



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0121489  
 (43) 공개일자 2018년11월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 38/17* (2006.01) *A61K 31/155* (2006.01)  
*A61K 38/26* (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 38/1729* (2013.01)  
*A61K 31/155* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7021406
- (22) 출원일자(국제) 2017년01월26일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년07월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/DK2017/050017
- (87) 국제공개번호 WO 2017/129195  
 국제공개일자 2017년08월03일
- (30) 우선권주장  
 PA 2016 70041 2016년01월26일 텐마크(DK)  
 PA 2016 70483 2016년07월01일 텐마크(DK)

- (71) 출원인  
 디펜신 테라퓨틱스 에이피에스  
 텐마크, 2200 코펜하겐, 올레 마알로에스베이 3,  
 코비스 내
- (72) 발명자  
 노드킬트 피터  
 텐마크, 2820 젠토프테, 바엘데가르드스베이 59  
 웨컴프 젠  
 독일, 72766 로이틀링겐, 호헨줄런스트라쎄 16  
 카에를프 소렌  
 텐마크, 2840 홀테, 클라크스베이 6
- (74) 대리인  
 손민

전체 청구항 수 : 총 43 항

**(54) 발명의 명칭 장내 미생물을 조절하는 방법**

**(57) 요 약**

본 발명은 하나 또는 그 이상의 디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체를 투여함으로써 장내 미생물을 조절하는 방법 및 하나 또는 그 이상의 디펜신의 경구 투여에 의한 장 염증의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 리라글루티드(Liraglutide)와 같은 GLP-1 유사체뿐만 아니라 포유 동물 또는 가금 알파 및 베타 디펜신은 장내 미생물 및 대사 물질의 조성의 변화를 유발할 수 있고 이에 따라 장 염증, 결장직장암, 대사 증후군, 비만, 당뇨병 전증(prediabetes) 및 당뇨병 또는 육류 생산에 런 성장 촉진제로서 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

*A61K 38/26* (2013.01)

*A61K 38/28* (2013.01)

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61K 9/0053* (2013.01)

*A61P 1/00* (2018.01)

*A61P 3/04* (2018.01)

*A61P 3/10* (2018.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

포유 동물의  $\alpha$ -디펜신( $\alpha$ -defensin),  $\beta$ -디펜신( $\beta$ -defensin), 또는 이의 생물활성 단편(bioactive fragment)을 이를 필요로 하는 대상체(subject)에게 투여함을 포함하여, 제2형 당뇨병(type 2 diabetes), 대사 증후군(metabolic syndrome), 전신 저등급 염증(systemic low grade inflammation), 비만(obesity), 인슐린 저항성(insulin resistance), 또는 포도당 내성(glucose intolerance)을 치료하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치료는 제2형 당뇨병, 대사 증후군, 비만, 인슐린 저항성, 또는 포도당 내성인 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 대상체로의 상기 디펜신 또는 생물활성 단편의 투여는 경구(oral) 투여인 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비만의 치료는 상기 대상체의 지방 백분율을 감소시키거나 또는 지방 백분율의 증가를 방지하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비만의 치료는 내장 지방(visceral fat) 및/또는 간 지방(liver fat)의 양의 예방 또는 감소, 및/또는 허리 둘레(waist circumference)의 감소를 포함하는 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료는 체중의 감소 또는 체중 증가의 방지를 포함하는 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료는 공복 혈당(fasting blood glucose)의 강하를 포함하는 방법.

#### 청구항 8

가축의 린 성장(lean growth)을 촉진하는 방법으로서, 포유 동물 또는 가금(poultry)의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 가축은 소(cow), 돼지(pig), 양(sheep), 염소(goat), 말(horse), 오리(duck), 거위

(geese), 비둘기(pigeon), 칠면조(turkey), 메추라기(quail) 및 닭(chicken)으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, hBD5, hBD-2, 절단된(truncated) hBD-2, HD6, hBD-1, hBD-3, hBD-4, 디펜신 단편 및 글리코실화 디펜신(glycosylated defensin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 포유 동물의 디펜신을 투여함을 포함하는 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신은 HD5 및/또는 hBD-2인 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신은 세포 투과성 웨타이드(cell penetrating peptide; CPP), 알부민 결합 모이어티(Albumin Binding Moiety; ABM), 검출가능한 모이어티(Z), 및 반감기 연장 웨타이드(half-life extending peptide)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 모이어티(moiety)를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 추가의 모이어티는 반감기 연장 웨타이드인 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 반감기 연장 웨타이드는 신생아 Fc 수용체(FcRn), 트랜스페린(transferrin), 알부민(HAS), XTEN® 또는 PEG, 호모-아미노산 중합체(homo-amino acid polymer; HAP), 프롤린-알라닌-세린 중합체(proline-alanine-serine polymer; PAS), 엘라스틴-유사 웨타이드(elastin-like peptide; ELP), 히알루론산(hyaluronic acid), 음전하 고도 사이아실레이트화 웨타이드(negatively charged highly siacylated peptide), 예를 들어 융모성 고나도트로핀  $\beta$ -사슬(chorionic gonadotropin (CG)  $\beta$ -chain)의 카르복시-말단 웨타이드(carboxy-terminal peptide; CTP), 인간 IgG, 및  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ (여기서, n은 8 내지 22이다)에 결합가능한 분자로 이루어진 군으로부터 선택된 방법.

#### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 25 또는 그 이상, 예를 들어 30 또는 그 이상, 예를 들어 35 또는 그 이상, 예를 들어 40 또는 그 이상의 BMI를 갖는 방법.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 0.80, 예를 들어 0.80-0.84, 예를 들어 적어도 0.85(여성) 또는 적어도 0.90, 예를 들어 0.9-0.99, 예를 들어 1.00 이상(남성)의 허리/엉덩이 비율(waist/hip ratio)을 갖는 방법.

#### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 6.1 mmol/l, 예를 들어 적어도 7.0 mmol/l의 공복 혈당(fasting blood glucose)을 갖는 방법.

### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 42 mmol/mol Hb, 예를 들어 42 내지 46 mmol/mol Hb, 예를 들어 적어도 48 mmol/mol Hb의 당화 혈액 색소 수준(glycated haemoglobin level)을 갖는 방법.

### 청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 하나 또는 그 이상의 하기의 증상을 갖는 방법:

상승된 혈압: = 140/90 mmHg;

- 이상지질혈증(dyslipidemia): 트리글리세리드(triglyceride; TG) = 1.695 mmol/L 및 고밀도 지질 단백 콜레스테롤(high-density lipoprotein cholesterol; HDL-C) = 0.9 mmol/L (남성), = 1.0 mmol/L (여성);
- 내장 비만(Central obesity): 허리:엉덩이 비율 > 0.90 (남성); > 0.85 (여성), 또는 체질량 지수(body mass index) > 30 kg/m<sup>2</sup>; 및
- 내장 비만(Central obesity): 허리:엉덩이 비율 > 0.90 (남성); > 0.85 (여성), 또는 체질량 지수(body mass index) > 30 kg/m<sup>2</sup>; 및

### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신은 0.1 mg hBD-2 /kg 내지 10 mg hBD-2 /kg의 1일 용량으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신은 0.1 mg HD5/kg 내지 10 mg HD5/kg의 1일 1회 용량으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신은 인슐린/인슐린 유사체(insulin/insulin analog) 및/ 또는 글루카곤 유사 펫타이드-1(glucagon like peptide-1 (GLP-1))/GLP-1 유사체 및/또는 글루카곤 유사 펫타이드-2(GLP-2)/GLP-2 유사체 및/또는 디펩티딜 펫티다이제 IV(dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)) 억제제 및/ 또는 메트포르민(metformin) 및/또는 나트륨 글루코스 트랜스포터-2(sodium glucose transporter-2 (SGLT-2)) 억제제 및/또는 글루카곤 수용체 길항제(antagonist) 및/또는 일시적인 수용체 전위 양이온 채널 아파 V 구성원 1(transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)) 길항제 또는 이들의 조합물과 조합하여 투여되는 방법.

### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 GLP-1 유사체가 엑세나타이드(exenatide), 리라글루타이드(liraglutide), 릭시세나타이드(lixisenatide), 알비글루타이드(albiglutide), 및 둘라글루타이드(dulaglutide)로부터 선택되는 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 상기 인슐린 유사체는 리스프로(Lispro), 아스파르트(Aspart), 글루리신(Glulisine), 데테미르(Detemir) 인슐린, 데글루데크(Degludec) 인슐린, 및 글라진(Glargine) 인슐린으로부터 선택되는 방법.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신은 1일 1회, 1일 2회, 또는 1일 3회로, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 방법.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인슐린/인슐린 유사체 또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 투여는 피하(subcutaneous) 또는 근육 내(intramuscular) 투여인 방법.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것이 동물사료에 혼합되는 것인 방법.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 치료 방법에 사용하기 위한 포유 동물의  $\alpha$ -디펜신,  $\beta$ -디펜신, 또는 이의 생물활성 단편.

**청구항 29**

포유 동물 또는 가금(poultry)의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하여, 장 내의 불균형한 미생물의 치료 또는 정상화를 위한 방법.

**청구항 30**

포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체를 투여함을 포함하여, 장 내 미생물의 유전자 풍부도를 증가시키는 방법.

**청구항 31**

포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체를 투여함을 포함하여, 장 내 미생물의 족(phylae)의 수를 증가시키는 방법.

**청구항 32**

포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체를 투여함을 포함하여, 장 내 미생물/대사 물질(microbiota/metabolome)로부터 짧은 사슬의 지방산의 생산을 증가시키는 방법.

**청구항 33**

포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체를 투여함을 포함하여, 장 내 박테리오이데테스(*Bacteroidetes*), 페칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 로세부리아(*Roseburia*), 블라우티아(*Blautia*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 코프로코쿠스(*Coprococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 메타노브레비박터(*Methanobrevibacter*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 아커만시아(*Akkermansia*), 알로프레보텔라(*Alloprevotella*), 알로바쿨룸(*Allobaculum*), 및 유박테리움(*Eubacterium*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 속(genus)에 속하는 박테리아의 수를 증가시키는 방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 속은 락토바실러스(*Lactobacillus*), 아커만시아(*Akkermansia*), 알로프레보텔라(*Alloprevotella*), 및 알로바쿨룸(*Allobaculum*)으로부터 선택되는 방법.

**청구항 35**

디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 투여함을 포함하여, 장 내 박테리오이데테스 프라질리스(*Bacteroidetes fragilis*), 수투렐라 와즈워티아(*Sutturella wadsworthia*), 베일로넬라 파볼라(*Veillonella parvula*), 에스케리키 콜라이(*Escherichia coli*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 푸소박테리움 누클리아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corodens*), 및 게멜라 모리빌룸(*Gemella morbillum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아의 수를 감소시키는 방법.

**청구항 36**

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신은 경구 투여되고 바람직하게는 상기 디펜신은 인간 HD5 또는 인간 베타 디펜신 2인 방법.

**청구항 37**

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GLP-1 유사체는 엑세나타이드(exenatide), 리라글루타이드(liraglutide), 릭시세나타이드(lixisenatide), 알비글루타이드(albiglutide), 및 둘라글루타이드(dulaglutide), 바람직하게는 리라글루티드(liraglutid)로부터 선택되는 방법.

**청구항 38**

제29항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 25 또는 그 이상, 예를 들어 30 또는 그 이상, 예를 들어 35 또는 그 이상, 예를 들어 40 또는 그 이상의 BMI를 갖는 방법.

**청구항 39**

제29항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 0.80, 예를 들어 0.80-0.84, 예를 들어 적어도 0.85(여성) 또는 적어도 0.90, 예를 들어 0.9-0.99, 예를 들어 1.00 이상(남성)의 허리/엉덩이 비율을 갖는 방법.

**청구항 40**

제29항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 6.1 mmol/1, 예를 들어 적어도 7.0 mmol/1의 공복 혈당을 갖는 방법.

**청구항 41**

제29항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 42 mmol/mol Hb, 예를 들어 42 내지 46 mmol/mol Hb, 예를 들어 적어도 48 mmol/mol Hb의 당화 혈액 색소 수준을 갖는 방법.

**청구항 42**

제29항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 하나 또는 그 이상의 하기의 증상을 갖는 방법:

- 상승된 혈압: = 140/90 mmHg;
- 이상지질혈증(dyslipidemia): 트리글리세리드(triglyceride; TG) = 1.695 mmol/L 및 고밀도 지질 단백 콜레스테롤(high-density lipoprotein cholesterol; HDL-C) = 0.9 mmol/L (남성), = 1.0 mmol/L (여성);
- 내장 비만(Central obesity): 허리:엉덩이 비율 > 0.90 (남성); > 0.85 (여성), 또는 체질량 지수(body mass index) > 30 kg/m<sup>2</sup>; 및
- 미세알부민뇨(Microalbuminuria): 뇨 알부민 배설률(urinary albumin excretion ratio) = 20 µg/min 또는 알부민:크레아티닌 비율(albumin:creatinine ratio) = 30 mg/g.

**청구항 43**

제29항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 따르는 치료 방법에 사용하기 위한, 포유 동물 또는 가금의 α-디펜신 및 /또는 β-디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001]

본 발명은 하나 또는 그 이상의 디펜신(defensin)을 경구 투여함으로써 장내 미생물(intestinal microbiota)을 조절 또는 안정화시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 장 염증(gut inflammation), 결장직장암(colorectal cancer), 대사 증후군(metabolic syndrome), 비만(obesity) 및 심장혈관 질환(cardiovascular disease)을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 육류 생산에 있어서 린(Lean) 성장의 촉진을 위해서도 사용될 수 있다.

**배경기술**

[0002]

**장내 미생물**

[0003]

비만 및 비만 관련 질환과 같은 일반적인 장애의 증가하는 유병률(prevalence)은 서구화된 생활 양식 및 식이(diet)와 밀접하게 관련되어 있다. 가장 우세한 비만-관련 질병(ailment)은 인슐린 저항성, 혈성의 제2형 당뇨병(T2D) 및 특정의 암이다(Faulds & Dahlman-Wright, 2012). 상기 질병의 병인은 복잡하지만, 이들 다수는 조절능력이 없는(dysregulated) 장내 미생물로부터 유래할 수 있는, 일반적인 상태의 저-등급(low-grade)의 염증으로 특징지어진다(Everard & Cani, 2013; Belkaid & Hand, 2014). 현대인의 생활 양식 및 동물 육류 생산과 관련된 문제가 멀리 떨어진 것처럼 보일 수 있지만, 손상된 장의 건강이 공통 분모(denominator)인 것은 관측된다. 조절능력이 없는 장의 건강은 실제로 비만(Ridaura et al, 2013), 제2형 당뇨병(Qin et al, 2012), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)(Zhang et al, 2015) 및 결장직장암(Feng et al, 2015)과 관련이 있다. 최근

예, 장내 미생물 사이의 연관성, 및 특히 박테로이드(*Bacteroides*)로부터의 특정의 지질다당류(lipopolysaccharide)의 존재, 및 인접 지역과 비교하여 핀란드에서 제1형 당뇨병의 발생률이 더 높다는 것이 보고되었다(Levitin 2016).

[0004] 비만 및 이에 수반되는 저-등급의 염증은 조절능력이 없는 대사 항상성(metabolic homeostasis)의 강력한 동인(driver)을 형성한다. Turnbaugh et al. (2006)은 비만-관련 미생물이 증가된 에너지 수확 능력을 지녔고, 비만인 마우스로부터의 미생물의 이식 2주 후, 무균 마우스가 린 마우스로부터의 유사한 이식수술보다 지방량(fat mass)이 현저히 증가함을 보였음을 밝혀냈다. Turnbaugh et al. (2008)은 추가로 장내 미생물의 조성물 내의 변화가 고 지방/당의 "서양의(Western)" 식이를 일시적으로 먹인 마우스에게 본래의 식이로 되돌아간 후 완전히 반전되었다는 것을 중요하게 밝혀냈다. 상기 연구 결과는 마른 인체의 수증자로부터 장내 미생물의 전이(transfer)가 대사 증후군을 지닌 개체 내 인슐린(insulin) 민감도(sensitivity)를 증가시킨다는 것을 입증한, Vrieze et al. (2012)에 의해 확인되었다.

[0005] 체중 및 체중-증가율을 증대시키기 위한 장내 미생물의 조작(manipulation)이 저-용량의 항생제(antibiotics) 및 락토바실러스 인글루비에이(*Lactobacillus ingluviei*)와 같은 프로바이오틱스(probiotics)의 사용을 통해 농업용 가축(live-stock)에서 여러 해 동안 적용되고 있다. 체중 증가를 위한 장내 미생물의 조작은 닭(Khan et al, 2007), 오리(Angelakis & Raoult, 2010), 및 마우스(Angelakis et al, 2012)에서 입증되었다. 인체에서, 항생제를 투여받은 유아(infant)는 또한 대조군보다 더 큰 것으로 밝혀졌으며(Trasande et al, 2012), 경구 항생제의 조기 노출이 어린이의 과체중(overweight)과 관련이 있다(Ajslev et al, 2014). 또한 임신한 여성에서는, 지방과다증(adiposity) 내 생리적인 증가 및 제 3의 임신 3개월(trimester)에 임신성 당뇨병(gestational diabetes)의 잠재적인 발생이 장내 미생물의 극심한 변화와 관련되어 나타난다(Koren et al, 2012).

[0006] 장 점막(mucosa)은 가장 큰 신체의 표면(약 200 m<sup>2</sup>)에 의해 외부 환경에 노출된다. 이와 같이, 장 표면은 이물질, 식이로부터 유래한 대사 산물, 및 장 내 서식하는 추정된 1014의 박테리아 - 장내 미생물과 밀접한 관련이 있다. 따라서 장내 장벽(barrier)은 지속적이고 강한 면역 감시(immune surveillance) 하에서, 면역 체계, 식이 성분, 및 장내 미생물을 필요로 하고 있다. 식이 조정(intervention)은 면역 조절(Mowat & Agace, 2014) 및 장내 미생물 조성물(Walter, 2015)에 중대한 영향을 미치고, 독립적으로 및 상승작용으로 모두 대사 항상성(homeostasis)에 영향을 미친다. 이와 관련하여, 최근 2개의 논문은 대사 항상성에 대한 미생물-조절된 변화 내(역으로의(adverse)) 잠재적인 식품 첨가물을 강조한다. 최근 논문(Chassaing et al, 2015)은 식품의 유화제(emulsifier)가 포도당 내성을(tolerance)을 손상시키는 방법으로, 조절능력이 없는 장내 미생물의 유도에 의해 체중 증가뿐만 아니라 결장염 감수성(colitis susceptibility)을 증대시킨다는 것을 설명하였다. 상기 관측은 무균(GF) 마우스에서는 반복될 수 없었고, 장내 미생물에 대한 중추적인 역할을 암시하였다. 유사하게도, Suez et al. (2014)는 최근에 비-칼로리 인공 감미료(sweetener)가 장내 미생물의 변화를 통해 대사의 기능 장애(dysfunction)를 유도하는 방법을 보여주었다. 상기 저자는 GF 마우스로 분변을 이동시킴으로써, 이후에 GF 마우스가 급속하게 포도당 내성을 발생하였다는 상기의 결과를 입증하였다. 상기 관찰은 GF 마우스((Backhed et al, 2007)에서 선구적인 연구를 반영하며, 대사의 건강을 유지하는데 장내 미생물의 역할을 명확히 밝혀냈다. 상기 연구는 공생(commensal)하는 미생물의 부재로, 불균형한 점막의 면역 항상성을 발생하고, 지방 조직은 크기 및 고지방 식이에 반응하는 기능이 감소하였음을 보여주었다. 정상적으로 건강한 표현형을 나타내는, 체중 증가의 부족에도 불구하고, 이소성(ectopic) 지질의 축적(간 지방증/hepatic steatosis) 및 증가된 수준의 혈청 트리글리세라이드(serum triglyceride)은 심각한 대사 장애의 원인이 되었다. 사람의 경우, 미생물의 유전자 풍부도(gene richness)는 건강한 표현형과 관련이 있는 반면에, 유전자 빈곤(gene poverty)(낮은 유전자의 수)은 대사 장애의 증가된 위험도와 관련이 있는 것으로 나타났다(Le Chatelier et al, 2013).

#### 디펜신(defensin)

[0008] 디펜신은 건강한 미생물을 유지하고 잠재적인 병원균을 막는데 도움이 되는 우세한 선천성 숙주 방어 중의 하나로 나타난다(Wehkamp et al, 2002 and Salzman et al, 2007). 디펜신은 그람 양성 및 음성 박테리아, 균류 및 고세균에 대한 항균 활성뿐만 아니라 항-염증성 사이토카인의 증가 및 염증성 사이토카인을 감소시키는 항-염증 활성을 갖는 펩타이드이다.

[0009] 인간 디펜신은 3개의 분자 내 시스테인 디설파이드 결합(cysteine disulphide bond)의 위상(topology)에 기반을 둔 α- 및 β-디펜신으로 나눌 수 있는 작은 양이온성(cationic) 펩타이드이다. 인간 α-디펜신은 추가로 호중성파립(neutrophil granules (HNP1-4)) 및 소장의 소낭선(crypt) 내 호산성파립세포(Paneth cell)(HD5 및

HD6 또는 DEFA5 및 DEFA6)에 의해 발현되는 장의  $\alpha$ -디펜신으로부터 가장 먼저 분리된 것으로 세분화될 수 있다.  $\beta$ -디펜신(DEFBn)은 피부(skin), 눈(eye), 중이(middle ear), 입(mouth), 기관(trachea), 폐(lung), 위장관(gastrointestinal tract), 간(liver), 비뇨생식계(urogenital system), 신장(kidney), 질(vagina), 췌장(pancreas) 및 유선(mammary gland)을 포함하는 다양한 조직 및 기관의 상피세포(epithelial cell)에 의해 주로 생산된다. 인간  $\beta$ -디펜신 계열의 가장 특성화된 군은 hBD1-4이다. 인간 디펜신의 일부는 구조적으로 생산되는 반면에, 다른 것은 전-염증성(pro-inflammatory) 사이토카인 또는 외인성(exogenous)의 미생물의 산물에 의해 유도된다. 인간 디펜신의 일부는 이미 자궁(womb) 내 태아를 보호하면서, 재태 기간(gestational age)에 따라 증가한 수준으로 양수(amniotic fluid) 내에서 발현된다. 모유(breast milk) 및 특히 초기 우유(first milk), 초유(colostrums)는  $\alpha$ - 및  $\beta$ -디펜신을 모두 포함하지만, 단지 그들 중 극히 일부만이 모체 우유(maternal milk)에서 상당한 농도로 발견된다(Armogida et al., 2004).

[0010] Liu et al. (2008)은 백혈구(leucocyte)에 의해 생산되고 혈액 내  $\alpha$ -디펜신의 아족(subgroup)에 속하는, HNP-1 및 HNP-2 모두, 고전 인슐린(classical insulin)의 신호전달 경로와 명확히 다른 세포 내 메커니즘을 통해 분리된 간세포/hepatocyte)에서 글리코겐 분해(glycogenolysis) 및 포도당 신생합성(gluconeogenesis)을 억제할 수 있다는 것을 밝혀냈다.

### 발명의 내용

#### 발명의 요약

본 발명은 경구 투여된, 포유 동물의, 장의  $\alpha$ - 및  $\beta$ -디펜신이, 고지방 식이를 먹인 마우스의 장 내 정상의 미생물 조성물을 유지하는 능력을 가짐을 입증한다. 실시예에서 상기 데이터는 포유 동물의  $\alpha$ - 및/또는  $\beta$ -디펜신이 장내 불균형(dysbiotic)한 미생물을 안정화 또는 정상화시키는 결과를 야기한다는 것을 입증한다. 따라서 디펜신은 결장직장암, 내분비선(endocrine), 영양(nutritional), 대사(metabolic) 또는 심장혈관계 질환(cardiovascular disease)의 치료 또는 예방 또는 육류 생산에서 린 성장 촉진제(lean growth promoter)로 유용하다.

실시예 1 및 3에서 입증된 바와 같이, 인간 알파-디펜신 5(HD5) 또는 인간 베타-디펜신 2(hBD2)의 경구 용량(oral dosage)은 고지방 식이로 유지된 마우스에서 체중 증가를 방지 또는 감소시킨다. 동물 모델은 대사 증후군 및 초기의 제2형 당뇨병의 모델이다. 치료받지 않은 경우, 고지방 식이를 먹인 마우스는 지방, 특히 복부 지방(abdominal fat) 및 간 지방을 축적함으로써 비만을 발생한다. 상기 마우스는 인슐린 저항성, 및 손상된 포도당 내성(glucose tolerance)과 같은, 당뇨병의 징후를 추가로 발생한다.

식이 내 HD5 또는 hBD2가 없는 경우 동물은 고지방 식이로 상당히 더 많은 체중을 증가하고 결국 당뇨병 및 비만의 징후가 발생한다. 감소된 체중 증가는 지방량의 축적의 감소로 발생하였다. HD5 또는 hBD2의 용량을 투여 받은 동물은 고-지방 식이에서 비-처리된 동물과 비교하여 증가된 포도당 내성 및 감소된 인슐린 저항성을 나타낸다.

유사하게도, 상기 실시예는 장내 불균형의 미생물상(microflora)을 지닌 동물에 HD5의 경구 투여는 적어도 미생물상을 부분적으로 입증한다. 따라서, HD5 및 다른 디펜신은 장내 불균형의 미생물상의 정상화 또는 미생물상의 정상화를 위해 사용될 수 있다. 고 지방 식이 및 높은 당 함량은 장내 불균형의 미생물상을 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서 디펜신은 상기 장내 불균형의 미생물상을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 디펜신은 또한 미생물에 부정적으로 영향을 줄 것으로 예상되는 치료, 예를 들어 항생제 치료, 면역 억제 치료, 화학 요법, 면역 요법, 또는 방사선 요법을 받은 대상체를 위해 예방적으로 사용될 수 있다.

[0016] 하나의 실시 양태는 비-인간 동물 내 장의 염증의 치료를 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ - 및/또는  $\beta$ -디펜신의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다.

[0017] 하나의 실시 양태는 인간 내 장의 염증의 치료를 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ - 및/또는  $\beta$ -디펜신의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다.

[0018] 하나의 실시 양태는 장 염증을 치료하기 위한 방법과 관련이 있고, 상기 염증은 동물의 구강(mouth), 식도(oesophagus), 위(stomach), 십이지장(duodenum), 공장(jejunum), 회장(ileum), 맹장(cecum), 직장(rectum), 및/또는 항문관(anal canal)에 위치되고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ - 및/또는  $\beta$ -디펜신의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다.

[0019] 하나의 실시 양태는 장내 정상적인 미생물 조성물을 유지하는 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유

동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(glucagon-like-peptide 1 (GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다.

[0020] 하나의 실시 양태는 장내 불균형한 미생물의 치료를 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다.

[0021] 하나의 실시 양태는 장내 미생물의 유전자 풍부도를 증가시키기 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량의 투여를 포함한다.

[0022] 하나의 실시 양태는 장내 미생물의 족(phylae)의 수를 증가시키기 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량의 투여를 포함한다.

[0023] 하나의 실시 양태는 장내 미생물에서 짧은 지방산(short fatty acid)의 생산을 증가시키기 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량의 투여를 포함한다.

[0024] 하나의 실시 양태는 장내 미생물의 부티레이트(butyrate)의 생산을 증가시키거나 또는 아세테이트(acetate)의 생산을 감소시키는 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량의 투여를 포함한다.

[0025] 하나의 실시 양태는 장 내 박테리오아이데테스(*Bacteroidetes*), 페칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 로세부리아(*Roseburia*), 블라우티아(*Blautia*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 메타노브레비박터(*Methanobrevibacter*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 코프로코쿠스(*Coprococcus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 알로바쿨룸(*Allobaculum*), 알로프레보텔라(*Alloprevotella*), 아커만시아(*Akkermansia*), 유박테리움(*Eubacterium*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 속(genus)에 속하는 박테리아의 수를 증가시키기 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량의 투여를 포함한다. 바람직하게는, 상기 박테리움(*bacterium*)의 속은 하나 또는 그 이상의 알로프레보텔라(*Alloprevotella*), 아커만시아(*Akkermansia*), 및 락토바실러스(*Lactobacillus*)를 포함한다.

[0026] 하나의 실시 양태는 장 내 박테리오아이데테스 *프라질리스*(*Bacteroidetes fragilis*), 수투렐라 와즈워티아(*Sutturella wadsworthia*), 베일로넬라 파볼라(*Veillonella parvula*), 에스케리키 콜라이(*Escherichi coli*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 푸소박테리움 누클리아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corodens*), 게멜라 모리빌룸(*Gemella morbillum*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 박테리아의 수를 감소시키는 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량의 투여를 포함한다.

[0027] 하나의 실시 양태는 결장직장암(colorectal cancer), 내분비(endocrine), 영양(nutritional), 대사(metabolic) 또는 심장혈관계 질환(cardiovascular disease)의 치료를 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다. 디펜신은 비만 및 제2형 당뇨병의 다양한 증상을 치료하기 위해 사용될 수 있고, 미생물상을 정상화하기 위해 사용될 수 있으므로, 상기 디펜신은 또한 하나 또는 그 이상의 언급된 장애에 걸리는 위험도를 감소시킬 수 있다.

[0028] 하나의 실시 양태는 동물 육류 생산에서 린 성장의 촉진을 위한 방법과 관련이 있고, 상기 방법은 디펜신, 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 글루카곤-유사-펩타이드 1(GLP-1)/GLP-1 유사체의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다. 이러한 실시 양태는 비만 마우스로 HD5 또는 hBD2의 투여는 지방의 퍼센트 백분율의 감소를 유도, 즉 상기 디펜신은 지방 성장보다 린 성장을 선호한다는 것의 입증에 의해 확인된다.

[0029] 하나의 실시 양태는 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금의  $\alpha$ -디펜신 및 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금의  $\beta$ -디펜신을 포함하는 조성물과 관련이 있다.

[0030] 하나의 실시 양태는 인슐린/인슐린 유사체(insulin/insulin analog) 및/또는 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-

1)/GLP-1 유사체 및/또는 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)/GLP-2 유사체 및/또는 디펩티딜 펩티다이제 IV(dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)) 억제제 및/또는 메트포르민(metformin) 및/또는 나트륨 글루코스 트랜스포터-2(sodium glucose transporter-2 (SGLT-2)) 억제제 및/또는 글루카곤 수용체 길항제(antagonist) 및/또는 일시적인 수용체 전위 양이온 채널 아파 V 멤버 1(transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)) 길항제 또는 이들의 조합물의 조합으로 적어도 하나의 포유 동물의 α- 또는 β-디펜신을 포함하는 조성물과 관련이 있다. 하나의 실시 양태에서 상기 디펜신은 HD5 또는 hBD-2이다.

[0031] 하나의 실시 양태는 화학 요법, 면역 요법, 방사선 요법 또는 이들의 조합물과 조합으로 사용하기 위한 적어도 하나의 포유 동물의 α- 또는 β-디펜신을 포함하는 조성물과 관련이 있다. 하나의 실시 양태에서 상기 디펜신은 HD5 또는 hBD-2이고, 바람직하게는 상기 디펜신은 경구로 투여된다.

