(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-502363
(P2021-502363A)
(43)公表日　令和3年1月28日(2021.1.28)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	4C084
A61P 1/04	(2006.01)	A61P	1/04	4H045
A61P 11/00	(2006.01)	A61P	11/00	
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00	
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 75 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-524879 (P2020-524879)
(86)(22)出願日　平成30年11月9日 (2018.11.9)
(85)翻訳文提出日　令和2年6月26日 (2020.6.26)
(86)国際出願番号　PCT/EP2018/080814
(87)国際公開番号　WO2019/092201
(87)国際公開日　令和1年5月16日 (2019.5.16)
(31)優先権主張番号　17201002.7
(32)優先日　平成29年11月10日 (2017.11.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　518260585
ディフェンシン　セラピューティクス　エーピーエス
デンマーク国，２２００　コペンハーゲン，オレ　マアロエスヴェジュ　３，コビス内
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡　亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田　直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀　明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好　玲奈

最終頁に続く

(54)【発明の名称】早期産児における粘膜抵抗力および腸／肺機能の成熟

(57)【要約】
本発明は、早期産児または早期産児を出産しようとしている母親における、粘膜抵抗力を成熟させ、免疫系をリバランスしてサイトカインストームを防止する方法；新生児敗血症、壊死性腸炎、急性および持続性の下痢、短腸症候群、呼吸器疾病、呼吸器感染、呼吸不全、神経発生障害、および子宮外発育不全の処置または予防の方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、およびリゾチーム、ならびに／またはＧＬＰ－２もしくはＧＬＰ－２アナログから選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドの経口および／もしくは肺内および／もしくは皮下への投与を含む、方法に関する。
【選択図】図４１

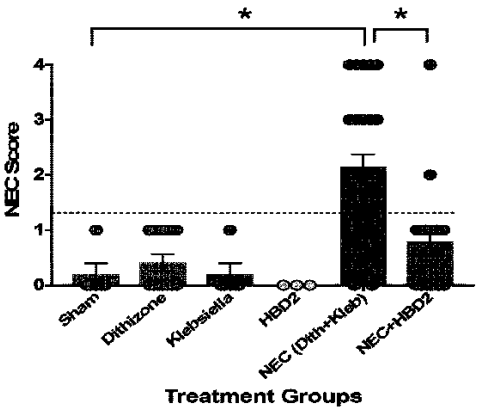


Fig 41

【特許請求の範囲】
【請求項１】
早期産児の腸および／または肺における粘膜障害を予防するまたは処置するための方法であって、β－ディフェンシンおよびα－ディフェンシンからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児にまたは早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法。
【請求項２】
前記粘膜障害が腸に存在しかつ壊死性腸炎、急性および持続性の下痢、ならびに短腸症候群からなる群から選択され、好ましくは壊死性腸炎である、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３】
前記粘膜障害が肺に存在しかつ呼吸器疾病、肺炎症、気道感染、呼吸不全、肺炎、閉塞性無呼吸、気管支肺異形成、呼吸急迫症候群、および原発性無気肺からなる群から選択される、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４】
前記β－ディフェンシンおよびα－ディフェンシンがｈＢＤ－２、短縮ｈＢＤ－２、ｈＢＤ－１、ｈＢＤ－３、ｈＢＤ－４、ＨＤ５、ＨＤ６、ディフェンシンおよびグリコシル化ディフェンシンの断片からなる群から選択される、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記β－ディフェンシンおよびα－ディフェンシンがｈＢＤ－２、短縮ｈＢＤ－２、ｈＢＤ－１、ｈＢＤ－４、ＨＤ５、およびＨＤ６からなる群から選択される、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記β－ディフェンシンおよびα－ディフェンシンがｈＢＤ－２および／またはＨＤ５である、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
前記粘膜障害が壊死性腸炎でありかつ前記ディフェンシンがｈＢＤ２である、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
前記組成物が１つを超える抗菌ペプチド、例えば２つの抗菌ペプチド、例えば３つの抗菌ペプチド、例えば４つの抗菌ペプチド、例えば５つの抗菌ペプチドを含む、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記組成物が２つのディフェンシンを含み、例えばｈＢＤ－２およびＨＤ５を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
前記組成物が医薬組成物である、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記抗菌ペプチドが細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）、アルブミン結合部分（ＡＢＭ）、検出可能部分（Ｚ）、および半減期延長ペプチドからなる群から選択される少なくとも１つの追加の部分をさらに含む、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記追加の部分が半減期延長ペプチドである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
半減期延長ペプチドが新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）、トランスフェリン、アルブミン（ＨＡＳ）、ＸＴＥＮ（登録商標）もしくはＰＥＧ、ホモ－アミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、プロリン－アラニン－セリンポリマー（ＰＡＳ）、またはエラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）、ヒアルロン酸、絨毛性ゴナドトロピン（ＣＧ）β－鎖のカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）などの負電荷の高シアル酸付加ペプチド、ヒトＩｇＧ、およびＣＨ３（ＣＨ２

）$_n$ＣＯ－（式中、ｎは８～２２である）からなる群から選択される化合物に結合できる分子である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記抗菌ペプチドが界面活性物質および／もしくはプレバイオティクスおよび／もしくはプロバイオティクスおよび／もしくはトリプトファン、ならびに／または糖質コルチコイドおよび／もしくは抗生物質および／もしくは免疫抑制薬および／もしくはＧＬＰ－２および／もしくはＧＬＰ－２アナログまたはその任意の組み合わせと組み合わせて投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記抗菌ペプチドが少なくとも隔日、１日１回、例えば少なくとも１日２回、例えば少なくとも１日３回、例えば少なくとも１日４回、例えば少なくとも１日５回または連続的に早期産児に投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
少なくとも１つのディフェンシンが出生日に開始して前記早期産児へ投与される、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
少なくとも１つのディフェンシンが早期産児の出産前に母親に投与される、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
前記投与が経口、口内、舌下、直腸内、膣内、気管内、肺内、鼻腔内、頭蓋内、皮下、静脈内、真皮または経皮である、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記投与が経口である、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
前記投与が肺内、気管内または鼻腔内である、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
前記肺内、気管内または鼻腔内の投与が吸入器、ネブライザー、または気化器による、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記早期産児が１，５００グラム以下、例えば１，０００グラム以下の出生時体重を有する、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２３】
前記請求項のいずれかに記載の処置方法での使用のための抗菌ペプチド。
【請求項２４】
前記請求項のいずれかに記載の処置方法での使用のためのディフェンシンポリペプチド。
【請求項２５】
前記請求項のいずれかに定義の障害の処置での使用のための医薬の製造のためのディフェンシンポリペプチドの使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、腸および肺の微生物叢の成熟および正常化ならびに壊死性腸炎の発生率の減少、粘膜比率の増加、腸絨毛高および杯細胞密度の増加、刷子縁の消化酵素活性の上昇、腸管ミエロペルオキシダーゼ活性の低下；気道過敏症の軽減、肺コンプライアンスの増加、肺炎症の軽減、血管周囲および気管支周囲の炎症の低減、気管支肺胞液中の炎症細胞数の減少、ならびに１つまたは複数の哺乳動物抗菌ペプチド（ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、および／またはリゾチームなど）の投与による

サイトカイン産生の減少を用いた免疫系のリバランシングに基づく、敗血症、呼吸器疾病、壊死性腸炎、短腸症候群、神経発生障害、および子宮外発育不全などの早期出産に関連する合併症を処置または予防する方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

背景

超低出生時体重（ＥＬＢＷ）児（出生時体重１．０００グラム未満）。

出生時に、全ての乳幼児は、生後数日から数週間以内に、母体内の無菌状態での生活から身体の全ての上皮表面（例えば、腸、肺、皮膚）に環境微生物がコロニー形成する環境への劇的な移行に適応しなければならない。この適応には、上皮表面で十分に発達した先天性免疫系を必要とし、それは、無害な微生物または有益な微生物を寛容し有害病原体を排除することを可能にする。正常な妊娠期間、出産過程、妊婦管理、および衛生状態を踏まえた後に、乳幼児は十分に適応するが、それにもかかわらず発達初期の感染症、敗血症、および炎症性障害の有病率は著しく高く、これは、出生時に乳児および小児が劇的な微生物学的および免疫学的な移行に対し非常に感受性が高いことを示す。

【０００３】

全世界における毎年１５００万人の早期出産児のうち、１００万人以上が死亡している（Ｓｔｒｕｎｋ，２０１４）。これらの死亡の多くは、腸、肺、および皮膚の表面における細菌のコロニー形成と戦う能力の未熟さに関連する。感染症は、未熟な肺、皮膚、および腸のバリア機能に関連し、特に、生後数日間からの腸表面に沿った多数の（約１００億個）の細菌に対する耐性が課題である。これらの感染症は肺機能障害を誘発し、病原体／毒素が血流中に移動し、全身に敗血症および炎症反応を引き起こし得る。罹病率は、在胎齢に反比例するが、完全に免除される期間を含む在胎齢は存在しない。ほとんどの器官が未熟であるが、脳および肺は特に早期出産によって生じた結果の影響を受けやすく、これが高い確率の長期間にわたる神経学的問題および健康上の問題をもたらす。ある総説では、ＥＬＢＷ児の半数以上が主に呼吸器疾病の結果として、最初の１～２年のうちに少なくとも１回再入院していた（Ｄｏｙｌｅ，２００３）。超低出生体重（ＶＬＢＷ）児のほとんどの研究は、認知欠損などの続発症の継続、学業不振、落第、ならびに小児期中期および青年期の間のさらなる補習支援の必要性を報告している（Ｓａｉｇａｌ，２００８）。

【０００４】

肺機能

正常な肺の発達は、一連の調整された事象をたどる。早産は、子宮内での正常な肺の発達を妨害し、その結果として、低酸素の子宮内環境から比較的高酸素の環境への早期移行を伴い肺機能および生理学が大きく変化し（Ｃｏｌｉｎ，２０１０）、呼吸急迫症候群、気管支肺異形成、動脈管開存症、および慢性肺疾患に至る。全肺容量は、妊娠後期に急速に変化する。Ｌａｎｇｓｔｏｎ，１９８４による計算は、３０週で肺容量は成熟出生時の最終的な肺容量のわずか３４％であることを明らかにした。先天免疫の未熟さは、感染に対するヒト新生児の感受性の増大に寄与する。肺は、新生児における潜在的な病原体の主な進入路である。アルファディフェンシン、ベータディフェンシン、およびカテリシジンは、肺の先天免疫に関与する。新生児発達における抗菌ペプチドの役割を説明している研究はほとんど存在しないが、Ｔｉｒｏｎｅ，２０１０は、早期産児は在胎齢が３０週以下ですらアルファ－ディフェンシンを産生できることを見出し、Ｓｔａｒｎｅｒ，２０１５は、抗炎症性コルチコステロイドであるデキサメタゾンでの処置がｈＢＤ－２発現の有意な減少をもたらすことを見出した。

【０００５】

感染症および敗血症

感染症は、先天性または後天性であり得る。先天性感染症は、母親の腸内微生物に帰せられる肺炎および絨毛羊膜炎からなる。後天性感染症は、主にカンジダおよび院内微生物に起因する。肺炎に至る羊水の感染は、ＥＬＢＷ児の主な死因である（Ｂａｒｔｏｎ，１９９９）。腸粘膜関門機能の喪失に起因する細菌転位および内毒素血症は、臓器傷害、全

身性炎症、および多臓器不全に関連づけられている。早産児および免疫不全の乳児の腸粘膜関門防御は細菌転位および内毒素血症に対する不完全な保護を示す。胃腸膨満は、早産児における一般的な事象であり、腸関門機能を損ない、それ故に細菌転位を惹起し得る（Ｓｈａｒｍａ，２００７）。敗血症のリスクは、出生時体重および在胎齢と逆相関する。敗血症の乳児は、多くの乳児疾患のリスク、長期入院のリスク、および死亡のリスクが上昇している（Ｓｔｏｌｌ，２００３）。ＥＬＢＷ児では、侵襲性カンジダ症は、神経発生的不良転帰に至る。侵襲性カンジダ症は、超早産児における感染症関連死の２番目に多い原因である。侵襲性カンジダ症は、１．５％のＶＬＢＷ児で認められた。ＣＮＳカンジダ症は調査中であり、診断が困難であるが、非常に不良な転帰の前兆である（Ｂａｒｔｏｎ，２０１４）。抗生物質での以前の処置、中心カテーテルまたは気管内チューブの存在は、侵襲性カンジダ症と強く関連することが見出された（Ｂｅｎｊａｍｉｎ，２０１０）。過去１０年間に、新生児敗血症を予防するかその転帰を改善することを目的としたいくつかの免疫介入（コロニー刺激成長因子および静脈内免疫グロブリンなど）は不成功に終わっている（Ｓｔｒｕｎｋ，２０１４）。

【０００６】

壊死性腸炎（ＮＥＣ）は、全入院早期産児の１～７％が罹患する破滅的な腸炎症性疾患であり、早期産児における２番目に高い死因である（Ａｎａｎｄ，２００７）。この疾患は、細菌の異常増殖、免疫調節不全、および腸管壊死を特徴とし、母体の一般的な疾患および乳汁分泌の欠如に起因する母乳栄養を欠く乳児において特に有病率が高い。ＮＥＣは、先天性免疫系および適応免疫系が未熟な、ストレスを受けた乳幼児において腸管関門の破壊および細菌内毒素の転位後に発症するようである（Ｓｈａｒｍａ，２００７）。ＮＥＣを切り抜けた乳児は、長期合併症、特に、神経発達障害（例えば、脳性麻痺（Ｓｔｒｕｎｋ，２０１４））、ならびに短腸症候群および成長障害（Ｐａｔｅｌ，２０１２）を発症するリスクが高い。体液性メディエーター（炎症促進性サイトカインを含む）は、脳傷害の病理発生における重要なメディエーターである可能性が高い（Ｓｔｒｕｎｋ，２０１４）。

【０００７】

ＮＥＣおよび敗血症は、同時に認められることが多いが、どのようにして腸細菌のコロニー形成不全および免疫障害が細菌転位および早期出産の一般的な合併症（呼吸不全、心血管の異常、免疫障害、ＮＥＣ、および脳機能不全など）と直接関連するかははっきりしない（Ｓａｎｇｉｌｄ，２０１３）。ＮＥＣにおけるディフェンシンの役割は不明である。Ｓａｌｚｍａｎ，１９９８は、ディフェンシン発現およびパネート細胞数が新生児ＮＥＣ患者の腸でより高いことを最初に見出した。Ｐｕｉｍａｎ，２０１１は他方で、小腸でのパネート細胞の存在数が急性ＮＥＣにおいて早産児対照由来と有意に異ならないことを見出した。Ｒｉｃｈｔｅｒ，２０１０は、低い糞便ｈＢＤ－２が早期産児における新生児腸疾患（壊死性腸炎など）を発症するリスク因子であり得ると推測した。Ｊｅｎｋｅ，２０１２は、低ｈＢＤ－２発現がＴＬＲ４発現に関連することを見出し、これは、管腔細菌に対する不適切な応答が、おそらく乳児にＮＥＣの発症が生じやすくすることを示唆する。ＮＥＣのリスク因子は、腸の未熟さ、運動不全（ｄｙｓｍｏｌａｌｉｔｙ）、異常な微生物叢、および透過性の増加である。

【０００８】

抗生物質は、早期新生仔豚モデルにおいて腸管免疫を調整しＮＥＣを予防することが示されており（Ｊｅｎｓｅｎ，２０１４）、ｈＢＤ－３は、新生ラットモデルにおいてＮＥＣの発生率を減少させ生存させることが示されている（Ｓｈｅｎｇ，２０１４）。Ｍａｎｚｏｎｉ，２０１４は、ウシラクトフェリン＋ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｈａｍｎｏｓｕｓで処置したＶＬＢＷ児ではプラセボと比較してＮＥＣの発生率が有意に低下することを見出した。

【０００９】

神経発生障害

早期産児におけるいくつかの研究は、小児期において遅発性敗血症と有害な神経発生的転

帰の間に関連があり、感染症の繰り返しおよびグラム陰性病原体が最も高いリスクを付与することを示している。しかし、敗血症と脳傷害の間の関連は、関与する細菌種とほぼ無関係なようであり、有害な最終の共通経路は多様な初期の宿主－微生物相互作用によって活性化され得ることを示唆する（Ｓｔｒｕｎｋ　ｅｔ．２０１４）。生後数年での神経発達障害の例は、脳性麻痺、精神遅滞、および感覚障害（視覚障害および聴覚障害など）である（Ｓａｉｇａｌ，２００８）。

【００１０】

早期産児の炎症に関連する最も一般的な病変は、限局性嚢胞性脳室周囲白質軟化症、びまん性壊死、またはその両方を特徴とする、白質傷害である（Ｓｔｒｕｎｋ，２０１４）。体液性メディエーター（ＩＬ－１およびＩＬ－６などの炎症誘発性サイトカインならびにＣＸＣＬ－８、ＴＮＦ－α、タイプＩおよびＩＩインターフェロンなどのケモカイン、ならびに活性酸素種を含む）は、脳傷害の病理発生における重要なメディエーターである可能性が高い。神経有毒作用は、直接的な宿主－微生物相互作用によって誘発されるだけでなく、周産期の炎症への曝露、パターン認識受容体を活性化する細菌産物によって誘発される胎児もしくは新生児の免疫細胞の活性化、または胎盤を横断する母体の炎症誘発性メディエーターによっても生じ得る（Ｇｉｒａｒｄ，２００９）。

【００１１】

子宮外発育不全

ＶＬＢＷ児における子宮外発育不全（誕生と退院の間の体重が１０パーセンタイル未満の乳児）は、ＶＬＢＷ児の成長および発達の予後ならびに生活習慣病の発生率に影響を及ぼす（Ｓａｋｕｒａｉ，２００８）。Ｓａｋｕｒａｉは、体重、身長、および頭囲についての子宮外発育不全の発生率がそれぞれ２８％、３４％、および１６％であることを見出した。各成長パラメーターについて、子宮外発育不全の発生率は、妊娠期間および出生時体重が減少するにつれて増加した。６００ｇ以下の乳児のコホートでは、退院時および２歳時に、９４％が体重、身長、および頭囲について１０パーセンタイル未満であると報告された。異常な神経発生的転帰は、生存者の９０％で認められた（Ｓｗｅｅｔ，２００３）。

【００１２】

新生児マイクロバイオーム

マイクロバイオームは、誕生から死亡まで健康な宿主内で進化し、宿主の免疫系と共に恒常性のバランスを維持するように宿主を絶えず微調整する。マイクロバイオームの発生に対するまず最も重要な寄与は、母体微生物叢の垂直伝播である。消化管、気道、尿生殖路中の粘膜、および皮膚のコロニー形成は、出生時またはおそらく出生前でさえも、新生児が母体の微生物叢に暴露されたときに開始される。最近の研究は、胎盤および胎便内のマイクロバイオームの存在を示唆し、コロニー形成過程が分娩のずっと前に始まることを示唆している。

【００１３】

胃腸管は、最も多様かつ豊富な微生物を有する。９９％を超える腸内微生物が嫌気性菌である。経膣分娩によって誕生した乳児は、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ種およびＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ種などの母体の膣内細菌叢を反映する腸管コロニー形成を有する。帝王切開による分娩によって誕生した乳児は、膣内種よりもむしろ上皮の種（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐｒｏｐｉｏｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ、およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍなど）によりコロニー形成される。生後の新生児の腸マイクロバイオームのさらなる発達は、分娩様式と無関係に、微生物叢と宿主の免疫系の間の相互作用に支配される。これがどのように進化するのかは、依然として完全に特徴づけられていない。栄養は、それが母乳中または調合乳中のいずれであっても、新生児の腸微生物叢の初期のコロニー形成パターンにおいて重要な役割を果たすことが実証されている（Ｇｒｉｔｚ　ａｎｄ　Ｂａｎｄａｒｉ，２０１５）。興味深いことに、母乳栄養乳児に調合乳を補足すると、それが比較的少量であっても、母乳栄養パターンから人工栄養パターンへのシフトが起こるであろう（Ｇｕａｒａｌｄｉ　ａｎｄ　Ｓａｌｖａｔｏｒｉ，２

０１２）。
【００１４】
早期産児、特にＥＬＢＷ児は、健康なマイクロバイオームの発達に関して言えば、不利な立場にある。これに寄与する要因は、その腸の未熟さに制限されず、早期卵膜破壊、母体感染、帝王切開による分娩の発生率の増加、出生時および出生後の広域抗生物質曝露、ならびに他の腸改変薬への曝露も含む（Ｇｒｉｔｚ ａｎｄ Ｂａｎｄａｒｉ，２０１５）。Ｂｕｔｅｌによる２００７年の研究は、健康な満期母乳栄養乳児は、生後７日目までにＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍがコロニー形成するのに対して、早期産児はそうではないことを見出した。興味深いことに、Ｂｕｔｅｌは、一定の微生物がコロニー形成するための在胎齢の閾値が存在する可能性があり、３３週間がＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（健康なマイクロバイオームの発達および維持に最も一般的に関与する生物）の出現のための標石のようであることも示唆している。
【００１５】
初乳
人乳は、主に分泌型ＩｇＡ抗体を介するが、おそらく殺菌性ラクトフェリンのようないくつかの他の要因を介しても、母乳栄養の出生児を感染から保護する。感染からの保護は、例えば、急性および持続性の下痢、気道感染、中耳炎、尿路感染、新生児敗血症、およびＮＥＣに対し授乳中に十分に証明されている（Ｈａｎｓｏｎ，１９９８）。人乳の消費は、新生児のＧＩ管に多数の可溶性の細胞成分を介して受動免疫を与える。人乳は、腸マイクロバイオームを調整する、抗菌性のタンパク質およびペプチド（ラクトフェリン、リゾチーム、およびディフェンシンを含む）を含む。抗菌活性に加えて、母乳は、成長因子およびサイトカインを介するＧＩ管の関門機能の維持、または可溶性パターン認識受容体（分泌型ＩｇＡおよび可溶性ＣＤ－１４受容体など）を介するＧＩ上皮の防御に寄与し、これは立体障害を介して腸内組織への細菌付着を防止できる（Ｔｒｅｎｄ，２０１６）。タンパク質および免疫因子（ｓＩｇＡおよび白血球など）の濃度は、母体年齢、分娩様式、母乳の生成量、喫煙、ＢＭＩ、経産歴、および母体感染によって変動することが報告されている。これらの多数の母体パラメーターはまた、早期出産に関連するリスク因子でもある（Ｔｒｅｎｄ，２０１６）。
【００１６】
Ａｒｍｏｇｉｄａ，２００４は、初乳中で、最高濃度のＨＮＰ－１およびＨＢＤ－２；中程度の量のＨＤ６、少量のＨＤ５およびＨＢＤ－１を見出した。ＨＮＰ－１、ＨＤ５、およびＨＤ６は、成熟乳と比較して初乳中で有意に高量で存在していた。妊娠期間の終了時に分娩した女性と比較したときに早産児を分娩した女性由来の母乳中のＨＢＤ－２レベルはより高い傾向にあった。測定された最も豊富なタンパク質がラクトフェリン、ｓＩｇＡ、リゾチーム、およびｓＣＤ－１４である傾向が最近、見出された。防御ペプチドＨＢＤ－１およびＨＢＤ－２は、より少量で存在していた。ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、およびＨＤ５の中央値は、これらの分子が母乳試料の半分未満で測定可能であったので、検出限界であった。非経口栄養と組み合わせた最適未満の腸処方食の導入は罹患しやすくし、一方で、母乳、特に初乳の量を出生時から増加させることは疾患を防ぐ（Ｓｉｇｇｅｒｓ，２０１０）。
【００１７】
早期産児の現在の処置
出生前のコルチコステロイドの増大されたかつより早期の使用、補助換気および界面活性物質、および集中治療に対する変わりつつある姿勢により、超早期出産の、特に２８週以前に誕生した乳児の生存率は、１９９０年代中頃以来劇的に改善された（Ｓａｉｇａｌ，２００８）。
【００１８】
２０１４年からのコクラン解析は、腸プロバイオティクスでの乳汁食の補足が重症ＮＥＣのリスクおよび死亡率を低下させたと結論付けた（ＡｌＦａｌｅｈ，２０１４）。プロバイオティクスは、細胞レベルに対するいくつかの重要な効果（ＮＦκＢ活性化、細胞保

護遺伝子の上方制御、アポトーシスの防止、活性酸素種の生成、および密着結合の発現）を有することが公知である（Ｐａｔｅｌ，２０１２）。しかし、プロバイオティクスに関連する敗血症のいくつかの報告は、上皮関門による防御が未熟な早産児などの、宿主での生細菌の日常的な臨床使用に関する懸念を示している（Ｐａｔｅｌ，２０１２）。

【００１９】

抗菌ペプチド

出生時には、免疫系、特に適応免疫は未熟であり、低レベルの免疫グロブリン、ナイーブＴ細胞、および抗原提示細胞を特徴とする。現在の仮説は、抗菌ペプチドおよび抗菌タンパク質などのエフェクター分子を保有する一定の先天性免疫細胞がこの障害をある程度代償し、若年期における微生物に対する防御における主な役割を果たすということである（Ｋａｉ－Ｌａｒｓｅｎ，２０１４）。抗菌ペプチドは、胎児が体内に存在する時点で既に発現されるが、そのレベルは在胎齢と共に増加する。ＨＤ５およびＨＤ６の転写物は、妊娠１３週で既に出現しており（Ｍａｌｌｏｗ，１９９６）、低レベルのＨＤ５が妊娠２４週で小腸中で検出されている（Ｓａｌｚｍａｎ，１９９８）。Ｃａｍｐｅｏｔｔｏ，２０１０は、ｈＢＤ－２を、在胎齢または哺乳様式と無関係に満期産児および早期産児の糞便中に高レベルで検出できることを見出した。結論として、早産児の新規の処置が非常に必要とされている。肺および腸の両方において同時に粘膜抵抗力の成熟を促進できる処置が特に必要である。経口、肺、および皮下への投与の両方を介して投与できる処置が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００２０】

概要

本発明者らは驚いたことに、哺乳動物ディフェンシンが、微生物の存在および存在量を増加させることによって腸微生物叢を変化させる能力；ＩＬ－２２濃度を増加させることによって粘膜構造を増大する能力；壊死性腸炎の発生率を低下させる能力；気道過敏（ＡＨＲ）を低下させ気道コンプライアンス（Ｃｄｙｎ）を増加させる能力；特に、ＡＨＲの低下により気道コンプライアンス（Ｃｄｙｎ）を増加させ肺機能を改善する能力；肺炎症を軽減する能力；気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）中の好中球数、好酸球数、およびマクロファージ数を減少させる能力、ならびにＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３濃度の正常化により免疫系をリバランスする能力を有することを実証した。本発明者らはまた、喘息モデルにおいて組織学的炎症の軽減有効性を実証した。特に、本発明者らはまた、喘息モデルにおける肺中でならびに移植片対宿主病モデルにおける腸および肝臓中で、組織学的炎症の低下における有効性を実証した。

【００２１】

データは、哺乳動物ディフェンシンの投与が、早期出産（ＩＤＣ１０；Ｐ０７）に関連する主要な合併症を軽減し、それ故、早期産児における敗血症（ＩＤＣ１０；Ｐ３６、Ｐ３７．５、およびＰ５２）、壊死性腸炎（ＩＤＣ１０；Ｐ７７）、短腸症候群（ＩＤＣ１０；Ｋ９１．２）、神経発生障害（ＩＤＣ１０；Ｐ５２およびＰ９１）、および子宮外発育不全（ＩＤＣ１０；Ｐ９２）の処置または予防に有用であることを示す。

【００２２】

驚いたことに、α－ディフェンシンおよびβ－ディフェンシンの両方が微生物叢の組成に強い影響を及ぼすことが予防的および治療的高脂肪食マウスモデルの両方において実証されたが、これらの効果がディフェンシンごとに異なり、α－ディフェンシンとβ－ディフェンシンの組み合わせがさらに個別の効果と異なることも実証された。

【００２３】

さらに驚いたことに、β－ディフェンシンが、ＩＬ－２２産生の増加により増加された粘膜の統合性を介しておそらく促進される壊死性腸炎の発生率を防止するか劇的に低下させることができることが、ジチゾン／Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ誘発性壊死性腸炎のマウスモ

デルにおいて実証された。

【００２４】

さらに驚いたことに、マウスを室内塵ダニ（ＨＤＭ）＋フロイントアジュバントで免疫化しＨＤＭでチャレンジする場合、ある投薬量のヒトベーターディフェンシン２（ｈＢＤ－２）は経口投与または鼻腔内投与のいずれにおいても、ステロイド感受性マウスモデルにおけるＡＨＲの増加、Ｃｄｙｎの減少、ＢＡＬＦ中の炎症細胞数、および肺組織中の炎症性サイトカイン産生によって定義される喘息および肺機能障害の発症を予防できることが、室内塵ダニアレルギーのマウスモデルにおいて実証された。免疫抑制が標的である従来の喘息予防法と対照的に、ｈＢＤ－２での予防は免疫系をリバランスするようであり、したがって十分に機能する免疫応答を維持する。

