

(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2020-512287

(P2020-512287A)

(43) 公表日 令和2年4月23日(2020.4.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-531167 (P2019-531167)
 (86) (22) 出願日 平成29年12月13日 (2017.12.13)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年7月5日 (2019.7.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/082535
 (87) 国際公開番号 W02018/108971
 (87) 国際公開日 平成30年6月21日 (2018.6.21)
 (31) 優先権主張番号 PA201670991
 (32) 優先日 平成28年12月13日 (2016.12.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 デンマーク (DK)

(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, 2 2 0 0 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 100191086
 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺の炎症性疾患を処置するための方法

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンの投与によ
 って気道過敏性を低下させること、肺コンプライアンスを上昇させること、肺の炎症を減
 少させること、気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞数を減少させること、およびサイトカイン
 産生を低下させることに基づく、喘息、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続
 型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘
 息持続状態、肺炎、気管支拡張症、COPD、サルコイドーシスおよび肺癌の処置または
 防止の方法に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

呼吸器系の炎症性疾患の処置および/または予防の方法であって、少なくとも 1 種類のディフェンシンの経口投与または肺内投与を含み、好ましくは対象が喘息に罹患している、方法。

【請求項 2】

前記疾患が、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、気管支拡張症、慢性閉塞性肺障害 (COPD)、気管支炎、肺炎および肺気腫、サルコイドーシス、肺線維症からなる群から選択され、好ましくはステロイド治療抵抗性喘息であり、少なくとも 1 種類のディフェンシンの投与を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

炎症が、肺癌によって引き起こされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

肺の組織炎症、気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞数を低減すること、肺組織ホモジェネート中の炎症性サイトカイン産生の正常化およびサイトカインストームの防止/処置によって免疫系のバランスを回復させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

その必要がある対象において肺コンプライアンスを増加させること、気道過敏性を低下させること、および/またはピークフローを増加させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 6】

肺微生物叢のおよび/または肺微生物叢からの、遺伝子の豊富さ、門の数を増加させること、酪酸塩産生および/またはトリプトファン産生を増加させること、酢酸塩産生を減少させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

肺中の正常微生物叢を維持することおよび/または安定化することを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

1 秒間努力呼気肺活量 (FEV₁) および/または最大呼気速度 (PEFR) を増加させること、または PEFR 変動を減少させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 9】

前記ディフェンシンが、HD 5、HD 6、hBD 1、hBD 2、切断型 hBD 2、hBD 3 および hBD 4 からなる群から選択される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、組成物中に含まれ、前記組成物が、2 種類のディフェンシンなど、3 種類のディフェンシンなどの、2 種類以上のディフェンシンを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記 2 種類のディフェンシンが、hBD 2 および HD 5 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記組成物が、医薬組成物である、請求項 10 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ディフェンシンが、細胞貫通ペプチド (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 つの追加部分を更に含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記追加部分が、半減期延長ペプチドである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記半減期延長ペプチドが、新生児 Fc 受容体 (FcRn)、トランスフェリン、アルブミン (HAS)、X TEN (登録商標) または 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、絨毛ゴナドトロピン (CG) 鎖のカルボキシ端ペプチド (CTP) などの負に荷電した高度にアシル化されたペプチド、ヒト IgG、および CH₃(CH₂)_nCO - (ここで n は 8 ~ 22 である) に結合できる分子からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記対象が、日常症状など、持続性症状などの、1 週間につき > 2 回の喘息症状を呈する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記対象が、活動に影響を及ぼす発作など、身体活動を制限する発作などの、異なる強度の喘息発作を呈する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象が、数日間持続する 1 週間あたり > 2 回の症状など、頻繁な夜間症状などの、1 ヶ月につき > 2 回の夜間喘息症状を呈する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記対象が、60 ~ 80% の FEV₁ など、< 60% の FEV₁ などの、< 80% の 1 秒間努力呼気肺活量 (FEV₁) を呈する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象が、20 ~ 30% の PEF R 変動など、> 30% の PEF R 変動など、> 60% の PEF R 変動などの、> 20% の変動がある最大呼気速度 (PEF R) を呈する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記ディフェンシンが、糖質コルチコイド、作動薬、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト、テオフィリン、抗生物質、リファキシミン、化学療法もしくは免疫療法、免疫抑制薬、プレバイオティクス、プロバイオティクス、トリプトファン、短鎖脂肪酸、HNP - 1、HNP - 2、HNP - 3、HNP - 4、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリン、リゾチーム、糞便移植またはこれらの任意の組合せとの組み合わせで投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

1 日投与量が、0.5 ~ 5 mg ディフェンシン / kg など、1 ~ 2 mg ディフェンシン / kg など、1 日あたり 1.2 mg ディフェンシン / kg などの、0.1 ~ 10 mg ディフェンシン / kg である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記ディフェンシンが、少なくとも 1 日 2 回など、少なくとも 1 日 3 回など、少なくとも 1 日 4 回など、少なくとも 1 日 5 回または継続的になど、少なくとも 1 日 1 回投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記肺内投与が、気管内、気管支内、または気管支肺胞上皮である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記肺内投与が、吸入器、ネブライザー、または気化器によるものである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記肺癌が、小細胞肺癌または非小細胞肺癌であって、所望により前記癌が、放射線療法によって、化学療法および / または手術によって処置されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

先行請求項のいずれか一項に記載の処置の方法における使用のためのディフェンシンポリペプチド。

【請求項 28】

先行請求項のいずれか一項において定義される障害の処置のための薬剤の調製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】

本発明は、哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンの投与によるサイトカイン産生の正常化およびサイトカインストームの防止によって、気道過敏性を低下させること、肺コンプライアンスを上昇させること、肺の炎症を減少させること、血管周囲または気管支周囲の炎症を減少させること、気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞数を減少させること、および免疫系のバランスを回復させることに基づき、喘息、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、肺炎、気管支拡張症、COPDおよび肺癌を含む肺の炎症性疾患を処置または防止する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

喘息は、慢性炎症、気道過敏性ならびに再発性の喘鳴、咳および息切れの症状を特徴とする気道の異質性の炎症性障害である。喘息は、全世界で3億人が罹患している大きな公共の健康問題であり、過去30年にわたって特に西欧諸国で有病率が大幅に増加している(Cosmi et al., 2011)。しかし、病因のメカニズムは見つからないままである。ステロイドおよび長時間作用性 作動薬との併用療法が喘息処置の中心である。これらの療法は急性炎症症状およびサイトカイン放出を効率的に抑制するが、疾患の予防法または治療法は今のところ存在しない。

【0003】

軽度から中等度のアレルギー性喘息は一般に、IgE産生に関連する活性化Th2リンパ球および好酸球浸潤、粘液分泌細胞、肥厚および化生、気道壁のリモデリングならびに気道過敏性(AHR)からなる急性または慢性の気道炎症を特徴とする。AHRは、メタコリンなどの非特異的な収縮刺激性刺激物質に対する応答性の増加および気道の狭窄を特徴とする(Hansbro et al., 2011)。Th2細胞は、特に、それらのサイトカインIL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13の分泌を通じて、疾患の様々な病理学的特徴に寄与する。

【0004】

重度喘息、好中球性喘息またはステロイド治療抵抗性喘息は、軽度から中等度のアレルギー性喘息と異なる病理学的特徴を有し、Th17細胞が寄与する可能性がある混合されたTh2/Th1表現型を特徴とする。腫瘍壊死因子(TNF)-、インターフェロン(IFN)-、IL-17およびIL-27が増加し、好中球(好酸球ではなく)の流入または喘息のこの亜型に特徴的な混合顆粒球の気道浸潤を引き起こし得る。喘息のこの亜型に罹患した患者は糖質コルチコイド処置に抵抗性であり、細菌およびウイルス感染の両方が疾患の誘発およびの進行に関係付けられている(Hansbro et al., 2004)。また、喘息の患者およびアトピー性皮膚炎に罹患した患者は、非アトピー性の個体と比較して感染症、例えば肺炎を発症する傾向が強い。

【0005】

単一のサイトカインを標的とすることによって喘息を処置するというコンセプト、例えば、抗IL-4;抗IL-5;抗TNF- は、限定的な成功を収めた。実際に、現在の中心療法であるステロイド療法は、広範な炎症誘発性経路を抑制することによって作用すると考えられている(Hansbro et al., 2011)。

【0006】

10

20

30

40

50

慢性閉塞性肺疾患 (COPD)

COPDは、2020年までに全世界で第4位の主な死亡原因になると予測されている、大きな公共の健康問題である。有毒な粒子およびガスの持続的な吸入が主要な危険因子であり、喫煙はこの種のリスクの最も良い例であるものの、喫煙者のわずか15%が、COPDを発症する (Fletcher and Peto, 1977)。喫煙者は、機能不全の免疫系を有する (Bouloukaki et al., 2011) もの、COPDの発症および疾患重症度の増加は徐々に炎症細胞負荷を悪化させる (Hogg et al., 2004)。

【0007】

マイクロバイオーーム

幼児の微生物叢は、最初は様々な身体部位全体で均一であり、その後の数日および数週間で部位特異的共同体へと変わる。健常な成人の肺マイクロバイオーームは、バクテロイデス、ファーミキューテスおよびプロテオバクテリア門が優位を占め、主たる微生物叢は、シュドモナス、レンサ球菌、プレボテラ、フゾバクテリウム、ベーヨネラ、ヘモフィルス、ナイセリアおよびポルフィロモナスから構成される (Charlson et al., 2011)。喘息患者の間で、対照と比較してプロテオバクテリア (特にヘモフィルス、モラクセラおよびナイセリア) およびファーミキューテス (特にラクトバチルス種) の頻度の増加およびバクテロイデス門 (特にプレボテラ) の頻度の減少が観察された (Hilty et al., 2010)。同様に疫学的データは、消化管微生物叢が喘息の乳児と非喘息の乳児の間で異なることを示す (Penders et al., 2007)。

10

20

【0008】

ディフェンシン

ディフェンシンは、健常なマイクロバイオーームを維持し潜在的な病原体の発生を防ぐように働く有力な自然宿主防御の1つを代表する (Wehkamp et al., 2002 および Salzman et al., 2007)。ディフェンシンは、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、真菌および古細菌に対する抗微生物活性ならびに抗炎症活性を有するペプチドである。ディフェンシン、特にhBD2は、炎症性腸疾患の処置における治療可能性を示した (WO2010/007166; WO2013/007596)。

【0009】

結論として、肺の炎症性疾患に罹患している対象の新規な処置法が必要である。自ら薬剤を投与、例えば吸引できる患者のための気道を通して投与できる処置薬が特に必要であり、かつ効率的に薬剤を吸入できない患者に対する他の投与経路による処置法が必要である。

30

【発明の概要】

【0010】

本発明者らは驚くべきことに、哺乳動物ディフェンシンが、気道過敏性 (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; 肺炎症を減少させる能力; 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低下させるならびに肺細胞中のIFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10およびIL-13を減少させる能力を有することを実証した。本発明者らは、喘息モデルでの組織炎症パラメータを減少させる効能、例えば血管周囲炎症および気管支周囲炎症を減少させる効能も実証した。

40

【0011】

データは、哺乳動物ディフェンシンの投与が喘息、COPDおよびサルコイドーシスの主要な特徴の正常化または減少をもたらし、したがって喘息、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、肺炎、気管支拡張症、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) およびサルコイドーシスを含む肺の炎症性疾患の処置または防止において有用であることを示す。

50

【0012】

驚くべきことに、ディフェンシンの経口投与および鼻腔内投与が、試験された少なくとも一部のパラメータについて同程度に有効であることが、ハウスダストダニアレルギーのマウスモデルにおいて実証された。これは、薬剤を吸入するのが困難な対象への経口投与による炎症性肺疾患の処置への可能性を開く。実施例において実証されるように、マウスを卵白アルブミン(OVA)に感作しC.ムリダルムに感染させる喘息のステロイド非感受性マウスモデルにおいて、およびマウスをハウスダストダニ(HDM)+フロイントアジュバントで免疫しHDMを負荷するステロイド感受性マウスモデルにおいて、ヒト-ディフェンシン2(hBD2)の投与は、AHRを低下させること、Cdynを増加させること、肺の組織炎症を減少させること、BALF中の炎症性細胞数を減少させること、および炎症性サイトカイン産生を減少させることが可能である。hBD2による処置なしでは、動物は、AHRの劇的な増加、Cdynの減少、肺組織の炎症性組織変化、白血球数、特に好中球、好酸球およびマクロファージの増加および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する。

10

【0013】

これらの知見から、本発明者らは肺の炎症の処置におけるディフェンシンの広く一般的な使用も検討する。肺の炎症を引き起こし得る条件の例は、肺癌、サルコイドーシスおよび抗微生物処置、化学療法、免疫療法、免疫抑制療法、および放射線療法を含むがこれらに限定されない宿主防御に影響を及ぼす種々のタイプの医学的処置を含む。

20

【0014】

本発明者らは、ディフェンシンがサイトカインレベルを完全に正常化することによって免疫系のバランスを回復させ、これにより、例えば所与のサイトカインをロックアウトするインターロイキン抗体または、自然免疫系の全身的抑制をもたらす全身的免疫抑制による現在の喘息処置とは反対にサイトカインストームを防止することを実験的に示した。したがって、ディフェンシンは、現在の処置法の有望な代替法となる。

【0015】

更に本発明者らは、ディフェンシンが、肺に直接的に投与された場合だけでなく、更に重要なことに、そして驚くべきことに、消化管に単に経口投与された場合でも、肺においてその効果を発揮できることを実証した。

【0016】

喘息発作の処置でのならびに維持療法のための経口投与は、世界中の喘息患者の生活を楽にするであろう。

30

【0017】

したがって、一態様では、免疫系のバランス回復、サイトカイン産生の正常化およびサイトカインストームの防止を含む呼吸器系の炎症性疾患を処置および/または予防する方法であって、少なくとも1種類のディフェンシンの経口投与または肺内投与を含み、好ましくは対象が喘息に罹患している、方法が提供される。

【0018】

他の態様では、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、気管支拡張症、気管支炎、COPD、サルコイドーシス、肺炎および気腫、肺線維症からなる群から選択される疾患、好ましくはステロイド治療抵抗性喘息を処置および/または防止する方法であって、少なくとも1種類のディフェンシンの投与を含む、方法が提供される。

40

【0019】

対象において肺癌を処置および/または防止する方法であって、当該対象への少なくとも1種類のディフェンシンの投与を含む、方法および、その必要がある対象において肺の組織炎症、血管周囲および気管支血管の炎症、気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞数および/または肺組織ホモジェネート中の炎症性サイトカイン産生を低減する方法であって、当該対象への少なくとも1種類のディフェンシンの投与を含む、方法が更に提供される。

【0020】

50

更に他の態様では、その必要がある対象において、肺の組織炎症、気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞数を低減する方法、肺組織ホモジェネート中の炎症性サイトカイン産生の正常化によって免疫系のバランスを回復させる方法およびサイトカインストームを防止/処置する方法であって、当該対象への少なくとも1種類のディフェンシンの投与を含む、方法が提供される。

【0021】

別の態様では、その必要がある対象において、肺コンプライアンスを増加させる方法、気道過敏性を低下させる方法および/またはピークフローを増加させる方法であって、当該対象への少なくとも1種類のディフェンシンの投与を含む、方法が提供される。

【0022】

その必要がある対象において、1秒間努力呼気肺活量(FEV1)および/または最大呼気速度(PEFR)を増加させる方法またはPEFR変動を減少させる方法であって、当該対象への少なくとも1種類のディフェンシンの投与を含む、方法。

【0023】

少なくとも1種類のディフェンシンを対象に投与することによって、その必要がある対象において遺伝子の豊富さ、門の数を増加させることができ、酪酸塩および/またはトリプトファンの産生を増加させることができ、肺微生物叢からの酢酸塩の産生を減少させることができる。

【0024】

更に、その必要がある対象において、肺の正常微生物叢を維持および/または安定化する方法、重要な共生細菌の出現度および存在量ならびに短鎖脂肪酸および/または酪酸塩および/またはトリプトファン産生株を増加させる方法であって、当該対象への少なくとも1種類のディフェンシンの投与を含む、方法が提供される。

【0025】

他の態様では、本開示は、本明細書に記載の任意の方法による処置法で使用するためのディフェンシンポリペプチドおよび本明細書で定義される障害の処置のための薬剤の調製のためのディフェンシンポリペプチドの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】マウスを卵白アルブミンで感作しC.ムリダラムに感染させる、喘息のマウスステロイド非感受性モデル(Essilfie et al., 2015)における哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンの効果を検討するための実験設定の概要である。

【図2】マウスをハウスダストダニ(HDM) + フロイントアジュバントで免疫しHDMを負荷する、喘息のマウスステロイド感受性モデルにおける哺乳動物 - ディフェンシンの効果を検討するための実験設定の概要である。

【図3a】ヒト - ディフェンシン1~4のClustal W(2.1)多重配列アラインメントである。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し、:は以下の「強い」グループの1つが完全に保存されることを示し: 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1つが完全に保存されることを示す: 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3b】HD5およびHD6のClustalアラインメントである。

【図4】卵白アルブミン/C.ムリダラムマウスステロイド非感受性喘息モデルにおける、hBD2の鼻腔内投与後の気道過敏性である。Y軸は、Rn 気道に固有の抵抗単位(450呼吸/分の呼吸数での8mL/kgの一回換気量)を示す。****は、マン・ホイットニー検定を使用してp < 0.05のp値を有する統計学的有意差を示す。

【図5a - 5b】ハウスダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるhBD2

10

20

30

40

50

のそれぞれ鼻腔内投与(図5a)および経口投与(図5b)後の気道過敏性である。生理食塩水は、負荷されない対照である。HDM/媒体は、媒体で処置されたハウダストダニが負荷され対照である。「hBD2 IN 1.2 mpk」は、1.2 mg/kgで鼻腔内に投与されたhBD2である。5 mpkは、5 mg/kgである。図5aの記号：
 - 媒体 IN； - hBD2 IN 1.2 mpk； - 生理食塩水； - hBD2 IN 5 mpk。図5bの記号：
 - HDM/媒体 IN； - 生理食塩水； - HDM/デキサメタゾン； - HDM/hBD2 1.2 mg/kg p.o.