[0032] 인간 베타-디펜신 2를 포함하는, 디펜신은 강한 항-염증성 약제라고 당해 기술분야에 알려져있다. 본 발명자들은 경구로 투여된 인간 베타-디펜신 2의 항-비만 및 항-당뇨 효과를 입증하였다. 다른 장내 호르몬, GLP-1, 및 리라글루ти드(Liraglutide)와 같은 GLP-1 유사체는 또한 비만 및 당뇨병을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명자들은 실시예 4에서 비경구(parenterally) 투여된 리라글루ти드가 다양한 염증성 및 항-염증성 사이토카인에 영향을 미치지 않는다는 것을 입증한다. 따라서, GLP-1 및 GLP-1 유사체는 디펜신과 비교하여 상이한 작용 방식을 가진다. 따라서, 본 발명자들은 본원에서 기술된 적응증(indication)를 치료하기 위한 적어도 하나의 GLP-1 또는 GLP-1 유사체와 적어도 하나의 디펜신의 조합물을 투여하는 것을 고안한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1A. 마우스 대사작용에 포유 동물의 알파 및/또는 베타 디펜신의 효과를 조사하기 위한 실험 설정의 도식적인 개요. -1주째에, C57/BL/6J 마우스는 그룹 및 케이지로 나뉘어졌고, 케이지 당 3마리 마우스 및 그룹당 케이지들이 있었다. -1주째 내지 0주째에, 마우스는 지방 분포를 추정하기 위하여 자기 공명 주사(magnetic resonance scan)에 의하여 임상적으로 검사되었다. 0, 1, 및 4주째에 배설물의 미생물은 분석되었다. 4주째에, 미생물의 분석에 추가하여, 마우스는 스캔(san)되었고 혈당 및 인슐린은 측정되었다. 6주째에, 에너지 소비량은 배설물의 질소 및 지질 함량을 분석하여 평가되었다. 7주째에, 인슐린 내성 검사(ITT)는 수행되었다. 8주째에, 경구 포도당 내성 검사(oral glucose tolerance test (OGTT)) 및 포도당-자극 인슐린 분비(GSIS)는 수행되었다. 9주째(종료)에, 여러 분석은 수행되었고, 특히 마우스는 체중 측정 및 스캔되었고, 결장, 맹장 및 소장의 혈장 조성 및 미생물 조성을 평가되었다. 또한, 조직학적 분석 및 단백질/RNA 분석은 근육 조직(대퇴사두근(quadriceps)), iWAT, eWAT, iBAT, 간, 결장, 공장, 회장 및 십이지장에 대해 수행되었다.

도 1B. 마우스 대사작용에 포유 동물의 알파 및/또는 베타 디펜신의 효과를 조사하기 위한 실험 설정의 도식적인 개요. -1주째에, C57/BL/6J 마우스가 도착하였다. 0주째에 배설물은 수집되었다. 0주째 내지 12주째에 런-in(run-in)하는 동안 상기 마우스는 고지방 식이가 제공되었다. 12주째에 상기 마우스는 지방 분포를 측정하기 위해 자기 공명 스캔에 의해 임상적으로 검사되었고, 배설물은 수집되었고 경구 포도당 내성 테스트(OGTT) 및 포도당-자극 인슐린 분비(GSIS)가 수행되었다. 13-0주째에 상기 마우스는 케이지 당 4마리의 마우스 및 그룹 당 3개의 케이지로써 그룹 및 케이지로 분리되었다. 0, 12 및 13-10주째에, 상기 배설물의 미생물은 분석되었다. 13-2, 13-4, 13-6, 13-8 및 13-10주째에 상기 마우스는 스캔되었고 혈당 및 인슐린 수준은 측정되었다. 13-9주째에, 인슐린 내성 테스트(ITT)가 수행되었다. 13-10주째(종료)에, 여러 분석은 수행되었고, 특히 상기 마우스는 체중 측정 및 스캔되었고, 결장, 맹장 및 소장의 혈장 조성 및 미생물 조성을 평가되었다. 또한, iWAT, eWAT 및 간 중량은 측정되었다.

도 2. 인간 베타 디펜신 1-4의 클러스탈(Clustal) W (2.1) 다중 서열 정렬.

도 3. 인간 알파 디펜신 5 및 6의 클러스탈 W (2.1) 다중 서열 정렬.

도 4. 인간 호중구(neutrophil) 펩타이드 1-3의 클러스탈 W (2.1) 다중 서열 정렬.

도 5. 인간, 히말라야 원숭이(Rhesus macaque), 침팬지(chimpanzee) 및 오랑우탄(orangutan) 베타 디펜신 2의 클러스탈 W (2.1) 다중 서열 정렬.

클러스탈 W 정렬에서:

\* 단일의, 완전히 보존된 잔기를 갖는 위치를 나타낸다.

: 하기의 '강력한' 그룹 중 하나는 완전히 보존되어있음을 나타낸다:

-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.

- 하기의 '약한' 그룹 중 하나는 완전히 보존되어있음을 나타낸다:

-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.

도 6. 저지방 식이(LFD), 고지방 식이(HFD) 또는 HFD 및 디펜신 hBD2 (HFD + P2)를 마우스에 처리 후 7주째부터의 체중 변화(A) 및 체중 증가(B) 및 누적된 사료 섭취량(C).

A: 체중 변화. N=12. HFD 둘 모두 LFD 참조 그룹과 유의하게 상이하다. 별표는 HFD와 HFD + P2의 차이점을 나타낸다. HFD 둘 모두 w 주부터 LFD와 유의하게 상이하다( $p<0.001$ ). 2-방향 분산분석(ANOVA). 터키 포스트 테스트 (Tukey Post test).

B: 체중 증가. N=12. HFD 둘 모두 LFD 참조 그룹과 유의하게 상이하다. 별표는 HFD와 HFD + P2의 차이점을 나타낸다. HFD 둘 모두 w 주부터 LFD와 유의하게 상이하다( $p<0.001$ ). 2-방향 분산분석. 터키 포스트 테스트.

C: 누적된 사료 섭취량. LFD 참조 그룹은 HFD 그룹과 비교하여 사료 1g 당 수크로스 및 단백질의 동일한 양을 가지고 있다.

도 7. 저지방 식이(LFD), 고지방 식이(HFD) 또는 HFD 및 디펜신 hBD2 (HFD + P2)를 마우스에 처리 후 7주째부터의 제지방/지방량의 증가. (A) 1주째 및 7주째에 제지방량의 증가. (B) 1주째 및 7주째에 지방량의 증가. A: -1주째 및 7주째 제지방량. N=12. 1-방향 분산분석. 터키 포스트 테스트. B: -1주째 및 7주째 지방량. N=12. 1-방향 분산분석. 터키 포스트 테스트.

도 8. 저지방 식이(LFD), 고지방 식이(HFD) 또는 HFD 및 디펜신 hBD2 (HFD + P2)를 마우스에 처리 후 7주 동안 치료된 마우스에서 포도당 항상성(glucose homeostasis). (A) 인슐린 내성 테스트 (ITT). (B) 경구 포도당 내성 테스트. (C) 포도당 자극 인슐린 분비 (GSIS). (D) 5시간의 공복 인슐린 테스트.

A: 식이 개시 후 7주째 인슐린 내성 테스트. 그룹 당 N=6. HFD는 LFD 참조 그룹과 비교된다. 통계적으로 유의한 변화만이 나타낸다. 상단 곡선 위의 별표는 HFD와 LFD의 차이를 나타낸다.

B: 식이 개시 후 7주째 포도당 내성 테스트. 그룹 당 N=11-12. HFD는 LFD 참조 그룹과 비교된다. 통계적으로 유의한 변화만이 나타낸다. 상단 곡선 위의 별표는 HFD와 LFD의 차이를 나타내고 중간 곡선 아래의 별표는 HFD + P2와 LFD의 차이를 나타낸다.

C: 식이 개시 후 포도당 자극 인슐린 분비 (GTT 기간 중). 그룹 당 N=11-12. HFD는 LFD 참조 그룹과 비교된다. 통계적으로 유의한 변화만이 나타낸다. 상단 곡선 위의 별표는 HFD와 LFD의 차이를 나타낸다. HFD + P2와 LFD는 임의의 시점에서 고정적으로 유의하지 않다.

D: 식이 개시 후 7주째 5시간 공복의 인슐린. 그룹 당 N=11-12.

A-C: 2-방향 분산분석, 던네트 포스트 테스트(Dunnett post test). D: 1-방향 분산분석, 터키 포스트 테스트.

도 9A, 9B 및 9C. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(고지방 + hBD-2)로 예방 치료한 마우스의 10주 동안의 처리 후 체중 증가(a) 사료 효율(b) 및 에너지 섭취량(c).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

9A. 체중 증가. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석 (누적된 일치 값)

9B. 사료 효율 (케이지에서 평균 음식 섭취량으로 조정된 증량된 그램). 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석 보정 NB! 공동-케이지에 기인한 n=4.

9C. 에너지 섭취량. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석 (누적된 일치 값)

도 10A, 10B 및 10C. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(hBD-2)로 예방 치료된 마우스에 10주 동안 처리된 총 체중의 비율로서의 지방(a), 간 중량(b) 및 부고환(epididymal) 지방의 중량(eWAT) 그램(c).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

10A. 상이한 주 간 총 체중의 지방 비율. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값)

10B. 종료 시 부고환 지방 조작(내장 AT)의 중량. 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

10C. 종료 시 중량. 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

도 11A 및 11B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(고지방 + hBD-2)의 예방 치료로 10주 동안 처리된 마우스의 포도당 항상성. (a) 경구 포도당 내성 검사. (b) 포도당 자극 인슐린 분비(GSIS).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

11A. 7주째의 경구 포도당 내성 테스트. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

11B. oGTT 동안 투여된 7주째의 포도당-자극 인슐린 분비. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

도 12A 및 12B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(고지방 + hBD-2)의 예방 치료로 10주 동안 처리된 마우스의 포도당 항상성. (a) 인슐린 내성 테스트(ITT). (b) HOMA-IR.

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

12a. 8주째의 인슐린 내성 테스트. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

12b. 9주째의 항상성 모형 평가(Homeostasis Model Assesment (HOMA)). 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

도 13A 및 13B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(고지방 + hBD-2)로 중재 치료된 마우스에 10주 동안의 치료에서 체중 증가(a) 및 체중 변화(b).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

13A. 체중 증가. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

13B. 런-인 기간(run-in period)의 종료 시 13주째 및 하기의 실험적인 식이 후 10주째부터의 체중 변화. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

도 14A 및 14B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(hBD-2)로 중재 치료된 마우스에 10주 동안의 치료에서 총 체중의 비율로서의 지방(a), 0-4주째부터의 1그램 당 지방%의 변화(b).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

14A. 상이한 주에 총 체중의 지방 비율. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

14B. 런-인의 종료 및 실험적인 식이 후 4주째부터 지방 비율의 변화. 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

도 15A 및 15B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(hBD-2)로 중재 치료된 마우스에 10주 동안의 치료에서 그램 당 간 중량(a) 및 그램 당 부고환 지방의 중량(eWAT).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

도 16A, 16B 및 16C. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 hBD2(고지방 + hBD-2)의 중재 치료로 10주 동안 처리된 마우스 내 포도당 항상성. (a) 케이지 1로부터 경구 포도당 내성 테스트. (b) 마우스 D1로부터 경구 포도당 내성 테스트. (c) 인슐린 내성 테스트(ITT).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

16A. 고지방 + hBD-2 그룹의 제 1의 케이지를 보여주는 런-인 기간의 종료(13-0주째)로부터 격주로 반복된 경구 포도당 내성 테스트.

16B. 고지방 + hBD-2 그룹의 유일한 마우스 D1을 보여주는 런-인 기간의 종료(13-0주째)로부터 격주로 반복된 경구 포도당 내성 테스트.

16C. 9주째의 인슐린 내성 테스트. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

도 17A, 17B 및 17C. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 HD5 (고지방

+HD5)의 예방 치료를 받은 마우스의 10주의 치료 동안 체중의 증가(a) 사료 효율(b) 및 에너지 섭취량(c).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

17A. 체중 증가. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

17B. 사료 효율(케이지 내 평균 음식 섭취량으로 조정된 증량된 그램). 공동-케이지에 기인한 1-방향 분산분석 터키 보정 NB! n=4.

17C. 에너지 섭취량. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

도18A. 18B 및 18C. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 HD5(HD5)로 예방 치료된 마우스의 10주 동안의 치료에서 총 체중의 비율로서의 지방(a), 그램 당 간 중량(b) 및 그램 당 부고환 지방의 중량(eWAT) (c).

18A. 상이한 주 동안 총 체중의 지방 비율. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

18B. 종료 시 간의 중량. 1-방향 분산분석터키 보정.

18C. 종료 시 부고환 지방 조직(내장 AT)의 중량. 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

도 19A 및 19B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 HD5(고지방 + HD5)의 예방 치료로 10주 동안 치료된 마우스 내 포도당 항상성. (a) 경구 포도당 내성 테스트. (b) 포도당 자극 인슐린 분비 (GSIS).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

19A. 7주째의 경구 포도당 내성 테스트. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

19B. oGTT 동안 투여된 7주째의 포도당 자극 인슐린 분비. 터키 보정된 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

도 20A 및 20B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 HD5(고지방 + HD5)의 예방 치료로 10주 동안 치료된 마우스 내 포도당 항상성. (a) 인슐린 내성 테스트(ITT). (b) HOMA-IR.

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

20A. 8주째의 인슐린 내성 테스트. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

20B. 9주째의 항상성 모형 평가(HOMA). 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

도 21A 및 21B. 도면은 실시예 1에서 4가지 치료법: HD5를 포함한 고지방 식이 - HF HD5; hBD2를 포함한 고지방 식이 - HD hBD2; 고지방 식이 - 무처리 : HF; 저지방 식이: LF 에 대한 1주째(Wk1)부터 10주째(Wk10)의 변화를 보여준다.

1주째(21A) 및 10주째(21B)에 미생물의 가중치 단일 분석(weighted unifrac analysis) 즉 박테리아 종의 상대적인 풍부도. HFD에 HD5를 더하여 먹인 마우스로부터의 미생물은 LFD를 먹인 마우스의 박테리아 군집 즉 미생물의 정상화에 점진적으로 접근하였다. 약어: Wk 1 - 1주; W10 - 10주.

도 21C. 변화에 기여하는 미생물의 종의 도면. 미생물의 변화는 주로 알로바쿨룸(Allobaculum) 및 락토바실러스(Lactobacillus)의 증가된 풍부도 및 클로스트리디움(Clostridium)의 풍부도의 감소에 의해 주로 유도되었다. 알로바쿨룸(Allobaculum)은 짧은 사슬 지방산 생성하는 종이다. 락토바실러스(Lactobacillus)는 항염증 작용을 하는 박테리아이다.

도 22A 및 22B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 H5(고지방 + HD5)로 중재 치료한 마우스의 10주 동안의 치료에서 체중 증가(a) 및 체중 변화(b).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

22A. 체중 증가. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

22B. 런-인 기간의 종료 시 13주째부터 체중 변화 및 실험적인 식이에서 하기의 10주. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

도23A 및 도23B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 HD5(HD-5)의 중재 치

료로 마우스의 10주 동안의 치료에서 총 체중의 비율로서 지방(a) 및 그램 당 0-4주부터 지방%의 변화.

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

23A. 상이한 주에 총 체중의 지방 비율. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

23B. 런-인 종료시 및 실험적인 식이 4주째로부터 지방 비율의 변화. 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

도 24A 및 24B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이 및 디펜신 HD5(HD-5)로 중재 치료된 마우스의 10주 동안의 치료에 그램 당 간 중량(a) 및 그램 당 부고환 지방의 중량(eWAT)(b).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

24A. 종료 시 간 중량. 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

24B. 종료 시 부고환 지방 조직(내장 AT)의 중량. 터키 보정을 사용한 1-방향 분산분석.

도 25A 및 25B. 저지방 식이(저지방), 고지방 식이(고지방) 또는 고지방 식이와 디펜신 HD5 (고지방 + HD5)의 중재 치료로 10주 동안 치료된 마우스 내 포도당 항상성. (a) 케이지로부터 경구 포도당 내성 테스트. (b) 인슐린 내성 테스트(ITT).

의미: 저지방 vs. 고지방 = A; 저지방 vs. 고지방 + hBD-2 = B; 고지방 vs. 고지방 + hBD-2 = C.

25A. 고지방 + HD-5 그룹의 제2의 케이제를 보여주는 런-인 기간 종료(13-0주째)로부터 격주로 반복된 경구 포도당 내성 테스트.

25B. 9주째의 인슐린 내성 테스트. 터키 보정을 사용한 2-방향 분산분석(누적된 일치값).

도 26. 마우스 내장 염증 및 미생물에 GLP-1 유사체(리라글루티드(Liraglutid))의 효과를 조사하기 위한 실험 설계의 도식적인 개요. -40주에, C57/Bl/6J DIO 마우스가 도착하였다. 마우스는 38주 동안 55 그램의 평균 체중을 달성하기 위하여 고지방 식이 60% 지방, SSNIFF (다이어트 #D12492) 또는 퓨리나 음식물을 섭취하였다. -2주부터 마우스는 단일로 수용되었다. 배설물 샘플은 16S RNA 분석을 위해 -1일째 및 27일째에 수집되었다. 장골 (ilium)로부터의 샘플은 28일째에 맹장(caecum)으로부터 2cm 수집되었다.

도 27A. 실시예 4로부터 미생물 분석의 결과. 마우스는 리라글루티드 또는 비히클(DIO 비히클)로 4주 동안 치료되었다.

-1일 및 28일째에 미생물의 비가중치 단일 분석(unweighted unifrac analysis)은 실험의 시작부터 종료시까지 2개의 치료 그룹의 미생물의 변화를 나타낸다. HFD에 리라글루티드를 더하여 먹인 마우스로부터의 미생물은 LFD를 먹인 마우스의 박테리아 군집에 점진적으로 접근하는 반면에, 마우스에 처리된 비히클의 미생물은 연구 동안 변하지 않았다.

도 27B. 추가된 미생물의 종과 함께하는 미생물의 변화. 상기 변화는 주로 아커만시아(*Akkermansia*) 및 알로프레보텔라(*Alloprevotella*)의 증가된 풍부도에 의해 유도되었다. 아커만시아는 짧은 사슬 지방산 생성하는 종이다.

도 28. 암컷 NMRI 마우스로 4 mg/kg hBD-2의 경구 투여 후 약물동태학적 데이터. Y축은  $\mu\text{g/g}$  조직 내 hBD2를 나타낸다. 결과는 그룹 평균 +/-SEM으로 주어진다.

도 29. 각각 1 mg/kg의 피하(subcutaneous(SC)) 투여 및 정맥 내(intravenous (IV)) 투여 후 hBD-2에 대한 약물 동력학적 데이터. Y축은 hBD2 ( $\mu\text{g/mL}$ )를 나타낸다. 상이한 곡선은 상이한 실험 및 검출 방법(HPLC 및 ELISA)을 나타낸다.

도 30. 각각 16.5 mg/kg의 피하 및 정맥 내 투여 후 "hBD-2-알부민 융합 N-말단"에 대한 약물 동력학적 데이터. Y축은 융합 단백질의 농도를  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타낸다. 결과는 4마리의 마우스/샘플링 시간 +/- SD의 평균값이다.

도 31. 각각 16.5 mg/kg의 피하 및 정맥 내 투여 후 "hBD-2-알부민 융합 C-말단"에 대한 약물 동력학적 데이터. Y축은 융합 단백질의 농도를  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타낸다. 결과는 4마리의 마우스/샘플링 시간 +/- SD의 평균값이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 정의

[0035]

디펜신(defensin): 본원에서 사용된 용어 "디펜신"은 항균 펩타이드의 디펜신 부류(class)에 속하는 것으로서 당해 기술분야의 통상의 기술자에 의해 알려진 폴리펩타이드를 말한다. 디펜신은 알파 디펜신 클래스 또는 베타 디펜신 클래스에 속한다. 디펜신의 예는 인간 장의 알파 디펜신 5(HD5; 서열번호 8); 인간 알파 디펜신 6(HD6; 서열번호 9); 인간 호중구 펩타이드 1(HNP-1); 인간 호중구 펩타이드 2(HNP-2); 인간 호중구 펩타이드 3(HNP-3); 알파 디펜신 클래스에 속하는 모든 것; 및 또한 인간 베타 디펜신 1(hBD1; 서열번호 4); 인간 베타 디펜신 2(hBD2; 서열번호 5), 인간 베타 디펜신 3(hBD3; 서열번호 6); 인간 베타 디펜신 4(hBD4; 서열번호 7), 침팬지 베타 디펜신 2(서열번호 10), 마카크(macaque) 베타 디펜신 2(서열번호 11), 오랑우탄 베타 디펜신 2(서열번호 3), 마우스 베타 디펜신 3(서열번호 12), 말 베타 디펜신 2(서열번호 13), 돼지(porcine) 베타 디펜신 1(서열번호 14), 염소 베타 디펜신 2(서열번호 15), 소(bovine) 베타 디펜신 2(서열번호 1), 닭 베타 디펜신 2(서열번호 2), 인간 LL37(서열번호 16), 인간 카텔리시딘(cathelicidin)으로부터 유래되고, 베타 디펜신 클래스에 속하는 절단된 hBD2(서열번호 17)를 포함한다. 디펜신은 글리코실화될 수 있고 디펜신은 더욱 작은 생물 활성 단편으로 단백질 가수 분해될 수 있다. 글리코실화된 디펜신 및 디펜신 단편은 또한 본 발명의 개시의 범위 내에 포함된다.

[0036]

디펜신은 전구체(precursor)로서 발현되고 신호 펩타이드의 절단에 의해 가공(processing)되며 또한 어떤 경우에는 세포 외 공간으로의 분비 전의 프로-펩타이드이다. 상기-동정된 서열은 예측된 성숙한 생물활성의 디펜신을 나타낸다. 공정은 세포마다 상이할 수 있고 분비된 성숙한 펩타이드의 결과는 예측된 서열로부터 하나 또는 2개의 C- 또는 N-말단 아미노산에 의해 상이할 수 있으며 여전히 이의 생물 활성을 유지할 수 있음을 당해 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 수 있다.

[0037]

장(gut): 장은 음식물을 소화 기관으로 이동시키기 위해 동물에 의해 사용되는 관(tube)이고, 소화기관 자체를 포함한다. 본원에서 사용된 인간의 장은 구강(mouth), 식도(oesophagus), 위(stomach), 십이지장(duodenum), 공장(jejunum), 회장(ileum), 맹장(cecum), 결장(colon), 직장(rectum), 및 항문관(anal canal)으로 이루어진 소화 시스템을 말한다. 어떤 구현에는 인간의 장의 부분 및 특히 구강, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 및 항문관을 말한다. 다른 구현에는 결장을 제외한 이들의 모든 부분을 말한다. 본원에서 언급된 반추 동물(ruminant)의 장은 구강, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 및 항문관으로 이루어진 장이지만, 위는 4개의 구획, 반추위(rumen), 별집위(reticulum), 중판위(omasum), 및 주름위(abomasum)로 분류되는 사실에 의해 특징지어진다. 본원에서 언급된 가금의 장은 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 및 항문관으로 이루어져 있지만, 위는 전위(proventriculus) 또는 실제의 위 및 모래주머니(gizzard)로 분류된다는 사실에 의해 특징지어진다. 어떤 경우에는, 작물(crop)이라 불리우는 식도를 따르는 근육 주머니(muscular pouch)가 존재한다.

[0038]

"글루카곤-유사 펩타이드-1('Glucagon-like peptide-1). GLP-1은 신경펩타이드(neuropeptide) 및 프로글루카곤(proglucagon) 유전자의 전사 산물로부터 유도된 인크레틴(incretin)이다. 말초(periphery) 내 GLP-1의 주요 공급원은 장 호르몬으로서 GLP-1을 분비하는, 창자(intestinal)의 L세포이다. GLP-1의 생물학적 활성 형태는: GLP-1-(7-37) 및 GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub>이다. 상기 펩타이드는 프로글루카곤 분자의 선택적인 절단에 기인한다.

[0039]

회장(ileal)의 L세포에 의한 GLP-1 분비는 소장의 내강(lumen) 내 영양소의 존재에 좌우된다. 상기 호르몬의 분비 촉진제(secretagogues)(분비를 유발하거나 또는 자극하는 제제)는 탄수화물, 단백질 및 지질과 같은 주요 영양소를 포함한다. 일단 혈액순환이 되면, GLP-1은 효소 디펩티딜 펩티다아제-4(dipeptidyl peptidase-4)에 의한 급속한 분해로 인해, 2분 미만의 반감기(half-life)를 가진다.

[0040]

GLP-1은 증가하는 포도당에 반응하여 호르몬 인슐린을 분비하는 췌장(pancreas)의  $\beta$  세포를 포함하는 반면에, 글루카곤 분비를 억제하는, 강한 항고혈당성(anti-hyperglycemic) 호르몬이다. 이러한 포도당-의존적인 작용은 혈장(plasma) 포도당 농도가 정상적인 공복시의 범위내 있을 때, 조절되지 않은 인슐린의 분비, 또는 불완전한-시기(poorly-timed)의 인슐린 주사는 혈당의 위험한 저하 - 저혈당(hypoglycaemia)을 유발시킬 수 있기 때문에 특히 흡인력이 있다. 이는 GLP-1은 혈당 수준이 공복시의 범위내 있을 때 더 이상  $\beta$ -세포를 자극하지 않기 때문에 GLP-1의 결과로 인해 발생하지 않는다. 또한, GLP-1은 위의 분비 및 운동성을 억제한다. 이는 탄수화물의 흡수를 지연시키고 연장(protract)시키며 포만 지수(satiating effect)에 기여한다.

[0041]

동일성(identity): 2개의 아미노산 서열 사이 또는 2개의 뉴클레오타이드 사이의 관련성은 매개변수 "동일성"에 의해 기술된다. 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성의 정도는 EMBOSS 패키지(Rice *et al.*, 2000, <http://emboss.org>), 특히 버전 3.0.0 또는 그 이상의 니들(Needle) 프로그램에서 실행된 니들만-분쉬 알고리즘(Needleman-Wunsch algorithm)(Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453)을 사용하여 결정된

다. 사용된 선택적인 매개변수는 10의 갭 시작 벌점(gap open penalty), 0.5의 갭 확장 벌점(gap extension penalty), 및 EBLOSUM62 (BLOSUM62의 EMBOSS 버전) 치환 행렬(substitution matrix)이다. 니들(Needle)로 표시된 "가장 긴 동일성(longest identity)"(짧지 않은 옵션-을 사용하여 수득된)의 산물은 백분율의 동일성으로서 사용되고 하기와 같이 계산된다:

- [0042] 린 성장 촉진(Lean growth promotion): 본원에서 사용된 용어 "린 성장 촉진(promotion)" 또는 "린 성장 증진(enhancement)"은 빠르지만 체질량의 린 증가가 목적인 육류 생산 산업에서 가축 또는 애완용 동물 예를 들어 소, 돼지, 양, 염소, 말, 오리, 거위, 비둘기, 칠면조(turkey), 메추라기(quail) 및 닭의 사료급여(feeding)를 말한다.
- [0043] 가축: 소, 말, 가금, 및 유사한 동물이 가정 내 사용을 위해 관리된다.
- [0044] 정상의 미생물: 본원에서 사용된 용어 "정상의 미생물"은 장내 불균형이 아닌 미생물을 나타낸다. 정상의 미생물은 다양한 유전자 및 족(phylae)의 풍부도를 가짐으로써 특징지어진다. 정상의 미생물은 속 박테리오아이데테스(*Bacteroidetes*), 페칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 로세부리아(*Roseburia*), 블라우티아(*Blautia*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 코프로코쿠스(*Coprococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 메타노브레비박터(*Methanobrevibacter*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 코프로코쿠스(*Coprococcus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 아커만시아(*Akkermansia*), 유박테리움(*Eubacterium*)에 속하는 박테리아를 포함함으로써 특징지어진다.
- [0045] 치료: 본원에서 사용된 용어 "치료" 및 "치료하는"은 상태(condition), 질환(disease) 또는 장애(disorder)를 제거(combatting)하는 목적을 위한 환자의 관리(management) 및 보호(care)를 말한다. 상기 용어는 증상 또는 합병증을 경감시키거나 또는 완화시키는 것; 상태, 질환 또는 장애의 진행을 지연시키는 것; 상태, 질환 또는 장애를 치유하거나 또는 제거시키는 것; 및/또는 상태, 질환 또는 장애를 예방하는 것의 목적을 위한 활성화된 화합물의 투여와 같이, 환자가 고통받는 것으로부터 주어진 상태에 대한 치료의 전체 스펙트럼을 포함하도록 의도되고, 상기 "예방하는" 또는 "예방"은 상태, 질환 또는 장애의 발생을 방해, 감소 또는 지연시키는 목적을 위한 환자의 관리 및 보호를 말하는 것으로 이해되고, 증상 또는 합병증의 개시의 위험도를 예방하거나 또는 감소시키는 활성화된 화합물의 투여를 포함한다. 치료되는 환자는 바람직하게는 포유 동물, 특히 인간이다. 치료되는 환자는 다양한 연령대가 될 수 있다.
- [0046] 대상체(subject), 환자: 대상체는 본원에서 개시된 포유동물 또는 가금의 종의 하나인 개체이다. 환자는 특정한 장애로 진단된, 대상체이다.
- [0047] **포유 동물 및 가금 알파 디펜신 및 포유 동물 및 가금 베타 디펜신**
- [0048] 상기 개시는 장 염증, 또는 결장직장암, 또는 내분비, 영양, 대사 또는 심장혈관계 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 본원에 개시된 적응증의 치료에 있어서 디펜신, 포유 동물 및 가금 알파 및/또는 베타 디펜신, 예를 들어 소(bovine), 돼지(porcine), 양, 마우스, 원숭이, 말 및 가금 예를 들어 닭, 칠면조, 오리, 거위, 메추라기, 비둘기 마우스, 원숭이 또는 인간 베타 디펜신, 보다 바람직하게는 사람과(Hominidae), 보다 바람직하게는 인간 알파 및/또는 베타 디펜신의 사용과 관련이 있다.
- [0049] 카텔리시딘(cathelicidin)의 LL37 단편은 또한 개시된 것에 따른 용도를 위해 고려된다. LL37은 서열번호 16의 서열을 가진다.
- [0050] 특히 바람직한 구현예에 따르면, 상기 디펜신은 알파 또는 베타 디펜신이다.
- [0051] 하나의 구현예에서, LL37, 포유 동물의 알파 및/또는 베타 디펜신은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 및/또는 서열번호 17의 임의의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 동일성의 정도를 가진다. 또 다른 구현예에서, 디펜신은 서열번호 1-17의 하나와 10 미만, 예를 들어 8 미만, 예를 들어 5 미만, 예를 들어 4 미만, 예를 들어 3 미만, 예를 들어 2 미만의 아미노산으로 상이하다.
- [0052] 바람직한 구현예에서, 인간 알파 디펜신은 알파 디펜신 5(서열번호 8) 및/또는 알파 디펜신 6(서열번호 9)으로 이루어진다. 바람직한 구현예에서, 포유 동물 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 1(서열번호 4), 인간 베타 디펜신 2(서열번호 5), 인간 베타 디펜신 3(서열번호 6), 인간 베타 디펜신 4(서열번호 7), 및/또는 절단된 인간 베타 디펜신 2(서열번호 17)로 이루어진다.