【００２５】

さらに驚いたことに、マウスを室内塵ダニ（ＨＤＭ）＋フロイントアジュバントで免疫化しＨＤＭでチャレンジする場合、ある投薬量のヒトベーターディフェンシン２（ｈＢＤ－２）は経口投与または鼻腔内投与のいずれにおいてもまた、ステロイド感受性マウスモデルにおけるＡＨＲの減少、Ｃｄｙｎの増加、組織学的肺炎症の軽減、ＢＡＬＦ中の炎症細胞数の減少、および肺組織中の炎症性サイトカイン産生によって喘息を処置し肺機能を改善できることが、室内塵ダニアレルギーのマウスモデルにおいて実証された。ｈＢＤ－２処置を行わない場合、動物は、劇的なＡＨＲの増加、Ｃｄｙｎの減少、肺組織の炎症性の組織学的変化、血球数、特に好中球数、好酸球数、およびマクロファージ数の増加、ならびに炎症性サイトカイン濃度の増加を特徴とする喘息を発症した。

【００２６】

さらに驚いたことに、ディフェンシンの全身毒性が変動することが、ヒトＰＢＭＣ（全身毒性のマーカー）で実証された。ｈＢＤ－１、ｈＢＤ－２、およびＨＤ５は、ＰＢＭＣにおいて有毒でないことが見出された。ｈＢＤ－４は中程度に有毒であることが見出されたのに対して、ｈＢＤ－３は有毒であることが見出された。これは、Ｓｈｅｎｇ，２０１４が腸上皮細胞株で試験したときにｈＢＤ－３が有毒でないことを見出していたので、重要かつ驚くべき所見である。Ｓｈｅｎｇの所見は、ベータディフェンシンが上皮表面に発現されるので、意外ではなかった。しかし、早期産児における上皮表面（例えば、腸など）は未熟でかつ漏れやすく、したがって、経口投与されたディフェンシンが吸収されそれらの効果を全身で発揮する可能性がある。

【００２７】

さらに驚いたことに、ｈＢＤ－２での予防的な処置は、死亡率および体重減少を劇的に低下させ；小腸および大腸ならびに肝臓の組織学スコアを低下させることが、移植片対宿主病のマウスモデル（早期産児といくつかの類似点を共有するモデル）において実証され、これらはすべて腸の健康および腸の完全性の改善を示唆している。ｈＢＤ２での処置は、腸上皮／固有層内へのＣＤ４５＋白血球の浸潤を低下させ、腸管Ｔ細胞および骨髄性細胞の浸潤を低下させた。ｈＢＤ２での予防的処置は、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６の減少ならびにＩＬ－１０誘発も示した。ｈＢＤ－２処置はさらに、骨髄性細胞由来のＩＬ－１βの減少（脾臓のＦＡＣＳ分析）ならびにＴｈ１サイトカイン、特にＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γの産生の減少を示した。

【００２８】

したがって、１つの態様では、早期産児における重要な共生細菌（例えば、ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）の存在および存在量の増加を含む腸管微生物叢の成熟／正常化の方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される１つまたは複数の哺乳動物抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【００２９】

他の態様では、早期産児における壊死性腸炎、腸の未熟さ、運動不全（ｄｙｓｍｏｌａｌｉｔｙ）、腸透過性の増加、敗血症の処置および／または予防、粘膜抵抗力の成熟／正

常化、ならびに腸管でのＩＬ－２２産生の増加の方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【００３０】

他の態様では、早期産児において呼吸器系の炎症性疾患（ＩＤＣ１０；Ｐ２２およびＰ２３）を処置および／または予防する方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【００３１】

他の態様では、早期産児において敗血症、壊死性腸炎、短腸症候群、および子宮外発育不全からなる群から選択される疾患を処置および／または予防する方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【００３２】

他の態様では、早期産児において神経発生障害、白質傷害、脳性麻痺、精神遅滞、および感覚障害を処置および／または予防する方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【００３３】

早期産児において腸の健康を改善する方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法をさらに提供する。

【００３４】

早期産児において組織学的肺炎症、血管周囲および気管支血管の炎症、ＢＡＬＦ炎症細胞数、ならびに／または肺組織中の炎症性サイトカイン産生を低減する方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法をさらに提供する。

【００３５】

別の態様では、早期産児において肺コンプライアンスを増加させ、気道過敏症を軽減し、そして／または最大呼気流量を増加させる方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【００３６】

別の態様では、早期産児において肺機能および肺コンプライアンスを増加させ、気道過敏症を軽減し、かつ／または最大呼気流量を増加させるための方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【００３７】

早期産児において組織サイトカイン産生の正常化によって免疫系をリバランスし、それ故に気管支肺胞液（ｂｒｏｎｃｈｉｏａｌｖｅｏｌａｒ　ｆｌｕｉｄ）中への炎症性細胞遊走にもかかわらずサイトカインストームを予防するための方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群か

ら選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法をさらに提供する。

【００３８】

他の態様では、本開示は、本明細書中に記載の任意の方法に従う処置方法で用いる、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される抗菌性ポリペプチドに関する。

【００３９】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書中に定義の障害の処置のための医薬の製造のための、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される抗菌性ポリペプチドの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【００４０】

【図１】高脂肪食マウスモデルにおける微生物叢の組成に対する哺乳動物ディフェンシン（ＨＤ５、ｈＢＤ－２、およびＨＤ５＋ｈＢＤ－２）の効果を調査するための実験設定の概要。

【図２】マウスを室内塵ダニ（ＨＤＭ）＋フロイントアジュバントによって免疫化しＨＤＭでチャレンジする場合の、喘息の予防のためのマウスステロイド感受性モデルにおける哺乳動物ディフェンシンでの予防的処置の効果を調査するための実験設定の概要。

【図３】マウスを室内塵ダニ（ＨＤＭ）＋フロイントアジュバントによって免疫化しＨＤＭでチャレンジする場合の、喘息の処置のためのマウスステロイド感受性モデルにおける哺乳動物ディフェンシンでの処置の効果を調査するための実験設定の概要。

【図４】Ａ）ヒトベータディフェンシン１～４およびＢ）：ＨＤ５およびＨＤ６のＣｌｕｓｔａｌ　Ｗ（２．１）多重配列アラインメント。Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｗアラインメントにおいて：＊は、単一の完全に保存された残基を有する位置を示す。：は、以下の「強い」グループのうちの１つが完全に保存されていることを示す：－Ｓ、Ｔ、Ａ；Ｎ、Ｅ、Ｑ、Ｋ；Ｎ、Ｈ、Ｑ、Ｋ；Ｎ、Ｄ、Ｅ、Ｑ；Ｑ、Ｈ、Ｒ、Ｋ；Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ；Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｆ；Ｈ、Ｙ；Ｆ、Ｙ、Ｗ。．は、以下の「より弱い」グループのうちの１つが完全に保存されていることを示す：－Ｃ、Ｓ、Ａ；Ａ、Ｔ、Ｖ；Ｓ、Ａ、Ｇ；Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｋ；Ｓ、Ｔ、Ｐ、Ａ；Ｓ、Ｇ、Ｎ、Ｄ；Ｓ、Ｎ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｋ；Ｎ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｈ、Ｋ；Ｎ、Ｅ、Ｑ、Ｈ、Ｒ、Ｋ；Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｍ；Ｈ、Ｆ、Ｙ。

【図５】マウス高脂肪食モデルにおける経口ＨＤ５、ｈＢＤ－２、およびＨＤ５＋ｈＢＤ－２（混合物）での予防的処置後の微生物の存在（様々な細菌の存在を表す）および存在量（全細菌の存在量に対する百分率として所与の細菌の存在量を表す）の重みなしおよび重み付きｕｎｉｆｒａｃ解析。無処置の高脂肪食（ＨＦ）および低脂肪食（ＬＦ）を対照として使用する。

【図６】マウス高脂肪食モデルにおける経口ＨＤ５、ｈＢＤ－２、およびＨＤ５＋ｈＢＤ－２（混合物）での予防的処置後の微生物存在量の属解析。

【図７】マウス高脂肪食モデルにおける経口ＨＤ５およびｈＢＤ－２での予防的処置後の小腸中のＡｌｌｏｂａｃｕｌｕｍの存在量。

【図８】マウス高脂肪モデルにおける経口ｈＢＤ－２での予防的処置後の結腸中のＬａｃｔｏｂａｃｉｌｌａｃｅａｅの存在量。

【図９】マウス高脂肪食モデルにおける経口ｈＢＤ－２での予防的処置の４週間後および１０週間後の結腸中のＢａｒｎｅｓｉｅｌｌａの相対存在量。

【図１０】マウス高脂肪食モデルにおけるＨＤ５またはｈＢＤ－２での治療上の処置後の微生物の存在および存在量（図５のテキストを参照のこと）の重みなしｕｎｉｆｒａｃ解析。

【図１１】マウス高脂肪食モデルにおける経口ＨＤ５およびｈＢＤ－２での治療的介入後の結腸中のＡｌｌｏｐｒｅｖｏｔｅｌｌａの相対存在量。

【図１２】マウス高脂肪食モデルにおけるＨＤ５またはｈＢＤ－２での治療的介入後の小腸および結腸中のＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅの相対存在量。

【図１３】ｈＢＤ－２の１ｍｇ／ｋｇ　ｓ．ｃ．ＯＤの効果が１００μｇ／マウスでの抗ＴＮＦ－αのｓ．ｃ．週２回（エンブレル）および０．３ｍｇ／ｋｇデキサメタゾンの腹腔内ＯＤと同等であることを示す、１４週治療ＳＣＩＤ　ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞移入結腸炎マウスモデルにおける臨床スコア（体重減少、便の硬さ、および直腸を介した血液の存在）。

【図１４】ｈＢＤ－２の１ｍｇ／ｋｇ　ｓ．ｃ．ＯＤの効果が１００μｇ／マウスでの抗ＴＮＦ－αのｓ．ｃ．週２回（エンブレル）および０．３ｍｇ／ｋｇデキサメタゾンの腹腔内ＯＤと同等であることを示す、１４週治療ＳＣＩＤ　ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞移入結腸炎マウスモデルにおける結腸重量。

【図１５】１ｍｇ／ｋｇ　ｓ．ｃ．ｈＢＤ－２の効果が１００μｇ／マウスでの抗ＴＮＦ－αのｓ．ｃ．週２回（エンブレル）および０．３ｍｇ／ｋｇデキサメタゾンの腹腔内ＯＤと同等であることを示す、１４週治療ＳＣＩＤ　ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞移入結腸炎マウスモデルにおける腸の健康の１つの現れとしての腸管組織中のミエロペルオキシダーゼ活性。

【図１６】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後のマウス室内塵ダニステロイド感受性喘息モデルにおける気道過敏症。

【図１７】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後のマウス室内塵ダニステロイド感受性喘息モデルにおける肺コンプライアンス。

【図１８】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＴＮＦ－αのサイトカイン濃度。

【図１９】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－４のサイトカイン濃度。

【図２０】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－５のサイトカイン濃度。

【図２１】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－６のサイトカイン濃度。

【図２２】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－９のサイトカイン濃度。

【図２３】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－１３のサイトカイン濃度。

【図２４】ｈＢＤ－２の予防的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－３３のサイトカイン濃度。

【図２５】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける気道過敏症。生理食塩水は、非チャレンジ対照である。ＨＤＭ／ビヒクルは、ビヒクルで処置された室内塵ダニチャレンジ対照である。「ｈＢＤ－２　ＩＮ　１．２　ｍｐｋ」は、１．２ｍｇ／ｋｇで鼻腔内投与されたｈＢＤ－２である。５ｍｐｋは５ｍｇ／ｋｇである。

【図２６】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内（Ａ）および経口（Ｂ）投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺コンプライアンス。

【図２７】ｈＢＤ－２の治療的鼻腔内投与後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるＢＡＬＦ中の総細胞数および分画細胞数。

【図２８】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＦＮ－γのサイトカイン

濃度。鼻腔内アーム由来のデータを左側に示し、経口アーム由来のデータを右側に示す。
【図２９】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＴＮＦ－αのサイトカイン濃度。鼻腔内アーム由来のデータを左側に示し、経口アーム由来のデータを右側に示す。
【図３０】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－６のサイトカイン濃度。
【図３１】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－９のサイトカイン濃度。
【図３２】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－４のサイトカイン濃度。鼻腔内アーム由来のデータを左側に示し、経口アーム由来のデータを右側に示す。
【図３３】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－５のサイトカイン濃度。
【図３４】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＫＣ（ＩＬ－８）のサイトカイン濃度。
【図３５】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－１０のサイトカイン濃度。鼻腔内アーム由来のデータを左側に示し、経口アーム由来のデータを右側に示す。
【図３６】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺ホモジネート中のＩＬ－１３のサイトカイン濃度。
【図３７】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるＨ＆Ｅ／ＰＡＳ調製物を用いた肺組織学。左上のパネル：無処置かつ未チャレンジの対照。右上のパネル：無処置かつＨＤＭチャレンジした対照。左下のパネル：ｈＢＤ－２　ＰＯで処置したＨＤＭチャレンジ。右下のパネル：ｈＢＤ－２　ＩＮで処置したＨＤＭチャレンジ。倍率５０倍。
【図３８】ｈＢＤ－２の治療的な鼻腔内投与および経口投与それぞれの後の室内塵ダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおける肺炎症の重症度。
【図３９】アラマーブルーならびに１、１０、および４０μｇ／ｍｌの濃度でのＨＤ５、ｈＢＤ－１、ｈＢＤ－２、ｈＢＤ－３、およびｈＢＤ－４への２４時間の曝露後のＰＢＭＣ細胞の細胞生存度。
【図４０】Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ／ジチゾン誘発性壊死性腸炎のマウスモデルにおける壊死性腸炎の重症度を評価するための組織学的採点システム。２超は、有意な腸炎症を示す。
【図４１】Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ／ジチゾンでのチャレンジから１時間後に１用量の１．２ｍｇ／ｋｇ　ｈＢＤ－２を投与されたマウスにおいて、壊死性腸炎の発生率の統計的に有意な低下がチャレンジの１６時間後に認められる。
【図４２】Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ／ジチゾンでのチャレンジから１時間後に１用量の１．２ｍｇ／ｋｇ　ｈＢＤ－２を投与されたマウス群において、統計的に有意な腸粘膜を防御するＩＬ－２２の増加がチャレンジの９時間後に認められる。
【図４３】ＰＢＳで処置した１５匹のマウスと比較した、幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した１５匹のマウスにおける死亡率の高度に統計的に有意な低下（ｐ＜０．０００１）。
【図４４】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した１０匹のマウスにおける小腸、結腸、および肝臓の組織学スコアの統計的に有意な低下。
【図４５】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置したマウスにおける、ベース

ラインからの％で表した体重減少（ａ）およびグラムで表した体重減少（ｂ）。
【図４６】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した１０匹のマウスにおける結腸および小腸の固有層内へのＣＤ４５＋白血球の細胞遊走の減少。
【図４７ａ－ｃ】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した１０匹のマウスにおける結腸および小腸の固有層の腸管Ｔ細胞および骨髄性細胞の浸潤の減少。
【図４８ａ－ｃ】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した１０匹のマウスの血清中のＴＮＦ－α（ａ）、ＩＬ－６（ｂ）、およびＩＬ－１０（ｃ）のサイトカイン濃度。
【図４９ａ－ｃ】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した１０匹のマウスにおける骨髄性細胞中のＩＬ－１β産生の低下。
【図５０】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した１０匹のマウスにおける、好中球の比率の低下（ａ）ならびに以下のＴｈ１サイトカイン産生の低下－ＣＤ４　Ｔ細胞（ｂ）およびＣＤ８　Ｔ細胞（ｃ）およびＣＤ６９＋ＣＤ４　Ｔ細胞（ｄ）中のＩＦＮ－γ；ＣＤ４　Ｔ細胞（ｅ）およびＣＤ８　Ｔ細胞（ｆ）中のＴＮＦ－α。
【図５１】幹細胞移植日から１０日間経口ＰＢＳで処置した１０匹のマウスにおける結腸中の炎症、骨髄性細胞および白血球の浸潤の増加、ならびに組織修復の増加。
【図５２】シクロスポリンおよびＰＢＳでそれぞれ処置した１３匹のマウスと比較した、幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２で処置した７匹のマウスにおける死亡率の統計的に有意な低下（ｐ＝０．０３）。
【図５３】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２、シクロスポリンまたはＰＢＳで処置したマウスにおけるベースラインからの体重減少（％）。
【図５４】幹細胞移植日から１０日間経口ｈＢＤ－２、経口ＨＤ５、またはＰＢＳでそれぞれ処置した２２匹のマウスにおける死亡率の有意な低下。
【図５５】低脂肪食または洋食を摂取したマウスと比較した、マウスにおける腸の内層から細菌集団（溶解領域）までの距離（μｍ）として測定されるＨＤ５およびｈＢＤ－２の経口投与によって行われた細菌集団制御。
【発明を実施するための形態】
【００４１】
詳細な説明
定義：
本明細書中で使用される用語「ディフェンシン」は、抗菌ペプチドのディフェンシンクラスに属するポリペプチドを指す。ディフェンシンは、健康なマイクロバイオームを維持し、潜在的な病原体を回避する役割を果たす優位な先天性宿主防御の１つである（Ｗｅｈｋａｍｐ　ｅｔ　ａｌ．ｅｔ　ａｌ．，２００２およびＳａｌｚｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。ディフェンシンは、グラム陽性菌およびグラム陰性菌、真菌および古細菌に対する抗菌活性を保有する、ならびに抗炎症活性を示すペプチドである。
【００４２】
ヒトディフェンシンは、その３つの分子内システインジスルフィド結合のトポロジーに基づいてα－ディフェンシンおよびβ－ディフェンシンに分類される小型のカチオン性ペプチドである。α－ディフェンシンは、好中性顆粒中で細胞内発現されるもの（ＨＮＰ１－４）および小腸の陰窩中のパネート細胞によって発現されるもの（ＨＤ５およびＨＤ６またはＤＥＦＡ５およびＤＥＦＡ６）にさらに分類できる。β－ディフェンシン（ＤＥＦＢｎ）は主に、種々の組織および器官（皮膚、眼、中耳、口腔、気管、肺、胃腸管、尿生殖器系、腎臓、膣、肝臓、膵臓、および乳腺を含む）中の上皮細胞によって産生される。ディフェンシンの例は、ヒト腸管アルファディフェンシン５（ＨＤ５；配列番号５）；ヒト腸管アルファディフェンシン６（ＨＤ６；配列番号６）；ヒト好中球ペプチド１（ＨＮＰ－１；配列番号８）；ヒト好中球ペプチド２（ＨＮＰ－２；配列番号９）；ヒト好中球ペプチド３（ＨＮＰ－３；配列番号１０）；ヒト好中球ペプチド４（ＨＮＰ－４；配列番号１１）（全てアルファディフェンシンクラスに属する）を含み；ヒトベータディフェンシン１（ｈＢＤ－１；配列番号１）；ヒトベータディフェンシン２（ｈＢＤ－２；配列番

号２）；ヒトベータディフェンシン３（ｈＢＤ－３；配列番号３）；ヒトベータディフェンシン４（ｈＢＤ－４；配列番号４）；マウスベータディフェンシン３（配列番号７）；および短縮ｈＢＤ－２（配列番号１６）も含む。ディフェンシンは前駆体として発現され、細胞外間隙への分泌前にシグナルペプチド、いくつかの場合、さらにプロペプチドの切断によりプロセシングされる。ヒトβ－ディフェンシンファミリーの最も特徴づけられたメンバーは、ｈＢＤ－１～４である。ヒトディフェンシンは、構成性に産生されるもの（例えば、ｈＢＤ－１）もあれば、炎症促進性サイトカインまたは外因性の微生物産物によって誘発されるものもある（例えば、ｈＢＤ－２、ｈＢＤ－３、およびｈＢＤ－４）。上記で同定された配列は、推定される成熟生物活性ディフェンシンを表す。当業者は、プロセシングは細胞ごとに異なる可能性があること、及び得られた分泌型成熟ペプチドの１つまたは２つのＣ末端アミノ酸またはＮ末端アミノ酸は予想される配列と異なる可能性があるが依然として生物活性を維持することを理解するであろう。

【００４３】

本明細書中で使用される用語「カテリシジン」は、ＬＬ－３７としても公知であり、マクロファージおよび顆粒球／多形核白血球のリソソームで見出される抗菌ペプチドのファミリーに関連する。カテリシジンは、侵襲性細菌感染に対する哺乳動物先天性免疫防御で重要な役割を果たす。カテリシジンファミリーのペプチドは、抗菌ペプチド（ＡＭＰ）として分類される。ＡＭＰファミリーは、ディフェンシンも含む。ディフェンシンは共通の構造の特徴を有するが、カテリシジン関連ペプチドは非常に異なる。カテリシジンファミリーの抗菌性ポリペプチドのメンバーは、高度に保存された領域（カテリンドメイン）および高度に可変性のカテリシジペプチドドメインを特徴とする。一例は、ヒトカテリシジン（ＬＬ－３７、配列番号１２）である。

【００４４】

用語「ラクトフェリン」は、ラクトトランスフェリンとしても公知であり、本明細書中で使用される場合、トランスフェリンファミリーの多機能性タンパク質に関する。ラクトフェリンは、乳汁、唾液、涙、および鼻汁などの種々の分泌液中に広く存在する分子質量が約８０ｋＤａの球状タンパク質である。ラクトフェリンは、好中球性顆粒球の二次顆粒中にも存在し、腺房細胞によって分泌される。ラクトフェリンは、乳汁から精製されるか、組換えによって産生できる。ヒト初乳が最も高濃度を有し、人乳、牛乳（１５０ｍｇ／Ｌ）が続く。ラクトフェリンは、身体の免疫系の構成要素の１つであり；抗菌活性（殺菌性、殺真菌性）を有し、先天性防御の一部である。一例は、ヒトラクトフェリン（配列番号１３）である。

【００４５】

本明細書中で使用される用語「ラクトフェリシン」は、抗菌性を有する両親媒性のカチオン性ペプチドに関する。ラクトフェリシンは、ラクトフェリンのペプシン媒介消化によって生成できる。一例は、ラクトフェリシン－Ｈ（配列番号１４）である。

【００４６】

用語「リゾチーム」は、ムラミダーゼまたはＮ－アセチルムラミドグリカンヒドロラーゼとしても公知であり、本明細書中で使用される場合、動物によって産生される抗菌性酵素に関し、先天性免疫系の一部を形成する。リゾチームは、グラム陽性菌の細胞壁の主な構成要素であるペプチドグリカン中のＮ－アセチルムラミン酸とＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミン残基の間の１，４－β結合の加水分解を触媒するグリコシドヒドロラーゼである。この加水分解はまた、細菌細胞壁の完全性を損ない溶菌をもたらす。リゾチームは、分泌物（涙、唾液、人乳、および粘液を含む）中に豊富に存在する。リゾチームはまた、マクロファージおよび多形核好中球の細胞質顆粒中に存在する。一例は、ヒトリゾチーム（配列番号１５）である。

【００４７】

本明細書中で使用される用語「同一性」は、２つのアミノ酸配列の間または２つのヌクレオチド配列の間の関連性に関する。２つのアミノ酸配列の間の同一性は、ＥＭＢＯＳＳパッケージ（Ｒｉｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，ｈｔｔｐ：／／ｅｍｂｏｓｓ．ｏｒｇ

）、好ましくは、バージョン３．０．０以降のＮｅｅｄｌｅプログラムで実行されるＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３）を使用して決定される。使用される任意選択的なパラメーターは、ギャップオープンペナルティ１０、ギャップ伸長ペナルティ０．５、およびＥＢＬＯＳＵＭ６２（ＢＬＯＳＵＭ６２のＥＭＢＯＳＳバージョン）代替行列である。Ｎｅｅｄｌｅラベルした「最長同一性」（ｎｏｂｒｉｅｆオプションを使用して得られる）の出力を同一性率として使用し、これを以下のように計算する：（同一の残基×１００）／（アラインメント長－アラインメント中のギャップの総数）。

【００４８】

用語「正常な微生物叢」は、ディスバイオシスではない微生物叢を示すために使用される。正常な微生物叢は、巨大な遺伝子豊富度を有することを特徴とする。正常な腸管微生物叢は、Ｂａｃｔｅｒｉｏｄｅｔｅｓ属、Ｆａｅｃａｌｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ属、Ｂｌａｕｔｉａ属、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｃｏｐｒｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｍｅｔｈａｎｏｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒ属、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ属、Ｃｏｐｒｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属、Ａｋｋｅｒｍａｎｓｉａ属、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ属に属する細菌を含むことを特徴とする。正常な肺微生物叢は、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ属、Ｆｉｒｍｉｃｕｔｅｓ属、およびＰｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ属に属する細菌を含むことを特徴とし、コア微生物叢は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａ、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、およびＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓからなる。

【００４９】

用語「腸管の健康の改善」は、本明細書中で使用される場合、腸壁の粘膜比率の増加、腸絨毛高の増加、腸管杯細胞密度の増加、刷子縁の消化酵素活性の増加、および腸管ミエロペルオキシダーゼ活性の低下を指す。

【００５０】

用語「白質傷害」は、本明細書中で使用される場合、限局性嚢胞性脳室周囲白質軟化症、びまん性壊死、またはその両方を特徴とする。

【００５１】

用語「感覚障害」は、本明細書中で使用される場合、視覚障害および聴覚障害などの容態を指す。

【００５２】

本明細書中で使用される用語「処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」および「処置する（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」は、容態、疾患、または障害と戦うことを目的とした患者の管理およびケアを指す。この用語は、以下の目的：症状または合併症の緩和または軽減；容態、疾患、または障害の進行の遅延；容態、疾患、または障害の治癒または排除；および／または容態、疾患、または障害の予防、のための活性化合物の投与などの、患者が罹患する所与の容態のための全範囲の処置を含むことを意図し、ここで「予防する（ｐｒｅｖｅｎｔｉｎｇ）」または「予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ）」は、症状または合併症の発生リスクを予防するまたは低下させるための活性化合物の妨害、減少を目的とした患者の管理およびケアを指すと理解すべきである。処置すべき患者は、好ましくは哺乳動物、特にヒトである。本明細書中で使用される用語「患者」は、早産児または早産（早期分娩）しようとしている女性を指す。

【００５３】

用語「早期産児」は、本明細書中で使用される場合、在胎齢が３７週以前、例えば、在胎齢が３５週以前、例えば、３０週、例えば、２５週で生まれた乳児を指す。この用語は、出生時体重が１，５００ｇ未満のＶＬＢＷ（超低出生体重）児および出生時体重が１，０００ｇ未満のＥＬＢＷ（出生時体重が極めて低い）児を含む。

【００５４】

用語「早産児を出産しようとしている女性」は、本明細書中で使用される場合、３７週以下の在胎齢、例えば、３５週以下の在胎齢、例えば、３０週以下、例えば、２５週以下の乳児を分娩中の妊婦および分娩しようとしている妊婦を指す。早産児を出産しようとしている女性はまた、肺および腸管の炎症性障害などの特定の障害と診断されており、肺および腸管の炎症性障害などの障害を示す特定の症状を示す妊婦であり得る。かかる妊婦は、早産リスクがあると見なされる。

【００５５】

哺乳動物アルファディフェンシン、哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、および哺乳動物リゾチーム。

本開示は、早期産児または早産しようとしている母親における敗血症、呼吸器疾病、壊死性腸炎、急性および持続性の下痢、短腸症候群、神経発生障害、および子宮外発育不全の処置または予防における、哺乳動物（より好ましくは、ヒト科）のアルファディフェンシンおよび／またはベータディフェンシンおよび／またはカテリシジンおよび／またはラクトフェリンおよび／またはラクトフェリシンおよび／またはリゾチーム（ヒトアルファおよびベータディフェンシンなど）の使用を指す。

【００５６】

１つの実施形態では、抗菌ペプチドはα－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される。

【００５７】

１つの実施形態では、哺乳動物のアルファディフェンシンまたはベータディフェンシンは、ＨＮＰ－１、ＨＮＰ－２、ＨＮＰ－３、ＨＮＰ－４、ＨＤ５、ＨＤ６、ｈＢＤ－１、ｈＢＤ－２、ｈＢＤ－３、およびｈＢＤ－４からなる群から選択される。別の実施形態では、哺乳動物アルファディフェンシンまたはベータディフェンシンは、ＨＤ５、ＨＤ６、ｈＢＤ－１、ｈＢＤ－２、およびｈＢＤ－４からなる群から選択される。これらのペプチドは全て腸粘膜で発現され、集合的に腸管ディフェンシンと呼ぶことができ、これは表面上で発現されないＨＮＰの対語である。１つの好ましい実施形態では、哺乳動物アルファディフェンシンまたはベータディフェンシンは、ＨＤ５およびｈＢＤ－２からなる群から選択される。

【００５８】

１つの実施形態では、哺乳動物のアルファディフェンシンおよび／またはベータディフェンシンは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、および配列番号１１のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％の同一度を有する。別の実施形態では、ディフェンシンは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、および配列番号１１の１つと、１０アミノ酸未満の、８未満など、例えば５未満、４未満など、例えば３未満、２未満などのアミノ酸が異なる。別の実施形態では、ディフェンシンは、配列のＮ末端および／またはＣ末端から１０アミノ酸程度、８未満など、例えば５未満、４未満など、例えば３未満、２未満などのアミノ酸が欠失した配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、および配列番号１１のフラグメントである。