【図6a - 6b】ハウダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるhBD2のそれぞれ鼻腔内投与(図6a)および経口投与(図6b)後の肺コンプライアンスである。図6aの記号：
 - 媒体 IN； - hBD2 IN 1.2 mpk； - 生理食塩水； - hBD2 IN 5 mpk。図6bの記号：
 - HDM/媒体 IN； - 生理食塩水； - HDM/デキサメタゾン； - HDM/hBD2 1.2 mg/kg p.o.

【図7】卵白アルブミン/C.ムリダラムマウスステロイド非感受性喘息モデルにおけるhBD2の鼻腔内投与後のBALF中の総細胞数および細胞分画数である。図の記号：
 A:SPG/Sal B:SPG/Ova C:SPG/Ova/Dex D:Cmu/Sal E:Cmu/Ova F:Cmu/Ova/Dex G:Cmu/Ova/hBD2 H:Cmu/Ova/hBD2/Dex

【表1】

処置群

	0日目	12+13日目	14日目	32日目	33+34日目
SPG/Sal	Sal IP	Ova IN	SPG IN	PBS IN	Ova IN
Cmu/Sal	Sal IP	Ova IN	Cmu IN	PBS IN	Ova IN
SPG/Ova	Ova IP	Ova IN	SPG IN	PBS IN	Ova IN
Cmu/Ova	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	PBS IN	Ova IN
SPG/Ova/Dex	Ova IP	Ova IN	SPG In	Dex IN	Ova+Dex IN
Cmu/Ova/Dex	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	Dex IN	Ova+Dex IN
Cmu/Ova/hBD-2	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	hBD2 IN	Ova+hBD2 IN
Cmu/Ova/hBD-2/Dex	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	hBD2+Dex IN	Ova+hBD2+Dex IN

【図8a - 8b】ハウダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるhBD2のそれぞれ鼻腔内投与および経口投与後のBALF中の総細胞数および差別的細胞数である。図8aは、hBD2を経口処置した動物を示す。図8bは、hBD2を鼻腔内投与した動物からの結果を示す。結果を平均値±SEMとして示す。* : p < 0.05 (媒体群に対する有意差、対応のない検定(unpaired test))。図の記号：生理食塩水 INは、負荷されない未処置の対照である。HDM/媒体は、未処置であるがHDMを負荷された動物を示す。HDMは、ハウダストダニを負荷された動物である。POは経口投与であり、INは鼻腔内投与である。*が付されたカラムは、媒体処置対照と統計的に有意に異なる。

【図9 - 18】ハウダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるhBD2のそれぞれ鼻腔内投与および経口投与後のIFN- (図9)、TNF- (図10)、IL-1 (図11)、IL-4 (図12)、IL-5 (図13)、IL-6 (図14)、IL-8 (図15)、IL-9 (図16)、IL-10 (図17)およびIL-13 (図18)のサイトカイン濃度を示す図である。各々の図は、左に鼻腔内群および右に経口群からのデータを有する。結果を平均値±SEMとしてpg/mLで示す。* : p < 0.05 (媒体群に対する有意差、マン・ホイットニー検定)。

【図19】ハウダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるhBD2のそれ

ぞれ鼻腔内投与および経口投与後のH & E / P A S 標本による肺組織像である。左上パネル：未処置かつ負荷されない対照；右上パネル：未処置かつH D M 負荷された対照；左下パネル：H D M 負荷され、h B D 2 で経口処置；右下パネル：H D M 負荷され、h B D 2 で鼻腔内処置。50倍拡大図。

【図20】ハウスダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるh B D 2 のそれぞれ鼻腔内投与および経口投与後の肺の炎症の重症度である。* : $p < 0.05$ (媒体群に対する有意差、マン・ホイットニー検定) ; # : $p < 0.05$ (媒体群に対する有意差、ウィルコクソンの符号順位検定)。

【図21】ハウスダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるh B D 2 のそれぞれ鼻腔内投与および経口投与後の血管周囲および気管支周囲の炎症である。 : 好酸球 ; : 単球。* : $p < 0.05$ (好酸球の血管周囲浸潤について媒体群に対する有意差、マン・ホイットニー検定) ; # : $p < 0.05$ (好酸球および単球の血管周囲/気管支周囲の浸潤について媒体群に対する有意差、ウィルコクソンの符号順位検定)。

【図22】雌性N M R I マウスへの4 m g / k g h B D 2 の経口投与後の薬理動態データである。Y軸は、h B D 2 を $\mu g / g$ 組織で示す。結果を、群平均値 \pm S E M として示す。

【図23】1 m g / k g のそれぞれ皮下投与および静脈内投与後のh B D 2 の薬理動態データである。Y軸は、h B D 2 を $\mu g / m L$ で示す。異なる曲線は、異なる実験および検査法 (H P L C および E L I S A) を表す。

【図24】16.5 m g / k g のそれぞれ皮下投与および静脈内投与後の「h B D 2 - アルブミンN末端融合物」の薬理動態データである。Y軸は、融合タンパク質の濃度を $\mu g / m L$ で示す。結果は4匹のマウスの平均/サンプリング時間 \pm S D である。

【図25】16.5 m g / k g のそれぞれ皮下投与および静脈内投与後の「h B D 2 - アルブミンC末端融合物」の薬理動態データである。Y軸は、融合タンパク質の濃度を $\mu g / m L$ で示す。結果は4匹のマウスの平均/サンプリング時間 \pm S D である。

【図26】「h B D 2 - アルブミンC末端融合物」の静脈内投与による実験の間の疾患活動性インデックススコアの経過である。結果を、群あたり9~10匹の動物の平均値 \pm 平均値の標準誤差として示す。所与の日付での対照 (媒体) 群の値からの有意差を * : $P < 0.05$; * * : $P < 0.01$; * * * : $P < 0.001$ として示す (ノンパラメトリックなデータのクラスカル・ワリスの検定)。A l b u c u l t (登録商標) は、N o v o Z y m e s A / S から入手可能な組換えアルブミンである。グラフに化合物の記載がない場合は、化合物はh B D 2 - アルブミンC末端融合物である。

【図27】「h B D 2 - アルブミンC末端融合物」の近位大腸の組織学スコアである。近位大腸試料の組織学スコア。結果を群あたり $n = 9 \sim 10$ 動物の平均値 \pm 平均値の標準誤差として示す。所与の日付での対照 (媒体) 群の値からの有意差を * * * : $P < 0.001$; * : $P < 0.05$ (ノンパラメトリックなデータのクラスカル・ワリスの検定 + D u n n の事後検定) として示す。A l b u c u l t (登録商標) は、N o v o Z y m e s A / S から入手可能な組換えアルブミンである。グラフに化合物の記載がない場合は、化合物はh B D 2 - アルブミンC末端融合物である。

【図28】マウスをハウスダストダニ (H D M) + フロイントアジュバントで免疫しH D M 負荷する、マウスステロイド感受性モデルにおいて喘息の予防のための哺乳動物ディフェンシンの効果を検討するための実験設定の概要である。

【図29】ハウスダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるh B D 2 のそれぞれ予防的な鼻腔内投与および経口投与後の気道過敏応答性である。

【図30】ハウスダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるh B D 2 のそれぞれ予防的な鼻腔内投与および経口投与後の肺コンプライアンスである。

【図31】ハウスダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるh B D 2 の予防的経口投与後のB A L F 中の好中球数である。* : $p < 0.05$ (媒体群に対する有意差、マン・ホイットニー検定)。

【図32 - 37】ハウスダストダニマウスステロイド感受性喘息モデルにおけるh B D 2

10

20

30

40

50

の予防的経口投与後の肺ホモジェネート中のTNF- α （図32）、IL-4（図33）、IL-5（図34）、IL-6（図35）、IL-9（図36）およびIL-13（図37）のサイトカイン濃度（pg/mL）である。結果を平均値 \pm SEMとして示す。*：p<0.05（媒体群に対する有意差、マン・ホイットニー検定）。

【図38-39】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、hBD2およびHD5+hBD2）の効果を検討するための実験設定の概要である。

【図40】高脂肪食マウスモデルにおけるHD5、hBD2およびHD5+hBD2の経口投与による予防処置後の微生物存在量の属解析である。

【図41】高脂肪食マウスモデルにおけるHD5およびhBD2の経口投与による予防処置後の小腸でのアロバキュラムの存在量である。

【図42】高脂肪マウスモデルにおけるhBD2の経口投与による予防処置後の大腸での乳酸菌科の存在量を示す図である。

【図43】高脂肪食マウスモデルにおけるhBD2の経口投与による予防処置の4週間後（左パネル）および10週間後（右パネル）後の大腸でのバルネシエラの相対的存在量を示す図である。

【図44】高脂肪食マウスモデルにおけるHD5およびhBD2の経口投与による治療介入後の大腸でのアロプレボテラの相対的存在量を示す図である。

【図45】高脂肪食マウスモデルにおけるHD5またはhBD2の経口投与による治療介入後の小腸（左パネル）および大腸（右パネル）でのビフィドバクテリア科の相対的存在量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

定義

ディフェンシン：本明細書で使用する場合、用語「ディフェンシン」は、抗微生物ペプチドのディフェンシン類に属するポリペプチドを指す。ディフェンシンは、健全なマイクロバイオームを維持し潜在的な病原体の発生を防ぐように働く有力な自然宿主防御の1つを代表する（Wehkamp et al, 2002およびSalzman et al, 2007）。ディフェンシンは、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、真菌および古細菌に対する抗微生物活性ならびに抗炎症活性を有するペプチドである。

【0028】

ヒトディフェンシンは、それらの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 -ディフェンシンへと分類される、小さいカチオン性ペプチドである。 α -ディフェンシンは、好中性顆粒において発現されるもの（HNp1-4）、および小腸陰窩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）へと更に細かく分類され得る。 β -ディフェンシン（DEFBn）は皮膚、眼、中耳、口、気管、肺、消化管、泌尿生殖器系、腎臓、膵臓、肝臓、脾臓および乳腺を含む様々な組織および器官における上皮細胞によって主に産生される。ディフェンシンの例は、全て α -ディフェンシン類に属する、ヒト腸 α -ディフェンシン5（HD5；配列番号5）、ヒト腸 β -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）、ヒト好中球ペプチド2（HNp-2）、ヒト好中球ペプチド3（HNp-3）；またヒト α -ディフェンシン1（hBD1；配列番号1）；ヒト β -ディフェンシン2（hBD2；配列番号2）；ヒト β -ディフェンシン3（hBD3；配列番号3）；ヒト β -ディフェンシン4（hBD4；配列番号4）；および切断型ヒト β -ディフェンシン2（配列番号7）を含む。

【0029】

WO2013/026794は、切断型hBD2および非切断型hBD2が同様の生物活性を有することを実証する。

【0030】

ディフェンシンは前駆体として発現され、細胞外空間へ分泌される前にシグナルペプチ

ドの切断によって、および場合によりプロペプチドの切断によってもプロセッシングされる。最も特徴付けされているヒト - ディフェンシンファミリーのメンバーはhBD1~4である。一部のヒトディフェンシン(例えばhBD1)は構成的に産生されるが、他(例えばhBD2、hBD3およびhBD4)は炎症性サイトカインまたは外来性微生物産物によって誘導される。前述の特定配列は、予測される成熟生物活性ディフェンシンを示す。プロセッシングは細胞間で異なる場合があること、および得られる分泌型成熟ペプチドは予測配列と1個または2個のCまたはN末端アミノ酸が異なり得るが依然として生物活性を保持することが、当業者によって理解されるであろう。

【0031】

同一性：2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間の関連性は、パラメータ「同一性」によって説明される。2つのアミノ酸配列間の同一性の程度は、EMBOSSパッケージのニードルプログラム(Riceら, 2000, <http://emboss.org>)、好ましくはバージョン3.0.0以降、に実装されるようなニードルマン-ウンシュアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453)を用いて決定される。使用される任意のパラメータは、10のギャップ・オープン・ペナルティ(gap open penalty)、0.5のギャップ・エクステンション・ペナルティ(gap extension penalty)、およびEBL0SUM62(BL0SUM62のEMBOSSバージョン)置換行列である。ニードル標識された「最長同一性」(-nobriefオプションを用いて得られる)のアウトプットをパーセント同一性として使用し、(同一残基×100)/(アラインメント長-アラインメントにおけるギャップの全数)として計算する。

10

20

【0032】

正常微生物叢：本明細書で使用する場合、用語「正常微生物叢」は、共生バランス失調でない微生物叢を示す。正常微生物叢は、遺伝子の大きな豊富さを有することによって特徴付けられる。正常腸微生物叢は、バクテロイデス、フィーカリバクテリウム、ロゼブリア、ブラウティア、ルミノコッカス、コプロコッカス、ピフィドバクテリウム、メタノブレピバクター、ラクトバチルス、コプロコッカス、クロストリジウム、アッカーマンシア、ユーバクテリウム属に属する細菌を含むことによって特徴付けられる。

30

【0033】

正常肺微生物叢は、バクテロイデス、ファーミキューテスおよびプロテオバクテリア属に属する細菌を含むことによって特徴付けられ、主たる微生物叢は、シュードモナス、レンサ球菌、プレボテラ、フゾバクテリウム、ベーヨネラ、ヘモフィルス、ナイセリアおよびポルフィロモナスから構成される。

【0034】

処置：本明細書で使用する場合、用語「処置」および「処置する」は、症状、疾患または障害に対抗するための患者の管理および看護を指す。本用語は患者が患う所与の症状に対する処置の全範囲を含むと意図され、症状または合併症を軽減または緩和する；症状、疾患または障害の進行を遅らす；症状、疾患または障害を治療または消失させる；および/または症状、疾患または障害を予防するための活性化化合物の投与などであり、ここで「予防する」または「予防」は、活性化化合物を妨げ、低下させて症状または合併症の発症のリスクを防止または低下するための患者の管理および看護を指すと理解されるべきである。治療されるべき患者は、好ましくは哺乳動物、特にヒトである。治療されるべき患者は様々な年齢であり得る。

40

【0035】

患者：患者は、肺の炎症性障害などの特定の障害と診断されたか、または肺の炎症性障害などの障害を示す特定の症状を有する対象である。

【0036】

哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物 - ディフェンシン

本開示は、特に喘息、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続

50

型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、気管支拡張症およびCOPDの処置における哺乳動物 - ディフェンシンおよび / または - ディフェンシン、例えばヒト - ディフェンシン、より好ましくはヒト科ディフェンシンの使用に関する。

【0037】

一実施形態において、哺乳動物 - ディフェンシンおよび / または - 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7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%の同一性の程度を有する。他の実施形態では、ディフェンシンは、配列番号1~7のうちの1つと10個未満、例えば8個未満、例えば5個未満、例えば4個未満、例えば3個未満、例えば2個未満のアミノ酸が異なる。

10

【0038】

好ましい態様において、ヒト - ディフェンシンは、 - ディフェンシン5 (配列番号5) および / または - ディフェンシン6 (配列番号6) からなる。好ましい実施形態では、哺乳動物 - ディフェンシンは、ヒト - ディフェンシン1 (配列番号1)、ヒト - ディフェンシン2 (配列番号2)、ヒト - ディフェンシン3 (配列番号3)、ヒト - ディフェンシン4 (配列番号4) または切断型ヒト - ディフェンシン2 (配列番号7) からなる。

20

【0039】

好ましい実施形態では、ヒト - ディフェンシンは、配列番号5のアミノ酸配列と、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%の同一性の程度を有する。好ましい実施形態では、ヒト哺乳動物 - ディフェンシンは、ディフェンシン5 (配列番号5) からなる。好ましい実施形態では、ヒト - ディフェンシンは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも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%の同一性の程度を有する。好ましい実施形態では、ヒト - ディフェンシンは、ヒト - ディフェンシン2 (配列番号2) または切り詰め型ヒト - ディフェンシン2 (配列番号7) からなる。

