に表現型を付与する任意の遺伝子を含む。これらのマーカー遺伝子は、一連の異なる原理により核酸分子の導入の成功の確認を可能にする。適切なマーカーは、抗生物質若しくは除草剤耐性を付与するマーカー、新規な代謝形質を導入するマーカー、又は視覚的選択を可能にするマーカーから選択することができる。選択マーカー遺伝子の例としては、抗生物質耐性を付与する遺伝子（例えば、ネオマイシンとカナマイシンをリン酸化する *npt11*、又はハイグロマイシンをリン酸化する *hpt*、又は例えばブレオマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、アンピシリン、ゲンタマイシン、ゲネチシン（G418）、スペクチノマイシン若しくはプラスチジジンに対する耐性を付与する遺伝子）、除草剤耐性を付与する遺伝子（例えば、*Basta*（R）に対する耐性を提供する *bar*、グリホサートに対する耐性を提供する *aroA* 若しくは *gox*、又は例えばイミダゾリノン、ホスフィノトリシン若しくはスルホニル尿素に対する耐性を付与する遺伝子）、又は代謝形質を提供する遺伝子（例えば、植物がマンノースを単独炭素源として使用できるようにする *manA*、又はキシロースを利用するためのキシロースイソメラーゼ、又は2-デオキシグルコースに対する耐性等の非栄養性マーカー）が挙げられる。視覚的マーカー遺伝子が発現されると、発色（例えば、 $\beta$ -グルクロニダーゼ *GUS* 又は  $\beta$ -ガラクトシダーゼとその着色物質、例えば、*X-Gal*）、発光（例えばルシフェリン/ルシフェラーゼシステム）又は蛍光（グリーン蛍光タンパク質 *GFP* とその誘導體）が生じる。以上の例は考えられるマーカーのごく一部に過ぎない。熟練作業者はこのようなマーカーに精通している。生物と選択方法に応じて異なるマーカーが好ましい。

10

20

#### 【0422】

核酸が植物細胞に安定的又は一過性に組込まれると、前記細胞のごく少数はこの外来DNAを取込み、必要に応じて、使用される発現ベクターと使用されるトランスフェクション技術に応じてそのゲノムに組込むことが知られている。これらの組込み細胞を同定・選択するために、通常では（上記のもの等の）選択マーカーをコードする遺伝子を目的の遺伝子と共に宿主細胞に導入する。これらのマーカーは、例えば、これらの遺伝子が例えば従来の方法による欠失により機能的でなくなっている突然変異体で使用することができる。さらに、本発明のポリペプチド又は本発明の方法で使用されるポリペプチドをコードする配列を含む同一のベクターを使用して、選択マーカーをコードする核酸分子を宿主細胞に導入することもできるし、別のベクターを使用して導入することもできる。導入された核酸が安定的にトランスフェクトされた細胞は、例えば選択により確認することができる（例えば、選択マーカーを組込んだ細胞は生存し、組込まなかった細胞は死滅する）。

30

40

#### 【0423】

核酸の導入に成功すると、トランスジェニック宿主細胞でマーカー遺伝子、特に抗生物質と除草剤に耐性の遺伝子は不要になり、又は望ましくなくなるので、本発明に係る核酸導入方法は、これらのマーカー遺伝子の除去又は切出しを可能にする技術を利用すると有利である。このような方法の1例は、コトランスフォーメーション（*co-transformation*）と呼ばれる方法である。コトランスフォーメーション法は、本発明に係る核酸を担持させたベクターと、マーカー遺伝子を担持させた第2のベクターの2個のベクターを同時に形質転換に利用する。高い割合の形質転換体（形質転換体の40%以上まで）が両方のベクターを受け取り、又は植物の場合には、両方のベクターを含む。アグロバクテリウムによる形質転換の場合には、形質転換体は通常ではベクターの一部、即ち、通常では発現カセットに相当するT-DNAにより挟まれた配列しか受け取らない。その後、交配を行うことにより、マーカー遺伝子を形質転換植物から除去することができる。別の方法では、トランスポゾンに組込まれたマーカー遺伝子を所望の核酸と共に形質転換に使用する（*Ac/Ds* 技術と呼ばれる）。形質転換体をトランスポザーゼ源と交配することができるが、又は一過性若しくは安定的にトランスポザーゼの発現を付与する核酸コンストラクトを形質転換体に形質転換する。若干の場合（約10%）では、形質転換が成功すると、トランスポゾンは宿主細胞のゲノムから飛び出し、失われる。さらに多くの場合では、トランスポゾンは別の場所に飛び移る。これらの場合には、交配を行うことにより

50

マーカー遺伝子を排除する必要がある。微生物学では、このようなイベントの検出を可能にする又は容易にする技術が開発されている。さらに有利な方法は、組換えシステムと呼ばれる方法に依存しており、その利点は、交配による排除を省略できるという点である。この種の最もよく知られているシステムは、Cre/LoxPシステムと呼ばれる方法である。Cre1は、LoxP配列間に位置する配列を除去するリコンビナーゼである。マーカー遺伝子がLoxP配列間に組込まれる場合には、形質転換に成功した後に、リコンビナーゼの発現により除去される。他の組換えシステムは、HIN/HIX、FLP/FR T及びREP/STBシステムである(Tribble et al., J. Biol. Chem., 275, 2000: 22255 - 22267; Velmurugan et al., J. Cell Biol., 149, 2000: 553 - 566)。本発明に係る核酸配列を植物ゲノムに部位特異的に組込むことが可能である。

10

#### 【0424】

本発明の目的で、「トランスジェニック」、「トランスジーン」又は「組換え」とは、例えば核酸配列については、前記核酸配列を含む発現カセット、遺伝子コンストラクト若しくはベクター、又は本発明に係る核酸配列、発現カセット若しくはベクターで形質転換された生物を意味する。

#### 【0425】

従って、トランスジェニック植物は、本発明の目的では、上記のように、本発明の方法で使用される核酸が、前記植物のゲノムに存在しない若しくは由来しないか、又は前記植物のゲノムに存在するが、前記植物のゲノムにおいてその天然の遺伝子座に存在しないという意味であるとみなされ、前記核酸は同種で発現させることも異種で発現させることも可能である。しかし、上記のように、トランスジェニックとは、本発明に係る核酸又は本発明の方法で使用される核酸が、植物のゲノム内でその天然の位置にあるが、配列が天然配列に対して改変されている、及び/又は天然配列の調節配列が改変されていることも意味する。トランスジェニックとは、本発明に係る核酸の発現がゲノム内の非天然遺伝子座で行われること、即ち、前記核酸の同種又は異種発現が行われることを意味するとみなすことが好ましい。好ましいトランスジェニック植物は本願に言及する。

20

#### 【0426】

「発現」又は「遺伝子発現」なる用語は、特定の1種以上の遺伝子又は特定の遺伝子コンストラクトの転写を意味する。「発現」又は「遺伝子発現」なる用語は特に、1種以上の遺伝子又は遺伝子コンストラクトが構造的RNA(rRNA、tRNA)又はmRNAに転写されることを意味し、その後、タンパク質に翻訳されてもされなくてもよい。このプロセスは、DNAの転写と、得られたmRNA産物のプロセッシングを含む。

30

#### 【0427】

本願で使用する「発現増加」又は「過剰発現」なる用語は、元の野生型発現レベルに追加される任意の形態の発現を意味する。本発明の目的では、元の野生型発現レベルはゼロでもよく、即ち発現が不在でもよいし、発現が測定不能であってもよい。

#### 【0428】

遺伝子又は遺伝子産物の発現を増加させる方法は、当技術分野において文献に明確に記載されており、例えば、(上述したような)適切なプロモーターにより駆動される過剰発現、転写エンハンサー又は翻訳エンハンサーの使用が挙げられる。目的のポリペプチドをコードする核酸の発現をアップレギュレートするように、非異種形態のポリヌクレオチドの適切な位置(一般的には上流)に、プロモーター又はエンハンサーエレメントとして機能する単離型核酸を導入することができる。ポリペプチド発現が所望される場合には、ポリヌクレオチドコーディング領域の3'末端にポリアデニル化領域を付加することが一般に望ましい。前記ポリアデニル化領域は、天然遺伝子、種々の他の植物遺伝子、又はT-DNAに由来することができる。付加する3'末端配列は、例えば、ノパリンシンターゼ又はオクトパインシンターゼ遺伝子、あるいは別の植物遺伝子、又はあまり好ましくはないが、任意の他の真核遺伝子に由来することができる。

40

#### 【0429】

50



サイトゾルに蓄積する成熟メッセージの量を増加するために、部分コーディング配列の5'非翻訳領域(UTR)又はコーディング配列にイントロン配列を付加してもよい。植物及び動物発現コンストラクトの両方で転写ユニットにスプライシング可能なイントロンを付加すると、遺伝子発現をmRNAレベルとタンパク質レベルの両方で1000倍まで増加することが示されている(Buchman and Berg(1988)Mol. Cell Biol. 8:4395-4405; Callis et al.(1987)Genes Dev 1:1183-1200)。遺伝子発現のこのようなイントロン増強は、一般的に、転写ユニットの5'末端の近傍に配置した場合に最大となる。トウモロコシイントロンAdh1-Sイントロン1、2、及び6、Bronze-1イントロンの使用は当技術分野で公知である。一般情報については、The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, N.Y.(1994)参照。

10

20

30

40

50

#### 【0430】

本願で言及する「導入」又は「形質転換」なる用語は、導入に使用する方法に関係なく、外来ポリヌクレオチド又はキメラ遺伝子(又は発現カセット)を宿主細胞に導入することを意味する。器官形成によるか又は胚発生によるかに拘わらず、その後のクローン増殖が可能な植物組織を本発明の遺伝子コンストラクトで形質転換させることができ、その結果、完全な植物体として再生させることができる。選択される特定の組織は、形質転換させる特定の生物種に利用可能で且つ最適なクローン増殖システムにより異なる。典型的な組織標的としては、葉ディスク、花粉、胚、子葉、胚軸、大配偶体、カルス組織、既存の分裂組織(例えば、頂端分裂組織、腋芽、及び根分裂組織)、及び誘導分裂組織(例えば、子葉分裂組織及び胚軸分裂組織)が挙げられる。ポリヌクレオチドは宿主細胞に一過性又は安定的に導入することができ、例えばプラスミドとして、組込まれないままにすることができる。あるいは、宿主ゲノムに組込むこともできる。得られた形質転換植物細胞はその後、当業者に公知の方法で形質転換植物を再生するために使用することができる。

#### 【0431】

外来遺伝子を植物のゲノムに導入することを形質転換と言う。植物種の形質転換は現在ではかなり日常的な技術になっている。目的の遺伝子を適切な祖先細胞に導入するために数種の形質転換法のいずれも使用できるという利点がある。植物組織又は植物細胞からの植物の形質転換・再生について記載されている方法を一過性又は安定的な形質転換に利用することができる。形質転換法としては、リポソームの使用、エレクトロポレーション、遊離DNA取込みを増進する化学物質、植物へのDNAの直接注入、パーティクルガン法、ウイルス又は花粉を使用した形質転換法、及びマイクロインジェクション法が挙げられる。プロトプラストのカルシウム/ポリエチレングリコール法(Krens, F.A. et al., (1982)Nature 296, 72-74; Negrutiu I et al.(1987)Plant Mol Biol 8:363-373);プロトプラストのエレクトロポレーション(Shillito R.D. et al.(1985)Bio/Technol 3, 1099-1102);植物材料へのマイクロインジェクション(Crossway A et al., (1986)Mol. Gen. Genet 202:179-185);DNA又はRNAをコーティングした粒子のパーティクルガン法(Klein T.M. et al., (1987)Nature 327:70);(非組込み型)ウイルスによる感染等の方法から選択することができる。トランスジェニック栽培植物を含むトランスジェニック植物をアグロバクテリウムによる形質転換法により生産することが好ましい。有利な形質転換法は植物体での形質転換である。このためには、例えば、アグロバクテリウムを植物種子に作用させることや、植物分裂組織にアグロバクテリウムを接種することができる。本発明によると、形質転換させたアグロバクテリウムの懸濁液を無傷の植物又は少なくとも花原基に作用させると特に好都合であることが分かった。その後、処理された植物の種子が得られるまで植物を成長させる(Clough and Bent, Plant J.(1998)16, 735-743)。アグロバクテリウムによるイネの形質転換法としては、以下の文献、即ち、ヨーロ

ツバ特許出願EP1198985、Aldemita and Hodges (Plant 199: 612-617, 1996)、Chan et al. (Plant Mol Biol 22(3): 491-506, 1993)、Hiei et al. (Plant J 6(2): 271-282, 1994)のいずれかに記載されている方法等の周知のイネ形質転換法が挙げられ、その開示内容全体を本願に援用する。トウモロコシ形質転換の場合、好ましい方法は、Ishida et al. (Nat. Biotechnol 14(6): 745-50, 1996)又はFrame et al. (Plant Physiol 129(1): 13-22, 2002)のいずれかに記載されている方法であり、その開示内容全体を本願に援用する。前記方法は、例えば、B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143と、Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42(1991) 205-225)にも記載されている。アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) を形質転換させるのに適したベクター (例えば、pBin19) に、発現させようとする核酸又はコンストラクトをクローニングすることが好ましい (Bevan et al (1984) Nucl. Acids Res. 12-8711)。その後、このようなベクターにより形質転換させたアグロバクテリウムを公知の方法で植物の形質転換に使用することができ、例えば、すり潰した葉又は細断した葉をアグロバクテリウム溶液に浸漬した後、適切な培地で培養することにより、アラビドプシス (Arabidopsis) 等のモデルとして使用される植物 (アラビドプシス・タリアーナ (Arabidopsis thaliana: シロイヌナズナ) は本発明の範囲では栽培植物とみなされない) や、例えばタバコ等の栽培植物で使用できる。アグロバクテリウム・ツメファシエンスによる植物の形質転換法は、例えば、HofgenとWillmitzerによりNucl. Acid Res. (1988) 16, 9877に記載されており、又は特にF. F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38から公知である。

#### 【0432】

後から無傷の植物に再生させる必要がある体細胞の形質転換に加え、植物分裂組織の細胞、特に成長して配偶子となる細胞を形質転換させることも可能である。この場合には、形質転換させた配偶子は自然植物発生に従い、トランスジェニック植物を生じる。従って、例えば、アラビドプシスの種子をアグロバクテリウムで処理し、所定の割合が形質転換されてトランスジェニックとなった発生中の植物から種子を得る [Feldman, KA and Marks MD (1987). Mol Gen Genet 208: 1-9; Feldmann K (1992). In: C. Koncz, N-H Chua and J. Shell, eds, Methods in Arabidopsis Research. World Scientific, Singapore, pp. 274-289]。別の方法は、花序を繰り返し除去し、ロゼットの中心の切除部位を形質転換アグロバクテリウムと共にインキュベーションすることにより、後期時点で同様に形質転換種子を得ることができる (Chang (1994). Plant J. 5: 551-558; Katavic (1994). Mol Gen Genet, 245: 363-370)。しかし、特に有効な方法は、減圧浸潤法と「フローラルディップ」法等のその変法である。アラビドプシスの減圧浸潤法の場合には、無傷の植物を減圧下にアグロバクテリウム懸濁液で処理し [Bechthold, N (1993). CR Acad Sci Paris Life Sci, 316: 1-194-1-199]、 「フローラルディップ」法の場合には、発生中の花組織を界面活性剤で処理したアグロバクテリウム懸濁液と

