



(21) 申请号 201780039341.1  
(22) 申请日 2017.04.28  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109414474 A

(43) 申请公布日 2019.03.01

(30) 优先权数据  
PA201670276 2016.04.29 DK  
PA201670484 2016.07.01 DK

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.12.24

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/DK2017/050132 2017.04.28

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/186250 EN 2017.11.02

(73) 专利权人 诺维信公司  
地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 P·诺德基尔德 S·基亚罗夫

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.  
A61K 38/04 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)  
A61K 38/26 (2006.01)  
A61P 1/16 (2006.01)  
A61P 1/18 (2006.01)  
A61P 3/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 104971343 A, 2015.10.14  
CN 105504063 A, 2016.04.20  
US 2014213521 A1, 2014.07.31  
CN 108026130 A, 2018.05.11  
CN 112795606 A, 2021.05.14  
CN 114075585 A, 2022.02.22  
CN 114107160 A, 2022.03.01  
US 2018163243 A1, 2018.06.14  
Ehab H. Mattar et al.. "Virucidal activity of human a- and b-defensins against hepatitis C virus genotype 4". 《Mol. BioSyst.》.2016,第12卷

审查员 陈咪咪

权利要求书1页 说明书30页  
序列表5页 附图61页

(54) 发明名称  
肝脏、胆道和胰腺障碍的治疗

(57) 摘要  
本发明涉及用于通过给予一种或多种防御素来治疗或预防肝脏、胆道和胰腺障碍的方法。包括在本公开文本的范围内还有某些代谢障碍的治疗。

1. 有效量的SEQ ID NO.5的哺乳动物 $\beta$ -防御素hBD-2用于制备用于在受试者中治疗或预防非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 或非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的药物的用途。
2. 根据权利要求1的用途,其中该哺乳动物 $\beta$ -防御素一天给予至少两次。
3. 根据权利要求1的用途,其中该哺乳动物 $\beta$ -防御素一天给予至少三次。
4. 根据权利要求1的用途,其中该哺乳动物 $\beta$ -防御素不进一步包含半衰期延长肽。
5. 根据权利要求1的用途,其中将该防御素以0.1mg防御素/kg和10mg防御素/kg之间的日剂量给予有需要的受试者。
6. 根据权利要求1的用途,其中所述防御素在C端或N端与白蛋白融合。
7. 根据前述权利要求中任一项的用途,其中所述受试者是动物。
8. 根据权利要求1的用途,其中该受试者的BMI为25或更高;  
腰/臀比为至少0.80;  
空腹血糖为至少6.1mmol/l;  
和/或  
糖化血红蛋白水平为至少42mmol/mol Hb。
9. 根据权利要求1的用途,其中该受试者具有以下症状中的一种或多种:
  - 血压升高:  $\geq 140/90$ mmHg;
  - 血脂异常: 甘油三酯 (TG) :  $\geq 1.695$ mmol/L, 且高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) : 男性  $\leq 0.9$ mmol/L, 女性  $\leq 1.0$ mmol/L;
  - AST/ALT  $> 1$ ;
  - 空腹血糖  $> 6.1$ mmol/L;
  - 中心性肥胖: 腰: 臀比: 男性  $> 0.90$ ; 女性  $> 0.85$ , 或体重指数  $> 30$ kg/m<sup>2</sup>; 以及
  - 微量白蛋白尿: 尿白蛋白排泄率  $\geq 20$  $\mu$ g/min 或白蛋白: 肌酐比  $\geq 30$ mg/g。
10. 根据权利要求1的用途, 其中将该防御素给予所述受试者一天一次、一天两次或一天三次。
11. 根据权利要求1的用途, 其中将该防御素给予所述受试者一周一次、两次或三次。
12. 根据权利要求1的用途, 其中该防御素向所述受试者的给予是口服的或皮下的。

## 肝脏、胆道和胰腺障碍的治疗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于通过给予一种或多种防御素来治疗或预防肝脏、胆道和胰腺障碍的方法。包括在本公开文本的范围内的还有某些代谢障碍的治疗。

[0002] 发明背景

[0003] 肠道微生物群

[0004] 肥胖症和肥胖症相关疾病等常见障碍的日益增加的患病率与我们的西方化生活方式和饮食密切相关。最突出的肥胖症相关疾病是胰岛素抵抗、明显2型糖尿病 (T2D) 和某些癌症 (Faulds&Dahlman-Wright, 2012)。虽然这些疾病的病因很复杂,但其中许多疾病的特征在于低度炎症的一般状态,这可能源于肠道微生物群和代谢物组失调 (Everard&Cani, 2013; Belkaid&Hand, 2014)。尽管与现代人类生活方式和动物肉类生产相关的挑战可能看起来相距甚远,但可以设想肠道健康受损是一个共同点。失调的肠道健康确实与大量疾病相关,如肥胖症 (Ridaura等人, 2013)、T2D (Qin等人, 2012)、类风湿性关节炎 (Zhang等人, 2015) 和结肠直肠癌 (Feng等人, 2015)。最近,已经报道了肠道微生物群,并且特别是来自拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的某些脂多糖的存在和芬兰与邻近地区相比更高的1型糖尿病发生率之间的联系 (Leviton 2016)。

[0005] 肥胖症及其伴随的低度炎症形成了失调的代谢体内平衡的有效驱动因素。Turnbaugh等人 (2006) 发现肥胖症相关的微生物群具有增加的能量收获能力,并且在从肥胖小鼠移植微生物群后2周,无菌小鼠的脂肪量增加显著高于瘦型小鼠的类似移植。Turnbaugh等人 (2008) 进一步且明显地发现,在暂时饲喂高脂肪/糖“西方 (Western)”饮食的小鼠中转回到原始饮食后,肠道微生物组成的变化完全逆转。Vrieze等人 (2012) 在人类中证实了这些发现,其证明从瘦型人类供体转移肠道微生物群增加了代谢综合征个体的胰岛素敏感性。

[0006] 通过使用低剂量抗生素和益生菌如嗜乳杆菌 (*Lactobacillus ingluviei*),已经在农业牲畜中持续多年采用用以增加体重和增重率的肠道微生物群操纵。已经在鸡 (Khan等人, 2007)、鸭 (Angelakis&Raoult, 2010) 和小鼠 (Angelakis等人, 2012) 中证明了用于体重增加的肠道微生物群操纵。在人类中,也发现接受抗生素的婴儿比其对照更大 (Trasande等人, 2012),而早期暴露于口服抗生素与儿童超重相关 (Ajslev等人, 2014)。在孕妇中,晚期妊娠中肥胖的生理性增加和妊娠期糖尿病的潜在发展似乎与肠道微生物群的深刻变化相关 (Koren等人, 2012)。