30

【0040】

更に別の実施形態では、哺乳動物 - ディフェンシンは、ヒト - ディフェンシンおよび / またはマウス - ディフェンシン、ならびにそれらの機能的に同等な変異体からなる。好ましくは、哺乳動物 - ディフェンシンは、ヒト - ディフェンシン5、ヒト - ディフェンシン6 およびそれらの機能的に同等な変異体からなる。より好ましくは、哺乳動物 - ディフェンシンはヒト - ディフェンシン5、およびその機能的に同等な変異体またはオーソログからなる。

40

【0041】

より更なる実施形態では、哺乳動物の - ディフェンシンはヒト - ディフェンシンおよび / またはマウス - ディフェンシン、ならびにそれらの機能的に同等な変異体からなる。好ましくは、哺乳動物 - ディフェンシンは、ヒト - ディフェンシン1、ヒト - ディフェンシン2、ヒト - ディフェンシン3、ヒト - ディフェンシン4 およびそれらの機能的に同等な変異体からなる。より好ましくは、哺乳動物 - ディフェンシンは、ヒト - ディフェンシン2 およびそれらの機能的に同等な変異体またはオーソログからなる。

40

【0042】

一実施形態では、本方法はそのような処置を必要とする対象への、少なくとも1種類の哺乳動物 - ディフェンシンの有効量を投与することを含む。

【0043】

哺乳動物 (例えばヒト) - ディフェンシンまたは - ディフェンシンの「機能的に同等な変異体」は、元の哺乳動物 (例えばヒト) - ディフェンシンおよび / または - ディ

50

ィフェンシンと肺または腸における微生物叢に対するほとんど同じの効果を示す、改変された哺乳動物（例えばヒト） - ディフェンシンまたは - ディフェンシンである。哺乳動物（例えばヒト）ディフェンシンの機能的に同等な変異体は、哺乳動物（例えばヒト）ディフェンシンアミノ酸配列（例えば配列番号1～7のいずれか）と比較して1～5個のアミノ酸改変、好ましくは1～4個のアミノ酸改変、より好ましくは1～3個のアミノ酸改変、最も好ましくは1～2個のアミノ酸改変、特に1個のアミノ酸改変を含んでよい。好ましくは、哺乳動物 - ディフェンシンについて、配列番号2を有するヒト - ディフェンシン2または切り詰め型ヒト - ディフェンシン2（配列番号7）と比較し、 - ディフェンシンについて、HD5（配列番号5）と比較する。

【0044】

本明細書において、用語「改変」は、哺乳動物（例えばヒト）ディフェンシンの任意の化学的改変を意味する。1つまたは2つ以上の改変は、1個または2個以上のアミノ酸の置換、欠失および/または挿入、ならびに1つまたは2つ以上のアミノ酸側鎖の交換；またはアミノ酸配列において類似の特性を有する非天然アミノ酸の使用であり得る。特に、1つまたは2つ以上の改変は、C末端のアミド化などのアミド化であり得る。好ましくは、アミノ酸の改変はマイナーなものであり、すなわち、ポリペプチドのフォールディングおよび/または活性に大きな影響を与えない保存的アミノ酸の置換または挿入；単一の欠失；小規模なアミノ末端またはカルボキシル末端の伸長；または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の、正味電荷を変化させることもしくは別の機能によって精製を容易にするわずかな伸長である。1つの実施形態では、ポリヒスチジンタグ、抗原エピトープまたは結合ドメインなどのわずかな伸長は、最大で約20～25個の残基の小リンカーペプチドによって哺乳動物（例えばヒト） - ディフェンシンまたは - ディフェンシンに付着され、当該リンカーは制限酵素切断部位を含んでよい。

【0045】

図3におけるClustal Wアラインメントを使用して、どのアミノ酸残基をタンパク質の生物活性に実質的に影響を及ぼすことなく置換できるかを予測できる。配列は、Clustal W2.1 (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) および以下の設定：Gap Open Penalty：10、Gap Extension Penalty：0,05、Weight Transition：NO、タンパク質の親水性残基：GPSNDQE、親水性ギャップ：あり、ウェイトマトリックス：BLOSUM（PROTEIN用）を使用してアラインメントした。以下のグループ（Clustal W、「強い」保存グループ）内の置換は保存的置換と考えられる：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。以下のグループ（Clustal W、「弱い」保存グループ）内の置換は半保存的置換と考えられる：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。

【0046】

保存的置換の例は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジンおよびヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸およびアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミンおよびアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシンおよびバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシン）、および小さいアミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、トレオニンおよびメチオニン）のグループ内でなされる置換である。一般的に特定の活性を変化させないアミノ酸置換は、当該技術分野において公知であり、例えば、NeurathおよびHill（1979）によって記載されている。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。

10

20

30

40

50

【0047】

20個の標準的アミノ酸に加えて、非標準的アミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリシン、2-アミノイソ酪酸、イソバリン、および -メチルセリン）を、野生型ポリペプチドのアミノ酸残基と置換してもよい。限定された数の非保存的アミノ酸、遺伝子コードをコードしないアミノ酸、および非天然アミノ酸を、アミノ酸残基と置換してもよい。「非天然アミノ酸」はタンパク質合成後に改変されており、かつ/またはそれらの側鎖で標準アミノ酸のものとは異なる化学的構造を有する。非天然アミノ酸は、化学合成され得、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-メチルプロリンおよび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。

10

【0048】

哺乳動物 -ディフェンシンおよび/または -ディフェンシン中の必須アミノ酸は、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、当該技術分野において公知の方法によって特定できる（Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085）。後者の技術では、単一アラニン変異が分子中の全ての残基で導入され、得られる変異分子を生物活性（すなわち、気道過敏応答性に対する活性またはサイトカイン、例えば、TNF-活性の抑制）について試験して、分子の活性に重要であるアミノ酸残基を特定する。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はまた、哺乳動物 -ディフェンシンおよび/または -ディフェンシンと関連するポリペプチドとの同一性の分析からも推測できる（図3におけるClustal Wアラインメントを参照）。

20

【0049】

単一または複数のアミノ酸置換は、Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241:53-57、Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156、WO95/17413、またはWO95/22625によって開示されるものなどの変異誘発、組換えおよび/またはシャフリングの既知の方法、それに続く関連したスクリーニング法を使用して実施および試験できる。使用され得る他の方法は、エラーブローンPCR、ファージディスプレイ（例えば、Lowman et al., 1991, Biochem. 30:10832-10837; US 5,223,409; WO 92/06204）、および領域特異的突然変異誘発（region-directed mutagenesis）（Derbyshire et al., 1986, Gene 46:145; Ner et al., 1988, DNA 7:127）を含む。所与の置換の結果が確信をもって予測できない場合、誘導体を本明細書における前述の方法にしたがって容易に分析して、生物活性の有無を決定してもよい。

30

【0050】

長時間作用性ディフェンシン

-ディフェンシンまたは -ディフェンシンの半減期は、 -ディフェンシンまたは -ディフェンシンを別の部分または分子と融合または複合化させること、すなわち、薬理的に許容される分子に連結された長期作用性の生物学的に活性な -ディフェンシンまたは -ディフェンシンを構築することによって延長されてよく、これは、複合化 -ディフェンシンまたは -ディフェンシンと同様に投与される非複合化 -ディフェンシンまたは -ディフェンシンの生体内での血漿半減期と比べて大幅に増加された、 -ディフェンシンまたは -ディフェンシンの生体内での血漿内半減期を提供する。

40

【0051】

長時間作用性生物活性 -ディフェンシンまたは -ディフェンシンは、新生児Fc受容体（FcRn）、トランスフェリン、アルブミン（HAS）、XTEN（登録商標）；または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、絨毛ゴナドトロピ

50

ン(CG) 鎖のカルボキシ末端ペプチド(CTP)などの負に荷電した高度にアシル化されたペプチド、ヒトIgG、およびCH₃(CH₂)_nCO-(ここでnは8~22である)への結合を有する分子から選択される薬理的に許容される分子に連結された哺乳動物-Diフェンシンもしくはその類似体または哺乳動物-Diフェンシンもしくはその類似体を含む。

【0052】

-Diフェンシン類似体または-Diフェンシン類似体は非哺乳動物起源のものであってもよく、有機小分子、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質から選択されてもよい。

【0053】

-Diフェンシンまたは-Diフェンシン作用薬は、先行技術文献に記載されている様々な方法、限定せずに述べると、二官能性リンカーによる化学的結合、-Diフェンシンまたは-DiフェンシンなどのDiフェンシンのN末端またはC末端をアルブミンまたはアルブミン類似体などの薬理的に許容される分子に結合することによる遺伝子技術的などで、薬理的に許容される分子に連結されてよい。特に、ヒトアルブミンなどのアルブミンまたはアルブミン類似体のN末端は、-Diフェンシンまたは-DiフェンシンのC末端、あるいは-Diフェンシンまたは-DiフェンシンのN末端に結合されてよく；あるいはヒトアルブミンなどのアルブミンのC末端は、-Diフェンシンまたは-DiフェンシンのC末端、あるいは-Diフェンシンまたは-DiフェンシンのN末端に結合されてよい。リンカー配列を、アルブミンと-Diフェンシン鎖または-Diフェンシン鎖の間に挿入できる。

【0054】

-または-Diフェンシン作用薬は、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る分子に連結されてよい。いくつかのリンカーは当技術分野において既知であり、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、ならびにW02009095479)、PDPHおよびEMCH(例えば、W02010092135を参照のこと)を含む。-Diフェンシンまたは-Diフェンシン作用薬の薬理的に許容される分子への化学的複合化(2つ以上の分子の連結)が機能的な-Diフェンシンまたは-Diフェンシン活性を強く低下させる特定の場合では、機能的な-Diフェンシンまたは-Diフェンシン作用薬を放出できる、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。

【0055】

半減期延長はまた、リジンに対する-L-グルタミルスペーサーなどのスペーサーおよびC-18脂肪二酸鎖によるペプチド骨格のアシル化によって達成されてもよい。脂肪二酸側鎖およびスペーサーは、アルブミンへの強固であるが可逆的な結合を仲介し、注射部位からの放出を遅らせ、腎クリアランスを低下させる。

【0056】

方法および使用

ヒト-Diフェンシン2は、気道過敏性を低下させる；肺コンプライアンスを上昇させる；肺炎症を減少させる；BALFの好中球数、好酸球数およびマクロファージ数を低下させるならびに、IFN-、TNF-、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10およびIL-13濃度の正常化によって免疫系のバランスを回復させサイトカインストームを防止できることが見出され、これにより、肺の炎症性疾患、例えば喘息およびCOPDの予防または処置のための薬剤として強力な活性を示す。

【0057】

10

20

30

40

50

驚くべきことに、ディフェンシンの非経口投与および経口投与が肺の炎症性疾患を処置するのに有効であることが見出された。このことは、本開示の実施例3で実証されるように、hBD2が腸から吸収されないことが知られているために予想外である。この知見の利点は、肺活量が低下した患者がディフェンシン薬剤を経口摂取できるということである。人工呼吸器の患者および喘息持続状態の患者などの重症患者を少なくとも1種類のディフェンシンの非経口投与によって処置できることも予想される。

【0058】

したがって、一態様では、本開示は、少なくとも1種類のディフェンシンの非経口投与または経口投与によって炎症性肺疾患を処置する方法に関する。好ましくは、投与は経口である。経口投与および非経口投与は、呼吸が損なわれた患者または人工呼吸療法を受けている患者に有益である。

10

【0059】

別の態様では、このような処置を必要とする対象に哺乳動物ディフェンシンの有効量を投与することによって、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、肺炎、気管支拡張症、COPD、サルコイドーシス、肺線維症または肺癌を処置するための方法が提供される。これらの疾患は、肺内投与、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、肺内または経口である。

【0060】

提供される方法は、白血球の遊走、例えば、BALF中の好中球、好酸球およびマクロファージを減少させることによって肺炎を処置または防止できる。hBD2の投与は、BALF中の特に好中球およびマクロファージを減少させるのに効果的であることが証明された。

20

【0061】

本方法は、例えば肺組織ホモジェネート中のIFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10およびIL-13のサイトカイン産生を正常化することで免疫系のバランスを回復させ、したがって、本明細書に記載される通り、上述の疾患の1つに罹患している対象のサイトカインストームを防止または処置し得る。好ましくは、本処置方法は、サイトカイン産生の減少をもたらし、ここで当該サイトカインはIFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10またはIL-13である。特に、本方法は、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-9およびIL-13の量を低下させ得る。サイトカインの量は、肺生検またはBALF中で決定できる。

30

【0062】

更に本方法は、本明細書に記載される通り、上述の疾患の1つに罹患している対象の気道過敏性を低下させ、肺コンプライアンスを上昇させ得る。

【0063】

提供される方法は、転写レベルの変化による細菌の表現型ならびに肺細菌叢の構造および組成または肺のメタボロームを変化させることによって、本明細書に記載される通り上述の疾患の1つに罹患している対象の肺の炎症を防止または処置できる。

40

【0064】

理論に拘束されるものではないが、経口投与を使用して観察される効果は、いわゆる腸-肺軸によって肺に影響を与え得る消化管微生物相および消化管のメタボロームにおける変化に起因し得る。

【0065】

喘息、COPDおよび嚢胞性線維症などの慢性肺障害は全て、腸疾患症状の構成要素を示し、このことは、人体のこれらの2つの粘膜部位の間に重要なクロストークがあること、および種々の呼吸器疾患は、気道微生物叢だけでなく腸微生物叢の腸内菌共生バランス失調にも関連していることを示す(Marsland et al, 2015)。帝王切開出産は、幼少期における腸微生物叢の多様性を低下させ組成を変化させると同時に、小

50

児期の中の喘息体質に関連付けられている (Jakobsson et al, 2014) 。幼少期の環境微生物への曝露が喘息を予防する (Ege et al, 2011) が、幼少期ならびに出生前の抗生物質曝露がアレルギー性喘息のリスクを増加させる (Marras et al 2009) ことが見出されている。小児期感染症と喘息およびアレルギーの発症の間の逆相関は長年認識されており、幼少期の感染曝露の減少が免疫寛容の異常および自己免疫症状の増加をもたらす (Wills-Karp et al, 2001) という「衛生仮説」を生み出した。

【0066】

補足的な仮説は、西洋化した地域における抗生物質使用および不健康な食事 (低繊維、高糖質) に起因する胃腸微生物叢の組成の変動が、粘膜免疫寛容の胃腸マイクロバイオー

10

【0067】

共生微生物は、主に、宿主-微生物相互作用を媒介する低分子を産生することによって、自然および適応免疫応答を調整し、病原性刺激に対する活性化閾値に影響を与える (Donia and Fishback, 2015) 。上皮性関門が微生物を主に消化管に限局するのを確実にする一方で、微生物代謝産物は上皮性関門を透過でき、それらが免疫細胞によって検出される宿主循環系に入り、蓄積するのを可能にする (Dorrestein et al, 2014) 。Trompetteら (2013) は、飼料中の発酵性繊維が、消化管微生物叢だけでなく肺微生物叢の組成、特にファーミキューテス対バクテロイデスの比を変化させ、後者は局所および全身の短鎖脂肪酸レベルの増加を引き起こし、次に樹状細胞の生成および機能に影響を与え、これにより、肺の免疫環境を形づくり、アレルギー性炎症の重症度に影響を与えることをマウスにおいて実証した。Schirmerらは更に、サイトカイン応答の個人間変動が特定の微生物および微生物機能に関連付けられることをヒトゲノム機能解析プロジェクトにおいて実証した。検出された関連性の大多数は、サイトカイン特異的および刺激特異的の両方であり、免疫系が高い特異性で微生物および産物を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表現型に関連することを示唆した。TNF- およびIFN- 産生能力は、マイクロバイオー

20

30

【0068】

更なる態様は、そのような処置を必要とする対象に - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンの有効量を経口的に投与することおよび/または - ディフェンシンの有効量を投与することによって、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、肺炎、気管支拡張症、COPDまたは肺癌を予防または処置する方法を提供する。好ましい実施形態では、喘息は、ステロイド治療抵抗性喘息である。一実施形態では、投与は、経口、口腔内、舌下、直腸、腔内、気管内、肺内、鼻腔内、頭蓋内、皮下、静脈内、皮膚または経皮である。好ましくは、投与は、経口または肺内である。経口投与は、呼吸が損なわれた患者または人工呼吸療法を受けている患者に有益であり得る。

40

【0069】

- ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンの有効量を、そのような処置を必要とする対象に非経口的に、例えば、皮下または静脈内に投与することによる喘息、軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、気管支拡張症およびCOPDの処置のための方法が、更に提供される。

【0070】

本明細書に記載の処置の方法は、少なくとも1種類の哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンを含む組成物を糖質コルチコイド、作動薬、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト、テオフィリン、抗生物質、リファキシミン、化学療法もしくは