【００５９】

１つの好ましい実施形態では、ヒトアルファディフェンシンは、（アルファディフェンシン５（配列番号５）および／またはアルファディフェンシン６（配列番号６）からなる。１つの好ましい実施形態では、哺乳動物ベータディフェンシンは、ヒトベータディフェンシン１（配列番号１）、ヒトベータディフェンシン２（配列番号２）、ヒトベータディフェンシン３（配列番号３）、および／またはヒトベータディフェンシン４（配列番号４）からなる。

【００６０】
１つの好ましい実施形態では、ヒトアルファディフェンシンは、配列番号５のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、および最も好ましくは少なくとも９５％の同一性を有する。１つの好ましい実施形態では、ヒト哺乳動物アルファディフェンシンは、アルファディフェンシン５（配列番号５）からなる。
【００６１】
１つの好ましい実施形態では、ヒトベータディフェンシンは、配列番号２のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％の同一性を有する。１つの好ましい実施形態では、ヒトベータディフェンシンは、ヒトベータディフェンシン２（配列番号２）からなる。
【００６２】
さらに別の実施形態では、哺乳動物アルファディフェンシンは、ヒトアルファディフェンシンならびに／またはマウスおよび／もしくはブタのアルファディフェンシン、ならびにその機能的に等価なバリアントから構成される。好ましくは、哺乳動物アルファディフェンシンは、ヒトアルファディフェンシン５、ヒトアルファディフェンシン６、およびその機能的に等価なバリアントからなる。より好ましくは、哺乳動物アルファディフェンシンは、ヒトアルファディフェンシン５、およびその機能的に等価なバリアントまたはオルソログからなる。
【００６３】
なおさらなる実施形態では、哺乳動物ベータディフェンシンは、ヒトベータディフェンシンならびに／またはマウスおよび／もしくはブタのベータディフェンシン、ならびにその機能的に等価なバリアントからなる。好ましくは、哺乳動物ベータディフェンシンは、ヒトベータディフェンシン１、ヒトベータディフェンシン２、ヒトベータディフェンシン３、ヒトベータディフェンシン４、およびその機能的に等価なバリアントからなる。より好ましくは、哺乳動物ベータディフェンシンは、ヒトベータディフェンシン２およびその機能的に等価なバリアントまたはオルソログからなる。
【００６４】
哺乳動物（例えば、ヒト）アルファディフェンシンまたはベータディフェンシンの「機能的に等価なバリアント」は、親哺乳動物アルファディフェンシンおよび／またはベータディフェンシンと、肺または腸管または皮膚における微生物叢に対する効果がほぼ同じ効果を示す修飾された哺乳動物アルファディフェンシンまたはベータディフェンシンである。哺乳動物ディフェンシンの機能的に等価なバリアントは、哺乳動物ディフェンシンのアミノ酸配列（例えば、配列番号１～６および配列番号８～１１のいずれか）と比較して、１～５個のアミノ酸の修飾、好ましくは１～４個のアミノ酸の修飾、より好ましくは１～３個のアミノ酸の修飾、最も好ましくは１～２個のアミノ酸の修飾（複数可）、特に１個のアミノ酸の修飾を含み得る。好ましくは、ベータ哺乳動物ディフェンシンについては、配列番号２を有するヒトベータディフェンシン２と比較し、アルファディフェンシンについては、ＨＤ５（配列番号５）と比較する。
【００６５】
用語「修飾」は、本明細書中では、哺乳動物（例えば、ヒト）ディフェンシンの任意の化学修飾を意味する。修飾（複数可）は、アミノ酸（複数可）の置換（複数可）、欠失（複数可）、および／または挿入（複数可）ならびにアミノ酸側鎖（複数可）の交換（複数可）；またはアミノ酸配列が類似の特徴を有する非天然アミノ酸の使用であり得る。特に、修飾（複数可）は、アミド化（Ｃ末端のアミド化など）であり得る。好ましくは、アミノ酸修飾は、小さなものであり、すなわち、ポリペプチドの折りたたみおよび／または活性に大きな影響を及ぼさない保存的アミノ酸置換または挿入；単一の欠失；小さなアミノ末端またはカルボキシル末端の伸長；または正味電荷または他の機能の変化によって精製を容易にする小さな伸長（ポリ－ヒスチジンタグ、抗原性エピトープ、または結合ドメイ

ンなど）である。１つの実施形態では、小さな伸長（ポリ－ヒスチジンタグ、抗原性エピトープ、または結合ドメインなど）は、最大で約２０～２５残基の小さなリンカーペプチドを介して哺乳動物アルファディフェンシンまたはベータディフェンシンに付着され、前述のリンカーは、制限酵素切断部位を含み得る。

【００６６】

図４中のＣｌｕｓｔａｌ Ｗアラインメントを使用して、タンパク質の生物学的活性に大きな影響を及ぼすことなく置換できるアミノ酸残基を予想できる。Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ２．１（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏ，ｍｅ．ｊｐ／ｔｏｏｌｓ／ｃｌｕｓｔａｌｗ／）および以下の設定を使用して、配列をアラインメントした：ギャップオープンペナルティ：１０、ギャップ伸長ペナルティ：０，０５、重みの移行：なし、タンパク質の親水性残基：ＧＰＳＮＤＱＥ、親水性ギャップ：あり、重み行列：ＢＬＯＳＵＭ（タンパク質用）。以下の群内の置換（Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ、「強い」保存群）を、保存的置換と見なす：－Ｓ、Ｔ、Ａ；Ｎ、Ｅ、Ｑ、Ｋ；Ｎ、Ｈ、Ｑ、Ｋ；Ｎ、Ｄ、Ｅ、Ｑ；Ｑ、Ｈ、Ｒ、Ｋ；Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ；Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｆ；Ｈ、Ｙ；Ｆ、Ｙ、Ｗ。以下の群内の置換（Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ、「弱い」保存群）を、半保存的置換と見なす：－Ｃ、Ｓ、Ａ；Ａ、Ｔ、Ｖ；Ｓ、Ａ、Ｇ；Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｋ；Ｓ、Ｔ、Ｐ、Ａ；Ｓ、Ｇ、Ｎ、Ｄ；Ｓ、Ｎ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｋ；Ｎ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｈ、Ｋ；Ｎ、Ｅ、Ｑ、Ｈ、Ｒ、Ｋ；Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｍ；Ｈ、Ｆ、Ｙ。保存的置換の例は、塩基性アミノ酸群（アルギニン、リジン、およびヒスチジン）、酸性アミノ酸群（グルタミン酸およびアスパラギン酸）、極性アミノ酸群（グルタミンおよびアスパラギン）、疎水性アミノ酸群（ロイシン、イソロイシン、およびバリン）、芳香族アミノ酸群（フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン）、および小型アミノ酸群（グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、およびメチオニン）内の置換である。一般的に比活性を変化させないアミノ酸置換は当該分野で公知であり、例えば、Ｎｅｕｒａｔｈ ａｎｄ Ｈｉｌｌ（１９７９）に記載されている。最も一般的に生じる交換は、Ａｌａ／Ｓｅｒ、Ｖａｌ／Ｉｌｅ、Ａｓｐ／Ｇｌｕ、Ｔｈｒ／Ｓｅｒ、Ａｌａ／Ｇｌｙ、Ａｌａ／Ｔｈｒ、Ｓｅｒ／Ａｓｎ、Ａｌａ／Ｖａｌ、Ｓｅｒ／Ｇｌｙ、Ｔｙｒ／Ｐｈｅ、Ａｌａ／Ｐｒｏ、Ｌｙｓ／Ａｒｇ、Ａｓｐ／Ａｓｎ、Ｌｅｕ／Ｉｌｅ、Ｌｅｕ／Ｖａｌ、Ａｌａ／Ｇｌｕ、およびＡｓｐ／Ｇｌｙである。

【００６７】

２０個の標準アミノ酸に加えて、非標準アミノ酸（４－ヒドロキシプロリン、６－Ｎ－メチルリジン、２－アミノイソ酪酸、イソバリン、およびアルファ－メチルセリンなど）を、野生型ポリペプチドのアミノ酸残基と置換できる。限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸、および非天然アミノ酸を、アミノ酸残基と置換できる。「非天然アミノ酸」は、タンパク質合成後に修飾されており、かつ／またはその側鎖（複数可）中の化学構造が標準アミノ酸の化学構造と異なる。非天然アミノ酸は、化学的に合成でき、好ましくは、市販されており、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、３－および４－メチルプロリン、ならびに３，３－ジメチルプロリンを含む。

【００６８】

哺乳動物のアルファディフェンシンおよび／またはベータディフェンシン中の必須アミノ酸を、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発などの当該分野で公知の手順にしたがって同定できる（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ，１９８９，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：１０８１－１０８５）。後者の技術では、単一のアラニン変異を、分子中のあらゆる残基で導入し、得られた変異分子を、生物学的活性（すなわち、気道過敏症に対する活性またはサイトカインの抑制（例えば、ＴＮＦ－アルファ活性））について試験して、分子の活性に重要なアミノ酸残基を同定する。Ｈｉｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：４６９９－４７０８も参照のこと。必須アミノ酸の同一性を、哺乳動物のアルファディフェンシンおよび／またはベータディフェンシンに関連するポリペプチドを用いる同一性の解析から推測することもできる（図４中のＣｌｕｓｔａｌ Ｗアラインメントを参照のこと）。

【００６９】
単一または複数のアミノ酸を置換し、公知の変異誘発法、組換え法、および／またはシャフリング法、その後に関連するスクリーニング手順（Ｒｅｉｄｈａａｒ－Ｏｌｓｏｎ ａｎｄ Ｓａｕｅｒ，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：５３－５７；Ｂｏｗｉｅ ａｎｄ Ｓａｕｅｒ，１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：２１５２－２１５６；ＷＯ９５／１７４１３号；またはＷＯ９５／２２６２５号に開示のスクリーニング手順など）を使用して試験できる。使用できる他の方法は、誤りがちのＰＣＲ、ファージディスプレイ（例えば、Ｌｏｗｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｂｉｏｃｈｅｍ．３０：１０８３２－１０８３７；米国特許第５，２２３，４０９号；ＷＯ９２／０６２０４号）、および領域特異的変異誘発（Ｄｅｒｂｙｓｈｉｒｅ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｇｅｎｅ ４６：１４５；Ｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８８，ＤＮＡ ７：１２７）を含む。所与の置換の結果を確実に予想できない場合、本明細書中に記載の方法にしたがって誘導体を容易にアッセイして生物学的活性の有無を決定できる。

【００７０】
１つの実施形態では、処置方法は、早期産児または早期産児を出産しようとしている（早期分娩）女性への少なくとも１つの哺乳動物α－ディフェンシンの有効量の投与を含む。他の実施形態では、提供される方法は、早期産児または早期産児を出産しようとしている女性への少なくとも１つの哺乳動物β－ディフェンシンの有効量の投与を含む。１つのさらなる実施形態では、提供される方法は、早期産児または早期産児を出産しようとしている女性への少なくとも１つの哺乳動物α－ディフェンシンおよび少なくとも１つの哺乳動物β－ディフェンシンの有効量の投与を含む。好ましい実施形態は、哺乳動物アルファディフェンシンＨＤ５および／または哺乳動物ベータディフェンシンｈＢＤ－２を投与する。

【００７１】
長時間作用性のディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、およびリゾチーム
哺乳動物α－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、またはリゾチームの半減期を、α－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、またはリゾチームを別の部分と融合または抱合すること（すなわち、同じ様式で投与された非抱合のα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、またはリゾチームのｉｎ ｖｉｖｏ血漿半減期と比較して実質的に増加したα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、またはリゾチームのｉｎ ｖｉｖｏ血漿半減期を提供する薬学的に許容され得る分子に連結された長時間作用性の生物学的に活性なα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、またはリゾチームを構築すること）によって延長できる。

【００７２】
１つの実施形態では、α－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、またはリゾチームは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）、アルブミン結合部分（ＡＢＭ）、検出可能部分（Ｚ）、および半減期延長ペプチドからなる群から選択される少なくとも１つのさらなる部分をさらに含む。

【００７３】
哺乳動物α－ディフェンシンもしくはそのアナログまたは哺乳動物β－ディフェンシンもしくはそのアナログまたは哺乳動物カテリシジンもしくはそのアナログまたは哺乳動物ラクトフェリンもしくはそのアナログまたは哺乳動物ラクトフェリシンもしくはそのアナログまたは哺乳動物リゾチームもしくはそのアナログを含む長期作用性の生物学的に活性なα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、またはリゾチームは、新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）、トランスフェリン、アルブミン（ＨＡＳ）、ＸＴＥＮ（登録商標）もしくはＰＥＧ、ホモ－アミノ酸ポリ

マー（ＨＡＰ）、プロリン－アラニン－セリンポリマー（ＰＡＳ）、またはエラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）、ヒアルロン酸、負電荷の高シアル酸付加ペプチド（絨毛性ゴナドトロピン（ＣＧ）β－鎖のカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）など）、ヒトＩｇＧ、およびＣＨ３（ＣＨ２）$_n$ＣＯ－（式中、ｎは８～２２である）に結合している分子からなる群から選択される薬学的に許容され得る分子に連結される。

【００７４】

α－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのアナログはまた、非哺乳動物起源であってよく、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であってよい。

【００７５】

α－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのアナログは、先行技術の文献に記載の種々の方法（二官能性リンカーを介する化学的カップリング、遺伝子テクノロジー的にα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシンなどのディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのＮ末端またはＣ末端を、アルブミンまたはアルブミンアナログなどの薬学的に許容され得る分子にカップリングすることによるなどであるがこれに限定されない）で薬学的に許容され得る分子に連結されてよい。特に、アルブミンまたはアルブミンアナログ（例えば、ヒトアルブミン）のＮ末端を、α－ディフェンシンもしくはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン（ｌａｃｔｏｆｆｅｒｒｉｃｉｎ）またはリゾチームのＣ末端、またはα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのＮ末端にカップリングできる；あるいは、アルブミン（例えば、ヒトアルブミン）のＣ末端を、α－ディフェンシンもしくはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのＣ末端、またはα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのＮ末端にカップリングできる。リンカー配列を、アルブミンとα－ディフェンシンもしくはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームの鎖との間に挿入できる。

【００７６】

α－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのアナログは、安定なリンカーまたはより不安定なリンカーを介して薬学的に許容され得る分子に連結されてよい。いくつかのリンカーが当該分野で公知であり、二官能性ＰＥＧ分子（例えば、Ｐａｉｇｅ ｅｔ．ａｌ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ｖｏｌ．１２，ｎｏ．１２，１９９５を参照のこと）、加水分解性リンカー（Ｓｈｅｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．２００５，１６：９１３－９２０およびＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１３，Ｎｏｓ．１－２，Ｊｕｎｅ ２００７およびＷＯ２００９０９５４７９）、ＰＤＰＨおよびＥＭＣＨ（例えば、ＷＯ２０１００９２１３５号を参照のこと）を含む。薬学的に許容され得る分子へのα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン（ｃａｔｈｅｌｉｄｉｎ）、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのアゴニストの化学的抱合（２つ以上の分子の連結）がα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームの活性を強力に低下させるという特別な場合では、機能的なα－ディフェンシンまたはβ－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシンまたはリゾチームのアゴニストを放出できるより不安定なリンカーを使用することが好ましいかもしれない。

【００７７】

半減期を、スペーサー（例えば、γ－Ｌ－グルタミルスペーサー）およびＣ－１８脂肪二塩基酸鎖を用いるリジンに対するペプチド骨格のアシル化によって延長できる。脂肪二

塩基酸側鎖およびスペーサーはアルブミンへの強力であるが可逆性の結合を媒介し、注射部位からの放出を遅延させ腎クリアランスを低下させる。

【００７８】

方法および使用

ヒトディフェンシン５、ヒトベータディフェンシン２、およびヒトディフェンシン５＋ヒトベータディフェンシン２は、腸管中の微生物の存在および存在量を増加させ得ることが見出されている；したがって、早期産児における腸管微生物叢の成熟または正常化ならびに壊死性腸炎、短腸症候群、敗血症、呼吸器疾病，神経発達障害（ｎｅｕｒｏｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｉｍｐａｉｒｍｅｎｔ）、および子宮外発育不全の予防または処置のための医薬としての強力な活性を示す。

【００７９】

ヒトベータディフェンシン２は、腸機能の正常化（腸管壁の粘膜比率の増加、腸絨毛高の増加および杯細胞密度の増加、刷子縁の消化酵素活性の増加、腸管ミエロペルオキシダーゼ活性の低下、ならびにＩＬ－２２産生の増加）によって壊死性腸炎の発生率を減少させ体重減少を予防できることが見出されている；したがって、壊死性腸炎、短腸症候群、敗血症、神経発達障害、および子宮外発育不全の予防または処置のための医薬としての強力な活性を示す。

【００８０】

ヒトベータディフェンシン２は、経口投与または鼻腔内投与のいずれにおいてもβ－ディフェンシンは体重減少を緩和し、腸管の健康を改善し、重要なことにプレドニゾロン／デキサメタゾンおよびシクロスポリンならびに抗ＴＮＦ－αなどの強力な免疫抑制薬と同等に疾患活動性指標を減少させることが、重症腸炎および腸内毒素症（ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞移入）の治療動物モデルにおいて示されており、前述の免疫抑制薬は全て成人におけるクローン病および潰瘍性大腸炎（Ｕｌｃｅｒａｔｉｖｅ　Ｃｏｌｏｉｔｉｓ）などの結腸炎の処置で日常的に使用されており、したがって、壊死性腸炎を有する早期産児の予防的処置または治療上の処置としての強力な活性を示す。

【００８１】

β－ディフェンシンがミエロペルオキシダーゼ活性の減少によって腸の健康および機能を正常化でき、したがって早期産児における腸の健康を改善する方法を提供することが実証された。

【００８２】

ヒトベータディフェンシン２は、気道過敏症の増大を予防し；肺コンプライアンスの減少を防止し；肺炎症を防止し；ＢＡＬＦ中への好中球、好酸球、およびマクロファージの遊走を防止し、肺組織ホモジネート中のＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、およびＩＬ－１３の濃度を正常化できることが見出され；したがって、早期産児における呼吸器疾病および肺の炎症状態（肺炎など）および敗血症の予防のための医薬としての強力な活性を示す。

【００８３】

特に、ヒトベータディフェンシン２およびヒトディフェンシン５は、シクロスポリンでの移植片対宿主病の標準的な処置と同等かそれを超えて死亡率および体重減少を劇的に減少させることが、移植片対宿主病のマウスモデルにおいて証明された。ディフェンシンが小腸および大腸ならびに肝臓の組織学スコアを減少させることがさらに実証され、これらは全て改善された腸の健康および腸の完全性を示唆する。ディフェンシンでの処置は、腸上皮／固有層でのＣＤ４５＋白血球の浸潤ならびに腸管Ｔ細胞および骨髄性細胞の浸潤を低下させた。ディフェンシンでの予防的な処置はまた、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６の低下ならびにＩＬ－１０の誘発も示した。ディフェンシンでの予防的処置はさらに、骨髄性細胞由来のＩＬ－１βの低下（脾臓のＦＡＣＳ分析）およびＴｈ１サイトカイン（特に、ＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γ）産生の低下を示した。

【００８４】

ヒトベータディフェンシン２は、気道過敏症の予防によって肺機能を改善し；肺コンプ

ライアンスの減少を防止し；肺炎症を防止し；ＢＡＬＦ中への好中球、好酸球、およびマクロファージの遊走を防止し、肺組織ホモジネート中のＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、およびＩＬ－１３の濃度を正常化できることが見出された；したがって、早期産児における呼吸器疾病および肺の炎症状態（肺炎など）および敗血症の予防のための医薬としての強力な活性を示す。

【００８５】

ヒトベータディフェンシン２は、気道過敏症を軽減し；肺コンプライアンスを増加させ；肺炎症を軽減し；ＢＡＬＦ中の好中球数、好酸球数、およびマクロファージ数を減少させ、肺ホモジネート中のＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３の濃度を正常化できることが見出され；したがって、早期産児における肺の炎症状態（肺炎など）および敗血症の処置のための医薬としての強力な活性を示す。

【００８６】

ヒトベータディフェンシン２は、免疫系をリバランスしてＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３の組織サイトカイン産生を正常化できることが見出されている。

【００８７】

驚いたことに、ディフェンシンの非経口投与だけでなく経口投与の両方が肺の炎症状態の予防および処置に有効であることが見出された。ｈＢＤ－２は腸から吸収されないことが知られているので、これは予想外である。この所見の利点は、補助換気されている重症の早期産児をディフェンシンの経口投与によって処置できることである。

【００８８】

ヒトベータディフェンシン２は、早期産児において腸管微生物叢を成熟および正常化させ、腸および／または肺の炎症、敗血症、呼吸器疾病、神経発達障害、ならびに子宮外発育不全を予防または処置することが見出された。

【００８９】

したがって、１つの態様では、本開示は、早期産児または早期産児を出産しようとしている女性へのディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドの投与による早期産児または早期産児を出産しようとしている母親の処置のための方法に関する。１つの実施形態では、投与は、経口、口内、舌下、直腸、膣、気管内、肺内、鼻腔内、頭蓋内、皮下、静脈内、真皮、または経皮への投与である。好ましくは、投与は経口投与である。経口投与および非経口投与は、呼吸に障害のある早期産児または人工呼吸を受けている早期産児に有利である。

【００９０】

別の態様では、壊死性腸炎、短腸症候群、敗血症、呼吸器疾病、神経発生障害、および子宮外発育不全の予防または処置のための方法であって、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群由来の哺乳動物抗菌ペプチドの有効量をかかる処置を必要とする被検体に投与することによる方法を提供する。これらの容態を、経口投与または非経口投与によって処置できる。好ましくは、投与は経口投与である。

【００９１】

提供される方法は、重要な共生細菌の存在および存在量を増加させることによって早期産児における腸微生物叢を成熟させるまたは正常化できる。提供される方法は、腸壁の粘膜比率の増加、腸絨毛高の増加、腸管杯細胞密度の増加、刷子縁の消化酵素活性の増加、および腸管ミエロペルオキシダーゼ活性の低下によって早期産児における腸管の健康を改善し、腸機能を正常化し、食物の取り込みを増加させることができる。

【００９２】

提供される方法は、ＢＡＬＦ中の白血球（例えば、好中球、好酸球、およびマクロファージ）の遊走の低下によって早期産児における呼吸器疾病、肺炎症、気道感染、呼吸不全

、肺炎、および敗血症を処置または予防できる。

【００９３】

提供される方法を使用して、呼吸急迫症候群を予防または処置できる。新生児呼吸急迫症候群（ＮＲＤＳ）、新生児の呼吸急迫症候群とも呼ばれ、または最近では界面活性物質欠損障害（ＳＤＤ）とも呼ばれ、以前にはヒアリン膜症（ＨＭＤ）と呼ばれていた乳児呼吸急迫症候群（ＩＲＤＳ）は、肺表面活性物質産生の発達不全および肺中の構造の未熟さに原因する早産児における症候群である。

【００９４】

提供される方法を使用して、気管支肺異形成を予防または処置することもできる。気管支肺異形成（ＢＰＤ；以前は、乳児期慢性肺疾患）は、早産児、通常は酸素補給で処置された早産児、が長期の酸素を必要とする慢性肺疾患である。この疾患は、低出生体重の乳児および呼吸急迫症候群（ＲＤＳ）を処置するために長期間の機械的換気を受けている乳児においてより一般的である。この疾患は顕著な罹病率および死亡率をもたらす。

【００９５】

本方法は、本明細書中に記載の前述の容態の１つを罹患している早期産児由来の肺組織ホモジネート中のサイトカイン産生（例えば、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、およびＩＬ－３３）を正常化することもでき、したがって、ＢＡＬＦ中への炎症性細胞の遊走にも関わらず、サイトカインストームを予防できる。

【００９６】

提供される方法は、転写レベルでの変化を介して本明細書中に記載の前述の容態の１つを罹患している被験体の細菌表現型ならびに肺および／もしくは腸の細菌叢の構造および組成、または肺および／もしくは腸のメタボロームを変えることによって肺および／または腸の炎症を処置または予防できる。

【００９７】

理論に拘束されないが、経口投与を使用して認められる効果は、いわゆる腸肺相関により肺に対する効果を有し得る腸微生物叢および腸メタボロームの変化に寄与する可能性がある。喘息、ＣＯＰＤ、および嚢胞性線維症などの慢性肺障害は全て、腸疾患発現の構成要素の１つを示し、このことは、人体のこれらの２つの粘膜部位間に重要なクロストークが存在し、かつ種々の呼吸器疾患が、気道微生物叢だけでなく腸管微生物叢の腸内毒素症に関連していることを示す（Ｍａｒｓｌａｎｄ　ｅｔ　ａｌ，２０１５）。帝王切開による誕生は、乳児期の腸管微生物叢の多様性を減少させその組成を変え、かつ同時に小児期の喘息素因に関連する（Ｊａｋｏｂｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ，２０１４）。

【００９８】

片利共生微生物は、主に宿主－微生物相互作用を媒介する小分子の産生によって、先天性免疫応答および適応免疫応答を調整しかつ病原性刺激の活性化閾値に影響を及ぼす（Ｄｏｎｉａ　ａｎｄ　Ｆｉｓｈｂａｃｋ，２０１５）。上皮関門が、微生物が主に腸に閉じ込められることを確実にする一方で、微生物の代謝産物は上皮関門を透過でき、それらは宿主循環系中に侵入し蓄積でき、そこでそれらは免疫細胞によって感知される（Ｄｏｒｒｅｓｔｅｉｎ，２０１４）。Ｔｒｏｍｐｅｔｔｅ，２０１３は、飼料中の発酵性繊維が腸のみならず肺の微生物叢の組成、特にＦｉｒｍｉｃｕｔｅｓのＢａｃｔｅｒｉｏｄｅｔｅｓに対する比を変化させ、後者が短鎖脂肪酸の局所レベルおよび全身レベルの増加をもたらし、これが今度は樹状細胞の造血および機能性に影響を及ぼし、それにより肺での免疫学的環境を形作りアレルギー性炎症の重症度に影響を及ぼすことを、マウスにおいて実証した。Ｓｃｈｉｒｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ（２０１６）は、サイトカイン応答の個体間変動が特定の微生物および微生物機能に関連することを、ヒト機能ゲノミクスプロジェクトにおいてさらに実証した。検出された関連性の大部分はサイトカインおよび刺激の両方に特異的であり、免疫系が微生物体および微生物の生成物を高い特異性で認識し相互作用すること、およびこれらの微生物因子が特定の免疫学的表現型に関連することを示唆する。ＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γの産生能力はマイクロバイオームにより強く影響を受けるようで

あったのに対して、ＩＬ－１β、ＩＬ－６ならびにＴｈ１７由来のＩＬ－１７およびＩＬ－２２などの他のサイトカインは、より低いが、より特異的な腸微生物叢との関連を示した。

【００９９】

有効量のα－および／またはβ－ディフェンシンおよび／またはカテリシジンおよび／またはラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームを早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することによる、早期産児における壊死性腸炎、短腸症候群、および子宮外発育不全を処置する方法をさらに提供する。

【０１００】

有効量のα－および／またはβ－ディフェンシンの投与による、早期産児における壊死性腸炎、敗血症、および神経発生障害を予防する方法をさらに提供する。

【０１０１】

本明細書中に記載の処置方法を、少なくとも１つの哺乳動物α－および／またはβ－ディフェンシンを、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、哺乳動物リゾチーム、哺乳動物カテリシジン、界面活性物質、プレバイオティクス、プロバイオティクス、糖質コルチコイド、抗生物質、免疫抑制薬、ＧＬＰ－２もしくはＧＬＰ－２アナログ、またはこれらの組み合わせのいずれかと組み合わせて含む組成物の投与によって行うことができる。ディフェンシンを、個別に投与するか、これらの治療薬の１つまたは複数と共に投与できる。ディフェンシンを、早期産児において使用できる他の医薬と共に投与するか、早期分娩において母親に投与することもできる。

【０１０２】

重要なことに、開示の方法を、早期産児ならびに／または妊娠中の母親が抗生物質の処置もしくは免疫抑制療法、または肺または腸微生物叢に対して負の効果がある別の処置を受けていた乳児の腸および／または肺でのディスバイオシスの微生物叢／メタボロームの処置、予防、または正常化のために使用できる。

【０１０３】

腸および／または肺の微生物叢の正常化はまた、メタボロームを、酪酸塩を相対的により多く産生し、かつ酢酸塩を相対的により少なく産生するメタボロームに変化させることを含み得る。