[0007] 肠粘膜是迄今为止暴露于外部环境的最大体表 (大约200m<sup>2</sup>)。因此,肠道表面与外来物质 (源自我们饮食的代谢物 (代谢物组)) 以及估计的10<sup>14</sup>个细菌 (栖息在我们的肠道中的肠道微生物群) 紧密接触。因此,肠屏障受到持续且强烈的免疫监视,需要免疫系统、饮食成分和肠道微生物群之间的动态串扰。饮食干预对免疫调节 (Mowat&Agace, 2014) 和肠道微生物群组成 (Walter, 2015) 产生巨大影响,两者都独立和协同地影响代谢体内平衡。在这方面,最近的两篇论文强调了食品添加剂在微生物群调节的向代谢体内平衡变化的 (不利) 潜力。最近的一篇论文 (Chassaing等人, 2015) 阐明了膳食乳化剂如何通过诱导失调的肠道微

生物群来削弱葡萄糖耐受,从而增加体重增加以及结肠炎易感性。该观察结果不能在无菌(GF)小鼠中复制,这表明肠道微生物群的关键作用。类似地,Suez等人(2014)最近展示了无热量人造甜味剂如何通过改变肠道微生物群来诱导代谢功能障碍。作者通过粪便转移到GF小鼠来验证他们的发现,之后GF小鼠迅速发展成葡萄糖耐受不良。这些观察结果反映了GF小鼠的开拓性研究(Bäckhed等人,2007),阐明了肠道微生物在维持代谢健康中的作用。本研究显示,在没有共生微生物的情况下,由此导致不均衡的粘膜免疫体内平衡,脂肪组织响应于高脂肪饮食而尺寸和功能减少。尽管没有体重增加(通常表现为健康的表型),但异位脂质积累(肝脏脂肪变性和血清甘油三酯水平升高)导致严重的代谢障碍。在人类中,已经显示微生物群的基因丰富度与健康表型相关,而基因贫乏(低基因计数)与代谢障碍风险增加相关(Le Chatelier等人,2013)。

[0008] Wertenbruch等人(2015)证实,与健康对照相比,来自肝病患者的血清中抗微生物肽LL-37/CRAMP(组织蛋白酶抑制素(cathelicidin))、人 $\beta$ 防御素2和补体因子C5a的水平升高。健康对照的所有三种标志物的血清水平相对较窄,但肝脏患者的水平存在很大差异。作者推测,hBD-2水平升高可能反映了胆管上皮重塑的增加。

[0009] Harada等人(2004)研究了肝内胆管上皮细胞、细胞系和胆汁中hBD1和hBD-2的水平。在活动性炎症期间在胆管中发现了hBD-2表达。发现胆汁水平与CRP的血清水平相关。作者得出结论,hBD-2响应于局部感染或活动性炎症而表达,并且hBD1可能是胆道抗微生物防御系统的预先存在的组分。

#### [0010] 防御素

[0011] 防御素代表主要的先天宿主防御之一,其用于维持健康的微生物组并避开潜在的路原体(Wehkamp等人,2002和Salzman等人,2007)。防御素是具有抗革兰氏阳性和阴性细菌、真菌和古细菌的抗微生物活性以及增加抗炎细胞因子和减少炎性细胞因子的抗炎活性的肽。

[0012] 人防御素是小阳离子肽,基于其三个分子内半胱氨酸二硫键的拓扑结构,所述肽可分为 $\alpha$ -防御素和 $\beta$ -防御素。人 $\alpha$ -防御素可以进一步细分为首先从嗜中性粒细胞颗粒分离的那些(HNP1-4)和由小肠隐窝中的帕内特细胞表达的肠防御素(HD5和HD6或者DEFA5和DEFA6)。 $\beta$ -防御素(DEFBn)主要由各种组织和器官中的上皮细胞产生,所述组织和器官包括皮肤、眼睛、中耳、口腔、气管、肺、胃肠道、肝脏、泌尿生殖系统、肾脏、阴道、胰腺和乳腺。人 $\beta$ -防御素家族中最佳表征的成员是hBD1-4。一些人防御素是组成性产生的,而其他是由促炎细胞因子或外源微生物产物诱导的。一些人防御素已经在羊水中表达,其水平随着孕龄而增加,保护子宫内的胎儿。母乳并且特别是初奶(初乳)含有 $\alpha$ -防御素和 $\beta$ -防御素以及组织蛋白酶抑制素,但在母乳中仅发现少数以显著浓度存在(Armogida等人,2004)。

[0013] Liu等人(2008)发现HNP-1和HNP-2(均由白细胞产生并属于血液中 $\alpha$ -防御素的亚组)能够通过经典胰岛素信号传导通路明显不同的细胞内机制抑制分离的肝细胞中的糖原分解和糖异生。

[0014] CN104971343披露了饲喂高脂肪饮食和维生素D缺乏饮食的小鼠患有代谢综合征。长期维持这种维生素D缺乏的饮食后防御素的表达下调,从而导致防御素缺乏。在25天内给予四次防御素HD5部分地导致血浆葡萄糖水平降低,但没有提供与胰岛素抵抗或体内平衡模型评估有关的数据。CN104971343没有披露向饲喂具有正常维生素D水平的高脂肪饮食的

小鼠给予防御素HD5可以治疗肝脏、胰腺或胆道的障碍。

[0015] 虽然现有技术披露了组织蛋白酶抑制素、补体和 $\beta$ -防御素与胆道炎症或感染增加的相关性,但没有防御素可用于治疗肝脏、胰腺或胆道的障碍的教导或暗示。

[0016] 发明概述

[0017] 本公开文本证明,口服给予的哺乳动物肠 $\alpha$ -防御素和 $\beta$ -防御素具有预防或治疗体重增加(包括中心性(腹部或内脏)体重增加和脂质积累)的能力。数据表明,哺乳动物 $\alpha$ -防御素和/或 $\beta$ -防御素的给予使得治疗肝脏(包括肝癌和肝性脑病)、胆道和胰腺的疾病或障碍以及某些代谢障碍。

[0018] 向饲喂高脂肪饮食的小鼠给予 $\alpha$ 防御素或 $\beta$ 防御素影响肝脏和内脏脂肪、脂肪变性标志物和肝脏脂质代谢的标志物的表达,表明它们减少肝脏脂肪和脂肪变性。饲料摄入量、饲料效率、脂肪摄取和排泄没有受到影响,表明防御素的给予不会改变食欲。

[0019] 根据实施例1,人 $\beta$ -防御素2(hBD-2)的给药足以减少饲喂高脂肪饮食的小鼠的体重增加。hBD-2的摄入主要减少脂肪量增加。诸位发明人最初假设,它主要是腹部(即肝脏和内脏)脂肪量增加减少;实施例2显示在高脂肪饮食中摄入hBD-2后,内脏脂肪量确实显著减少,同时观察到肝脏量减少的趋势。在给予hBD-2后,葡萄糖激发期间葡萄糖耐受和葡萄糖刺激的胰岛素反应均得到改善。已知与脂肪积累相关的标志物的表达显著减少。重要的是,食物摄入量不受饮食类型的显著影响。向饲喂高脂肪饮食的小鼠给予 $\alpha$ 防御素HD5导致脂肪酸代谢增加。