- [0053] 바람직한 구현예에서, 인간 알파 디펜신은 서열번호 8의 아미노산 서열에 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 동일성의 정도를 가진다. 바람직한 구현예에서, 인간 포유 동물 알파 디펜신은 알파 디펜신 5(서열번호 8)로 이루어진다. 바람직한 구현예에서, 인간 베타 디펜신은 서열번호 5의 아미노산 서열에 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 동일성의 정도를 가진다. 바람직한 구현예에서, 인간 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 2(서열번호 5)로 이루어진다. 또 다른 바람직한 인간 베타 디펜신은 절단된 인간 베타 디펜신 2(서열번호 17)이다. 절단된 hBD2(서열번호 17)은 hBD2(서열번호 5)와 유사한 항-염증 효과를 가진다(WO 2013/026794).
- [0054] 인간 이외의 종의 경우, 대상체는 바람직하게는 동일 또는 관련된 종 또는 동일한 종으로부터의 디펜신(예를 들어 서열번호 1-3 및 10-15로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 디펜신)의 아미노산 서열에 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%를 공유하는 디펜신으로부터 유도된 디펜신으로 치료된다. 예를 들어, 가금은 동일 또는 또 다른 조류 종으로부터의 이종상동성(orthologous) 디펜신으로 치료될 수 있다고 생각될 수 있다.
- [0055] 여전히 또 다른 구현예에서, 포유 동물 알파 디펜신은 인간 알파 디펜신 및/또는 마우스 알파 디펜신, 및 이의 기능적으로 동등한 변이체를 포함한다. 바람직하게는, 포유 동물 알파 디펜신은 인간 알파 디펜신 5, 인간 알파 디펜신 6 및 이의 기능적으로 동등한 변이체로 이루어질 수 있는, 인간 알파 디펜신이다. 보다 바람직하게는, 포유 동물 알파 디펜신은 인간 알파 디펜신 5, 및 기능적으로 동등한 변이체 또는 이의 이종상동성으로 이루어진다.
- [0056] 여전히 추가의 구현예에서, 포유 동물의 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 및/또는 마우스 베타 디펜신, 및 이의 기능적으로 동등한 변이체로 이루어진다. 바람직하게는, 포유 동물 또는 가금 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 1, 인간 베타 디펜신 2 인간 베타 디펜신 3, 인간 베타 디펜신 4, 침팬지 베타 디펜신 2, 마카크 베타 디펜신 2, 및 마우스 베타 디펜신 3, 오랑우탄 베타 디펜신 2, 말 베타 디펜신 2, 돼지 베타 디펜신 2 및 이의 기능적으로 동등한 변이체로 이루어진다. 보다 바람직하게는, 포유 동물 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 1, 인간 베타 디펜신 2, 인간 베타 디펜신 3, 인간 베타 디펜신 4 및 이의 기능적으로 동등한 변이체를 포함한다. 보다 더욱 바람직하게는, 포유 동물 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 2, 및 이의 기능적으로 동등한 변이체 또는 이종상동성으로 이루어진다.
- [0057] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신의 유효량을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다. 다른 구현예에서, 제공된 방법은 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\beta$ -디펜신의 유효량을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다. 추가의 구현예에서, 제공된 방법은 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\beta$ -디펜신의 유효량을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체로의 투여를 포함한다. 바람직한 구현예는 포유 동물의 알파 디펜신 HD5 및/또는 포유 동물 베타 디펜신 hBD-2의 투여를 제공한다.
- [0058] 포유 동물(예: 인간) 또는 가금 알파 또는 베타 디펜신의 "기능적으로 동등한 변이체"는 모체 포유 동물(예: 인간) 또는 가금 알파 및/또는 베타 디펜신으로서 장 내 미생물에 대략적으로 동일한 효과를 보이는 변경된 포유 동물(예: 인간) 또는 가금 알파 또는 베타 디펜신이다. 포유 동물(예: 인간) 또는 가금 디펜신의 기능적으로 동등한 변이체는 포유 동물(예: 인간) 또는 가금 디펜신 아미노산 서열과 비교하여, 1-5 아미노산 변형, 바람직하게는 1-4 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 1-3 아미노산 변형, 가장 바람직하게는 1-2 아미노산 변형, 및 특히 하나의 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 베타 포유 동물 디펜신의 경우, 인간 베타 디펜신 2 와 비교하여, 서열번호 5를 가진다.
- [0059] 용어 "변형(modification)"은 본원에서 포유 동물(예: 인간) 또는 가금의 임의의 화학적 변형을 의미한다. 변형은 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입뿐만 아니라 아미노산 사슬의 대체; 또는 상기 아미노산 서열에 유사한 특성을 갖는 비천연 아미노산(unnatural amino acid)의 사용일 수 있다. 특히 변형은 C-말단의 아미드화(amidation)와 같은, 아미드화일 수 있다.
- [0060] 바람직하게는, 아미노산 변형은 폴리펩타이드의 접힘(folding) 및/또는 활성(activity); 단일 결실; 작은 아미노- 또는 카르복시-말단 연장; 또는 순전하(net charge)의 변화 또는 다른 기능, 예를 들어 폴리-히스티딘 태그, 항원성 에피토프 또는 결합 도메인에 의한 정제를 촉진하는 작은 연장에 유의하게 영향을 미치지 않는 보존적인 아미노산 치환 또는 삽입인, 사소한 특성이 있다. 하나의 구현예에서 작은 연장, 예를 들어 폴리-히스티딘 태그, 항원성 에피토프 또는 결합 도메인은 대략 20-25 잔기 이하의 작은 링커 펩타이드를 통한 포유 동물

또는 가금 알파 또는 베타 디펜신에 부착되고 상기 링커는 제한 효소 절단 부위를 함유할 수 있다. 도 2 내지 5의 클러스탈 W(Clustal W) 정렬은 아미노산 잔기가 단백질의 생물학적 활성에 실질적으로 영향을 주지 않으면서 치환될 수 있는지 예측하는 데 사용될 수 있다. 서열은 클러스탈 W 2.1(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) 및 하기의 설정: 캡 시작 벌점: 10, 캡 확장 벌점: 0.05, 중량 전환: NO, 단백질에 대한 친수성 잔기: GPSNDQE, 친수성 캡: YES, 중량 매트릭스: BLOSUM(단백질 용)을 사용하여 정렬된다. 하기의 그룹(클러스탈 W, '강한' 보존 그룹) 내 치환은 보존적인 치환으로 간주된다:

- [0061] -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.
- [0062] 하기의 그룹(클러스탈 W, '약한' 보존 그룹) 내 치환은 반-보존적인 치환으로 간주된다:
- [0063] -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.
- [0064] 보존적 치환의 예는 염기성 아미노산(아르기닌, 라이신 및 히스티딘), 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산), 극성 아미노산(글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산(류신, 이소류신 및 발린), 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신), 및 작은 아미노산(글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌 및 메티오닌)의 그룹 내 생성된 치환이다. 일반적으로 특정한 활성을 변화시키지 않는 아미노산 치환은 당해 기술분야에서 알려져 있고 예를 들어, Neurath and Hill (1979)에 기술되어 있다. 가장 일반적으로 발생하는 교환(exchange)은 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, and Asp/Gly이다.
- [0065] 20개의 표준 아미노산 이외에, 비-표준 아미노산(예를 들어 4-히드록시프롤린, 6-N-메틸라이신, 2-아미노이소부티르산, 이소발린, 및 알파-메틸 세린)은 야생형 폴리펩타이드의 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 제한된 수의 비-보존적인 아미노산, 유전적 암호에 의해 암호화되지 않는 아미노산, 및 비천연 아미노산은 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. "비천연 아미노산"은 단백질 합성 후 변형되고, 및/또는 표준 아미노산과 상이한 결사슬(side chain)의 화학 구조를 가진다. 비천연 아미노산은 화학적으로 합성될 수 있고, 바람직하게는 상업적으로 이용가능하며, 피페콜산(piperolic acid), 티아졸리딘 카르복실산(thiazolidine carboxylic acid), 디하이드로프롤린(dehydroproline), 3- 및 4-메틸프롤린(methylproline), 및 3,3-디메틸프롤린(dimethylproline)을 포함한다.
- [0066] 포유 동물 또는 가금 알파 및/또는 베타 디펜신의 필수 아미노산은 당해 기술분야에 알려진 절차, 예를 들어 부위-지정된 돌연변이 생성(mutagenesis) 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이 생성에 따라 동정될 수 있다(Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). 후자의 기술에서, 단일 알라닌 돌연변이는 분자 내 모든 잔기에 도입되고, 생성된 돌연변이 분자는 분자의 활성에 결정적인 아미노산 잔기를 동정하기 위한 생물학적 활성(즉, 염증성 장(bowel) 질환 및/또는 TNF-알파 활성의 억제)에 대해 시험된다. 또한, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708을 참조한다. 필수 아미노산의 동정은 또한 포유 동물 또는 가금 알파 및/또는 베타 디펜신과 관련된 폴리펩타이드와의 동일성 분석으로부터 추론될 수 있다(도 2 내지 5에서 클러스탈 W 정렬을 참조).
- [0067] 단일 또는 다중의 아미노산 치환은 돌연변이 생성, 재조합, 및/또는 셔플링(shuffling)의 공지된 방법을 사용하여 생성되고 테스트될 수 있고, Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; 또는 WO 95/22625에 개시된 것과 같은, 관련된 스크리닝 절차를 따르게 될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 방법은 실수 유발(error-prone) PCR, 파지 디스플레이(phage display)(예를 들어, Lowman *et al.*, 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; 미국 특허 제 5,223,409호; WO 92/06204), 및 부위-특이적 돌연변이 생성(Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46:145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7:127)을 포함한다.
- [0068] 주어진 치환의 결과가 확실하게 예측될 수 없는 경우, 유도체는 생물학적 활성의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 상기 본원에서 기술된 방법에 따라 용이하게 분석될 수 있다.
- [0069] 본원에 개시된 디펜신은 글리코실화(glycosylation)되는 대상체일 수 있다. 또한, 자연적으로 발생하는 디펜신은 단백질 분해 절차를 거친 대상체일 수 있고 더 작은 생물활성의 단편으로 절단될 수 있다고 당해 기술분야에 공지되어 있다. 글리코실화된 디펜신 및 디펜신의 생물활성 단편은 본 발명의 개시 내 포함된다.
- [0070] 또한 디펜신의 유도제(inducer)가 본 발명의 개시 범위 내 포함된다. 비타민 D 및 대장균 Nissle은 디펜신의 분비를 유도할 수 있고 이에 따라 본원에 기술된 적응증을 치료할 수 있는 것은 당해 기술분야에 공지되어 있다.

[0071] 알파 및 베타-디펜신의 조합

하나의 실시 양태에서 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및 적어도 하나의 포유 동물 및 가금  $\beta$ -디펜신을 포함하는 조성물이 제공된다. 실시예 1 및 3에서 입증된 바와 같이 알파 및 베타 디펜신은 경구 투여 될 수 있다. 예시적인 알파-디펜신, HD5는 특히 이소성 지질 축적을 감소시키고 예시적인 베타-디펜신, hBD2는 특히 글루코스 조절 경로를 개선시킨다. 따라서 알파 및 베타 디펜신의 조합은 특히 본원에 기술된 바와 같이 비만 및 내분비 적응증의 효과적인 치료를 유도할 수 있다.

[0073] 포유 동물  $\alpha$ -디펜신은 HD5 및 HD6로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 적어도 하나의 포유 동물  $\beta$ -디펜신은 hBD-1, hBD-2, hBD-3 및 hBD-4로부터 선택될 수 있다.

[0074] 바람직하게는, 조성물은 HD5 및 hBD-2를 포함한다.

[0075] 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제(excipient)를 추가로 포함할 수 있고 멸균되며 멸균 및 등장액으로서 제제화될 수 있다.

[0076] 알파 및 베타-디펜신의 비율은 임의의 양(ration)일 수 있다. 일부의 구현예에서, 조성물은 몰(molarity) 기준 또는 중량 기준 또는 mg/mL 기준으로 본질적으로 동일한 양의 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\beta$ -디펜신을 포함한다.

[0077] 장시간-작용하는 디펜신

[0078]  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신의 반감기는  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신을 다른 분자와 융합 또는 접합(conjugating) 즉,  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신과 동일한 방식으로 투여된  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신의 생체 내 혈장 반감기와 비교하여 실질적으로 증가된,  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신의 생체 내 혈장 반감기를 제공하는 약제학적으로 허용가능한 분자에 연결된 장시간 작용하는 생물학적 활성의  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신을 구성함으로써 연장될 수 있다.

[0079] 장시간 작용하는 생물학적 활성  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신은 포유 동물의 신생 포유 동물 Fc 수용체, 트랜스페린(transferrin) 또는  $\text{a CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ , 상기 n은 8 내지 22 또는 중합체와 결합하는 분자로부터 선택되는 약제학적으로 허용가능한 분자에 연결된 포유 동물  $\alpha$ -디펜신 또는 이의 유사체 또는 포유 동물  $\beta$ -디펜신 또는 이의 유사체를 포함한다.

[0080]  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신 작용제(agonist)는 또한 비-포유동물 기원일 수 있고, 작은 유기 분자, 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질로부터 선택될 수 있다.

[0081]  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신 작용제는 선행 기술 문헌에 기술된 바와 같이 다양한 방식, 예를 들어 화학적 커플링의 제한없이 이작용성 링커(bifunctional linker), N-말단 또는 C-말단의 디펜신, 예를 들어  $\alpha$ -디펜신 또는  $\beta$ -디펜신을 약제학적으로 허용가능한 분자, 예를 들어 알부민 또는 알부민 유사체에 커플링함으로써 기술적인 유전자를 통해, 약제학적으로 허용가능한 분자에 연결될 수 있다. 특히, N-말단의 알부민 또는 알부민 유사체, 예를 들어 인간 알부민은 C-말단의  $\alpha$ -디펜신 또는  $\beta$ -디펜신, 또는 N-말단의  $\alpha$ -디펜신 또는  $\beta$ -디펜신, 또는 C-말단의 알부민, 예를 들어 인간 알부민은  $\alpha$ -디펜신 또는  $\beta$ -디펜신의 C-말단, 또는 N-말단의  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신에 커플링될 수 있다. 링커 서열은 알부민과  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신 사슬 사이에 삽입될 수 있다.  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신 작용제는 안정한 링커 또는 보다 불안정한 링커를 통해 약제학적으로 허용가능한 분자에 연결될 수 있다. 이관능성 PEG 분자(예를 들어, Paige et.al Pharmaceutical Research, vol. 12, no. 12, 1995 참조), 가수분해성 링커(Shechter et al. Bioconjugate Chem. 2005, 16: 913- 920 and International Journal of Peptide Research and Therapeutics, Vol. 13, Nos. 1-2, June 2007 및 WO2009095479 참조), 예를 들어 WO2010092135에 참조된 PDPP 및 EMCH를 포함하는 다수의 링커가 당해 기술분야에 공지되어 있다.  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신 작용제의 화학적 접합(2개 또는 그 이상의 분자에 연결)이 약제학적으로 허용가능한 분자에 작용하는 특별한 경우에, 기능적인  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신 활성을 강하게 감소시키고, 바람직하게는 기능적인  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -디펜신 작용제를 방출할 수 있는 보다 불안정한(labile) 링커를 사용할 수 있다.

[0082] 반감기 연장은 스페이서(spacer), 예를 들어  $\gamma$ -L-글루타밀 스페이서 및 리신에 대한 C-18 지방 이산성(di-acid) 사슬을 지닌 펩타이드 골격의 아실화(acylation)을 통해 또한 이루어질 수 있다. 지방 이산성 부위 사슬 및 스페이서는 알부민에 강하지만 가역적인 결합을 매개하고, 주입 부위로부터의 방출을 늦추고 신장(renal) 제거를 감소시킨다.

[0083] 방법 및 용도

- [0084] 실시예 4에서 입증된 바와 같이, GLP-1 유사체인, 리라글루티드(liraglutid)의 투여는 고지방 식이를 먹인 비만 마우스 내 미생물상의 변화를 유도한다. 상기 변화는 특히 짧은 사슬 지방산의 생성을 선호하는 박테리아 종의 증가로 더욱 건강하거나 또는 정상적인 미생물상으로 향한다. 따라서, 본 발명자들은 장내 불균형한 미생물상의 치료와 GLP-1 또는 GLP-1 유사체의 투여에 의해 본원에 기술된 다른 용도를 고려한다.
- [0085] 바람직하게는, GLP-1 또는 GLP-1 유사체는 피하 또는 근육 내 투여를 통해 비경구적으로 투여된다. GLP-1 유사체는 엑세나타이드(exenatide), 리라글루타이드(liraglutide), 릭시세나타이드(lixisenatide), 알비글루타이드(albiglutide), 및 둘라글루타이드(dulaglutide)로부터 선택될 수 있다.
- [0086] 인간 알파 디펜신 5 및 인간 베타 디펜신 2는 장내 정상적인 미생물을 유지 또는 안정화시킬 수 있으며, 또한 장내 불균형한 미생물을 치료 또는 정상화할 수 있다; 이에 따라 결장직장암, 장 염증, 내분비, 영양, 대사, 또는 심혈관 질환의 치료를 위한 약제로서 또는 린 성장 촉진제로서 강력한 활성을 나타낸다. 따라서, 하나의 실시 양태는 유효량의 포유 동물  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 일반적으로 장내 염증의 치료 또는 결장직장암, 내분비, 영양, 대사 또는 심혈관 질환의 치료를 위한 방법을 제공한다. 상기 질환의 예는 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 대사 증후군, 전신 저등급 염증, 비만, 인슐린 저항성, 포도당 불내성 및 심혈관 질환이다.
- [0087] 특히, HD5 및 hBD2는 인슐린 저항성을 치료하고 인슐린 감수성 및 포도당 내성의 개선뿐만 아니라 비만의 치료 및 예방에 사용될 수 있다. HD5는 특히 이소성 지질 축적을 감소시킬 수 있는 반면 hBD2는 특히 당 조절 효능을 개선시킬 수 있다.
- [0088] 비만의 예방 또는 체중 감소의 유도 또는 체중 증가의 예방은 바람직하게는 내장 지방(visceral fat)의 축적의 감소 또는 예방, 지방 백분율의 증가의 감소 또는 예방, 또는 허리 둘레의 증가의 감소 또는 예방을 수반한다.
- [0089] 제공된 방법은 본원에 기술된 바와 같이 상기 조건(condition) 중 하나에 의해 영향을 받는 대상체의 장내 박테리아 군집의 구조 및 조성뿐만 아니라 전사 수준의 변화를 통해 박테리아 표현형을 변화시킴으로써 장 염증을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0090] 제공된 방법은 장내 미생물의 구조 및 조성을 변화시킴으로써 결장직장암, 내분비, 영양, 대사 또는 심장혈관계 질환을 치료할 수 있고, 따라서 대상체의 대사체(metabolome)는 본원에 기술된 바와 같은 상기 조건 중 하나에 의해 영향을 받는다.
- [0091] 하나의 실시 양태는 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 포유 동물  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신의 유효량을 투여함으로써, 인간의 장 염증의 치료를 위한 방법을 제공하고, 상기 염증은 동물의 구강, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 및/또는 항문관에 위치된다. 바람직하게는 디펜신은 인간 알파 디펜신이다. 다른 바람직한 구현예에서 디펜신은 인간 베타 디펜신, 바람직하게는 hBD2이고, 염증은 구강, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 직장, 및/또는 항문관에서 감소된다.
- [0092] 하나의 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및  $\beta$ -디펜신의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 장 염증의 치료를 위한 방법을 제공한다.
- [0093] 하나의 실시 양태는 장내 정상적인 미생물을 안정화 또는 유지시키기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 장내 불균형한 미생물의 치료 또는 정상화를 위한 방법을 제공한다.
- [0094] 추가의 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 장내 미생물의 유전자 풍부도를 증가시키기 위한 방법을 제공한다.
- [0095] 하나의 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 장내 미생물 죽의 수를 증가시키기 위한 방법을 제공한다.
- [0096] 하나의 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 부티레이트 생성의 증가 및/또는 아세테이트 생성의 감소를 위한 방법을 제공한다.
- [0097] 하나의 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 장내 미생물로부터 짧은 사슬의 지방산의 생성을 증가시키기

위한 방법을 제공한다.

[0098] 어떤 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 장내 미생물 내 박테리오이데테스(*Bacteroidetes*), 과에칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 로세부리아(*Roseburia*), 블라우티아(*Blautia*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 코프로코쿠스(*Coprococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 메타노브레비박터(*Methanobrevibacter*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 알로바쿨룸(*Allbaculum*), 알로프레보텔라(*Alloprevotella*), 아커만시아(*Akkermansia*), 유박테리움(*Eubacterium*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 속(genus)에 속하는 박테리아의 수를 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 박테리아는 알로바쿨룸(*Allbaculum*), 알로프레보텔라(*Alloprevotella*), 아커만시아(*Akkermansia*), 또는 락토바실러스(*Lactobacillus*)이다.

[0099] 바람직한 구현예에서, 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*), 박테로이데스 카카에(*Bacteroides caccae*), 과에칼리박테리움 프라우스니치이(*Faecalibacterium prausnitzii*), 로세부리아 인테스티날리스(*Roseburia intestinalis*), 블라우티아 한세니(*Blautia hansenii*), 루미노코쿠스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*), 코프로코쿠스 코메스(*Coprococcus comes*), 클로스트리디움 넥사일(*Clostridium nexile*), 클로스트리디움 볼테아에(*Clostridium bolteae*), 비피도박테리움 롱굼(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 비피듐(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*), 비피도박테리움 덴툼(*Bifidobacterium dentum*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*), 유박테리움 렉탈레(*Eubacterium rectale*)로 이루어진 군으로부터 선택된 박테리아의 수를 증가시키기 위한 방법이 제공된다. 제공된 방법은 건강한 장내 미생물의 전형적인 박테리아의 수를 증가시킨다.

[0100] 하나의 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신 및/또는 GLP-1/GLP-1 유사체의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체로 투여함으로써 장내 미생물 내 박테리오이데스 프라질리스(*Bacteroidetes fragilis*), 수투렐라 와즈워티아(*Sutturella wadsworthia*), 베일로넬라 파볼라(*Veillonella parvula*), 에스케리키 콜라이(*Escherichia coli*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 푸소박테리움 누클리아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corodens*), 및 게멜라 모리빌룸(*Gemella morbillum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 속에 속하는 박테리아 수를 감소시키기 위한 방법을 제공한다. 제공된 방법은 치료를 필요로 하는 대상체의 장내 불균형한 미생물의 전형적인 박테리아의 수를 감소시킨다.

[0101] 따라서, 바람직한 구현예에서 개시된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 기술된 장 염증, 결장직장암, 내분비, 영양, 대사 또는 심혈관 질환은 치료를 필요로 하는 대상체의 장내 불균형한 미생물을 의해 특징지어진다. 어떤 구현예에서, 개시된 방법에 의해 제공된 치료를 필요로하는 대상체의 장내 불균형한 미생물은 낮은 유전자 풍부도를 가진다. 다른 구현예에서, 개시된 방법에 의해 제공되는 치료를 필요로 하는 대상체의 장내 불균형한 미생물은 낮은 수의 죽을 갖는다. 다른 구현예에서, 개시된 방법에 의해 제공된 치료를 필요로 하는 대상체의 장내 불균형한 미생물로부터 아세테이트의 증가된 생성을 가진다. 개시된 방법에 의해 증가된 아세테이트의 생성은 부티레이트의 생성의 선호도를 감소시킬 수 있다.

[0102] 바람직한 구현예에서, 개시된 방법에 의해 제공되는 치료를 필요로하는 대상체의 장에 장내 불균형의 미생물은 박테리오이데스(*Bacteroidetes*), 과에칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 로세부리아(*Roseburia*), 블라우티아(*Blautia*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 코프로코쿠스(*Coprococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 메타노브레비박터(*Methanobrevibacter*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 알로바쿨룸(*Allbaculum*), 알로프레보텔라(*Alloprevotella*) 아커만시아(*Akkermansia*), 및 유박테리움(*Eubacterium*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 속에 속하는 낮은 수의 박테리아를 갖는다. 보다 바람직한 구현예에서, 개시된 방법에 의해 제공되는 치료를 필요로하는 대상체의 장내 불균형한 미생물은 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*), 박테로이데스 카카에(*Bacteroides caccae*), 과에칼리박테리움 프라우스니치이(*Faecalibacterium prausnitzii*), 로세부리아 인테스티날리스(*Roseburia intestinalis*), 블라우티아 한세니(*Blautia hansenii*), 루미노코쿠스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*), 코프로코쿠스 코메스(*Coprococcus comes*), 클로스트리디움 넥사일(*Clostridium nexile*), 클로스트리디움 볼테아에(*Clostridium bolteae*), 비피도박테리움 롱굼(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 비피듐(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*), 비피도박테리움 덴툼(*Bifidobacterium dentum*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*), 유박테리움 렉탈레(*Eubacterium rectale*)로 이루어진 군으로부터 선택된 낮은 수

의 박테리아를 갖는다. 추가의 구현예에서, 치료를 필요로하는 대상체의 장내 불균형한 미생물은 박테리오이데스 프라질리스(*Bacteroidetes fragilis*), 수투렐라 와즈워티아(*Sutturella wadsworthia*), 베일로넬라 파불라 (*Veillonella parvula*), 에스케리키 콜라이(*Escherichi coli*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 푸소박테리움 누클리아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corodens*), 및 게멜라 모리빌룸(*Gemella morbillum*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 높은 수의 박테리아를 갖는다.

- [0103] 바람직한 구현예에 개시된 방법은 적어도 포유 동물 또는 가금 알파 디펜신 및/또는 적어도 포유 동물 또는 가금 베타 디펜신 및/또는 적어도 GLP-1/GLP-1 유사체의 투여를 통해, 장내 불균형한 미생물 및 중간대사체 (metabolome)를 치료할 수 있다.
- [0104] 개시된 방법은 항생제 치료 또는 화학 요법 또는 면역 요법 또는 면역 억제 요법 또는 장내 미생물에 부정적인 영향을 미치는 또 다른 치료를 수행했거나 및/또는 수행하고 있는 대상체의 장내 불균형한 미생물 및/또는 중간 대사체의 치료, 예방 또는 정상화를 위해 사용될 수 있다.
- [0105] 개시된 방법은 치은염(gingivitis)을 포함하는 치주염(periodontitis)에 의해 영향을 받는 대상체와 같은 대상체의 구강 내 장내 불균형한 미생물의 치료, 예방 또는 정상화를 위해 또한 사용될 수 있다. 치주염은 흡연 및 스트레스에 의해 유발될 수 있으며 또한 약물-유도, 예를 들어 화학 요법, 면역 요법 및 면역 억제 요법에 의해 유도될 수 있다.
- [0106] 개시된 방법에 의해 제공된 치료를 필요로 하는 대상체는 장 염증 또는 결장직장암 또는 내분비, 영양, 대사 또는 심혈관 질환에 영향을 받는다. 하나의 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체는 25 또는 그 이상, 예를 들어 30 또는 그 이상, 예를 들어 35 또는 그 이상, 예를 들어 40 또는 그 이상의 BMI를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체는 적어도 0.80, 예를 들어 0.80-0.84, 예를 들어 적어도 0.85(여성) 또는 적어도 0.90, 예를 들어 0.9-0.99, 예를 들어 1.00(남성) 이상의 허리/엉덩이 비율을 가진다. 추가의 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체는 적어도 6.1 mmol/l, 예를 들어 적어도 7.0 mmol/l의 공복 혈당을 가진다. 또한 추가의 구현예에서, 치료를 필요로하는 대상체는 적어도 42 mmol/mol Hb, 예를 들어 42 내지 46 mmol/mol Hb 사이, 예를 들어 적어도 48 mmol/mol Hb의 당화된 해모글로빈(HbA<sub>1c</sub>) 수준을 갖는다.
- [0107] 개시된 방법에 의해 제공된 치료를 필요로 하는 대상체는 하기의 증상 중 하나 또는 그 이상을 나타낼 수 있다.
- [0108] · 증가된 혈압:  $\geq 140/90 \text{ mmHg}$ ;
- [0109] · 이상 지질 혈증(dyslipidemia): 트리글리세라이드(triglyceride)(TG):  $\geq 1.695 \text{ mmol/L}$  및 고-밀도 지단백 콜레스테롤(HDL-C)  $\leq 0.9 \text{ mmol/L}$ (남성)  $\leq 1.0 \text{ mmol/L}$ (여성);
- [0110] · 중심성 비만(central obesity): 허리:엉덩이 비  $> 0.90$  (남성);  $> 0.85$  (여성), 또는 체질량 지수 $> 30\text{kg/m}^2$ ; 및
- [0111] · 미세 알부민뇨(microalbuminuria): 뇨 알부민 배설 비  $\geq 20 \mu\text{g/min}$  또는 알부민:크레아티닌 비  $\geq 30 \text{ mg/g}$ .
- [0112] 하나의 구현예에서, 개시된 방법에 따르는, 적어도 하나의 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신의 투여는, 일반적으로 경구이다.
- [0113] 포유 동물 또는 가금 알파 및 베타 디펜신은 임의의 통상적인 경로에 의한 투여를 위해 제제화된 조성물에서 치료학적으로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 포유 동물 및 가금 알파 및/또는 베타 디펜신은 경구 투여된다. 인간 베타-디펜신 2는 결장 내 염증성 장 질환을 치료하기 위해 경구 투여될 수 있다. 본 발명자들은 놀랍게도 인간 알파 디펜신, HD5는 경구로 투여될 수 있고 산성의 위를 통과함에도 불구하고, 장내 생물활성을 유지한다는 것을 입증하였다.
- [0114] 경구 투여는 정상적으로 장관(enteral) 약물 전달을 위한 것이고, 상기 약제는 장관 점막을 통해 전달된다. 그러나, 본 발명자들에 의해 입증된 바와 같이, hBD2는 임의의 검출 가능한 정도(extent)로 장으로부터 흡수되지 않는다. 다른 디펜신도 또한 장으로부터 흡수되지 않을 것으로 예상된다.
- [0115] 하나의 구현예에서, 포유 동물 및 가금 알파 및/또는 베타 디펜신은 피하 투여된다. 특히 hBD2 및 HD5는 피하 투여될 수 있다고 고려된다.