50

は免疫療法、免疫抑制薬、プレバイオティクス、プロバイオティクス、トリプトファン、短鎖脂肪酸、HNP - 1、HNP - 2、HNP - 3、HNP - 4、カテリシジン、ラクトフェリン、ラクトフェリシン、リゾチーム、糞便移植またはこれらの組合せのいずれかと組み合わせて投与することによって施すことができる。本明細書に記載のディフェンシンを使用して抗生物質、化学療法、放射線療法、免疫療法または免疫抑制療法の1つ以上の症状を軽減できる。ディフェンシンは、個別に、またはこれらの治療法の1つ以上と共に投与されてよい。ディフェンシンは、喘息を治療するのに使用できる他の薬剤と共に投与されてもよい。

【0071】

重要なことに、本開示の方法は、抗生物質処置または化学療法または免疫療法または免疫抑制療法または放射線療法、または肺微生物叢または腸微生物叢への負の影響を有する別の処置を受けた、かつ/または受けている対象の肺における共生バランス失調性の微生物叢/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。

10

【0072】

肺微生物叢を正常化することは、シュドモナス、レンサ球菌、プレボテラ、フゾバクテリウム、ベーヨネラ、ヘモフィルス、ナイセリアおよびポルフィロモナスから構成される主たる微生物叢と共に、バクテロイデス、ファーミキューテスおよびプロテオバクテリア属に属する肺の細菌の集団を活性化することを含んでよい。

【0073】

肺微生物叢を正常化することは、メタボロームを、相対的により多くのトリプトファンおよび/または酪酸塩ならびに相対的により少ない酢酸塩を産生するものに変化させることを含んでもよい。

20

【0074】

処置される対象は、日常症状、持続性症状などの喘息症状を1週間あたり<2回呈してよい。

【0075】

処置される対象は、活動に影響を及ぼす発作、身体活動を制限する発作などの異なる強度の喘息発作を呈してよく、かつ/または数日間持続する1週間あたり>2回の症状、頻繁な夜間症状などの1ヵ月あたり>2回の夜間の喘息症状を呈してよい。

【0076】

一実施形態では、処置される対象は、予測値の<80%の1秒間努力呼気肺活量(FEV1)、例えば、60~80%のFEV1、<60%のFEV1を有する。

30

【0077】

更に対象は、>20%の変動がある最大呼気速度(PEFR)、例えば、20~30%のPEFR変動、>30%のPEFR変動、>60%などのPEFR変動を有してよい。

【0078】

本開示の方法によって提供される処置を必要とする対象は、処置前に以下の症状の1つ以上を呈してよい：

軽度間欠型：

1週間につき<2回の症状

発作間期の無症候性および正常なピークフロー値(PEFR)

異なる強度の短時間の発作

1ヵ月につき<2回の夜間症状

予測の>80%の1秒間努力呼気流量(FEV1)またはPEFR

<20%のPEFR変動

40

軽度持続型：

1週間につき>2回、ただし1日につき<1回の症状

活動に影響を及ぼす場合がある増悪

1ヵ月につき>2回の夜間症状

予測される値の>80%のFEV1

50

20%と30%の間のPEFR変動

中等度持続型：

日常症状

短時間作用性 作動薬の毎日の使用

活動に影響を及ぼす発作

1週間につき > 2回かつ数日間持続する場合がある増悪

1週間につき > 1回の夜間症状

予測される値の60%を超えるが、80%未満のFEV₁

> 30%のPEFR変動

重度持続型：

継続的な症状

制限された身体活動

頻繁な増悪

頻繁な夜間症状

予測される値の < 60%のFEV₁

> 60%のPEFR変動

【0079】

一実施形態では、処置は、処置された対象が重度持続型から中等度持続型、軽度持続型または軽度間欠型に変化するようになくとも1つの症状の改善をもたらす。処置は、処置された対象が中等度持続型から軽度持続型または軽度間欠型に、または軽度持続型から軽度間欠型に変化するようになくとも1つの症状の改善をもたらしてもよい。

【0080】

他の実施形態では、ディフェンシンは、肺癌に関連した肺の炎症を処置するために使用される。肺癌は、小細胞肺癌または非小細胞肺癌（NSCLC）であってよい。NSCLCは、腺癌、有棘細胞癌、大細胞癌および細気管支肺胞上皮癌から選択され得る。肺癌患者に対する1種以上のディフェンシンの投与は、疾患の炎症症状の1つ以上または癌治療の1つ以上の副作用を改善できると予想される。癌治療の副作用は、放射線、化学療法、免疫療法または手術の副作用であり得る。肺の宿主防御を改善することにより少なくとも1種類の - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンの投与が腫瘍細胞の増殖を減少させる場合もあることが予想される。

【0081】

インビトロ合成

哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物 - ディフェンシンは、当技術分野で既知の従来法を使用して、生体外合成によって製造され得る。種々の市販の合成装置が利用可能であり、例えばApplied Biosystems Inc.、Beckman Inc.などの自動合成機がある。合成機を使用することによって、天然アミノ酸を非天然アミノ酸、特に、D-アラニンおよびD-イソロイシンなどのD-アイソマー（またはD-型）、ジアステレオアイソマー、異なる長さまたは官能性を有する側鎖などで置換できる。特定の配列および調製方法は、利便性、経済性、要求される純度などによって決定される。化学的連結を、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、アミド形成のためのカルボキシル基など、結合に都合がよい官能性を含む様々なペプチドまたはタンパク質に付与してよい。必要に応じて、様々な基を合成の間または発現の間にペプチドに導入してよく、それは他の分子へのまたは表面への連結を可能にする。このためシステインがチオエーテルを得るために、ヒスチジンが金属イオン錯体への結合のために、カルボキシル基がアミドまたはエステルを形成するために、アミノ基がアミドを形成するために使用できる、などである。

【0082】

哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物 - ディフェンシン、あるいはこれらの機能的同等物はまた、組換え合成の従来の方法にしたがって単離および精製されてもよい。

10

20

30

40

50

組換え合成は、適切な発現ベクターおよび真核生物発現系を用いて実施されてよい。溶液を発現宿主および培地から調製し、存在するディフェンシンをHPLC、排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、または他の精製技術を使用して精製してよい。大腸菌におけるヒト - ディフェンシン2の組換え発現の方法がWO2010/007166 (Novozymes)に開示されている。

【0083】

哺乳動物 - ディフェンシンおよびヒト - ディフェンシンはまた、対応するmRNAの投与によって誘導されてもよい。

【0084】

投与量

ヒト - ディフェンシンおよびヒト - ディフェンシンなどの哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物 - ディフェンシンは好ましくは、肺の炎症全般を処置するのに効果的な量の医薬組成物または軽度間欠型喘息、軽度持続型喘息、中等度持続型喘息、重度持続型喘息、好酸球性喘息、好中球性喘息、ステロイド治療抵抗性喘息、喘息持続状態、気管支拡張症、COPDまたは肺癌の処置に効果的な量の医薬組成物において、好ましくは患者への許容可能な毒性を伴って使用される。ヒト - ディフェンシンおよびヒト - ディフェンシンなどの哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物 - ディフェンシンはまた好ましくは、肺および/または腸の正常な微生物叢の組成を維持するのに、または肺および/または腸の共生バランス失調性微生物叢を処置または正常化するのに効果的な量の医薬組成物において、好ましくは処置を必要とする患者への許容可能な毒性を伴って使用

10

20

【0085】

このような処置では、適切な投与量はもちろん、例えば、使用される化合物の化学的性質および薬理動態データ、個々の宿主、投与様式ならびに処置される症状の性質および重症度に応じて変化する。

【0086】

しかしながら一般的に、哺乳動物、例えばヒトにおける満足のいく結果のためのヒト - ディフェンシンの望ましい一日投与量は、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のHD5/kg体重であり、1mg HD5/kg体重 ~ 10mg HD5/kg体重など、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、更により好ましくは1.2mg HD5/kg体重であり、例えば、分割量で1日に最大1、2または3回投与される。

30

【0087】

一実施形態では、ヒト - ディフェンシンの望ましい一日投与量は、好ましくは約0.1mg hBD2/kg体重 ~ 約10mg hBD2/kg体重、より好ましくは約0.5mg hBD2/kg体重 ~ 約10mg hBD2/kg体重であり、1mg hBD2/kg体重 ~ 10mg hBD2/kg体重など、より好ましくは約1.2mg hBD2/kg体重 ~ 約10mgのhBD2/kg体重、好ましくは約1.2mg hBD2/kg体重 ~ 約5mg hBD2/kg体重、更により好ましくは1.2mg hBD2/kg体重であり、例えば、分割量で1日に最大1、2または3回投与される。

40

【0088】

2種の異なるディフェンシンを1回投与量で投与する場合、投与量は重量基準またはモル基準で決定される等量のまたはほぼ等量の2種のディフェンシンを含んでよい。比率はまた、ヒト - ディフェンシンに対するヒト - ディフェンシンの比が、重量基準またはモル基準で決定して、10:1 ~ 1:10、5:1 ~ 1:5など、例えば2:1 ~ 1:2で変化するように異なってもよい。

【0089】

好ましい実施形態の化合物は、大型哺乳動物、例えばヒトへ、従来使用されるものと同

50

様の投与量で同様の投与様式により投与され得る。

【0090】

一実施形態では、本明細書に記載される通り、1日投与量が、0.1～10mg ディフェンシン/kg、例えば0.5～5mg ディフェンシン/kg、例えば1～2mg ディフェンシン/kg、例えば1日あたり1.2mg ディフェンシン/kgである方法が提供される。

【0091】

ある種の実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、ヒト - ディフェンシンおよび/またはヒト - ディフェンシンなどの哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または哺乳動物 - ディフェンシンを、単位剤形あたり約0.5mg以下～約1500mg以上、好ましくは約0.5、0.6、0.7、0.8または0.9mg～約150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900または1,000mg、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の量で含んでよい。ある種の実施形態では、しかし、上記のものより低いまたは高い投与量が好ましくてよい。好適な濃度および投与量は、当業者によって容易に決定され得る。ある種の実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、ヒト - ディフェンシンなどの哺乳動物 - ディフェンシンを含む。ある種の実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、ヒト - ディフェンシンなどの哺乳動物 - ディフェンシンを含む。更なる実施形態では、好ましい実施形態の医薬組成物は、ヒト - ディフェンシンおよびヒト - ディフェンシンなどの哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物の - ディフェンシンを含み、ここで当該 - ディフェンシンおよび - ディフェンシンは、モル濃度ベースまたはmg/mLベースで等量で存在する。

10

20

【0092】

一実施形態では、哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンは、少なくとも1日1回、少なくとも1日2回など、例えば少なくとも1日3回または継続的に投与される。

【0093】

一実施形態では、哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または - ディフェンシンは、持続注入によって静脈内投与されるかまたは、外部人工呼吸器を装着している患者において持続的な機械的人工換気によって肺内投与される。

30

【0094】

経口または非経口投与のための製剤化

哺乳動物 - ディフェンシンまたは - ディフェンシンは、任意の一般的な経路による投与用に製剤化された組成物中で治療的に使用できる。一実施形態では、少なくとも1種類の哺乳動物 - ディフェンシンの投与は、本開示の方法によれば、一般に鼻腔内である。鼻腔内投与は、肺薬物送達として標準的である。

【0095】

一実施形態では、少なくとも1種類の哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または少なくとも1種類の哺乳動物 - ディフェンシンの投与は、本開示の方法によれば、経口である。

40

【0096】

一実施形態では、少なくとも1種類の哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または少なくとも1種類の哺乳動物 - ディフェンシンの投与は、本開示の方法によれば、皮下または静脈内である。

【0097】

いくつかの実施形態では、好ましい実施形態の組成物は、凍結乾燥品として、および再水和化の後に安定性をもたらす適切な賦形剤を使用して凍結乾燥品として製剤化されてよい。ヒト - ディフェンシンおよび/またはヒト - ディフェンシンなどの、哺乳動物

50

- ディフェンシンおよび/または哺乳動物 - ディフェンシンを含む医薬組成物は、従来の方法により、例えば、混合工程、顆粒化工程、コーティング工程、溶解工程または凍結乾燥工程により製造できる。好ましい実施形態では、哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または哺乳動物 - ディフェンシンを含む医薬組成物は、無菌の等張溶液として製剤化される。

【0098】

薬学的に許容される担体および/または希釈剤は、当業者に既知である。液体溶液として製剤化された組成物に関して、許容される担体および/または希釈剤は、生理食塩水を含み滅菌水が含まれるべきであり、当該組成物は所望により抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および他の一般的な添加剤を含んでよい。

10

【0099】

本開示の化合物は、経口投与用の多種多様な製剤に製剤化され得る。固形調製物は、粉末、錠剤、ドロップ、カプセル、カシェ、舐剤、および分散可能な顆粒を含み得る。経口投与に適した他の剤形は、エマルジョン、シロップ、エリキシル、水溶液、水性懸濁液、歯磨き粉、歯磨きゲル、チューインガムを含む液状調製物、または溶液、懸濁液、およびエマルジョンなどの液状調製物へと使用直前に変換されることが意図される固形調製物を含み得る。

【0100】

本開示の化合物は、鼻腔内、皮下または静脈内投与用の多種多様な剤形で製剤化され得る。製剤は、(哺乳動物 - ディフェンシンおよび/または哺乳動物 - ディフェンシンならびに他の任意の有効成分に加えて)担体、増量剤、崩壊剤、流動調整剤、糖および甘味料、香料、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、溶解剤、浸透圧を調節するための塩、緩衝剤、希釈剤、分散化および界面活性剤、結合剤、滑剤、ならびに/または他の当該技術分野において公知の医薬品用賦形剤を含有できる。当業者は更に、哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物 - ディフェンシンを適切な方法で、および Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro (1990) に記載されるものなどの容認された実施法にしたがって製剤化し得る。

20

【0101】

ヒト - ディフェンシンおよびヒト - ディフェンシンなどの哺乳動物 - ディフェンシンおよび哺乳動物 - ディフェンシンは、単独でまたは1つまたは2つ以上の他の医薬化合物または原薬との併用療法で、例えば、糖質コルチコイド、作動薬、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト、テオフィリン、抗生物質、化学療法もしくは免疫療法またはこれらの組合せと共に、かつ/または1つ以上の薬理的に許容される賦形剤と共に使用できる。

30

【0102】

気道投与

本開示の組成物を投与するために気道投与を使用してもよい。肺内投与は、肺への局所投与を意味する。本明細書において使用する場合、用語「気管内投与、気管支内投与または肺胞内投与」は、添加される安定剤または他の賦形剤の有無に関わらず、ディフェンシン溶液の点滴注入によって、粉末形態のディフェンシンの適用によって、または、ディフェンシンの吸入によりディフェンシンの気道の適切な部分への到達を可能にすることによってのいずれかに関わらず、エアロゾル化されたかまたは霧状にされた溶液もしくは懸濁液または吸入粉末またはゲルとしてディフェンシンが気管、気管支または肺胞にそれぞれ適用される、このような投与の全ての形態を含む。

40

【0103】

気管支内/肺胞内投与の方法としては、生理学的に許容される組成物としてディフェンシンが溶解された洗浄液を使用する当業者に公知の方法による気管支肺胞洗浄(BAL)、または実際に、賦形剤を含有するかまたは含有しない、乾燥形態のディフェンシンを含有する吸入粉末の使用または溶液もしくは懸濁液形態または粉末形態のディフェンシンの気管支鏡検査中の直接適用を含む気管支内投与の任意の他の効果的な形態による方法が挙

50

げられるが、これらに限定されない。気管内投与の方法としては、溶解されたディフェンシンの類似の溶液またはディフェンシン懸濁液による盲目的気管洗浄、またはこの目的に適した任意の噴霧装置の使用により得られる溶解したディフェンシンまたはディフェンシン懸濁液を含有する噴霧液滴の吸入が挙げられるが、これらに限定されない。

【0104】

他の実施形態では、気管内投与、気管支内投与または肺胞内投与は製品の吸入を含まないが、ディフェンシンの溶液またはディフェンシンを含有する粉末もしくはゲルの気管または下気道中への滴下注入または適用を含む。

【0105】

投与の他の好ましい方法は、以下の装置の使用を含んでよい：

- 1．圧縮空気／酸素混合物を使用する加圧式噴霧器
- 2．超音波噴霧器
- 3．電子マイクロポンプ式噴霧器
- 4．定量吸入器（MDI）
- 5．乾燥粉末吸入システム（DPI）

10

【0106】

エアロゾルを、機械的人工換気（装置1、2および3）中に、a）フェイスマスクを介して、またはb）挿管された患者において気管内チューブを介して送達してよい。患者が自ら噴霧装置を作動させることができるという条件で、補助なしに患者が装置4および5を使用することもできる。

20

【0107】

ディフェンシンおよび／もしくは機能的ホモログまたはディフェンシンの変異体を含む溶液の好ましい濃度は、ml溶液あたり約0.1 μg ~ 1000 μgの範囲、ml溶液あたり約0.1 μg ~ 250 μgなどの範囲である、