[0020] 如实施例4所示,对于类似的食物摄入,与未接受hBD-2的肥胖小鼠相比,向肥胖小鼠给予hBD-2在给予后趋于减少体重增加。hBD-2的给予降低了总体重的脂肪百分比并且迅速改善了葡萄糖耐受和胰岛素耐受。给予HD5后观察到类似的结果。

[0021] 胰高血糖素样肽-1(GLP-1)类似物的给予在饲喂高脂肪饮食的小鼠中具有降低体重的作用,并导致肝脏中脂肪积累减少和血浆胆固醇水平降低。

[0022] 总而言之,本文提供的数据显示, $\alpha$ 防御素、 $\beta$ 防御素、GLP-1和GLP-1类似物可用于治疗肝脏、胆道或胰腺疾病或障碍。

[0023] 在一个方面,本公开文本涉及用于治疗或预防肝脏、胆道、胰腺或代谢疾病或障碍的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予有效量的哺乳动物 $\alpha$ -防御素和/或 $\beta$ -防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物。

[0024] 在另一个方面,本公开文本涉及用于治疗肝癌、胆管癌或胰腺癌的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予有效量的哺乳动物 $\alpha$ -防御素和/或 $\beta$ -防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物,单独地或与放射疗法、化学疗法或免疫疗法组合。

[0025] 在又另一个方面,本公开文本涉及用于本文所述方法的哺乳动物 $\alpha$ -防御素和/或 $\beta$ -防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物。

[0026] 在又另一个方面,本公开文本涉及哺乳动物 $\alpha$ -防御素和/或 $\beta$ -防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物在制备用于根据前述权利要求中任一项的治疗的药物中的用途。

[0027] 附图简述

[0028] 图1. 用于研究哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素对小鼠代谢的影响的实验设置的图解提纲。在第-1周,将小鼠分进组和笼子,使得每个笼子3只小鼠且每组4只笼子。在第-1周

和第0周之间,通过磁共振扫描临床检查小鼠以估计脂肪分布。在第0、1和4周,分析粪便的微生物组。在第4周,除了分析微生物群外,扫描小鼠并测量血糖和胰岛素水平。在第6周,通过分析粪便的氮和脂质含量来评估能量消耗。在第7周,进行胰岛素耐量测试(ITT)。在第8周,进行口服葡萄糖耐量测试(OGTT)和葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。在第9周(终止),进行几次分析,特别是对小鼠进行称重和扫描,并评估结肠、盲肠和小肠的血浆组成和微生物群组成。此外,对肌肉组织(四头肌)、iWAT、eWAT、iBAT、肝脏、结肠、空肠、回肠和十二指肠进行蛋白质/RNA分析。对肌肉组织(四头肌)、iWAT、eWAT、iBAT、肝脏、结肠、空肠、回肠和十二指肠进行组织学分析。

[0029] 图2. 用于研究哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素对小鼠代谢的影响的实验设置的图解提纲。在第-1周,C57/BL/6J小鼠到达。在第0周,收集粪便。在第0周和第12周之间的磨合期中,给小鼠饲喂高脂肪饮食。在第12周,通过磁共振扫描临床检查小鼠以估计脂肪分布,收集粪便并进行口服葡萄糖耐量测试(OGTT)和葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。在第13-0周,将小鼠分进组和笼子,每只笼子4只小鼠且每组3只笼子。在第0、12和13-10周,分析粪便的微生物组。在第13-2、13-4、13-6、13-8和13-10周,扫描小鼠并测量血糖和胰岛素水平。在第13-9周,进行胰岛素耐量测试(ITT)。在第13-10周(终止),进行几次分析,特别是对小鼠进行称重和扫描,并评估结肠、盲肠和小肠的血浆组成和微生物群组成。此外,测量iWAT、eWAT和肝脏重量。

[0030] 图3. 人 $\beta$ 防御素1-4的Clustal W(2.1)多序列比对。

[0031] 图4. 人 $\alpha$ 防御素5和6的Clustal W(2.1)多序列比对。

[0032] 图5: 人嗜中性粒细胞肽1-3的Clustal W(2.1)多序列比对。

[0033] 图6: 人、恒河猴、黑猩猩、红猩猩、山羊、绵羊、牛、马、猪和小鼠 $\beta$ 防御素2的Clustal W(2.1)多序列比对。

[0034] 在Clustal W比对中:

[0035] \*指示具有单个完全保守残基的位置。

[0036] :指示以下“强”组之一是完全保守的:

[0037] -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;

[0038] H,Y;F,Y,W。

[0039] .指示以下“较弱”组之一是完全保守的:

[0040] -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;

[0041] N,D,E,Q,H,K;N,E,Q,H,R,K;V,L,I,M;H,F,Y。

[0042] 图7: 用低脂肪饮食(LFD)、高脂肪饮食(HFD)或HFD和防御素hBD-2(HFD+P2)处理小鼠7周的体重变化(a)和体重发展(b)以及累积饲料摄入量(c)。

[0043] 图8: 用低脂肪饮食(LFD)、高脂肪饮食(HFD)或HFD和防御素hBD-2(HFD+P2)处理小鼠7周的瘦肉量/脂肪量发展。(a)第1周和第7周的瘦肉量发展。(b)第1周和第7周的脂肪量发展。

[0044] 图9: 用低脂肪饮食(LFD)、高脂肪饮食(HFD)或HFD和防御素hBD-2(HFD+P2)处理7周的小鼠的葡萄糖体内平衡。(a)胰岛素耐量测试(ITT)。(b)口服葡萄糖耐量测试。(c)葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。(d)5小时空腹胰岛素测试。

[0045] 图10: 用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素

hBD-2预防性处理(高脂肪+hBD-2)处理小鼠10周的体重发展(A)、饲料效率(B)和能量摄入(C)。

[0046] 显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;

[0047] 高脂肪对高脂肪+hBD-2=C。(A) 体重发展。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 饲料效率(针对笼中平均食物摄入量调整的增重克数)。采用图基校正的单因素方差分析NB!n=4,归因于共同笼养。(C) 能量摄入。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)

[0048] 图11:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2预防性处理(hBD-2)处理小鼠10周的脂肪占总体重的百分比(A)、以克计的肝脏重量(B)和以克计的附睾脂肪(eWAT)重量(C)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;高脂肪对高脂肪+hBD-2=C。(A) 不同周的总体重的脂肪百分比。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 在终止时的附睾脂肪组织(内脏AT)重量。采用图基校正的单因素方差分析。(C) 在终止时的重量。采用图基校正的单因素方差分析。

[0049] 图12:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2预防性处理(高脂肪+hBD-2)处理10周的小鼠的葡萄糖体内平衡。(A) 口服葡萄糖耐量测试。(B) 葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;高脂肪对高脂肪+hBD-2=C。(A) 第7周的口服葡萄糖耐量测试。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 在oGTT期间进行的第7周的葡萄糖刺激的胰岛素分泌。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0050] 图13:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2预防性处理(高脂肪+hBD-2)处理10周的小鼠的葡萄糖体内平衡。(A) 胰岛素耐量测试(ITT)。(B) HOMA-IR。