- [0116] 어떤 구현예 내에서, 바람직한 구현예의, 조성물은 동결 건조물로서 안정성을 제공하고 재수화(rehydration) 후 적절한 부형제를 사용하여, 동결 건조물(Iyophilizate)로서 제형화될 수 있다.
- [0117] 포유 동물 알파 디펜신 및/또는 포유 동물 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신 및/또는 인간 베타 디펜신을 함유하는 약제학적 또는 동물 사료 조성물은, 통상적인 방법, 예를 들어, 혼합(mixing), 입화(granulating), 코팅(coating), 용해(dissolving) 또는 동결 건조(Iyophilizing) 공정에 따라 제조될 수 있다. 바람직한 구현 예에서, 포유 동물 알파 디펜신 및/또는 포유 동물 베타 디펜신을 함유하는 약제학적 조성물은 멸균 및 등장액으로 제제화된다.
- [0118] 제공된 약제학적 조성물은, 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 포유 동물 알파 디펜신을 포함한다. 포유 동물 알파 디펜신의 예는 HD5 및 HD6이다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 포유 동물 알파 디펜신 HD5를 포함한다. 약제학적 조성물은 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 포유 동물 베타 디펜신을 포함한다. 포유 동물 베타 디펜신의 예는 hBD1, hBD2, hBD3 및 hBD4이다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 포유 동물 베타 디펜신 hBD2를 포함한다. 약제학적 조성물은, 추가의 구현예에서, 적어도 하나의 포유 동물 알파 디펜신 및 적어도 하나의 포유 동물 베타 디펜신을 포함한다. 포유 동물 알파 디펜신의 예는 HD5 및 HD6이다. 포유 동물의 베타 디펜신의 예는 hBD1, hBD2, hBD3 및 hBD4이다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 포유 동물 알파 디펜신 HD5 및 포유 동물 베타 디펜신 hBD2를 포함한다. 다른 구현예에서, 조성물 또는 사료 조성물은 서열번호 1-3 및 10-17로부터 선택되는 아미노산 서열뿐만 아니라 본원에서 정의된 서열 변이체 및 단편을 갖는 디펜신으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 비-인간 디펜신을 포함한다.
- [0119] 바람직한 구현예의 약제학적 조성물은 포유 동물 알파 디펜신 및/또는 포유 동물 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함한다.
- [0120] 약제학적으로 및 동물 사료로 허용가능한 담체 및/또는 희석제는 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 액체 용액으로서 제제화된 조성물의 경우, 허용가능한 담체 및/또는 희석제는 식염수 및 멸균수를 포함하고, 선택적으로 항산화제, 완충액, 정균제(bacteriostat), 및 다른 통상적인 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0121] 개시된 화합물을 경구 투여를 위한 다양한 제형으로 제제화될 수 있다. 고형 제제는 분말, 정제(tablet), 점액제(drop), 캡슐, 카시에(cachet), 로젠지(lozenge), 및 분산성 과립(dispersible granule)을 포함할 수 있다. 경구 투여에 적합한 다른 형태는 에멀젼, 시럽, 엘릭서(elixir), 수성 용액, 수성 혼탁액, 치약, 젤 치마제(gel dentrifrice), 츄잉 껌을 포함하는 액체 형태 제제, 또는 사용 직전에 액체 형태 제제, 예를 들어 용액, 혼탁액, 및 에멀젼으로 전환되도록 의도된 고체 형태 제제를 포함할 수 있다.
- [0122] 개시된 화합물을 피하 투여를 위한 다양한 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0123] 제형은 (포유 동물 알파 디펜신 및/또는 포유 동물 베타 디펜신, 및 다른 선택적인 활성 성분에 추가하여) 담체, 충전제(filler), 봉해제(disintegrator), 유동 조절제(flow conditioner), 당 및 감미제, 향료(fragrance), 방부제(preservative), 안정화제(stabilizer), 습윤제(wetting agent), 유화제(emulsifier), 용해제(solubilizer), 삼투압 조절용 염(salt), 완충액(buffer), 희석제(diluents), 분산 및 계면-활성제(dispersing and surface-active agent), 결합제(binder), 윤활제(lubricant) 및/또는 당해 기술분야에서 공지된 다른 약제학적 부형제를 함유할 수 있다.
- [0124] 당해 기술분야의 통상의 기술자는 Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro (1990)에 기술된 것과 같이, 허용된 실행에 따라, 적절한 방식으로 포유 동물 또는 가금 알파 디펜신 및 포유 동물 또는 가금 베타 디펜신을 추가로 제제화할 수 있다.
- [0125] 포유 동물 알파 디펜신 및 포유 동물 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신은, 단독으로, 또는 하나, 둘 또는 그 이상의 다른 약제학적 화합물 또는 약물 물질, 예를 들어 인슐린/인슐린 유사체 및/또는 글루카곤 유사 웹타이드-1(GLP-1)/GLP-1 유사체 및/또는 글루카곤 유사 웹타이드-2(GLP-2)/GLP-2 유사체 및/또는 디펩티딜 웹티다아제 IV (DPP-IV) 억제제 및/또는 메트포르민/metformin) 및/또는 소듐 글루코스 트랜스포터-2(SGLT-2) 억제제 및/또는 글루카곤 수용체 길항제 및/또는 일시적인 수용체 전위 양이온 채널 아족 V 맴버 1(TRPV1) 길항제 및/또는 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와의 병용 요법으로 사용될 수 있다. 바람직하게는, 인슐린 또는 인슐린 유사체 또는 GLP-1 또는 GLP1 유사체는 피하 또는 근육 내 투여를 통해 비경구 투여된다. GLP-1 유사체는 엑세나타이드(exenatide), 리라글루타이드(liraglutide), 릭시세나타이드(lixisenatide), 알비글루타이드(albiglutide), 및 둘라글루타이드(dulaglutide)로부터 선택될 수 있고, 인슐린 유사체는 리스프로(Lispro), 아스파르트(Aspart), 글루리신(Glulisine), 데테미르 인슐린(Detemir

insulin), 데글루테크 인슐린(Degludec insulin), 및 글라진 인슐린(Glargine insulin) 중에서 선택될 수 있다.

[0126] 포유 동물 알파 디펜신 및 포유 동물 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신은, 또한 화학 요법, 면역 요법, 방사선 요법 또는 이들의 조합으로 병용 요법으로 사용될 수 있다.

### 가축에서의 방법 및 용도

[0128] 본원에 개시된 방법은 성장 속도 및 사료 효율을 개선하기 위해 가축과 함께 사용될 수 있다. 상기 방법은 예를 들어 항생제의 대안으로서 사용될 수 있다.

[0129] 하나의 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신의 유효량을 상기 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 비-인간 동물 내 장 염증을 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0130] 또 다른 실시 양태는 포유 동물 또는 가금  $\alpha$ -디펜신 및/또는  $\beta$ -디펜신의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는, 동물 육류 생산에 린 성장의 촉진을 위한 방법과 관련이 있다. 디펜신은 호르몬, 스테로이드 및 항생제의 대안으로서 사용될 수 있다. 실시예 1 및 3에서 입증된 바와 같이, 고지방 식이를 먹인 마우스로 HD5 및 hBD2의 투여는 지방량의 축적을 예방함으로써 린 성장을 촉진한다.

### 시험관 내 합성

[0132] 포유 동물 및 가금 알파 디펜신 및 포유 동물 및 가금 베타 디펜신은 당해 기술분야에 공지된 통상적인 방법을 사용하여, 시험관 내 합성에 의해 제조될 수 있다. 다양한 상업적 합성 장치, 예를 들어, Applied Biosystems Inc., Beckman 등의 자동화 합성기(synthesizer)는 이용가능하다. 합성기를 사용함으로써, 자연적으로 발생하는 아미노산은 비천연 아미노산, 특히 D-이성체(또는 D-형태) 예를 들어 D-알라닌 및 D-이소류신, 부분입체이성질체(diastereoisomer), 상이한 길이 또는 작용성을 갖는 결사슬 등으로 치환될 수 있다. 특정 순서 및 제조 방법은 편의성, 경제성, 요구되는 순도 등에 의해 결정될 것이다.

[0133] 화학적인 연결은 아미드 또는 치환된 아민 형성을 위한 아미노기, 예를 들어 환원성 아민화, 티오에테르(thioether) 또는 디설파이드(disulphide) 형성을 위한 티올기, 아미드 형성을 위한 카르복실기 등과 같은, 결합을 위해 편리한 작용기를 포함하는 다양한 웹타이드 또는 단백질에 제공될 수 있다.

[0134] 원하는 경우, 다양한 기(group)는 합성 동안 또는 발현 동안 웹타이드 내로 도입될 수 있으며, 이는 다른 분자 또는 표면으로 연결을 허용한다. 따라서, 시스테인은 티오에테르, 금속 이온 복합체에 결합하기 위한 히스티딘, 아미드를 형성하기 위한 아미노기 등을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0135] 포유 동물 및 가금 알파 디펜신 및 포유 동물 및 가금 베타 디펜신, 또는 이의 기능적 당량(equivalent)은, 또한 재조합 합성의 통상적인 방법에 따라 분리 및 정제될 수 있다. 재조합 합성은 적절한 발현 벡터 및 진핵 발현 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 용액은 발현 숙주 및 배지 및 HPLC, 배제 크로마토그래피, 겔 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 또는 다른 정제 기술을 사용하여 정제되어 제시된 디펜신으로 제조될 수 있다. 대장균에서 인간 베타 디펜신 2의 재조합 발현에 대한 방법은 WO 2010/007166 (노보자임스(Novozymes))에 개시되어 있다.

### 용량

[0136] 포유 동물 알파 디펜신 및 포유 동물 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신은, 바람직하게는 장 염증, 결장직장암, 내분비, 영양, 대사 또는 심혈관 질환을 치료하기 위한 효과적인, 바람직하게는 환자에게 허용가능한 독성을 지닌 양으로 약제학적 조성물에 사용된다. 포유 동물 또는 가금 알파 디펜신 및 포유 동물 또는 가금 베타 디펜신은 바람직하게는 린 성장을 촉진하기 위해 동물 사료에 적용된다. 포유 동물 또는 가금 알파 디펜신 및 포유 동물 또는 가금 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신은, 또한 바람직하게는 장내 정상적인 미생물 조성물을 유지하기 위해 또는 장내 불균형한 미생물을 치료 또는 정상화시키기 위해 효과적인, 바람직하게는 상기 치료를 필요로 하는 환자 또는 동물에게 허용가능한 독성을 지닌 양으로 약제학적 조성물 또는 동물 사료에 사용된다.

[0138] 상기 치료의 경우, 적절한 용량은, 물론, 예를 들어, 사용된 화합물의 화학적 성질 및 약물동력학적(pharmacokinetic) 데이터, 개별적인 숙주, 투여의 방식 및 치료되는 상태의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 본원에서 사용된 용어 "mg HD5 당량(equivalent)"은 HD5의 농도와 비교하여 인간 알파 및 베타 디펜신의 등몰(equimolar) 농도를 말한다. 본원에서 사용된 용어 "mg hBD-2 당량"은 hBD-2의 농도와 비교하여 인간 알파

및 베타 디펜신의 등물 농도를 말한다. 개시된 디펜신의 분자량이 비교될 수 있는 경우, 용어 "mg HD5 당량" 및 "mg hBD-2 당량"은 사용된 디펜신의 mg를 단순히 의미할 수 있다.

[0139] 그러나, 일반적으로, 포유 동물 또는 가금, 예를 들어 인간에서의 만족스러운 결과를 위해서, 인간 알파 디펜신의 지시된 일일 용량은 바람직하게는 약 0.1mg HD5 당량/kg 체중 내지 약 10 mg HD5 당량/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.5 mg HD5 당량/kg 체중 내지 약 10 mg HD5 당량/kg 체중, 예를 들어 1 mg HD5 당량/kg 체중 내지 10 mg HD5 당량/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 1.2 mg HD5 당량/kg 체중 내지 약 10 mg HD5 당량/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2 mg HD5 당량/kg 체중 내지 약 5 mg HD5 당량/kg 체중, 보다 더욱 바람직하게는 1.2 mg HD5 당량/kg 체중으로, 예를 들어, 1일 1회, 2회 또는 3회로 분할된 용량으로 투여될 수 있다.

[0140] 하나의 구현예에서, 인간 베타 디펜신의 지시된 1일 용량은 바람직하게는 약 0.1 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2 당량/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.5 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2 당량/kg 체중, 예를 들어 1 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 10 mg hBD-2 당량/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 1.2 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2 당량/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 5 mg hBD-2 당량/kg 체중, 보다 더욱 바람직하게는 1.2 mg hBD-2 당량/kg 체중으로, 예를 들어 1일 1회, 2회 또는 3회로 분할된 용량으로 투여될 수 있다.

[0141] 하나의 구현예에서, 인간 베타 디펜신과 함께 인간 알파 디펜신의 지시된 1일 용량은 바람직하게는 약 0.1 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2 당량/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.5 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2 당량/kg 체중; 예를 들어 1 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 10 mg hBD-2 당량/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 1.2 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2 당량/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2 mg hBD-2 당량/kg 체중 내지 약 5 mg hBD-2 당량/kg 체중, 보다 더욱 바람직하게는 1.2 mg hBD-2 당량/kg 체중으로, 예를 들어 1일 1회, 2회 또는 3회로 분할된 용량으로 투여된다.

[0142] 일반적으로, 포유 동물에서, 예를 들어 인간에서, 인간 알파 디펜신의 지시된 1일 용량은 바람직하게는 약 0.1 mg HD5/kg 체중 내지 약 10 mg HD5/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.5 mg HD5/kg 체중 내지 약 10 mg HD5/kg 체중, 예를 들어 1 mg HD5/kg 체중 내지 10 mg HD5/kg 체중, 보다 바람직하게는 1.2 mg HD5/kg 체중 내지 10 mg HD5/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2 mg HD5/kg 체중 내지 약 5 mg HD5/kg 체중, 보다 더욱 바람직하게는 1.2 mg HD5/kg 체중으로, 예를 들어, 1일 1회, 2회 또는 3회로 분할된 용량으로 투여된다. 유사한 용량은 다른 알파-디펜신에 대해 사용될 수 있다.

[0143] 하나의 구현예에서 인간 베타 디펜신의 지시된 1일 용량은 바람직하게는 약 0.1 mg hBD-2/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.5 mg hBD-2/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2/kg 체중; 예를 들어 1 mg hBD-2/kg 체중 내지 10 mg hBD-2/kg 체중, 보다 바람직하게는 1.2 mg hBD-2/kg 체중 내지 약 10 mg hBD-2/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2 mg hBD-2/kg 체중 내지 5 mg hBD-2/kg 체중, 보다 더욱 바람직하게는 1.2 mg hBD-2/kg 체중으로, 예를 들어, 1일 1회, 2회 또는 3회로 분할된 용량으로 투여된다. 유사한 용량은 다른 베타-디펜신에 대해 사용될 수 있다.

[0144] 인간 베타 디펜신과 함께 인간 알파 디펜신의 지시된 1일 용량은 약 0.1 mg 디펜신/kg 체중 내지 10 mg 디펜신/kg 체중, 보다 바람직하게는 0.5 mg 디펜신/kg 체중 내지 약 10 mg 디펜신/kg 체중, 예를 들어 1 mg 디펜신/kg 체중 내지 10 mg 디펜신/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 1.2 mg 디펜신/kg 체중 내지 약 10 mg 디펜신/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2 mg 디펜신/kg 체중 내지 약 5 mg 디펜신/kg 체중, 보다 더욱 바람직하게는 1.2 mg 디펜신/kg 체중, 예를 들어, 1일 1회, 2회 또는 3회로 분할된 용량으로 투여된다.

[0145] 2개의 상이한 디펜신이 하나의 용량으로 투여되는 경우, 상기 용량은 중량 기준 또는 몰 기준으로 결정된 2개의 디펜신의 동일하거나 또는 거의 동일한 양을 포함할 수 있다. 비율은 또한 베타 디펜신에 대한 알파 디펜신의 비율이 중량 기준 또는 몰 기준으로 결정되는 10:1 내지 1:10, 예를 들어 5:1 내지 1:5, 예를 들어 2:1 내지 1:2로 다양할 수 있으므로 상이할 수 있다.

[0146] 일일 용량은 0.6 mg HD5/kg 체중 + 0.6 mg hBD-2/kg 체중에 상응할 수 있었다.

[0147] 바람직한 구현예의 화합물은 포유 동물 또는 가금, 예를 들어 인간, 새끼 돼지(piglet) 또는 송아지(calf)에게 통상적으로 사용된 것과 유사한 용량으로 유사한 투여 방식으로 투여될 수 있다.

[0148] 특정한 구현예에서, 바람직한 구현예의 약제학적 조성물 또는 동물 사료 조성물은 단위 용량 형태 당 약 0.5 mg 또는 그 이하 내지 약 1500mg 또는 그 이상, 바람직하게는 약 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 또는 0.9 mg 내지 약 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 mg, 및 보다 바람직하게는 약

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 또는 25 mg 내지 약 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100 mg의 양으로, 포유 동물 또는 가금 알파 디펜신 및/또는 포유 동물 또는 가금 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신 및/또는 인간 베타 디펜신을 포함할 수 있다. 그러나, 특정한 구현예에서, 상기 언급된 것보다 낮거나 또는 높은 용량이 바람직할 수 있다. 적절한 농도 및 용량은 당해 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 특정한 구현예에서, 바람직한 구현예의 약제학적 조성물은 포유 동물 알파 디펜신, 예를 들어 인간 알파 디펜신을 포함한다. 다른 구현예에서, 바람직한 구현예의 약제학적 조성물은 포유 동물 베타 디펜신, 예를 들어 인간 베타 디펜신을 포함한다. 추가의 구현예에서, 바람직한 구현예의 약제학적 조성물은 포유 동물 알파 및 포유 동물 베타 디펜신, 예를 들어 인간 알파 및 인간 베타 디펜신을 포함하고, 상기 알파 및 베타 디펜신은 몰 농도 기준 또는 mg/mL 기준으로 동일한 양으로 존재한다.

[0149] 하나의 구현예에서, 포유 동물 또는 가금 알파 및/또는 베타 디펜신은 적어도 1일 1회, 예를 들어 적어도 1일 2회, 예를 들어 적어도 1일 3회 투여된다.

[0150] 상기 개시는 추가로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안되는 하기의 실시예에 의해 기술된다.

#### 실시예

##### 실시예 1

[0153] 디펜신의 예방 치료에 의한 장 미생물의 조절 및 장 염증 및 대사 증후군의 예방.

##### 재료 및 방법

[0155] 마우스: 마우스는 3마리(trios)씩, 그룹당 4개의 케이지(cage)에 수용되었다. 사료 섭취량은 조명이 꺼지기 직전(6pm)에 매일 등록되었다. 각각의 마우스는 그룹 및 케이지 양쪽에서 변경된 순서의 실험 절차로 수행되었다. 마우스는 SPF 표준 조건에서 12시간 명/암 주기 하에 상온에 보관되었다.

[0156] 식이 요법: 투여의 경우, 평균 체중은 마우스 당 25그램으로 추정된다. 이들은 1일에 마우스 당 대략 3 그램의 사료를 섭취한다.

[0157] 치료 요법(treatment regime) (도 1A): 마우스는 고지방 식이(HFD) 또는 저지방(LF) 제어 식이를 공급했다. HFD는 4개의 하위 그룹; 1 hBD2, 1 HD5, 1 hBD2/HD5 및 디펜신의 보충이 없는 1 표준 HFD 을 포함한다. 디펜신 농도는 1일 kg 마우스 당 1,2mg hBD2이다. HD5는 hBD2와 동일한 몰 농도로 주어진다. 조합 그룹은 50% hBD2 + 50% HD5로 주어지므로, 남은 테스트 그룹과 동등한 전체 디펜신의 양이 주어진다.

[0158] 테스트: 인슐린 내성 테스트(ITT), 포도당-자극 인슐린 분비(GSIS) 테스트, 경구 포도당 내성 테스트(OGTT) 및 5시간의 공복 인슐린 테스트는 1일 그룹 당 마우스의 50%를 사용하여, 혼동 요인으로서 1일 변이를 피하는, 2일에 걸쳐 수행되었다.

[0159] 미생물 분석은 장의 미생물을 연구하기 위해 수행되었다. 종방향 16S 특성화는 60마리 마우스로부터 4개의 쌍, 총 240개의 샘플로 된 샘플에서 수행되었다. 각각의 마우스는 식이 변경, 식이 변경 후 1주, 식이 변경 후 4주 및 종료 시 샘플링되었고, 디펜신 치료의 결과로서 배설물의 미생물의 완전한 특성을 확인하였다. 또한, 소장의 내용물은 종료 시 분석되었으므로, 영양 섭취의 주요 지점에서 가능한 변경에 대한 가치있는 이해(insight)를 제공한다.

[0160] 맹장 내용물의 완전한 대사적 특성은 미생물을의 변경을 전신 대사로의 전환으로 허용하도록 수행될 수 있다. 십이지장, 공장, 회장 및 결장에 대한 자세한 조직학적 및 면역조직학적 분석은 또한 수행될 수 있다.

[0161] hBD2+HD5 치료의 결과는 분석에서 제외되었다.

#### 결과

[0163] 체중 변화: 사료 섭취량은 3개의 실험 식이 그룹 모두에서 유사하였지만(도 6C), 고지방 식이(HFD) 그룹 모두 10주 연구 기간 동안 저지방 식이(LFD) 참조 그룹보다 유의하게 많은 체중이 증가하였다(\*\*p<0.0001 2-방향 분산분석, 터키 포스트 테스트 (Tukey Post Test)). 그러나, HFD + hBD-2 그룹은, HFD 참조 그룹보다 적은 체중이 증가하였다(\*p=0.0028) (도 6A 및 B).

[0164] 린(lean)/지방량 증가: 린/지방량은 연구 초기에 3개의 실험 그룹 사이에 균등하게 분배되었다(도 7A 및 B). 연구 종료 시, HFD 그룹 모두 같은 양의 린질량을 얻었으며(도 7B), 대체로 증가된 신체 용적에 기인하여, LFD 그룹보다 유의하게 높았다(\*p<0.0001, 1-방향 분산분석, 터키 포스트 테스트). 연구 종료 시, HFD + hBD-2 그룹은

LFD 그룹과 비교하여 증가된 지방량으로의 경향을 보였다(도 7B). 그러나 이는 통계적으로 유의하지 않았다 (\*p=0.25). HFD 그룹은 LFD 그룹과 비교하여 지방량의 거의 4배의 양 및 HFD + hBD-2 그룹과 비교하여 지방량의 2배의 양으로 증가하였다(각각 \*p<0.0001 및 \*p=0.005)(도 7B).

[0165] 인슐린 내성 테스트. LFD 그룹 및 HFD + hBD-2 그룹 모두 HFD 그룹보다 인슐린에 유의하게 더욱 민감하였다 (p<0.05)(도 8a).

[0166] 포도당 내성 테스트. HFD 그룹은 15분의 피크(peak) 내지 120분의 반-제거(semi-clearance)의 포도당의 연장된 제거로 포도당 내성이 없었다. LFD 그룹은 15분의 피크로부터 포도당의 급속한 제거를 가진다. HFD + hBD-2 그룹은 경미하게 연장된 포도당 제거를 가졌지만 HFD 그룹보다 유의하게 낮은 포도당 수준에 도달하였다(p<0.05)(도 8B).

[0167] 포도당 자극 인슐린 분비. HFD 그룹은 포도당 투여 후 유의하게 높고 지속적인 인슐린 농도로 포도당 항상성을 손상시켰다(p<0.05). LFD 그룹은 포도당 자극 후 인슐린 농도가 거의 증가하지 않았다. HFD + hBD-2 그룹은 LFD 그룹보다 높았지만 유의하게 차이가 없는 인슐린 농도를 가졌다(도 8C).

[0168] 5시간 공복 인슐린. HFD 그룹은 LFD보다 유의하게 높은 공복 인슐린 수준(\*p=0.0004) 및 HFD + hBD-2 그룹보다 경계선상의 유의하게 높은 공복 인슐린(\*p =0.057)을 지닌 중증의 당뇨병 환자였다. LFD 및 HFD + hBD-2 그룹 사이의 유의한 차이는 없었다(\*p=0.17)(도 8D).

[0169] \*터키 포스트 테스트, 또는 듀넷 포스트 호크 테스트.

[0170] 실시예 1의 연구 완료 후, 결과는 다시 분석되었고 하기 및 첨부 도면에 나타내었다.

[0171] 체중 변화. 사료 섭취량은 3개의 실험 식이 그룹 모두에서 유사하였지만, 고지방 식이(HFD) 그룹 모두는 10주의 연구 기간동안 저지방 식이(LFD) 참조 그룹보다 유의하게 많은 체중이 증가하였다(\*p<0.0001 2-방향 분산분석, 터키 포스트 테스트). 그러나, HFD + hBD-2 그룹은, HFD 참조 그룹보다 유의하게 적은 체중이 증가하였다 (\*p=0.0028)(도 9a). 도 9B는 사료 효율, 도 9C는 에너지 섭취량을 도시한다.

[0172] 린/지방량 증가. 린/지방량은 연구 초기에 3개의 실험 그룹 사이에 동일하게 분배되었다. 연구 종료 시 HFD 그룹 모두 동일한 양의 린질량을 얻었으며, 대체로 증가된 체질량에 기인하여, LFD 그룹보다 유의하게 높았다 (\*p<0.0001, 1-방향 분산분석, 터키 포스트 테스트). 연구 종료 시, HFD + hBD-2 그룹은 LFD 그룹과 비교하여 증가된 지방량으로의 경향을 보였다. 그러나 이는 통계적으로 유의적이지 않았다(\*p=0.25). HFD 그룹은 LFD 그룹과 비교하여 전체 체중의 퍼센트 내 지방량의 거의 3배의 양 및 HFD + hBD-2 그룹과 비교하여 전체 체중의 퍼센트 내 지방량의 2배의 양으로 증가하였다(각각 \*p<0.0001 및 \*p=0.005)(도 10a). 간 중량의 관점에서 3개의 그룹 사이의 통계적인 차이는 없었지만(도 10b), HFD + hBD-2는 HFD 그룹보다 유의하게 적은 내장 지방(eWAT)을 가졌다(도 10c).

[0173] 포도당 내성 테스트. HFD 그룹은 15분의 피크 내지 120분의 반-제거의 포도당의 연장된 제거로 포도당 내성이 없었다. LFD 그룹은 15분의 피크로부터 포도당이 급속히 제거되었다. HFD + hBD-2 그룹은 경미하게 연장된 포도당 제거를 가졌지만 HFD 그룹보다 유의하게 낮은 포도당 수준에 도달하였다(p<0.05)(도 11a).

[0174] 포도당 자극 인슐린 분비. HFD 그룹은 포도당 투여 후 유의하게 높고 지속적인 인슐린 농도로 포도당 항상성을 손상시켰다(p<0.05). LFD 그룹은 포도당 자극 후 인슐린 농도가 거의 증가하지 않았다. HFD + hBD-2 그룹은 LFD 그룹보다 높았지만 유의하게 차이가 없는 인슐린 농도를 가졌다(도 11b).

[0175] 인슐린 내성 테스트. LFD 그룹 및 HFD + hBD-2 그룹 모두 HFD 그룹보다 인슐린에 유의하게 더욱 민감하였다(p<0.05)(도 12A). LFD 참조 그룹 및 HFD + hBD-2 그룹 사이의 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

[0176] 항상성 모델 평가(HOMA-IR). HOMA-IR 지수로 평가된 바와 같이 인슐린 저항성 및 베타 세포 기능 사이의 관계는 HFD 그룹과 비교하여 HFD + hBD-2 그룹에서 통계적으로 유의하게 낮았다(도 12b).

[0177] \*터키 포스트 테스트, 또는 듀넷 포스트 호크 테스트(Dunnett post hoc test).

[0178] 고지방 식이 섭취 마우스에서 당뇨병 및 비만의 발생에 대한 예방으로서 hBD-2의 결론:

[0179] - 일정한 체중 증가(낮은 집단 내 SD 포함)

[0180] - HFD-hBD2-섭취 마우스의 50%는 60% HFD를 섭취했음에도 불구하고, LFD 참조 마우스와 유사한 체지방률을 가졌다. 몇몇의 마우스는 가장 낮은 LFD 참조 마우스보다 더 낮은 지방%를 가졌다.

- [0181] - 가장 잘 보호된 hBD2-접취 마우스는 LFD 참조 마우스보다 동일하거나 또는 더 적은 내장 지방량을 가졌고, 60% HFD에서 매우 드문 경우이다!
- [0182] - 개선된 인슐린 민감도! hBD2 접취 마우스는 LFD 참조 마우스와 유의한 차이가 없었다. 인슐린 내성 테스트 및 HOMA-IR은 모두 개선된 인슐린 신호 전달을 나타낸다.
- [0183] - 포도당 내성은 HFD 대조군 마우스와 비교하여 현저하게 개선되었다. 중요하게도, 포도당 공격(challenge) 동안에 포도당 내성 및 포도당 자극 인슐린 반응 모두 개선되었다. 이는 hBD2-접취 마우스가 HFD 대조군 마우스보다 포도당 환약(bolus)을 처리하기 위해 인슐린을 덜 필요로 하였다.
- [0184] 고지방 식이 접취 마우스에서 당뇨병 및 비만의 발생에 대한 예방으로서 HD5의 결론:
- [0185] - HD5-접취 마우스는 HFD-접취 대조군 마우스보다 적은 체중이 증가하였지만(도 17A), 효과는 통계적으로 유의하지 않았다. 또한 낮은 사료 효율(도 17B) 및 에너지 섭취량(도 17C)으로의 경향도 있었다.
- [0186] - HD5-접취 마우스는 HFD-접취 대조군 마우스보다 경계선상의 더 적은 지방%(도 18A) 및 경계선상의 더 적은 내장 지방량(도 18C)을 가졌다. 간 중량의 관점에서 통계적으로 유의한 차이는 발견되지 않았다(도 18B).
- [0187] - 포도당 내성(도 19A), 포도당-자극 인슐린 분비(도 19B), 인슐린 내성(도 20A), 및 HOMA-IR(도 20B)에서 유의한 개선은 없었지만, HD5 접취 마우스는 HFD-접취 대조군 마우스보다 잘 수행되었다. hBD2 및 HD5에서 수득된 결과의 차이는 hBD2 및 HD5 사이의 작용 방식의 차이를 암시한다.
- [0188] 미생물의 조절의 관점에서, 연구의 1주부터 도 21A의 결과는 미생물상의 변화가 연구의 첫 주 내에 이미 일어났다는 것을 입증한다. 3개의 HFD 그룹은 LFD 그룹의 미생물상과 상이한 비교할만한 미생물상을 가진다.
- [0189] 10주 후 연구의 완료 시, HFD-HD5 그룹의 미생물상은 변화했고 LFD 그룹 및 미처리된 HFD 그룹 사이의 중간이었다(도 21B). 결론은 HD5의 경구 투여가 미생물상의 부분 정상화를 유도하여 미처리된 그룹보다 LFD 그룹의 미생물상과 더욱 유사하다는 것이다.
- [0190] HFD 그룹에서, 종료시, 알파 디펜신(HD5)로 치료된 마우스는 치료되지 않은 마우스보다 장내 미생물에서 알로바콜룸(*Allobaculum*) 및 락토바실러스(*Lactobacillus*)의 증가된 풍부도 및 클로스트리디움(*Clostridium*)의 풍부도의 감소로 미생물의 정상화를 보였다(도 21C). 알로바콜룸(*Allobaculum*)은 짧은 사슬 지방산 생성 종이다. 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 항-염증성 특성을 지닌 박테리아이다.
- [0191] 결과는 HFD 그룹에서, 종결시, 알파, 베타 및 알파 및 베타 디펜신으로 치료된 마우스는 치료되지 않은 마우스보다 장내 미생물에서 더 높은 유전자 풍부도 및 더 높은 수의 박테리아를 나타내는 것을 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0192] LFD 대조군에서, 종료시, 마우스는 장내 건강한 변경되지 않은 미생물을 나타낸다.
- [0193] 실시예 2. 디펜신에 의한 장 미생물의 조절.
- [0194] 무척추동물(Vertebrates): 생체 내에서 개념의 증명을 위해 무척추동물 왁스 나방 모델 갤러리아 멜로넬라 (*Galleria mellonella* (*G. mellonella*)))를 사용할 수 있다. 배설물은  $\alpha$ - 및/또는  $\beta$ -디펜신의 강제-사료 투여 후 분석될 수 있다(Giannouli et al. 2014)(Favre-Godal et al. 2014).
- [0195] 실시예 3. 비만 마우스에서 디펜신을 사용한 중재적 치료에 의한 장 미생물, 장 염증 및 대사 증후군 매개변수의 조절.
- [0196] 마우스 및 식이. 실험은 식이-유도된 비만 마우스에서 대사 증후군(MetS)의 치료에서의 hBD-2 및 HD5의 효과를 설명한다. 마우스에게 전적으로 HFD(지방으로부터 60%의 에너지)의 사료가 공급된 13주의 런-인 기간(run-in period)은 중재 전에 선행하였다. 런-인 기간 동안 최소 12그램의 체중 증가(초기 체중의 약 50%)의 기준(criteria)을 충족시키는 마우스만 최종 분석에 포함되었다. 상기 기준을 충족시키지 못한 마우스는 계층 구조의 '키퍼(keeper)'로서 각각의 케이지에 머물렀다. 이들은 모든 실험 테스트에 노출되었지만, 분석에서 제외되었다.
- [0197] 치료 요법(도 1B). 중재 전에 모든 마우스는 MR 검사를 받았고 OGTT가 수행되었다. 마우스의 케이지는 이들의 지방량에 따라 실험 그룹에 배정되었다. 모든 후속 측정은 중재 전에 동일한 마우스로부터의 데이터와 쌍을 이루게 되었다.