【０１０４】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成

本発明の哺乳動物アルファディフェンシン、哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、および哺乳動物リゾチームを含む哺乳動物抗菌ペプチドを、当該分野で公知の従来の方法を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成によって調製できる。種々の市販の合成装置（例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．、Ｂｅｃｋｍａｎなどの自動合成機）が利用可能である。合成機の使用により、天然に存在するアミノ酸を、非天然アミノ酸、特にＤ異性体（またはＤ体）（例えば、Ｄ－アラニンおよびｄ－イソロイシン）、ジアステレオ異性体、および異なる長さまたは官能性を有する側鎖などと置換できる。特定の配列および調製様式は、利便性、経済性、および必要な純度などによって決定されるであろう。化学的連結を、結合に都合の良い官能基（アミドまたは置換アミン形成、例えば還元的アミノ化のためのアミノ基、チオエーテルまたはジスルフィド形成のためのチオール基、およびアミド形成のためのカルボキシル基など）を含む種々のペプチドまたはタンパク質に与えてよい。必要に応じて、合成中または発現中にペプチド中に種々の基を導入でき、それは、他の分子または表面への連結を可能にする。したがって、チオエーテルを作製するためにシステインを使用でき、金属イオン複合体への連結のためにヒスチジンを使用でき、アミドまたはエステルの形成のためにカルボキシル基を使用でき、アミドの形成のためにアミノ基を使用できる、などである。

【０１０５】

哺乳動物アルファディフェンシン、哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシ

ジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、もしくは哺乳動物リゾチーム、またはその機能的等価物を含む哺乳動物抗菌ペプチドを、従来の組換え合成方法にしたがって単離および精製することもできる。組換え合成を、適切な発現ベクターおよび真核生物または原核生物の発現系を使用して行うことができる。発現宿主および培地の溶液を調製し、存在するディフェンシンを、ＨＰＬＣ、排除クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、アフィニティクロマトグラフィまたは他の精製技術を使用して精製できる。大腸菌におけるヒトベータディフェンシン－２の組換え発現方法は、ＷＯ２０１０／００７１６６号（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ）に開示されている。

【０１０６】

哺乳動物アルファディフェンシン、哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、または哺乳動物リゾチームを含む哺乳動物抗菌ペプチドを、早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に対応するｍＲＮＡを投与することによって誘発することもできる。

【０１０７】

投薬量

哺乳動物アルファディフェンシン、哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、哺乳動物リゾチーム（ヒトアルファディフェンシン、ヒトベータディフェンシン、ヒトカテリシジン、ヒトラクトフェリン／ラクトフェリシン、ヒトリゾチームなど）を、早期産児または早期出産しようとしている母親において、好ましくは患者に対して許容され得る毒性を有して、壊死性腸炎、短腸症候群、敗血症、呼吸器疾病、神経発生障害および子宮外発育不全を予防または処置するのに有効な量で、医薬組成物中で使用することが好ましい。哺乳動物アルファディフェンシンおよび哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、哺乳動物リゾチーム（ヒトアルファディフェンシン、ヒトベータディフェンシン、ヒトカテリシジン、ヒトラクトフェリン／　ラクトフェリシン、ヒトリゾチームなど）はまた、好ましくは、処置を必要とする患者に対して許容され得る毒性を有して、肺および／または腸管での正常な微生物叢の組成を維持するか、肺および／または腸管でのディスバイオシスの微生物叢を処置または正常化するのに有効な量で、医薬組成物中で使用することが好ましい。

【０１０８】

かかる処置について、適切な投薬量は、勿論、例えば、使用される化合物の化学的性質および薬物動態学データ、各宿主、投与様式、ならびに処置される容態の性質および重症度に応じて変動するであろう。

【０１０９】

しかし、一般に、哺乳動物（例えば、ヒト）において満足のいく結果を得るために、ヒトアルファディフェンシンの指示される１日投薬量は、好ましくは約０．１ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重～約１０ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重、より好ましくは約０．５ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重～約１０ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重；例えば、１ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重～１０ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重、より好ましくは約１．２ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重～約１０ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重、好ましくは約１．２ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重～約５ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重、さらにより好ましくは１．２ｍｇ　ＨＤ５／ｋｇ体重であり、例えば、１日に最大で１回、２回または３回の分割用量で投与される。

【０１１０】

１つの実施形態では、ヒトベータディフェンシンの指示される１日投薬量は、好ましくは約０．１ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重～約１０ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重、より好ましくは約０．５ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重～約１０ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重；例えば、１ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重～１０ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重、より好ましくは約１．２ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重～約１０ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重、好ましくは約１．２ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重～約５ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重、さらにより好ましくは１．２ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇ体重であり、例えば、１日に最大で１回、２回ま

たは３回の分割用量で投与される。
【０１１１】
２つの異なるディフェンシンを１つの調剤で投与する場合、調剤は、重量基準またはモル基準で決定された等量またはほぼ等量の２つのディフェンシンを含み得る。比は異なってもよく、したがって、アルファディフェンシンのベーターディフェンシンに対する比は重量基準またはモル基準で決定される１０：１～１：１０、例えば、５：１～１：５、例えば、２：１～１：２変動する。
【０１１２】
好ましい実施形態の化合物を、哺乳動物（例えば、ヒト）に、慣習的に使用されるものと類似の投与様式によって類似の投薬量で投与できる。
【０１１３】
１つの実施形態では、１日投薬量が０．１ｍｇと１０ｍｇの間のディフェンシン／ｋｇ、例えば、０．５ｍｇと５ｍｇの間のディフェンシン／ｋｇ、例えば、１ｍｇと２ｍｇの間のディフェンシン／ｋｇ、例えば、１．２ｍｇディフェンシン／ｋｇ／日である、本明細書中に記載の方法を提供する。
【０１１４】
１つの実施形態では、１日投薬量が０．１ｍｇと１０ｍｇの間のカテリシジン／ｋｇ、例えば、０．５ｍｇと５ｍｇの間のカテリシジン／ｋｇ、例えば、１ｍｇと２ｍｇの間のカテリシジン／ｋｇ、例えば、１．２ｍｇカテリシジン／ｋｇ／日である、本明細書中に記載の方法を提供する。
【０１１５】
１つの実施形態では、１日投薬量が１ｍｇと１０００ｍｇの間のラクトフェリン／ｋｇ、例えば、５ｍｇと５００ｍｇの間のラクトフェリン／ｋｇ、例えば、５０ｍｇと２００ｍｇの間のラクトフェリン／ｋｇ、例えば、１００ｍｇ／ｋｇラクトフェリン／ｋｇ／日である、本明細書中に記載の方法を提供する。
【０１１６】
１つの実施形態では、１日投薬量が１ｍｇと１０００ｍｇの間のリゾチーム／ｋｇ、例えば、５ｍｇと５００ｍｇの間のリゾチーム／ｋｇ、例えば、５０ｍｇと２００ｍｇの間のリゾチーム／ｋｇ、例えば、１００ｍｇ／ｋｇリゾチーム／ｋｇ／日である、本明細書中に記載の方法を提供する。
【０１１７】
１つの実施形態では、１日投薬量が１μｇと１０００μｇの間のラクトフェリシン／ｋｇ、例えば、１μｇと５００μｇの間のラクトフェリン／ｋｇ、例えば、５μｇと１００μｇの間のラクトフェリシン／ｋｇ、例えば、１０μｇ／ｋｇラクトフェリシン／日である、本明細書中に記載の方法を提供する。
【０１１８】
１つの実施形態では、ヒトカテリシジンの表示の１日投薬量は、好ましくは、約０．１ｍｇカテリシジン／ｋｇ体重～約１０ｍｇカテリシジン／ｋｇ体重であり、例えば、１日に最大で１回、２回または３回の分割用量で投与される。１つの実施形態では、ヒトラクトフェリンの表示の１日投薬量は、好ましくは、約１ｍｇ／ｋｇ体重～約１０００ｍｇラクトフェリン／ｋｇ体重であり、例えば、１日に最大で１回、２回または３回の分割用量で投与される。
【０１１９】
１つの実施形態では、ヒトラクトフェリシンの表示の１日投薬量は、好ましくは、約１μｇ／ｋｇ体重～約１０００μｇ／ｋｇ体重であり、例えば、１日に最大で１回、２回または３回の分割用量で投与される。
【０１２０】
１つの実施形態では、ヒトリゾチームの表示の１日投薬量は、好ましくは、約１ｍｇリゾチーム／ｋｇ体重～約１０００ｍｇリゾチーム／ｋｇ体重であり、例えば、１日に最大で１回、２回または３回の分割用量で投与される。

【０１２１】
ある実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、哺乳動物アルファディフェンシンおよび／または哺乳動物ベータディフェンシンおよび／または哺乳動物カテリシジンおよび／または哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／または哺乳動物リゾチーム（ヒトアルファディフェンシンおよび／またはヒトベータディフェンシンおよび／またはヒトカテリシジンおよび／またはヒトラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／またはヒトリゾチームなど）を、単位投薬形態あたり約０．０１ｍｇ以下～約１５００ｍｇ以上の量で、好ましくは約０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、または０．０５ｍｇ～約１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、または１０００ｍｇ、より好ましくは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、または２５ｍｇ～約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００ｍｇの量で含み得る。しかし、ある実施形態では、前述の投薬量より高いまたは低い投薬量が好ましいかもしれない。当業者は、適切な濃度および投薬量を容易に決定できる。

【０１２２】
ある実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、哺乳動物アルファディフェンシン（ヒトアルファディフェンシンなど）を含む。他の実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、哺乳動物ベータディフェンシン（ヒトベータディフェンシンなど）を含む。さらなる実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、哺乳動物アルファディフェンシンおよび哺乳動物ベータディフェンシン（ヒトアルファディフェンシンおよびヒトベータディフェンシンなど）を含み、ここで、アルファディフェンシンおよびベータディフェンシンは、容積モル濃度基準またはｍｇ／ｍＬ基準において等量で存在する。他の実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、哺乳動物カテリシジン（ヒトカテリシジンなど）を含む。他の実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン（ヒトラクトフェリン／ラクトフェリシンなど）を含む。他の実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、哺乳動物リゾチーム（ヒトリゾチームなど）を含む。

【０１２３】
１つの実施形態では、哺乳動物のアルファディフェンシンおよび／もしくはベータディフェンシンならびに／またはカテリシジンならびに／またはラクトフェリン／ラクトフェリシンならびに／またはリゾチームを、少なくとも１日１回、例えば、少なくとも１日２回、例えば、少なくとも１日３回投与する。

【０１２４】
経口投与または非経口投与のための製剤
哺乳動物のアルファディフェンシン、ベータディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン／ラクトフェリシン、およびリゾチームを、任意の従来の経路による投与のために製剤化された組成物中で治療的に使用できる。１つの実施形態では、投与は、経口、口内、舌下、直腸、膣、気管内、肺内、鼻腔内、頭蓋内、皮下、静脈内、真皮または経皮の投与である。好ましくは、投与は経口である。

【０１２５】
１つの実施形態では、開示の方法にしたがう少なくとも１つの哺乳動物α－ディフェンシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物β－ディフェンシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物カテリシジンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物リゾチームの投与は一般に、鼻腔内または肺内である。鼻腔内および肺内の投与は、肺薬物送達において標準的である。１つの実施形態では、開示の方法にしたがう少なくとも１つの哺乳動物α－ディフェンシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物β－ディフェンシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物カテリシジンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物リゾチームの投与は、経口である。

【０１２６】
１つの実施形態では、開示の方法にしたがう少なくとも１つの哺乳動物α－ディフェンシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物β－ディフェンシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物カテリシジンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／または少なくとも１つの哺乳動物リゾチームの投与は、皮下または静脈内である。
【０１２７】
いくつかの実施形態内では、好ましい実施形態の組成物を、凍結乾燥物としての安定性を与える適切な賦形剤を利用して凍結乾燥物として製剤化し、その後に再水和できる。哺乳動物アルファディフェンシンおよび／または哺乳動物ベータディフェンシンおよび／または哺乳動物カテリシジンおよび／または哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／または哺乳動物リゾチーム（ヒトアルファディフェンシンおよび／またはヒトベータディフェンシンおよび／またはヒトカテリシジンおよび／またはヒトラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／またはヒトリゾチームなど）を含む医薬組成物を、従来の方法にしたがい、例えば、混合、造粒、コーティング、溶解、または凍結乾燥プロセスによって製造できる。１つの好ましい実施形態では、哺乳動物アルファディフェンシンおよび／または哺乳動物ベータディフェンシンおよび／または哺乳動物カテリシジンおよび／または哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／または哺乳動物リゾチームを含む医薬組成物を、無菌かつ等張の液剤として製剤化する。
【０１２８】
薬学的に許容され得る担体および／または希釈剤は、当業者によく知られている。液剤として製剤化される組成物について、許容され得る担体および／または希釈剤は生理食塩水を含み、滅菌水を含めるべきであり、組成物は、任意選択的に、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、および他の一般的な添加物を含んでよい。開示の組成物を、経口投与用の多種多様な製剤に製剤化できる。固体調製物は、散剤、錠剤、ドロップ、カプセル、カシェ、ロゼンジ、および分散性顆粒を含み得る。経口投与に適切な他の形態は、液体調製物（乳剤、シロップ、エリキシル、水溶液、水性懸濁剤、練り歯磨き、ゲル歯磨剤、チューインガムを含む）、または使用前の液体調製物（液剤、懸濁剤、および乳剤など）への即時変換を意図する固体調製物を含み得る。
【０１２９】
開示の組成物を、口内、舌下、経口、直腸、膣、真皮、経皮、頭蓋内、皮下、または静脈内への投与のための多種多様な製剤に製剤化できる。製剤は、（哺乳動物アルファディフェンシンおよび／または哺乳動物ベータディフェンシンおよび／または哺乳動物カテリシジンおよび／または哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシンおよび／または哺乳動物リゾチーム、ならびに他の任意選択的な有効成分に加えて）当該分野で公知の担体、充填剤、崩壊薬、流動調整剤、糖類および甘味料、香料、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、可溶化剤、浸透圧制御のための塩、緩衝液、希釈剤、分散剤および表面活性剤、結合剤、潤滑剤、ならびに／または他の薬学的賦形剤を含んでよい。この分野の当業者は、哺乳動物アルファディフェンシン、哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、および哺乳動物リゾチームを、適切な様式で、許容された手法（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｇｅｎｎａｒｏ（１９９０）に記載の手法など）にしたがってさらに製剤化できる。
【０１３０】
哺乳動物アルファディフェンシン、哺乳動物ベータディフェンシン、哺乳動物カテリシジン、哺乳動物ラクトフェリン／ラクトフェリシン、および哺乳動物リゾチーム（ヒトアルファディフェンシン、ヒトベータディフェンシン、ヒトカテリシジン、ヒトラクトフェリン／ラクトフェリシン、およびヒトリゾチームなど）を単独で使用するか、１つ、２つ、またはそれを超える他の医薬化合物または原体（例えば、界面活性物質、プレバイオティクス、プロバイオティクス、糖質コルチコイド、抗生物質、免疫抑制薬、ＧＬＰ－２

ｏｒ　ＧＬＰ－２アナログ、もしくはこれらの組み合わせ）および／または１つまたは複数の薬学的に許容され得る賦形剤（複数可）との併用療法で使用できる。

【０１３１】

気道投与

本発明の組成物を投与するために気道投与を使用できる。本明細書中で使用される用語「肺内投与」は、肺への局所投与を指す。本明細書中で使用される場合、用語「気管内、気管支内、または肺胞内への投与」は、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームの液剤の注入による、粉末形態でディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームを適用することによる、あるいはディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームを、安定剤または他の賦形剤を添加してまたは添加せずに、エアロゾル化されたもしくは霧状の液剤もしくは懸濁剤または吸入用の散剤もしくはゲルとしてのディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームの吸入によって気道関連部に到達させることによるかに関わらず、それによりディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームが気管内、気管支内、または肺胞内にそれぞれ適用されるようなかかる投与の全ての形態を含む。

【０１３２】

気管支内／肺胞投与方法は、当業者に周知の方法にしたがい、その中にディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームが溶解されている生理学的に許容され得る組成物の洗浄液として使用する気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）、あるいは実際に、任意の他の有効な気管支内投与形態（賦形剤を含むか含まずに、乾燥形態でのディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームを含む吸入散剤の使用、または気管支鏡検査中のディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームを含む液剤または懸濁剤または散剤の直接適用を含む）を含むが、これらに限定されない。気管内投与方法は、溶解されたディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームの類似の溶液、またはディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームの懸濁液を用いるブラインド気管洗浄、あるいはこの目的のために適切な任意の噴霧装置の使用によって得られる溶解されたディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、および／またはリゾチームの溶液、またはディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、および／またはリゾチームの懸濁液を含む噴霧液滴の吸入を含むが、これらに限定されない。

【０１３３】

別の実施形態では、気管内、気管支内、または肺胞内の投与は、生成物の吸入を含まないが、気管または下気道へのディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームの溶液、またはディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームを含む散剤またはゲルの注入もしくは適用を含む。

【０１３４】

他の好ましい投与方法は、以下のデバイスの使用を含み得る：

１．圧縮空気／酸素混合物を使用する加圧ネブライザー

２．超音波ネブライザー

３．電子マイクロポンプネブライザー

４．定量吸入器（ＭＤＩ）

５．ドライパウダー吸入器システム（ＤＰＩ），

【０１３５】

エアロゾルを、機械的換気中の挿管された患者においてａ）フェイスマスクまたはｂ）気管内チューブを介して、送達できる（デバイス１、２、および３）。患者がエアロゾル

デバイスを自分で駆動させることができる場合、患者はデバイス４および５を補助なしで使用することもできる。

【０１３６】

ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／もしくはリゾチームならびに／またはディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／もしくはリゾチームの機能的なホモログもしくはバリアントを含む溶液に好ましい濃度は、約０．１μｇ～１０００μｇ／ｍｌ溶液の範囲、例えば、約０．１μｇ～２５０μｇ／ｍｌ溶液の範囲である。

【０１３７】

肺内投与用の医薬組成物

本開示で用いる医薬組成物または医薬製剤は、薬学的に許容され得る担体、好ましくは水性のキャリアもしくは希釈剤と組み合わされ、好ましくはその中に溶解された、またはペグ化調製物としてまたは吸入を介するエアロゾルとして投与されるリポソーム調製物もしくはナノ粒子調製物として、あるいは気管支肺胞洗浄液（ｂｒｏｎｃｈｏａｌｖｅｏａｒ　ｌａｖａｇｅ）として気管支鏡を介して投与される洗浄液としてまたはブラインド気管内洗浄物もしくは洗浄液として下気道に運ばれる、ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームを含む。種々の水性担体（０．９％生理食塩水、緩衝化生理食塩水、および生理学的に適合可能な緩衝液などを含まれるが、これらに限定されない）を使用できる。組成物を、当業者に周知の従来の技術によって滅菌できる。得られた水溶液を、使用のために包装するか、無菌条件下で濾過し凍結乾燥させ、凍結乾燥した調製物を投与前に滅菌水溶液に溶解できる。

【０１３８】

１つの実施形態では、凍結乾燥させたディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシンおよび／またはリゾチームの調製物を、例えば、単回服薬単位で予め包装できる。なおさらに好ましい実施形態では、単回服薬単位は、患者に合わせて調整される。

【０１３９】

組成物は、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどの、ｐＨ調整剤および緩衝剤ならびに／または張度調整剤を含むが、これらに限定されない、薬学的に許容され得る補助剤またはアジュバントを含んでよい。

【０１４０】

製剤は、ミクロスフェア、リポソーム、マイクロカプセル、ナノ粒子などを含む、薬学的に許容され得る担体および賦形剤を含み得る。従来のリポソームは典型的には、リン脂質（中性または負電荷）および／またはコレステロールから構成される。リポソームは、水性区画に囲まれた脂質二重層に基づく小胞構造物である。リポソームは、その生理化学的性質（リン脂質二重層のサイズ、脂質組成、表面電荷、数、および流動性など）が異なり得る。リポソーム形成のために最も頻繁に使用される脂質は：１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファート（一ナトリウム塩）（ＤＭＰＡ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファート（一ナトリウム塩）（ＤＰＰＡ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファート（一ナトリウム塩）（ＤＯＰＡ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）］（ナトリウム塩）（ＤＭＰＧ）、１，２－ジパルミトイル

－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）］（ナトリウム塩）（ＤＰＰＧ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）］（ナトリウム塩）（ＤＯＰＧ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－Ｌ－セリン］（ナトリウム塩）（ＤＭＰＳ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－Ｌ－セリン）（ナトリウム塩）（ＤＰＰＳ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－［ホスホ－Ｌ－セリン］（ナトリウム塩）（ＤＯＰＳ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（グルタリル）（ナトリウム塩）、および１，１’，２，２’－テトラミリストイルカルジオリピン（アンモニウム塩）である。他の脂質またはリポソームの修飾物質と組み合わせた（例えば、コレステロールおよび／またはホスファチジルコリンと組み合わせた）ＤＰＰＣから構成される製剤が好ましい。

【０１４１】

長期循環リポソームは、血管壁透過性が増加する身体部位で血管外遊出する能力を特徴とする。最も一般的な長期循環リポソームの生成方法は、親水性ポリマーであるポリエチレングリコール（ＰＥＧ）をリポソームの外面に共有結合性に付着させることである。いくつかの好ましい脂質は：１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（アンモニウム塩）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－５０００］（アンモニウム塩）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（塩化物塩）（ＤＯＴＡＰ）である。

【０１４２】

リポソームに適用可能な脂質は、Ａｖａｎｔｉ，Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬによって提供されている。さらに、リポソーム懸濁液は、保存時のフリーラジカルおよび脂質過酸化ダメージから脂質を保護する脂質保護剤を含み得る。親油性フリーラジカルクエンチャー（α－トコフェロールなど）および水溶性鉄特異的キレート剤（フェリオキサミン（ｆｅｒｒｉｏｘｉａｎｉｎｅ）など）が好ましい。例えば、Ｓｚｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｂｉｏｅｎｇ．９：４６７（１９８０）、米国特許第４，２３５，８７１号、同第４，５０１，７２８号、および同第４，８３７，０２８号（これら全てが、本明細書中で参考として援用される）に記載の種々のリポソーム調製方法が利用可能である。別の方法は、不均一なサイズの多重層小胞を生成する。この方法では、小胞形成脂質を、適切な有機溶媒または溶媒系に溶解し、真空下または不活性ガス下で乾燥させて、脂質薄膜を形成させる。必要に応じて、薄膜を、第三級ブタノールなどの適切な溶媒に再溶解し、次いで、凍結乾燥させてより均一な脂質混合物を形成でき、この混合物はより容易に水和される粉末様形態である。この薄膜を、標的化薬およびターゲティング成分の水溶液で被覆し、典型的には１５～６０分間にわたって撹拌しながら水和させる。得られた多重層小胞のサイズ分布を、より強い撹拌条件下で水和することにより、またはデオキシコラートなどの可溶化界面活性剤の添加によって、より小さなサイズにシフトさせることができる。

【０１４３】

ミセルは、水溶液中の界面活性物質（疎水性部分および１つまたは複数のイオン性または強親水性基を含む分子）によって形成される。

【０１４４】

当業者に周知の一般的な界面活性物質を、本発明のミセルで使用できる。適切な界面活性物質は、ラウリン酸ナトリウム（ｓｏｄｉｕｍ　ｌａｕｒｅａｔｅ）、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オクタオキシエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクトキシノール９、およびＰＬＵＲＯＮＩＣ　Ｆ－１２７（Ｗｙａｎｄｏｔｔｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｃｏｒｐ．）を含む。好ましい界面活性物質は、ＩＶ注射に適合する非イオン性ポリオキシエチレン界面活性剤およびポリオキシプロピレン界面活性剤（ＴＷＥＥＮ－８０、ＰＬＵＲＯＮＩＣ　Ｆ－６８、およびｎ－オクチル－ベーター－Ｄ－グルコピラノシドなど）である。さらに、リン脂質（リポソーム生成での使用について記載の

リン脂質など）を、ミセル形成のために使用することもできる。

【０１４５】

本開示の１つの態様は、早期産児における粘膜障害を予防または処置する方法であって、ここで、前述の粘膜障害が、壊死性腸炎、急性および持続性の下痢、短腸症候群、呼吸器疾病、肺炎症、気道感染、呼吸不全、肺炎、閉塞性無呼吸、気管支肺異形成、呼吸急迫症候群、および原発性無気肺からなる群から選択され、α－ディフェンシンおよびβ－ディフェンシンからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供することである。

【０１４６】

本開示のさらなる態様は、粘膜障害が腸におよび／または肺に存在する、本明細書中に示される方法を提供することである。

【０１４７】

１つの実施形態では、粘膜障害は、腸に存在し、壊死性腸炎、急性および持続性の下痢、ならびに短腸症候群からなる群から選択される。

【０１４８】

１つの実施形態では、粘膜障害は、肺に存在し、呼吸器疾病、肺炎症、気道感染、呼吸不全、肺炎、閉塞性無呼吸、気管支肺異形成、呼吸急迫症候群、および原発性無気肺からなる群から選択される。

【０１４９】

１つの態様では、本開示は、早期産児における腸および肺での粘膜抵抗力を成熟させ免疫系をリバランスする方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている（早期分娩）女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５０】

１つの態様では、本開示は、早期産児における敗血症、呼吸器疾病、壊死性腸炎、急性および持続性の下痢、短腸症候群、神経発生障害、および子宮外発育不全を防止または処置する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５１】

１つの態様では、本開示は、早期産児において腸管の健康を改善する（すなわち、ミエロペルオキシダーゼ活性を減少させる）方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５２】

１つの態様では、本開示は、早期産児における壊死性腸炎、腸の未熟さ、運動不全（ｄｙｓｍｏｌａｌｉｔｙ）、腸透過性の増加、異常な微生物叢、および敗血症を予防および処置する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することによって腸管の健康を改善することを含む、方法を提供する。

【０１５３】

１つの態様では、本開示は、早期産児において短腸症候群を防止または処置する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドならびに可能な１つまたは複数のＧＬＰ－２またはＧＬＰ－２アナログを含む組成物

を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５４】

１つの態様では、本開示は、早期産児において子宮外発育不全を防止または処置する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することによって腸管の健康を改善することを含む、方法を提供する。

【０１５５】

１つの態様では、本開示は、早期産児において神経発達障害、白質傷害、脳性麻痺、精神遅滞、および感覚障害を予防および軽減する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５６】

１つの態様では、本開示は、早期産児において呼吸器疾病、肺炎症、気道感染、呼吸不全、肺炎、および敗血症を予防する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５７】

１つの態様では、本開示は、早期産児において組織学的肺炎症および気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数を低減する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５８】

１つの態様では、本開示は、早期産児において炎症性サイトカイン産生の正常化によって炎症応答を正常化して免疫応答をリバランスしサイトカインストームを予防する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１５９】

１つの態様では、本開示は、早期産児において肺コンプライアンスを増加させ、気道過敏症を軽減し、かつ／または最大呼気流量を増加させる方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１６０】

１つの態様では、本開示は、早期産児において肺機能および肺コンプライアンスを増加させ、気道過敏症を軽減し、かつ／または最大呼気流量を増加させる方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１６１】

１つの態様では、本開示は、早期産児における早期卵膜破壊、母体感染、帝王切開による分娩、出生時および出生後の広域抗生物質曝露、ならびに他の腸改変薬への曝露後の感染症を予防および／または治療する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェン

シン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１６２】

１つの態様では、本開示は、早期産児において遺伝子豊富度を増大させ、ヒュレー数を増加させ、細菌の存在を増加させ、細菌存在量を増加させ、腸または肺の微生物叢由来のブチラート産生を増加させ、かつ／またはアセタート産生を減少させる方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１６３】

１つの態様では、本開示は、早期産児において腸または肺または皮膚における正常な微生物叢を成熟させ、維持し、かつ／または安定化する方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１６４】

１つの態様では、本開示は、早期産児の腸でのＡｌｌｏｂａｃｕｌｕｍ、Ａｌｌｏｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ａｋｋｅｒｍａｎｓｉａ、Ｂａｒｎｅｓｉｅｌｌａ、Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ、Ｆａｅｃａｌｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａ、Ｒｏｔｈｉａ、およびＶｅｉｌｌｏｎｅｌｌａの存在量を増加させる方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１６５】

１つの態様では、本開示は、早期産児における食物の取り込みおよび体重増加を増大させる方法であって、α－ディフェンシン、β－ディフェンシン、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、およびリゾチームからなる群から選択される少なくとも１つの抗菌ペプチドを含む組成物を早期産児または早期産児を出産しようとしている女性に投与することを含む、方法を提供する。

【０１６６】

実施例

実施例１．ディフェンシンでの予防的処置による腸微生物叢の調整。

材料と方法：

実験デザインの全体像を、図１の上のパネル「予防研究」に示す。

【０１６７】

マウス：マウスを、群あたり４つのケージに３匹ずつ収容した。飼料摂取を午後６時の消灯直前に毎日記録した。各マウスを、群およびケージの両方に関して順序をかえて実験手順に供した。マウスを、ＳＰＦ標準条件にて１２時間の明／暗サイクル下で室温にて維持した。