【0108】

肺内投与のための医薬組成物

本開示で使用するための医薬組成物または医薬製剤は、薬学的に許容される担体、好ましくは水性担体もしくは希釈剤と組み合わせ、好ましくはそれらに溶解されるディフェンシン、またはペグ化した調製物として、または吸入によるエアロゾルとして投与されるリポソームもしくはナノ粒子の調製物として下気道に運ばれるディフェンシン、または気管支肺胞洗浄としてもしくは盲目的気管内洗浄（blind intratracheal wash）もしくは洗浄（lavage）として気管支鏡を介して投与される洗浄液としてのディフェンシンを含む。種々の水性担体を使用でき、0.9%生理食塩水、緩衝生理食塩水、生理学的適合性緩衝液等を含むがこれらに限定されない。組成物を、当業者に公知の従来技術により滅菌してもよい。得られる水溶液を、使用のために包装でき、または無菌条件下で濾過し凍結乾燥でき、凍結乾燥された調製物は投与前に滅菌水溶液中に溶解される。

30

【0109】

一実施形態では、凍結乾燥したディフェンシン調製物を、例えば単回用量単位で予め包装してもよい。更により好ましい実施形態では、単回用量単位は患者に対して調整される。

40

【0110】

組成物は、薬理的に許容される補助剤またはアジュバントを含有してよく、pH調整剤および緩衝剤ならびに／または等張化剤、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を含むがこれらに限定されない。

【0111】

製剤は、薬理的に許容される担体および賦形剤を含有してよく、マイクロスフィア、リポソーム、マイクロカプセル、ナノ粒子などを含む。従来のリポソームは通常、リン脂質（中性のまたは負に荷電した）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、水性区画を囲む脂質二重層に基づく小胞構造体である。リポソームは、それらの生

50

理化学的特性、例えばリン脂質二重層のサイズ、脂質組成、表面電荷および数ならびに流動性の点で異なり得る。リポソーム形成に最も頻繁に使用される脂質は以下のものである：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 - ホスフェート (一ナトリウム塩) (DMPA)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (一ナトリウム塩) (DPFA)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (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 - グリセリン)] (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 - グリセリン)] (ナトリウム塩) (DPFG)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - rac - (1 - グリセリン)] (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)。別の脂質またはリポソームの修飾剤と組み合わせられた DPPC で構成される製剤は、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の組み合わせであることが好ましい。

10

20

【0112】

長期循環型リポソームは、血管壁の透過性が増加された身体部位で血管外遊出する能力で特徴付けられる。長期循環型リポソームを生成する最も一般的な方法は、親水性ポリマーポリエチレングリコール (PEG) をリポソームの外表面に共有結合させることである。好ましい脂質のいくつかは以下のものである：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)。

30

【0113】

リポソームに適用可能で有り得る脂質は、Avanti, Polar Lipids, Inc, Alabaster, AL により供給される。更に、リポソーム懸濁液は、脂質を貯蔵時のフリーラジカルおよび脂質過酸化による損傷から保護する脂質保護剤を含んでもよい。トコフェロール等の脂溶性のフリーラジカル失活剤およびフェリオキサミン等の水溶性の鉄特異的キレート剤が好ましい。

40

【0114】

例えば Szoka 他、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 頁 (1980)、米国特許第 4, 235, 871 号、米国特許第 4, 501, 728 号および米国特許第 4, 837, 028 号に記載されるように、種々の方法をリポソームの調製に使用でき、これらの全ては参照により本願に組み込まれる。別の方法により、サイズが不均一な多重膜小胞が生成される。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中に溶解し、真空下または不活性ガス下で乾燥して薄い脂質膜を形成する。もし所望であれば、この膜を再度三級ブタノールなどの適切な溶媒に溶解し、その後凍結乾燥して、より容易に水和される粉末様形態のより均質な脂質混合物を形成してもよい。この膜

50

は標的薬剤および標的化成分の水溶液で覆われており、通常は攪拌しつつ15～60分の期間で水和できる。得られる多重薄膜小胞のサイズ分布は、より激しい震盪条件下で脂質を水和することによって、またはデオキシコレートなどの可溶化界面活性剤を添加することによって一層小さなサイズへとシフトさせることができる。

【0115】

ミセルは、水溶液中で界面活性剤（疎水性部分および1つ以上のイオン性基または強親水性基を含有する分子）により形成される。

【0116】

当業者に公知の一般的な界面活性剤を本発明のミセルに使用できる。好適な界面活性剤としては、ラウリン酸ナトリウム、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.) が挙げられる。好ましい界面活性剤は、静脈内注射に適合する非イオン性の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であり、例えばTWEEN-80、PLURONIC F-68、n-オクチル-D-グルコピラノシド等である。更に、リポソームの製造において使用するために説明されるもの等のリン脂質を、ミセル形成のために使用してもよい。

10

【0117】

実施例

実施例 1

マウスの、感染誘発性の重篤な喘息のステロイド非感受性好中球性アレルギー性気道疾患モデルにおける哺乳動物 - ディフェンシンの有効性の決定および評価 (図1)

20

【0118】

材料および方法

処置方法：6～8週齢の雌性BALB/cマウスをミョウバンアジュバント1mg含む200μLの0.9%生理食塩水中の卵白アルブミン50μgに腹腔内(IP)感作した。マウスに、12～13日目および33～34日目に卵白アルブミン(50μL無菌生理食塩水中10μg)を鼻腔内(IN)負荷した。14日目に、マウスに、天然のマウス病原体であるクラミジア・ムリダルム(Chlamydia muridarum)をIN接種した(Cmu:100封入体形成単位、ATCCVR-123、30μLのスクロースリン酸グルタミン酸緩衝液(SPG))。デキサメタゾン(DEX)を、卵白アルブミン負荷と共に32～34日目にIN投与した(2mg/kg;50μLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS))。hBD2を30、32および34日目にIN投与した(5mg/kg;50μLのリン酸緩衝生理食塩水)。

30

【0119】

鼻腔内送達によってマウスに投与される薬剤は、気道を経由して肺に達することが予想され、肺内投与の当該技術分野において承認されているモデルである。

【0120】

試験：

気道炎症：白血球百分率を、光学顕微鏡を使用して、メイグリュンワルドギムザ染色されたBALF細胞から得た。

40

【0121】

肺機能：AHRを、Scireq Flexivent FX1システムを使用して麻酔下のカニューレを挿入したマウスで測定した。データを、10mg/kgのメタコリンでの気道抵抗として、および用量反応曲線として表す。

【0122】

結果

気道炎症：卵白アルブミンで感作し、C.ムリダルムに感染させたマウスは、総白血球、マクロファージ、リンパ球、好中球およびより小さい程度の好酸球の高度に統計的に有意な増加を起こした。INでhBD2処置した群は、好中球数およびより小さい程度のリ

50

ンパ球の完全な正常化を示し、一方でマクロファージおよび好酸球は変化しなかった。INでhBD2に加えてDEXにて処置した群は、好酸球の完全な正常化を示したが、これ以外に相加効果は観察されなかった(図7)。

【0123】

肺機能：卵白アルブミンで感作したマウス(Ova)は、生理食塩水(Sal)(非喘息)対照と比較して、より高いAHRを有した。この差は、統計的に高度に有意である。INhBD2処置群(Cmu/Ova/hBD2)は、生理食塩水対照群と同等の完全に正常化したAHRを示した。INでhBD2に加えてDEXにて処置した群は生理食塩水対照群と同等の完全に正常化したAHRを示したが、DEXは相加効果を有しないようであった(図4)。

10

【0124】

結論：この実施例は、鼻腔内投与されたhBD2が既知の喘息のステロイド治療抵抗性動物モデルにおいて気道過敏性およびBALF中の好中球数を完全に正常化できることを実証する。

【0125】

実施例2

アレルギー性喘息のマウスハウスダストダニ/フロイド完全アジュバント誘発モデルにおける経口投与対IN投与される哺乳動物 - ディフェンシンの有効性の決定および評価(図2)

【0126】

材料および方法

処置方法：7~10週齢の雌性BALB/cマウスを、試験開始の1日前に7つの試験群にランダムに割り当て、ハウスダストダニに皮下(SC)感作した(200μLの生理食塩水中100μgのHDMおよび0.9%生理食塩水中のフロイド完全アジュバント)。マウスに次いで、14日目にHDMを鼻腔内(IN)負荷した(50μLの生理食塩水中25μgのHDM)。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))。hBD2を、14日目にIN投与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)。初回量を、負荷の60分前に投与し、その後の投与量を約6時間間隔で投与した。

20

30

【0127】

試験：

気道炎症：負荷の48時間後に、気管支肺胞洗浄を行い、3つの容量の冷PBS(0.4; 0.3および0.3mL(合計1mL))で肺を洗浄した。総白血球数および白血球百分率を、自動血液分析機Sysmex XT-2000iVで決定した。

【0128】

肺機能：HDM負荷の48時間後を起点として、肺抵抗および肺コンプライアンスの測定を、DSI社のBuxco Finepointe RCシステムを使用して、麻酔下のカニューレを挿入したマウスによりメタコリンの負荷後(MCH1、3.125mg/mL; MCH2、6.25mg/mL; MCH3、12.5mg/mLおよびMCH4、25mg/mL)に実施した。データを、10mg/kgのメタコリンでの気道抵抗として、および用量反応曲線として表す。

40

【0129】

サイトカイン分析のための肺の採取：全てのBALの完了後、肺を胸郭から摘出し、液体窒素中で急速凍結し、ELISAによるIL-1、TNF-、IL-6、IL-10およびIFNのサイトカイン濃度の分析まで摂氏-80度にて凍結保存した。

【0130】

結果

HDM負荷し媒体で処置した動物において、生理食塩水負荷した(非喘息の)マウスと比較して肺抵抗値の増加および肺コンプライアンス値の減少が観察された。両方の媒体処

50

置群（経口および鼻腔内）のマウスにおいて炎症反応が、HDMおよびアジュバントによる感作の14日後の単回HDM負荷によって引き起こされた。炎症反応は、生理食塩水負荷対照と比較した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の統計的に有意な増加（ $p < 0.05$ ）により特徴づけられた。また、肺組織ホモジェネート中の5つのサイトカイン、IL-1、TNF- α 、IL-6、IL-10およびIFN- γ の濃度分析は、生理食塩水負荷対照と比較してHDM負荷動物での有意に高いレベルを明らかにした。

【0131】

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有意に抑制しなかった。細胞データと一致して、デキサメタゾンは、HDM/媒体対照と比較して肺組織ホモジェネート中のIL-1、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。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抵抗性であることを示す。

10

【0132】

試験品目hBD2は、14日目における3回の経口適用後および鼻腔内適用後の両方で、HDM負荷し媒体で処置した動物と比較して、気道抵抗の増加（図5aおよび5b）および肺コンプライアンスの減少（図6aおよび6b）を効果的に抑制した。鼻腔内適用後にいくつかの測定パラメータでより顕著な効果が観察され、例えば、BALFにおける細胞流入において、両方の投与量（ $0.4 \text{ mg/kg/day TID}$ および $1.7 \text{ mg/kg/day TID}$ ）が好中球数を有意に抑制した。一方でステロイド標準であるデキサメタゾンは、好中球数を抑制できなかった。同程度の有意な効果が、両方の投与経路について肺組織ホモジェネート中のIL-6、IL-10およびIFN- γ サイトカインレベルで観察された（図9、14、17）。経口投与されたhBD2はTNF- α を有意に低下させたが（図10）、鼻腔内投与されたhBD2は対照と有意に違わなかった。図11は、IL-1に対する効果を示す。

20

【0133】

結論：全ての得られた結果は、アレルギー性喘息のハウスダストダニ/フロインド完全アジュバント誘発マウスモデルにおけるhBD2の明白な抗炎症効果を示す。驚くべきことに、経口投与されたhBD2も、喘息マウスの喘息処置および炎症軽減において効果的であった。

30

【0134】

実施例3

アレルギー性喘息のマウスハウスダストダニ/フロインド完全アジュバント誘発モデルにおける経口投与対IN投与される哺乳動物 - ディフェンシンの有効性の決定および評価（図2）

【0135】

材料および方法

処置方法：試験開始の1日前に4つの試験群にランダムに割り当てた7~10週齢の雌性BALB/cマウスを、ハウスダストダニに皮下（SC）感作した（ $200 \mu\text{L}$ の生理食塩水中 $100 \mu\text{g}$ のHDMおよび 0.9% 生理食塩水中のフロインド完全アジュバント）。マウスに、14日目にHDMを鼻腔内（IN）負荷した（ $50 \mu\text{L}$ の生理食塩水中 $25 \mu\text{g}$ のHDM）。hBD2を、14日目にIN投与または経口投与した（ 0.4 mg/kg TID IN ； 0.4 mg/kg TID 経口 、 $50 \mu\text{L}$ リン酸緩衝生理食塩水）。初回量を、負荷の60分前に投与し、その後の投与量を約6時間間隔で投与した。

40

【0136】

試験：

肺組織の採取：肺を胸郭から摘出し、液体窒素中で急速凍結し、ELISAによるIL-4、IL-5、IL-8（KC）、IL-9およびIL-13のサイトカイン濃度分析まで摂氏-80度にて凍結保存した。

50

【0137】

肺を10%緩衝ホルマリン中で、生体内原位置で膨らませ、胸郭から摘出し、個別に10%緩衝ホルマリンに入れ、まとめてパラフィン包埋し、薄切し、H&E/PAS染色を行った。

【0138】

血液採取

全ての終末血液試料は、経静脈採血により採取した。血液を、リチウム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、将来的なSCFA分析まで-80℃で保存した。

【0139】

肺組織試料採取

肺を、胸部を穏やかに切開することにより、および胸骨および肋骨の両側部を切り落とすことにより露出させ、摘出した。群あたり最初の6匹の動物からの肺を胸郭から摘出し、液体窒素中で急速凍結し、ELISAによるサイトカイン濃度の分析まで-80℃にて凍結保存した。

【0140】

群あたり他の8匹の動物からの肺を10%緩衝ホルマリンにより生体内原位置で膨らませ、胸郭から摘出し、個別に10%緩衝ホルマリンに入れ、まとめてパラフィン包埋し、薄切し、H&E/PAS染色を行った。パラフィンブロックを、IHC分析のために保管した。

【0141】

読み取り

組織病理学(H&E;PAS)(N=8/群;合計N=32)

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

【0142】

組織病理学

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

0 なし

1 少数の散在する炎症性細胞

2 より大きな集合体

3 細胞の顕著な集積

炎症の総合スコアを、全個体のスコアの合計として算出した。

杯細胞化生を、太い気道および末梢気道のレベルで別々に、PAS染色したスライドで以下の通りに評価した:

0 基底膜に沿った粘液含有細胞なし

1 基底膜に沿った75%未満の染色された細胞質を有する少数の陽性細胞

2 基底膜に沿った75%を超える染色された細胞質を有する少数の陽性細胞

3 基底膜に沿った75%未満の染色された細胞質を有する多数の陽性細胞

4 基底膜に沿った75%を超える染色された細胞質を有する多数の陽性細胞

【0143】

統計的評価

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)を使用して実行した。群間の差を、 $p < 0.05$ の場合統計的に有意であるとみなす。

【0144】

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なマン-ホイットニー検定法を使用して実行した。

【0145】

10

20

30

40

50

結果

両方の媒体処置群（経口および鼻腔内）のマウスにおいて炎症反応が、HDMおよびアジュバントによる感作の14日後の単回HDM負荷によって引き起こされた。炎症反応は、生理食塩水負荷対照と比較したHDM負荷動物における肺組織ホモジェネート中の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により、および肺組織の重篤な組織学的炎症性変化により特徴づけられた。

【0146】

試験品目hBD2は、14日目における3回の経口適用および鼻腔内適用の後の両方で、HDM負荷し媒体で処置した動物と比較して肺組織での組織炎症の増加を効果的に抑制した（図19、20、21）。同程度の有意な効果が、両方の投与経路による肺組織ホモジェネート中のIL-4、IL-5、IL-8、IL-9およびIL-13サイトカインレベルに対し観察された（図12、13、15、16、18）。

10

【0147】

結論：全ての得られた結果は、アレルギー性喘息のハウスダストダニ/フロインド完全アジュバント誘発マウスモデルにおけるhBD2の明白な抗炎症効果を示す。当該効果は、hBD2の鼻腔内投与および経口投与の両方を使用して得られた。

【0148】

実施例4

NMRIマウスへの4mg/kg投与の単回経口経管栄養後のhBD2の薬物動態プロファイルを確立するための薬物動態研究

20

【0149】

材料および方法

処置方法：21匹の雌性NMRIマウスに、投与日に得た個々の体重に応じて栄養管（gavage tube）および1mlシリンジを使用する5ml/kgの経口経管栄養により投与した。尿を、腹部の鼠径部を穏やかにマッサージすることによりランダムな時点に採取するようにした。第1の血液試料を、顎下腺からの採取法を使用して得た。第2の血液試料を、イソフルランで麻酔されたマウスから採取した。腸試料を、安楽死後に得た。各々のマウスの腹部を切開し、腸管の3つの断片を採取した。

【0150】

結果

hBD2は、全ての値が<10pg/mlの検出レベル以下であったため血清または尿試料のいずれにおいてもHPLCによって検出できなかった。これは、hBD2がマウスにおいて4mg/kgの経口投与後に全身的に有効でない（not systemically available）ことを示す（図22）。