- [0198] LFD(저지방 식이) 참조 그룹은 병행하여 운영되고 있었다. 중재를 위한 대조군으로서 2개의 추가의 그룹이 포함되었다: 1개의 전적으로 HFD 및 1개의 LFD. 실험 마우스는 중재 동안 전적으로 HFD에 머물렀다. 마우스는 10주 동안 실험 식이요법을 빌었다. 이들은 실험 동안, 케이지 당 4마리 마우스, 그룹 당 3개의 케이지로, 공동으로 보관되었다. 모든 테스트는 1일 그룹 당 1케이지로, 3일 이상 실행하였다.
- [0199] 테스트. 인슐린 내성 테스트(ITT), 포도당-자극 인슐린 분비(GSIS) 테스트, 및 경구 포도당 내성 테스트(OGTT) 및 5시간의 공복 인슐린 테스트는 1일 그룹 당 1/3의 마우스에 3일에 걸쳐 수행되었고, 혼동 요인으로서의 1일 변이를 피하였다.
- [0200] 미생물 분석은 장의 미생물 연구를 위해 수행될 수 있다. 종방향 16S 특성화는 60마리 마우스로부터 7개의 쌍, 총 240개의 샘플로 된 샘플에서 수행될 수 있다. 각각의 마우스는 식이 변경 전, 식이 변경 후 2주, 4주, 6주, 8주 및 종료 시 샘플링될 수 있고, 따라서 디펜신 치료의 결과로서 배설물의 미생물의 완전한 특성을 확인하였다.
- [0201] 또한, 소장의 내용물은 종료 시(16S 또는 심층 서열분석(sequencing)을 통해) 분석될 수 있고, 따라서 영양소 섭취의 주요 지점에서 가능한 변경에 대한 가치있는 이해를 제공한다.
- [0202] 마지막으로, 맹장의 완만한 대사적 특성은 미생물의 변경을 전신 대사로의 전환으로 허용하도록 수행될 수 있다. 십이지장, 공장, 회장 및 결장에 대한 자세한 조직학적 및 면역조직학적 분석은 또한 수행될 수 있다.
- [0203] 고지방 식이 공급된 비만 마우스에서 대사 증후군의 치료로서 hBD-2:
- [0204] 결과
- [0205] 체중 변화. 표준 고지방 식이(HFD) 공급된 그룹은 전체의 연구 기간 동안 동일한 식이 섭취량을 보였고 첫 13주에 동일한 지방 및 제자방량으로 동일한 체중 증가를 보였으며, 따라서 식이 중재 전 동일한 시작 지점을 가진다. 체중 증가는 저지방 식이(LFD) 그룹보다 유의하게 더 커졌다(\*p<0.05 2-방향 분산분석)(도 13A). 식이 중재 후 HFD 그룹은 체중이 지속적으로 증가하였지만, HFD + hBD-2 그룹은 유의하지는 않았지만, 식이 중재 후 첫 4주에 더 적은 체중이 증가하는 경향을 보였다(\*p=0.07 2-방향 분산분석). 4주부터 연구 기간의 종료시까지 HFD + hBD-2 그룹은 표준 HFD 그룹과 유사한 체중을 증가시켰다(\*p=0.82 2-방향 분산분석)(도 13B).
- [0206] 지방 비율. 전체 체중의 지방 비율은 연구 기간의 시작 시 3개의 실험 그룹 사이에 유사하였다. 식이 중재 시점에서 2개의 HFD 공급 그룹의 지방 비율은 동일하였고 2개의 군 모두 LFD 공급 그룹보다 유의하게 더 커졌으며, 이는 식이 중재 후 10주 동안 일관되었다(\*p<0.05 2-방향 분산분석)(도 14A). 식이 중재 후 4주째에 HFD + hBD-2 그룹의 ~75%는 중재 전에 더 적은 지방 비율을 가졌고, 모든 마우스가 증가된 지방 비율을 가졌던, 표준 HFD 그룹과 극적으로 대조된다(도 14B). 지방 비율의 변화는 상기 시점에서 표준 HFD 그룹보다 HGD + hBD-2 그룹에서 유의하게 더 작았다(\*p=0.003 2-방향 분산분석). 종료 시 간의 중량은 LFD 그룹과 비교하여 HFD 공급 그룹에서 유의하게 더 커졌다(\*p<0.05 1-방향 분산분석)(도 15A). 종료 시 내장 지방량(eWAT)은 또한 LFD와 비교하여 HFD 그룹에서 더 높았다(\*p<0.05 1-방향 분산분석). HFD 공급 그룹 사이에서 내장 지방(eWAT)에 유의한 차이가 없었다(도 15B).
- [0207] 포도당 내성 테스트. 포도당 내성은 HFD + hBD-2 그룹에서 식이 중재 시점부터 급속하게 개선되었으며, 이는 2주 후에 이미 혈당에서 더 작은 피크뿐만 아니라 포도당의 더 빠른 제거를 보였다(도 16A). 상기 연구에서 가장 많은 포도당 내성이 없는 마우스는 표준 HFD로부터 HFD + hBD-2로의 전환된 후 첫 2주 동안 극적으로 개선되는 것으로 관찰되었다(도 16B).
- [0208] 인슐린 내성 테스트. LFD 그룹은 HFD 그룹 모두보다 인슐린에 유의하게 더욱 민감하였다(\*p<0.05 2-방향 분산분석). HFD + hBD-2그룹은 HFD 대조군과 비교하여 동시에 더 많은 인슐린 민감도가 있었고, 식이 중재 이후에 인슐린 내성의 개선을 의미한다(\*p<0.05 2-방향 분산분석)(도 16C).
- [0209] 고지방 식이 공급된 마우스에서 당뇨병 및 비만의 발생에 대한 중재로서 hBD-2의 결론:
- [0210] - 전반적으로, hBD-2 공급된 마우스는 HFD 대조군 마우스보다 중재의 첫 4주에 더 적은 체중이 증가하였다(도 143).
- [0211] - 비만 및 포도당 내성 마우스의 7/8은 단 2주간의 중재 후에 포도당 내성을 유의하게 개선시켰다(도 14a). 단일 마우스는 50g의 체중 중에서 약 20g의 지방량으로 기준치에서 가장 포도당 내성이 있는 마우스였다. 상기 심하게 건강에 해로운 표현형에도 불구하고, 마우스는 중재의 2주까지 포도당 불내성 측면에서 완전히 구제되었다

(도 16B).

[0212] - 전신 수준에서, hBD-2 공급된 마우스는 HFD 대조군 마우스보다 더 낮은 인슐린 저항성이 있었다(도 16C). 이는 심각한 전신의 인슐린 저항성이 극단적으로 역전되기 어렵고 인간 질환(예: 당뇨병, CVD, 다른 것 중 특정 암)의 치료에 주요 한계가 있다는 것이 핵심 포인트이다.

[0213] 고지방 식이 공급된 비만 마우스에서 대사 증후군의 치료로서의 HD-5:

[0214] 체중 변화. 모든 HFD 공급된 그룹은 연구 기간 동안 동일한 식이 섭취량을 가졌고 13주의 런-인 기간 동안 동일한 체중 증가를 보였다(도 22A). 식이 중재 후 HFD + HD-5 공급된 그룹은 HFD 대조군보다 유의하게 더 적은 체중이 증가하였다(\*p<0.05 2-방향 분산분석)(도 22B). 또한, HFD + HD-5 그룹에서 지방 비율을 감소시키는 경향이 관찰되었고(도 23A), HFD + HD-5에서 유의하게 더 적은 지방 비율은 HFD 대조군과 비교하여 식이 변화 4주 후에 측정되었다(\*p=0.009 2-방향 분산분석)(도 23B). 종료 시 간의 중량은 HFD 대조군과 비교하여 HFD + HD-5 공급된 그룹에서 감소되는 경향이 있었다. 특히, 표준 HFD 공급된 마우스의 ~50%는 가장 높은 HFD + HD-5 공급된 마우스보다 더 높은 수치였다(도 24A). 내장 지방의 무게는 LFD 공급된 그룹보다 HFD 공급된 그룹에서 더 컸다(\*p<0.05 1-방향 분산분석)(도 24B).

[0215] 포도당 내성 테스트. 대표적인 케이지, 케이지 2에서 HFD + HD5 치료된 동물에 대한 포도당 내성은 중재의 개시(13-0주)로부터 13.8주까지 시간 경과에 따라 개선되었다(도 25A).

[0216] 인슐린 내성 테스트. LFD 그룹은 HFD 공급된 그룹보다 유의하게 더 인슐린 민감성이었다(\*p<0.05 2-방향 분산분석). HFD + HD-5 그룹은 HFD 대조군보다 더 인슐린 민감성이었고, 식이 중재 이후에 인슐린 내성의 개선을 나타낸다(\*p<0.05 2-방향 분산분석)(도 25B).

[0217] 고지방 식이 공급된 마우스에서 당뇨병 및 비만 발생에 대한 중재로서 HD5의 결론:

[0218] - HD5-공급된 마우스는 HFD-공급된 대조군 마우스와 비교하여 체중 변화가 유의하게 감소하였다(도 22B).

[0219] - HFD-HD5-공급된 비만 마우스의 지방량을 감소시키는 일반적인 경향이 있었다(도 23A 및 B).

[0220] - 간 중량은 HFD-공급된 대조군 마우스와 비교하여 HD5-공급된 마우스에서 간 질량이 감소되는 경향을 보였다(도 24a). 내장 및 피하 저장은 유의하게 상이하지 않았고(도 24b), 상기 관찰은 HD5 마우스에서 보통으로 감소된 지방%가 간의 지질분해/지질 산화로 제한된다는 것을 제시한다.

[0221] - 포도당 내성이 HD5 공급된 마우스에서 시간에 지남에 따라 향상되었고(도 25A),

[0222] - HD5 공급된 마우스는 HFD-공급된 대조군 마우스보다 인슐린 내성이 더 낮았다(도 25b).

[0223] 관찰된 변화는 치료되지 않은 마우스에서 보다 디펜신으로 치료된 HFD 그룹에서 장내 미생물에서 더 높은 유전자 풍부도와 더 높은 수의 죽과 일치한다.

[0224] **실시예 4.** 글루카곤 유사 웨타이드-1 유사체로 중재적 치료에 의한 장 미생물의 조절 및 장 염증의 치료.

#### 재료 및 방법.

[0226] 마우스. 4주된 C57B1/6J DIO 수컷 마우스는 고지방 식이(HFD 60% 지방, SSNIFF (Diet #D12492)) 또는 퓨리나 음식물을 36주 동안 섭취하였다. HFD 공급된 그룹은 중재의 시작으로 약 55그램의 평균 체중에 도달하였다. 마우스는 -2주까지 케이지당 10그룹으로 수용되었다. -2주부터 마우스는 연구기간 동안 단일로 수용되었다. 사료 섭취량은 3pm에 등(light)이 꺼지기 직전에 매일 등록되었다. 각각의 마우스는 그룹 및 케이지 양쪽에 변경된 순서로의 실험 절차를 위해 수행되었다. 마우스는 SPT 표준 조건에서 12시간 명/암 주기 하에 상온에서 보관되었다.

[0227] 치료 요법(도 26). 마우스는 고지방 식이(HFD) 또는 저지방(LF) 제어 식이를 섭취하였다. HFD는 2개의 하위 그룹; 1 GLP-1 및 GLP-1의 보충없이 1 표준 HFD를 포함했다. GLP-1은 PBS에 용해되었고 0.1% BSA는 첨가되었다. GLP-1은 0.2 mg/kg BID 피하 투여되었다.

[0228] 분석. 16S RNA 미생물 분석은 연구의 -1일 및 27일에 수행되었다. 장골로부터의 샘플은 사이토카인 IFN  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL12p70, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 및 IL-10의 농도의 분석을 위해 맹장으로부터 약 2 cm를 채취하였고 액체 질소에서 급속 동결시켰다.

#### 결과

[0230] 비가중 단일 분석(unweighted unifrac analysis) 즉, 박테리아 종의 상대적인 풍부도. 연구의 개시(1일)시에, 4개의 그룹은 예상했던 것과 비교할 만한 미생물상을 가진다. 그러나, 4주의 치료 후 고지방 식이 공급 및 GLP-1(리라글루티드)의 중재적 치료로부터의 미생물은 대조군(비히클 처리된) 그룹과 유의하게 상이하였다(도 27A).

[0231] 장 미생물의 관찰된 변화는 아커만시아(*Akkermansia*) 및 알로프레보텔라(*Alloprevotella*)의 증가된 풍부도에 의해 주로 주도된다(도 27B). 장기 박테리아의 양의 증가는 더욱 건강하거나 또는 정상화된 미생물을 나타내는 것으로 간주된다. 공지된 짧은 사슬의 지방산은 내인성 GLP-1의 유도에 긍정적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

[0232] 놀랍게도, GLP-1(리라글루티드)의 항-염증 효능은 3개의 연구 그룹 사이의 임의의 사이토카인에 대해 장골 내 사이토카인의 농도에 통계적인 차이가 없었기 때문에 관찰되지 않았다.

### 실시예 5.

[0234] 경구 생체 이용률의 결정 및 NMRI 마우스로 4 mg/kg 투여의 단일 경구 위관 영양법(gavage)에 따라 hBD-2의 약물 동태학적 특성을 확립하기 위한 약물 동태학 연구.

### 재료 및 방법

[0236] 치료\_요법. 21마리의 암컷 NMRI 마우스는 투여 당일에 수득된 각각의 체중에 따라 위관 영양 튜브를 사용하여 경구 위관 영양법 5 ml/kg에 의해 투여되었다. 소변은 복부의 사타구니 부위를 부드럽게 마사지함으로써 무작위적 시점에서 샘플링되도록 하였다. 제 1의 혈액 샘플은 턱밑 아래 샘플링 방법을 사용하여 채취되었다. 제2의 혈액 샘플은 이소플루란(Isoflurane) 마취된 마우스로부터 수집되었다. 장 샘플은 안락사 후에 채취되었다. 각각의 마우스의 복부는 개방되었고 장의 3개의 부분(공장, 십이지장, 결장)은 샘플링되었다.

### 결과

[0238] hBD-2는 모든 값이 10 pg/ml 미만의 검출 수준 이하로서 임의의 혈청 또는 소변 샘플에서 HPLC에 의해 검출될 수 없었기 때문에 건강한 장으로부터 흡수되지 않는 것처럼 보인다. 이는 hBD-2가 마우스에서 4 mg/kg의 경구 투여 후 전신적으로 이용가능하지 않음을 나타낸다.

[0239] 경구 투여된 hBD2는 투여 후 360분까지 결장 내용물 내에 검출 가능하도록 남아있다(도 28).

### 실시예 6.

[0241] NMRI 암컷 마우스로 1 mg/kg hBD-2(분자량 66437 Da)에 대한 몰 당량의 피하 또는 정맥 내 투여에 따르는 인간 혈청 알부민의 C-말단(분자량 71.336 Da) 또는 N-말단(분자량 71.666 Da)에 융합된 hBD-2의 약물동력학적 프로파일의 조사 및 비교하기 위함.

### 재료 및 방법

[0243] 치료\_요법. 동물은 각각의 체중(30그램 마우스의 경우 300 μL)에 따르는 1.65 mg/ml의 스톡(stock) 농도의 10 ml/kg을 투여되었다. 제 1의 혈액 샘플은 턱밑 아래 샘플링 방법을 사용하여 취득하였고 제 2의 샘플은 이소플루란 마취 및 안락사를 사용하였다.

### 결과

[0245] hBD-2는 1시간의 반감기를 나타내었고 2개의 융합된 단백질은 12시간의 반감기를 나타내었다. AUC는 극적으로 변경되었다. 신장 제거는 또한 hBD-2의 경우 10ml/min(도 29)로부터 2개의 융합 단백질의 경우 0.5-2.2 ml/min 으로 변경되었다(도 30, 31)

[0246] 실시예는 hBD2의 반감기가 알부민에 대한 C- 또는 N-말단 접합에 의해 현저하게 연장될 수 있음을 입증한다.

### 실시예 7.

[0248] 마우스의 급성 10일 텍스트란 나트륨 설페이트 (DSS) 유도 대장염 모델에서 "hBD-2-알부민 융합 N-말단"의 항-염증 효과를 결정 및 평가하기 위함.

### 재료 및 방법

[0250] 치료\_요법. "hBD-2-알부민 N-말단"은 꼬리 정맥(vein)을 통해 정맥 내 투여되었거나 또는 10 ml/kg 체중의 투여 용량으로 평균 25G 바늘을 사용하여 피하에 투여되었다. 동물은 실행의 10일 동안 매일 1용량으로 투여받았다.

활성 대조군인 텍사메타존(DEX)은 10 ml/kg 체중 OD의 투여 용량의 1 mg/kg의 용량으로 피하 투여되었다.

## [0251] 결과

"hBD-2 알부민 N-말단"으로의 치료는 정맥 내 경로를 통해 1.65 mg/kg의 용량으로 투여되었을 때 질환 활성 지수(DAI)의 유의한 저해를 야기하였다( $p<0.05$ ). 또한, 10일에 "hBD-2 알부민 N-말단"은 각각 1.65 mg/kg의 용량 및 125 mg/kg의 용량으로 피하로 매일 투여되었을 때 DAI 점수의 유의한 저해가 관찰되었다( $p<0.05$ ).

[0253] 텍스트란 나트륨 설페이트의 투여는 조직학적 검사 후 입증된 바와 같이 결장 조직의 유의한 염증 및 손상을 야기하였다. "hBD-2 알부민 N-말단"의 치료는 상기 조직학적 손상의 임의의 통계적으로 유의한 감소를 야기하지 않았지만, 유사하게 활성 대조군 DEX는 조직학적 손상을 유의하게 감소시키지 못했다.

[0254] 결과는 2일 및 3일째에 체중의 일시적인 감소에도 불구하고 "hBD-2 알부민 N-말단"으로 치료된 동물에서 7일째 체중의 유의한 증가를 보여주었다. 대조적으로, DEX 처리 동물은 5일째부터 체중의 매우 유의한 감소를 보였다 ( $p<0.01$ ). 이는 "hBD-2 알부민 N-말단"이 정상적인 미생물을 유지하고 이에 따라 체중 보존 효과를 가진다는 것을 나타낸다.

[0255] 실시예는 hBD2-알부민 융합 N-말단이 염증성 상태의 동물 모델에서 생물학적으로 활성이 있음을 입증한다.

## [0256] 실시예 8.

[0257] 마우스의 급성 10일 텍스트란 나트륨 설페이트(DSS) 유도 대장염 모델에서 "hBD-2-알부민 융합 C-말단"의 항-염증 효과를 측정 및 평가하기 위함.

## [0258] 재료 및 방법

[0259] 치료 요법. "hBD-2-알부민 C-말단"은 꼬리 정맥을 통해 정맥 내 투여되었거나 또는 10 ml/kg 체중의 투여 용량으로 멸균 25G 바늘을 사용하여 피하에 투여되었다. 동물은 실행의 10일 동안 매일 1용량으로 투여받았다. 활성 대조군인 프레드니솔론(Pred)은 10 ml/kg 체중 OD의 투여 용량의 1 mg/kg의 용량으로 위관 영양법에 의해 경구로 제공되었다.

## [0260] 결과

[0261] "hBD-2-알부민 C-말단"으로의 치료는 정맥 내 경로를 통해 1.6 mg/kg의 용량으로 매일 투여되었을 때 DAI의 유의한 저해를 야기하였다( $p<0.05$ ). 또한 "hBD-2-알부민 C-말단"은 정맥 내 경로를 통해 1.6 mg/kg의 용량으로 0, 2, 4, 6, 8 및 10일의 격일로 투여되었을 때 DAI의 유의한 저해를 야기하였다( $p<0.05$ ). 프레드니솔론으로의 매일의 치료는 9일째에 DAI의 유의한 저해를 야기하였다( $p<0.05$ ).

[0262] 텍스트란 나트륨 설페이트의 투여는 조직학적 검사 후 입증된 바와 같이 결장 조직의 유의한 염증 및 손상을 야기하였다. 1.6 mg/kg의 용량으로 "hBD-2-알부민 C-말단"으로의 치료는 상기 조직학적 손상의 통계적으로 유의한 감소를 야기하였다( $p<0.05$ ). 유사하게도, 2, 4, 6, 8, 및 10일에 1.6 mg/kg 및 16.5 mg/kg의 용량으로 "hBD-2-알부민 C-말단"으로의 매일의 치료는 결장의 근위부(proximal part)에서 조직 손상을 유의하게 감소시키지 못했지만 말초(distal) 결장의 손상을 감소시켰다( $p<0.01$ ).

[0263] 결과는 추가로 "hBD-2-알부민 C-말단"으로 치료된 동물에서 체중의 유의한 증가를 보여주었다( $p<0.05$ ). 이는 "hBD-2-알부민 C-말단"이 정상적인 미생물을 유지하고 이에 따라 체중 보존 효과를 가진다는 것을 나타낸다.

[0264] 실시예는 hBD2-알부민 융합 C-말단이 염증성 상태의 동물 모델에서 생물학적으로 활성이 있음을 입증한다.

[0265]

## 실시예 9. 서열

서열 번호	명칭	서열
1	소 베타 디펜신 2	GVGNPVSCVRNKGICVPIRCGSMKQIGTCVGRAVKCCRK
2	닭 베타 디펜신 2	LFCKGGSCHFGGCPHLIKVGSCFRSCKWPWNA
3	오랑우탄 베타 디펜신 2	VFGDISNPVTCLRSGAICHPGFCPRRYKHIGTCGLSVIKCKKP
4	hBD1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK
5	hBD2	GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
6	hBD3	GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK
7	hBD4	ELDRICGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK
8	HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
9	HD6	AFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL
10	침팬지 베타 디펜신 2	GISDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
11	마카크 베타 디펜신 2	GIGDPVTCLKNGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
12	마우스 베타 디펜신3	KINNPVSCLRKGGRCWNRIGNTRQIGSCGVPFLKCCRK
13	말 베타 디펜신 2	GIGNPISCARNRGVCIPIGCLPGMKQIGTCGLPGTKCCRK
14	돼지 베타 디펜신 1	NIGNSVSCLRNKGVCMPPGKCAPKMHQIGTCGMPQVKCCRK
15	염소 베타 디펜신 2	GIINHRSCYRNKGVCAPARCPRNMRQIGTCHGPPVKCCRK
16	인간 LL37	LLGDFFRKSKFKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
17	절단된 hBD2	PVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP

[0266]

## 참조 문헌

[0267]

Ajslev TA, et al, 2014. Trends in parent-child correlations of childhood body mass index during the development of the obesity epidemic. PLoS One 9(10).

[0268]

Angelakis E and Raoult D, 2010. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. PLoS One 5(5).

[0269]

Angelakis E., et al 2012. An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight, the intestinal microbiome and metabolism in mice. Microb Pathog 52(1):61-8.

[0270]

Armogida SA, et al, 2004. Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. Allergy Asthma Proc. 25(5):297-304.

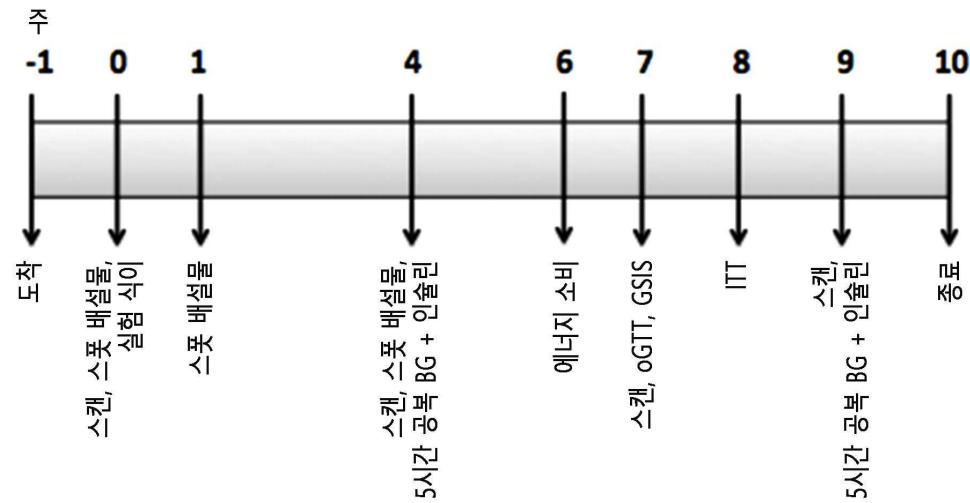
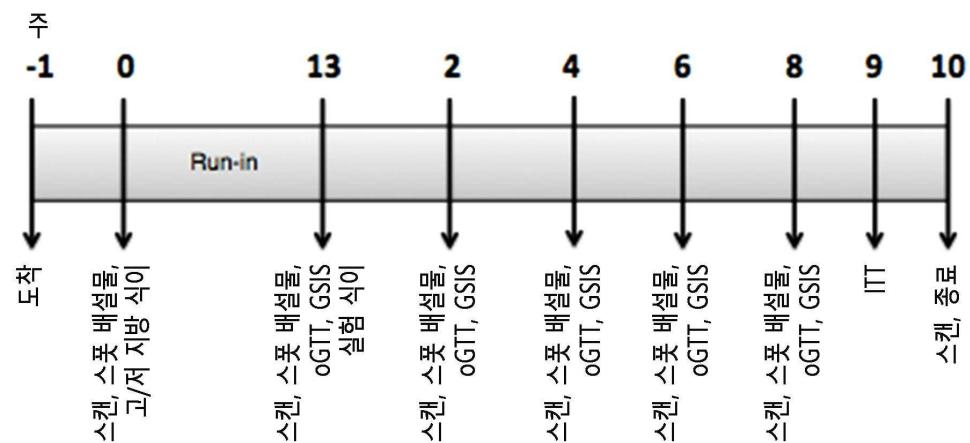
[0271]

Backhed F, et al, 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free

- mice. Proc Natl Acad Sci USA 104(3):979-84.
- [0273] Belkaid W and Hand TW, 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell 157(1):121-41.
- [0274] Bowie JU and Sauer RT, 1989. Identifying determinants of folding and activity for a protein of unknown structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156;
- [0275] Chassaing B, et al, 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. Nature 519(7541):92-6.
- [0276] Cunningham BC and Wells JA, 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. Science 244: 1081-1085.
- [0277] Derbyshire KM, Salvo JJ and Grindley ND, 1986. A simple and efficient procedure for saturation mutagenesis using mixed oligodeoxynucleotides. Gene 46:145-152.
- [0278] Everard A and Cani PD, 2013. Diabetes, obesity and gut microbiota. Best Pract Res Clin Gastroenterol 27(1):73-83.
- [0279] Faulds MH and Dahlman-Wright K, 2012. Metabolic diseases and cancer risk. Curr Opin Oncol. 24(1):58-61.
- [0280] Favre-Godal Q, et al, 2014. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. Phytochemistry. 105: 68-78.
- [0281] Feng Q, et al, 2015. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Nat Commun 6:6528.
- [0282] Giannouli M, et al. Use of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* as an in vivo model to study the virulence of *Helicobacter pylori*. 2014. BMC Microbiol14: 228.
- [0283] Hilton DJ, et al, 1996. Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. J. Biol. Chem. 271: 4699-4708.
- [0284] Khan M, et al, 2007. Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens. Br Poult Sci 48(6):732-5.
- [0285] Koren O, et al, 2012. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. Cell 150(3):470-80.
- [0286] Le Chatelier E et al. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature 500(7464):541-6.
- [0287] Leviten M, 2016. The Finnish connection. Biocentury Innovations, June 16.
- [0288] Liu hY et al, 2008. Suppression of hepatic glucose production by human neutrophil  $\alpha$ -defensin through a signaling pathway distinct from insulin. The Journal of Biological Chemistry 283(18):12056-12063.
- [0289] Lowman HB, Bass SH, Simpson N and Wells JA, 1991. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. Biochem 30:10832-10837.
- [0290] Mowat AM and Agace WW, 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. Nat Rev Immunol. 14(10):667-85.
- [0291] Needleman SB and Wunsch CD, 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48: 443-453.
- [0292] Ner SS, Goodin DB and Smith M, 1988. A simple and efficient procedure for generating random point mutations and for codon replacements using mixed oligodeoxynucleotides. DNA 7:127-134.
- [0293] Neurath H and Hill RL, 1979. The Proteins. Academic Press, New York.
- [0294] Qin J, et al 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature

490(7418):55-60.