【０１６８】

飼料：服薬について、平均体重は、マウスあたり２５グラムと推定された。マウスは、マウスあたり１日およそ３グラムの飼料を食べる。

【０１６９】

治療レジメン：マウスに、高脂肪食（ＨＦＤ）または低脂肪（ＬＦ）対照食のいずれかを与えた。ＨＦＤは、以下の４つの亜群を含んだ；ａ）ｈＢＤ－２、ｂ）ＨＤ５、ｃ）ｈＢＤ－２／ＨＤ５、およびｄ）ディフェンシンを補足していない標準ＨＦＤ。ディフェンシン濃度は、１．２ｍｇ　ｈＢＤ－２／ｋｇマウス／日であった。ＨＤ５を、ｈＢＤ－２

と等モル濃度で与えた。併用群には、５０％ｈＢＤ－２＋５０％ＨＤ５を与えたので、ディフェンシンの総量は残りの試験群と同等であった。

【０１７０】

試験：

微生物分析を、腸管の微生物叢を研究するために行った。経時的１６Ｓ特徴づけを、６０匹のマウス由来の４つずつの試料、合計２４０試料に対して行った。各マウスから飼料変更前、飼料変更の１週間後、飼料変更の４週間後、および終了時に試料を採取し、したがって、ディフェンシン処置の結果としての糞便微生物叢の完全な特徴づけを確実にした。

【０１７１】

結果：

体重変化。食物摂取は3つ全ての実験食群で類似していたが、両高脂肪食（ＨＦＤ）群（ａ）ｈＢＤ－２処置群およびｄ）処置なしの標準ＨＦＤ群）はどちらも、１０週間の研究期間にわたって低脂肪食（ＬＦＤ）基準群より有意に多く体重が増加した（＊ｐ＜０．０００１、二元配置ＡＮＯＶＡ、Ｔｕｋｅｙ事後検定）。しかし、ＨＦＤ＋ｈＢＤ－２群は、ＨＦＤ基準群より体重増加が有意に低かった（＊ｐ＝０．００２８）。

【０１７２】

微生物叢。ｈＢＤ－２は主に微生物の存在に影響を及ぼしたのに対して、ＨＤ５およびｈＢＤ－２＋ＨＤ５は、主に微生物存在量に影響を及ぼした（図５および６）。存在は、存在する異なる細菌の数を表す。存在の増加は、より多様な微生物叢を意味し、過去十年間にわたって多くの刊行物においてより健康な微生物叢と関連付けられており、場合によっては動物モデルにおいて特定の疾患の改善と関連付けられている。存在量は、存在する所与の株の細菌数を表す。理想的には、重要な種と同定されているＢａｒｎｅｓｉｅｌｌａ、ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ種、およびＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅなどの「善玉」菌の存在量が増加する一方で、例えば、病原体の存在量が減少することが望まれる。Ａｌｌｏｂａｃｕｌｕｍの存在量の統計的に有意な増加が、ＨＤ５での予防後の小腸で認められた（ｐ＜０．０２；図７）。Ａｌｌｏｂａｃｕｌｕｍは、短鎖脂肪酸産生種である。Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌａｃｅａｅの存在量が低下する傾向が、ｈＢＤ－２での予防的処置後の結腸で認められた（ｐ＝０．１；図８）。結腸でのＢａｒｎｅｓｉｅｌｌａの存在量の統計的に有意な増加が、ｈＢＤ－２での予防的処置後に認められた（ｐ＜０．０３；図９）。Ｂａｒｎｅｓｉｅｌｌａは、入院患者において観察され得る、抗生物質耐性病原性細菌の腸管優位を排除し防御できることが認められている細菌である。Ｂａｒｎｅｓｉｅｌｌａの存在量は、いくつかの免疫調節細胞の量に対応している。結腸でのＢａｒｎｅｓｉｅｌｌａレベルが高いほど、脾臓および肝臓で列挙される辺縁帯Ｂ細胞が増加しナチュラルキラーＴ細胞は不変であった。さらに、Ｂａｒｎｅｓｉｅｌｌａを優先する微生物組成における変化と関節炎耐性の間の直接的な関連が、マウスにおいて実証されている。ＩＬ－１０－／－マウスにおける結腸炎の発症では、より高いＢａｒｎｅｓｉｅｌｌａ表現型のレベルは、より低い疾患活動性レベルと相関した。

【０１７３】

結論：

早産児は、ほぼ例外なく帝王切開で誕生する。手順が無菌条件下で行われるため、乳児は、特に腸管、肺、および皮膚の大きな粘膜表面に天然の微生物集団を持たずに誕生する。最近の治療のコクラン解析（Ａｌｆａｌｅｈ ａｎｄ Ａｎｎｅｂｒｅｅｓ，２０１４）によって早産児で今日承認されている唯一の処置は、微生物叢を樹立するために外部供給源を介してこれらの乳児の粘膜表面に微生物を定植させるべきという理論に基づくプロバイオティクスである。胎児は、第３期の当初からディフェンシンを産生し始めて、天然産道を介した出生後の大規模な細菌コロニー形成のために粘膜表面を準備し、したがってＥＬＢＷ早産児は、ディフェンシンの天然の産生がまったくないか非常に少ししか持たずに誕生する。上記の例は、腸管でのディフェンシンが重要な共生細菌の促進および正常な微生物叢の維持に大きな影響を及ぼすこと、および２つの異なるディフェンシンの微生物

叢調整効果が異なることを実証するのに役立つ。

【０１７４】

実施例２．ディフェンシンでの介在処置による腸微生物叢の調整。

材料と方法：

研究デザインの全体像を、図１の下のパネルの「治療研究」に示す。

【０１７５】

マウスおよび食餌。本実験では、食餌誘発性肥満マウスにおける微生物叢に対するｈＢＤ－２およびＨＤ５の効果を解明する。介入に先立ち、１３週間のランイン期間として、マウスに超ＨＦＤ（脂肪由来のエネルギー６０％）を与えた。ランイン期間中に最低で１２グラムの体重増加（初期体重のおよそ５０％）の基準を満たしているマウスのみを、最終解析に含めた。これらの基準を満たさなかったマウスは、階層「キーパー」として各ケージに留めた。キーパーは、全ての実験的試験を体験したが、解析からは除外された。

【０１７６】

処置レジメン。介入前に、全てのマウスをＭＲスキャンした。マウスのケージを、それらの脂肪量に基づいて実験群に割り付けた。その後の全ての測定値を、介入前の同じマウス由来のデータとペアにした。ＬＦＤ（低脂肪食）基準群を、並行して実施した。介入についての対照として以下のさらなる２群を含めた：ａ）超ＨＦＤおよびｂ）ＬＦＤ。介入中、実験マウスは超ＨＦＤを継続した。マウスに実験食を１０週間与えた。マウスを、実験を通して、ケージあたり４匹、群あたり３ケージで共収容した。全試験を、３日間にわたって、１ケージ／群／日で行った。

【０１７７】

試験：

微生物分析を、腸管の微生物叢を研究するために行った。経時的１６Ｓ特徴づけを、６０匹のマウス由来の４つずつの試料、合計２４０試料に対して行った。各マウスから飼料変更前、飼料変更の１週間後、飼料変更の４週間後、および終了時に試料を採取し、したがって、ディフェンシン処置の結果としての糞便微生物叢の完全な特徴づけを確実にした。

【０１７８】

結果：

体重変化－ｈＢＤ－２。標準高脂肪食（ＨＦＤ）摂取群は、全研究期間を通して等しく飼料を摂取し、最初の１３週間に等しい脂肪量および除脂肪量で同一の体重増加を示したので、食事介入前の出発点は同じであった。体重増加は、低脂肪食摂取（ＬＦＤ）群より有意に大きかった（＊ｐ＜０．０５　二元配置ＡＮＯＶＡ）。食事介入後、ＨＦＤ群は体重が増加し続けたが、ＨＦＤ＋ｈＢＤ－２群は、有意ではないが、食事介入後の最初の４週間の体重増加は小さい傾向があった（＊ｐ＝０．０７、二元配置ＡＮＯＶＡ）。４週間～研究期間の終了で、ＨＦＤ＋ｈＢＤ－２群は、標準ＨＦＤ群と類似する体重増加を認めた（＊ｐ＝０．８２、二元配置ＡＮＯＶＡ）。

【０１７９】

体重変化－ＨＤ５。全てのＨＦＤ摂取群は、研究期間中の飼料摂取は同じであり、１３週間のランイン期間の体重増加は等しかった。食事介入後、ＨＦＤ＋ＨＤ５を摂取した群は、ＨＦＤ対照よりも体重増加が有意に少なかった（＊ｐ＜０．０５、二元配置ＡＮＯＶＡ）。さらに、ＨＦＤ＋ＨＤ５群に脂肪率の減少傾向が認められ、ＨＦＤ＋ＨＤ５における有意に低い脂肪率が、ＨＦＤ対照と比較して飼料変更から４週間後に測定された（＊ｐ＝０．００９　二元配置ＡＮＯＶＡ）。

微生物叢。

【０１８０】

両ディフェンシンは、細菌の存在および細菌の非存在に大きな影響を及ぼすことが示された（すなわち、「善玉」菌のコロニー形成を促進し、「悪玉」菌または病原体のコロニー形成を減少させて微生物叢を変化させる能力）（図１０）。ＨＤ５が結腸でのＡｌｌｏｐｒｅｖｏｔｅｌｌａの存在量を統計的に有意に増加させた（ｐ＜０．０２）のに対して、ｈＢＤ－２はＡｌｌｏｐｒｅｖｏｔｅｌｌａの存在量に影響を及ぼさなかった（図１１

）。ｈＢＤ－２は、小腸でおよび結腸での両方におけるＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅの相対存在量を劇的にかつ統計的に有意に増加させた（それぞれ、ｐ＜０．０００１およびｐ＜０．０４；図１２）。ＨＤ５は小腸でのＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅの存在量を増加させる傾向があった（図１２）。

【０１８１】

結論：

早産児は、ほぼ例外なく帝王切開で誕生する。手順が無菌条件下で行われるため、乳児は、特に腸管、肺、および皮膚の大きな粘膜表面に天然の微生物集団を持たずに誕生する。最近の治療のコクラン解析（Ａｌｆａｌｅｈ　ａｎｄ　Ａｎｎｅｂｒｅｅｓ，２０１４）によって早産児で今日承認されている唯一の処置は、天然の微生物叢を樹立するために外部供給源を介してこれらの乳児の粘膜表面に微生物を定植させるべきという理論に基づくプロバイオティクスである。胎児は、第３期の当初からディフェンシンを産生し始めて、天然産道を介した出生後の大規模な細菌コロニー形成のために粘膜表面を準備する。したがって、上記の例は、腸管でのディフェンシンが正常な微生物叢の樹立および維持に大きな影響を及ぼすこと、および２つの異なるディフェンシンの微生物叢調整効果が異なることを実証するのに役立つ。

【０１８２】

実施例３．壊死性腸炎の早産仔ブタモデルにおける経口哺乳動物α－およびβ－ディフェンシンでの予防的処置の有効性を決定するための方法。

材料と方法：

処置レジメン：２４匹の早産仔ブタを、妊娠１０５日目に帝王切開によって分娩させる。新生仔ブタを、温度および酸素供給を制御した保育器に直ちに移す。呼吸が安定したときに、仔ブタに臍動脈カテーテルおよび口胃カテーテルを留置する。全ての仔ブタは最初に、食道管を介して非経口栄養が提供される。経腸規定食は、０～２歳の乳児に与えるために使用される３つの市販品から作製する。仔ブタを出生時体重および性別によって層別化し、対照およびｈＢＤ－２を受ける介入群に割り付ける。

【０１８３】

試験：

不快感または虚弱の兆候（起立の回避、手足の冷え、膨隆腹、脱水、蒼白色の肌、下痢、および血性下痢）を記録する。仔ブタを毎日計量し、摂食量を記録する。

【０１８４】

ラクツロースおよびマンニトールを使用するｉｎ　ｖｉｖｏ腸管透過性試験を行う。５日目に、全ての仔ブタを安楽死させ、組織を採取し、巨視的ＮＥＣ採点システムを適用する。簡潔に述べれば、胃腸管の５つの各領域（胃、近位、中位、および遠位の小腸、ならびに結腸）を、炎症および壊死を示す病理学的変化について巨視的に評価する。病変を以下のように格付けする：１＝病変なし；２＝局所充血；３＝充血、広範な浮腫および局所出血；４＝大量の出血；５＝局所壊死および腸壁気腫症、および６＝広範な貫壁性壊死および腸壁気腫症。動物を、少なくとも１つの領域で疾患最小スコアの３が観察された場合にＮＥＣ陽性と指定する。

【０１８５】

粘膜比率を決定するために、各小腸領域から１０ｃｍのセグメントを取り出し、長手方向に切り開く。粘膜をプラスチック製のスライドで穏やかにこすり落とし、粘膜の比率を湿重量基準で測定する。心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃の重量を、湿重量基準で決定する。

【０１８６】

小腸の近位領域および遠位領域ならびに結腸由来のＰＦＡ固定腸管試料を、パラフィン包埋し、組織形態学および組織病理学のためにＨＥで染色する。遠位小腸および結腸中の杯細胞の定量のために、組織スライドをアルシアンブルーおよび過ヨウ素酸シッフで染色する。

【０１８７】

炎症の尺度として、組織ミエロペルオキシダーゼ活性をアッセイする。ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＩＬ－８、およびＴＮＦ－αを、遠位小腸由来の組織試料について測定する。刷子縁酵素活性を、各仔ブタ由来の小腸の近位領域、中位領域、および遠位領域由来の瞬間凍結試料で測定する。

【０１８８】

実施例４．１４週治療ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞移入誘発性結腸炎マウスモデルにおけるｓ．ｃ．ｈＢＤ－２対ｓ．ｃ．抗ＴＮＦ－α（エンブレル）および腹腔内デキサメタゾンの有効性。

材料と方法：

処置レジメン：ケージあたり５匹の群で収容した７０匹の雌ＢＡＬＢ／ｃマウスを、７つの異なる処置群に割り付けた。結腸炎を、ＢＡＬＢ／ｃマウス由来のＣＤ４＋ＣＤ２５Ｔ細胞の移植によりＳＣＩＤマウスで誘発した。ＢＡＬＢ／ｃマウス由来の脾臓およびリンパ節から単離したリンパ球を、ＣＤ４＋Ｔ細胞のネガティブ選択に供した。その後、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋細胞を、ビーズへの結合によりＣＤ４＋Ｔ細胞懸濁液からポジティブに単離し、ＣＤ４＋ＣＤ２５－を上清から採取した。動物を、ｈＢＤ－２で、０．１ｍｇ／ｋｇ　ｓ．ｃ．にて７日目から８６日間連続して１日１回（ＯＤ）；１ｍｇ／ｋｇ　ｓ．ｃ．にてＯＤまたは３ｍｇ／ｋｇ　ｓ．ｃ．にてＯＤ；マウス抗ＴＮＦαで、１００μｇ／マウス　ｓ．ｃ．にて１週間に２回（エンブレル）；デキサメタゾンで、０．３ｍｇ／ｋｇを腹腔内にてＯＤ（ｄｅｘ）；ビヒクルとしてＰＢＳ　ｓ．ｃ．にて７日目から８６日間連続して（ビヒクル）処置したか、偽処置（ｓｈａｍ）であった。

【０１８９】

処置群：

１．０．１ｍｇ／ｋｇ　ｈＢＤ－２、皮下に１日１回（ｎ＝１１）
２．１ｍｇ／ｋｇ　ｈＢＤ－２、皮下に１日１回（ｎ＝１１）
３．３ｍｇ／ｋｇ　ｈＢＤ－２、皮下に１日１回（ｎ＝１１）
４．ＰＢＳ（ｈＢＤ－２　ビヒクル）、皮下に１日１回（ｎ＝１１）
５．０．３ｍｇ／ｋｇ　デキサメタゾン、腹腔内に１日１回（ｎ＝１１）
６．１００　μｇ／マウス　ＩｇＧ１のＦｃ部分に連結した可溶性ヒト７５－キロダルトンＴＮＦ受容体（エンブレル）、皮下に１週間に２回（ｎ＝１１）
７．偽処置群（ｎ＝６）

【０１９０】

試験：

臨床評価は、体重減少、便の硬さ、および直腸を介した血液の存在に基づいた。動物を９５日目に屠殺し、結腸を重量およびミエロペルオキシダーゼ活性の評価のために取り出した。

【０１９１】

結果：

臨床スコアに対する統計的に有意で類似する効果が、ｈＢＤ－２　１ｍｇ／ｋｇ　ｓ．ｃ．ＯＤ、デキサメタゾン０．３ｍｇ／ｋｇ　ｉ．ｐ．ＯＤ、およびエンブレルについて認められた（図１３）。同様に、これらの３つの服薬レジメンは、結腸重量（図１４）およびミエロペルオキシダーゼ活性（図１５）に対し統計的に有意で類似する効果を示した。

【０１９２】

結論：

ＤＳＳは、ヒト早期産児で認められる壊死性腸炎に伴ういくつかの特徴を共有する結腸炎型をマウスで誘発する。この実施例は、ｈＢＤ－２が、デキサメタゾンおよび抗ＴＮＦ－αの両方（壊死性腸炎を処置するために一般的に使用される化合物）と同等の、特に臨床症状の軽減における統計的に有意な効果を有することを実証するのに役立つ。

【０１９３】

実施例５．室内塵ダニ誘発アレルギー喘息のマウスモデルにおける鼻腔内哺乳動物β－ディフェンシン対経口哺乳動物β－ディフェンシンでの予防的処置の有効性の決定および

評価。
材料と方法：
研究デザインを図２に示す。
【０１９４】
処置レジメン：雌７～１０週齢ＢＡＬＢ／ｃマウスを、研究開始１日前に５つの研究群に無作為に割り付け、室内塵ダニに対して皮下（ＳＣ）感作した（２００μＬ生理食塩水中の１００μｇ　ＨＤＭ＋０．９％生理食塩水中のフロイント完全アジュバント）。マウスをｈＢＤ－２で、１２日目の午前中に開始して１．２ｍｇ／ｋｇ／日（０．４ｍｇ／ｋｇ　ＴＩＤ）の用量でそれぞれ経口処置および鼻腔内処置し、およそ６時間間隔でＴＩＤを継続した。最後の用量を、１４日目のチャレンジの１時間前に投与した。総服薬数は８回または合計２ｍｇ／ｋｇ　ｈＢＤ－２であった。マウスを次いで、１４日目にＨＤＭで鼻腔内に（ＩＮ）チャレンジした（５０μＬ生理食塩水中のＨＤＭ　２５μｇ）（図２）。
【０１９５】
試験：
気道炎症：チャレンジから４８時間後に、気管支肺胞洗浄液を、３体積の冷ＰＢＳ（０．４；０．３、および０．３ｍＬ、合計１ｍＬ）で肺を洗浄して行った。総白血球数および分画白血球数を、自動血液分析器Ｓｙｓｍｅｘ　ＸＴ－２０００ｉＶで測定した。
【０１９６】
肺機能：ＨＤＭチャレンジから４８時間後に開始して、肺抵抗および肺コンプライアンスを、ＤＳＩのＢｕｘｃｏ　Ｆｉｎｅｐｏｉｎｔ　ＲＣシステムを使用して麻酔下のカニューレ留置したマウスによりメタコリンチャレンジ（３．１２５　ＭＣＨ１；６．２５　ＭＣＨ２；１２．５　ＭＣＨ３、および２５ｍｇ／ｍＬ　ＭＣＨ４）後に測定した。データを、１０ｍｇ／ｋｇメタコリンでの気道抵抗および用量応答曲線として表す。
【０１９７】
サイトカイン分析のための肺試料採取：あらゆるＢＡＬの完了後、肺を胸郭から取り出し、液体窒素中で瞬間凍結し、ＥＬＩＳＡによる肺ホモジネート中のＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１３、およびＩＬ－３３のサイトカイン濃度の分析まで－８０℃にて凍結して保存した。
【０１９８】
結果：
生理食塩水チャレンジ（非喘息）マウスと比較して、ＨＤＭチャレンジビヒクルで処置した動物における肺抵抗値の増加および肺コンプライアンス値の減少が認められた（図１６および１７）。両ビヒクル処置マウス群（経口および鼻腔内）における炎症応答を、ＨＤＭでの感作から１４日後の単回ＨＤＭチャレンジによって誘発した。この炎症応答は、生理食塩水チャレンジ対照（データ示さず）と比較して、ＢＡＬＦ中の総細胞数、好酸球数、好中球数、マクロファージ数、およびリンパ球数が統計的に有意に増加することを特徴とした（ｐ＜０．０５）。また、肺組織ホモジネート中の７つのサイトカインＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１３、およびＩＬ－３３の濃度分析は、生理食塩水チャレンジ対照と比較してＨＤＭチャレンジ動物における有意に高いレベルを明らかにした（図１８～２４）。
【０１９９】
１２日目～１４日目に投与した、ＴＩＤでの経口および鼻腔内適用後のｈＢＤ－２（８回投与で合計２．０ｍｇ／ｋｇ）は、ＨＤＭチャンレンジビヒクルで処置した動物と比較して、気道抵抗の増加（図１６）および肺コンプライアンスの減少（図１７）を有効に阻害した。ＢＡＬＦ中の細胞流入に対する影響が経口適用後に観察され、それは好中球数を有意に抑制した（データ示さず）。肺組織ホモジネート中のサイトカイン濃度の完全な正常化を伴う免疫系のリバランスが、経口投与後のＴＮＦ－α、ＩＬ－４、Ｌ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、およびＩＬ－１３サイトカインレベルに対して認められた（図１８ｂ～２４ｂ）。ｈＢＤ－２の鼻腔内投与後にＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ

－９、およびＩＬ－１３が低下する傾向があったが、これは対照と統計学的に有意に異ならなかった（図１８ａ～２４ａ）。得られた全ての結果は、室内塵ダニ誘発アレルギー喘息のマウスモデルにおけるｈＢＤ－２の明確な予防効果および抗炎症効果を示している。

【０２００】

結論：

特にＥＬＢＷ児の死亡率の高さの主因は、未熟な腸管における壊死性腸炎に由来する細菌転位または肺炎および未熟な肺の炎症に由来する細菌転位のいずれかに起因する敗血症である。特にＥＬＢＷ児の肺は、完全に発達しておらず、最善の状態であってもｈＢＤ－２産生が制限されている。この実施例は、ｈＢＤ－２での経口処置が肺の炎症およびサイトカイン産生、おそらくなおさらに重要には肺機能に大きな影響を有することを実証するのに役立つ。

【０２０１】

実施例６．室内塵ダニ／フロイント完全アジュバント誘発アレルギー喘息のマウスモデルにおける哺乳動物β－ディフェンシンでの鼻腔内治療介入対経口治療介入の有効性の決定および評価。

材料と方法：

研究デザインを図３に示す。

【０２０２】

処置レジメン：雌７～１０週齢ＢＡＬＢ／ｃマウスを、研究開始１日前に６つの研究群に無作為に割り付け、室内塵ダニに対して皮下（ＳＣ）感作した（２００μＬ生理食塩水中の１００μｇ　ＨＤＭ＋０．９％生理食塩水中のフロイント完全アジュバント）。マウスを次いで、１４日目にＨＤＭで鼻腔内に（ＩＮ）チャレンジした（５０μＬ生理食塩水中のＨＤＭ　２５μｇ）。デキサメタゾンを１４日目に経口投与した（１ｍｇ／ｋｇ　ＢＩＤ；５０μＬリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ））。ｈＢＤ－２を１４日目にＩＮまたは経口投与した（１．７ｍｇ／ｋｇ　ＴＩＤ　ＩＮ；０．４ｍｇ／ｋｇ　ＴＩＤ　ＩＮ；０．４ｍｇ／ｋｇ　ＴＩＤ経口、５０μＬリン酸緩衝生理食塩水）。初回用量をチャレンジの６０分前に投与し、その後の２用量をおよそ６時間間隔で投与した（図３）。

【０２０３】

試験：

気道炎症：チャレンジから４８時間後に、気管支肺胞洗浄液を、３体積の冷ＰＢＳ（０．４；０．３、および０．３ｍＬ、合計１ｍＬ）で肺を洗浄して行った。総白血球数および分画白血球数を、自動血液分析器Ｓｙｓｍｅｘ　ＸＴ－２０００ｉＶで測定した。

【０２０４】

肺機能：ＨＤＭチャレンジから４８時間後に開始して、肺抵抗および肺コンプライアンスを、ＤＳＩのＢｕｘｃｏ　Ｆｉｎｅｐｏｉｎｔ　ＲＣシステムを使用して麻酔下のカニューレ留置したマウスによりメタコリンチャレンジ（３．１２５　ＭＣＨ１；６．２５　ＭＣＨ２；１２．５　ＭＣＨ３、および２５ｍｇ／ｍＬ　ＭＣＨ４）後に測定した。データを、１０ｍｇ／ｋｇメタコリンでの気道抵抗および用量応答曲線として表す。

【０２０５】

サイトカイン分析のための肺試料採取：あらゆるＢＡＬの完了後、肺を胸郭から取り出し、液体窒素中で瞬間凍結し、ＥＬＩＳＡによるＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、およびＩＦＮγのサイトカイン濃度の分析まで－８０℃にて凍結して保存した。

【０２０６】

結果：

生理食塩水チャレンジ（非喘息）マウスと比較して、ＨＤＭチャレンジビヒクルで処置した動物における肺抵抗値の増加および肺コンプライアンス値の減少が認められた（図２５および２６）。両ビヒクル処置マウス群（経口および鼻腔内）における炎症応答を、ＨＤＭおよびアジュバントでの感作から１４日後の単回ＨＤＭチャレンジによって誘発した。この炎症応答は、生理食塩水チャレンジ対照（図２７）と比較して、ＢＡＬＦ中の総細

胞数、好酸球数、好中球数、マクロファージ数、およびリンパ球数が統計的に有意に増加することを特徴とした（ｐ＜０．０５）。また、肺組織ホモジネート中の５つのサイトカインＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、およびＩＦＮ－γの濃度分析は、生理食塩水チャレンジ対照と比較してＨＤＭチャレンジ動物における有意に高いレベルを明らかにした。

【０２０７】

デキサメタゾン処置は、ＢＡＬＦ中の総細胞数および好酸球数を有意に抑制したが、好中球数、マクロファージ数、およびリンパ球数は抑制しなかった（データ示さず）。細胞データによれば、デキサメタゾンは、ＨＤＭ／ビヒクル対照と比較して、肺組織ホモジネート中のＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、およびＩＦＮ－γのレベルに影響を及ぼさなかった（図２８～２９）。しかし、デキサメタゾンは、好酸球数に関連するＡＨＲ測定値に影響を及ぼした。得られた結果は、このモデルが、ある程度ステロイド耐性であることを示している。１４日目のＴＩＤでの経口および鼻腔内適用後のｈＢＤ－２は、ＨＤＭチャンレンジビヒクルで処置した動物と比較して、気道抵抗の増加（図２５ａおよび２５ｂ）および肺コンプライアンスの減少（図２６ａおよび２６ｂ）を有効に阻害した。より顕著な効果が、鼻腔内適用後に測定したいくつかのパラメーター（ＢＡＬＦ中の細胞流入など）に対して認められ、両方の用量（０．４ｍｇ／ｋｇ／日ＴＩＤおよび１．７ｍｇ／ｋｇ／日ＴＩＤ）が総細胞数、好中球数、およびマクロファージ細胞数を有意に抑制し、好酸球が低下する傾向があり（図２７）、一方で、ステロイド標準デキサメタゾンはこれらを抑制できなかった（データ示さず）。類似の有意な効果が、両方の服薬経路により肺組織ホモジネート中のＩＬ－６、ＩＬ－１０、およびＩＦＮ－γのサイトカインレベルに対して認められた（図２８、３２、３５）。経口投与したｈＢＤ－２はＴＮＦ－αを有意に低下させ（図２９）、一方で、鼻腔内投与したｈＢＤ－２は対照と有意に異ならなかった。得られた全ての結果は、室内塵ダニ／フロイント完全アジュバント誘発アレルギー喘息のマウスモデルにおけるｈＢＤ－２の明確な抗炎症効果を示している。

【０２０８】

結論：

特にＥＬＢＷ児の死亡率の高さの主因は、未熟な腸管における壊死性腸炎に由来する細菌転位または肺炎および未熟な肺の炎症に由来する細菌転位のいずれかに起因する敗血症である。特にＥＬＢＷ児の肺は、完全に発達しておらず、最善の状態であってもｈＢＤ－２産生が制限されている。この実施例は、ｈＢＤ－２での経口処置が肺の炎症およびサイトカイン産生、おそらくなおさらに重要には肺機能に大きな影響を有することを実証するのに役立つ。

【０２０９】

実施例７．室内塵ダニ／フロイント完全アジュバント誘発アレルギー喘息のマウスモデルにおける哺乳動物β－ディフェンシン投与を用いた鼻腔内治療介入対経口治療介入の有効性の決定および評価。