[0051] 显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;

[0052] 高脂肪对高脂肪+hBD-2=C。(A) 第8周的胰岛素耐量测试。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 第9周的体内平衡模型评估(HOMA)。采用图基校正的单因素方差分析。

[0053] 图14:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2预防性处理(高脂肪+hBD-2)处理10周的小鼠的肝脏中的过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ 2)表达(a)和过氧化物酶体辅酶A氧化酶1(Acox1)表达(b)。

[0054] 图15:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2干预处理(高脂肪+hBD-2)处理小鼠10周的体重发展(A)和体重变化(B)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;高脂肪对高脂肪+hBD-2=C。(A) 体重发展。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0055] (B) 从磨合期结束时的第13周到接受实验饮食的接下来的10周的体重变化。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0056] 图16:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2干预处理(hBD-2)处理小鼠10周的脂肪占总体重的百分比(A)和从第0周到第4周以克计的脂肪%变化(B)。

[0057] 显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;高脂肪对高脂肪+hBD-2

=C。(A) 不同周的总体重的脂肪百分比。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 从磨合期结束到接受实验饮食的4周的脂肪百分比变化。采用图基校正的单因素方差分析。

[0058] 图17:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2干预处理(hBD-2)处理小鼠10周的以克计的肝脏重量(A)和以克计的附睾脂肪(eWAT)重量(B)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;高脂肪对高脂肪+hBD-2=C。

[0059] (A) 在终止时的肝脏重量。采用图基校正的单因素方差分析。(B) 在终止时的附睾脂肪组织(内脏脂肪)重量。采用图基校正的单因素方差分析。

[0060] 图18:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2干预处理(高脂肪+hBD-2)处理10周的小鼠的葡萄糖体内平衡。(A) 来自笼子1的口服葡萄糖耐量测试(B) 来自小鼠D1的口服葡萄糖耐量测试。(C) 胰岛素耐量测试(ITT)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+hBD-2=B;高脂肪对高脂肪+hBD-2=C。

[0061] (A) 口服葡萄糖耐量测试从磨合期结束(第13-0周)开始每两周重复一次,显示高脂肪+hBD-2组的第一笼。(B) 口服葡萄糖耐量测试从磨合期结束(第13-0周)开始每两周重复一次,仅显示高脂肪+hBD-2组的小鼠D1。(C) 第9周的胰岛素耐量测试。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0062] 图19:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素hBD-2干预处理(hBD-2)处理小鼠10周的小鼠肝脏中的过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$  2)表达(A)和过氧化物酶体辅酶A氧化酶1(Acox1)表达(B)。

[0063] 图20:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5预防性处理(高脂肪+HD5)处理小鼠10周的体重发展(A)、饲料效率(B)和能量摄入(C)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。

[0064] (A) 体重发展。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 饲料效率(针对笼中平均食物摄入量调整的增重克数)。单因素方差分析图基校正NB!n=4,归因于共同笼养。(C) 能量摄入。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0065] 图21:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5预防性处理(HD5)处理小鼠10周的脂肪占总体重的百分比(A)、以克计的肝脏重量(B)和以克计的附睾脂肪(eWAT)重量(C)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。(A) 不同周的总体重的脂肪百分比。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 在终止时的肝脏重量。单因素方差分析图基校正。(C) 在终止时的附睾脂肪组织(内脏AT)重量。采用图基校正的单因素方差分析。

[0066] 图22:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5预防性处理(高脂肪+HD5)处理10周的小鼠的葡萄糖体内平衡。(A) 口服葡萄糖耐量测试。(B) 葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。(A) 第7周的口服葡萄糖耐量测试。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B) 在oGTT期间进行的第7周的葡萄糖刺激的胰岛素分泌。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0067] 图23:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5

预防性处理(高脂肪+HD5)处理10周的小鼠的葡萄糖体内平衡。(A)胰岛素耐量测试(ITT)。(B)HOMA-IR。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。(A)第8周的胰岛素耐量测试。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B)第9周的体内平衡模型评估(HOMA)。采用图基校正的单因素方差分析。

[0068] 图24:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5预防性处理(高脂肪+HD5)处理10周的小鼠的肝脏中的过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$  2)表达(A)和过氧化物酶体辅酶A氧化酶1(Acox1)表达(B)。

[0069] 图25:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5干预处理(高脂肪+HD5)处理小鼠10周的体重发展(A)和体重变化(B)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。(A)体重发展。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0070] (B)从磨合期结束时的第13周到接受实验饮食的接下来的10周的体重变化。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0071] 图26:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5干预处理(HD-5)处理小鼠10周的脂肪占总体重的百分比(A)和从第0周到第4周以克计的脂肪%变化(B)。

[0072] 显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。(A)不同周的总体重的脂肪百分比。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。(B)从磨合期结束到接受实验饮食的第4周的脂肪百分比变化。采用图基校正的单因素方差分析。

[0073] 图27:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5干预处理(HD-5)处理小鼠10周的以克计的肝脏重量(A)和以克计的附睾脂肪(eWAT)重量(B)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。

[0074] (A)在终止时的肝脏重量。采用图基校正的单因素方差分析。(B)在终止时的附睾脂肪组织(内脏AT)重量。采用图基校正的单因素方差分析。

[0075] 图28:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5干预处理(高脂肪+HD5)处理10周的小鼠的葡萄糖体内平衡。(A)来自笼子2的口服葡萄糖耐量测试(B)胰岛素耐量测试(ITT)。显著性:低脂肪对高脂肪=A;低脂肪对高脂肪+HD-5=B;高脂肪对高脂肪+HD-5=C。(A)口服葡萄糖耐量测试从磨合期结束(第13-0周)开始每两周重复一次,显示高脂肪+HD-5组的第二笼。

[0076] (B)第9周的胰岛素耐量测试。采用图基校正的双因素方差分析(匹配值叠加)。

[0077] 图29:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)或高脂肪饮食和用防御素HD5干预处理(HD-5)处理小鼠10周的小鼠肝脏中的过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$  2)表达(a)和过氧化物酶体辅酶A氧化酶1(Acox1)表达(b)。

[0078] 图30:用低脂肪饮食(低脂肪)、高脂肪饮食(高脂肪)、高脂肪饮食和用防御素hBD-2预防性处理(高脂肪+hBD-2)或用防御素HD5预防性处理(高脂肪+HD5)处理10周的小鼠的膳食脂肪摄取(A)和粪便脂肪含量(B)。

[0079] 图31:用于研究GLP-1类似物(利拉鲁肽(Liraglutid))对小鼠肠道炎症和微生物群的影响的实验设置的图解提纲。在第-40周,C57/BI/6J DIO小鼠到达。给小鼠饲喂高脂肪

饮食60%脂肪(SSNIFF(饮食#D12492))或普瑞纳(purina)粮38周,以达到55克的平均体重。从第-2周开始,将小鼠单独圈养。在第-1天和第27天收集粪便样品用于16S RNA分析。在第28天从距盲肠2cm处收集来自髂骨的样品。