30

【0151】

実施例5

雌性NMRIマウスへの1mg/kgのhBD2（分子量66437Da）のモル等量の皮下または静脈内投与後のヒト血清アルブミンのC末端（分子量71.336Da）またはN末端（分子量71.666Da）に融合されたhBD2の薬物動態プロファイルの検討および比較

40

【0152】

材料および方法

処置方法：動物に、個々の体重に応じて1.65mg/mlのストック濃度の10ml/kgを投与した（30グラムのマウスで300μL）。第1の血液試料を顎下腺からの採取法を使用して得て、第2の血液試料をソフルランによる麻酔および安楽死後に得た。

【0153】

結果

hBD2は、1時間の半減期を示し、2つの融合タンパク質は12時間の半減期を示した。AUCは、劇的に変化した。腎クリアランスも、hBD2の10ml/分から2つの融

50

合分子の 0.5 ~ 2.2 ml / 分へと変化した (図 23、24、25)。

【 0154 】

この実施例は、アルブミンへの C 末端または N 末端結合によって hBD2 の半減期を著しく延長できることを実証する。

【 0155 】

実施例 6

マウスでの 10 日間のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与により誘発される急性大腸炎モデルにおける「hBD2 - アルブミン N 末端融合物」の抗炎症効果の決定および評価

【 0156 】

材料および方法

処置方法：無菌 25 G 針を使用して「hBD2 - アルブミン N 末端」を 10 ml / kg 体重の投与液量で尾静脈を介して静脈内投与または皮下投与した。動物は、10 日連続して毎日 1 回投与量を受けた。実薬対照であるデキサメタゾン (DEX) を、10 ml / kg 体重の投与液量で 1 mg / kg の投与量を一日一回皮下に与えた。

【 0157 】

結果

「hBD2 - アルブミン N 末端」による処置は、静脈内経路を介して 1.65 mg / kg の投与量で毎日投与した場合、疾患活動性インデックス (DAI) の有意な抑制をもたらした ($p < 0.05$)。更にまた、10 日目に DAI スコアの有意な抑制が、「hBD2 - アルブミン N 末端」を 1.65 mg / kg の投与量および 125 mg / kg の投与量でそれぞれ皮下に毎日投与した場合に観察された ($p < 0.05$)。

デキストラン硫酸ナトリウムの投与は、組織検査から明らかのように、大腸組織の有意な炎症および損傷をもたらした。「hBD2 - アルブミン N 末端」による処置は、この組織損傷のなんらの統計的に有意な減少ももたらさなかったが、同様に、実薬対照である DEX は、組織傷害を有意に低下できなかった。

本結果は更に、2 日目および 3 日目に一過的に体重が減少するにもかかわらず「hBD2 - アルブミン N 末端」で処置した動物において、7 日目に有意な体重増加を示した。対照的に、DEX で処置した動物は、5 日目以降非常に有意な体重減少を示した ($p < 0.01$)。

【 0158 】

この実施例は、hBD2 - アルブミン N 末端融合物が炎症性疾患の動物モデルにおいて生物学的に活性であることを実証する。

【 0159 】

実施例 7

マウスでの 10 日間のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与により誘発される急性大腸炎モデルにおける「hBD2 - アルブミン C 末端融合物」の抗炎症効果の決定および評価

【 0160 】

材料および方法

処置方法：無菌 25 G 針を使用して「hBD2 - アルブミン C 末端」を 10 ml / kg 体重の投与液量で尾静脈を介して静脈内投与または皮下投与した。動物は、10 日連続して毎日 1 回投与量を受けた。実薬対照であるプレドニソロン (Pred) を、10 ml / kg 体重の投与液量で 1 mg / kg の投与量を一日一回経管栄養により経口的に与えた。

【 0161 】

結果

「hBD2 - アルブミン C 末端」による処置は、静脈内経路を介して 1.6 mg / kg の投与量で毎日投与した場合、DAI の有意な抑制をもたらした ($p < 0.05$)。更に、「hBD2 - アルブミン C 末端」は、静脈内経路により 1.6 mg / kg の投与量を 0、2、4、6、8 および 10 日目の隔日に投与した場合に DAI の有意な抑制をもたらし

10

20

30

40

50

た ($p < 0.05$) (図 26)。Pred による毎日の処置は、9 日目に DAI の有意な抑制をもたらした ($p < 0.05$)。

デキストラン硫酸ナトリウムの投与は、組織検査から明らかなように、大腸組織の有意な炎症および損傷をもたらした。1.6 mg / kg の投与量の「hBD2 - アルブミン C 末端」による処置は、この組織損傷の統計的に有意な減少をもたらした ($p < 0.05$)。同様に、0、2、4、6、8 および 10 日目の 1.6 mg / kg および 16.5 mg / kg の投与量での「hBD2 - アルブミン C 末端」による毎日の処置は、大腸の組織損傷の有意な減少をもたらした ($p < 0.01$) (図 27)。実薬対照である Pred による処置は、大腸近位部の組織傷害を有意に減少できなかったが、遠位大腸の損傷を減少させた ($p < 0.01$)。

本結果は更に、「hBD2 - アルブミン C 末端」で処置した動物における、有意な体重増加を示した ($p < 0.05$)。

【0162】

この実施例は、hBD2 - アルブミン C 末端融合物が炎症性疾患の動物モデルにおいて生物学的に活性であることを実証する。

【0163】

実施例 8

【表 2】

配列番号	名称	配列
1	hBD1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQQGTCYRGKAKCCK
2	hBD2	GIGDPVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
3	hBD3	GIINTLQKYCRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSRGRKCCRRKK
4	hBD4	ELDRICGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK
5	HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
6	HD6	AFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL
7	切断型 hBD2	PVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP

【0164】

実施例 9

アレルギー性喘息のマウスハウスダストダニ誘発モデルにおける哺乳動物 - ディフェンシンの経口投与による予防処置に対する IN 投与による予防処置の有効性の決定および評価

【0165】

材料および方法

処置方法：7 ~ 10 週齢の雌性 BALB / c マウスを、試験開始の 1 日前に 5 つの試験群にランダムに割り当て、ハウスダストダニに皮下 (SC) 感作した (200 μ L の生理食塩水中 100 μ g の HDM および 0.9% 生理食塩水中のフロインド完全アジュバント

)。マウスをhBD2により1.2mg/kg/day(0.4mg/kg TID)の投与量で、12日目の朝に開始して約6時間間隔で1日3回連続して経口および鼻腔内にそれぞれ処置した。最終投与量を、14日目の負荷の1時間前に投与した。総投与数は8回投与またはhBD2の総投与量は2mg/kgであった。マウスに次いで、14日目にHDMを鼻腔内(IN)負荷した(50μLの生理食塩水中25μgのHDM)。

【0166】

試験：

気道炎症：負荷の48時間後に、気管支肺胞洗浄を行い、3つの容量の冷PBS(0.4; 0.3および0.3mL(合計1mL))で肺を洗浄した。総白血球数および白血球百分率を自動血液分析機Sysmex XT-2000iVで決定した。

10

【0167】

肺機能：HDM負荷の48時間後を起点として、肺抵抗および肺コンプライアンスの測定をメタコリン負荷後(MCH1、3.125mg/mL; MCH2、6.25mg/mL; MCH3、12.5mg/mLおよびMCH4、25mg/mL)に、DSI社のBuxco Finepointe RCシステムを使用して麻酔下のカニューレを挿入したマウスにより実施した。データを、10mg/kgのメタコリンでの気道抵抗として、および用量反応曲線として表す。

【0168】

サイトカイン分析のための肺の採取：全てのBALの完了後、肺を胸郭から摘出し、液体窒素中で急速凍結し、ELISAによる肺ホモジェネート中のTNF-、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13およびIL-33のサイトカイン濃度分析まで摂氏-80度にて凍結保存した。

20

【0169】

結果

肺抵抗値の増加および肺コンプライアンス値の減少が、生理食塩水を負荷した(非喘息の)マウスと比較してHDM負荷し媒体で処置した動物において観察された。両方の媒体処置群(経口および鼻腔内)のマウスにおいて炎症反応が、HDMによる感作の14日後の単回HDM負荷によって引き起こされた。炎症反応は、生理食塩水負荷対照と比較した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の統計的に有意な増加($p < 0.05$)により特徴づけられた。また、肺組織ホモジェネート中の7つのサイトカイン、TNF-、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13およびIL-33の濃度分析は、生理食塩水負荷対照と比較してHDM負荷動物での有意に高いレベルを明らかにした。

30

【0170】

12日目~14日目に投与されたhBD2は、1日3回の経口適用後および鼻腔内適用後(8回の投与で合計2.0mg/kg)の両方で、HDM負荷し媒体で処置した動物と比較して効果的に正常な肺機能を保ち気道抵抗の増加(図29)および肺コンプライアンスの減少(図30)を抑制した。BALFでの細胞流入に対する効果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(図31)が、他の免疫細胞は、喘息において通常観察されるようにBALFに移動した。しかし、重要なことに、喘息においてしばしば観察されるサイトカインストームおよび喘息発作の基盤は、特にhBD2の経口投与後に肺組織ホモジェネート中のサイトカイン濃度の完全な正常化によって防止された。経口投与後のTNF-、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9およびIL-13のサイトカインレベルを図32~37に示す。hBD2の鼻腔内投与後にTNF-、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9およびIL-13が減少する傾向があったが、これは対照と統計的に有意に違わなかった。

40

【0171】

結論：全ての得られた結果は、アレルギー性喘息のハウスダストダニ誘発マウスモデルにおけるhBD2の明白な保護、予防および抗炎症効果を示す。

【0172】

50

実施例 10

ディフェンシンを用いた予防処置による消化管微生物叢の保護および保存

マウス：マウスを群あたり4ケージで、3匹ずつ飼育した。食餌摂取を午後6時の消灯直前に毎日記録した。個々のマウスに、群およびケージ単位で順序を変えて実験手順を実施した。マウスを、SPFの標準条件で12時間の明暗周期下に室温で維持した。処置方法を図38に記載する。

【0173】

食餌：投与のために、平均体重をマウスあたり25グラムと見積もった。マウスは1日に1匹あたり約3gの飼料を食する。

【0174】

処置方法：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4つのサブ群：1. hBD2、1. HD5、1. hBD2/HD5、1. ディフェンシン無添加の標準HFDを含んだ。ディフェンシン濃度は、1日にマウス1kgあたり1.2mg hBD2であった。HD5をhBD2と等モル濃度で与えた。併用群には50% hBD2 + 50% HD5を与え、そのためディフェンシンの全量は残りの試験群と同等であった。

【0175】

試験：

微生物分析を実施して腸の微生物叢を調査した。縦断的な16Sの特徴付けを60匹のマウスからの4組の試料である合計240試料で実施した。各マウスを食餌変更前、食餌変更1週間後、食事変更4週間後および終了時にサンプリングし、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付けを確実にした。

【0176】

結果

微生物叢

hBD2は主に微生物の出現度に影響を及ぼし、一方でHD5およびhBD2 + HD5は主に微生物存在量に影響を及ぼした。図40は、異なる投与群における種の相対的存在量を示し、hBD2およびHD5の腸微生物叢に対する重大な効果を例示する。アロバキユラムの存在量の統計的に有意な増加が、HD5による予防後の小腸において観察された($p < 0.02$; 図41)。アロバキユラムは短鎖脂肪酸を産生する種である。短鎖脂肪酸は、GPCR43により媒介される大腸Treg細胞の恒常性の調節において重要な役割を果たす。バルネシエラの存在量の統計的に有意な増加が、hBD2による予防処置後の大腸において観察された($p < 0.03$; 図43)。バルネシエラは、入院患者において観察できる抗生物質抵抗性の病原性細菌を除去しその腸管優位を防ぐことができる細菌である。バルネシエラの存在量は、いくつかの免疫調節性細胞の量に対応する。大腸におけるバルネシエラのレベルが高いほど、脾臓および肝臓において計数される周辺帯B細胞およびインバリアントナチュラルキラーT細胞が多くなる。IL10-/-マウスにおける大腸炎の発症において、より高いレベルのバルネシエラの系統型が、より低い疾患活動性レベルと相関していた。乳酸菌科の存在量が減少する傾向が、hBD2による予防処置後の大腸において観察された($p = 0.1$; 図42)。

【0177】

結論：肺微生物叢ならびに微生物叢は、喘息において重要な役割を果たしているようである(後者は腸-肺軸によって)。重要な共生細菌の出現度および存在量ならびに大腸T細胞の恒常性に対するディフェンシンの重大な影響は、ディフェンシンによる経口処置後のアレルギー性喘息マウスにおいて観察される肺効果だけでなく経口投与対鼻腔内投与の後に観察された肺効果の間の差も説明できる。この実施例10は、および - ディフェンシンの両方、特にHD5およびhBD2が、存在する種の数および細菌の総数に関し微生物叢の組成に対して重大な影響を与えこれにより健常な微生物叢を保護し保存することであることを示す。より詳しくは、ディフェンシンは、大腸Treg細胞の恒常性において重要な役割を果たす短鎖脂肪酸(SCFA)を産生する細菌を促進するようである。

10

20

30

40

50

【0178】

実施例 11

ディフェンシンを用いた介入処置による腸内菌共生バランス失調の処置

【0179】

マウスおよび食餌

本実験は、食餌誘発性肥満マウスにおける微生物叢に対する h B D 2 および H D 5 の効果を明らかにする。マウスが超高脂肪食（エネルギーの 60% が脂肪由来）を給餌される 13 週間の馴らし期間を、介入に先行させた。馴らし期間中の最低 12 g の体重増加（初期体重の約 50%）という基準を満たしたマウスのみを最終分析に組み入れた。この基準を満たさなかったマウスを、ヒエラルキー「維持マウス (keepers)」としてそれぞれのケージで飼育した。これらは全ての実験的な試験に供されたが、分析からは除外された。

10

【0180】

処置方法：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当てた。以後の全ての測定を、介入前の同一のマウスからのデータと対にした。LFD（低脂肪食）参照群の実験を並行して行った。介入の対照として、2つの追加群：1. 超高脂肪食および 1. 低脂肪食を含めた。実験マウスを介入の間、超高脂肪食で飼育した。マウスは 10 週間、試験食を受けた。それらは実験の全期間を通して、ケージあたり 4 匹、群あたり 3 ケージで共飼育された。全ての試験を、1 日に群あたり 1 ケージで、3 日間にわたって実施した。処置方法を図 39 に示す。

20

【0181】

試験：試験微生物分析を実施して腸の微生物叢を調査した。縦断的な 16S の特徴付けを 60 匹のマウスからの 4 組の試料である合計 240 試料で実施した。各マウスを食餌変更前、食餌変更 1 週後、食事変更 4 週後および終了時にサンプリングし、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付けを確実にした。

【0182】

結果

微生物叢

両方のディフェンシンは、細菌の出現度および細菌の欠如に対して重大な影響を及ぼすことを示した。H D 5 は大腸におけるアロプレボテラの存在量を統計的に有意に増加させ（ $p < 0.02$ ）（図 44）、一方で h B D 2 はアロプレボテラの存在量に対して影響を及ぼさなかった。h B D 2 は、小腸においておよび大腸においての両方でビフィドバクテリア科の相対的存在量を劇的にかつ統計的に優位に増加させた（それぞれ $p < 0.0001$ および $p < 0.04$ ；図 45）。H D 5 は、小腸におけるビフィドバクテリア科の存在量を増加させる傾向があった（図 45）。

30

【0183】

肺微生物叢ならびに腸微生物叢は、喘息において重要な役割を果たしているようである（後者は腸 - 肺軸によって）。重要な共生細菌の出現度および存在量ならびに大腸 T 細胞の恒常性に対するディフェンシンの重大な影響は、ディフェンシンによる経口処置後のアレルギー性喘息マウスにおいて観察される肺効果だけでなく経口投与対鼻腔内投与の後に観察された肺効果の間の差も説明できる。

40

【0184】

結論：この実施例 11 は、および - ディフェンシンの両方、特に h B D 2 および H D 5 が、存在する種の数および細菌の総数に関し微生物叢の組成に対して重大な影響を与えこれにより健常な微生物叢を保護し維持するようであることを示す。より詳しくは、ディフェンシンは、大腸 Treg 細胞の恒常性において重要な役割を果たす短鎖脂肪酸 (SCFA) を産生する細菌を促進するようである。