- [0295] Reidhaar-Olson JF and Sauer RT, 1988. Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241:53-57;
- [0296] Gennaro AR, 1990. Remington 's Pharmaceutical Sciences. Ed. Mack Publishing Co., Easton, PA.
- [0297] Rice P, Longden I and Bleasby A, 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16: 276-277.
- [0298] Ridaura VK, et al, 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341(6150):1241214.
- [0299] 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.
- [0300] Suez J, et al, 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 514(7521):181-6.
- [0301] Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM and Blaser MJ, 2012. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes (Lond)* 37(1):16-23.
- [0302] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER and Gordon JI, 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.
- [0303] Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L and Gordon JI, 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3(4):213-23.
- [0304] Vrieze A, et al 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterol* 143(4):913-6.
- [0305] Walter, 2015. Murine gut microbiota-diet trumps genes. *Cell Host Microbe* 17(1):3-5.
- [0306] Wehkamp J, et al, 2002. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig Dis Sci.* 47(6):1349-55.
- [0307] Zhang X, et al, 2015. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med* 21(8):895-905.
- [0308] 그리고 하기의 특허 및 특허 출원:
- [0309] WO 2010/007166
- [0310] WO 92/06204
- [0311] WO 95/17413
- [0312] WO 95/22625
- [0313] US 5,223,409

**도면****도면1a****도면1b****도면2**

HBD1            -----DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGT CYRGKAKCCK-----  
 HBD2            ---GIGDPVTCLKSGAICHCPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP-  
 HBD3            GI INTLQKYCVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRKK  
 HBD4            -----ELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYRIGRCPN-TYACCLRK-  
\*   .   \*   \*   \*   \*\*

**도면3**

HD5            -ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR  
 HD6            AFTCHCRR-SCYSTEYSYGTCTVMGINHRCFCL  
\*\* : \*\*   \* : \*   \* . \* : \*   : \* : \*\*

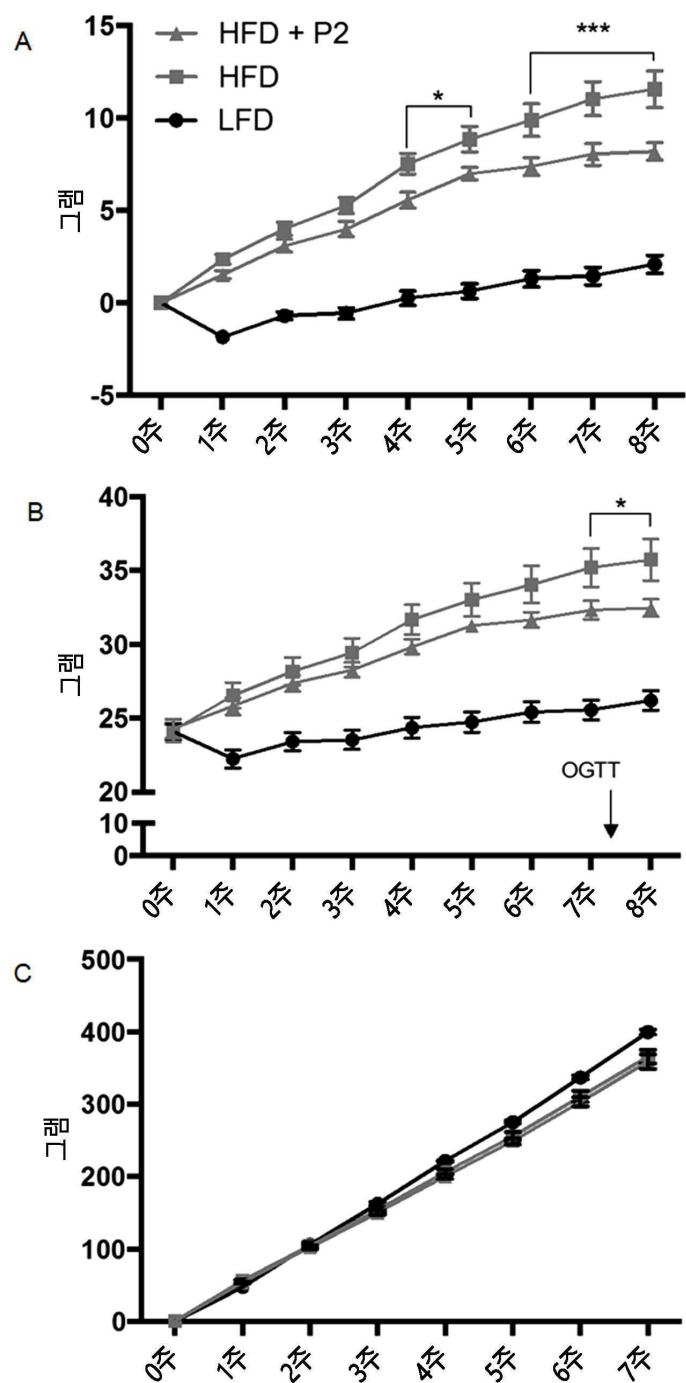
**도면4**

HN P2	-CYCRI PACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC
HN P3	DCYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC
HN P1	ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC *****

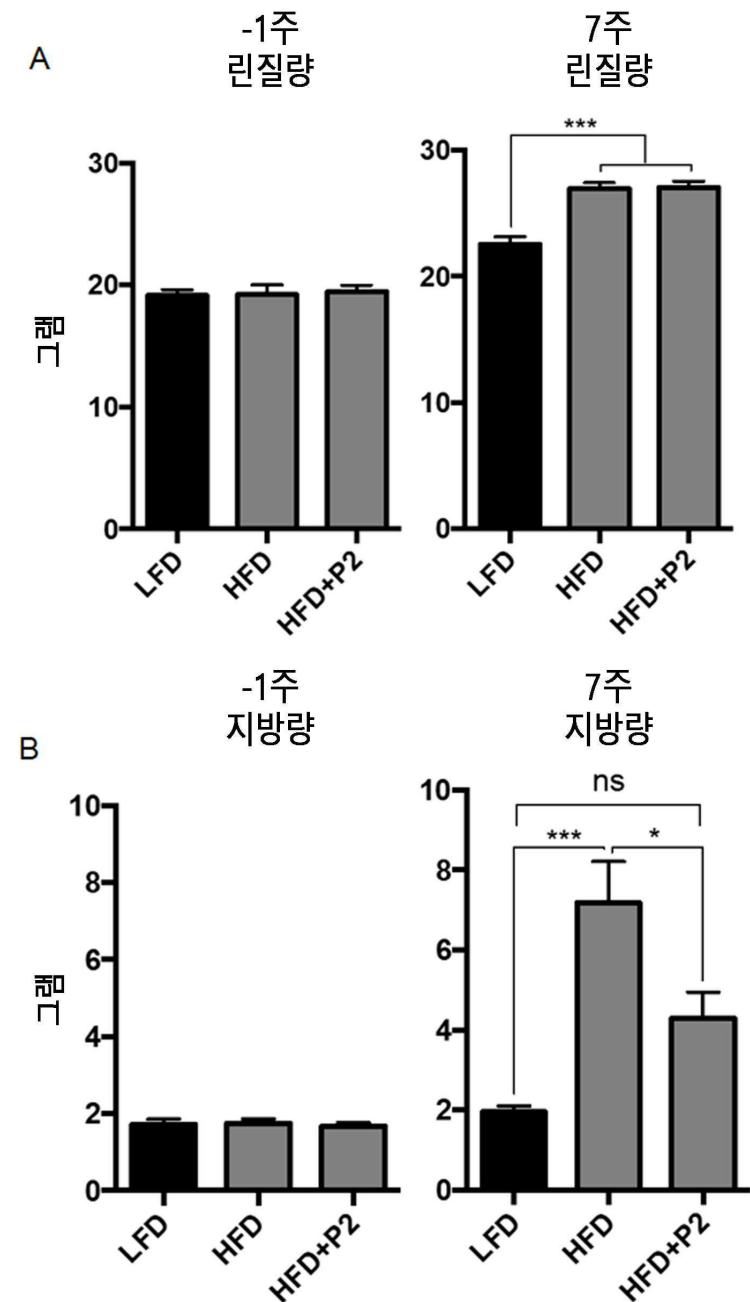
**도면5**

hBD2	---GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKP---
침팬지	---GISDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKP---
마카크	---GIGDPVTCLKNGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKP---
오랑우탄	---VFGDISNPVTCLRSGAICHPGFCPRRYKHIGTCGLSVIKCCKP---
염소	---GIINHRSCYRNKGVCAPARCPRNMRQIGTCHGPPVKCCRK---
소	---GVGNPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKCCRK---
말	---GIGNPIASCARNRGVCIPIGCLPGMKQIGTCGLPGTKCCRK---
돼지	---NIGNSVSCLRNGVCMPGKCAPKMKQIGTCGMPQVKCCRK---
마우스	---KINNPVSCLRKGGRCWNR-CIIGNTRQIGSCGPFLKCCRK---
닭	-----LFCKGGSCHFGGCPSPHLIKVGSCFR---SCCKWPWNA .....* * :*: * .**:

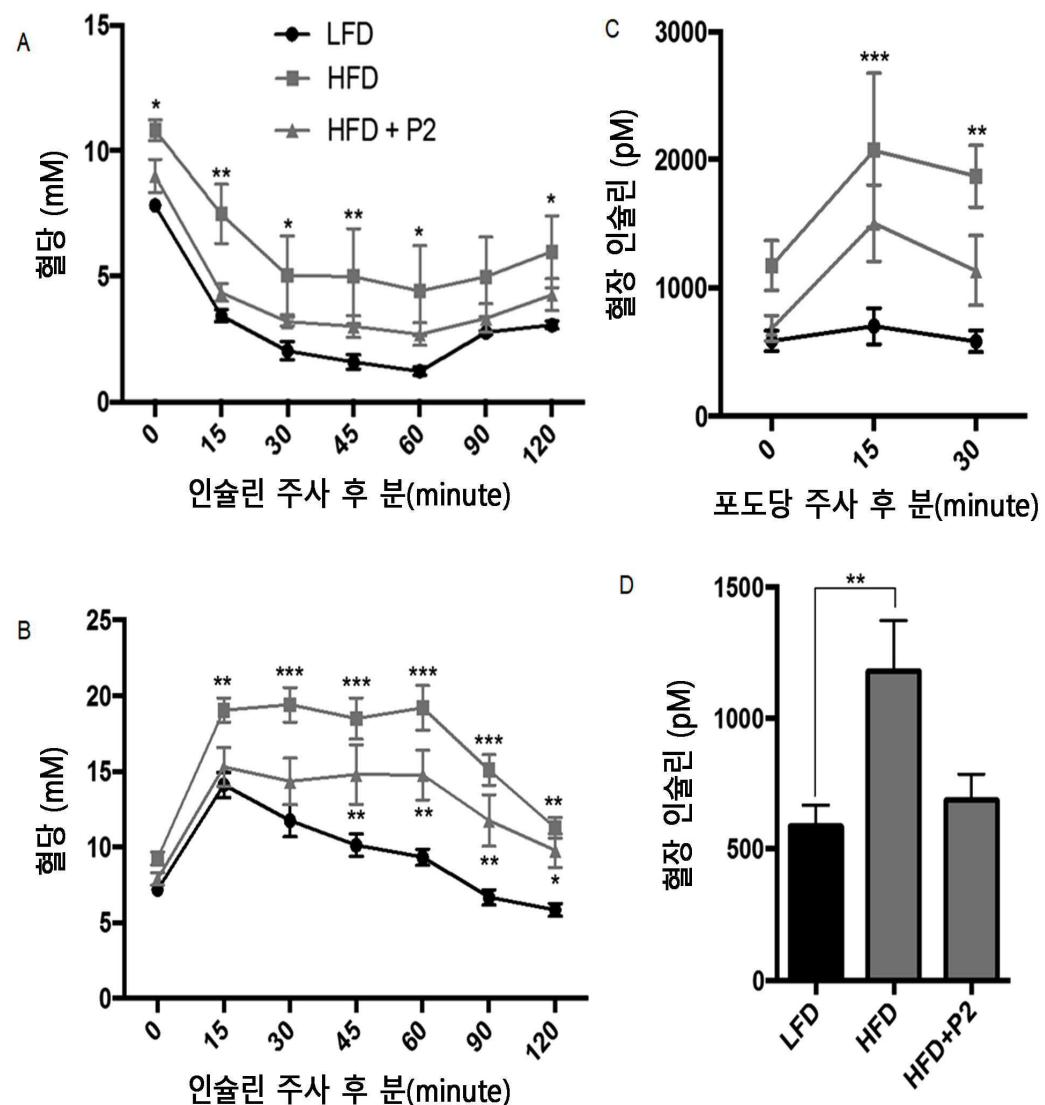
## 도면6



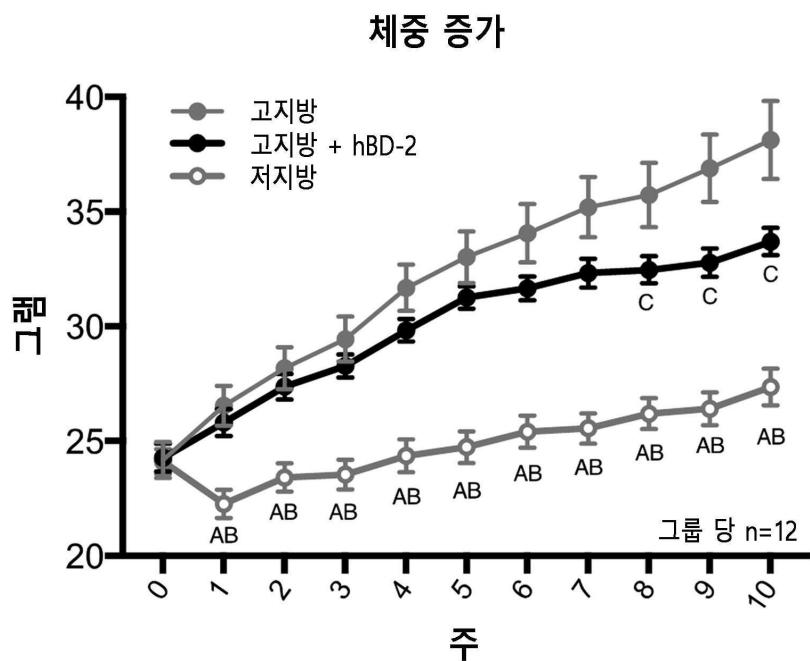
## 도면7



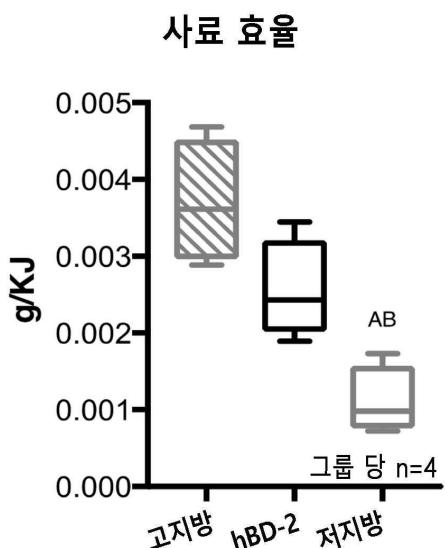
## 도면8



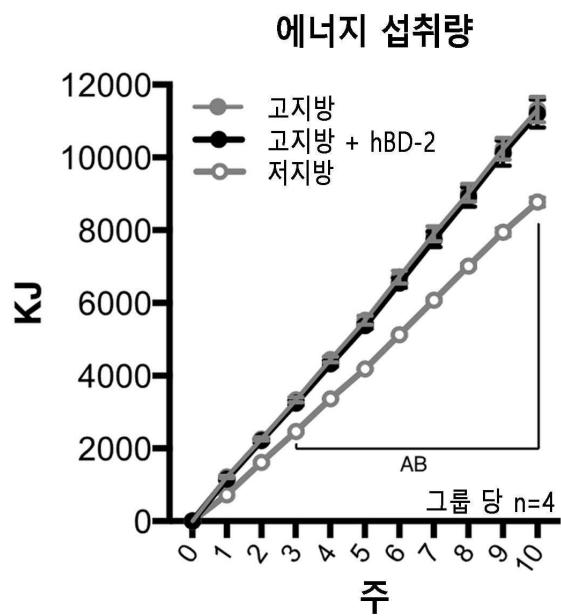
도면9a



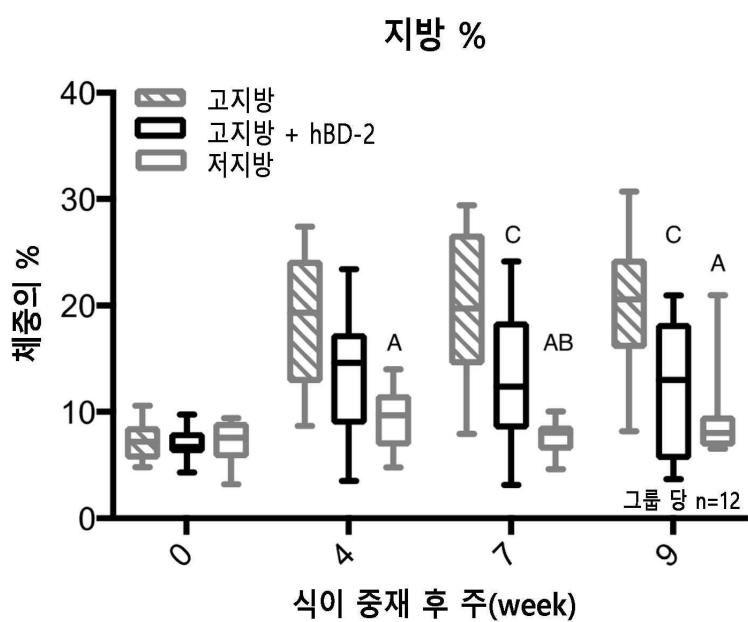
도면9b



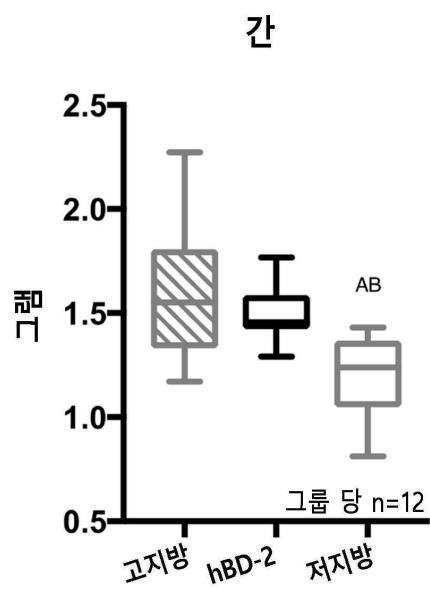
도면9c



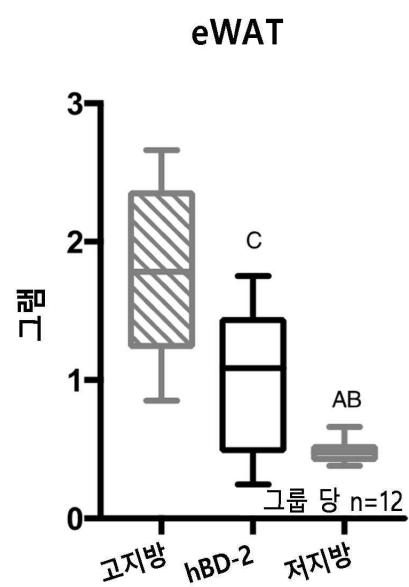
도면10a



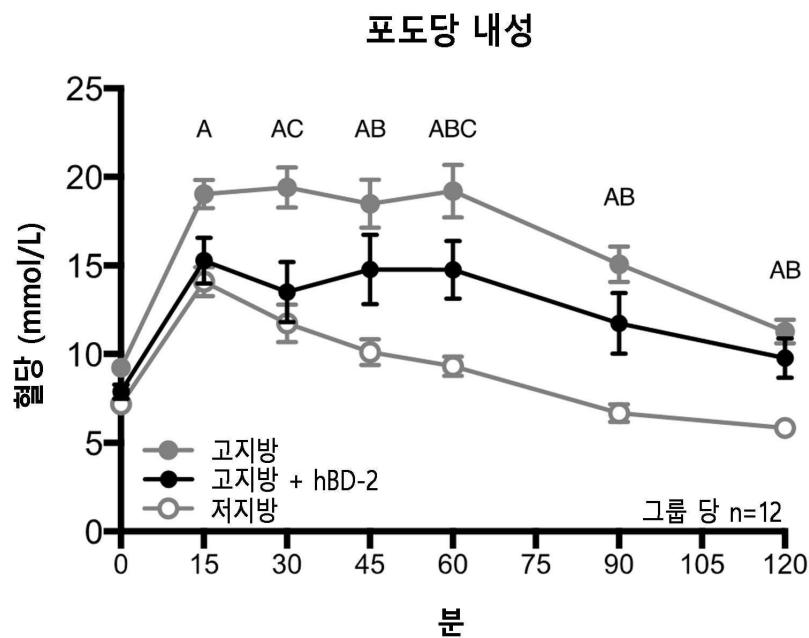
도면10b



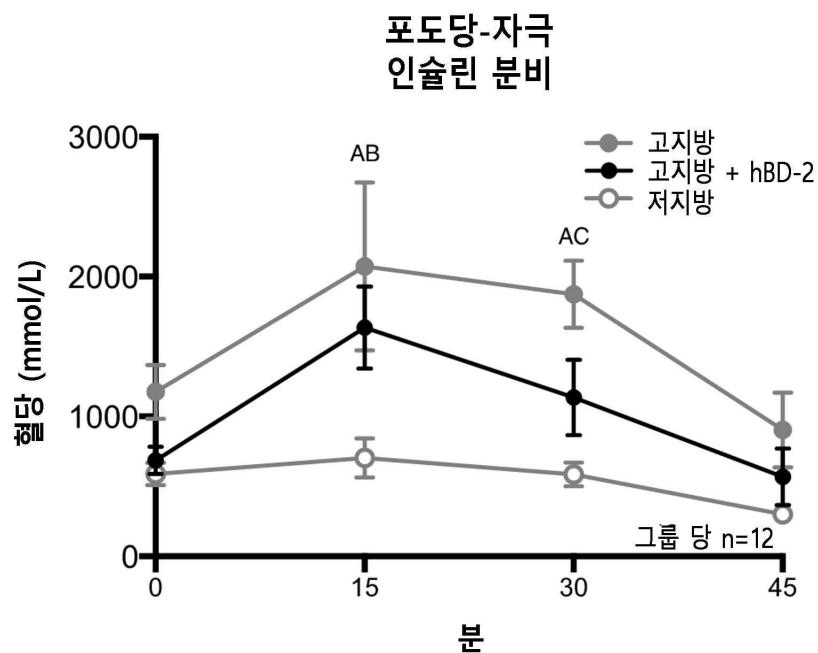
도면10c



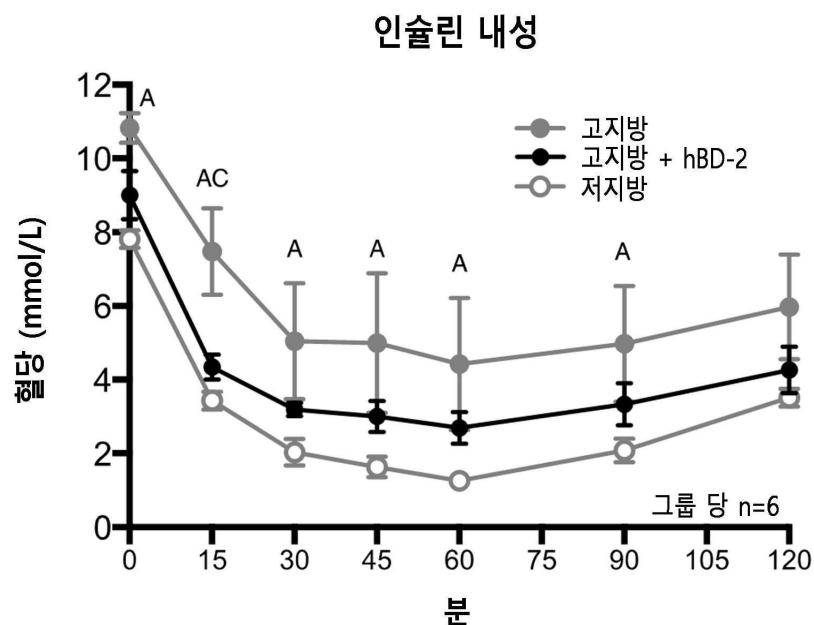
도면11a



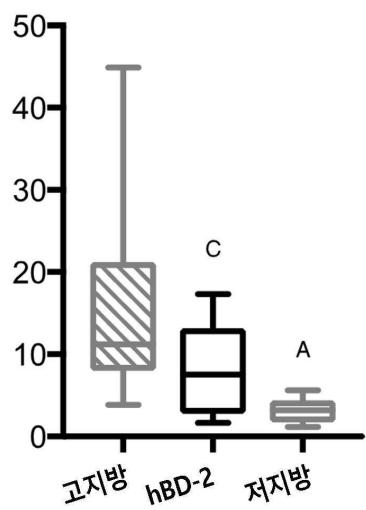
도면11b



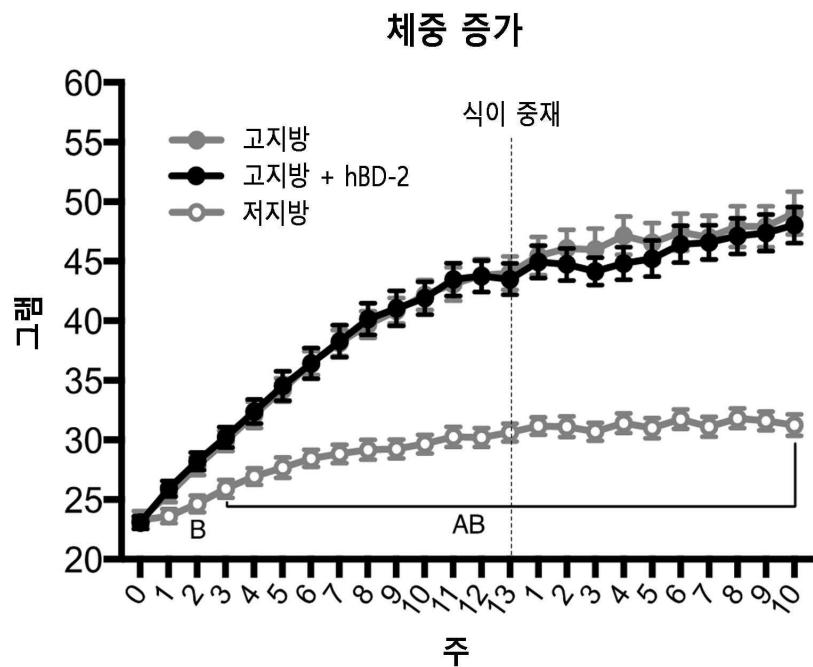
도면12a



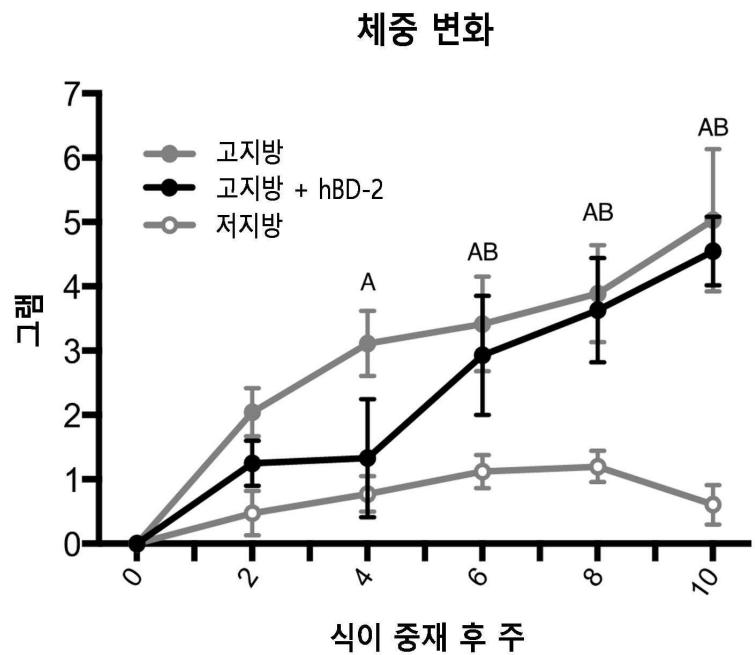
도면12b

**HOMA-IR**

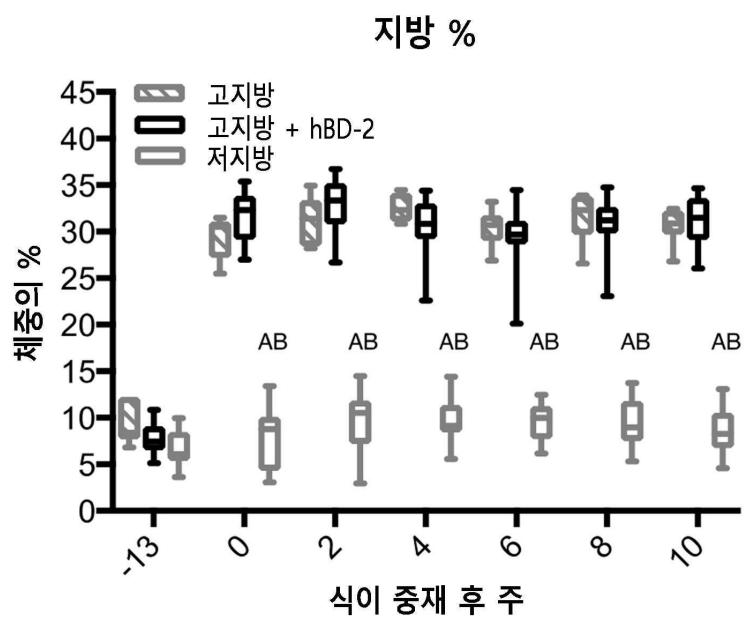
도면13a



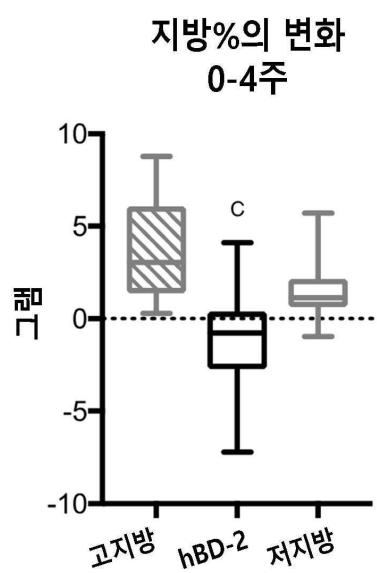
도면13b



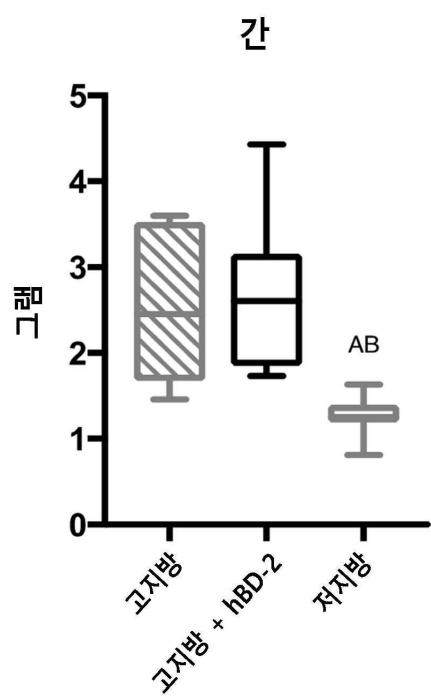
도면14a



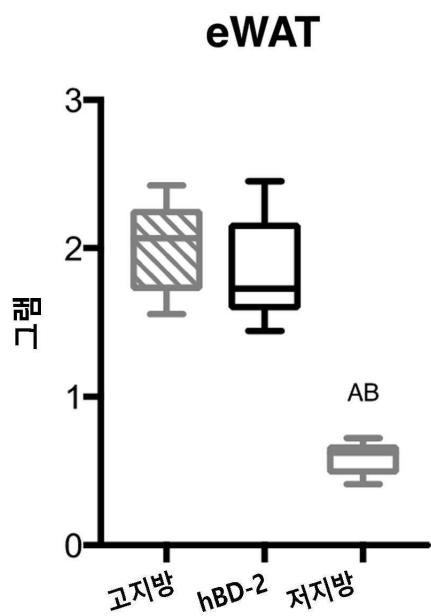
도면14b



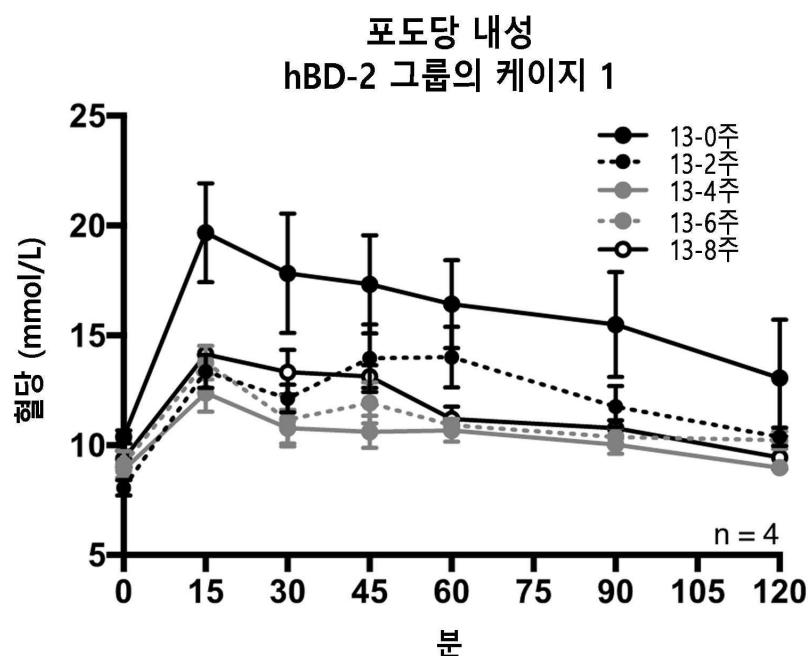
도면15a



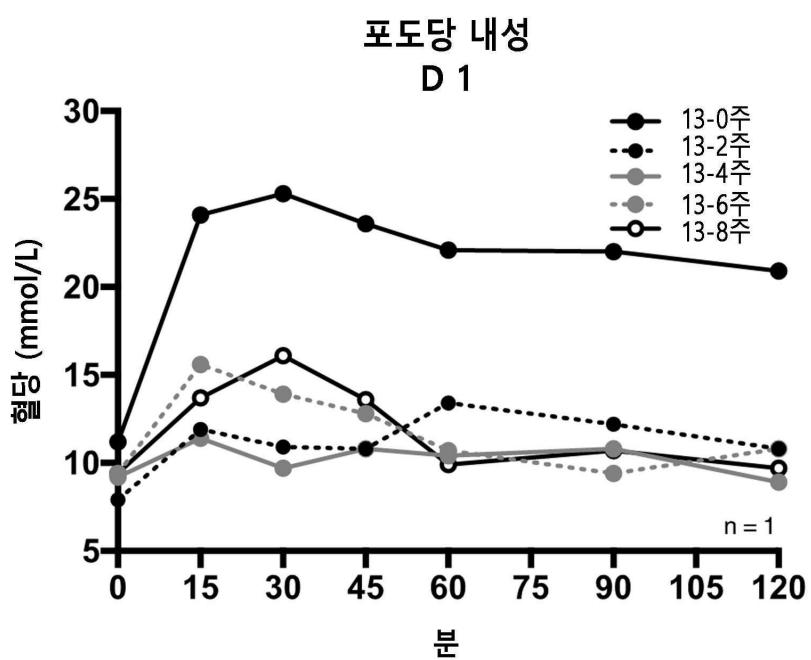
도면15b



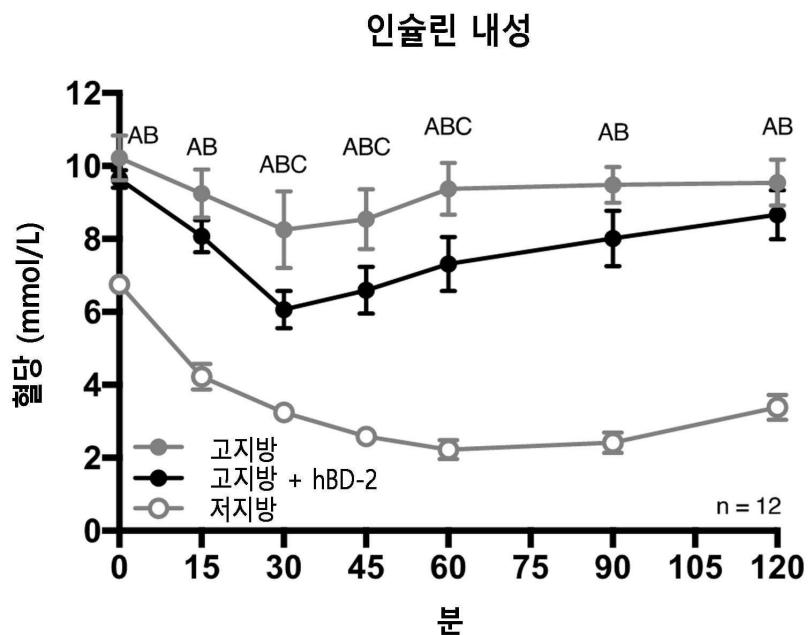
도면16a



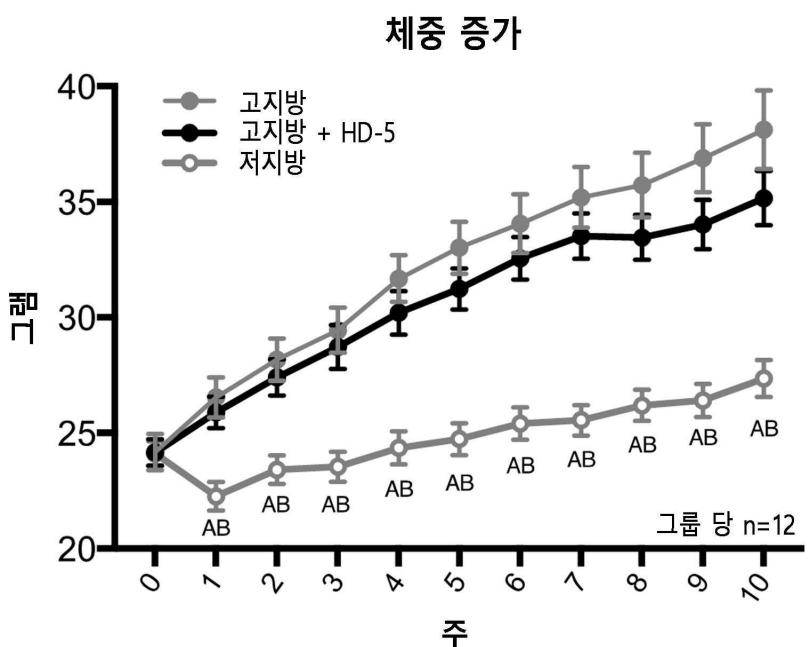
도면16b



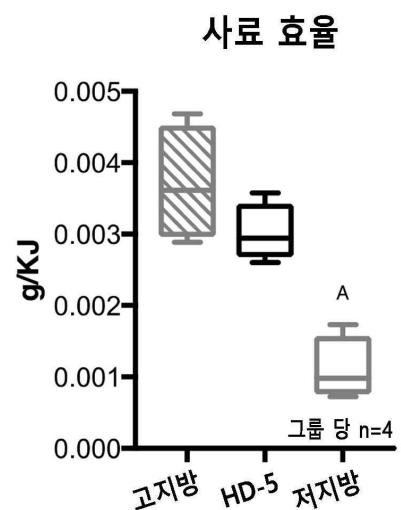
도면16c



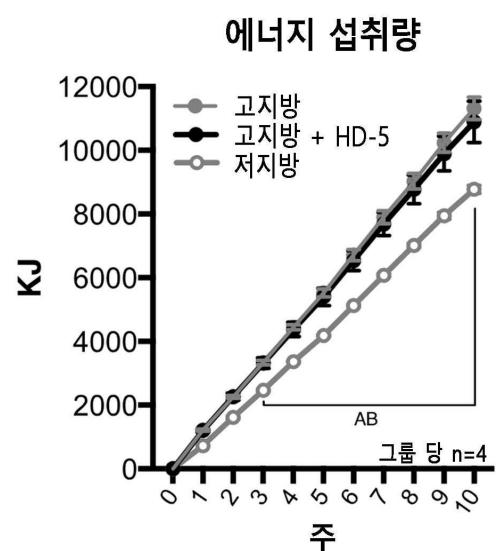
도면17a



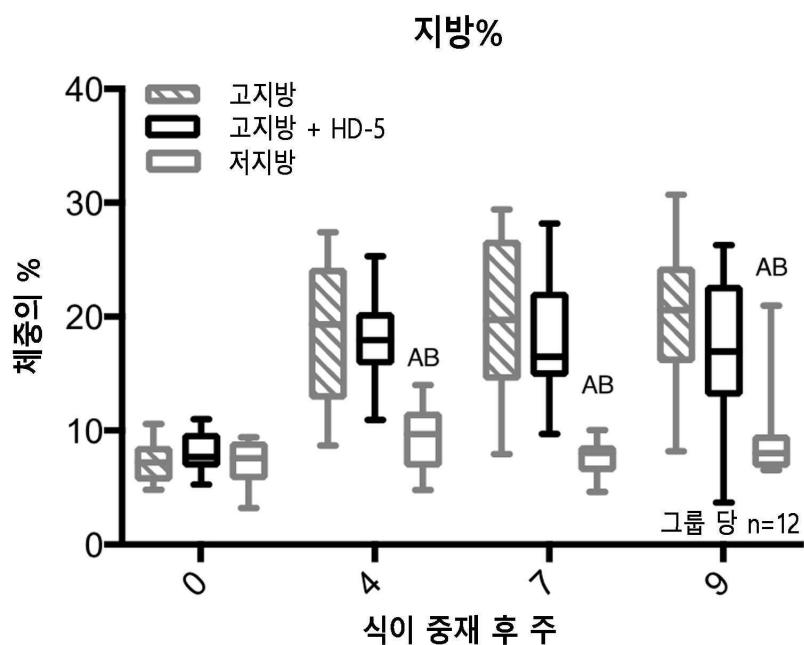
도면17b



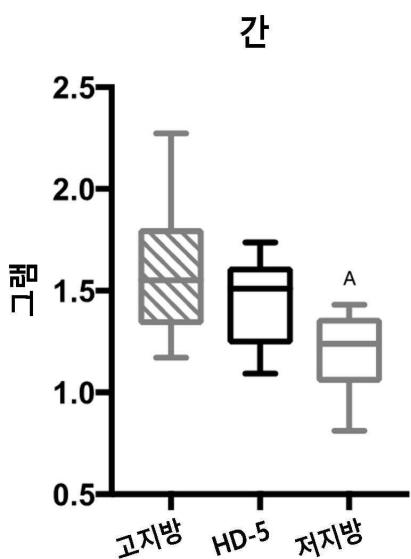
도면17c



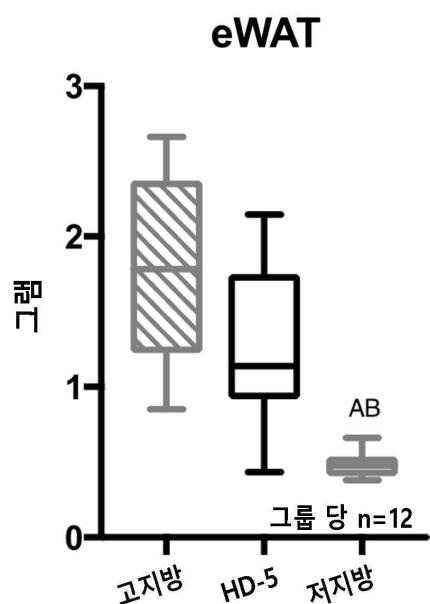
도면18a



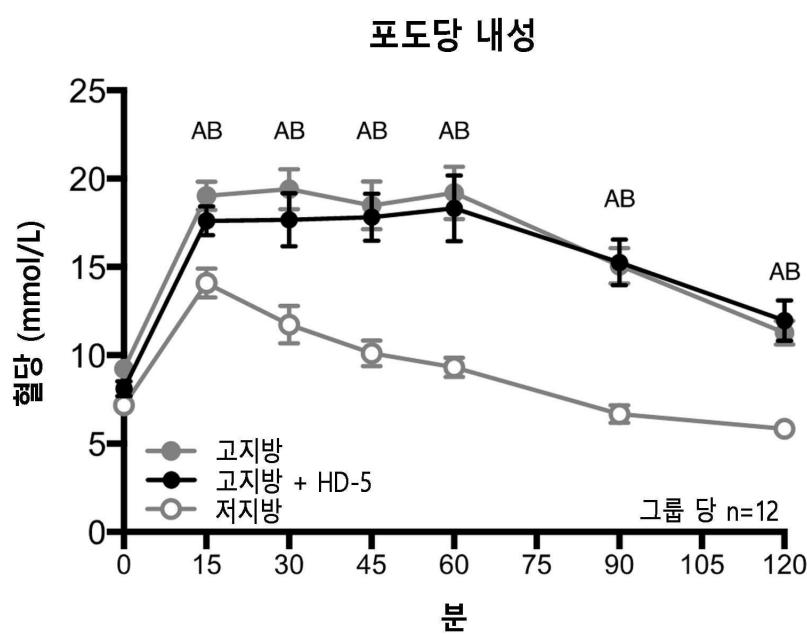
도면18b



도면18c

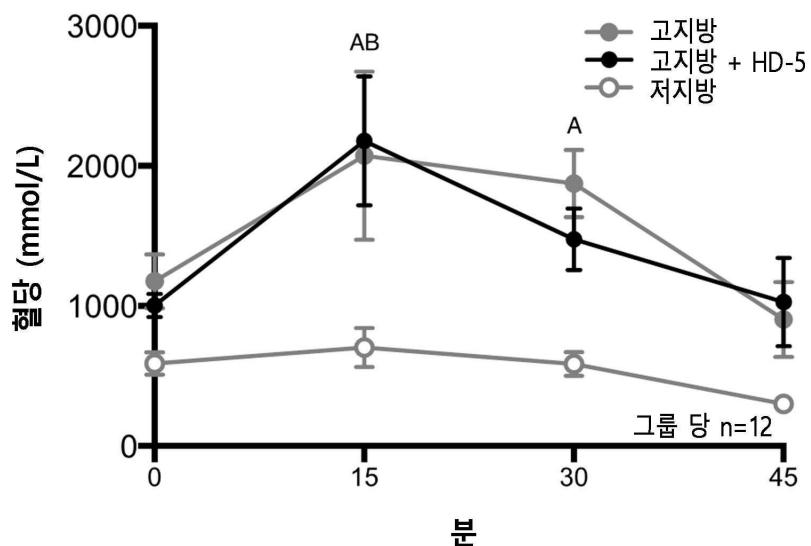


도면19a



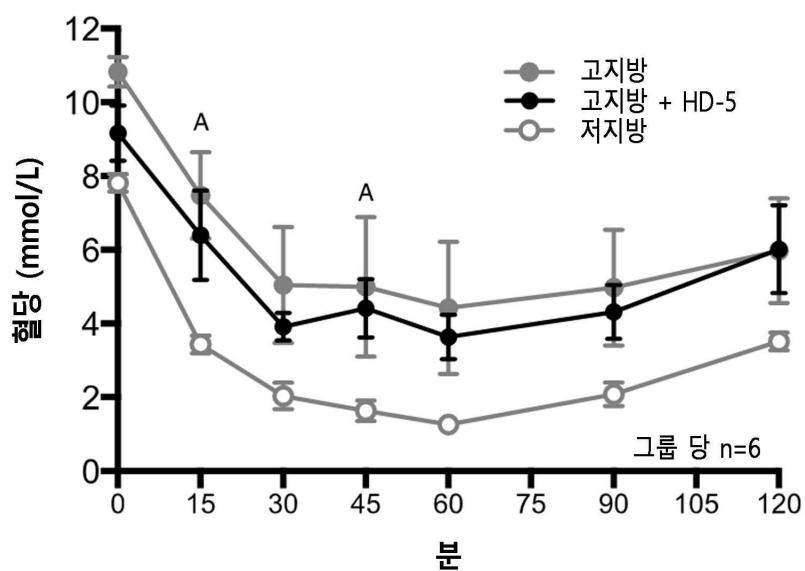
도면19b

## 포도당-자극 인슐린 분비

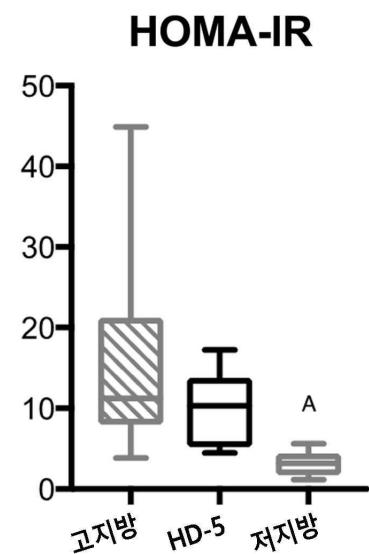


도면20a

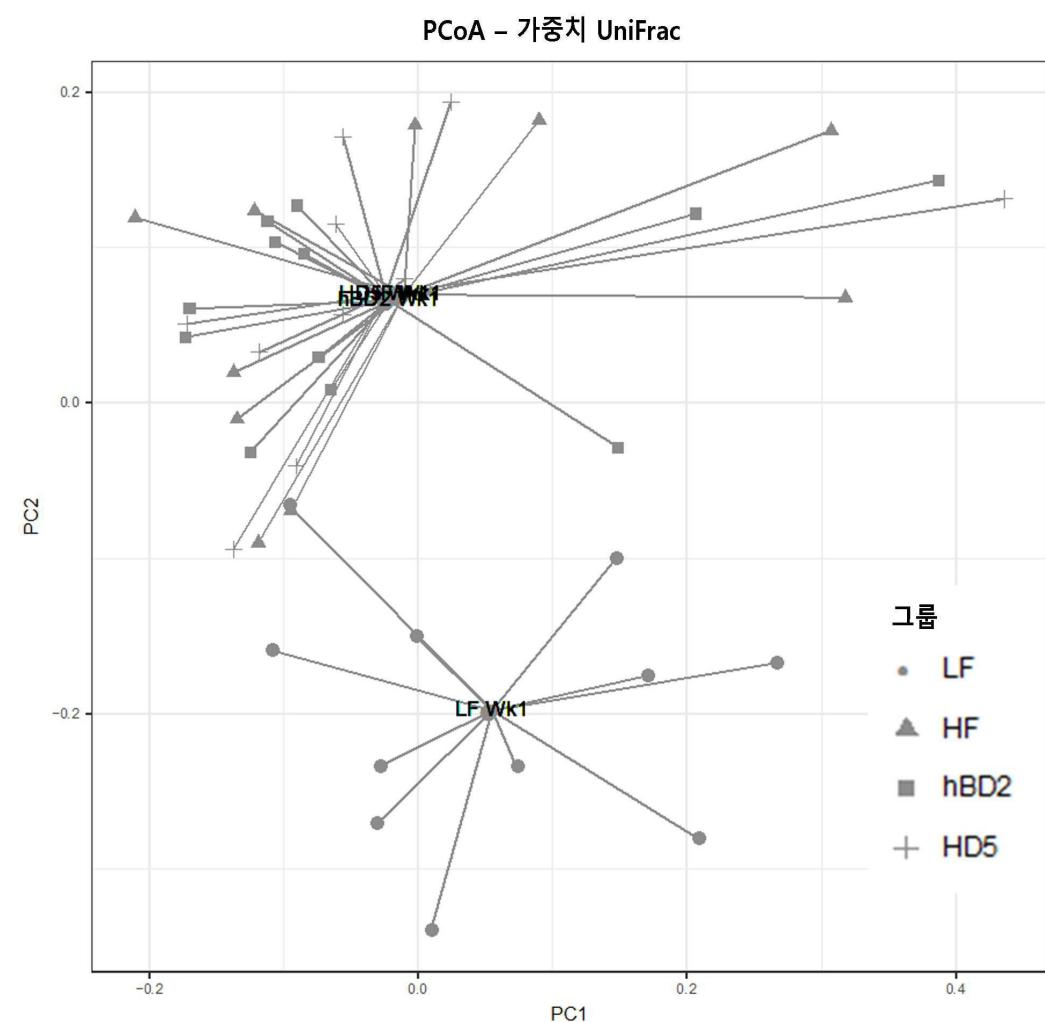
## 인슐린 내성



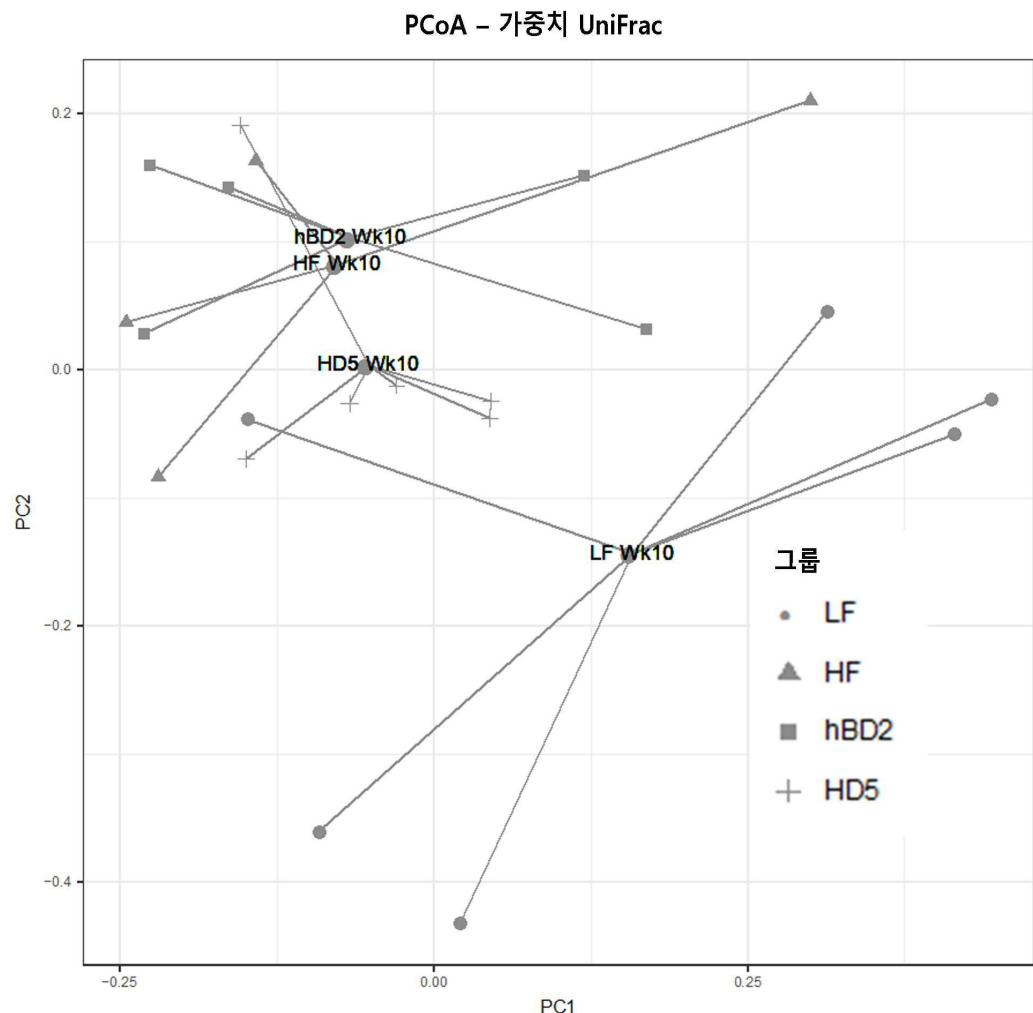
도면20b



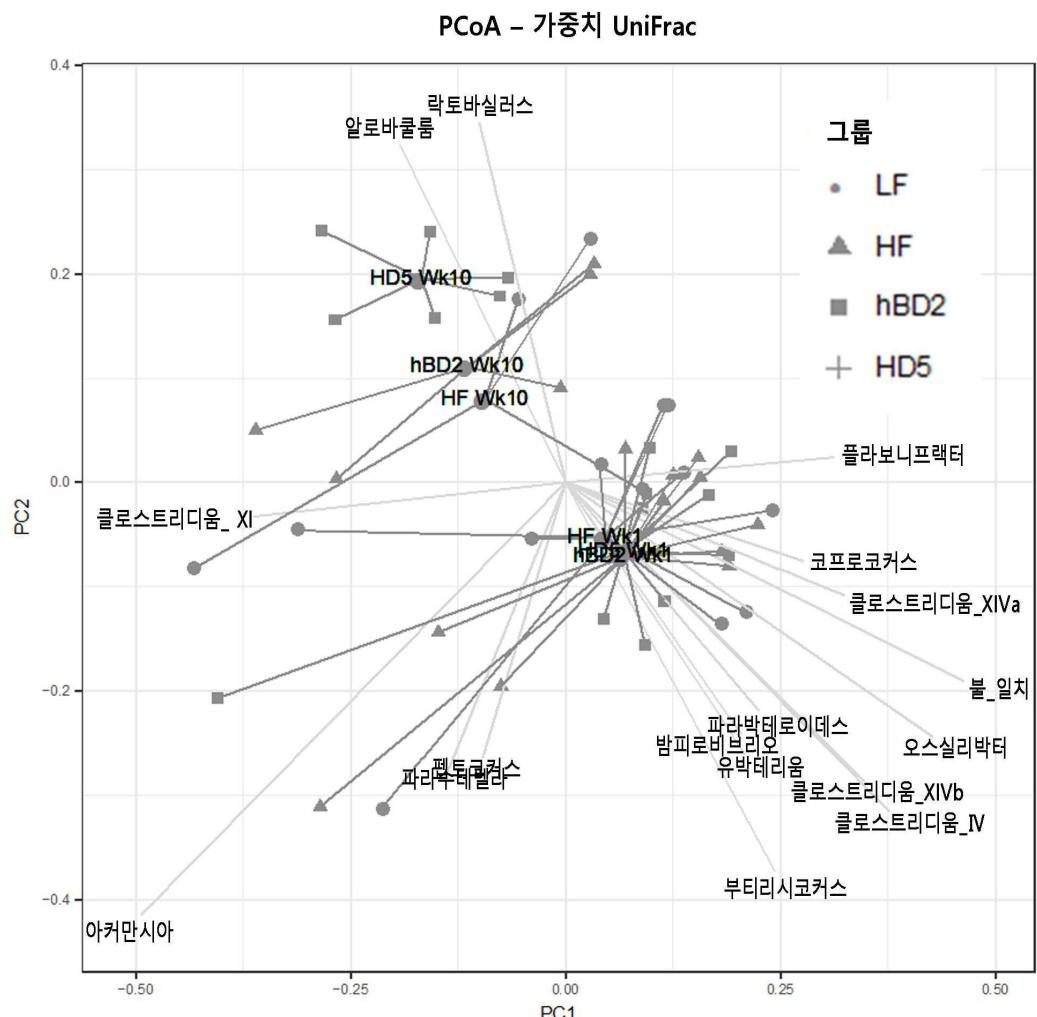
도면21a



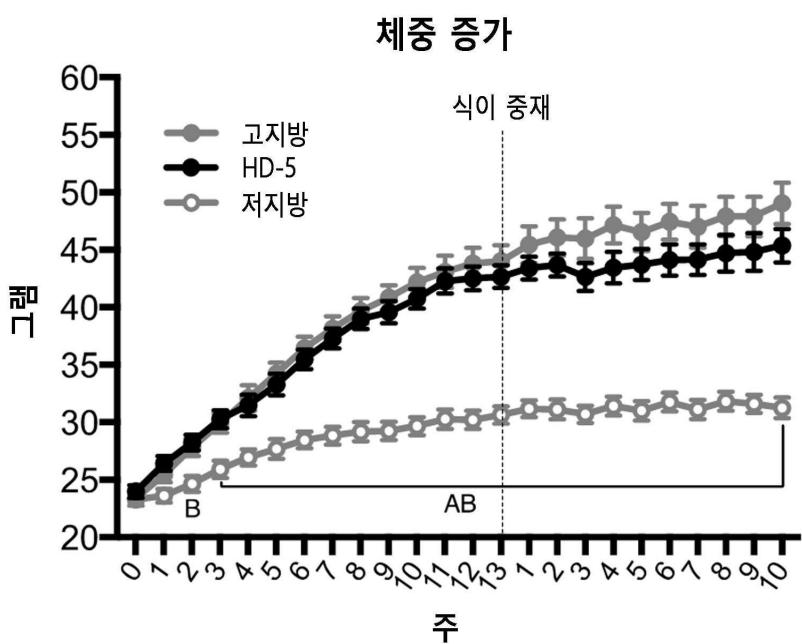
## 도면21b



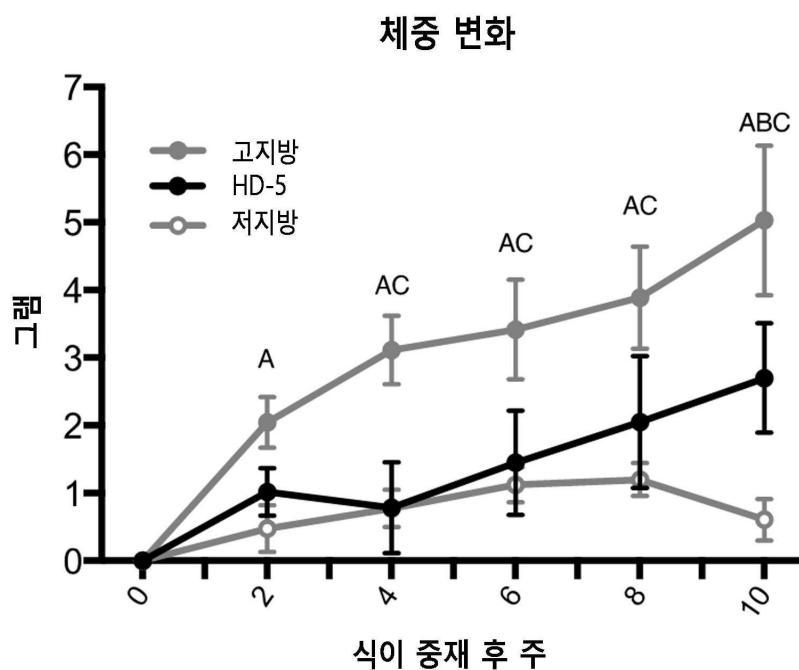
## 도면21c



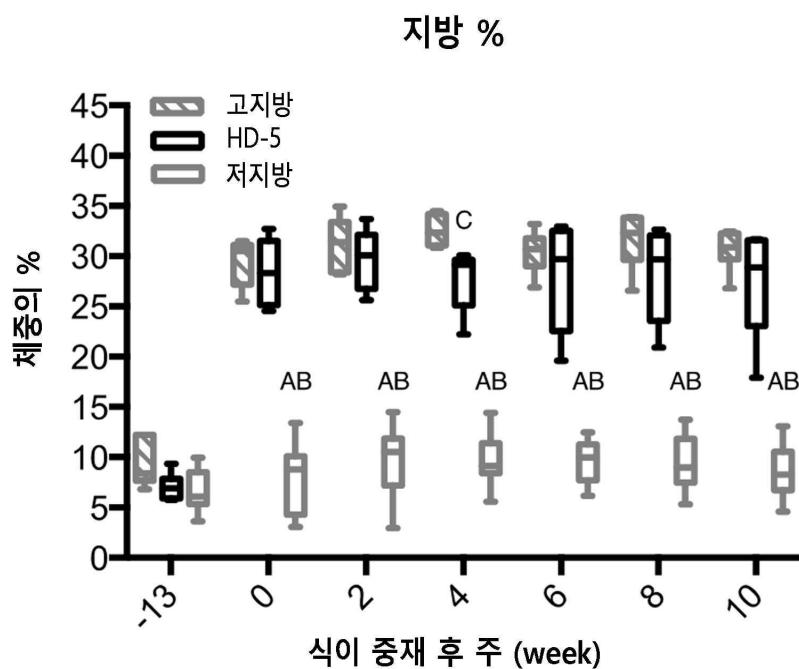
## 도면22a



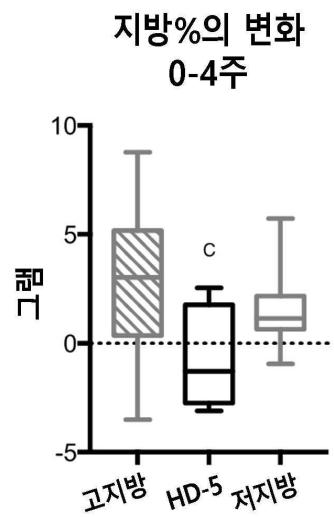
도면22b



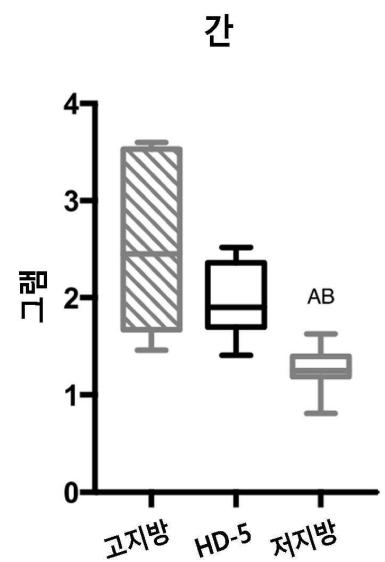
도면23a



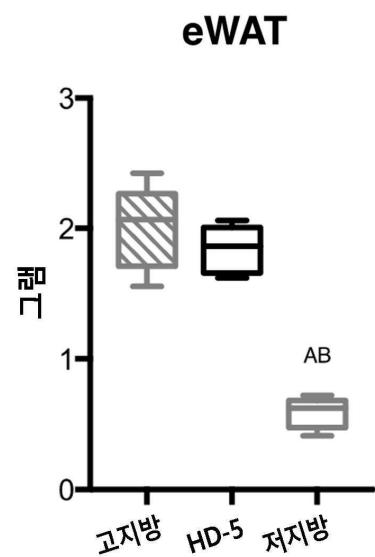
도면23b



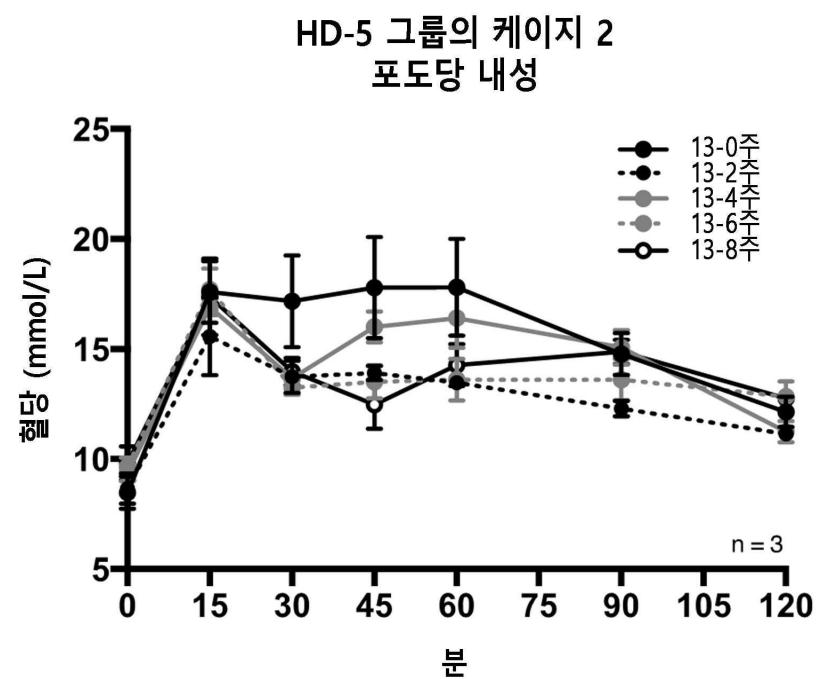
도면24a



도면24b

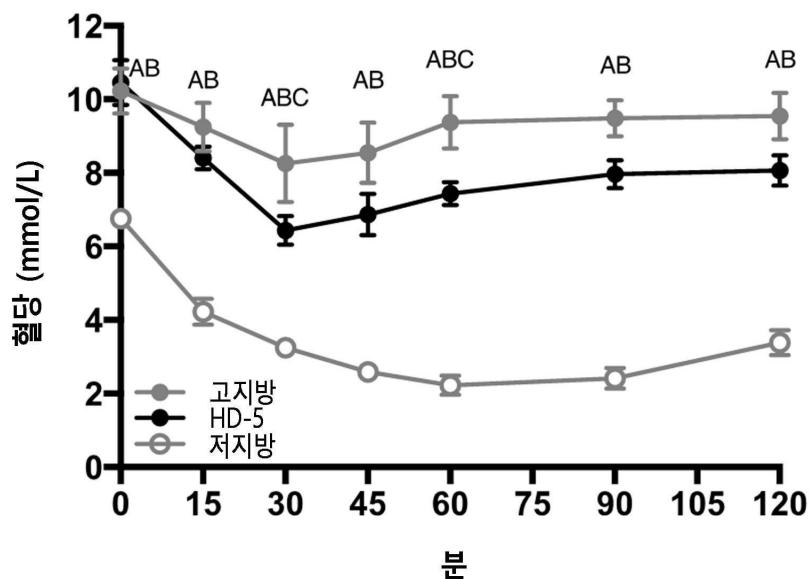


도면25a

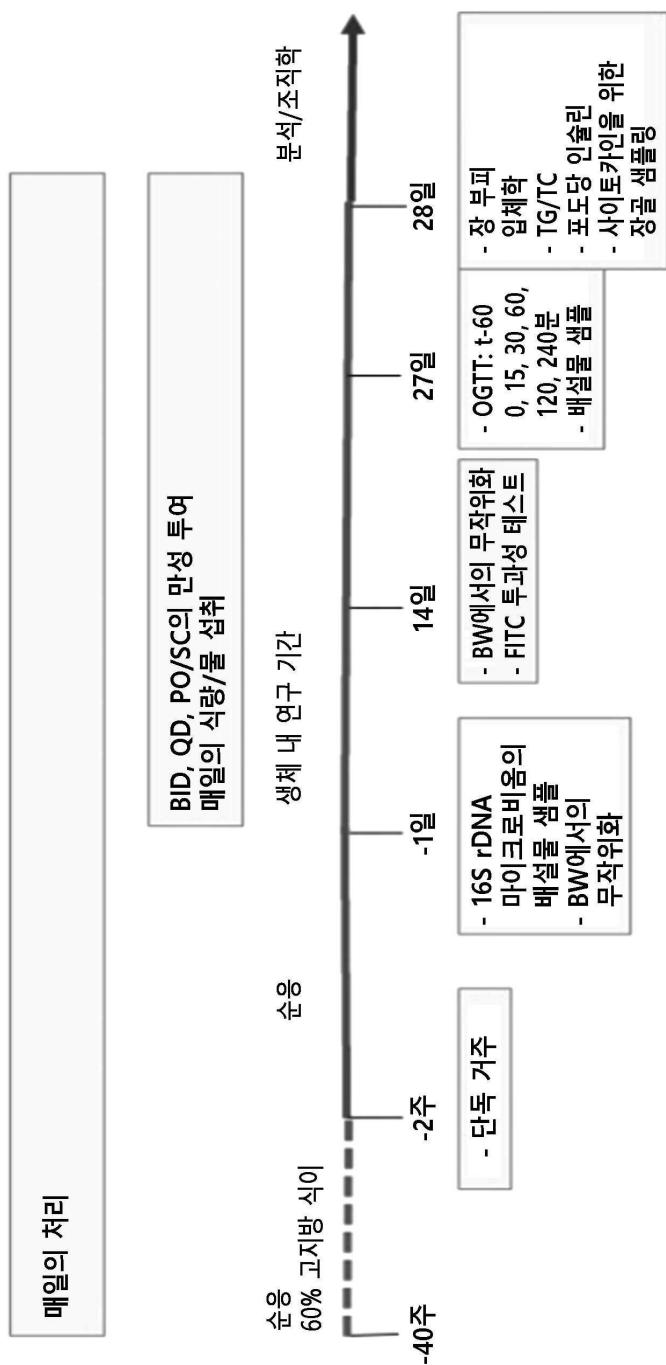


도면25b

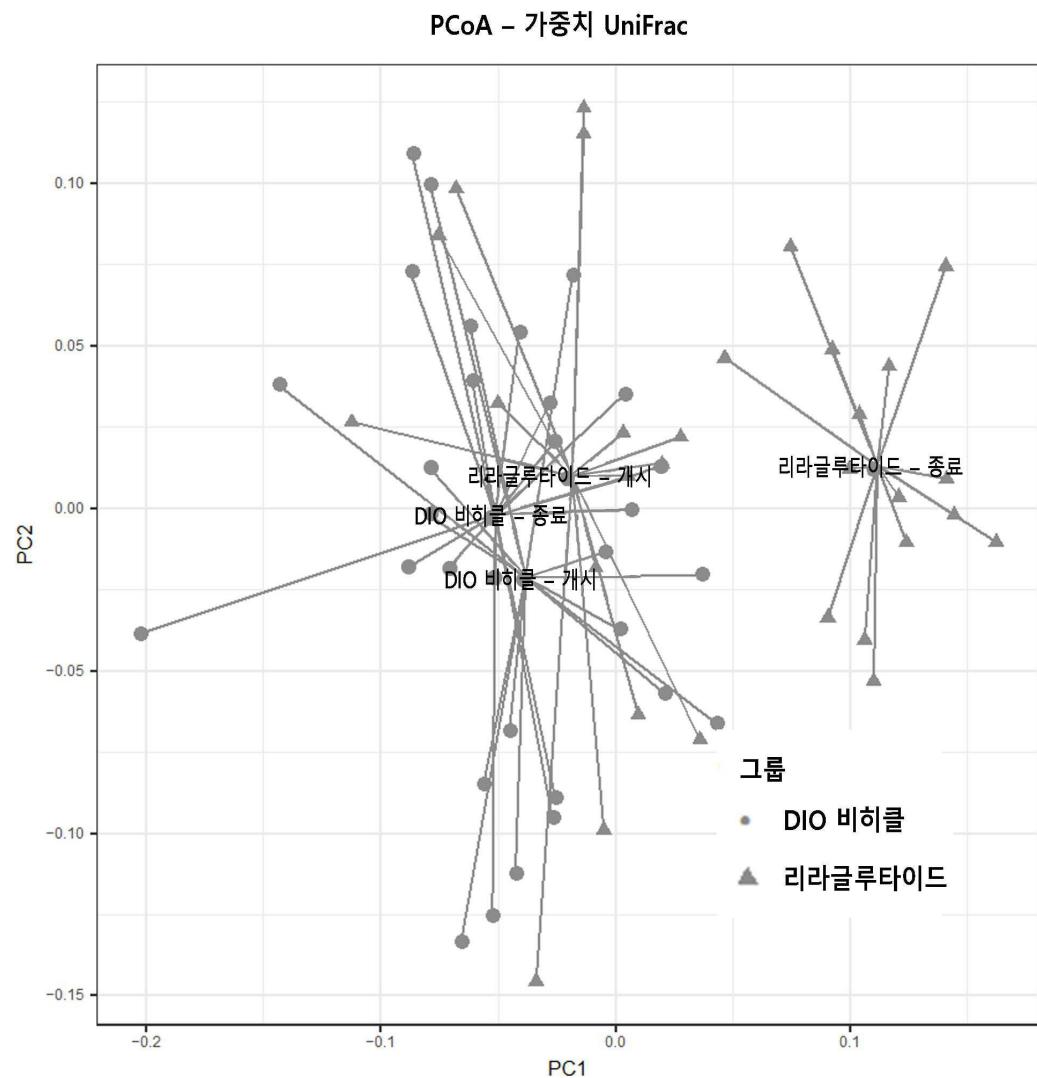
## 인슐린 내성



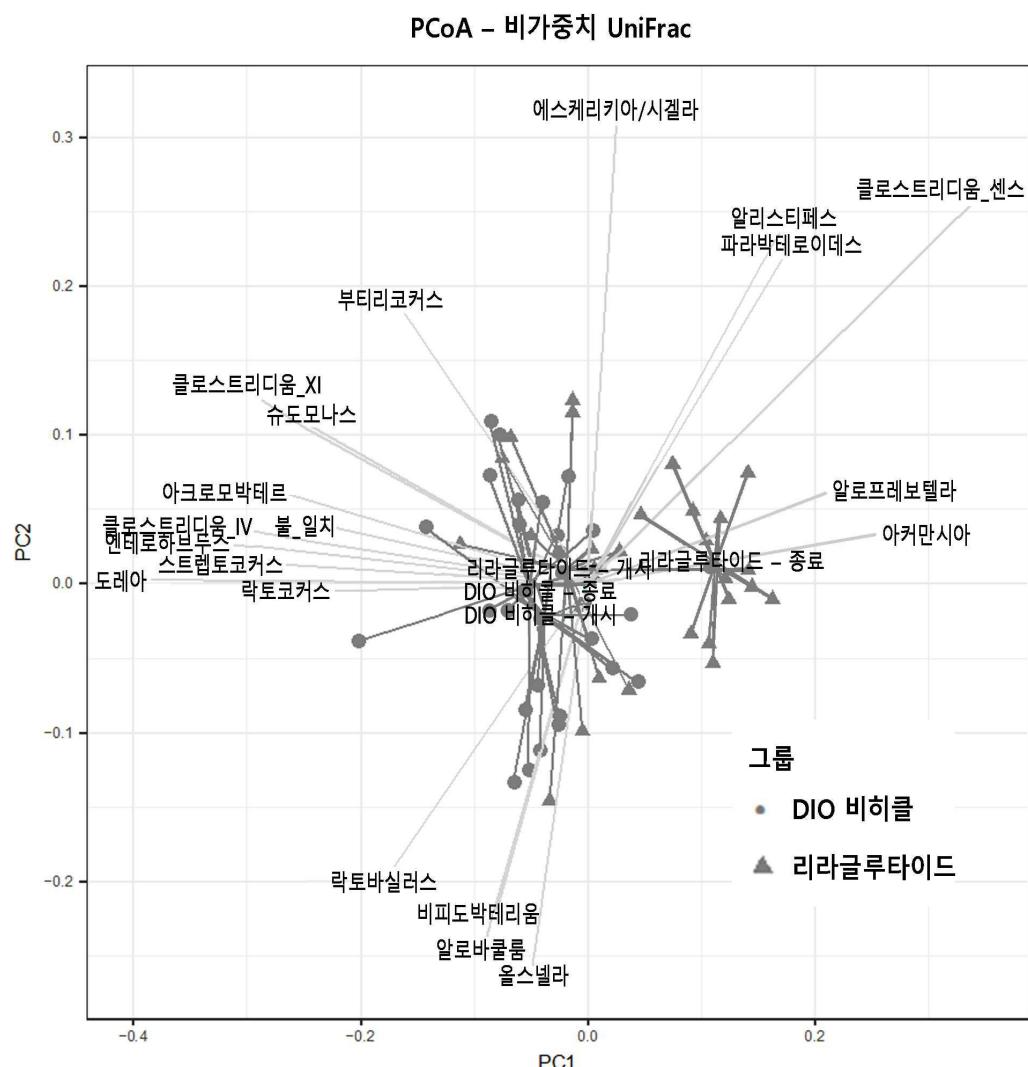
## 도면26



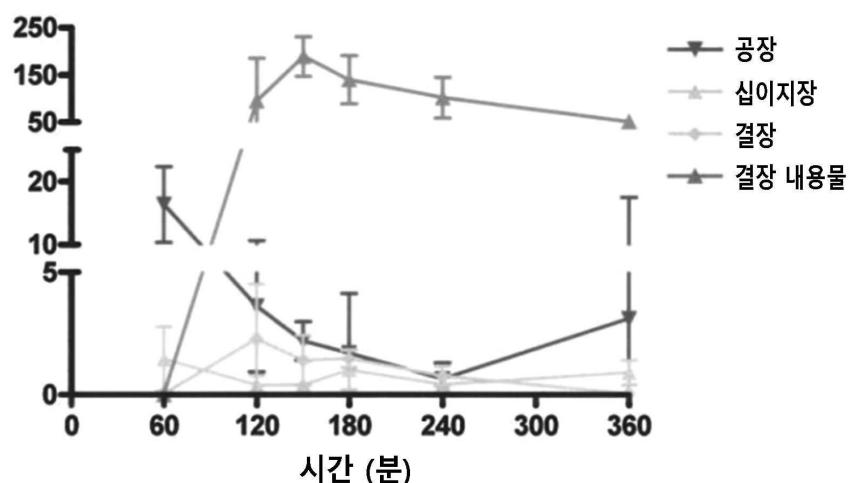
## 도면27a



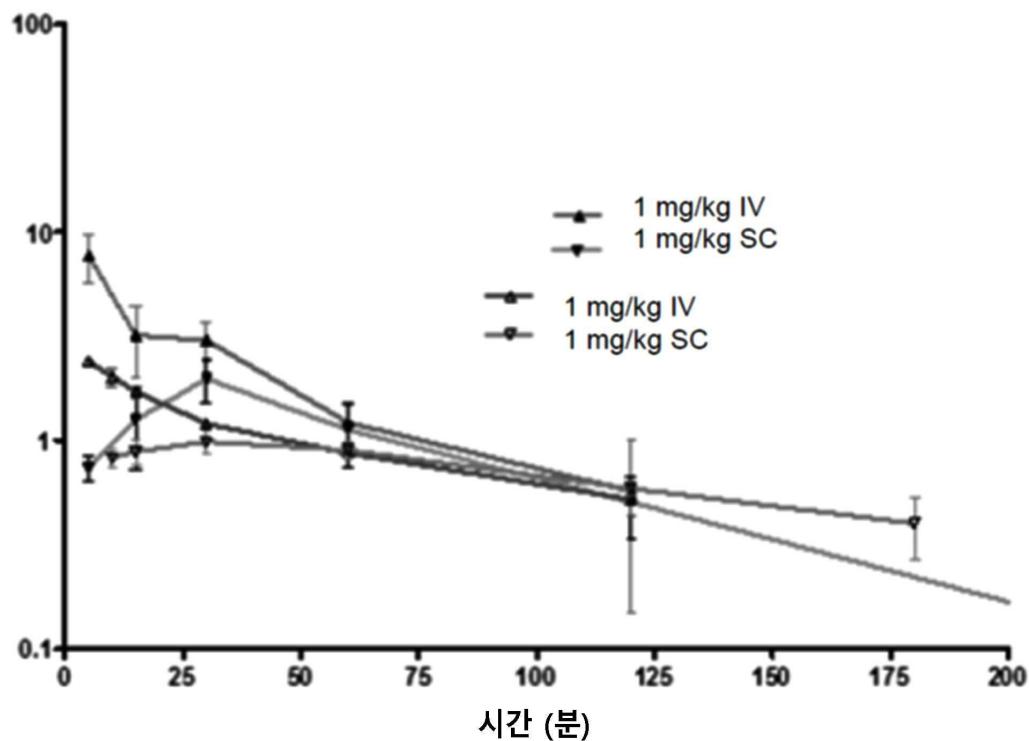
도면27b



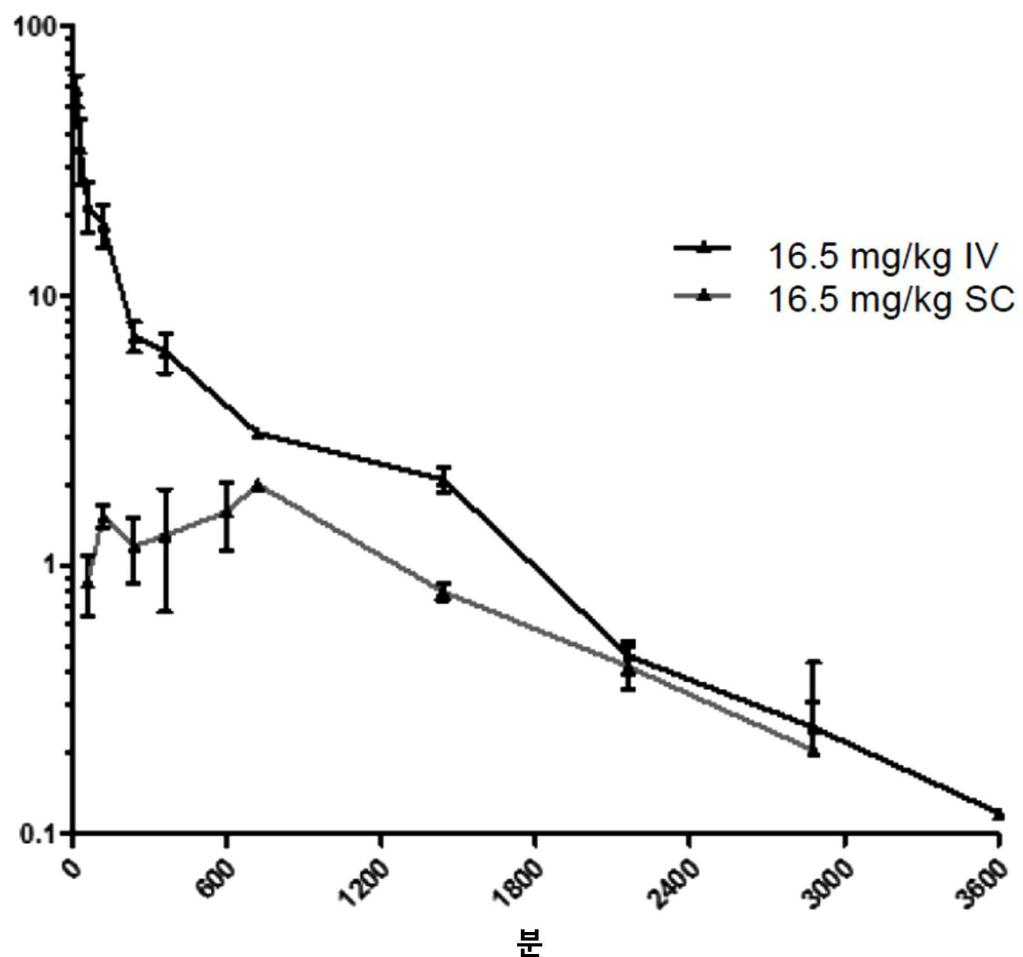
도면28



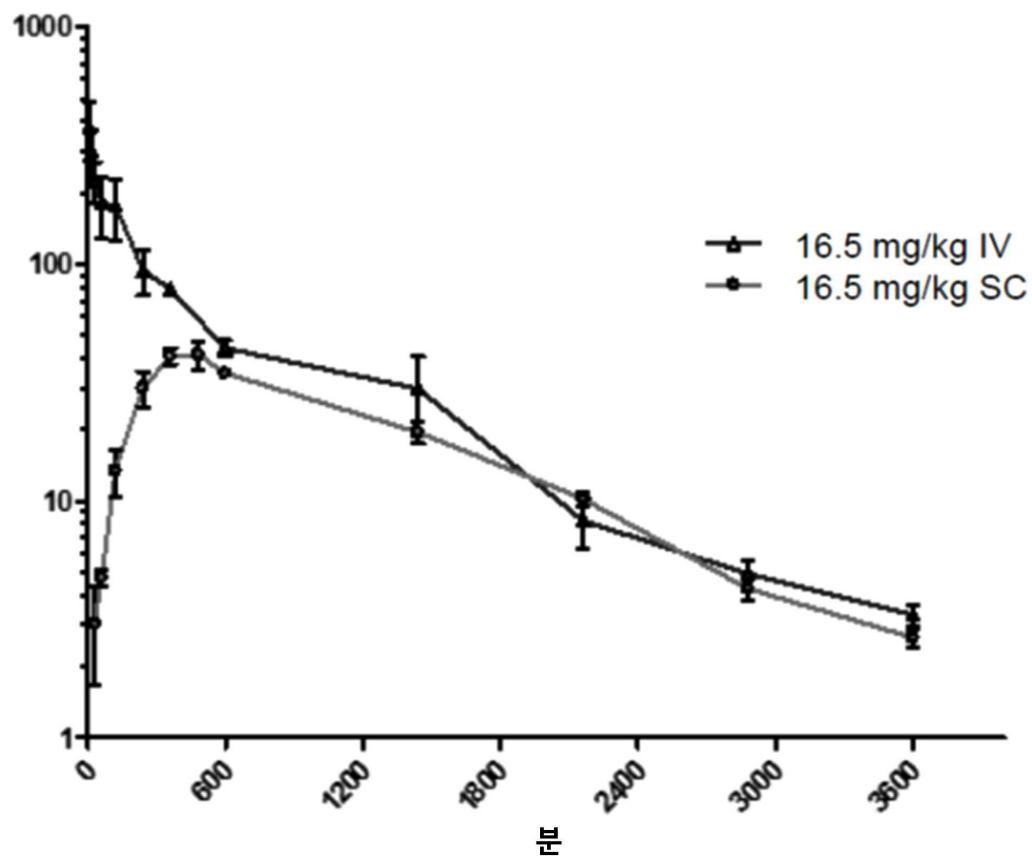
도면29



## 도면30



## 도면31



## 서 열 목 록

- <110> Defensin Therapeutics ApS  
<120> Methods for Modulating Intestinal Microbiota  
<130> IPA180777-DK  
<150> DK PA 2016 70041  
<151> 2016-01-26  
<150> DK PA 2016 70483  
<151> 2016-07-01  
<160> 17  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Bos taurus  
<400> 1

Gly Val Gly Asn Pro Val Ser Cys Val Arg Asn Lys Gly Ile Cys Val

1

5

10

15

Pro Ile Arg Cys Pro Gly Ser Met Lys Gln Ile Gly Thr Cys Val Gly

20 25 30

Arg Ala Val Lys Cys Cys Arg Lys

35 40

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 2

Leu Phe Cys Lys Gly Gly Ser Cys His Phe Gly Gly Cys Pro Ser His

1 5 10 15

Leu Ile Lys Val Gly Ser Cys Phe Arg Ser Cys Cys Lys Trp Pro Trp

20 25 30

Asn Ala

<210> 3

<211> 44

<212> PRT

<213> Pongo pygmaeus

<400> 3

Val Phe Gly Asp Ile Ser Asn Pro Val Thr Cys Leu Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ile Cys His Pro Gly Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys His Ile Gly Thr

20 25 30

Cys Gly Leu Ser Val Ile Lys Cys Cys Lys Lys Pro

35 40

<210> 4

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala

1                    5                    10                    15  
 Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala  
 20                    25                    30  
 Lys Cys Cys Lys

35  
 <210>        5  
 <211>        41  
 <212>        PRT  
 <213>        Homo sapiens  
 <400>        5

Gly Ile Gly Asp Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Val Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu  