[0080] 图32.在饲喂HFD 38周后用HFD加GLP-1类似物处理4周期间的以克计并作为体重%的体重减轻。

[0081] 图33.在饲喂HFD 38周并饲喂HFD加GLP-1类似物4周后在终止时的以克计的肝脏重量。

[0082] 图34.在饲喂HFD 38周并饲喂HFD加GLP-1类似物4周后在终止时的血浆胆固醇浓度。

[0083] 图35.在向雌性NMRI小鼠口服给予4mg/kg hBD-2后的药代动力学数据。Y轴显示以 $\mu\text{g/g}$ 组织计的hBD-2。结果以组均值 $\pm$ SEM给出。

[0084] 图36.分别在皮下(SC)和静脉内(IV)给予1mg/kg后hBD-2的药代动力学数据。Y轴显示以 $\mu\text{g/mL}$ 计的hBD-2。不同的曲线代表不同的实验和检测方法(HPLC和ELISA)。

[0085] 图37.分别在皮下和静脉内给予16.5mg/kg后“hBD-2-白蛋白融合N末端(hBD-2-albumin fusion N-terminal)”的药代动力学数据。Y轴显示以 $\mu\text{g/mL}$ 计的融合蛋白浓度。结果是4只小鼠/采样时间的均值 $\pm$ SD。

[0086] 图38.分别在皮下和静脉内给予16.5mg/kg后“hBD-2-白蛋白融合C末端(hBD-2-albumin fusion C-terminal)”的药代动力学数据。Y轴显示以 $\mu\text{g/mL}$ 计的融合蛋白浓度。结果是4只小鼠/采样时间的均值 $\pm$ SD。

[0087] 发明详述

[0088] 本发明是如在权利要求中所限定的。

[0089] 定义:

[0090] 组织蛋白酶抑制素:该术语是指组织蛋白酶抑制素相关的抗微生物肽,它们是在巨噬细胞和多形核白细胞、PMN和角质细胞的溶酶体中发现的多肽家族。组织蛋白酶抑制素在对抗侵袭性细菌感染的哺乳动物先天免疫防御中起着至关重要的作用。组织蛋白酶抑制素家族的肽被归类为抗微生物肽,一个也包括防御素的家族。抗微生物多肽的组织蛋白酶抑制素家族的成员的特征在于高度保守的区域(cathelin结构域)和高度可变的组织蛋白酶抑制素肽结构域。组织蛋白酶抑制素的例子是衍生出LL-37(SEQ ID NO:16)的人组织蛋白酶抑制素。

[0091] 防御素:如本文所用的术语“防御素”是指本领域技术人员认为属于抗微生物肽的防御素类别的多肽。该防御素属于 $\alpha$ 防御素类别或 $\beta$ 防御素类别。防御素的例子包括人肠 $\alpha$ 防御素5(HD5,SEQ ID NO.8)、人 $\alpha$ 防御素6(HD6,SEQ ID NO.9)、人嗜中性粒细胞肽1(HNP-1)、人嗜中性粒细胞肽2(HNP-2)、人嗜中性粒细胞肽3(HNP-3),均属于 $\alpha$ 防御素类别;以及人 $\beta$ 防御素1(hBD1,SEQ ID NO.4)、人 $\beta$ 防御素2(hBD-2,SEQ ID NO.5)、人 $\beta$ 防御素3(hBD3,SEQ ID NO.6)、人 $\beta$ 防御素4(hBD4,SEQ ID NO.7)、黑猩猩 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:10)、猕猴 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:11)、红猩猩 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:3)、小鼠 $\beta$ 防御素3(SEQ ID NO:12)、马 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:13)、猪 $\beta$ 防御素1(SEQ ID NO:14)、山羊 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:12)、牛 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:1)、鸡 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:2),属于 $\beta$ 防御素类别。

[0092] 防御素表达为前体,并且在分泌到细胞外间隙之前通过信号肽(并且在一些情况

下也通过前肽)切割来加工。上文鉴定的序列代表预测的成熟生物活性防御素。本领域技术人员将理解,加工可以在细胞与细胞之间不同,并且所得分泌的成熟肽可以与所预测的序列相差一个或两个C末端或N末端氨基酸,并且仍然保留其生物活性。

[0093] 肠道:

[0094] 肠道是动物用来将食物转移到消化器官的管子,并且它包括消化器官本身。如本文所用的人体肠道是指由口腔、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠和肛管组成的消化系统。

[0095] 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)。GLP-1是神经肽和衍生自胰高血糖素原基因的转录产物的肠降血糖素。外周中GLP-1的主要来源是肠L细胞,其分泌GLP-1作为肠激素。GLP-1的生物活性形式是:GLP-1-(7-37)和GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub>。这些肽是由胰高血糖素原分子的选择性切割产生的。

[0096] 回肠L细胞的GLP-1分泌取决于小肠腔中营养素的存在。这种激素的促分泌素(引起或刺激分泌的剂)包括碳水化合物、蛋白质和脂质等主要营养素。一旦进入循环,由于被酶二肽基肽酶-4快速降解,GLP-1的半衰期小于2分钟。

[0097] GLP-1是有效的抗高血糖激素,诱导胰腺的 $\beta$ 细胞响应于葡萄糖升高而释放激素胰岛素,同时抑制胰高血糖素分泌。这种葡萄糖依赖性作用特别有吸引力,因为当血浆葡萄糖浓度处于正常禁食范围内时胰岛素的不受调节的释放或者胰岛素注射不合时宜可导致血糖的危险降低-低血糖。GLP-1不会发生这种情况,因为当血糖水平处于禁食范围内时,GLP-1不再刺激 $\beta$ 细胞释放更多的胰岛素。此外,GLP-1抑制胃液分泌和运动。这延迟并延长了碳水化合物的吸收,并有助于饱腹作用。

[0098] 利拉鲁肽 (NN2211)是长效胰高血糖素样肽-1受体激动剂,其与刺激胰岛素分泌的内源性代谢激素GLP-1结合相同的受体。

[0099] 其他GLP-1类似物包括艾塞那肽 (exenatide)、利西拉肽 (lixisenatide)、阿必鲁肽 (albiglutid)和度拉糖肽 (dulaglutide)。

[0100] 同一性:同一性:两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性由参数“同一性”描述。

[0101] 使用如在EMBOSS包 (Rice等人,2000,http://emboss.org) (优选3.0.0或更高版本)的Needle程序中实施的Needleman-Wunsch算法 (Needleman和Wunsch,1970, J.Mol.Biol.48:443-453)来测定两个氨基酸序列之间的同一性程度。所使用的任选参数是空位开放罚分10,空位扩展罚分0.5和EBLUSUM62 (BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。标记为“最长同一性”的Needle输出 (使用-nobrief选项获得)用作百分比同一性,并如下计算:

[0102] (相同残基x 100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0103] 治疗:如本文所用的术语“治疗 (treatment和treating)”是指出于对抗病症、疾病或障碍的目的对患者进行的管理和护理。该术语旨在包括对患者所患的给定病症的全部治疗,如出于以下目的给予活性化合物:减轻或缓解症状或并发症;延缓该病症、疾病或障碍的进展;治愈或消除该病症、疾病或障碍;和/或预防该病症、疾病或障碍,其中“预防 (preventing或prevention)”应理解为指出于阻碍、减少或延迟该病症、疾病或障碍的发展的目的对患者进行的管理和护理,并且包括给予活性化合物以预防症状或并发症发生或者降低症状或并发症发生的风险。待治疗的患者优选是哺乳动物,特别是人。待治疗的患者可

以是各个年龄段。

[0104] 受试者,患者:受试者是本文公开的哺乳动物的物种之一的个体。患者是被诊断患有特定障碍的受试者。

[0105] 哺乳动物 $\alpha$ 防御素和 $\beta$ 防御素

[0106] 本公开文本涉及哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素(如牛、猪、绵羊、山羊、小鼠、猴、马或人 $\beta$ 防御素,更优选人科防御素,更优选人 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或人组织蛋白酶抑制素)在肝脏、胰腺或胆道障碍和某些代谢障碍的治疗中的用途。在另一个实施方案中,本公开文本涉及GLP-1类似物(如利拉鲁肽)在肝脏、胰腺或胆道障碍和某些代谢障碍的治疗中的用途。

[0107] 在一个实施方案中,哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和/或SEQ ID NO:17的氨基酸序列中的任一项具有至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、最优选至少95%的同一性程度。在另一个实施方案中,防御素与SEQ ID NO:1-15或17之一相差小于10(如小于8,例如小于5,如小于4,例如小于3,如小于2)个氨基酸。

[0108] 在一个优选的实施方案中,该人 $\alpha$ 防御素由 $\alpha$ 防御素5(SEQ ID NO:8)和/或 $\alpha$ 防御素6(SEQ ID NO:9)组成。在一个优选的实施方案中,该哺乳动物 $\beta$ 防御素由人 $\beta$ 防御素1(SEQ ID NO:4)、人 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:5)、人 $\beta$ 防御素3(SEQ ID NO:6)、人 $\beta$ 防御素4(SEQ ID NO:7)和/或截短的人 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:17)组成。在另一个优选的实施方案中,该组织蛋白酶抑制素由人组织蛋白酶抑制素或衍生自组织蛋白酶抑制素的人LL37(SEQ ID NO:16)组成。在一个优选的实施方案中,该GLP-1类似物是利拉鲁肽。

[0109] 在一个优选的实施方案中,人 $\alpha$ 防御素与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、最优选至少95%的同一性程度。在一个优选的实施方案中,该人哺乳动物 $\alpha$ 防御素由 $\alpha$ 防御素5(SEQ ID NO:8)组成。在一个优选的实施方案中,该人 $\beta$ 防御素与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、最优选至少95%的同一性程度。在一个优选的实施方案中,该人 $\beta$ 防御素由人 $\beta$ 防御素2(SEQ ID NO:5)组成。在一个优选的实施方案中,该人组织蛋白酶抑制素与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、最优选至少95%的同一性程度。在一个优选的实施方案中,该人组织蛋白酶抑制素由人LL37(SEQ ID NO:16)组成。

[0110] 对于除人以外的物种,该受试者优选来源于相同或相关物种的防御素或组织蛋白酶抑制素或者与来自相同物种的防御素或组织蛋白酶抑制素的氨基酸序列具有至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、最优选至少95%的防御素或组织蛋白酶抑制素(例如具有选自SEQ ID NO:1-3、10-15的氨基酸序列的防御素)进行治疗。

[0111] 在又一个实施方案中,该哺乳动物 $\alpha$ 防御素包含人 $\alpha$ 防御素和/或小鼠 $\alpha$ 防御素及其功能等效变体。优选地,该哺乳动物 $\alpha$ 防御素由人 $\alpha$ 防御素5、人 $\alpha$ 防御素6及其功能等效变体组成。更优选地,该哺乳动物 $\alpha$ 防御素由人 $\alpha$ 防御素5及其功能等效变体或直向同源物组成。

[0112] 在一个又进一步的实施方案中,该哺乳动物 $\beta$ 防御素由人 $\beta$ 防御素和/或小鼠 $\beta$ 防御

素及其功能等效变体组成。优选地,该哺乳动物 $\beta$ 防御素由以下项组成:人 $\beta$ 防御素1、人 $\beta$ 防御素2、人 $\beta$ 防御素3、人 $\beta$ 防御素4、黑猩猩 $\beta$ 防御素2、猕猴 $\beta$ 防御素2、和小鼠 $\beta$ 防御素3、红猩猩 $\beta$ 防御素2、马 $\beta$ 防御素2、猪 $\beta$ 防御素1、山羊 $\beta$ 防御素2、牛 $\beta$ 防御素2、或截断的人 $\beta$ 防御素2及其功能等效变体。更优选地,该哺乳动物 $\beta$ 防御素包含人 $\beta$ 防御素1、人 $\beta$ 防御素2、人 $\beta$ 防御素3、人 $\beta$ 防御素4、截断的人 $\beta$ 防御素2及其功能等效变体。甚至更优选地,该哺乳动物 $\beta$ 防御素由人 $\beta$ 防御素2及其功能等效变体或直向同源物组成。

[0113] 在一个又进一步的实施方案中,该哺乳动物组织蛋白酶抑制素由人组织蛋白酶抑制素及其功能等效变体组成。优选地,该哺乳动物组织蛋白酶抑制素由人LL37组成。

[0114] 在一个实施方案中,该方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的至少一种哺乳动物 $\alpha$ -防御素。在其他实施方案中,所提供的方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的至少一种哺乳动物 $\beta$ -防御素。在一个进一步的实施方案中,所提供的方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的至少一种哺乳动物 $\alpha$ -防御素和至少一种哺乳动物 $\beta$ -防御素。一个优选的实施方案提供了该哺乳动物 $\alpha$ 防御素HD5和/或该哺乳动物 $\beta$ 防御素hBD-2的给药。

[0115] 在其他实施方案中,所提供的方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的至少一种哺乳动物组织蛋白酶抑制素。在一些实施方案中,该方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的人LL37。

[0116] 在其他实施方案中,所提供的方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的至少一种GLP-1类似物。在一个具体的实施方案中,该GLP-1类似物是利拉鲁肽。

[0117] 在进一步的实施方案中,所提供的方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的至少一种哺乳动物 $\alpha$ -防御素和至少一种哺乳动物组织蛋白酶抑制素。一个优选的实施方案提供了该哺乳动物 $\alpha$ 防御素HD5和/或该哺乳动物组织蛋白酶抑制素的给药。在一个进一步的实施方案中,所提供的方法包括向需要这种治疗的受试者给予有效量的至少一种哺乳动物 $\beta$ -防御素和至少一种哺乳动物组织蛋白酶抑制素。一个优选的实施方案提供了该哺乳动物 $\beta$ 防御素hBD-2和/或该哺乳动物组织蛋白酶抑制素的给药。在一些实施方案中,该方法进一步包括给予GLP-1类似物,如利拉鲁肽。