共に短時間インキュベートする [Clough, S J and Bent A F (1998) *The Plant J.* 16, 735 - 743]。どちらの場合にも所定の割合のトランスジェニック種子が収穫され、上記選択条件下で成長させることにより、これらの種子を非トランスジェニック種子から区別することができる。さらに、プラスチドは大半の作物で母系遺伝し、花粉を介してトランスジーンが流出する危険が減る又はなくなるので、プラスチドの安定的な形質転換は有利である。葉緑体ゲノムの形質転換は一般に、Klaus et al., 2004 [*Nature Biotechnology* 22 (2), 225 - 229] に模式的に示されている方法により実施される。要約すると、形質転換させようとする配列を葉緑体ゲノムと相同のフランキンゲ配列の間に選択マーカー遺伝子と共にクローニングする。これらの相同フランキンゲ配列は、葉緑体ゲノム(プラストーム: plastome) への部位特異的組込みを誘導する。プラスチド形質転換法は多種多様の植物種について記載されており、Bock (2001) *Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J Mol Biol.* 2001 Sep 21; 312 (3): 425 - 38 又は Maliga, P (2003) *Progress toward commercialization of plastid transformation technology. Trends Biotechnol.* 21, 20 - 28 に総説が記載されている。さらに、一過性に同時に組込まれたマーカー遺伝子により生産することができるマーカーフリープラスチド形質転換体として、生物工学的進展も最近報告されている (Klaus et al., 2004, *Nature Biotechnology* 22 (2), 225 - 229)。

【0433】

遺伝子改変植物細胞は、熟練作業者が精通している全方法により再生することができる。適切な方法は、S. D. Kung と R. Wu, Potrykus 又は Hofgen と Willmitzer による上記刊行物を参照されたい。

【0434】

一般に、形質転換後に、目的の遺伝子と共にトランスフェクトされた植物発現性遺伝子によりコードされる1種以上のマーカーの存在について、植物細胞又は細胞群を選択した後、形質転換材料を完全な植物体に再生させる。形質転換植物を選択するためには、形質転換植物を非形質転換植物から区別できるように、形質転換で得られた植物材料を一般に選択条件に供する。例えば、上記のように得られた種子を蒔き、初期成長期間後に、噴霧により適切な選択に供することができる。別の方法では、形質転換された種子のみが植物体に成長できるように、必要に応じて滅菌後に、適切な選択剤を使用して種子を寒天平板培地で成長させることも考えられる。あるいは、上記に記載したもの等の選択マーカーの存在について、形質転換植物をスクリーニングする。

【0435】

DNA 導入及び再生後に、例えばサザン分析法を使用し、形質転換されたと推定される植物を目的の遺伝子の存在、コピー数及び/又はゲノム編成について評価してもよい。これに代えて又はこれに加えて、新たに導入されたDNAの発現レベルをノーザン分析法及び/又はウェスタン分析法によりモニターしてもよく、どちらの技術も当技術分野における通常の知識を有する者に周知である。

【0436】

作製された形質転換植物をクローン繁殖や古典的育種技術等の種々の手段により繁殖させることができる。例えば、第1世代(又はT1)形質転換植物を自家受精させ、ホモ接合型第2世代(又はT2)形質転換体を選択した後、古典的育種技術によりT2植物体をさらに繁殖させることができる。作製された形質転換植物は種々の形態をとることができる。例えば、形質転換細胞と非形質転換細胞のキメラ、クローン形質転換体(例えば、発現カセットを含むように形質転換された全細胞)、形質転換組織と非形質転換組織の接ぎ木(例えば、植物では、形質転換した台木を形質転換していない接ぎ穂に接ぎ木する)が挙げられる。

## 【0437】

以下、非限定的な実施例により本発明を具体的に説明する。

## 【実施例】

## 【0438】

[実施例1] 免疫剤、ファージディスプレイ及びスクリーニングアッセイ用のフザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) のフォルチ (Folch) 法下相抗原の調製

2:1及び1:2 (v/v) 比のクロロホルム:メタノールを使用して室温にてフザリウム・オキシスポルムの無傷の菌糸と分生子を順次抽出した。抽出物を合一し、乾燥し、Folchら (1957 (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.) により記載されているように、粗脂質抽出物を分配した。フォルチ法下層に由来する脂質を回収し、免疫に使用した。

10

## 【0439】

[実施例2] ファージディスプレイ及びスクリーニングアッセイ用のフザリウム・オキシスポルムのセラミドモノヘキソシド画分の調製

Barreto-Bergterらの方法 (2011 Barreto-Bergter E, Sasaki G and, de Souza LM. (2011) Structural analysis of fungal cerebroside. *Front Microbiol.* 2:239.) に記載されているように調製されたフザリウム・オキシスポルムに由来するセラミドモノヘキソシド画分をEliana Barreto-Bergterから入手した。

20

## 【0440】

[実施例3] フザリウム・オキシスポルムのフォルチ法下相抗原と結合するVHHの同定

## 3.1 免疫

フザリウム・オキシスポルムに由来するフォルチ法下相抽出物を免疫したラマからVHHを作製した。標準プロトコルに従い、フザリウム・オキシスポルムに由来するフォルチ法下相抽出物を薄層クロマトグラフィー (TLC) にスポットしたものをラマに6回ブースト免疫した。フォルチ法下相抽出物が吸着したシリカをプレートから掻き取り、リン酸緩衝液に懸濁した。懸濁液を超音波処理し、不完全フロイントアジュバントと混合し、皮下注射に使用した。免疫過程の間、全ラマは終始健康な状態であり、免疫前後に血液試料を採取した。

30

## 【0441】

## 3.2 ライブラリー構築

ライブラリー構築のために、Ficoll-Hypaqueを製造業者の指示に従って使用し、免疫したラマの血液試料から末梢血単核細胞を調製した。これらの細胞から全RNAを抽出し、RT-PCRの出発材料として使用し、遺伝子断片をコードするVHHを増幅した。これらの断片をファージミドベクターpASF20にクローニングした。pASF20は、pUC119に由来する発現ベクターであり、lacZプロモーター、合成リーダー配列、マルチクローニングサイト、コリファージpIIIタンパク質コーディング配列、アンピシリン耐性遺伝子、及び一本鎖生産用M13ファージ起点を含む。このベクターは、VHHコーディング配列とインフレームで、C末端 (His) 6ペプチドタグとc-mycペプチドタグをコードする。標準方法に従ってファージを作製した (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual; Brian K. Kay, Jill Winter, Dr. John McCafferty)。クローン多様性が $1E+08$ 以上のライブラリーが得られ、ファージが生産され、抗体多様性を示すことが確認された。

40

## 【0442】

50

### 3.3 選択

以下のように2ラウンドのパニング選択を実施した。常に5%クロロホルム/メタノールを溶媒とし、真菌脂質画分をポリスチレンMaxisorpマルチウェルプレートにコーティングした。第1ラウンドの選択では、4種類の異なる条件、即ち、2種類の異なる脂質画分（真菌；フザリウム・オキシスポルム）濃度（50 μg/mlと5 μg/ml）と、バックグラウンド対照用の2種類の異なるブランク条件（5%CHCl<sub>3</sub>/MeOHとPBS）を使用してライブラリーからのファージ（1,00E+11ファージ/選択条件）25 μlを選択した。第2ラウンドの選択では、第1ラウンドの選択の条件に加え、さらに低い抗原濃度を使用した（0.5 μg/ml）。第2ラウンドの選択では、非特異的なファージ結合の選択を減らすために、ファージ投入量を第1ラウンドの選択からの投入量に比較して10倍に希釈した。 10

#### 【0443】

第1ラウンドの選択では、特に50 μg/mlの選択条件からの出力について良好な濃縮が認められた。この選択からのファージ出力をレスキューし、沈殿させ、第2ラウンドの選択で入力として使用した。この選択ラウンドでは、0.5 μg/mlの選択条件を除き、抗原をコーティングした条件で有意に高い濃縮が認められた。

#### 【0444】

第2ラウンドのパニング選択後に得られた選択された溶出ファージプールを大腸菌TG1細胞に感染させ、個々のコロニーを釣菌し、2%グルコースと100 μg/mlのカルベニシリンを添加した2×TY培地を各ウェルに100 μlずつ入れた96ウェルプレートに移してマスタープレート（MP）とし、37℃で終夜増殖させた。マスタープレートを20%グリセロール中で-80℃にて保存し、ペリプラズム抽出物生産、スクリーニング及びシーケンシングに使用した。 20

#### 【0445】

[実施例4] フザリウム・オキシスポルムの脂質画分と結合するVHHのスクリーニング

VHHがフザリウム・オキシスポルムの脂質画分と結合するか否かを検証するために、ELISAにより結合を評価した。真菌脂質画分10 μg/mlを5%CHCl<sub>3</sub>/MeOHに溶解してコーティングしたウェルと、5%CHCl<sub>3</sub>/MeOHのみをコーティングしたウェルとの結合について、個々のクローンを各々スクリーニングした。抗原をコーティングしたウェルのOD<sub>450nm</sub>結合シグナルと、対応するブランクウェルの比が2倍を上回る場合に、クローンを陽性とみなした。試験した360個の個々のクローンに適用した規定のカットオフ基準によると、14.2%の総合ヒット率が得られた。 30

#### 【0446】

[実施例5] VHH10G11は、インビトロ抗真菌アッセイにおいてボトリチス・シネレア（*Botrytis cinerea*）の成長を用量依存的に阻害する。

#### 【0447】

植物病原性真菌であるボトリチス・シネレアR16に対するVHH10G11Q（配列番号1）の抗真菌活性をインビトロで評価した。

#### 【0448】

精製したVHH10G11Qの2倍希釈液を96ウェルマイクロタイタープレートで調製した。10 μMの最終VHH10G11Q濃度から出発し、これらの希釈液20 μlと対照として水20 μlに真菌孢子懸濁液（1/2濃度のジャガイモデキストロースブロス（PDB）1ml当たり孢子1E+05個）80 μlを加えた。Incucyte Zom生細胞イメージングシステムを使用して試験プレートを25℃で36時間インキュベートした。全試験は少なくとも2枚ずつ実施した。 40

#### 【0449】

図1に示す抗真菌活性アッセイの結果によると、VHH10G11Q濃度（μM）に対する%真菌成長（緑色オブジェクト総面積）として表した場合に、明白な用量依存成長阻害パターンが判明した。

## 【0450】

[実施例6] VHH10G11は、インビトロ抗真菌アッセイにおいてグリコシルセラミド結合性VHH41D01と比較してボトリチス・シネレアの成長をより強力に阻害する。

## 【0451】

WO2014/177595A1とWO2014/191146A1は、複数の抗グリコシルセラミド結合性VHHについて記載しており、そのうち、VHH41D01は、ボトリチス・シネレアR16を含む数種の試験株で最も顕著な抗真菌活性を示す。

## 【0452】

植物病原性真菌であるボトリチス・シネレアR16に対するVHH10G11Q（配列番号1）の成長阻害特性をVHH41D01とインビトロで比較した。 10

## 【0453】

精製したVHH10G11Q及び41D01の2倍希釈液を96ウェルマイクロタイタープレートで調製した。40 $\mu$ Mの最終VHH10G11Q濃度から出発し、これらの希釈液20 $\mu$ lと対照として水20 $\mu$ lに真菌孢子懸濁液（1/2濃度のジャガイモデキストロースブロス（PDB）1ml当たり孢子1E+05個）80 $\mu$ lを加えた。Incucyte Zoom生細胞イメージングシステムを使用して試験プレートを25 $^{\circ}$ Cで48時間インキュベートした。全試験は少なくとも2枚ずつ実施した。

## 【0454】

図2に示す抗真菌活性アッセイの結果によると、驚くべきことにVHH10G11Qでは生物学的に活性なVHH41D01と比較してさらに顕著な成長阻害パターンが判明した。 20

## 【0455】

[実施例7] 部位特異的突然変異誘発

VHHの部位特異的突然変異誘発を以下のように実施した。VHH配列変異体をコードするヌクレオチド配列を遺伝子断片として合成により構築し、さらにピキア・パストリス（*Pichia pastoris*：ピキア酵母）の形質転換に適したプラスミドpPpT4GAP-S（Naatsaari et al（2012）, *PLoS One*, 7（6）：e39720）にクローニングした。このプラスミドは、クローニングした遺伝子断片から発現を誘導するためにP<sub>AOX</sub>プロモーターを含む。目的のVHH配列変異体を含むプラスミドを構築する際には、標準クローニング技術を使用した。作製に成功したクローンを配列決定し、目的のVHH配列変異体が存在することと、正しくクローニングされていることを確認した。その後、標準エレクトロポレーションプロトコールを使用して直鎖化プラスミドをコンピテントなピキア・パストリス（*Pichia pastoris*：ピキア酵母）ATCC76273（TM）細胞に形質転換した。その後、作製に成功した形質転換体を使用し、VHH配列変異体を作製した。まず、形質転換体をBMGY（緩衝グリセロール複合体培地）で培養した後、BMMY（緩衝メタノール複合体培地）に移し、誘導を開始した（Weidner et al（2020）, *J Vis Exp*, 36：1862）。その後、当技術分野で広く知られている濾過及び/又はクロマトグラフィー技術を使用してVHHを精製した。 30 40

## 【0456】

[実施例8] VHH10G11のAlaスキヤニング

VHH10G11の全3個のCDR領域をAlaスキヤニングにより評価し、VHH10G11の抗真菌作用に及ぼす1アミノ酸置換の影響を調べた（配列番号18～51）。実施例7に記載したように10G11の変異体を構築・作製した後、実施例5に記載したように抗真菌アッセイを実施した。驚くべきことに、突然変異体の抗真菌作用の維持により明白に示されるように、10G11は、CDR領域の個々のアミノ酸をアラニンで置換した変異体の大半で性能の維持を示した（図3）。アラニンの代わりにグリシン（R26G；配列番号18及びD35G；配列番号27）、セリン（R53S；配列番号32及びT56S；配列番号36）又はアスパラギン（K58N；配列番号39）を使用して他の 50

1 アミノ酸置換変異体を構築しても同様の結果が得られた ( 図 3 ) 。

【 0 4 5 7 】

[ 実施例 9 ] H i s タグを付加した V H H 1 0 G 1 1 の抗真菌活性の改善

H i s タグは、一般にアフィニティークロマトグラフィーを使用する精製用にポリペプチドに付加される。実施例 5 に記載したような抗真菌アッセイを使用した日常的試験中に、驚くべきことに、6 × H i s タグを C 末端に付加した 1 0 G 1 1 Q ポリペプチド ( 配列番号 1 4 8 ) は、抗真菌活性が有意に改善されることが判明した ( 図 4 ) 。 H i s タグは正電荷をもつ 6 個のヒスチジンアミノ酸から構成されるので、1 0 G 1 1 の抗真菌相互作用には正電荷が有益であると思われた。

【 0 4 5 8 】

[ 実施例 1 0 ] V H H 1 0 G 1 1 Q のインシリコ ( I n s i l i c o ) モデル化

1 0 G 1 1 分子をよりよく理解するために、インシリコアプローチを使用してその三次元構造をモデル化した。P r o t e i n D a t a B a n k ( P D B ) で B L A S T 検索を行い、モデル化しようとする 1 0 G 1 1 分子と同一の C D R 長をもつ抗体の構造座標を得た。ギャップコストを 1 3 とし B l o s u m 6 2 行列を使用した。上位 2 5 0 件のヒットのうち、調査対象の 1 0 G 1 1 分子と同一の C D R 長をもつ各構造を相同性モデル化試行に使用した。まず、得られた P D B 構造と 1 0 G 1 1 分子の間で相違する残基を突然変異させる。次に、D u n b r a c k 2 0 1 0 回転異性体ライブラリーで検出されるようなそれらの実測優先性に従って、これらの残基の側鎖をモデル化する ( S h a p o v a l o v a n d D u n b r a c k , ( 2 0 1 1 ) , S t r u c t u r e , 1 9 ( 6 ) : 8 4 4 - 5 8 ) 。必要に応じて、モデル化突然変異を採用するために、直近の側鎖もモデル化した。このモデルを指針として使用し、前記分子の重要なアミノ酸残基を決定した。