【0185】

参考文献

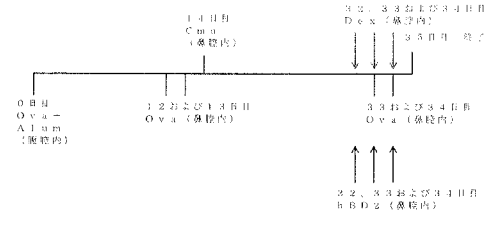
Bouloukaki, I. et al., 2011. Sputum and

50

- nasal lavage lung-specific biomarkers before and after smoking cessation. *BMC Pulmonary Medicine* 11: 35
- Charlson, E.S. et al. 2011. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 957-963.
- Cosmi, L et al., 2011. TH17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 66: 989-998. 10
- 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.
- Ege, M.J. et al., 2011. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *NEJM* 364: 701-709. 20
- Essilfie, A. et al., 2015. Macrolide therapy suppresses key features of experimental steroid-sensitive and steroid-insensitive asthma. *Thorax* 70: 458-467.
- Fletcher, C. and Peto, R. 1977. The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ*: 1: 1645-1648.
- Hansbro, P.M. et al, 2004. Role of atypical bacterial infection on the lung in predisposition/protection of asthma. *Pharmacol Ther* 101: 193-210 30
- Hansbro, P.M. et al., 2011. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? *BJP* 163: 81-95.
- Hilty, M. et al., 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE* 5, e8578
- Hogg, J.C. et al. 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *NEJM*: 350: 2645-2653. 40
- 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.
- Marra, F. et al., 2009. Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma. *Pediatrics* 123: 1003-1010. 50

- Marsland, B.J. et al., 2015. The gut-lung axis in respiratory disease. *Annals ATS* 12: S150-156
- Penders, J. et al., 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 2007: 1223-1236
- 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. 10
- Schirmer, M. et al., 2016. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell* 167: 1125-1136
- Trompette, A. et al., 2013. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine* 20: 159-168. 20
- Wehkamp J, et al., 2002. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig Dis Sci.* 47(6):1349-55.
- Wills-Karp, M. et al., 2001. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene Hypothesis. *Nat Rev Immunol* (1): 69-75.
- WO 2010/007166
- WO 92/06204 30
- WO 95/17413
- WO 95/22625
- US 5,223,409
- WO 2013/007596

【 図 1 】



【 図 2 】

群	N	皮下注射 (0日目)	腹腔内接種 / マウス (1-3日目)	接種 (1-4日目)	調査および処置 (接種後4-8時間後 / 1-5日目)
1	14	生理食塩水 + 100 μg L-CFA	50 μL 生理食塩水	-	● 血液検査のための血液採取 (N=14)
2	14	-	-	感染	● 組織病理学のための臓器採取 (N=8)
3	14	100 μg HDM / 0.2 mL 生理食塩水 + CFA / 生理食塩水 マウス	25 μg / 50 μL 生理食塩水	hBD2 (経口) (1.2 mg/kg/day) (0.4 mg/kg TID)	● サイロキンの測定のための血液採取 (N=8)
4	14	-	-	hBD2 (腹腔内) (1.2 mg/kg/day) (0.4 mg/kg TID)	-

【 図 3 a 】

HBD1 -----DHYNCSGGQCLYSACPIPTKIQTGTCYRGKARCK---
 HBD2 ---GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPTKCKKPKP-
 HBD3 GIIITLQYKYCRVGRGCAVLSCLPKSRQIGKCSYRGRKCKRRK
 HBD4 -----ELDRICGGYGTARCR-KKCRSQRYRIGRCPN-TYACCLIRK-

Fig. 3a

【 図 3 b 】

HD5 -ATCYCFTRCATRESISGUCSISGRLYRCCR
 HD6 APTCHCRS-SCYSTSEYSGYGTVMGNIHRFCCL
 *** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

Fig. 3b

【 図 4 】

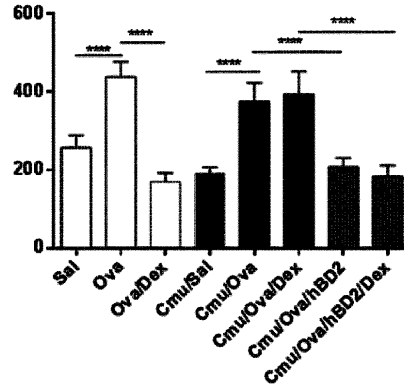


Fig. 4

【 図 5 a 】

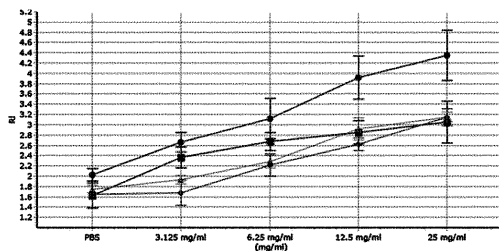


Fig. 5a

【 図 6 a 】

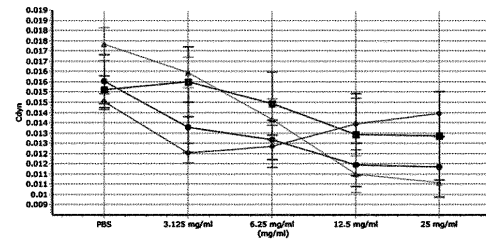


Fig. 6a

【 図 5 b 】

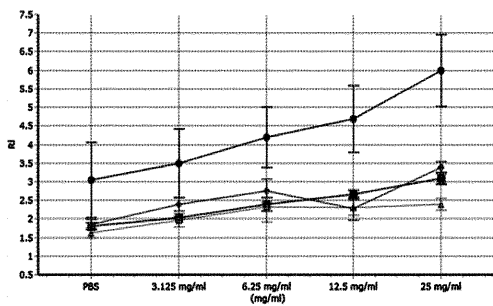


Fig. 5b

【 図 6 b 】

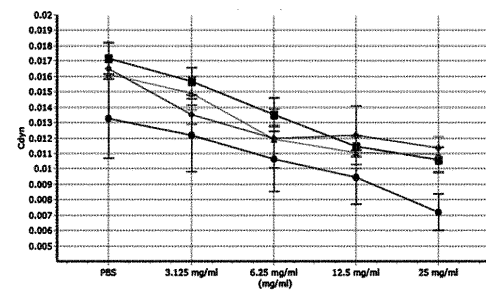
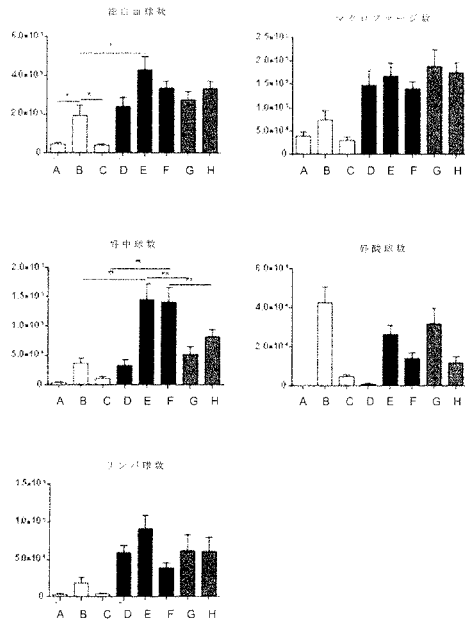
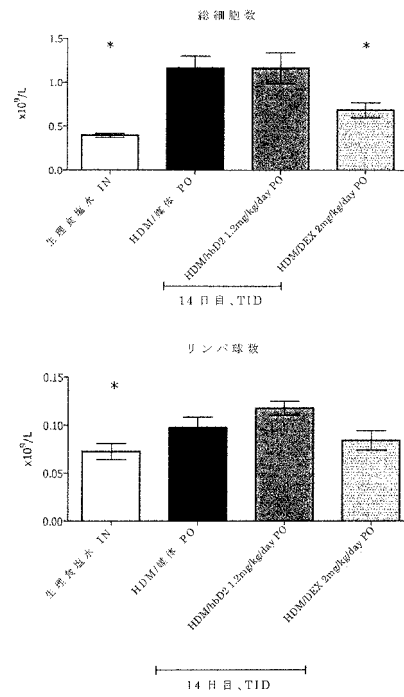


Fig. 6b

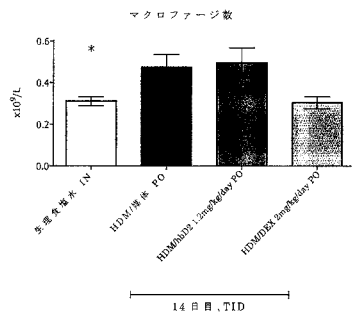
【 図 7 】



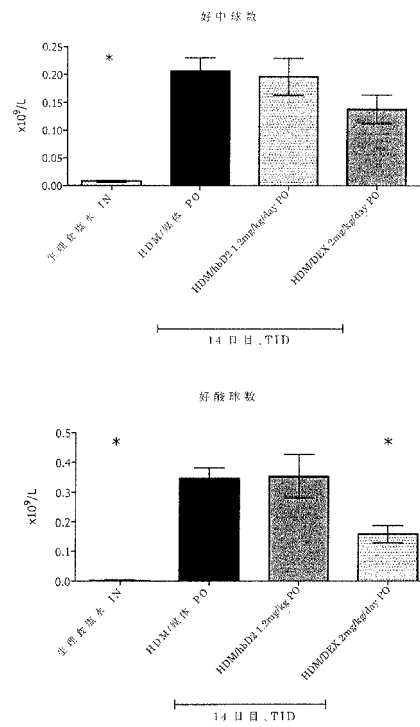
【 図 8 a - 1 】



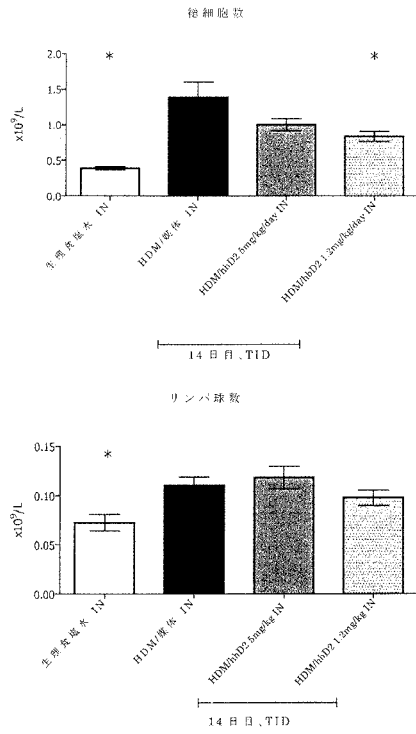
【 図 8 a - 2 】



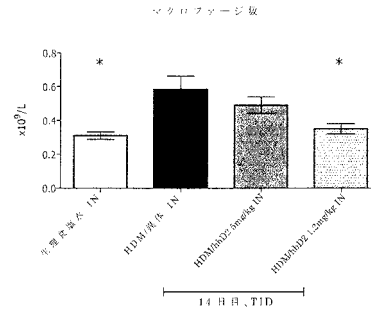
【 図 8 a - 3 】



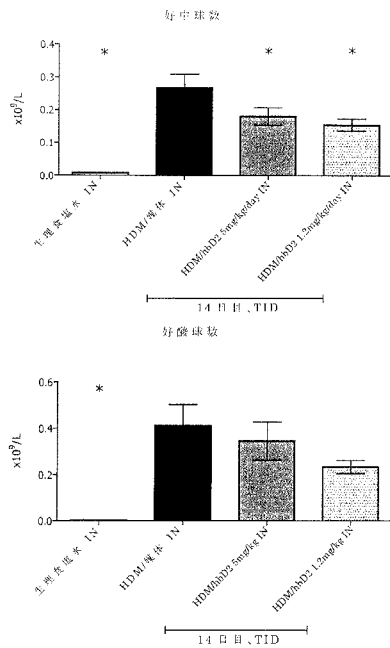
【図 8 b - 1】



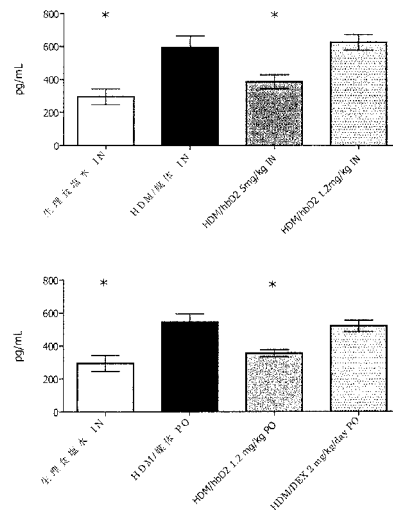
【図 8 b - 2】



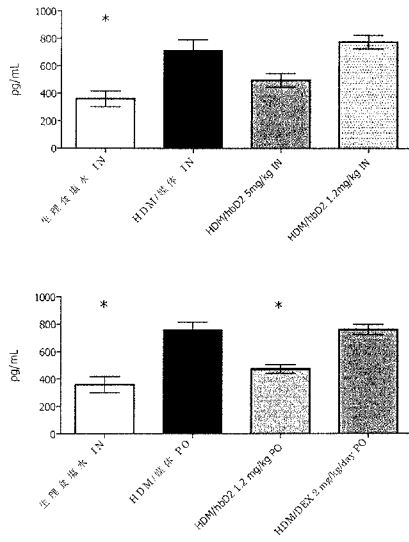
【図 8 b - 3】



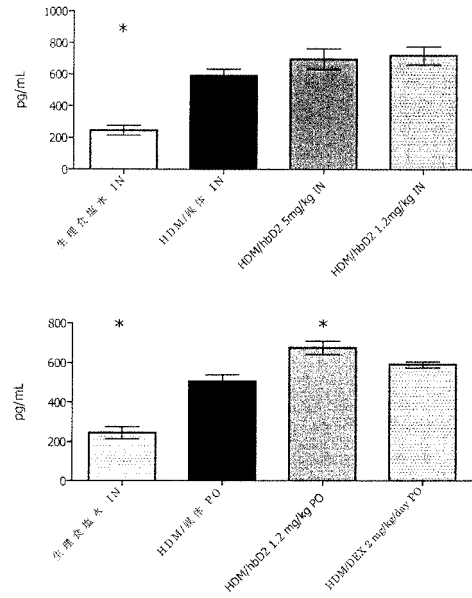
【図 9】



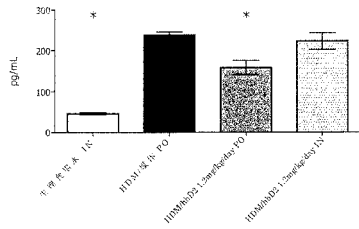
【 図 1 0 】



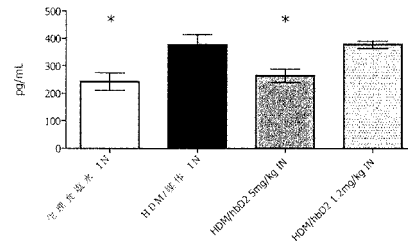
【 図 1 1 】



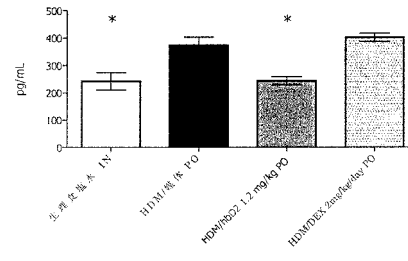
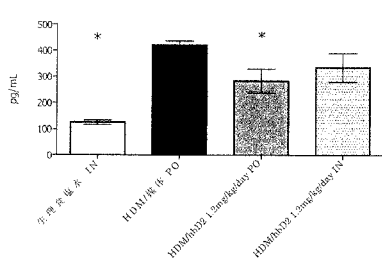
【 図 1 2 】



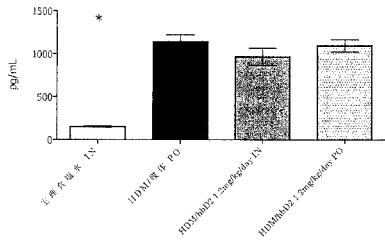
【 図 1 4 】



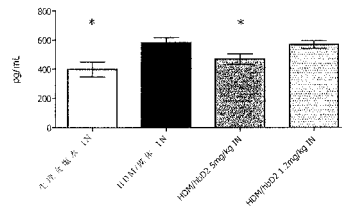
【 図 1 3 】



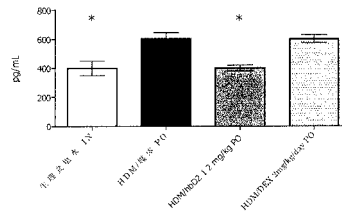
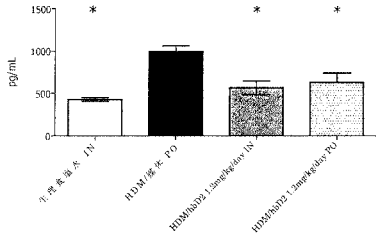
【 図 1 5 】