材料と方法：

研究デザインを図３に示す。

【０２１０】

処置レジメン：雌７～１０週齢ＢＡＬＢ／ｃマウスを、研究開始１日前に４つの研究群に無作為に割り付け、室内塵ダニに対して皮下（ＳＣ）感作した（２００μＬ生理食塩水中の１００μｇ　ＨＤＭ＋０．９％生理食塩水中のフロイント完全アジュバント）。マウスを、１４日目にＨＤＭで鼻腔内に（ＩＮ）チャレンジした（５０μＬ生理食塩水中のＨＤＭ　２５μｇ）。ｈＢＤ－２を１４日目にＩＮまたは経口投与した（０．４ｍｇ／ｋｇ　ＴＩＤ　ＩＮ；０．４ｍｇ／ｋｇ　ＴＩＤ経口、５０μＬリン酸緩衝生理食塩水）。初回用量をチャレンジの６０分前に投与し、その後の用量をおよそ６時間間隔で投与した（図３の群１～４）。

【０２１１】

試験：

採血：全ての末梢血試料を、頸静脈出血によって採取した。血液をＬｉ－ヘパリン管に採取し、氷上に置き、直ちに４℃で遠心分離した。血漿を分離し、ＳＣＦＡ分析が可能になるまで－８０℃で保存した。

【０２１２】

肺組織の試料採取：胸郭を穏やかに開き、胸骨および肋骨のいずれかの側面を切り取り、トリミングすることによって、肺を露出させ切除した。群あたり第１の６匹の動物由来の肺を胸郭から取り出し、液体窒素中で瞬間凍結し、ＥＬＩＳＡによる肺ホモジネート中のＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－８（ＫＣ）、ＩＬ－９、およびＩＬ－１３のサイトカイン濃度の分析まで－８０℃にて保存した。群あたり他の８匹の動物由来の肺を、１０％緩衝ホルマリンを用いてｉｎ　ｓｉｔｕで膨張させ、胸郭から取り出し、個別に１０％緩衝ホルマリンに入れ、ｉｎ　ｔｏｔｏでパラフィン包埋し、切片にし、Ｈ＆Ｅ／ＰＡＳ染色した。パラフィンブロックをＩＨＣ分析のために保持した。

【０２１３】

読み出し

・組織病理学（Ｈ＆Ｅ；ＰＡＳ）（Ｎ＝８／群；総数＝３２）

・肺組織ホモジネート中のサイトカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－８（ＫＣ）、ＩＬ－９、およびＩＬ－１３）（Ｎ＝６／群；総数＝２４）

【０２１４】

組織病理学

細胞流入（単核球、好酸球、好中球）を、以下のように気管支周囲／細気管支および血管周囲腔について個別にＨ＆Ｅ染色スライド上で半定量的に評価した：

０　不在

１　わずかな散在する炎症細胞

２　より大きな凝集物

３　細胞の顕著な蓄積

【０２１５】

炎症についての総合スコアを、全ての個別スコアの合計として計算した。杯細胞異形成を、大気道レベルおよび末梢気道レベルで個別に、以下のようにＰＡＳ染色スライドで評価した：

０　基底膜に沿って粘液を含む細胞なし

１　７５％未満の細胞質が染色され基底膜に沿ってわずかな陽性細胞

２　７５％を超える細胞質が染色され基底膜に沿ってわずかな陽性細胞

３　７５％未満の細胞質が染色され基底膜に沿って多数の陽性細胞

４　７５％を超える細胞質が染色され基底膜に沿って多数の陽性細胞

【０２１６】

統計学的評価

データを、ＭＳ　Ｅｘｃｅｌを使用して処理した。統計解析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア（バージョン５．０４）を使用して行った。群間の差異を、ｐ＜０．０５の場合に統計的に有意と見なす。

【０２１７】

選択された組織学的スコア－値データの統計解析を、中央値およびノンパラメトリックマン・ホイットニー検定を使用して行った。

【０２１８】

結果：

両方のビヒクル処置マウス群（経口および鼻腔内）において炎症応答が、ＨＤＭおよびアジュバントでの感作から１４日後に単回ＨＤＭチャレンジによって誘発された。炎症応答は、生理食塩水チャレンジ対照と比較したＨＤＭチャレンジ動物における肺組織ホモジネート中の５つのサイトカインＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－８、ＩＬ－９、およびＩＬ－１３の濃度の統計的に有意な増加ならびに肺組織の重度の組織学的な炎症の変化を特徴とした（図３７および３８）。

【０２１９】
ｈＢＤ－２は、ＴＩＤでの経口および鼻腔内の適用後の両方において、１４日目に、ＨＤＭチャレンジビヒクルで処置した動物と比較して、肺組織の組織学的炎症の増加を有効に阻害した（図３７および３８）。有意な効果が、経口投与後の肺組織ホモジネート中のＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－９、およびＩＬ－１３サイトカインレベルに対し（図３２、３３、３１、３６）ならびにＩＮ投与後のＩＬ－９およびＩＬ－１３に対し（図３１、３６）認められた。得られた全ての結果は、室内塵ダニ／フロイント完全アジュバント誘発アレルギー喘息のマウスモデルにおけるｈＢＤ－２の明確な抗炎症効果を示している。
【０２２０】
結論：
特にＥＬＢＷ児の死亡率の高さの主因は、未熟な腸管における壊死性腸炎に由来する細菌転位または肺炎および未熟な肺の炎症に由来する細菌転位のいずれかに起因する敗血症である。特にＥＬＢＷ児の肺は、完全に発達しておらず、最善の状態であってもｈＢＤ－２産生が制限されている。この実施例は、ｈＢＤ－２での経口処置が肺の炎症およびサイトカイン産生、おそらくなおさらに重要には肺機能に大きな影響を有することを実証するのに役立つ。
【０２２１】
実施例８．
アラマーブルーならびにそれぞれ０．６および２０．０　ｐｇ／ｍｌ　ＬＰＳで１、１０、および４０μｇ／ｍｌの濃度のＨＤ５、ｈＢＤ－１、ｈＢＤ－２、ｈＢＤ－３、およびｈＢＤ－４への２４時間の曝露後のＰＢＭＣ細胞の生存度（図３９）。
実験は、ＨＤ５、ｈＢＤ－１、およびｈＢＤ－２は濃度と無関係に有毒でないのに対しｈＢＤ－４は中程度に増加した毒性を示し、ｈＢＤ－３は濃度の増加に伴い顕著に増加する毒性を示すことを示す。
【０２２２】
実施例９．
壊死性腸炎マウスモデルにおける壊死性腸炎の発生率およびＩＬ－２２濃度。ヒト壊死性腸炎と一致する腸粘膜傷害を、生後１４日目のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおいて経口経管栄養によるジチゾンおよびその後のＫｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａチャレンジの組み合わせによって誘発した。壊死性腸炎の重症度を、有意な損傷を示すスコア＞２を用いる組織学的採点システムによって評価した（図４０）。ジチゾンまたはＫ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａチャレンジのいずれも、単独では粘膜傷害を誘発しなかったが、ジチゾンおよびその後のＫ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａチャレンジの組み合わせは、チャレンジから１６時間後に測定された、重症かつ統計的に有意な粘膜損傷を誘発した（図４１）。Ｋ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａチャレンジから１時間後の１．２ｍｇ／ｋｇ　ｈＢＤ－２での予防的経口処置は、壊死性腸炎の発生率を正常値へと劇的かつ統計的に有意に低下させた（図４１）。ＩＬ－２２（粘膜関門増強サイトカイン）の濃度は、チャレンジから９時間後に統計的に有意に増加した。
【０２２３】
実施例１０．

【表１】

配列

配列番号	名称	配列
1	ｈＢＤ－１	ＤＨＹＮＣＶＳＳＧＧＱＣＬＹＳＡＣＰＩＦＴＫＩＱＧＴＣＹＲＧＫＡＫＣＣＫ
2	ｈＢＤ－２	ＧＩＧＤＰＶＴＣＬＫＳＧＡＩＣＨＰＶＦＣＰＲＲＹＫＱＩＧＴＣＧＬＰＧＴＫＣＣＫＫＰ
3	ｈＢＤ－３	ＧＩＩＮＴＬＱＫＹＹＣＲＶＲＧＧＲＣＡＶＬＳＣＬＰＫＥＥＱＩＧＫＣＳＴＲＧＲＫＣＣＲＲＫＫ
4	ｈＢＤ－４	ＥＬＤＲＩＣＧＹＧＴＡＲＣＲＫＫＣＲＳＱＥＹＲＩＧＲＣＰＮＴＹＡＣＣＬＲＫ
5	ＨＤ５	ＡＴＣＹＣＲＴＧＲＣＡＴＲＥＳＬＳＧＶＣＥＩＳＧＲＬＹＲＬＣＣＲ
6	ＨＤ６	ＡＦＴＣＨＣＲＲＳＣＹＳＴＥＹＳＹＧＴＣＴＶＭＧＩＮＨＲＦＣＣＬ
7	マウスベータディフェンシン３	ＫＩＮＮＰＶＳＣＬＲＫＧＧＲＣＷＮＲＣＩＧＮＴＲＱＩＧＳＣＧＶＰＦＬＫＣＣＫＲＫ
8	ＨＮＰ－１	ＡＣＹＣＲＩＰＡＣＩＡＧＥＲＲＹＧＴＣＩＹＱＧＲＬＷＡＦＣＣ
9	ＨＮＰ－２	ＣＹＣＲＩＰＡＣＩＡＧＥＲＲＹＧＴＣＩＹＱＧＲＬＷＡＦＣＣ
１０	ＨＮＰ－３	ＤＣＹＣＲＩＰＡＣＩＡＧＥＲＲＹＧＴＣＩＹＱＧＲＬＷＡＦＣＣ
１１	ＨＮＰ－４	ＶＣＳＣＲＬＶＦＣＲＲＴＥＬＲＶＧＮＣＬＩＧＧＶＳＦＴＹＣＣＴＲＶ
１２	ヒトカテリシジン（ＬＬ－３７）	ＬＬＧＤＦＦＲＫＳＫＥＫＩＧＫＥＦＫＲＩＶＱＲＩＫＤＦＬＲＮＬＶＰＲＴＥＳ
１３	ヒトラクトフェリン	ＧＲＲＲＳＶＱＷＣＡＶＳＱＰＥＡＴＫＣＦＱＷＱＲＮＭＲＫＶＲＧＰＰＶＳＣＩＫＲＤＳＰＩＱＣＩＱＡＩＡＥＮＲＡＤＡＶＴＬＤＧＧＦＩＹＥＡＧＬＡＰＹＫＬＲＰＶＡＡＥＶＹＧＴＥＲＱＰＲＴＨＹＹＡＶＡＶＶＫＫＧＧＳＦＱＬＮＥＬＱＧＬＫＳＣＨＴＧＬＲＲＴＡＧＷＮＶＰＩＧＴＬＲＰＦＬＮＷＴＧＰＰＥＰＩＥＡＡＶＡＲＦＦＳＡＳＣＶＰＧＡＤＫＧＱＦＰＮＬＣＲＬＣＡＧＴＧＥＮＣＡＦＳＳＱＥＰＹＦＳＹＳＧＡＦＫＣＬＲＤＧＡＧＤＶＡＦＩＲＥＳＴＶＦＥＤＬＳＤＥＡＥＲＤＥＹＥＬＬＣＰＤＮＴＲＫＰＶＤＫＦＫＤＣＨＬＡＲＶＰＳＨＡＶＶＡＲＳＶＮＧＫＥＤＡＩＷＮＬＬＲＱＡＱＥＫＦＧＫＤＫＳＰＫＦＱＬＦＧＳＰＳＧＱＫＤＬＬＦＫＤＳＡＩＧＦＳＲＶＰＰＲＩＤＳＧＬＹＬＧＳＧＹＦＴＡＩＱＮＬＲＫＳＥＥＥＶＡＡＲＲＡＲＶＶＷＣＡＶＧＥＱＥＬＲＫＣＮＱＷＳＧＬＳＥＧＳＶＴＣＳＳＡＳＴＴＥＤＣＩＡＬＶＬＫＧＥＡＤＡＭＳ

		ＬＤＧＧＹＶＹＴＡＧＫＣＧＬＶＰＶＬＡＥＮＹＫＳＱＱＳＳ ＤＰＤＰＮＣＶＤＲＰＶＥＧＹＬＡＶＡＶＶＲＲＳＤＴＳＬＴ ＷＮＳＶＫＧＫＫＳＣＨＴＡＶＤＲＴＡＧＷＮＩＰＭＧＬＬＦ ＮＱＴＧＳＣＫＦＤＥＹＦＳＱＳＣＡＰＧＳＤＰＲＳＮＬＣＡ ＬＣＩＧＤＥＱＧＥＮＫＣＶＰＮＳＮＥＲＹＹＧＹＴＧＡＦＲ ＣＬＡＥＮＡＧＤＶＡＦＶＫＤＶＴＶＬＱＮＴＤＧＮＮＮＥＡ ＷＡＫＤＬＫＬＡＤＦＡＬＬＣＬＤＧＫＲＫＰＶＴＥＡＲＳＣ ＨＬＡＭＡＰＮＨＡＶＶＳＲＭＤＫＶＥＲＬＫＱＶＬＬＨＱＱ ＡＫＦＧＲＮＧＳＤＣＰＤＫＦＣＬＦＱＳＥＴＫＮＬＬＦＮＤ ＮＴＥＣＬＡＲＬＨＧＫＴＴＹＥＫＹＬＧＰＱＹＶＡＧＩＴＮ ＬＫＫＣＳＴＳＰＬＬＥＡＣＥＦＬＲＫ
１４	ラクトフェリシン－Ｈ	ＧＲＲＲＳＶＱＷＣＡＶＳＱＰＥＡＴＫＣＦＱＷＱＲＮＭＲＫ ＶＲＧＰＰＶＳＣＩＫＲＤＳＰＩＱＣＩＱＡ
１５	ヒトリゾチーム	ＫＶＦＥＲＣＥＬＡＲＴＬＫＲＬＧＭＤＧＹＲＧＩＳＬＡＮＷ ＭＣＬＡＫＷＥＳＧＹＮＴＲＡＴＮＹＮＡＧＤＲＳＴＤＹＧＩ ＦＱＩＮＳＲＹＷＣＮＤＧＫＴＰＧＡＶＮＡＣＨＬＳＣＳＡＬ ＬＱＤＮＩＡＤＡＶＡＣＡＫＲＶＶＲＤＰＱＧＩＲＡＷＶＡＷ ＲＮＲＣＱＮＲＤＶＲＱＹＶＱＧＣＧＶ
１６	短縮ｈＢＤ２	ＰＶＴＣＬＫＳＧＡＩＣＨＰＶＦＣＰＲＲＹＫＱＩＧＴＣＧＬ ＰＧＴＫＣＣＫＫＰ

【０２２４】

実施例１１．

幹細胞移植後の急性移植片対宿主病マウスモデルにおける経口ｈＢＤ－２での予防的処置の有効性の決定および評価。

【０２２５】

材料と方法

処置レジメン：１２匹の雌ＢＡＬＢ／ｃマウスに、０日目に少なくとも４時間間隔で４．５Ｇｙ（２×４９８秒間）を照射した。骨髄を以下のように採取した：後肢を２匹の雌ＷＴ　Ｃ５７ＢＬ／６マウスから無菌的に採取した。骨格筋を除去し、骨端を切り取った。骨の内腔をＰＢＳで洗い流し、細胞をペレット化して取り出した。Ｔ細胞の採取：２匹の雌ＷＴ　Ｃ５７ＢＬ／６マウスの脾臓を、１００μＭセルストレイナーでＰＢＳ充填ディッシュに濾し取った。細胞をＰＢＳに取り、５０ｍＬファルコンチューブに移し、遠沈した。細胞を１ｍＬ　ＰＢＳに取り、脾臓あたり２０μＬのＣＤ４マイクロビーズ＋２０μＬ　ＣＤ８マイクロビーズを添加して４℃で２０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで洗浄し、ＭＡＣＳ分離に適用してＣＤ４＋細胞およびＣＤ８＋細胞をポジティブ選択した。ポジティブ選択したＴ細胞を計数し、取り出した。移植：第２の照射の直後に、全てのＷＴ　ＢＡＬＢ／ｃレシピエントマウスに、イソフルラン麻酔下で眼窩後静脈叢にｉ．ｖ．で５×１．０００．０００個のＢＭ細胞（５０μＬ）を注射した。１５匹のＢＡＬＢ／ｃマウスを、０～１０日目に、１日あたり１００μＬ　ＰＢＳ中の１．２ｍｇのｈＢＤ２／ｋｇ体重／日でバイアル経口経管栄養により処置した。

【０２２６】

１５匹のＢＡＬＢ／ｃマウスに、０～１０日目に、１００μＬ　ＰＢＳ（ビヒクル）／日を経口経管栄養によって与えた。

【０２２７】

試験：

マウスを最初の７日間毎日計量し、生存を１００日間モニタリングした。

【０２２８】

結果

ビヒクル群の全ての１５匹のマウスは、３５日目までに死亡したのに対し、４匹の、すなわち３０％未満のｈＢＤ２処置マウスのみが３５日目までに死亡し、８匹のマウスは１００日目まで依然として生存していた（ｐ＜０．０００１）（図４３）。小腸、結腸、および肝臓の組織学スコアは全て、ＰＢＳと比較してｈＢＤ－２処置群について高度に統計的に低かった（図４４）。ｈＢＤ２処置マウスは、骨髄移植後の最初の７日間の体重減少が統計的に有意に小さく、腸の健康および腸の完全性が改善されたことを示唆している（図４５）。ｈＢＤ２での処置は、結腸の固有層中のＣＤ４５＋白血球の浸潤（図４６中のＦＡＣＳ分析）；腸管Ｔ細胞および骨髄性細胞の浸潤（図４７ａ～ｃ）を低下させた。ｈＢＤ２での予防的処置はまた、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６の濃度の低下およびＩＬ－１０濃度の増加を示した（図４８ａ～ｃ）。ｈＢＤ－２処置はさらに、骨髄性細胞由来のＩＬ－１βの低下を示した（図４９ａ～ｃ中の脾臓のＦＡＣＳ分析）。脾臓のＦＡＣＳ分析はまた、好中球数の減少（図５０ａ）；特にＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γのＴｈ１サイトカイン産生の減少（図５０ｂ～ｆ）を示した。結腸試料のマイクロアレイ分析は、ＰＢＳと比較してｈＢＤ－２処置群において減少した炎症、白血球および骨髄性細胞の遊走、ならびに組織リモデリングを示した（図５１）。幹細胞移植前に、患者の腸管を、２つまたは３つの広域抗生物質での処置により可能な範囲で滅菌する。この処置後、この腸管は、早期産児の無菌腸管に類似する。患者が移植片対宿主病を発症する場合、最初の最も顕著な症状の１つは通常、早期産児における壊死性腸炎と特徴を共有する重症結腸炎である。したがって、この実施例は、幹細胞移植時からのｈＢＤ－２での経口処置が結腸炎の発症を予防し死亡率を劇的に低下させることを実証するのに役立つ。

【０２２９】

実施例１２．

幹細胞移植後の急性移植片対宿主病マウスモデルにおける経口ｈＢＤ－２対シクロスポリンでの予防的処置の有効性の決定および評価。

【０２３０】

材料と方法

処置レジメン：２０匹の雌ＢＡＬＢ／ｃマウスに、０日目に少なくとも４時間間隔で４．５Ｇｙ（２×４９８秒間）を照射した。骨髄を以下のように採取した：後肢を２匹の雌ＷＴ　Ｃ５７ＢＬ／６マウスから無菌的に採取した。骨格筋を除去し、骨端を切り取った。骨の内腔をＰＢＳで洗い流し、細胞をペレット化して取り出した。Ｔ細胞の採取：２匹の雌ＷＴ　Ｃ５７ＢＬ／６マウスの脾臓を、１００μＭセルストレイナーでＰＢＳ充填ディッシュに濾し取った。細胞をＰＢＳに取り、５０ｍＬファルコンチューブに移し、遠沈した。細胞を１ｍＬ　ＰＢＳに取り、脾臓あたり２０μＬのＣＤ４マイクロビーズ＋２０μＬ　ＣＤ８マイクロビーズを添加して４℃で２０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで洗浄し、ＭＡＣＳ分離に適用してＣＤ４＋細胞およびＣＤ８＋細胞をポジティブ選択した。ポジティブ選択したＴ細胞を計数し、取り出した。移植：第２の照射の直後に、全てのＷＴ　ＢＡＬＢ／ｃレシピエントマウスに、イソフルラン麻酔下で眼窩後静脈叢にｉ．ｖ．で５×１．０００．０００個のＢＭ細胞（５０μＬ）を注射した。２０匹のＢＡＬＢ／ｃマウスを、０～１０日目に、１．２ｍｇのｈＢＤ２／ｋｇ体重／日（ｎ＝７）；０、３、６、および９日目の５０ｍｇシクロスポリン／ｋｇ体重（ｎ＝７）または１００μＬ　ＰＢＳ／日の経口経管栄養（ｎ＝６）で処置した。

【０２３１】

試験：

マウスを研究中に定期的に計量し、生存を９０日間モニタリングした。

【０２３２】

結果

１匹を除く全てのＰＢＳ処置マウスが９０日目までに死亡したのに対し、ｈＢＤ－２処置

動物の１匹のみが９０日目までに死亡し（ｐ＝０．０３）、シクロスポリン処置した動物の３匹が死亡した（図５２）。ｈＢＤ２およびシクロスポリンで処置したマウスは、ＰＢＳ処置マウスと比較して、骨髄移植後の体重減少が統計的に有意に小さく、腸の健康および腸の完全性が改善されたことを示唆している（図５３）。幹細胞移植前に、患者の腸管を、２つまたは３つの広域抗生物質での処置により可能な範囲で滅菌する。この処置後、この腸管は、早期産児の無菌腸管に類似する。患者が移植片対宿主病を発症する場合、最初の最も顕著な症状の１つは通常、早期産児における壊死性腸炎と特徴を共有する重症結腸炎である。したがって、この実施例は、幹細胞移植時からのｈＢＤ－２での経口処置が結腸炎の発症を予防し死亡率を劇的に低下させることを実証するのに役立つ。

【０２３３】

実施例１３．

幹細胞移植後の急性移植片対宿主病マウスモデルにおける経口ＨＤ５での予防的処置の有効性の決定および評価。

【０２３４】

材料と方法

処置レジメン：２２匹の雌ＢＡＬＢ／ｃマウスに、０日目に少なくとも４時間間隔で４．５Ｇｙ（２×４９８秒間）を照射した。骨髄を以下のように採取した：後肢を２匹の雌ＷＴ　Ｃ５７ＢＬ／６マウスから無菌的に採取した。骨格筋を除去し、骨端を切り取った。骨の内腔をＰＢＳで洗い流し、細胞をペレット化して取り出した。Ｔ細胞の採取：２匹の雌ＷＴ　Ｃ５７ＢＬ／６マウスの脾臓を、１００μＭセルストレイナーでＰＢＳ充填ディッシュに濾し取った。細胞をＰＢＳに取り、５０ｍＬファルコンチューブに移し、遠沈した。細胞を１ｍＬ　ＰＢＳに取り、脾臓あたり２０μＬのＣＤ４マイクロビーズ＋２０μＬ　ＣＤ８マイクロビーズを添加して４℃で２０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで洗浄し、ＭＡＣＳ分離に適用してＣＤ４＋細胞およびＣＤ８＋細胞をポジティブ選択した。ポジティブ選択したＴ細胞を計数し、取り出した。移植：第２の照射の直後に、全てのＷＴ　ＢＡＬＢ／ｃレシピエントマウスに、イソフルラン麻酔下で眼窩後静脈叢にｉ．ｖ．で５×１．０００．０００個のＢＭ細胞（５０μＬ）を注射した。２２匹のＢＡＬＢ／ｃマウスを、０～１０日目に、１．２ｍｇのＨＤ５／ｋｇ体重／日；１．２ｍｇのｈＢＤ－２／ｋｇ体重／日、または１００μＬのＰＢＳ／日の経口経管栄養で処置した。

【０２３５】

試験：

生存を６０日間モニタリングした。

【０２３６】

結果

８匹のＰＢＳ処置マウスのうちの６匹が６０日目までに死亡したのに対し、８匹のＨＤ５処置動物のうちの２匹が死亡し、ｈＢＤ－２処置動物は６０日目までに死亡しなかった（図５４）。

【０２３７】

幹細胞移植前に、患者の腸管を、２つまたは３つの広域抗生物質での処置により可能な範囲で滅菌する。この処置後、この腸管は、早期産児の無菌腸管に類似する。患者が移植片対宿主病を発症する場合、最初の最も顕著な症状の１つは通常、早期産児における壊死性腸炎と特徴を共有する重症結腸炎である。したがって、この実施例は、幹細胞移植時からのｈＢＤ－２での経口処置が結腸炎の発症を予防し死亡率を劇的に低下させることを実証するのに役立つ。

【０２３８】

実施例１４．

経口投与したディフェンシン（ＨＤ５およびｈＢＤ－２）の抗菌効果。

【０２３９】

方法：

ムチンの免疫染色およびＦＩＳＨによる細菌の局在化

腸粘膜表面での細菌局在化を分析するために以前に記載されているように、粘液免疫染色を蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリッド形成（ＦＩＳＨ）と組み合わせた。簡潔に述べれば、糞便物質を含まない結腸組織（近位結腸、盲腸から２ｃｍ）を、メタノール－カルノア固定液（６０％メタノール、３０％クロロホルム、１０％氷酢酸）中に室温で最低３時間入れた。組織を次いで、メタノールで２×３０分間、エタノールで２×１５分間、エタノール／キシレン（１：１）で１５分間、およびキシレンで２×１５分間洗浄し、その後に縦方向でパラフィン中に包埋した。５μｍの切片化を行い、６０℃で１０分間の予熱後、キシレン中にて６０℃で１０分間、キシレン中にて１０分間で脱パラフィンし、９９．５％エタノール中に１０分間入れた。ハイブリッド形成工程を、ハイブリッド形成緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、０．９Ｍ　ＮａＣｌ、０．１％ＳＤＳ、２０％ホルムアミド）中で最終濃度１０μｇ／ｍＬに希釈したＥＵＢ３３８プローブ（５’－ＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＧＴＡＧＧＡＧＴ－３’、Ａｌｅｘａ　６４７を使用して５’を標識）を使用して５０℃で一晩行った。洗浄緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、０．９Ｍ　ＮａＣｌ）で１０分間およびＰＢＳで３×１０分間の洗浄後に、ＰＡＰペン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して、切片の周りに印をつけ、ブロック溶液（ＰＢＳ中の５％ウシ胎児血清）を４℃で３０分間添加した。ムチン－２一次抗体（ウサギＨ－３００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ，ＵＳＡ）をブロック溶液で１：１５００に希釈し、４℃で一晩適用した。ＰＢＳでの３×１０分間の洗浄後、１：１５００に希釈した抗ウサギＡｌｅｘａ４８８二次抗体、１μｇ／ｍＬのファロイジン－テトラメチルローダミンＢイソチオシアナート（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、および１０μｇ／ｍＬのＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を含むブロック溶液を、切片に２時間適用した。ＰＢＳでの３×１０分間の洗浄後、スライドを、Ｐｒｏｌｏｎｇアンチフェードマウント媒体（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用してマウントした。観察を、ソフトウェアＺｅｎ２０１１バージョン７．１を備えたＺｅｉｓｓ　ＬＳＭ７００共焦点顕微鏡を用いて行った。このソフトウェアを使用して、細菌と上皮細胞単層の間の距離、ならびに粘液の厚さを測定した。

【０２４０】

結果：

腸壁と細菌集団の間の溶解領域に統計的に極めて有意な差が認められた。この距離は低脂肪食および洋食の両方を摂取したマウスで短かったのに対して、ＨＤ５および特にｈＢＤ－２は、距離に対する顕著な効果を有した（図５５）。

【０２４１】

結論：

この実施例は、マウスにおいて経口投与されたＨＤ５およびｈＢＤ－２は、それらがマウス自体の上皮細胞によって産生されたかのように上皮表面で、かつ経口投与後に予想される主に腸の内腔でではなく、それらの微生物叢調整効果を発揮することを実証する。

【０２４２】

参考文献

AlFaleh and Anabrees. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev 2014;4:CD005496.

Butel et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. J pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 44: 577－582.