【 0 4 5 9 】

得られたモデルを 3 個の C D R 領域の表示と共に図 5 に示す。露出している側鎖の選択を 1 0 G 1 1 のリボン図上に可視化し、K a b a t ナンバリングに従って表示する ( 図 5 は生殖細胞系列配列も示し、1 0 G 1 1 配列をもたらず置換を表示している。さらに、対応する K a b a t ナンバリングも示す ) 。側鎖が露出され、構造障害が最小限であると思われたことから、これらのアミノ酸残基を特異的アミノ酸置換の最良の候補として選択した。

【 0 4 6 0 】

[ 実施例 1 1 ] 1 0 G 1 1 電荷変異体の抗真菌活性

図 3 に示すアッセイ結果から確認されるように、抗真菌活性の低下を示した 5 個の突然変異体のうちの 4 個は、正電荷をもつアミノ酸が電荷をもたない変異体で置換されているという特徴があった。正電荷をもつ H i s タグ付き変異体は抗真菌活性が増加しているという結果 ( 図 4 ) も踏まえ、電荷の効果をさらに調査した。このために、種々の 1 0 G 1 1 電荷変異体を実施例 7 に記載したように作製し、その抗真菌活性を実施例 5 に記載したように試験した。分子の抗原結合界面における 1 0 G 1 1 分子の総電荷を減らすように、以下の置換を設計した。

・突然変異体 1 : C D R 1 の R 2 6 A 置換 ( 配列番号 7 )

・突然変異体 2 : C D R 2 の R 5 3 A 及び K 5 8 A 置換 ( 配列番号 8 )

・突然変異体 3 : C D R 3 の R 9 6 A 及び R 1 0 0 c A 置換 ( 配列番号 9 )

・突然変異体 4 : C D R 1 の R 2 6 A 置換と、C D R 2 の R 5 3 A 及び K 5 8 A 置換と、C D R 3 の R 9 6 A 及び R 1 0 0 c A 置換 ( 配列番号 1 0 )

・突然変異体 5 : C D R 1 の R 2 6 A 置換と、C D R 2 の R 5 3 A 及び K 5 8 A 置換と、C D R 3 の R 9 6 A 及び R 1 0 0 c A 置換と、定常領域の K 7 6 N 及び K 7 7 T 置換 ( 配列番号 1 1 ) 。

【 0 4 6 1 】

総電荷を減らしたこれらの突然変異体は、抗真菌活性の低下又は不在を示す ( 図 6 ) 。このことは、1 0 G 1 1 の活性に正電荷が重要であるという仮説をさらに裏付けている。

10

20

30

40

50

そこで、実施例 10 に記載した構造解析に基づいて正電荷をもつ以下の変異体を設計した。

- ・突然変異体 6 : CDR1 の S 2 7 H、I 2 8 H 及び S 3 0 H 置換 (配列番号 1 2 )
- ・突然変異体 7 : CDR3 の W 1 0 0 a H 及び T 1 0 0 b H 置換 (配列番号 1 3 )
- ・突然変異体 8 : CDR1 の S 2 7 H、I 2 8 H 及び S 3 0 H 置換と、CDR3 の W 1 0 0 a H 及び T 1 0 0 b H 置換 (配列番号 1 4 )
- ・突然変異体 9 : CDR1 の S 2 7 K、I 2 8 K 及び S 3 0 K 置換 (図 7 参照) (配列番号 1 5 )
- ・突然変異体 10 : CDR3 の W 1 0 0 a K 及び T 1 0 0 b K 置換 (配列番号 1 6 )
- ・突然変異体 11 : CDR1 の S 2 7 K、I 2 8 K 及び S 3 0 K 置換と、CDR3 の W 1 0 0 a K 及び T 1 0 0 b K 置換 (図 8 参照) (配列番号 1 7 )。

#### 【0462】

図 6 は、突然変異体 6 及び 7 が 10G11 と同等の抗真菌活性を持つことを示す。突然変異体 8、9、10 及び 11 は抗真菌活性の有意な増加を示し、突然変異体 11 は 10G11 の 5 倍の抗真菌活性に達する。

#### 【0463】

最後に、延長インキュベーション抗真菌アッセイを実施し、実施例 5 に記載したような実験構成の後に 14 日間延長した処、10G11 は非常に強力ではあるものの、3 日後に孢子発芽後成育が部分的に再開したが、これに対して、突然変異体 9 及び突然変異体 11 は、評価期間を通して孢子発芽後成育の防止に持続効果があることが分かった (図 9)。

#### 【0464】

[実施例 12] 10G11 はフォルチ法下相抽出物の画分 3 と結合する。

10G11 とその変異体の推定相互作用パートナーを調査するために、実施例 1 に記載したようにボトリチス・シネレア菌糸から脂質を抽出した。全脂質抽出物をさらに分画するために、薄層クロマトグラフィーを使用した (TLC; Skipski et al (1965), *Biochimica et Biophysica Acta*, 106 (2): 386 - 396)。抽出物をシリカゲルガラスプレートにスポットし、クロロホルム/メタノール混液 (85/15, v/v) 100 mL を充填したクロマトグラフィータンクで展開させた。TLC により分離された脂質バンドを - ナフトールで染色し、脂質を視覚的に検出できるようにした。4 個の画分が同定され、画分 1 は極性脂質の画分であり、画分 2 は保持係数 (Rf) がグルコシルセラミド参照標準 (タモギタケ由来 Glycer) と同様であり、セラミドであると思われ、画分 3 は Rf が参照標準よりも若干高く、画分 4 は非極性リン脂質 (PL) である (図 10)。夫々の画分から十分な材料を得るためには、順相フラッシュクロマトグラフィーを使用することができる (Gorden, M. H. (2015). *Encyclopedia of Analytical Science* (Second edition), Elsevier)。そこで、MeOH 数滴を加えることにより TLE を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> に溶解し、15 μm 粒子を充填した 4 g 順相フラッシュカートリッジにロードした。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (85/15, v/v) を溶離液としてカラムに送液した。最後に、画分を 0.45 μm シリンジフィルター (ナイロンメンブレン) で濾過し、乾燥した。その後、1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン (DPH) の添加下で薄膜水和法により、真の脂質抽出物とその個々の画分からリポソームを調製した (Trucillo et al, 2020. *Processes* 8 (9): 1022; Zhang, 2017. *Liposomes* 1522: 17 - 22)。DPH は水性媒体中ではほぼ非蛍光性であるが、脂質膜に挿入されると強い蛍光を示す。脂質膜の破壊は蛍光シグナルの減少に繋がると思われる。その後、10G11 とこれらのリポソームの相互作用を試験した。図 11 の結果によると、10G11 は全脂質抽出物 (TLE)、画分 3 及び画分 4 中に存在する脂質と相互作用することが分かる。さらに、10G11 は小胞の破損をもたらし、10G11 による膜破壊という興味深い効果に繋がることが分かる。

#### 【0465】



10G11と画分3の結合をさらにバイオレイヤー干渉法（BLI）により確認した。BLIは、生体分子相互作用を測定するための無標識光学解析技術である（Kamat et al, 2017. Analytical biochemistry 536: 16-31; Wallner et al. 2013. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 72: 150-154）。この解析により、10G11と画分3の結合が確認された（図12）。

【0466】

[実施例13] 画分3と結合する他の分子

ビオチン化脂質（12：0ビオチニルMG（1-（12-N-ビオチン）アミノドデカノイル-rac-グリセロール）（Sigma Aldrich）の添加により上記リポソーム形成方法（実施例12）を変更し、ストレプトアビジンをコーティングしたプレート（ストレプトアビジンをコーティングし、SuperBlock（TM）バッファでブロッキングされた高結合能透明96ウェルプレートであるThermo Fisher Scientific製品Pierce（TM））を使用するELISAにこれらのリポソームを使用できるようにした。この方法を使用して画分3と結合する他の分子についてスクリーニングした処、画分3と結合するさらに2個の分子、即ち、図13に示すように配列番号3（10E11Q）と配列番号5（12C03Q）が同定された。

【0467】

[実施例14] 作用方式

ボトリチス・シネレア胞子に及ぼす10G11の作用は、胞子が胞子発芽後成育の開始を阻害されるというレベルで認められ、驚くべきことに、Incucyte Zoom生細胞イメージングシステムで顕微鏡タイムラプスイメージング中の構造完全性の急激な低下（図14）により確認されたように、相当部分の胞子が10G11活性により溶菌も生じる。リポソームを破壊する10G11の作用（実施例12）は、胞子の溶菌が10G11の作用によることをさらに裏付けている。

【0468】

[実施例15] 温室におけるファコプソラ・パキリジ（Phakopsora pachyrhizi）を病原とするダイズさび病の防除

ポット栽培したダイズ苗4ポット（4本/ポット）に、表1に記載するような濃度の活性成分を含有する水性懸濁液125mlを噴霧した。14日間隔で2回施用した。活性成分の1回目の施用（施用A）から2日後に苗にファコプソラ・パキリジ（Phakopsora pachyrhizi）を1回接種した。10G11Qの成長阻害特性を非抗真菌性基準VHH分子、非処理対照及び浸透移行性化学農薬であるQuadris Top SBX（アゾキシストロピン、ジフェノコナゾール）と比較した。

【0469】

【表2】

処理剤	施用量	施用回数
未処理( <i>P. pachyrhizi</i> 接種)	施用せず	0
10G11	250g ai/ha	2(AB)
10G11	500g ai/ha	2(AB)
10G11	750g ai/ha	2(AB)
基準VHH	250g ai/ha	2(AB)
基準VHH	500g ai/ha	2(AB)
基準VHH	750g ai/ha	2(AB)
Quadris Top SBX	7-7.5 oz./A	2(AB)

表1. 処理表

【0470】

0～100%のスケールの重症度百分率として疾患重症度を記録する。最初の症状が現れるときから記録を開始した後、少なくとも活性成分の2回目の施用（施用B）の3週間

後まで週1回評価した。苗の位置に基づき、草冠下部重症度百分率、草冠中部重症度百分率及び草冠上部重症度百分率に分けて重症度百分率を評定し、自然界における疾患の自然発生後に疾患の進行を十分に追跡する。

【0471】

図15に示す結果によると、草冠下部では、2回目の施用の3週間後まで、基準VHH及び非処理接種対照に比較して10G11の顕著な用量関連成長阻害パターンが認められる。

【0472】

グラフのx軸の時間の表示は、疾患重症度又は発生率の記録時点を表す。これらは相対値であり、記録を行った時点の施用後日数により表す。例えば、2回目の施用(施用B)から13日後の記録は、13DABとして表される。このコードは、図15~図28に適用される。

10

【0473】

図16に示す結果によると、草冠中部では、2回目の施用の3週間後まで、基準VHH及び非処理接種対照に比較して10G11の顕著な用量関連成長阻害パターンが認められる。

【0474】

図17に示す結果によると、草冠上部では、2回目の施用の3週間後まで、基準VHH及び非処理接種対照に比較して10G11の顕著な用量関連成長阻害パターンが認められる。

20

【0475】

一般に、750gai/haの10G11は、基準化学農薬であるQuadris Top SBXと「同等」の活性を示すことが多い。

【0476】

[実施例16] 温室におけるコレトリカム・オルビキュラーレ(Colletotrichum orbiculare)を病原とするカボチャ炭疽病の防除

ポット栽培したカボチャ苗4ポット(2本/ポット)に、表2に記載するような濃度の活性成分を含有する水性懸濁液125mlを噴霧した。6日又は7日間隔で4回施用した。活性成分の1回目の施用(施用A)から2日後に苗にコレトリカム・オルビキュラーレ(Colletotrichum orbiculare)を1回接種した。10G11Qの有効性を非処理対照及び基準化学農薬であるBravo WS(クロロタロニル)の有効性と比較した。

30

【0477】

【表3】

処理剤	施用量	施用回数
未処理対照	施用せず	0
10G11Q	175g ai/ha	4(ABCD)
10G11Q	350g ai/ha	4(ABCD)
10G11Q	700g ai/ha	4(ABCD)
Bravo WS	28fl oz./A	4(ABCD)

40

表2. 処理表

【0478】

0~100%のスケールの重症度百分率として疾患重症度を記録する。最初の症状が現れたときから記録を開始した後、活性成分の4回目の施用(施用D)の2週間後まで定期的に評価した。

【0479】

図18に示す結果によると、最後の施用の2週間後まで、非処理接種対照に比較して10G11の明白な用量関連成長阻害パターンが認められる。

【0480】

50

【実施例17】圃場におけるブドウ灰色かび病 (*Botrytis cinerea*) の防除

ブドウの木10本4区画(1区画当たり33.6m<sup>2</sup>)を地域慣例に従って600l/haの噴霧量に対応する8リットルの噴霧溶液で処理した。噴霧混合液は、表3に記載するような濃度の活性成分を含有するものとした。ブドウの木の特定の生物季節学的段階、即ち(標準化BBCHスケールに従い)BBCH77、BBCH79、BBCH81及びBBCH85に4回施用した。人為的な感染は実施せず、1回目の噴霧は予想される疾患圧に基づいて予防的に行った。10G11の有効性を非処理対照及び基準化学農薬であるTeldor(フェンヘキサミド)の有効性と比較した。さらに、Switch(フルジオキソニル+シプロジニル)とTeldorの化学農薬輪番と、Switchと10G11の輪番も試験した。

【0481】

【表4】

処理剤	施用量	施用回数
未処理対照	施用せず	0
10G11	250g ai/ha	4(ABCD)
10G11	500g ai/ha	4(ABCD)
10G11	750g ai/ha	4(ABCD)
Teldor	1kg/ha	4(ABCD)
Switch	1kg/ha	2(AC)
Teldor	1kg/ha	2(BD)
Switch	1kg/ha	2(AC)
10G11	500g ai/ha	2(BD)

表3. 処理表

【0482】

0~100%のスケールの重症度百分率(PESSEV)として疾患重症度を記録する。4回目の施用の直前に最初の症状が現れたときから記録を開始した。最後の施用の13日後と20日後にも追加評価を実施した。各評価時に、1区画当たりランダムに選択した100房について、疾患に罹患したブドウの房表面積の百分率を推定した。

【0483】

図19に示す結果によると、最後の施用の20日後まで10G11の明白な用量関連性能が認められる。

【0484】

【実施例18】圃場におけるブドウうどんこ病 (*Uncinula necator*) の防除

ブドウの木10本4区画(1区画当たり25m<sup>2</sup>)を地域慣例とブドウの木の成長段階に従って600l/ha又は800l/haの噴霧量に対応する8リットル又は10リットルの噴霧溶液で処理した。噴霧混合液は、表4に記載するような濃度の活性成分を含有するものとした。平均10日間隔で8回施用した。人為的な感染は実施せず、1回目の噴霧は、最初のうどんこ病症状が現れる前に開花前の段階で実施した。10G11の有効性を非処理対照及び基準化学農薬であるTopas10EC(ペンコナゾール)の有効性と比較した。さらに、Tiovit Jet(硫黄)、Vivando(メトラフェノン)、Sercadis(フルキサピロキサキド)、Prosper500EC(スピロキサミン)及びKarathane Star(メプチルジノカップ)の化学農薬輪番も評価した。表4に記載するように、7番目の処理剤は化学農薬輪番の化学農薬の一部を10G11に置き換えた。