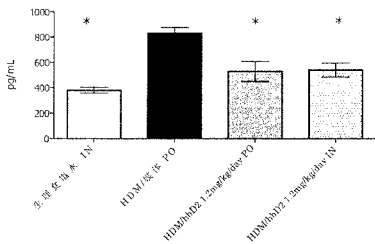
【 図 1 7 】



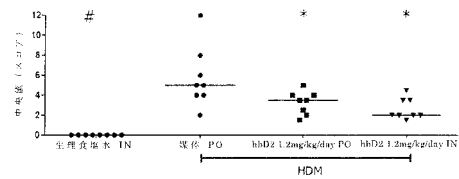
【 図 1 6 】



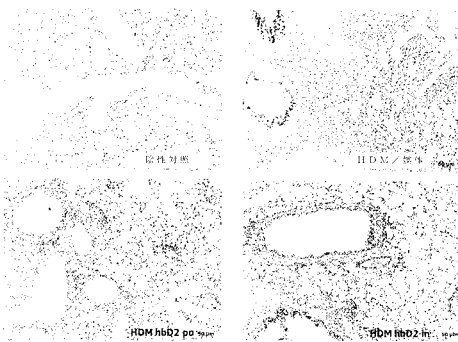
【 図 1 8 】



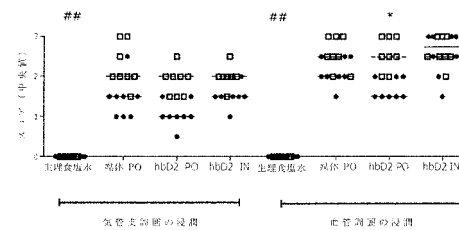
【 図 2 0 】



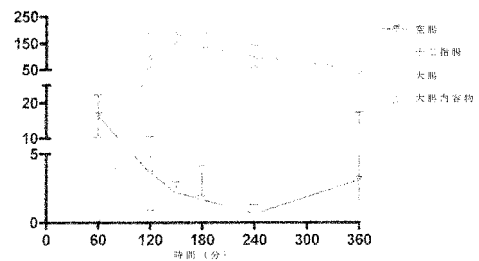
【 図 1 9 】



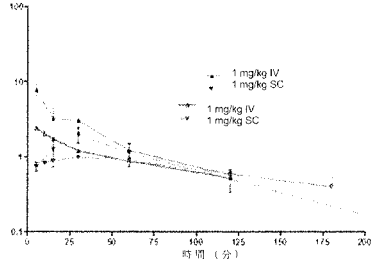
【 図 2 1 】



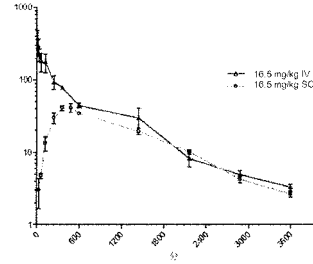
【 図 2 2 】



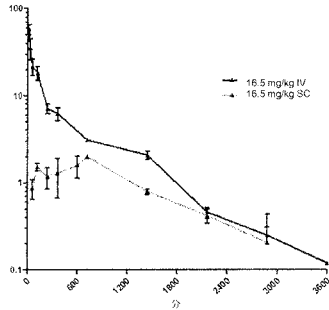
【図 23】



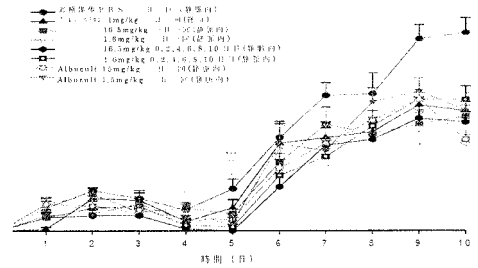
【図 25】



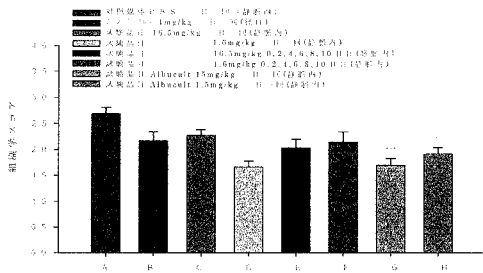
【図 24】



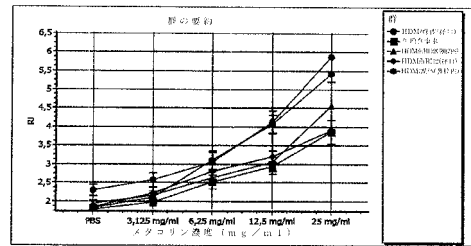
【図 26】



【図 27】



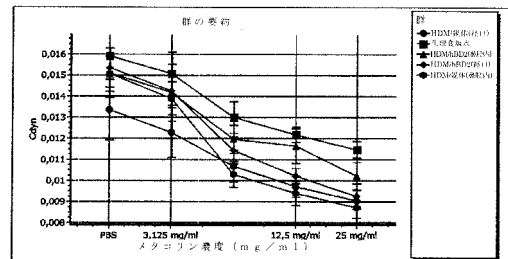
【図 29】



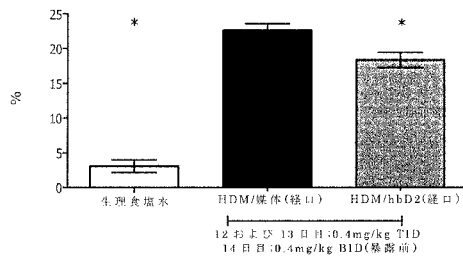
【図 28】

群	N	皮下投与 開始日	鼻投与経路 開始日	処置 11, 12, 27, 28, 29, 30日	測定および試 験の48時間後 (16日目)
1	12	生理食塩水に溶解した100 μ LのCFR	5.0 μ L生理食塩水		● AHR(低投与) 27, 28, 29, 30日 ● BALF(経鼻投与) 27, 28, 29, 30日
2	12	生理食塩水に溶解した100 μ LのCFR	5.0 μ L生理食塩水	経鼻(鼻投与)	● BALF(経鼻投与) 27, 28, 29, 30日 ● BALF(経鼻投与) 27, 28, 29, 30日
3	12	生理食塩水に溶解した100 μ LのCFR	5.0 μ L生理食塩水	経鼻(鼻投与)	N=12/群
4	12	生理食塩水に溶解した100 μ LのCFR	5.0 μ L生理食塩水	経鼻(鼻投与)	● BALF(経鼻投与) 27, 28, 29, 30日 ● BALF(経鼻投与) 27, 28, 29, 30日
5	12	生理食塩水に溶解した100 μ LのCFR	5.0 μ L生理食塩水	経鼻(鼻投与)	N=12/群

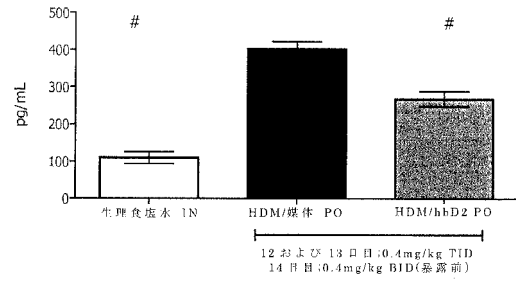
【図 30】



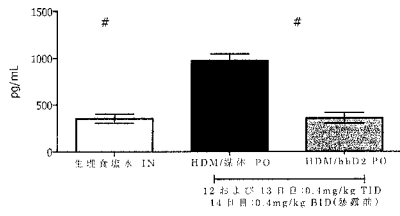
【図 3 1】



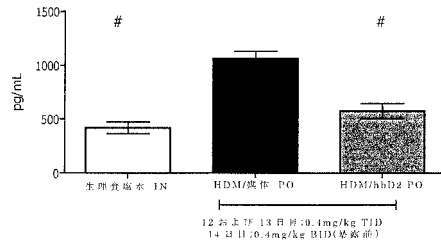
【図 3 3】



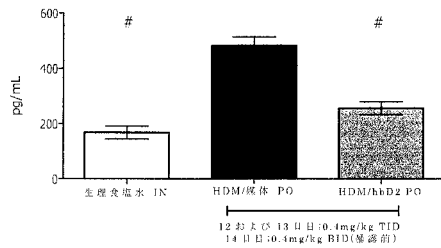
【図 3 2】



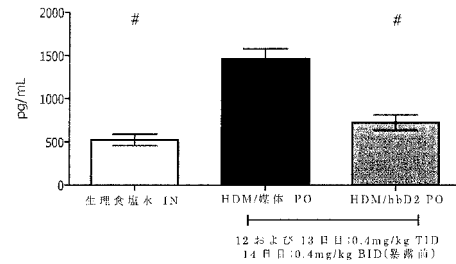
【図 3 4】



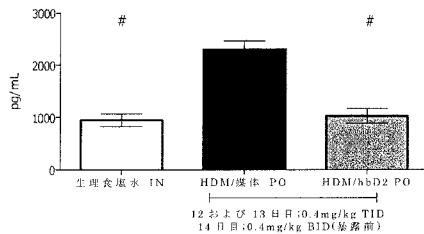
【図 3 5】



【図 3 7】

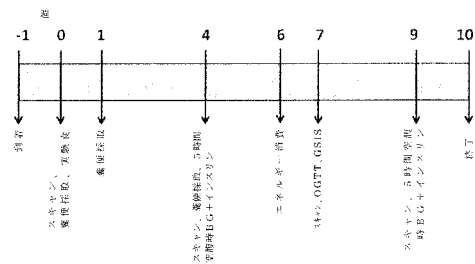


【図 3 6】



【図 3 8】

予防研究



【配列表】

2020512287000001.xml

【手続補正書】

【提出日】令和1年8月9日(2019.8.9)

【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】

2020512287000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/082535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/17 A61P31/04 A61P29/00 A61P11/06 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.
A	ZHENWEI SHEN ET AL: "[beta]-Defensin 2 Ameliorates Lung Injury Caused by Pseudomonas Infection and Regulates Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rat", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2012 MDPI AG CHE, vol. 15, no. 8, 30 July 2014 (2014-07-30), pages 13372-13387, XP055461387, ISSN: 1661-6596, DOI: 10.3390/ijms150813372 page 13373 ----- -/--	1,2,4-9, 12-25, 27,28
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 22 March 2018		Date of mailing of the international search report 13/06/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hars, Jesko

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/082535

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. L. WOHLFORD-LENANE ET AL: "Rhesus Theta-Defensin Prevents Death in a Mouse Model of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Pulmonary Disease", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 83, no. 21, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 11385-11390, XP055461435, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01363-09 page 11386 -----	1,2,4-9, 12-25, 27,28
A	JIN SOOK SUH ET AL: "Identification of a cell-penetrating peptide domain from human beta-defensin 3 and characterization of its anti-inflammatory activity", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, 26 August 2015 (2015-08-26), pages 5423-5434, XP055388673, DOI: 10.2147/IJN.S90014 figure 1 -----	1,2,4-9, 12-25, 27,28
A	WO 2010/007165 A2 (NOVOZYMES AS [DK]) 21 January 2010 (2010-01-21) claims 1,7 -----	1,2,4-9, 12-25, 27,28
X	WO 2012/064601 A1 (PULMATRIX INC [US]; HAVA DAVID L [US]; CLARKE ROBERT W [US]) 18 May 2012 (2012-05-18) claims 54-59; sequence 5 -----	1,2,4-9, 12-25, 27,28
X	WO 2011/031713 A2 (US OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY DEPT OF HEALTH AND HUMAN) 17 March 2011 (2011-03-17) pages 17,19; claims 1,8; sequence 9 -----	1,2,4-9, 12-25, 27,28
X	WO 03/070176 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; UNIV NAGASAKI [JP]; MOSS JOEL [US]; H) 28 August 2003 (2003-08-28) pages 7,8,24; claims 45-47; sequence 8 -----	1,2,4-9, 12-25, 27,28
A	HAWKINS G A ET AL: "Analysis of the defensin gene family for DNA sequence variants", AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 71, no. 4 Supplement, October 2002 (2002-10), page 462, XP009504312, & 52ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS; BALTIMORE, MD, USA; OCTOBER 15-19, 2002 ISSN: 0002-9297 page 462 -----	1,2,4-9, 12-25, 27,28

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/082535**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.:
1, 2, 4-9, 12-25, 27, 28(all 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/ EP2017/ 082535

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1, 2, 4-9, 12-25, 27, 28(all partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of one defensin, wherein said defensin is HD5 (SEQ ID NO:5) and wherein the subject suffers from asthma.

2-8. claims: 1, 2, 4-9, 12-25, 27, 28(all partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of one defensin, wherein said defensin is HD5 and wherein the subject suffers from (invention number in brackets) bronchiectasis (2), Chronic obstructive pulmonary disorder (COPD) (3), bronchitis (4), pneumonia (5), emphysema (6), sarcoidosis (7) or lung fibrosis (8).

9-16. claims: 1, 2, 4-10, 12-25, 27, 28(all partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of at least one defensin, wherein said defensin is HD6 and wherein the subject suffers from (invention number in brackets) asthma (9), bronchiectasis (10), Chronic obstructive pulmonary disorder (COPD) (11), bronchitis (12), pneumonia (13), emphysema (14), sarcoidosis (15) or lung fibrosis (16).

17-24. claims: 1, 2, 4-10, 12-25, 27, 28(all partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of at least one defensin, wherein said defensin is hBD-1 and wherein the subject suffers from (invention number in brackets) asthma (17), bronchiectasis (18), Chronic obstructive pulmonary disorder (COPD) (19), bronchitis (20), pneumonia (21), emphysema (22), sarcoidosis (23) or lung fibrosis (24).

25-32. claims: 1, 2, 4-25, 27, 28(all partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of at least one defensin, wherein said defensin is hBD-2 or truncated hBD-2 and wherein the subject suffers from (invention number in

International Application No. PCT/ EP2017/ 082535

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

brackets) asthma (25), bronchiectasis (26), Chronic obstructive pulmonary disorder (COPD) (27), bronchitis (28), pneumonia (29), emphysema (30), sarcoidosis (31) or lung fibrosis (32).

33-40. claims: 1, 2, 4-10, 12-25, 27, 28(all partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of at least one defensin, wherein said defensin is hBD-3 and wherein the subject suffers from (invention number in brackets) asthma (33), bronchiectasis (34), Chronic obstructive pulmonary disorder (COPD) (35), bronchitis (36), pneumonia (37), emphysema (38), sarcoidosis (39) or lung fibrosis (40).

41-48. claims: 1, 2, 4-10, 12-25, 27, 28(all partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of at least one defensin, wherein said defensin is hBD-4 and wherein the subject suffers from (invention number in brackets) asthma (41), bronchiectasis (42), Chronic obstructive pulmonary disorder (COPD) (43), bronchitis (44), pneumonia (45), emphysema (46), sarcoidosis (47) or lung fibrosis (48).

49-54. claims: 3, 26(completely); 1, 5-15, 19-25, 27, 28(partially)

A method of treatment and/or prevention of inflammatory diseases of the respiratory system the method comprising oral or intrapulmonary administration of at least one defensin preferably wherein the inflammation is caused by lung cancer and the defensin is (invention number in brackets): HD5 (49), HD6 (50), hBD-1 (51), hBD-2 or truncated hBD2 (52), hBD-3 (53) or hBD-4 (54).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/082535

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010007165 A2	21-01-2010	AR 072524 A1	01-09-2010
		AU 2009272680 A1	21-01-2010
		CA 2730674 A1	21-01-2010
		CN 102159232 A	17-08-2011
		EA 201170218 A1	30-08-2011
		EP 2320929 A2	18-05-2011
		JP 2011528332 A	17-11-2011
		KR 20110031962 A	29-03-2011
		KR 20110044863 A	02-05-2011
		NZ 590466 A	31-08-2012
		TW 201004641 A	01-02-2010
		US 2010016232 A1	21-01-2010
		WO 2010007165 A2	21-01-2010
		ZA 201100462 B	27-03-2013

WO 2012064601 A1	18-05-2012	US 2013281361 A1	24-10-2013
		WO 2012064601 A1	18-05-2012

WO 2011031713 A2	17-03-2011	US 2012164123 A1	28-06-2012
		US 2014341876 A1	20-11-2014
		WO 2011031713 A2	17-03-2011

WO 03070176 A2	28-08-2003	AU 2003215257 A1	09-09-2003
		US 2006036083 A1	16-02-2006
		US 2009155293 A1	18-06-2009
		US 2012107336 A1	03-05-2012
		WO 03070176 A2	28-08-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 9/12	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 47/61 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
	A 6 1 K 47/61	

(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. T W E E N

(72) 発明者 ノードキルド, ペーター
デンマーク国, 2 8 2 0 ゲントフテ, ヴァルデガーズヴェジュ 5 9

(72) 発明者 クジャールフ, ソーレン
デンマーク国, 2 8 4 0 ホルテ, クラークスヴェジュ 6

Fターム(参考) 4C076 AA12 AA17 AA22 AA24 AA29 AA31 AA36 AA53 AA69 AA95
BB01 BB11 BB13 BB16 BB21 BB25 BB27 CC04 CC15 CC27
EE23 EE37 EE41 EE59 FF02 FF05 FF06 FF09 FF12 FF13
FF14 FF16 FF36 FF39 FF43 FF52 FF57 FF61 FF63
4C084 AA01 AA02 AA19 BA01 BA08 BA18 BA19 BA23 DA42 MA13
MA17 MA22 MA23 MA28 MA35 MA37 MA41 MA43 MA47 MA52
MA56 MA59 MA66 NA05 NA14 ZA591 ZA592 ZB111 ZB112 ZB261
ZB262 ZC411 ZC412 ZC751 ZC752
4H045 BA17 BA18 BA19 CA40 EA22