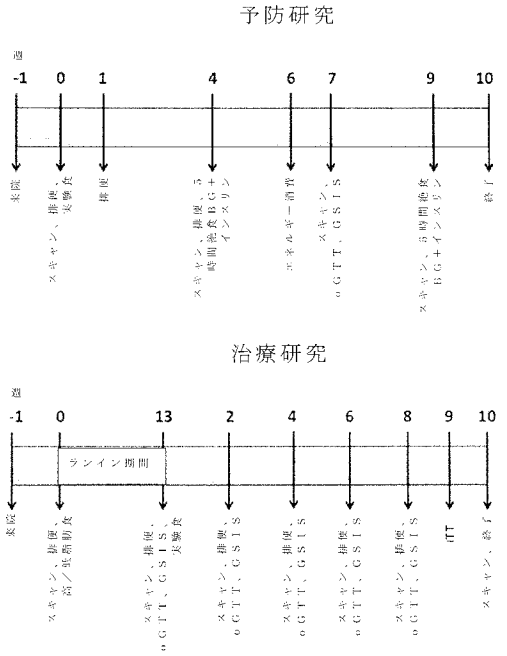
Campeotto, F. et al. Fecal expression of human β－defensin－2 following birth. Neo

natology 2010; 98: 365-369.
Donia, M. S. and Fischbach, M. A. 2015. Small molecules from the human microbiota. Science 349, 1254766
Dorrestein, P. C. et al., 2014. Finding the missing links among metabolites, microbes, and the host. Immunity 40: 824-832.
Gritz and Bandari. The human neonatal gut microbiome: a brief review. Frontiers in pediatrics 2015; 3.
Guaraldi and Salvatori. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. Front Cell Infect Microbiol 2012; 2: 94
Hanson. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. Ann Allergy 1998; 81: 523-534.
Jakobsson, H. E. et al. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonization and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarian section. Gut 63: 559-566.
Kai-Larsen et al. A review of the innate immune defense of the human foetus and newborn, with emphasis on antimicrobial peptides. Acta Paediatrica 2014; 103: 1000-1008.
Langston et al. Human lung growth in late gestation and in the neonate. Am Rev Respir 1984; 129: 607-613.
Mallow et al. Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. J Biol Chem 1996; 271: 4038-4045.
Manzoni et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight neonates: a randomized clinical trial. Early Hum Dev 2014; 90: 60-65.
Patel and Denning. Therapeutic use of prebiotics, probiotics and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: What is the current evidence. Clin Perinatol 2013; 40: 11-25
Puiman, P. J. Paneth cell hyperplasia and metaplasia in necrotizing enterocolitis. Pediatr Res 2011, 69: 217-223.
Richter et al. Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human beta-defensin 2 and tu

mor necrosis factor-alpha. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2010; 51:103-5.
Saigal and Doyle. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. Lancet 2008; 371:261-269.
Sakurai et al. Extrauterine growth restriction in preterm infants of gestational age < 32 weeks. Pediatrics International 2008; 50: 70-75.
Salzman et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. Pediatr Res 1998; 44: 20-26.
Salzman NH, Underwood MA and Bevins CL, 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. Semin Immunol 19(2):70-83.
Sangild et al. Invited review: the preterm pig as a model in pediatric gastroenterology. J Anim Sci 2013;91:4713-29.
Schirmer, M. et al., 2016. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. Cell 167: 1125-1136
Sharma et al. Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 2007; 42: 454-461.
Sheng et al. Human β-defensin-3 promotes intestinal epithelial cell migration and reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. Pediatric Researh 2014; 76: 269279.
Siggers et al. Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. J Nutr Biochem 2010;
Starner et al. Expression and activity of β-defensins and LL-37 in the developing human lung. J Immunol 2005;174: 1608-1615.
Stoll and Hansen. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD neonatal research network. Semin Perinatol 2003; 27: 293-310.
Strunk et al. Infection-induced inflammation and cerebral injury in preterm infants. Lancet Infect Dis 2014; 14:751-62.

Sweet et al. Two-year outcome of infants weighing 600 grams or less at birth and born 1994 through 1998 Obstet Gynecol 2003; 101: 18-23.
Tirone, C. et al. Correlation of levels of alpha-defensins determined by HPLC-ESI-MS in bronchoalveolar lavage fluid with the diagnosis of pneumonia in premature neonates. Pediatr Res 2010; 68: 140-144.
Trend et al. Levels of innate immune factors in preterm and term mother's breast milk during the 1st month postpartum. British Journal of Nutrition 2016;
Trompette, A. et al., 2013. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nature Medicine 20: 159-168.
Wehkamp J, et al., 2002. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. Dig Dis Sci. 47(6):1349-55.
WO 2010/007166
WO 92/06204
WO 95/17413
WO 95/22625
US 5,223,409
WO 2010/007166

【図１】



【図２】

群番号	N	感作ｓ．ｃ．（０日目）	チャレンジ ｉ．ｎ．／マウス １４日目	処置 １２、１３、および１４日目	チャレンジから４８時間後の測定および試料採取（１６日目）
1	12	生理食塩水中１００μＬのＣＦＡ	５０μＬ生理食塩水	-	
2	12			ビヒクル ｉ．ｎ．	・ＡＨＲ（抵抗およびコンフライアンス；Ｂｕｘｃｏ）Ｎ＝６／群 ・ＢＡＬＦ（総細胞数および分画細胞数）
3	12	１００μｇ ＨＤＭ／０．２ｍＬ、生理食塩水＋ＣＦＡ／マウス	２５μｇ ＨＤＭ／５０μＬ生理食塩水	ビヒクル ｐ．ｏ．	Ｎ＝１２／群 ・肺（サイトカイン濃度のために凍結）
4	12			ｈｂＤ２ ｉ．ｎ．１．２ｍｇ／ｋｇ／Ｈ（０．４ｍｇ／ｋｇ ＴＩＤ）	Ｎ＝１２．群
5	12			ｈｂＤ２ ｐ．ｏ．１．２ｍｇ／ｋｇ／Ｈ（０．４ｍｇ／ｋｇ ＴＩＤ）	

【図３】

群番号	N	感作ｓ．ｃ．（０日目）	チャレンジ ｉ．ｎ．／マウス １４日目	処置 眼薬レジメンおよび処置すべき経路 １４日目	チャレンジから４８時間後の測定および試料採取（１６日目）
1	14	生理食塩水中１００μＬのＣＦＡ	５０μＬ生理食塩水	-	
2	14			ビヒクル	・ＡＨＲ（抵抗およびコンフライアンス；Ｂｕｘｃｏ）（Ｎ＝６） ・ＢＡＬＦ（総細胞数および分画細胞数）（Ｎ＝１２）
3	14			ｈｂＤ２ ｐ．ｏ．１．２ｍｇ／ｋｇ／Ｈ（０．４ｍｇ／ｋｇ ＴＩＤ）	・サイトカイン測定のための凍結肺（Ｎ＝１２／群）
4	14	１００μｇ ＨＤＭ／０．２ｍＬ 生理食塩水＋ＣＦＡ／マウス	２５μｇ ＨＤＭ／５０μＬ生理食塩水	ｈｂＤ２ ｉ．ｎ．１．２ｍｇ／ｋｇ／Ｈ（０．４ｍｇ／ｋｇ ＴＩＤ）	・血漿のための血液（Ｎ＝１４） ・組織病理学のための肺（Ｎ＝８／群）
5	14			ｈｂＤ２ ｉ．ｎ．５ｍｇ／ｋｇ／Ｈ（１．７ｍｇ．ｋｇ ＴＩＤ）	・サイトカイン測定のための凍結肺（Ｎ＝６）
6	14			デキサメタゾン ｐ．ｏ．１ｍｇ／ｋｇ ＢＩＤ	

【図４Ａ】

```
HBD1        ------DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK---
HBD2        ---GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP-
HBD3        GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK
HBD4        -----ELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYPIGRCPH-TYACCLRK-
                    *    .*    *      * *      **
```

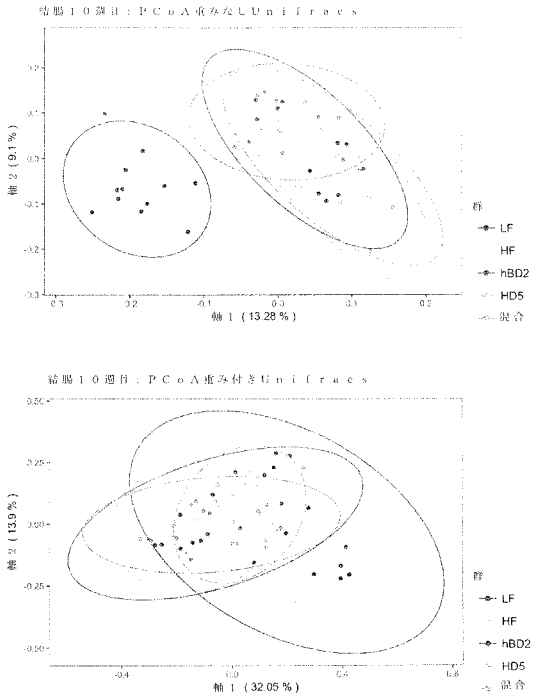
図４Ａ

【図４Ｂ】

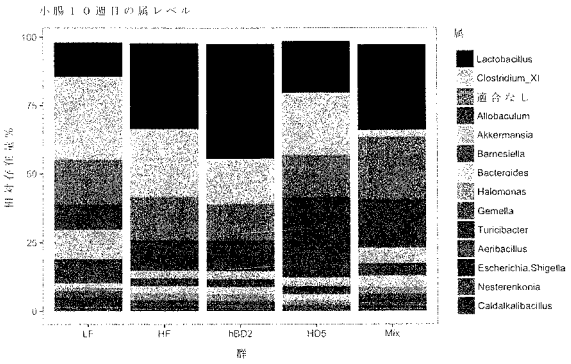
```
HD5         -ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
HD6         AFTCHCRR-SCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL
              **:**   * : *   *.* : *  :*:**
```

図４Ｂ

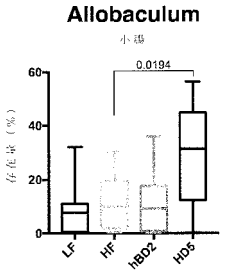
【図５】



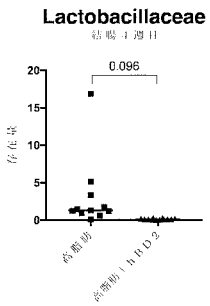
【図６】



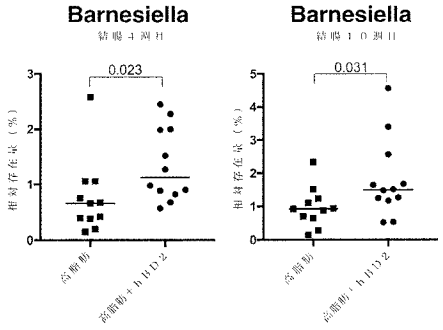
【図７】



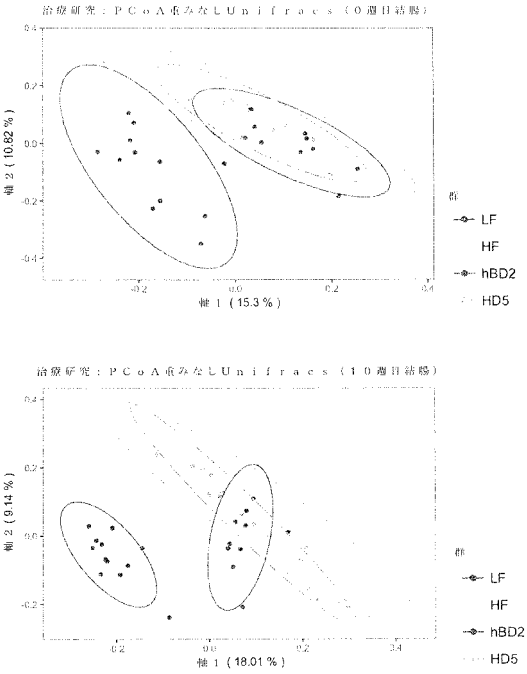
【図８】



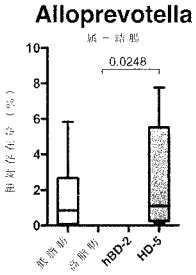
【図９】



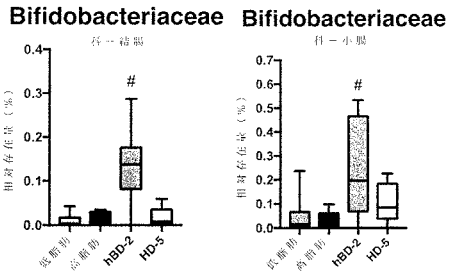
【図１０】



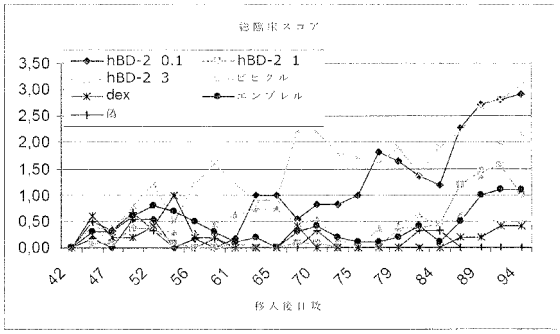
【図１１】



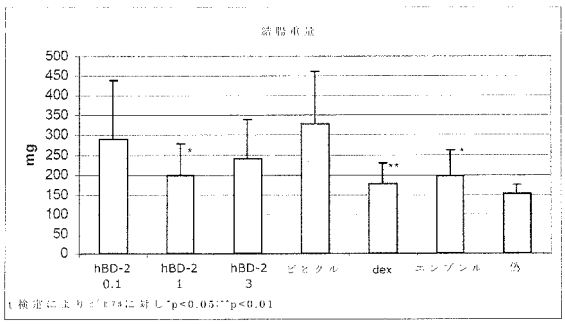
【図１２】



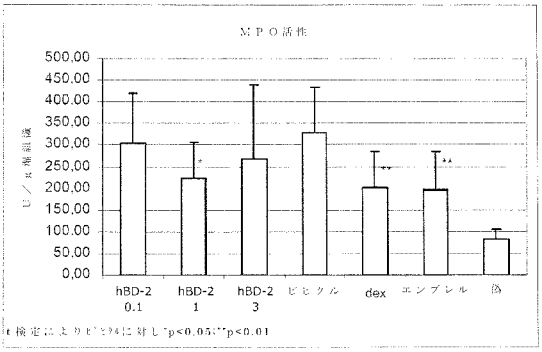
【図１３】



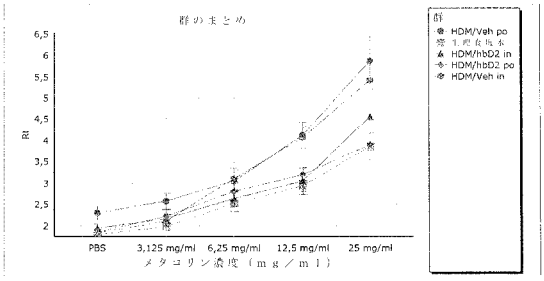
【図１４】



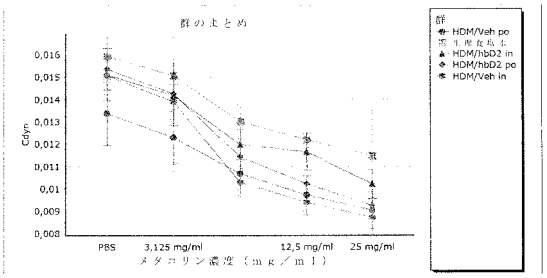
【図１５】



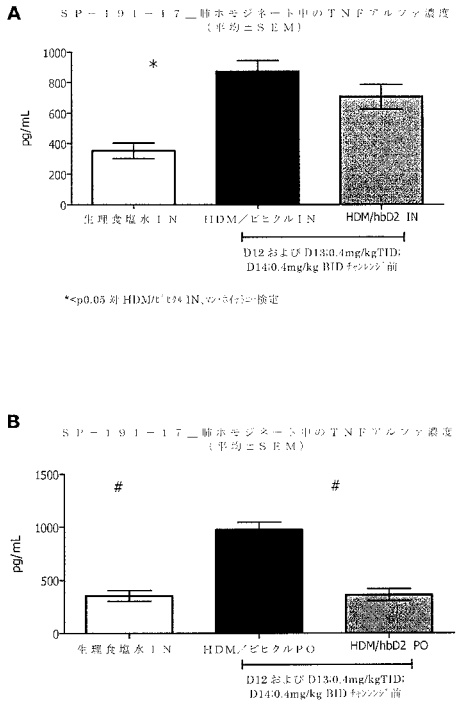
【図１６】



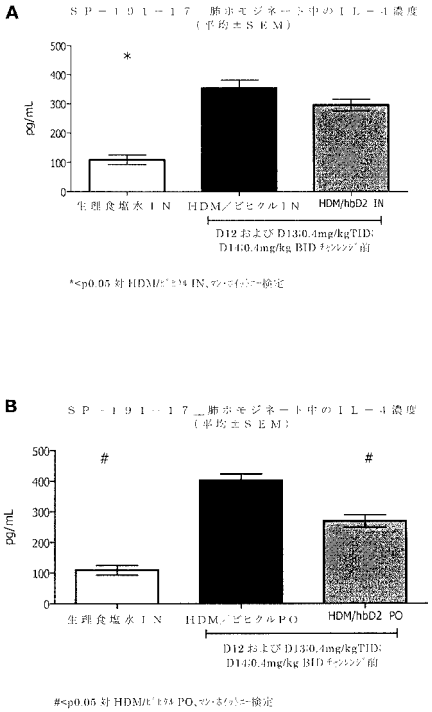
【図１７】



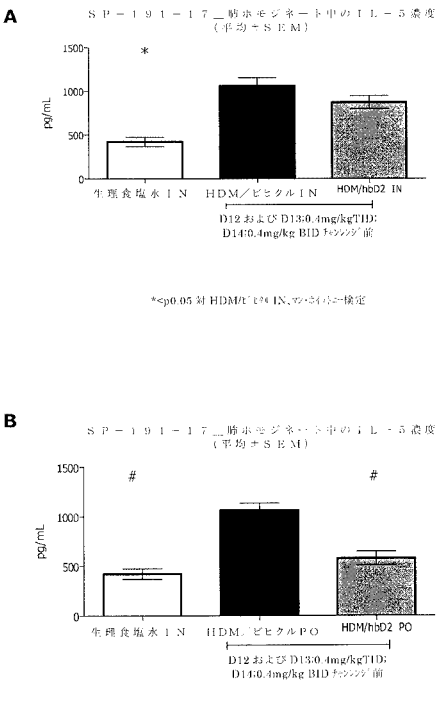
【図１８】



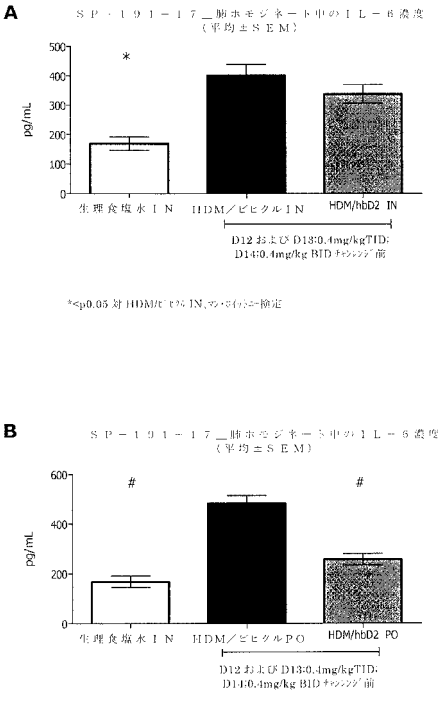
【図１９】



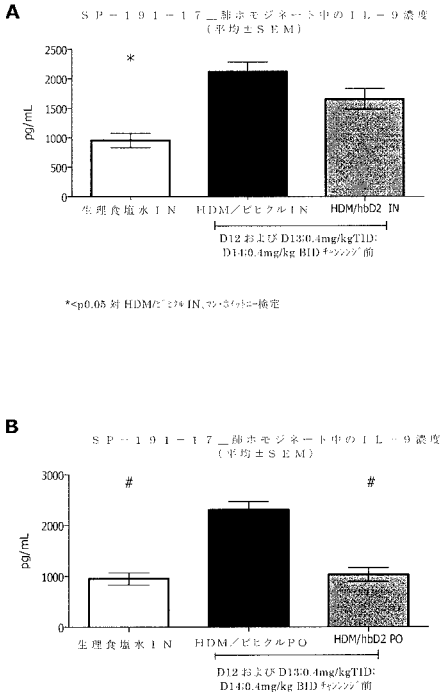
【図２０】



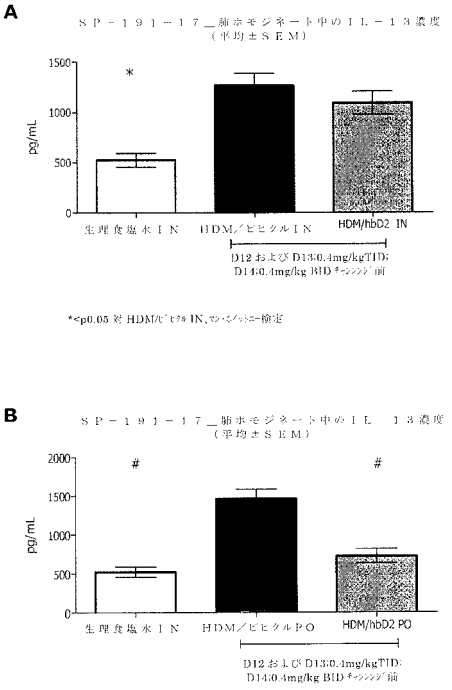
【図２１】



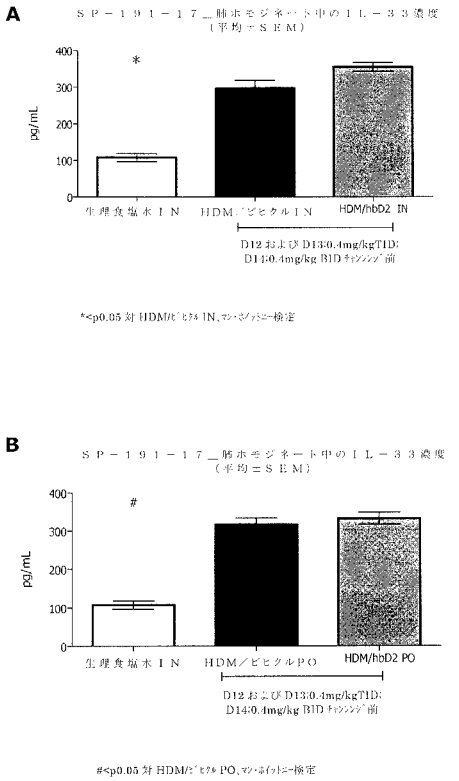
【図２２】



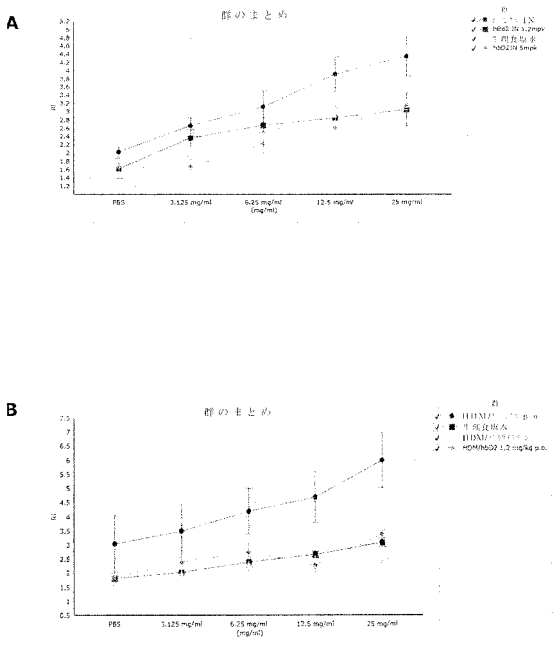
【図２３】



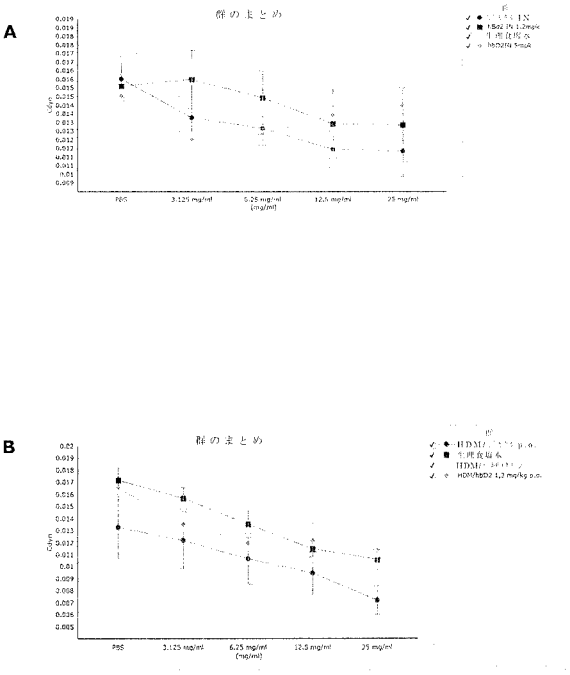
【図２４】



【図２５】



【図２６】



【図２７－１】

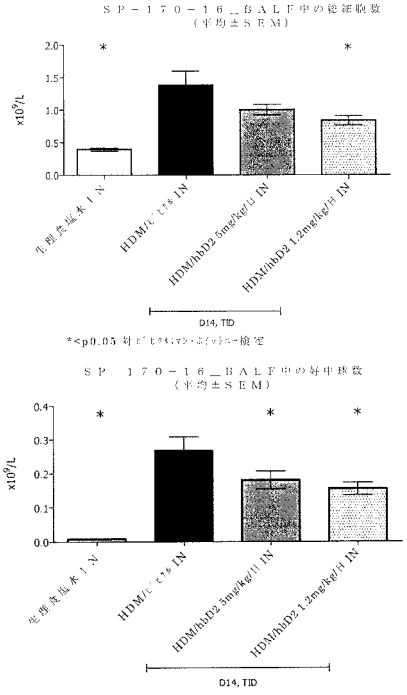


図２７

【図２７－２】

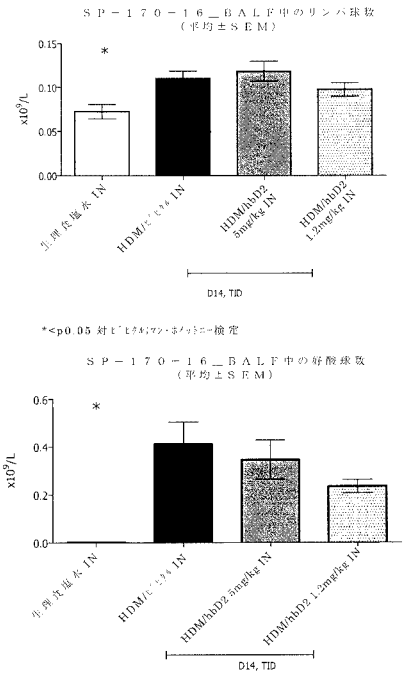


図２７（続き）

【図２７－３】

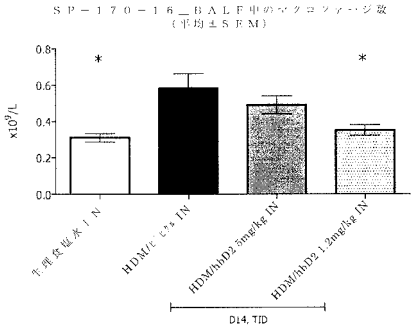
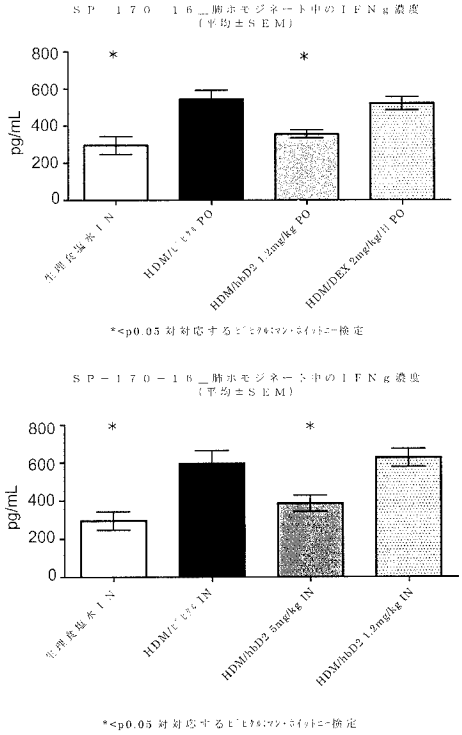
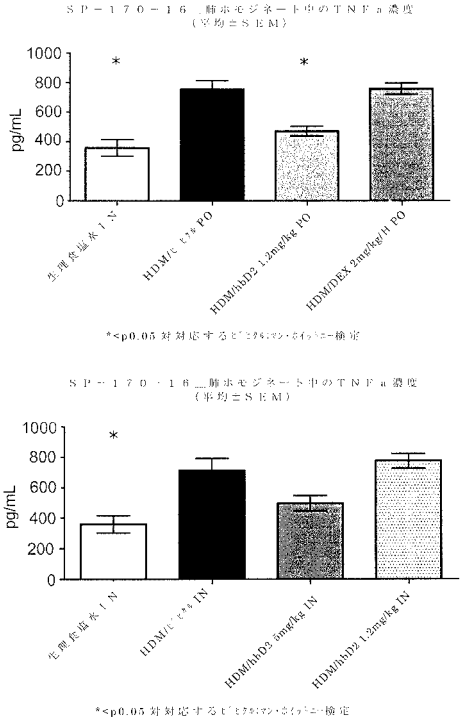