【0485】

10

20

30

40

50

【表 5】

処理剤	施用量	施用回数
未処理対照	施用せず	0
10G11	250g ai/ha	8(ABCDEFGH)
10G11	500g ai/ha	8(ABCDEFGH)
10G11	750g ai/ha	8(ABCDEFGH)
Topas 10 EC	0.3l/ha	8(ABCDEFGH)
Tiovit Jet	8kg/ha	4(ABGH)
Vivando	0.2l/ha	1(C)
Sercadis	0.15l/ha	1(C)
Prosper 500 EC	0.6l/ha	2(DF)
Karathane Star	0.6l/ha	1(E)
Tiovit Jet	8kg/ha	3(ABG)
Vivando	0.2l/ha	1(C)
10G11	500g ai/ha	1(CFH)
Prosper 500 EC	0.6l/ha	1(D)
Karathane Star	0.6l/ha	1(E)

10

表4. 処理表

【0486】

苗条の同一位置からランダムに選択した100枚の葉で罹患した葉面積の百分率を評価することにより、葉で有効性評価を実施した。さらに、ランダムに選択した1区画当たり50房の感染面積の百分率として果実のうどんこ病感染も評価した。最後の施用の4週間後まで評価を続けた。

20

【0487】

図20及び21に示す結果によると、疾患圧が非常に高いにも拘わらず、施用の4週間後まで10G11の明白な用量関連性能が認められる。葉と房の両方でうどんこ病症状の良好な軽減が認められた。

【0488】

[実施例19] オイジウム・ネオリコベルシシ (*Oidium neolycoopersici*) を病原とするトマトうどんこ病の防除  
 トマト苗15本4区画(1区画当たり9.9m<sup>2</sup>)を地域慣例に従って1000l/haの噴霧量に対応する3.96リットルの噴霧溶液で処理した。噴霧混合液は、表5に記載するような濃度の活性成分を含有するものとした。7日間隔で5回施用した。人為的な感染は実施せず、1回目の噴霧は、最初の症状が認められる前に実施した。10G11の有効性を非処理対照及び基準化学農薬であるTopas(ペンコナゾール)の有効性と比較した。さらに、Systhane Forte(ミクロブタニル)、Ortiva(アゾキシストロピン)、Signum(ボスカリド+ピラクロストロピン)及びTopasの化学農薬輪番も評価した。表5に記載するように、7番目の処理剤は、化学農薬輪番の化学農薬の一部を10G11に置き換えた。

30

【0489】

40

【表 6】

処理剤	施用量	施用回数
未処理対照	施用せず	0
10G11	250g ai/ha	5 (ABCDE)
10G11	500g ai/ha	5 (ABCDE)
10G11	750g ai/ha	5 (ABCDE)
Topas	0.02%(v/v)	5 (ABCDE)
Systhane Forte	0.04%(v/v)	1 (A)
Ortiva	0.1%(v/v)	1 (B)
Signum	0.15%(v/v)	1 (C)
Topas	0.02%(v/v)	2 (DE)
Systhane Forte	0.04%(v/v)	1 (A)
10G11	500g ai/ha	2 (BD)
Signum	0.15%(v/v)	1 (C)
Topas	0.02%(v/v)	1 (E)

10

表5. 処理表

## 【0490】

ランダムに選択した1区画当たり10枚の葉で疾患に罹患した葉面積の百分率（疾患重症度）を記録した。これらの値に基づき、発生率百分率（P E S I N C；罹患葉の%）を計算した。週1回の基準で評価を行い、最後の施用の1週間後まで続けた。

20

## 【0491】

図2.2及び2.3に示す結果によると、最後の施用の1週間後まで10G11の明白な用量関連性能が認められる。軽度の疾患圧のこれらの条件下で10G11の良好な性能が認められ、トマトうどんこ病の重症度と発生率のいずれも明白に低下した。

## 【0492】

[実施例20] 温室におけるポドスフェラ・アフアニス（*Podospheera aphanis*）を病原とするイチゴうどんこ病の防除

イチゴ苗20本4区画（1区画当たり3m<sup>2</sup>）を地域慣例に従って400l/ha又は500l/haの噴霧量に対応する0.576リットル又は0.72リットルの噴霧溶液で処理した。噴霧混合液は、表6に記載するような濃度の活性成分を含有するものとした。7日間隔で6回施用した。人為的な感染は実施せず、1回目の噴霧は、最初のうどんこ病症状が現れる前に行った。10G11の有効性を非処理対照及び基準化学農薬であるTopas 2.5WG（ペンコナゾール）の有効性と比較した。さらに、Ganzo（ミクロブタニル）、Topas 2.5WG（ペンコナゾール）及びSignum（ボスカリド+ピラクロストロピン）の化学農薬輪番も評価した。表6に記載するように、7番目の処理剤は、化学農薬輪番の化学農薬の一部を10G11に置き換えた。

30

## 【0493】

40

50

【表 7】

処理剤	施用量	施用回数
未処理対照	施用せず	0
10G11	250g ai/ha	6(ABCDEF)
10G11	500g ai/ha	6(ABCDEF)
10G11	750g ai/ha	6(ABCDEF)
Topas 2.5 WG	2kg/ha	6(ABCDEF)
Ganzo	0.38l/ha	2(AD)
Topas 2.5 WG	2kg/ha	2(BE)
Signum	1.5kg/ha	2(CF)
Ganzo	0.38l/ha	2(AD)
10G11	500g ai/ha	2(BE)
Signum	1.5kg/ha	2(CF)

10

表6. 処理表

## 【0494】

1区画当たり20枚の葉で有効性評価を実施し、区画全体で罹患した葉面積の百分率（P E S S E V）と罹患した葉の百分率（P E S I N C）を評価した。週1回の基準で評価を行い、最後の施用の2週間後まで続けた。

## 【0495】

図24及び25に示す結果によると、最後の施用の2週間後まで10G11の明白な用量関連性能が認められる。10G11を施用すると、うどんこ病発生率及び重症度の両方の良好な低下が得られた。

20

## 【0496】

[実施例21]イチゴの灰色かび病（*Botrytis cinerea*）の防除  
イチゴ苗20本4区画（1区画当たり3m<sup>2</sup>）を地域慣例に従って400l/ha又は500l/haの噴霧量に対応する0.576リットル又は0.72リットルの噴霧溶液で処理した。噴霧混合液は、表7に記載するような濃度の活性成分を含有するものとした。7日間隔で6回施用した。人為的な感染は実施せず、1回目の噴霧は、開花の開始時に行った。10G11の有効性を非処理対照及び基準化学農薬であるTeldor（フェンヘキサミド）の有効性と比較した。さらに、Switch（シプロジニル+フルジオキソニル）、Teldor（フェンヘキサミド）及びScala（ピリメタニル）の化学農薬輪番も評価した。表7に記載するように、7番目の処理剤は、化学農薬輪番の化学農薬の一部を10G11に置き換えた。

30

## 【0497】

【表 8】

処理剤	施用量	施用回数
未処理対照	施用せず	0
10G11	250g ai/ha	6(ABCDEF)
10G11	500g ai/ha	6(ABCDEF)
10G11	750g ai/ha	6(ABCDEF)
Teldor	1kg/ha	6(ABCDEF)
Switch	0.8kg/ha	2(AD)
Teldor	1kg/ha	2(BE)
Scala	2l/ha	2(CF)
Switch	0.8kg/ha	2(AD)
10G11	500g ai/ha	2(BE)
Scala	2l/ha	2(CF)

40

表7. 処理表

50

【0498】

収穫時に果実で有効性評価を実施し、健康な果実と罹患果実の個数と重量を評価した。その後、1区画当たり50個の健康な果実を低温貯蔵庫(2)に2日間入れた後、周囲温度(7~10)でさらに5日間収穫後評価を続けた。周囲温度貯蔵の0日目、2日目及び5日目に貯蔵果実で灰色かび病(Botrytis)の発生率と重症度を評価した。

【0499】

図26及び27に示す結果によると、収穫時と収穫後のいずれでも10G11の明白な用量関連性能が認められる。開花中に圃場で10G11を施用すると、収穫時の灰色かび病(Botrytis)の発生率が低下した。10G11の性能は収穫後にも確認され、貯蔵果実で灰色かび病(Botrytis)重症度の用量関連低下が認められた。

10

【0500】

[実施例22] 温室におけるポドスフェラ・キサソチイ(Podosphaera xanthii)を病原とするキュウリうどんこ病の防除

1区画当たりキュウリ苗10本4区画(1区画当たり4m<sup>2</sup>)を作物の高さに応じて1000~1875l/haの噴霧量で処理した。噴霧混合液は、表8に記載するような濃度の活性成分を含有するものとした。7日間隔で8回施用した。人為的な感染は実施せず、1回目の噴霧は、開花の開始時に実施した。10G11の有効性を非処理対照、10G11の有効性を非処理対照、基準化学農薬であるTopaz(ペンコナゾール)、基準生物農薬であるSonata(バチルス・プミルス(Bacillus pumilis)株QST2808)とアジュバントElasto G5の併用、並びにTakumi(シフルフェナミド)、Flint(トリフロキシストロピン)及びTopazの化学農薬輪番の有効性と比較した。

20

【0501】

【表9】

処理剤	施用量	施用回数
未処理対照	施用せず	0
10G11	125g ai/ha LWA*	8(ABCDEFGH)
10G11	250g ai/ha LWA*	8(ABCDEFGH)
10G11	500g ai/ha LWA*	8(ABCDEFGH)
Topaz	0.5l/ha	8(ABCDEFGH)
Takumi Flint Topaz	0.15l/ha 12.5g/100l 0.5l/ha	
Sonata Elasto G5	10l/ha 250ml/100l	8(ABCDEFGH) 8(ABCDEFGH)

30

表8. 処理表. \*LWA=leaf wall area

【0502】

1区画当たり40枚の葉で有効性評価を実施し、罹患葉面積の百分率(PESSEV)を評価した。週1回の基準で評価を行い、最後の施用の2週間後まで続けた。

40

【0503】

図28に示す結果によると、7回目の施用の1週間後まで10G11の明白な用量関連性能が認められる。8回目の施用から疾患圧が非常に重度の値に達すると、性能は低下した。

【0504】

[実施例23] 10G11の結合特性

10G11の種々の結合特性を検討した。

【0505】

IncuCyte(R)塩基解析ソフトウェアのグラフ/エクスポートメニューの時間プロット特徴を使用してマイクロプレートグラフを作成した。対数増殖中期の処理済み試

50

料のコンフルエンスの生データを Graph Pad Prism 8 にエクスポートし、標準濃度の片対数関数としてプロットした。データを 4 パラメータロジスティック回帰曲線にフィッティングさせた後に、IC50 値を外挿する。孢子発芽及び / 又は菌糸体成長の 50 % を阻害する濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を意味する IC50 に基づいて病原体感受性を測定する。IC50 計算値は  $0.76 \pm 0.10 \mu\text{M}$  である。該当外の VHH の標準は等モル量で抗真菌活性を示さない (図 1)。

#### 【0506】

10G11 と画分 3 の結合の解離定数  $K_d$  値を推定するために、実施例 13 に記載したような画分 3 に由来するピオチン化リポソームを用いた ELISA 構成を使用した。10G11 ポリペプチドをリン酸緩衝液で段階希釈により  $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $2.5 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$  及び  $10 \mu\text{M}$  の濃度に調製して加えた。得られた ELISA 吸収プロットを図 29 に示す。このプロットを使用し、Graph Pad を使用して解離定数  $K_d$  を推定した。ここでは、非直線回帰フィッティングを使用した。この結果、 $0.76 \sim 1.55 \mu\text{M}$  の IC50 範囲が得られた。これは、 $0.76 \mu\text{M} \sim 1.55 \mu\text{M}$  の範囲の解離定数  $K_d$  の推定値に変換することができる。

10

#### 【0507】

[ 実施例 24 ] CDR2 領域の置換

CDR2 を生殖細胞系列配列に戻すと、抗真菌活性が低下することから、CDR2 は抗真菌活性に重要であることが分かったので、CDR1 領域と CDR3 領域を変異させた 10G11 分子の変異体を作製した (図 30)。逆に、CDR3 を (基準 VHH の) 無関係の CDR3 領域で置き換えても抗真菌活性は低下しなかった (図 30) ので、CDR3 は抗真菌活性を低下せずにアミノ酸変異が可能であると判断された。

20

#### 【0508】

本願に開示するポリペプチド、組成物及び方法の記載事項 (特徴) と実施形態を以下にまとめる。明白に逆の指示がない限り、以下に明記する本発明により開示される記載事項及び実施形態は、各々他の記載事項及び / 又は実施形態と組み合わせることができる。特に、好ましい又は有利であるとする全特徴は、好ましい又は有利であるとする他の全特徴と組み合わせることができる。

#### 【0509】

本願に開示する記載内容を以下に箇条書きにする。

30

1. 真菌と結合し、前記真菌の孢子の成長の遅延及び / 又は前記真菌の孢子の溶菌を生じることが可能なポリペプチド。
2. 前記ポリペプチドが、真菌の膜又は真菌の膜の成分と結合する、記載事項 1 に記載のポリペプチド。
3. 前記ポリペプチドが、真菌の細胞壁又は細胞壁の成分と結合しない、上記記載事項のいずれかに記載のポリペプチド。
4. 前記ポリペプチドが、真菌のグルコシルセラミドと結合しない、上記記載事項のいずれかに記載のポリペプチド。
5. 前記ポリペプチドが、例えば、ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*) 又は他の真菌の脂質含有画分等の真菌の細胞膜の脂質含有画分と結合する、上記記載事項のいずれかに記載のポリペプチド。
6. 前記脂質含有画分が、クロマトグラフィーにより取得される、記載事項 5 に記載のポリペプチド。
7. 前記クロマトグラフィーが、真菌菌糸及び / 又は分生子から得られた粗脂質抽出物で実施され得る、記載事項 6 に記載のポリペプチド。
8. 前記クロマトグラフィーが、薄層クロマトグラフィー又は順相フラッシュクロマトグラフィーである、記載事項 6 又は記載事項 7 に記載のポリペプチド。
9. 前記クロマトグラフィーが、基板上、例えばシリカゲルをコーティングしたガラスプレート上で実施される、記載事項 6 又は記載事項 7 又は記載事項 8 に記載のポリペプチド。