[0118] 哺乳动物(例如人) $\alpha$ 防御素或 $\beta$ 防御素或组织蛋白酶抑制素的“功能等效变体”是经修饰的哺乳动物(例如人) $\alpha$ 防御素或 $\beta$ 防御素或组织蛋白酶抑制素,其对肝脏、胆道或胰腺的炎症表现出与亲本哺乳动物(例如人) $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素近似相同的作用。与哺乳动物(例如人)防御素或组织蛋白酶抑制素氨基酸序列相比,该哺乳动物(例如人)防御素或组织蛋白酶抑制素的功能等效变体可以包含1-5个氨基酸修饰、优选1-4个氨基酸修饰、更优选1-3个氨基酸修饰、最优选1-2个氨基酸修饰,并且特别是一个氨基酸修饰。优选地,对于 $\beta$ 哺乳动物防御素,与具有SEQ ID NO:5的人 $\beta$ 防御素2相比。优选地,对于 $\alpha$ 哺乳动物防御素,与具有SEQ ID NO:8的HD5相比。优选地,对于哺乳动物组织蛋白酶抑制素,与具有SEQ ID NO:16的人LL37相比。

[0119] 本发明方法还可以包括给予GLP-1类似物的功能等效物或其修饰形式,如利拉鲁肽的功能等效物。

[0120] 术语“修饰”在本文中意指哺乳动物(例如人)防御素、哺乳动物组织蛋白酶抑制素或GLP-1类似物(如利拉鲁肽)的任何化学修饰。该修饰可以是氨基酸的取代、缺失和/或插

入以及氨基酸侧链的替代;或在氨基酸序列中具有相似特征的非天然氨基酸的使用。特别地,该修饰可以是酰胺化,如C末端的酰胺化。

[0121] 优选地,氨基酸修饰具有次要性质,即不会显著影响多肽的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;单缺失;小氨基或羧基末端延伸;或通过改变净电荷或另一种功能促进纯化的小延伸(如多组氨酸标签、抗原表位或结合结构域)。在一个实施方案中,该小延伸(如多组氨酸标签、抗原表位或结合结构域)通过最多约20-25个残基的小接头肽与该哺乳动物(例如人) $\alpha$ 防御素或 $\beta$ 防御素附接,并且所述接头可以含有限制酶切割位点。图3至6中的Clustal W比对可以用于预测哪些氨基酸残基可以被取代而基本上不影响蛋白质的生物活性。序列使用Clustal W 2.1(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)和以下设置进行比对:空位开放罚分:10,空位扩展罚分:0,05,权重转移(Weight Transition):否,蛋白质的亲水性残基:GPSNDQE,亲水性空位:是,权重矩阵(Weight Matrix):BLOSUM(用于蛋白质)。

[0122] 下组(Clustal W,“强”保守组)内的取代被视为保守取代:

[0123] -S,T,A;N,E,Q,K;N,H,Q,K;N,D,E,Q;Q,H,R,K;M,I,L,V;

[0124] M,I,L,F;H,Y;F,Y,W。

[0125] 下组(Clustal W,“弱”保守组)内的取代被视为半保守取代:

[0126] -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。

[0127] 保守取代的例子是在碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)和小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)的组内进行的取代。通常不改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的,并且例如由Neurath和Hill(1979)描述。最常发生的交换是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和Asp/Gly。

[0128] 除20种标准氨基酸外,非标准氨基酸(如4-羟基脯氨酸、6-N-甲基赖氨酸、2-氨基异丁酸、异缬氨酸和 $\alpha$ -甲基丝氨酸)可以取代野生型多肽的氨基酸残基。有限数量的非保守氨基酸、不由遗传密码编码的氨基酸和非天然氨基酸可以取代氨基酸残基。“非天然氨基酸”在蛋白质合成后被修饰,和/或在其侧链中具有不同于标准氨基酸的化学结构。非天然氨基酸可以化学合成,并且优选地是可商购的,并且包括哌啶酸、噻唑烷羧酸、脱氢脯氨酸、3-甲基脯氨酸和4-甲基脯氨酸以及3,3-二甲基脯氨酸。

[0129] 哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素中和/或GLP-1类似物或其肽骨架中的必需氨基酸可以根据本领域已知的程序鉴定,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham和Wells,1989,Science 244:1081-1085)。在后一种技术中,在分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且测试所得突变分子的生物活性(即,针对炎性肠病的活性和/或对TNF- $\alpha$ 活性的抑制)以鉴定对分子活性至关重要的氨基酸残基。还参见Hilton等人,1996,J.Biol.Chem.271:4699-4708。必需氨基酸的身份也可以从与哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物的肽骨架相关的多肽的同一性分析来推断(参见图3至6中的Clustal W比对)。

[0130] 可以使用已知的诱变、重组和/或改组方法制备和测试单个或多个氨基酸取代,随后进行相关的筛选程序,如Reidhaar-Olson和Sauer,1988,Science241:53-57;Bowie和Sauer,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2152-2156;WO 95/17413;或WO 95/22625所披露的那些。可以使用的其他方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如,Lowman等人,1991,Biochem.30:10832-10837;美国专利号5,223,409;WO 92/06204)和区域定向诱变(Derbyshire等人,1986,Gene 46:145;Ner等人,1988,DNA 7:127)。

[0131] 当不能确定地预测给定取代的结果时,可以根据上文所述的方法容易地测定衍生物以确定生物活性的存在或不存在。

[0132] 长效化合物

[0133]  $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素的半衰期可以通过以下方式来延长:将该 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素与另一种分子融合或缀合,即构建与药学上可接受的分子连接的长效生物活性 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素,提供与以和该 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素相同的方式给予的 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素的体内血浆半衰期相比大量增加的 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素的体内血浆半衰期。

[0134] 长效生物活性 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素包含与药学上可接受的分子连接的哺乳动物 $\alpha$ -防御素或其类似物或者哺乳动物 $\beta$ -防御素或其类似物或者人组织蛋白酶抑制素或其类似物,所述分子选自与哺乳动物新生儿Fc受体结合的分子、转铁蛋白或CH3(CH2) $n$ CO- (其中 $n$ 为8至22)或聚合物。

[0135]  $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素激动剂也可以是非哺乳动物来源的,并且可以选自小有机分子、肽、多肽和蛋白质。

[0136] 该 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素激动剂能以如现有技术文献中描述的各种方式与药学上可接受的分子连接,如(不限于)通过双功能接头进行的化学偶联、基因技术上通过将该防御素(如 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素)的N末端或C末端与药学上可接受的分子(如白蛋白或白蛋白类似物)偶联。特别地,白蛋白或白蛋白类似物(例如人白蛋白)的N末端可以与 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素的C末端或者 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素的N末端偶联;或者白蛋白(例如人白蛋白)的C末端可以与 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素的C末端或者 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素的N末端偶联。可以在白蛋白和 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素链之间插入接头序列。