図２７（続き）

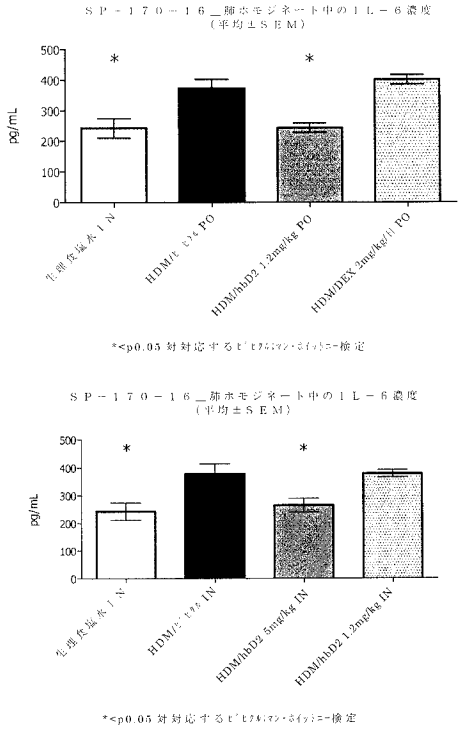
【図２８】



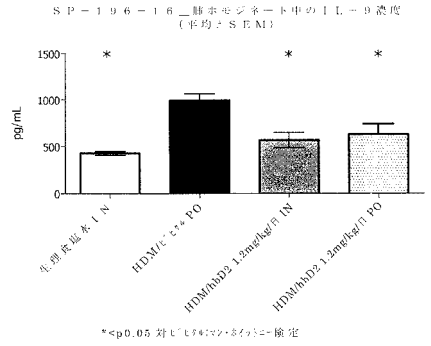
【図２９】



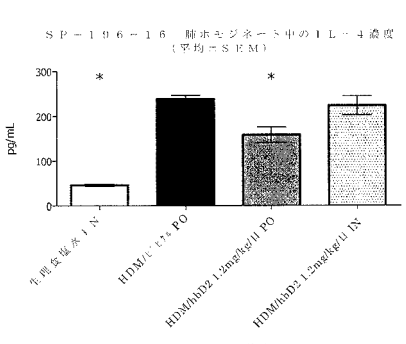
【図３０】



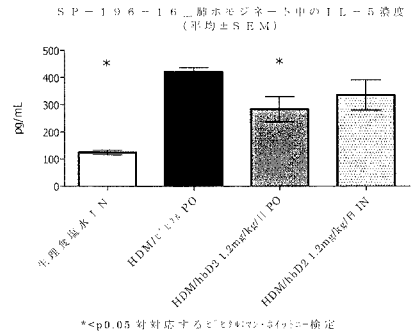
【図３１】



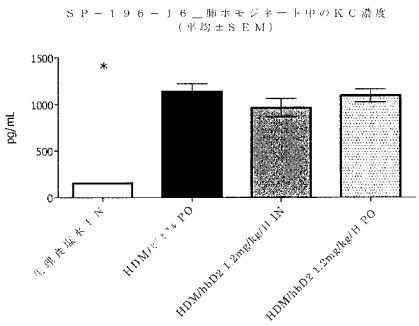
【図３２】



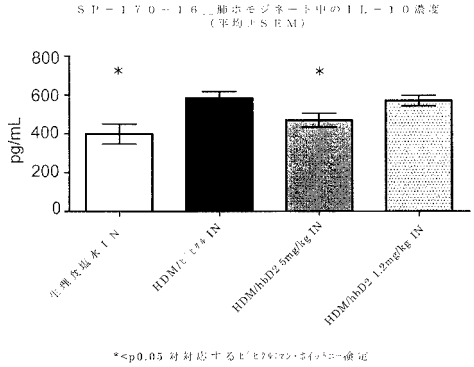
【図３３】

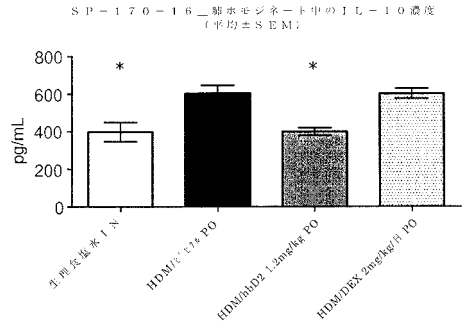


【図３４】

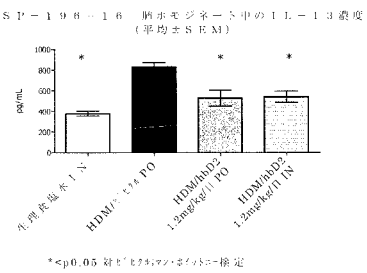


【図３５】

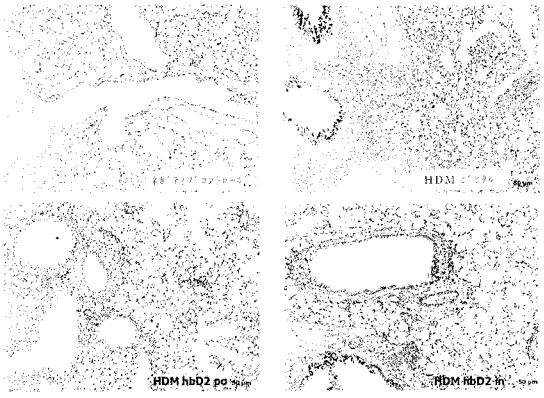




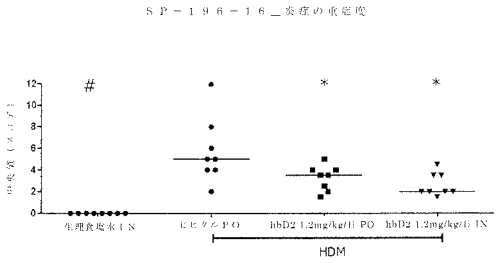
【図３６】



【図３７】

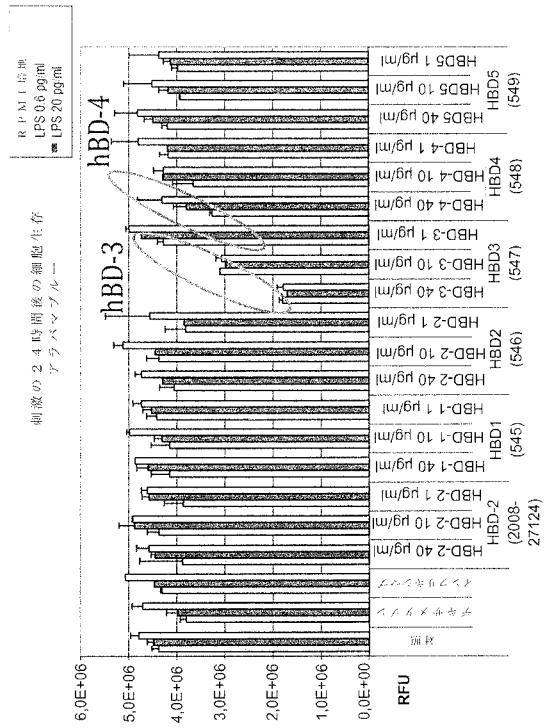


【図３８】

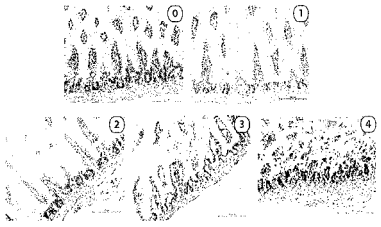


*p<p0.05 対ビヒクルウルコンサインランク・検定

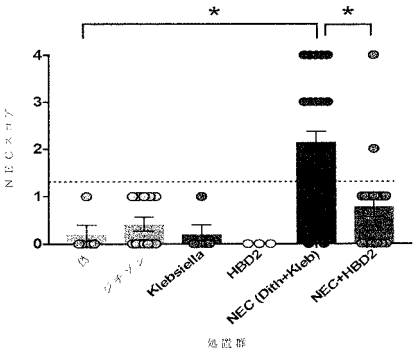
【図３９】



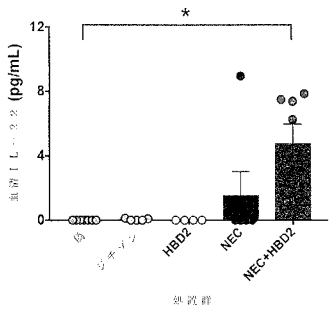
【図４０】



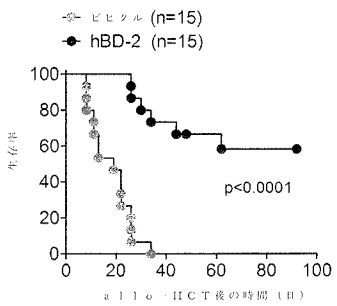
【図４１】



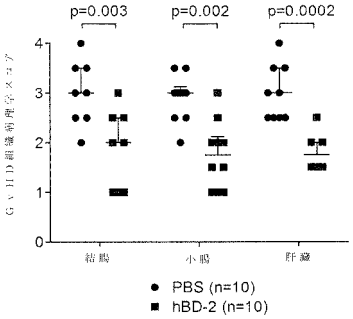
【図４２】



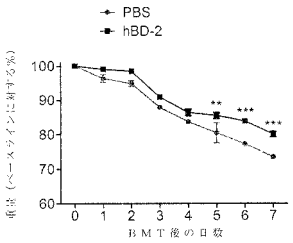
【図４３】



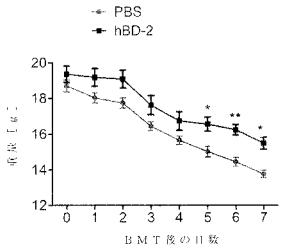
【図４４】



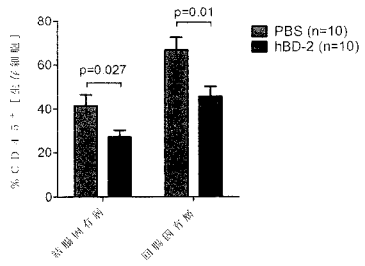
【図４５Ａ】



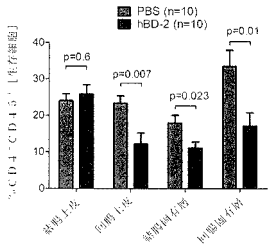
【図４５Ｂ】



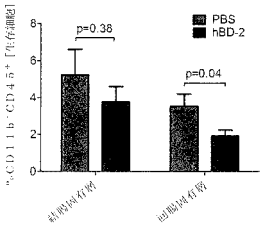
【図４６】



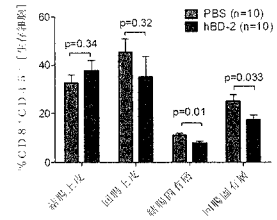
【図４７Ａ】



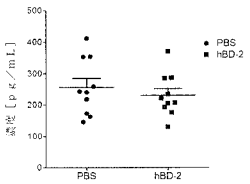
【図４７Ｂ】



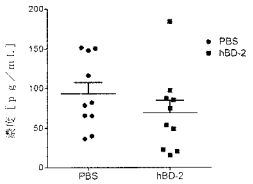
【図４７Ｃ】



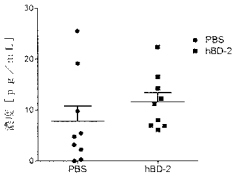
【図４８Ａ】



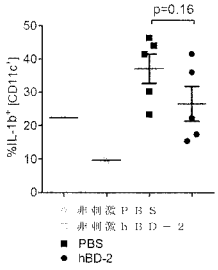
【図４８Ｂ】



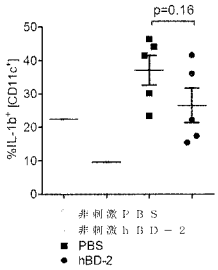
【図４８Ｃ】



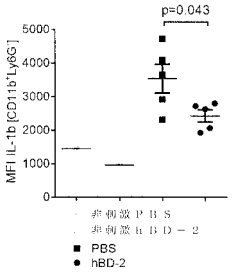
【図４９Ａ】



【図４９Ｂ】



【図４９Ｃ】



【図５０Ａ－Ｂ】

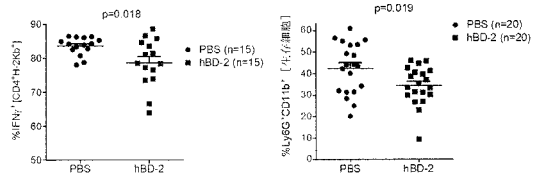


図５０ａ及びｂ

【図５０Ｃ－Ｄ】

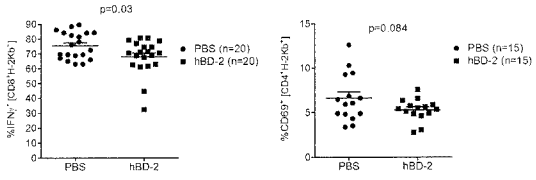


図５０ｃ及びｄ

【図５０Ｅ－Ｆ】

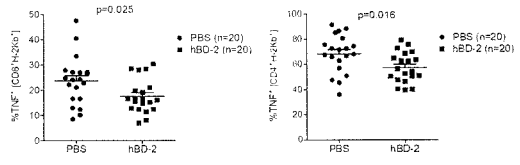
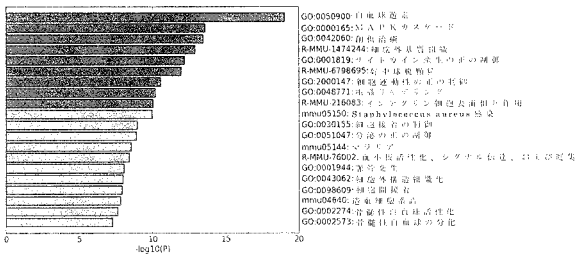
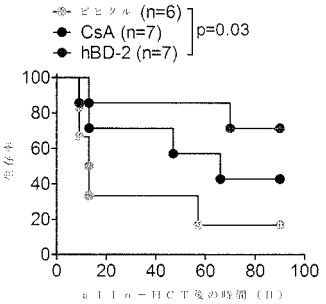


図５０ｅ及びｆ

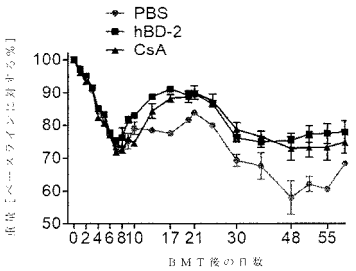
【図５１】



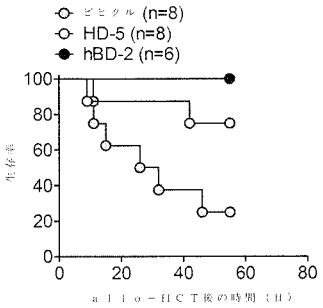
【図５２】



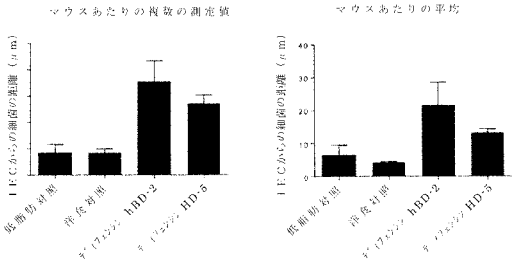
【図５３】



【図５４】



【図５５】



【手続補正書】
【提出日】令和1年12月16日(2019.12.16)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
早期産児の腸および／または肺における粘膜障害の予防または処置での使用のためのｈＢＤ－２（配列番号２）、短縮ｈＢＤ－２（配列番号１６）、ｈＢＤ－１（配列番号１）、ｈＢＤ－４（配列番号４）、ＨＤ５（配列番号５）およびＨＤ６（配列番号６）ならびに１～２個のアミノ酸修飾を有する機能的に等価なバリアントからなる群から選択される抗菌ペプチド。
【請求項２】
前記粘膜障害が腸に存在しかつ壊死性腸炎、急性および持続性の下痢、ならびに短腸症候群からなる群から選択され、好ましくは壊死性腸炎である、請求項１に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項３】
前記粘膜障害が肺に存在しかつ呼吸器疾病、肺炎症、気道感染、呼吸不全、肺炎、閉塞性無呼吸、気管支肺異形成、呼吸急迫症候群、および原発性無気肺からなる群から選択される、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項４】
前記抗菌ペプチドがｈＢＤ－２および／またはＨＤ５である、前記請求項のいずれかに記載の使用のための抗菌ペプチド。

【請求項５】
前記粘膜障害が壊死性腸炎でありかつ前記抗菌ペプチドがｈＢＤ２である、前記請求項のいずれかに記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項６】
１つを超える抗菌ペプチド、例えば２つの抗菌ペプチド、例えば３つの抗菌ペプチド、例えば４つの抗菌ペプチド、例えば５つの抗菌ペプチドが早期産児に投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項７】
２つの抗菌ペプチド、例えばｈＢＤ－２およびＨＤ５が早期産児に投与される、前記請求項のいずれかに記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項８】
前記抗菌ペプチドが細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）、アルブミン結合部分（ＡＢＭ）、検出可能部分（Ｚ）、および半減期延長ペプチドからなる群から選択される少なくとも１つの追加の部分をさらに含む、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項９】
前記追加の部分が半減期延長ペプチドである、請求項８に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１０】
前記半減期延長ペプチドが新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）、トランスフェリン、アルブミン（ＨＡＳ）、ＸＴＥＮ（登録商標）もしくはＰＥＧ、ホモ－アミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、プロリン－アラニン－セリンポリマー（ＰＡＳ）、またはエラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）、ヒアルロン酸、絨毛性ゴナドトロピン（ＣＧ）β－鎖のカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）などの負電荷の高シアル酸付加ペプチド、ヒトＩｇＧ、およびＣＨ３（ＣＨ２）$_n$ＣＯ－（式中、ｎは８～２２である）からなる群から選択される化合物に結合できる分子である、請求項９に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１１】
前記抗菌ペプチドが界面活性物質および／もしくはプレバイオティクスおよび／もしくはプロバイオティクスおよび／もしくはトリプトファン、ならびに／または糖質コルチコイドおよび／もしくは抗生物質および／もしくは免疫抑制薬および／もしくはＧＬＰ－２および／もしくはＧＬＰ－２アナログまたはその任意の組み合わせと組み合わせて投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１２】
前記抗菌ペプチドが少なくとも隔日、１日１回、例えば少なくとも１日２回、例えば少なくとも１日３回、例えば少なくとも１日４回、例えば少なくとも１日５回または連続的に早期産児に投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１３】
少なくとも１つのディフェンシンが出生日に開始して前記早期産児へ投与される、前記請求項のいずれかに記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１４】
前記抗菌ペプチドが経口、口内、舌下、直腸内、膣内、気管内、肺内、鼻腔内、頭蓋内、皮下、静脈内、真皮または経皮の投与により投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１５】
前記抗菌ペプチドが経口投与により投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１６】
前記抗菌ペプチドが肺内、気管内または鼻腔内の投与により投与される、前記請求項のいずれか１項に記載の使用のための抗菌ペプチド。

【請求項１７】
前記肺内、気管内または鼻腔内の投与が吸入器、ネブライザー、または気化器による、請求項１６に記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１８】
前記早期産児が１，５００グラム以下、例えば１，０００グラム以下の出生時体重を有する、前記請求項のいずれかに記載の使用のための抗菌ペプチド。
【請求項１９】
前記請求項のいずれかで定義される障害の処置での使用のための医薬の製造のためのｈＢＤ－２（配列番号２）、短縮ｈＢＤ－２（配列番号１６）、ｈＢＤ－１（配列番号１）、ｈＢＤ－４（配列番号４）、ＨＤ５（配列番号５）およびＨＤ６（配列番号６）ならびに１～２個のアミノ酸修飾を有する機能的に等価なバリアントからなる群から選択される抗菌ペプチドの使用。
【手続補正書】
【提出日】令和2年11月6日(2020.11.6)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2021502363000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/080814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/17 A61P1/00 A61P11/00 A61P1/12
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ann Cathrine Findal Støy: "The effect of bovine colostrum products on intestinal dysfunction and inflammation in a preterm pig model of necrotizing enterocolitis", , 20 October 2015 (2015-10-20), page FP1-4, 1-151, XP055548710, Denmark DOI: 10.1002/mbo3.280 Retrieved from the Internet: URL:http://orbit.dtu.dk/files/54900213/Ann_Cathrine_F_St_y_Final_B5_thesis_2013.pdf [retrieved on 2019-01-29]	1,2,8, 10, 14-16, 18-25
Y	pages 3,4,20 - pages 22,23,66	11-13
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 May 2019	28/05/2019

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

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/080814

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIAO-FANG WANG ET AL: "Concentration characteristics of bovine [beta]-defensin 1 and 2 in fresh bovine milk and infant formula", INTERNATIONAL JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY, vol. 68, no. 2, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 299-301, XP055548836, GB ISSN: 1364-727X, DOI: 10.1111/1471-0307.12214	1,2,4-25
X	WO 2014/165105 A2 (RUSH UNIVERSIYT MEDICAL CT [US]; NORTHSHORE UNIVERSITY HEALTH SYSTEM [] 9 October 2014 (2014-10-09)	1,2, 4-10, 14-16, 18-25
Y	paragraphs [0005], [0006], [0049]	11-13
X	JOANNA BARICELLI ET AL: "[beta]-defensin-2 in breast milk displays a broad antimicrobial activity against pathogenic bacteria", JORNAL DE PEDIATRIA, vol. 91, no. 1, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 36-43, XP055551294, BR ISSN: 0021-7557, DOI: 10.1016/j.jped.2014.05.006	1,2, 4-10, 14-25
Y	figure 1; table 1	11-13
A	J. LEE ET AL: "Oropharyngeal Colostrum Administration in Extremely Premature Infants: An RCT", PEDIATRICS, vol. 135, no. 2, 26 January 2015 (2015-01-26), pages e357-e366, XP055549030, ISSN: 0031-4005, DOI: 10.1542/peds.2014-2004 page e358	1,2,4-25
A	David Kyle Meyerholz: "Developmental influence on respiratory epithelia to paramyxoviridae infection, beta-defensin expression and adenoviral delivery of a beta-defensin gene", , 1 January 2004 (2004-01-01), page FP1-6,1-148, XP055551247, ISBN: 978-0-496-04051-3 Retrieved from the Internet: URL:https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2109&context=rtd [retrieved on 2019-02-04] page 110	1,2,4-25
3	-/--	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/080814

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANDREAS C.W. JENKE ET AL: "Human [beta]-defensin 2 expression in ELBW infants with severe necrotizing enterocolitis", PEDIATRIC RESEARCH, vol. 72, no. 5, 17 August 2012 (2012-08-17), pages 513-520, XP055551305, US ISSN: 0031-3998, DOI: 10.1038/pr.2012.110 page 514	1,2,4-25
A	QINGFENG SHENG ET AL: "Human [beta]-defensin-3 promotes intestinal epithelial cell migration and reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model", PEDIATRIC RESEARCH, vol. 76, no. 3, 23 June 2014 (2014-06-23), pages 269-279, XP055551351, US ISSN: 0031-3998, DOI: 10.1038/pr.2014.93 page 270	1,2,4-25
A	MICHAEL S. CAPLAN ET AL: "Role of Asphyxia and Feeding in a Neonatal Rat Model of Necrotizing Enterocolitis", PEDIATRIC PATHOLOGY., vol. 14, no. 6, 9 January 1994 (1994-01-09), pages 1017-1028, XP055551283, US ISSN: 0277-0938, DOI: 10.3109/15513819409037698 page 1018	1,2,4-25
Y	WO 2017/129195 A1 (DEFENSIN THERAPEUTICS APS [DK]) 3 August 2017 (2017-08-03) claims 11-14	11-13
X	YINGYING HE ET AL: "Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation", ADVANCES IN NUTRITION, vol. 7, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01) , pages 102-111, XP055551609, United States ISSN: 2161-8313, DOI: 10.3945/an.115.010090 table 1	1,2, 4-10, 14-16, 18,19, 23-25

-/--

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/080814

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ELIZABETH A. CRISTOFALO ET AL: "Randomized Trial of Exclusive Human Milk versus Preterm Formula Diets in Extremely Premature Infants", JOURNAL OF PEDIATRICS., vol. 163, no. 6, 1 December 2013 (2013-12-01), pages 1592-1595.e1, XP055461209, US ISSN: 0022-3476, DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.07.011	1,2, 4-10, 14-16, 18-25
Y	page 1592	11-13
A	ARMOGIDA SHEILA A ET AL: "Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk", ALLERGY AND ASTHMA PROCEEDI, PROVIDENCE, RI, US, vol. 25, no. 5, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 297-304, XP009150956, ISSN: 1088-5412 figure 3	1,2,4-25

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2018/080814

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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.:

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.:

7(completely); 1, 2, 4-6, 8-25(partially)

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.

International Application No. PCT/ EP2018/ 080814

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 7(completely); 1, 2, 4-6, 8-25(partially)

A method for preventing or treating a mucosal disorder at least in the gut of a preterm infant, the method comprising administering to a preterm infant or to a woman about to give birth to a preterm infant a composition comprising at least one antimicrobial peptide, wherein the peptide is hBD-2 or truncated hBD-2 and the mucosal disorder is necrotising enterocolitis.

2-6. claims: 1, 2, 4-6, 8-25(all partially)

A method for preventing or treating a mucosal disorder at least in the gut of a preterm infant, the method comprising administering to a preterm infant or to a woman about to give birth to a preterm infant a composition comprising at least one antimicrobial peptide, wherein the peptide is (invention number in brackets): hBD-3 or fragments thereof (2), hBD-4 or fragments thereof (3), HD5 or fragments thereof (4), HD6 or fragments thereof (5), glycosylated defensins not being any of glycosylated hBD-2, hBD-3, hBD-4, HD5 or HD6 (6), and the mucosal disorder is necrotising enterocolitis.

7-12. claims: 1, 2, 4-6, 8-25(all partially)

A method for preventing or treating a mucosal disorder at least in the gut of a preterm infant, the method comprising administering to a preterm infant or to a woman about to give birth to a preterm infant a composition comprising at least one antimicrobial peptide, wherein the peptide is (invention number in brackets): hBD-2 or truncated hBD-2 (7), hBD-3 or fragments thereof (8), hBD-4 or fragments thereof (9), HD5 or fragments thereof (10), HD6 or fragments thereof (11), glycosylated defensins not being any of glycosylated hBD-2, hBD-3, hBD-4, HD5 or HD6 (12), and the mucosal disorder is acute and prolonged diarrhea.

13-18. claims: 1, 2, 4-6, 8-25(all partially)

A method for preventing or treating a mucosal disorder at least in the gut of a preterm infant, the method comprising administering to a preterm infant or to a woman about to give birth to a preterm infant a composition comprising at least one antimicrobial peptide, wherein the peptide is (invention number in brackets): hBD-2 or truncated hBD-2 (13), hBD-3 or fragments thereof (14), hBD-4 or fragments thereof (15), HD5 or fragments thereof (16), HD6 or fragments thereof (17), glycosylated defensins not being any

International Application No. PCT/ EP2018/ 080814

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

of glycosylated hBD-2, hBD-3, hBD-4, HD5 or HD6 (18), and the mucosal disorder is short bowel syndrome.

19-24. claims: 3(completely); 1, 4-6, 8-25(partially)

A method for preventing or treating a mucosal disorder at least in the lung of a preterm infant, the method comprising administering to a preterm infant or to a woman about to give birth to a preterm infant a composition comprising at least one antimicrobial peptide, wherein the peptide is (invention number in brackets): hBD-2 or truncated hBD-2 (19), hBD-3 or fragments thereof (20), hBD-4 or fragments thereof (21), HD5 or fragments thereof (22), HD6 or fragments thereof (23), glycosylated defensins not being any of glycosylated hBD-2, hBD-3, hBD-4, HD5 or HD6 (24).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2018/080814

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014165105 A2	09-10-2014	EP 2968073 A2	20-01-2016
		EP 3254666 A1	13-12-2017
		US 2016022540 A1	28-01-2016
		WO 2014165105 A2	09-10-2014
WO 2017129195 A1	03-08-2017	AU 2017212534 A1	26-07-2018
		BR 112018015170 A2	18-12-2018
		CA 3012711 A1	03-08-2017
		CN 108778309 A	09-11-2018
		EP 3407905 A1	05-12-2018
		JP 2019504122 A	14-02-2019
		KR 20180121489 A	07-11-2018
		SG 11201805954W A	30-08-2018
		US 2019111107 A1	18-04-2019
		WO 2017129195 A1	03-08-2017

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61P 11/16	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	11/16	
A61P 11/08	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	11/08	
A61P 43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00 １２１	
A61K 38/16	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	38/16	
Ｃ０７Ｋ 14/00	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/00 ＺＮＡ	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人 100191086
弁理士 高橋 香元
(72)発明者 ノーキルド, ペーター
デンマーク国, １３１６ コペンハーゲン ケー, ２．, リゲンスゲード １１ エー

Ｆターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 BA23 BA41 MA13 MA16
MA17 MA22 MA23 MA28 MA35 MA37 MA41 MA43 MA47 MA52
MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA591 ZA592 ZA601
ZA602 ZA611 ZA612 ZA681 ZA682 ZB111 ZB112 ZB351 ZB352 ZC511
ZC512 ZC751
4H045 AA10 AA30 BA10 BA50 CA40 EA20 FA74 GA20 GA30