40

50



- 10．前記クロマトグラフィーが、クロロホルム/メタノール混液（例えば、85/15% v/v）を溶離液として使用して実施される、記載事項6～9のいずれかに記載のポリペプチド。
- 11．前記脂質含有画分が、真菌（例えば、フザリウム・オキシスポルム又は他の真菌）の菌系及び/又は分生子を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得され得る又は取得可能であり得る、記載事項5～10のいずれかに記載のポリペプチド。
- 12．前記脂質含有画分が、シリカをコーティングしたガラススライド上でクロロホルム/メタノール混液（例えば、85/15% v/v）を溶離液として使用して真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び/又は分生子を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得され得る又は取得可能であり得る、記載事項5～10のいずれかに記載のポリペプチド。 10
- 13．前記脂質含有画分が、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び/又は分生子を全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数（Rf）がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程により取得され得る又は取得可能であり得る、記載事項5～10のいずれかに記載のポリペプチド。
- 14．前記脂質含有画分が、前記TLEをジクロロメタン（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>）とMeOHに溶解し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH（例えば、85/15% v/v）を溶離液として使用する全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び/又は分生子を分画する工程と、その後、前記画分をフィルターにより濾過する工程とを含む方法により取得され得る又は取得可能であり得る、記載事項5～10のいずれかに記載のポリペプチド。 20
- 15．前記脂質含有画分が、前記TLEをジクロロメタン（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>）とMeOHに溶解し、前記TLEを順相フラッシュカートリッジ（例えば、15µm粒子を充填したフラッシュカートリッジ）にロードし、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH（85/15% v/v）を溶離液として前記カラムに送液する全脂質抽出物順相フラッシュクロマトグラフィーにより、真菌（例えば、ボトリチス・シネレア又は他の真菌）の菌系及び/又は分生子を分画する工程と、前記画分をフィルター（例えば、ナイロンメンブレンを装着した0.45µmシリンジフィルター）で濾過する工程と、前記画分を乾燥する工程とを含む方法により取得され得る又は取得可能であり得る、記載事項5～10のいずれかに記載のポリペプチド。 30
- 16．前記クロマトグラフィーからの前記画分が、前記ポリペプチドと前記画分の結合又は前記ポリペプチドと前記画分の相互作用を試験する前に処理され得る、記載事項5～15のいずれかに記載のポリペプチド。
- 17．前記脂質含有画分からリボソームを調製する工程を含む、記載事項16に記載のポリペプチド。
- 18．前記方法が、薄膜水和法を含む、記載事項17に記載のポリペプチド。 40
- 19．リボソームの前記調製方法が、1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン（DPH）の添加下で薄膜水和法を使用する、記載事項17又は記載事項18に記載のポリペプチド。
- 20．配列番号1～51及び101～111から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列、又は前記配列に対して1箇所まで、2箇所まで、3箇所まで、4箇所まで若しくは5箇所までのアミノ酸置換を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチド。
- 21．配列番号1～10、12～51及び101～111から構成される群から選択され 50

るアミノ酸配列、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成される、記載事項20に記載のポリペプチド。

22. 配列番号1~6から構成される群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成される、記載事項20又は記載事項21に記載のポリペプチド。

23. 配列番号1、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチド。 10

24. 配列番号2、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチド。

25. 配列番号3、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチド。

26. 配列番号4、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチド。 20

27. 配列番号5、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチド。

28. 配列番号6、又は前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか又は同配列から構成されるポリペプチド。

29. 配列番号52~67及び112~122から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と；

配列番号68~83及び123~133から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と； 30

任意選択的に配列番号84~100及び134~144から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域を含むポリペプチド。

30. 配列番号52、53及び54から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と；

配列番号68、69及び70から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と；

任意選択的に配列番号84、85及び86から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域

を含む、記載事項29に記載のポリペプチド。 40

31. 配列番号52を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号68を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号84を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域；

配列番号53を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号69を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号85を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域；

配列番号54を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号70を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号86を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域；

配列番号55を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号68を含むか 50







むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号140を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域；

配列番号119を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号130を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号141を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域；

配列番号120を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号131を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号142を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域；

配列番号121を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号132を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号143を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域；あるいは

配列番号122を含むか又は同配列から構成されるCDR1領域と、配列番号133を含むか又は同配列から構成されるCDR2領域と、任意選択的に配列番号144を含むか又は同配列から構成されるCDR3領域

を含む、記載事項29又は記載事項30に記載のポリペプチド。

32．配列番号149、150、154、155、158及び159から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域1(FR1)配列と、配列番号151、156及び160から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域2(FR2)配列と、配列番号152、157及び161から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3(FR3)配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4(FR4)配列を含む、記載事項29～31のいずれか一項に記載のポリペプチド。

33．配列番号149及び150から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域1(FR1)配列と、配列番号151を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域2(FR2)配列と、配列番号152を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3(FR3)配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4(FR4)配列を含む、記載事項29～31のいずれか一項に記載のポリペプチド。

34．配列番号154及び155から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域1(FR1)配列と、配列番号156を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域2(FR2)配列と、配列番号157を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3(FR3)配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4(FR4)配列を含む、記載事項29～31のいずれか一項に記載のポリペプチド。

35．配列番号158及び159から構成される群から選択される配列を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域1(FR1)配列と、配列番号160を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域2(FR2)配列と、配列番号161を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域3(FR3)配列と、配列番号153を含むか又は同配列から構成されるフレームワーク領域4(FR4)配列を含む、記載事項29～31のいずれか一項に記載のポリペプチド。

36．前記ポリペプチドが、80～200残基長である、上記記載事項のいずれかに記載のポリペプチド。

37．前記ポリペプチドが、抗体又はその機能的断片である、上記記載事項のいずれかに記載のポリペプチド。

38．前記ポリペプチドが、抗体の重鎖可変ドメイン(VH又はVHH)又はその機能的断片である、上記記載事項のいずれかに記載のポリペプチド。

39．前記ポリペプチドが、記載事項20～38のいずれか一項に記載のポリペプチドである、記載事項1～19のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40．上記記載事項のいずれかに記載のポリペプチドを含有する組成物。

10

20

30

40

50

- 4 1 . 前記組成物が、農薬組成物である、記載事項 4 0 に記載の組成物。
- 4 2 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、真菌と結合することにより、前記真菌の胞子の成長の遅延及び / 又は前記真菌の胞子の溶菌を生じることが可能である、前記組成物。
- 4 3 . 前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、前記真菌の少なくとも 1 種の細胞膜成分と特異的に結合する、記載事項 4 2 に記載の組成物。
- 4 4 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、ボトリチス・シネレアの細胞膜の脂質含有画分と結合することが可能であり、前記脂質含有画分が、ボトリチス・シネレアの菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数 ( R f ) がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能である、前記組成物。 10
- 4 5 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 5 1 若しくは 1 0 1 ~ 1 1 1 のいずれか 1 種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。
- 4 6 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 5 2 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 8 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。 20
- 4 7 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 5 3 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 9 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。
- 4 8 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 5 4 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 7 0 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。
- 4 9 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 5 1 若しくは 1 0 1 ~ 1 1 1 のいずれか 1 種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能であり、前記ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 5 1 又は 1 0 1 ~ 1 1 1 のいずれか 1 種に比較して正電荷の増加をもたらす 1 箇所以上の置換を含む、前記組成物。 30
- 5 0 . 前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、抗体又はその機能的断片である、記載事項 4 2 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の組成物。
- 5 1 . 前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、抗体の重鎖可変ドメイン ( V H 又は V H H ) 又はその機能的断片である、記載事項 4 2 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。
- 5 2 . 前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、前記真菌の少なくとも 1 種の細胞膜成分と特異的に結合する、記載事項 4 5 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の組成物。 40
- 5 3 . 前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、ボトリチス・シネレアの細胞膜の脂質含有画分と結合することが可能であり、前記脂質含有画分が、ボトリチス・シネレアの菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数 ( R f ) がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能である、記載事項 5 2 に記載の組成物。
- 5 4 . 前記組成物における前記少なくとも 1 種のポリペプチドの濃度が、 0 . 0 0 0 1 ~ 5 0 重量 % である、記載事項 4 0 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の組成物。
- 5 5 . 農薬組成物である、記載事項 4 0 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の組成物。
- 5 6 . 農芸化学的に適切な基剤及び / 又は 1 種以上の適切なアジュバントをさらに含有する、記載事項 5 5 に記載の組成物。 50

57. 前記真菌が、植物病原性真菌である、記載事項1～39項のいずれか一項に記載のポリペプチド又は記載事項40～56のいずれか一項に記載の組成物。

58. 前記植物病原性真菌の属が、アルテルナリア属 (*Alternaria*)、アスコキタ属 (*Ascochyta*)、ボトリチス属 (*Botrytis*)、セルコスポラ属 (*Cercospora*)、コレトトリカム属 (*Colletotrichum*)、ディプロディア属 (*Diplodia*)、エリシフェ属 (*Erysiphe*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、レプトスフェリア属 (*Leptosphaeria*)、ゲウマノミセス属 (*Gaeumanomyces*)、ヘルミントスポリウム属 (*Helminthosporium*)、マクロフォミナ属 (*Macrophoma*)、ネクトリア属 (*Nectria*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ペロノスポラ属 (*Peronospora*)、フォーマ属 (*Phoma*)、フィマトトリカム属 (*Phymatotrichum*)、フィトフトラ属 (*Phytophthora*)、プラズモパラ属 (*Plasmopara*)、ポドスフェラ属 (*Podosphaera*)、プッチニア属 (*Puccinia*)、プレノフォラ属 (*Pyrenophora*)、ピリクラリア属 (*Pyricularia*)、ピシウム属 (*Pythium*)、リゾクトニア属 (*Rhizoctonia*)、スクレロチウム属 (*Scerotium*)、スクレロチニア属 (*Sclerotinia*)、セプトリア属 (*Septoria*)、チエラビオプシス属 (*Thielaviopsis*)、ウンシヌラ属 (*Uncinula*)、ベンチュリア属 (*Venturia*)、バーティシリウム属 (*Verticillium*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ブルメリア属 (*Blumeria*)、ミコスフェレラ属 (*Mycosphaerella*)、ウスチラゴ属 (*Ustilago*)、メラムプソラ属 (*Melampsora*)、ファコブソラ属 (*Phakospora*)、モニリニア属 (*Monilinia*)、ムコール属 (*Mucor*)、リゾプス属 (*Rhizopus*)、及びアスペルギルス属 (*Aspergillus*)を含む群から選択される、記載事項57に記載のポリペプチド又は組成物。

10

20

59. 少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号1～51若しくは101～111のいずれか1種に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

30

60. 少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号52に記載のアミノ酸配列を有するCDR1領域と、配列番号68に記載のアミノ酸配列を有するCDR2領域と、配列番号84に記載のアミノ酸配列を有するCDR3領域を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

61. 少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号53に記載のアミノ酸配列を有するCDR1領域と、配列番号69に記載のアミノ酸配列を有するCDR2領域と、配列番号85に記載のアミノ酸配列を有するCDR3領域を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

40

62. 少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号54に記載のアミノ酸配列を有するCDR1領域と、配列番号70に記載のアミノ酸配列を有するCDR2領域と、配列番号86に記載のアミノ酸配列を有するCDR3領域を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

63. 抗真菌剤として使用するための、記載事項40～62のいずれか一項に記載の組成物。

64. 抗真菌剤として使用するための、記載事項1～39、57又は58のいずれか一項に記載のポリペプチド。

65. 抗真菌剤としての、記載事項40～62のいずれか一項に記載の組成物又は記載事

50



項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

6 6 . 植物の抗真菌剤としての、記載事項 6 5 に記載の使用。

6 7 . 植物又は前記植物の一部を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための方法であって、前記植物又は前記植物の一部を前記植物病原性真菌による前記感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で、記載事項 4 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の組成物又は記載事項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドを前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む、前記方法。

6 8 . 収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための収穫後処置方法であって、前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を前記植物病原性真菌による前記感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で、記載事項 4 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の組成物又は記載事項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドを前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む、前記方法。

10

6 9 . 植物病原性真菌の成長を阻害する又は植物病原性真菌を殺傷する方法であって、記載事項 4 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の組成物又は記載事項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドを植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む、前記方法。

7 0 . 記載事項 4 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

7 1 . 真菌と特異的に結合する及び / 又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドの作製方法であって、真菌標的又は真菌標的に基づく若しくは由来する適切な抗原決定基（例えば、その抗原部分、その断片、その領域、そのドメイン、そのループ又は他のそのエpitep）を動物に免疫する工程と；ポリペプチド配列を発現する細胞収集物又はサンプルを前記免疫動物から取得する工程と；前記真菌標的と結合する及び / 又は前記真菌標的に対して親和性を有するアミノ酸配列を発現する細胞について、前記細胞収集物又はサンプルをスクリーニングする工程と；( i ) 前記アミノ酸配列を単離する工程、又は ( i i ) 前記アミノ酸配列をコードする核酸配列を前記細胞収集物若しくはサンプルから単離する工程と；前記アミノ酸配列を発現させる工程を含み、それにより、真菌と特異的に結合する及び / 又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドを作製する、前記方法。

20

7 2 . 前記真菌標的が、記載事項 6 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法により取得される又は取得可能な脂質含有画分である、記載事項 7 1 に記載の方法。

30

7 3 . 前記真菌標的が、ボトリチス・シネレアの細胞膜の脂質含有画分であり、前記脂質含有画分が、ボトリチス・シネレアの菌糸を全脂質抽出物薄層クロマトグラフィーにより分画する工程と、保持係数 ( R f ) がセラミド画分よりも大きく且つ非極性リン脂質画分よりも小さい画分を選択する工程とを含む方法により取得可能である、記載事項 7 1 に記載の方法。

7 4 . 抗真菌組成物の製造方法であって、記載事項 7 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の方法に従って抗真菌ポリペプチドを作製する工程と、前記抗真菌ポリペプチドに 1 種以上の適切な基剤及び / 又は 1 種以上の適切なアジュバントを組み合わせる工程とを含む、前記方法。

7 5 . 記載事項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物部分、種子又は植物細胞。

40

7 6 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。

7 7 . 少なくとも 1 種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号 5 2 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 1 領域と、配列番号 6 8 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 2 領域と、配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を有する C D R 3 領域を含み、前記ポリペプチドが、真菌と結合することが可能である、前記組成物。

7 8 . 前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、抗体又はその機能的断片である、記載事項

50

76又は77に記載の組成物。

79．前記少なくとも1種のポリペプチドが、抗体の重鎖可変ドメイン（ $V_H$ 又は $V_{HH}$ ）又はその機能的断片である、記載事項76～78のいずれか一項に記載の組成物。

80．前記少なくとも1種のポリペプチドが、前記真菌の少なくとも1種の細胞膜成分と特異的に結合する、記載事項76～79のいずれか一項に記載の組成物。

81．前記組成物における前記少なくとも1種のポリペプチドの濃度が、0.0001～50重量%である、記載事項76～80のいずれか一項に記載の組成物。

82．農薬組成物である、記載事項76～81のいずれか一項に記載の組成物。

83．農芸化学的に適切な基剤及び/又は1種以上の適切なアジュバントをさらに含有する、記載事項82に記載の組成物。

84．前記真菌が、植物病原性真菌である、上記記載事項のいずれか一項に記載の組成物又はポリペプチド。

85．前記植物病原性真菌の属が、アルテルナリア属（*Alternaria*）、アスコキタ属（*Ascochyta*）、ボトリチス属（*Botrytis*）、セルコスポラ属（*Cercospora*）、コレトトリカム属（*Colletotrichum*）、ディプロディア属（*Diplodia*）、エリシフェ属（*Erysiphe*）、フザリウム属（*Fusarium*）、レプトスフェリア属（*Leptosphaeria*）、ゲウマノミセス属（*Gaeumannomyces*）、ヘルミントスポリウム属（*Helminthosporium*）、マクロフォミナ属（*Macrophoma*）、ネクトリア属（*Nectria*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）、ペロノスポラ属（*Peronospora*）、フォーマ属（*Phoma*）、フィマトトリカム属（*Phymatotrichum*）、フィトフトラ属（*Phytophthora*）、プラズモパラ属（*Plasmopara*）、ポドスフェラ属（*Podosphaera*）、プッチニア属（*Puccinia*）、ピレノフォラ属（*Pyrenophora*）、ピリクラリア属（*Pyricularia*）、ピシウム属（*Pythium*）、リゾクトニア属（*Rhizoctonia*）、スクレロチウム属（*Scerotium*）、スクレロチニア属（*Sclerotinia*）、セプトリア属（*Septoria*）、チエラビオプシス属（*Thielaviopsis*）、ウンシヌラ属（*Uncinula*）、ベンチュリア属（*Venturia*）、バーティシリウム属（*Verticillium*）、マグナポルテ属（*Magnaporthe*）、ブルメリア属（*Blumeria*）、ミコスフェレラ属（*Mycosphaerella*）、ウスチラゴ属（*Ustilago*）、メラムプソラ属（*Melampsora*）、ファコブソラ属（*Phakospora*）、モニリニア属（*Monilinia*）、ムコール属（*Mucor*）、リゾプス属（*Rhizopus*）、及びアスペルギルス属（*Aspergillus*）を含む群から選択される、記載事項84に記載の組成物又はポリペプチド。