 20                    25                    30

Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro  
 35                    40  
 <210>        6  
 <211>        45  
 <212>        PRT  
 <213>        Homo sapiens  
 <400>        6

Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile Gly Lys  
 20                    25                    30

Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys  
 35                    40                    45

<210>        7  
 <211>        37  
 <212>        PRT  
 <213>        Homo sapiens  
 <400>        7

Glu Leu Asp Arg Ile Cys Gly Tyr Gly Thr Ala Arg Cys Arg Lys Lys

1 5 10 15  
 Cys Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile Gly Arg Cys Pro Asn Thr Tyr Ala  
 20 25 30  
 Cys Cys Leu Arg Lys

35  
 <210> 8  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Thr Gly Arg Cys Ala Thr Arg Glu Ser Leu

1 5 10 15  
 Ser Gly Val Cys Glu Ile Ser Gly Arg Leu Tyr Arg Leu Cys Cys Arg  
 20 25 30  
 <210> 9  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9

Ala Phe Thr Cys His Cys Arg Arg Ser Cys Tyr Ser Thr Glu Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Thr Cys Thr Val Met Gly Ile Asn His Arg Phe Cys Cys Leu  
 20 25 30

<210> 10  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes  
 <400> 10

Gly Ile Ser Asp Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His  
 1 5 10 15  
 Pro Val Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu  
 20 25 30  
 Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro

	35		40
<210>	11		
<211>	41		
<212>	PRT		
<213>	Macaca mulatta		
<400>	11		

Gly Ile Gly Asp Pro Val Thr Cys Leu Lys Asn Gly Ala Ile Cys His

1	5	10	15												
Pro	Val	Phe	Cys	Pro	Arg	Arg	Tyr	Lys	Gln	Ile	Gly	Thr	Cys	Gly	Leu
20		25			30										

Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro

35		40	
<210>	12		
<211>	40		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<400>	12		

Lys Ile Asn Asn Pro Val Ser Cys Leu Arg Lys Gly Gly Arg Cys Trp

1	5	10	15												
Asn	Arg	Cys	Ile	Gly	Asn	Thr	Arg	Gln	Ile	Gly	Ser	Cys	Gly	Val	Pro
20		25			30										

20		25		30											
Phe	Leu	Lys	Cys	Cys	Lys	Arg	Lys								
35		40													

<210> 13

<211> 40

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 13

Gly	Ile	Gly	Asn	Pro	Ile	Ser	Cys	Ala	Arg	Asn	Arg	Gly	Val	Cys	Ile
1		5			10				15						
Pro	Ile	Gly	Cys	Leu	Pro	Gly	Met	Lys	Gln	Ile	Gly	Thr	Cys	Gly	Leu
20		25			30										

Pro Gly Thr Lys Cys Cys Arg Lys

35                    40

<210> 14  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Sus scrofa  
<400> 14

Asn Ile Gly Asn Ser Val Ser Cys Leu Arg Asn Lys Gly Val Cys Met

1                    5                    10                    15

Pro Gly Lys Cys Ala Pro Lys Met Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Met  
                      20                    25                    30

Pro Gln Val Lys Cys Cys Lys Arg

                      35                    40

<210> 15  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Capra aegagrus  
<400> 15

Gly Ile Ile Asn His Arg Ser Cys Tyr Arg Asn Lys Gly Val Cys Ala

1                    5                    10                    15

Pro Ala Arg Cys Pro Arg Asn Met Arg Gln Ile Gly Thr Cys His Gly

                      20                    25                    30

Pro Pro Val Lys Cys Cys Arg Lys

                      35                    40

<210> 16  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 16

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu

1                    5                    10                    15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val

                      20                    25                    30

Pro Arg Thr Glu Ser

35

<210> 17

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His Pro Val Phe Cys

1

5

10

15

Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu Pro Gly Thr Lys

20

25

30

Cys Cys Lys Lys Pro

35