86．少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号1若しくは配列番号2に記載のアミノ酸配列又はそのいずれかに対して少なくとも約80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

87．少なくとも1種のポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドが、配列番号52に記載のアミノ酸配列を有するCDR1領域と、配列番号68に記載のアミノ酸配列を有するCDR2領域と、配列番号84に記載のアミノ酸配列を有するCDR3領域を含み、前記ポリペプチドが、抗真菌剤として使用するために真菌と結合することが可能である、前記組成物。

88．抗真菌剤としての、記載事項76～87のいずれか一項に記載の組成物の使用。

89．植物の抗真菌剤としての、記載事項88に記載の使用。

90．植物又は植物の一部を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための方法であって、前記植物又は前記植物の一部を前記植物病原性真菌による前記感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で、記載事項76～87のいずれか一項に記載の組成物を前記植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む

10

20

30

40

50

、前記方法。

91．収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を植物病原性真菌による感染に対して保護又は処置するための収穫後処置方法であって、前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分を前記植物病原性真菌による前記感染に対して保護又は処置するために有効な条件下で、記載事項76～87のいずれか一項に記載の組成物を前記収穫した植物又は前記植物の収穫した部分に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む、前記方法。

92．植物病原性真菌の成長を阻害する又は植物病原性真菌を殺傷する方法であって、記載事項76～87のいずれか一項に記載の組成物を植物又は前記植物の一部に直接又は間接的に施用する工程を少なくとも含む、前記方法。

93．記載事項76～87のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

94．真菌と特異的に結合する及び／又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドの作製方法であって、真菌標的又は真菌標的に基づく若しくは由来する適切な抗原決定基（例えば、その抗原部分、その断片、その領域、そのドメイン、そのループ又は他のそのエピトープ）を動物に免疫する工程と；ポリペプチド配列を発現する細胞収集物又はサンプルを前記免疫動物から取得する工程と；前記植物有害生物標的と結合する及び／又は前記標的に対して親和性を有するアミノ酸配列を発現する細胞について、前記細胞収集物又はサンプルをスクリーニングする工程と；(i)前記アミノ酸配列を単離する工程、又は(ii)前記アミノ酸配列をコードする核酸配列を前記細胞収集物若しくはサンプルから単離する工程と；前記アミノ酸配列を発現させる工程とを含み、それにより、真菌と特異的に結合する及び／又は真菌に対して親和性を有するポリペプチドを作製する、前記方法。

20

95．抗真菌組成物の製造方法であって、記載事項94に記載の方法に従って抗真菌ポリペプチドを作製する工程と；前記抗真菌ポリペプチドに1種以上の適切な基剤及び／又は1種以上の適切なアジュバントを組み合わせる工程とを含む、前記方法。

96．記載事項76～87のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物、植物部分、種子又は植物細胞。

97．記載事項1～39のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸。

98．記載事項97に記載の核酸を含むベクター又はプラスミド。

99．記載事項98に記載のベクター又はプラスミドを含む宿主細胞。

100．ポリペプチドの生産方法であって、前記ベクター又はプラスミドの発現を誘導するための条件下で記載事項99に記載の宿主細胞を培養する工程と、任意選択的に、前記培養培地又は発酵ブロスから前記ポリペプチドを単離する工程とを含む、前記方法。

30

40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】

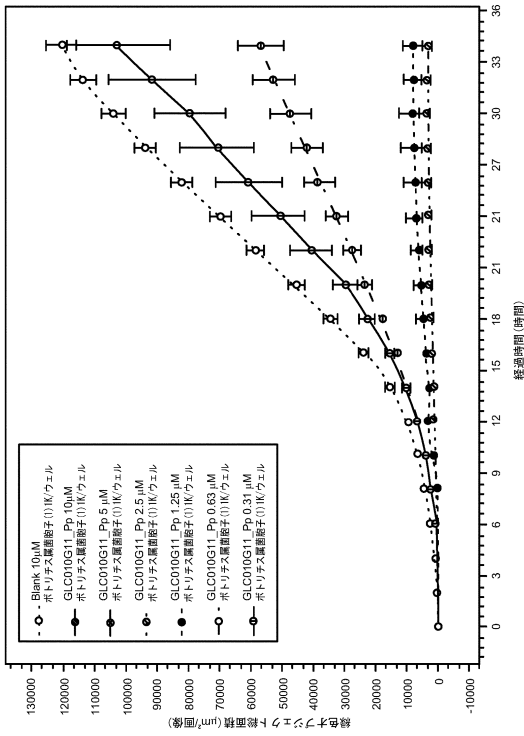


FIG. 1

【 図 2 】

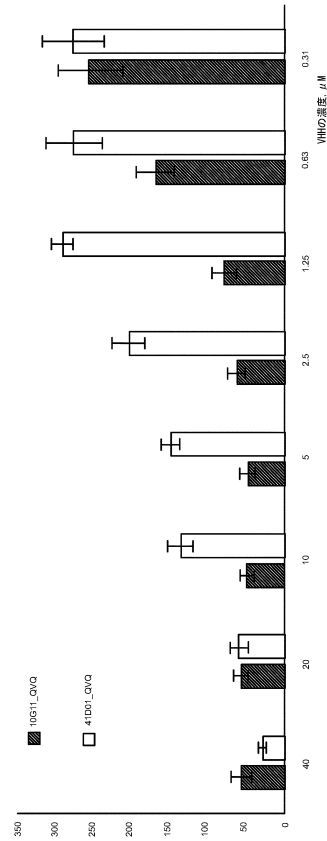


FIG. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

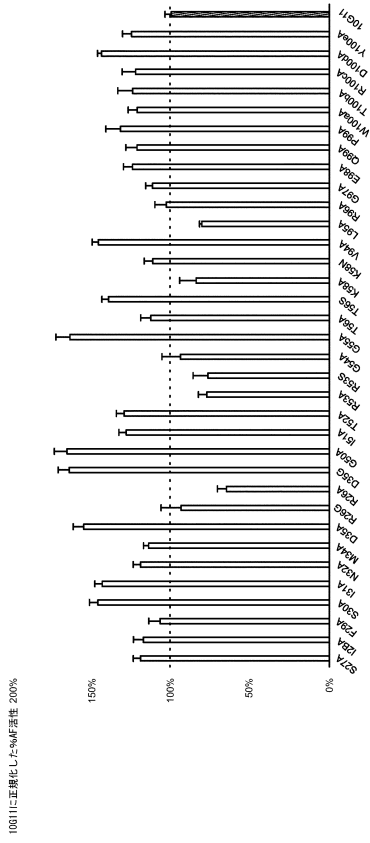


FIG. 3

【 図 4 】

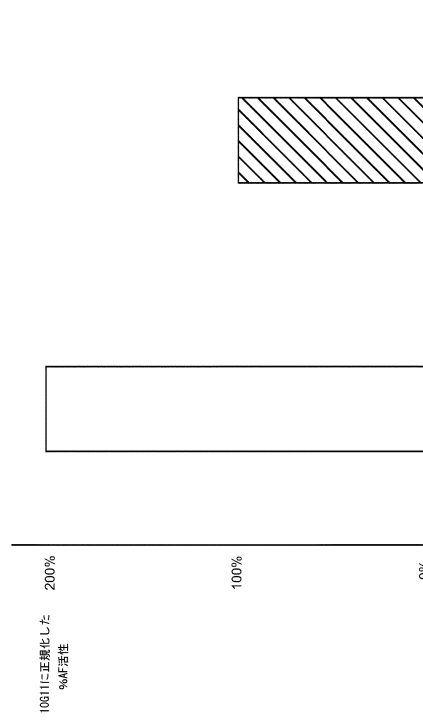


FIG. 4

10

20

【 図 5 】

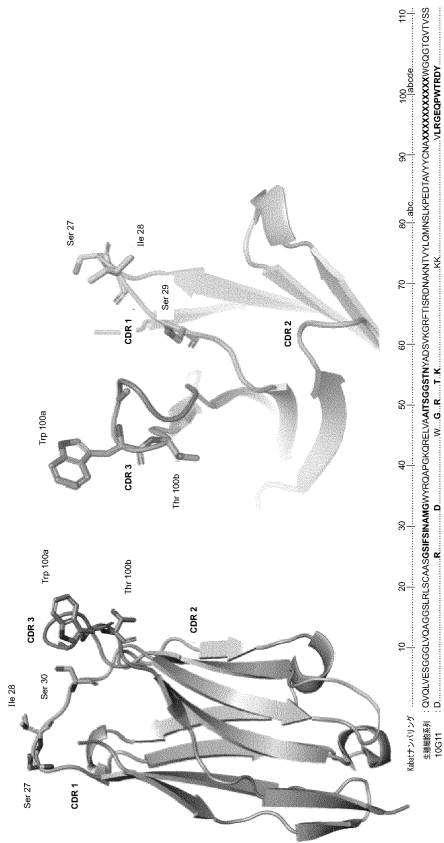


FIG. 5

【 図 6 】

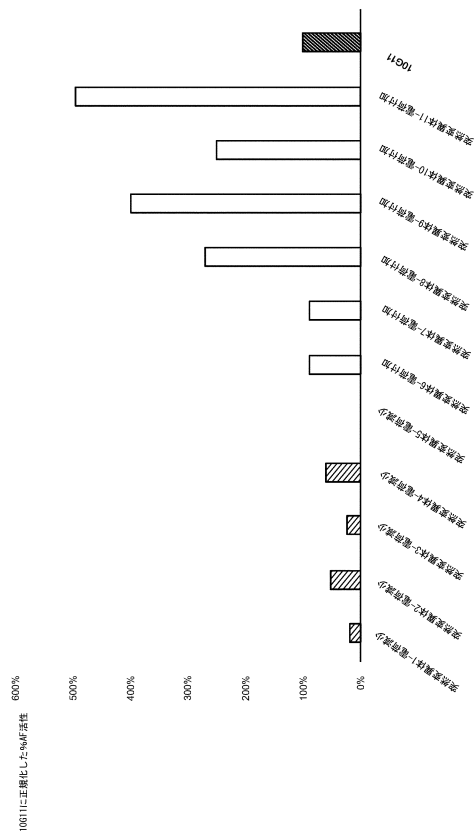


FIG. 6

30

40

50



【 図 1 1 】

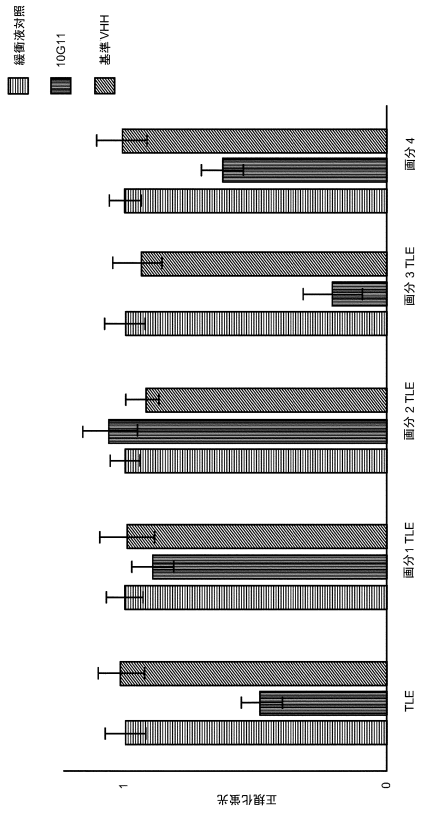


FIG. 11

【 図 1 2 】

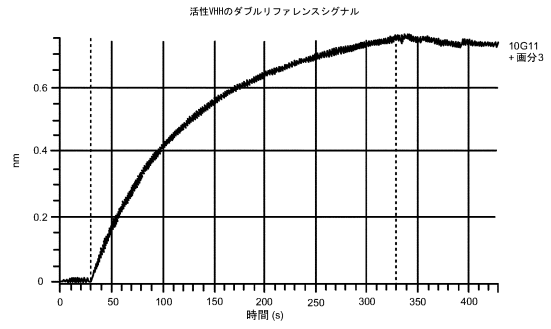
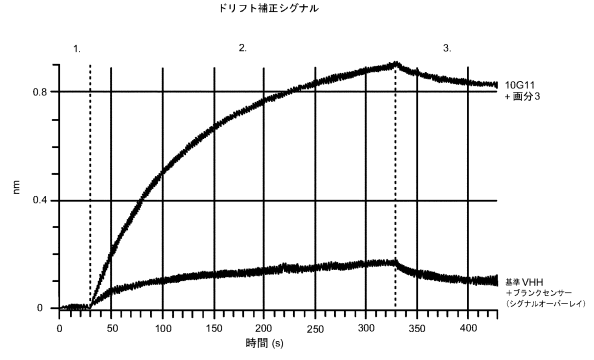


FIG. 12

【 図 1 3 】

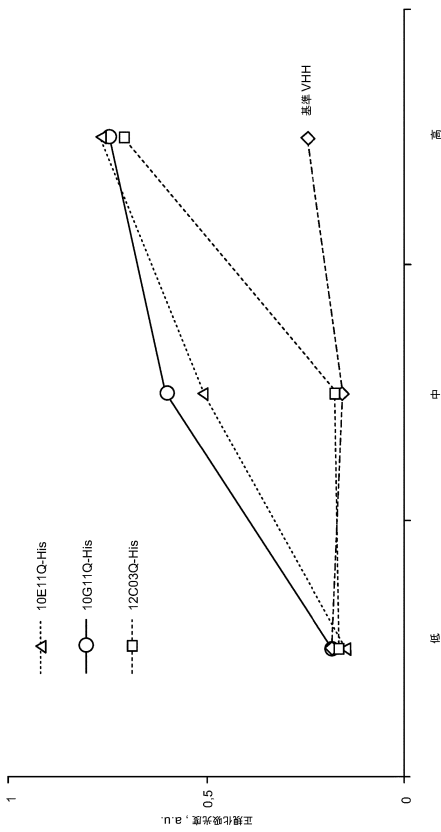


FIG. 13

【 図 1 4 】

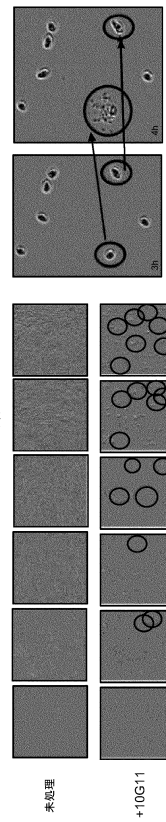


FIG. 14

10

20

30

40

50

【 図 1 5 】

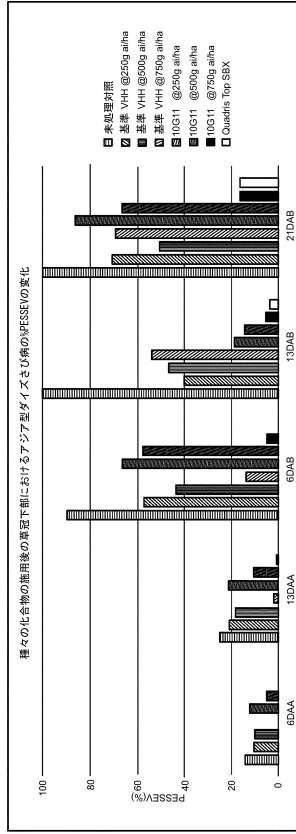


FIG. 15

【 図 1 6 】

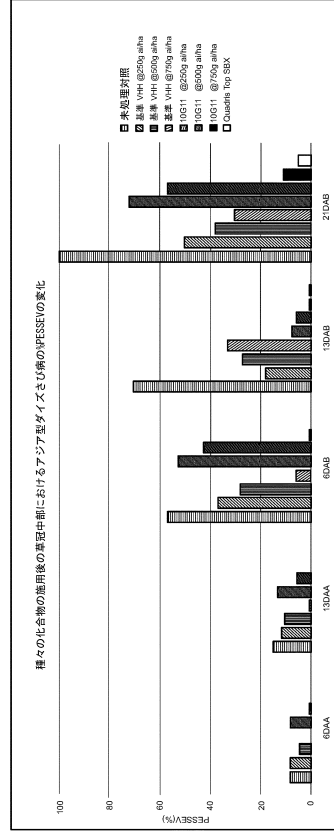


FIG. 16

10

20

【 図 1 7 】

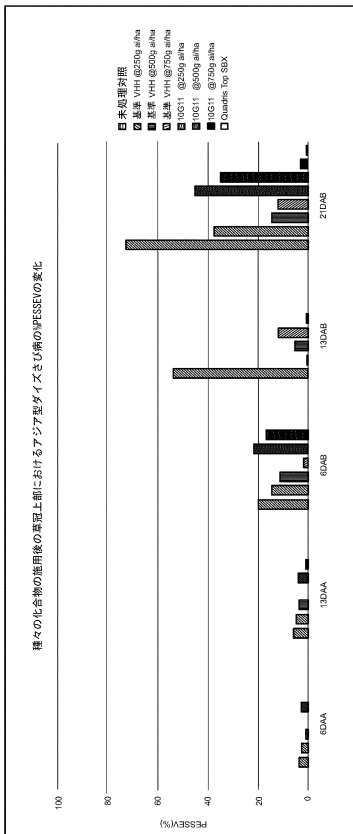


FIG. 17

【 図 1 8 】

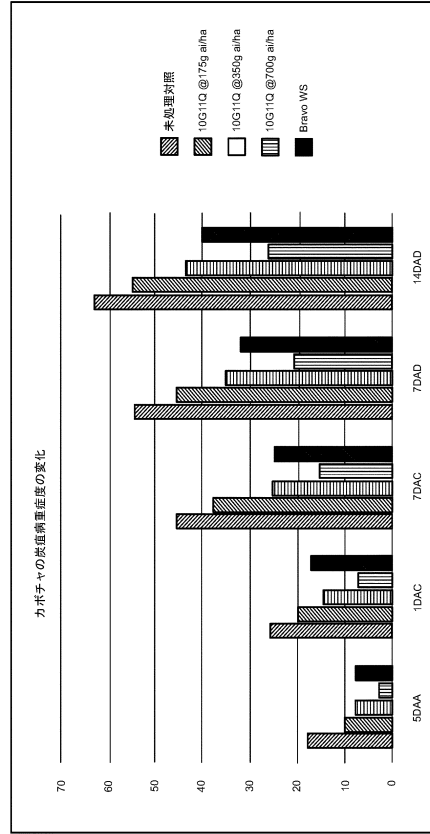


FIG. 18

30

40

50



【 図 19 】

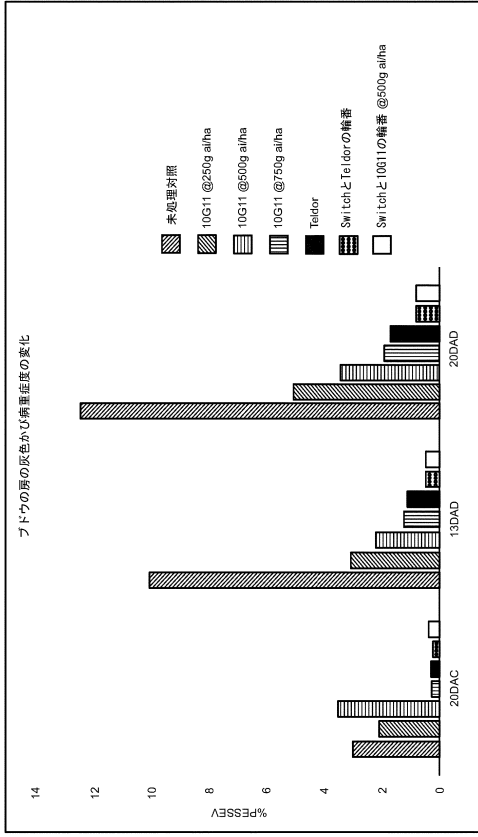


FIG. 19

【 図 20 】

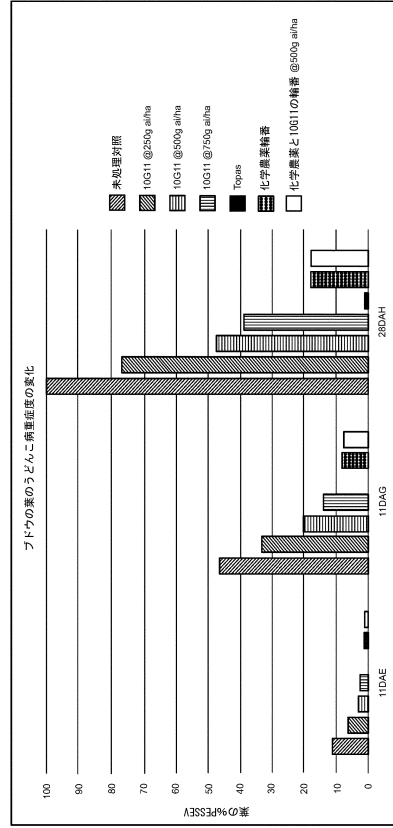


FIG. 20

10

20

【 図 21 】

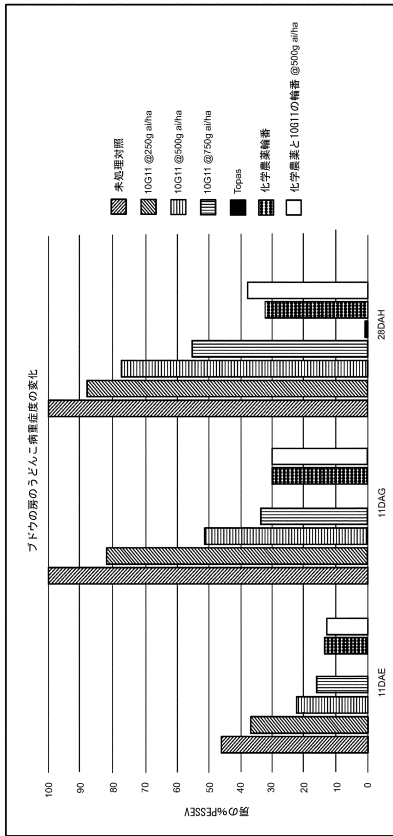


FIG. 21

【 図 22 】

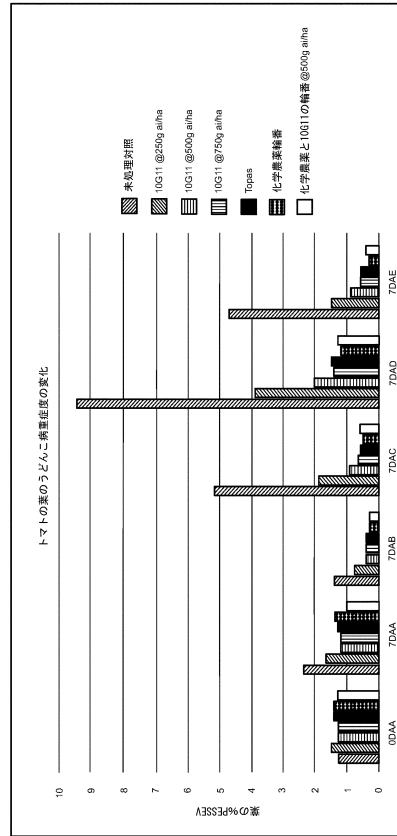


FIG. 22

30

40

50

【 図 2 3 】

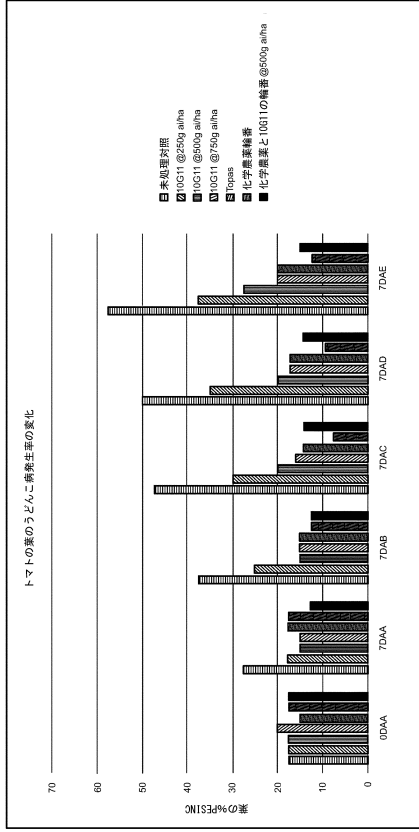


FIG. 23

【 図 2 4 】

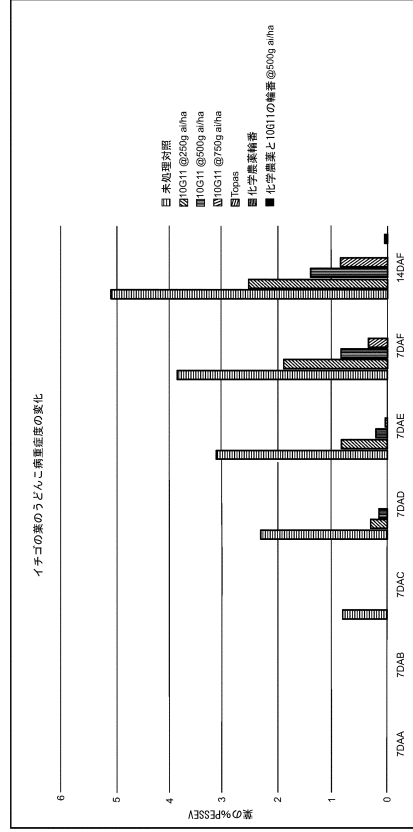


FIG. 24

10

20

【 図 2 5 】

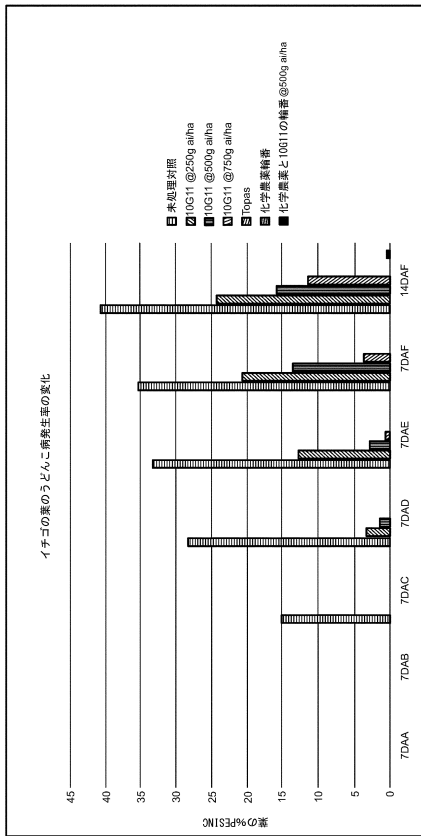


FIG. 25

【 図 2 6 】

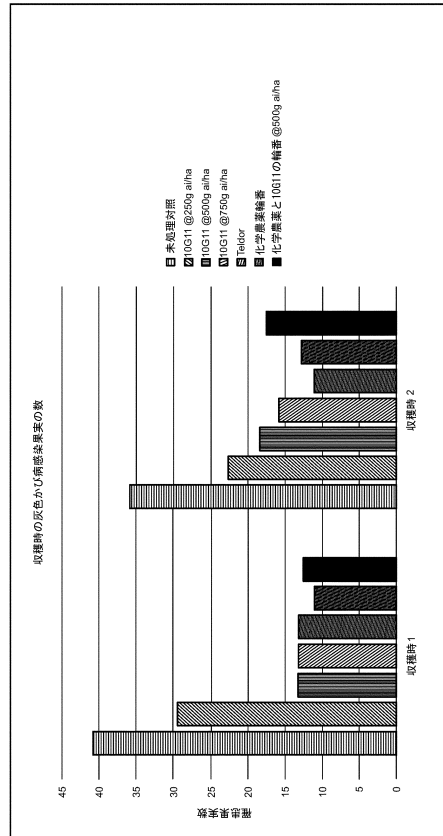


FIG. 26

30

40

50

【 図 27 】

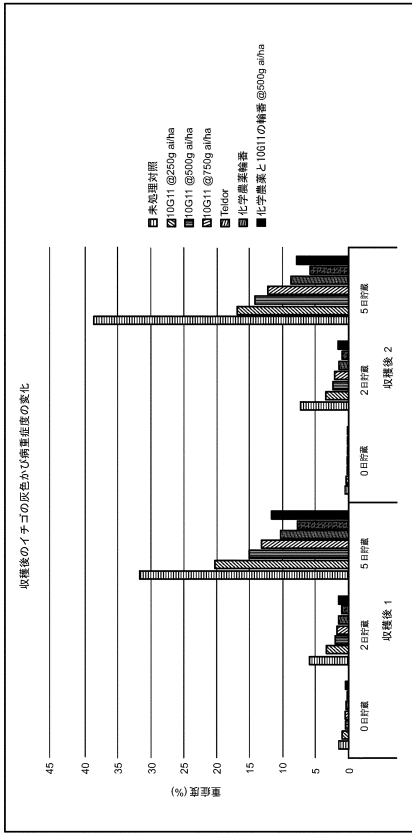


FIG. 27

【 図 28 】

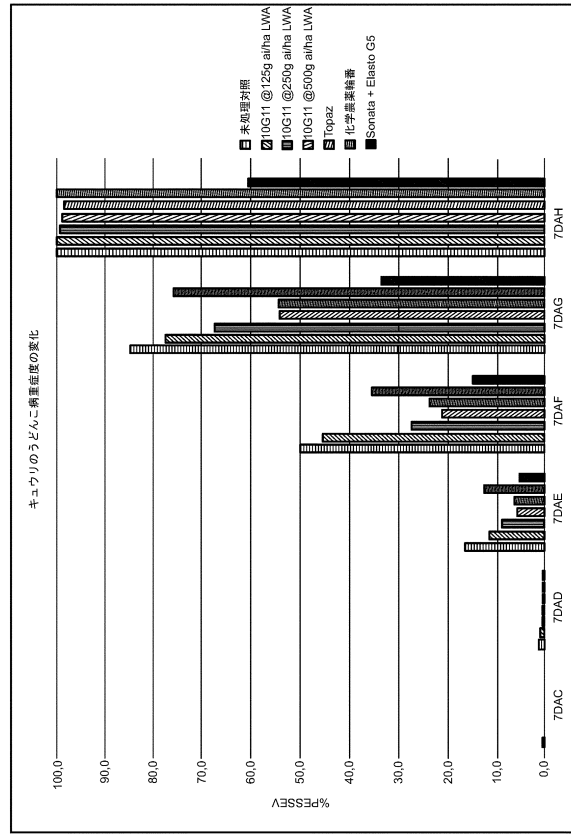


FIG. 28

【 図 29 】

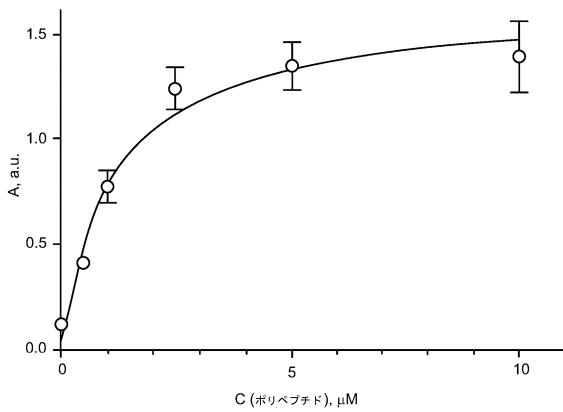


FIG. 29

【 図 30 - 1 】

配列番号	名称	配列	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	UG11.0	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
2	UG11	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
3	UG11.0	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
4	UG11	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
5	12C03.0	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
6	12C03	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
7	突然変異体1	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
8	突然変異体2	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
9	突然変異体3	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
10	突然変異体4	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
11	突然変異体5	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
12	突然変異体6	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
13	突然変異体7	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
14	突然変異体8	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
15	突然変異体9	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
16	突然変異体10	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							
17	突然変異体11	DVQLTSSGGEVLVQSSSLALSCASISLTIAMDMWFRQAPGQSEHWAGLTSGETTKVAISTVSGFTTSRNNAKKEVTLQMSLAFEDAVYICVLAGSDPFDLWGGQFTVTS							

FIG. 30

10

20

30

40

50



【 図 3 1 】

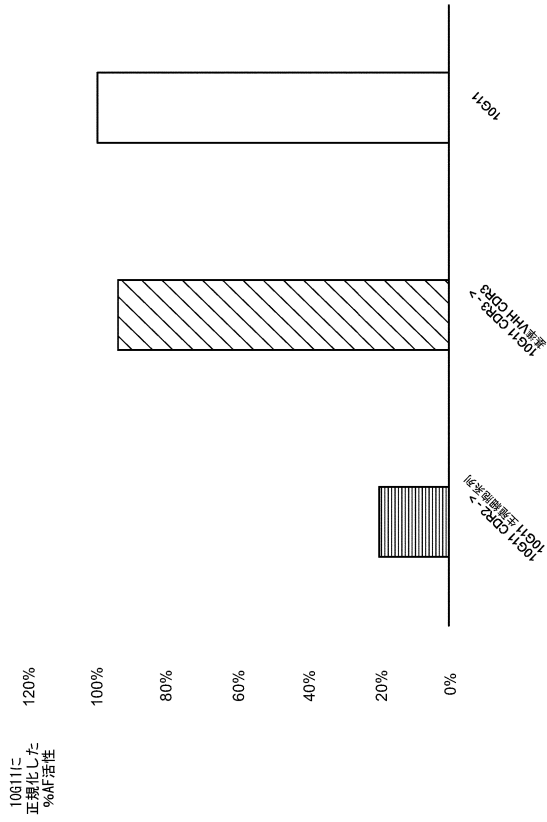


FIG. 31

10

20

【 配列表 】

2023519975000001.app

30

40

50



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2021/058548

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	A01N37/46 A01N63/10 A01N63/50 A61P31/10 C07K16/14 C12N15/82	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01N A61P C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/177595 A1 (AGROSAVFE N V [BE]) 6 November 2014 (2014-11-06) cited in the application page 1 - page 2; claims 1-15; figure 1; examples 1-5; sequences 10, 20, 35 page 57 - page 59 -----	1-33
X	WO 2016/071438 A2 (AGROSAVFE NV [BE]) 12 May 2016 (2016-05-12) page 1; figure 1; examples 1-5; sequences 11, 36 page 71 - page 76 -----	1-33
A	WO 2009/068627 A2 (ABLYNX NV [BE]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOTT [BE] ET AL.) 4 June 2009 (2009-06-04) sequence 2094 ----- -/--	5,6,20, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 9 September 2021		Date of mailing of the international search report 15/09/2021
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 Oderwald, Harald

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2021/058548
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/074498 A1 (NANJING LEGEND BIOTECH CO LTD [CN]; CHOU CHUAN CHU [US]) 18 April 2019 (2019-04-18) sequence 142	5,6,20, 21
A	----- LEONARDO NIMRICHTER ET AL: "Fungal Glucosylceramides: From Structural Components to Biologically Active Targets of New Antimicrobials", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 2, January 2011 (2011-01), XP055132483, ISSN: 1664-302X, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00212 the whole document	1-5
A	----- WARD E S ET AL: "BINDING ACTIVITIES OF A REPERTOIRE OF SINGLE IMMUNOGLOBULIN VARIABLE DOMAINS SECRETED FROM ESCHERICHIA COLI", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 341, no. 6242, 12 October 1989 (1989-10-12), pages 544-546, XP000086104, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/341544A0 the whole document	1-5
A	----- FOLCH J ET AL: "A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 224, January 1957 (1957-01), pages 497-509, XP009011060, ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-5,13, 31

10

20

30

40

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/EP2021/058548

**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 13ter.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 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/EP2021/058548

**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).

10

20

**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:

see additional sheet

- 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 an 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.:  
**6-8, 21-23, 30-32(completely); 1-5, 9-20, 24-29, 33(partially)**
  
- 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.:

30

40

**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.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

10

- 1. claims: 6, 21(completely); 1-5, 9-20, 24-29, 33(partially)

Composition comprising at least one polypeptide, which polypeptide is capable of binding to a fungus or to a lipid-containing fraction of the plasma membrane of Botrytis cinerea, thereby causing retardation of growth of a spore of the said fungus and/or lysis of a spore of the fungus wherein the polypeptide comprises the amino acid set out in SEQ ID NO: 1 (10G11Q) or 2 (10G11) comprising a CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID NO: 52, 68 and 84, respectively. Said compositions for use as an anti-fungal agent. Use of said compositions as an anti-fungal agent. Related method for protecting or treating a plant, post-harvest treatment method, method of inhibiting or killing the growth of a plant pathogenic fungus. Said polypeptide per se, transgenic plant comprising a nucleic acid encoding said polypeptide.

---

20

- 2. claims: 7, 22(completely); 1-5, 9-20, 24-29, 33(partially)

Composition comprising at least one polypeptide, which polypeptide is capable of binding to a fungus or to a lipid-containing fraction of the plasma membrane of Botrytis cinerea, thereby causing retardation of growth of a spore of the said fungus and/or lysis of a spore of the fungus wherein the polypeptide comprises the amino acid set out in SEQ ID NO: 3 (10E11Q) or 4 (10E11) comprising a CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID NO: 53, 69 and 85, respectively. Said compositions for use as an anti-fungal agent. Use of said compositions as an anti-fungal agent. Related method for protecting or treating a plant, post-harvest treatment method, method of inhibiting or killing the growth of a plant pathogenic fungus. Said polypeptide per se, transgenic plant comprising a nucleic acid encoding said polypeptide.

---

30

- 3. claims: 8, 23(completely); 1-5, 9-20, 24-29, 33(partially)

Composition comprising at least one polypeptide, which polypeptide is capable of binding to a fungus or to a lipid-containing fraction of the plasma membrane of Botrytis cinerea, thereby causing retardation of growth of a spore of the said fungus and/or lysis of a spore of the fungus wherein the polypeptide comprises the amino acid set out in SEQ ID NO: 5 (12C03Q) or 6 (12C03) comprising a CDR1, CDR2 and CDR3 of SEQ ID NO: 54, 70 and 86, respectively. Said compositions for use as an anti-fungal agent. Use of said compositions as an anti-fungal agent. Related method for protecting or treating a plant, post-harvest treatment method, method of inhibiting or killing the growth of a plant pathogenic fungus. Said polypeptide per se, transgenic plant comprising a nucleic acid encoding said polypeptide.

40

International Application No. PCT/ EP2021/ 058548

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

4-14. claims: 1-5, 9-20, 24-29, 33(all partially) 10

same as invention 1, but relating to a "Mutant" in the order given in Table 9, i.e. invention 4 pertains to "Mutant 1" (SEQ ID NO: 7, with CDRs in SEQ ID NOs: 55, 68 and 84), ..., and invention 14 pertains to "Mutant 11" (SEQ ID NO: 17, with CDRs in SEQ ID NOs: 57, 68 and 89).

---

15-48. claims: 1-5, 9-20, 24-29, 33(all partially) 20

same as invention 1, but relating to a "Single ALA mutant" in the order given in Table 9, i.e. invention 15 pertains to "Single ALA Mutant 1" (SEQ ID NO: 18, with CDRs in SEQ ID NOs: 58, 68 and 84), ..., and invention 48 pertains to "Single ALA Mutant 34" (SEQ ID NO: 51, with CDRs in SEQ ID NOs: 52, 68 and 100).

---

49-59. claims: 1-5, 9-20, 24-29, 33(all partially)

same as invention 1, but relating to a "10G11" variant in the order given in Table 9, i.e. invention 49 pertains to "10G11-A" (SEQ ID NO: 101, with CDRs in SEQ ID NOs: 112, 123 and 134), ..., and invention 59 pertains to "10G11-K" (SEQ ID NO: 111, with CDRs in SEQ ID NOs: 122, 133 and 144).

---

60. claims: 30-32 30

A method for the preparation of a polypeptide which specifically binds to and/or has affinity to a fungus which comprises immunizing an animal with a fungal target. A method for the preparation of an anti-fungal composition.

---

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/058548

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014177595 A1	06-11-2014	AU 2014261434 A1	12-11-2015
		AU 2014273418 A1	05-11-2015
		AU 2020205327 A1	06-08-2020
		BR 112015027430 A2	25-07-2017
		CA 2910632 A1	04-12-2014
		CA 2910874 A1	06-11-2014
		CN 105358698 A	24-02-2016
		CN 105358699 A	24-02-2016
		DK 2992100 T3	09-12-2019
		EP 2992100 A1	09-03-2016
		EP 2992101 A1	09-03-2016
		EP 3597758 A1	22-01-2020
		ES 2703192 T3	07-03-2019
		ES 2762151 T3	22-05-2020
		HR P20192182 T1	21-02-2020
		HU E047580 T2	28-05-2020
		JP 6388917 B2	12-09-2018
		JP 6720252 B2	08-07-2020
		JP 2016522186 A	28-07-2016
		JP 2016526015 A	01-09-2016
		JP 2019014715 A	31-01-2019
		JP 2019178136 A	17-10-2019
		PL 2992100 T3	30-04-2020
		PL 2992101 T3	31-05-2019
		PT 2992100 T	16-12-2019
		TR 201819577 T4	21-01-2019
		US 2016075769 A1	17-03-2016
		US 2016145325 A1	26-05-2016
		US 2018022791 A1	25-01-2018
		US 2019352379 A1	21-11-2019
		US 2021253677 A1	19-08-2021
		WO 2014177595 A1	06-11-2014
		WO 2014191146 A1	04-12-2014
ZA 201507757 B	21-12-2016		
ZA 201507758 B	25-01-2017		
WO 2016071438 A2	12-05-2016	AR 102550 A1	08-03-2017
		BR 112017009330 A2	19-12-2017
		CA 2966548 A1	12-05-2016
		EP 3215624 A2	13-09-2017
		JP 2017536134 A	07-12-2017
		JP 2021061843 A	22-04-2021
		US 2018179551 A1	28-06-2018
		WO 2016071438 A2	12-05-2016
WO 2009068627 A2	04-06-2009	AU 2008328779 A1	04-06-2009
		AU 2008328781 A1	04-06-2009
		AU 2008328784 A1	04-06-2009
		AU 2008328785 A1	04-06-2009
		BR PI0819656 A2	23-06-2015
		CA 2705890 A1	04-06-2009
		CA 2706200 A1	04-06-2009
		CA 2706425 A1	04-06-2009
		CA 2706675 A1	04-06-2009
		CN 101970490 A	09-02-2011
		EP 2215123 A1	11-08-2010
		EP 2215125 A1	11-08-2010
		EP 2220120 A2	25-08-2010

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/058548

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		EP 2225278 A2	08-09-2010	
		EP 2650311 A2	16-10-2013	
		JP 2011504740 A	17-02-2011	
		KR 20100097716 A	03-09-2010	
		US 2011028695 A1	03-02-2011	
		US 2011053865 A1	03-03-2011	
		US 2011059090 A1	10-03-2011	
		US 2011189203 A1	04-08-2011	
		US 2015232562 A1	20-08-2015	
		WO 2009068625 A2	04-06-2009	
		WO 2009068627 A2	04-06-2009	
		WO 2009068628 A1	04-06-2009	
		WO 2009068630 A1	04-06-2009	
		WO 2009068631 A1	04-06-2009	
		ZA 201004057 B	28-04-2011	
-----				
WO 2019074498	A1	18-04-2019	AU 2017435322 A1	30-04-2020
			CN 111526887 A	11-08-2020
			EP 3694550 A1	19-08-2020
			JP 2021508314 A	04-03-2021
			SG 11202002873X A	29-04-2020
			WO 2019074498 A1	18-04-2019
-----				

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 A 0 1 H 1/00 (2006.01)  
 A 0 1 N 63/50 (2020.01)  
 A 0 1 N 63/30 (2020.01)  
 A 0 1 P 3/00 (2006.01)  
 A 2 3 B 7/154(2006.01)  
 C 1 2 N 5/04 (2006.01)  
 C 0 7 K 1/22 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)  
 A 0 1 H 5/10 (2018.01)  
 A 0 1 H 6/00 (2018.01)

## F I

C 1 2 N 1/21  
 A 0 1 H 1/00  
 A 0 1 N 63/50  
 A 0 1 N 63/30  
 A 0 1 P 3/00  
 A 2 3 B 7/154  
 C 1 2 N 5/04  
 C 0 7 K 1/22  
 C 1 2 N 15/13  
 A 0 1 H 5/10  
 A 0 1 H 6/00

## テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

A

,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,D  
 K,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),O  
 A(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,B  
 B,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,IR,IS,IT,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,Z  
 W

ベルギー国、 9 0 5 2 ・ヘント、テクノロジーパーク - ズウェイナルデ・ 9 4、バイオタリス・  
 エン・フェー気付

## (72)発明者

ファン・ダーレ, インヘ・エロディー

ベルギー国、 9 0 5 2 ・ヘント、テクノロジーパーク - ズウェイナルデ・ 9 4、バイオタリス・  
 エン・フェー気付

## Fターム (参考)

2B030 AA02 AA03 AB03 AD04 CA15  
 4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA11  
 4B065 AA60X AA66X AA67X AA88X AA88Y AB01 AC14 BA02 CA53  
 4B169 KA01 KC38  
 4H011 AA01 AA03 BB21  
 4H045 AA10 AA30 BA09 CA30 DA76 EA05 FA74