[0137] 该 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素激动剂可以通过稳定的接头或更不稳定的接头与药学上可接受的分子连接。本领域已知几种接头,包括双功能PEG分子(例如参见Paige等人Pharmaceutical Research,第12卷,第12期,1995)、可水解接头(Shechter等人Bioconjugate Chem.2005,16:913-920和International Journal of Peptide Research and Therapeutics,第13卷,第1-2期,2007年6月和W02009095479)、PDPH和EMCH(参见例如在W02010092135中)。在该 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素激动剂与药学上可接受的分子的化学缀合(两个或更多个分子的连接)强烈降低该功能性 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素活性的特殊情况下,可能优选使用可释放该功能性 $\alpha$ -防御素或 $\beta$ -防御素或组织蛋白酶抑制素激动剂的更不稳定的接头。

[0138] 半衰期延长也可以通过将具有间隔子(例如 $\gamma$ -L-谷氨酰间隔子)和C-18脂肪二酸链的肽骨架酰化为赖氨酸来实现。脂肪二酸位点链和间隔子介导与白蛋白的强烈但可逆的结合,减缓从注射部位的释放并降低肾清除率。

[0139] 同样地,可以通过本领域已知的方法(包括上述方法)延长GLP-1类似物(如利拉鲁肽)的半衰期。

[0140] 在一些实施方案中,该 $\alpha$ -防御素、该 $\beta$ -防御素、该组织蛋白酶抑制素或该GLP-1类似物进一步包含选自下组的至少一种另外的部分,该组由以下各项组成:细胞穿透肽(CPP)、白蛋白结合部分(ABM)、可检测部分(Z)以及半衰期延长肽。

[0141] 在其他实施方案中,该 $\alpha$ -防御素、该 $\beta$ -防御素、该组织蛋白酶抑制素或该GLP-1类似物不包含细胞穿透肽(CPP)、白蛋白结合部分(ABM)、可检测部分(Z)以及半衰期延长肽中的任一种。

[0142] 方法和用途

[0143] 如实施例5所证明的,发现利拉鲁肽(一种GLP-1类似物)的给予在饲喂高脂肪饮食的小鼠中具有降低体重的作用。该GLP-1类似物还降低了肝脏中的脂肪积累和血浆胆固醇水平。因此,诸位发明人考虑通过给予GLP-1或GLP-1类似物治疗肝脏、胆道、胰腺或代谢疾病或障碍,或者肝癌、胆管癌或胰腺癌以及本文所述的其他用途。

[0144] 优选地,通过皮下或肌内给药来肠胃外给予GLP-1或GLP-1类似物。该GLP-1类似物可以选自艾塞那肽、利拉鲁肽、利西拉肽、阿必鲁肽和度拉糖肽。

[0145] 发现人 $\alpha$ 防御素5和人 $\beta$ 防御素2(单独地或组合地)和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物能够预防或治疗饲喂高脂肪/糖饮食(“西方饮食”)的小鼠的体重增加、脂质积累和炎症。饲喂这种高脂肪/糖饮食的小鼠在没有任何治疗的情况下迅速增加体重并积累附睾或内脏脂肪和/或在肝脏中积累脂肪。肝脏中脂肪的积累相当于非酒精性脂肪性肝病,其后期可导致肝脏脂肪变性、肝脏纤维化、肝硬化、肝性脑病并且最终导致肝癌。通过减少腹部脂肪例如在肝脏中的积累,可以减少或预防NAFLD、NASH和相关障碍的发生。

[0146] 如果可以预防或减少体重增加,也可以预防或减少附睾或内脏脂肪的积累和/或肝脏中脂肪的积累,从而显示出作为用于治疗或预防肝病(包括肝癌和肝性脑病)、胆道和胰腺障碍和某些代谢障碍的潜在药物的活性。因此,一个方面提供了用于治疗或预防如本文所定义的肝脏、胆道和胰腺障碍以及代谢障碍的方法。

[0147] 肝脏障碍的例子包括酒精性(IDC10:K70)和非酒精性肝病、中毒性肝病(IDC 10:K71)(例如脂肪肝)、肝炎(IDC 10:K73和K75)、肝硬化(IDC 10:K74)、肝衰竭(IDC 10:K72)、纤维化(IDC 10:K74)和肝脏硬化,最重要的是非酒精性脂肪性肝炎NASH-(IDC 10:K75.8)和非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)(IDC 10:K76.0)。在一个具体的实施方案中,该肝病是NASH或NAFLD。

[0148] 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是最常见的肝病,由于与肥胖症的流行增长密切相关,患病率增加。脂肪变性是细胞中脂质的异常保留,通常发生在肝脏中,但可能发生在肾脏、心脏和肌肉等其他器官中。肝脏中的脂肪变性可引起脂肪性肝病(FLD),其可进一步分类为酒精性或非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),这取决于酒精消耗的贡献。

[0149] 单纯性脂肪变性与肝脏相关发病率或死亡率风险的增加无关;然而,非酒精性脂肪性肝炎(NASH)可能会进展为晚期肝纤维化和肝硬化,并且还和肝癌风险的增加相关。患

有NASH的受试者患上癌症(如肝细胞癌)的风险增加(5%-10%),与因丙型肝炎而患上肝硬化的受试者的风险相当。据估计,约有100万美国公民患有NASH,但是很难量化,因为NASH并不总能引起症状。然而,NASH在美国7%-9%的进行肝脏活检的人群中被诊断,并且是25岁以下美国公民肝移植的主要适应症。

[0150] NASH在BMI(体重指数)大于30、患有糖尿病和/或有胰岛素抵抗的人群中常见。目前,NASH最常见地在常规实验室测试期间发现。其他测试有助于确认NASH的存在并排除其他类型的肝病。成像测试(如超声、CT扫描或磁共振成像)可以揭示肝脏中的脂肪积累,但不能将NASH与具有相似外观的肝病其他病因区分开。需要进行肝脏活检以确认NASH。目前没有肝移植以外的特定疗法用于治疗NASH,但生活方式管理可能有助于降低其严重程度。

[0151] 肝酶(如AST和ALT)的水平升高可用作鉴定NAFLD和NASH患者的诊断程序的一部分。在NAFLD患者中ALT水平通常高于AST水平;然而,AST/ALT比大于1表明该疾病的晚期纤维化形式。这个比率是晚期纤维化的最简单的预测模型,并且可以使用容易获得的肝功能测试来计算。尽管它很简单,但这个比率具有良好的阴性预测值,并且可用于排除晚期纤维化的存在。

[0152] 胆道和胰腺障碍的例子包括:胆管炎(IDC:K 83.0)(特别是原发性硬化性胆管炎)、胆囊炎(IDC10:K81.0)、胆管癌(IDC10:C22.1)和胰腺炎(IDC10:K85.0)。

[0153] 代谢障碍的例子包括:脂蛋白代谢障碍(IDC10:E78);高胆固醇血症(IDC10:E78.0);高甘油三酯血症(IDC10:E78.1);高脂血症(IDC10:E78.2和E78.4);高乳糜微粒血症(IDC10:E78.3);糖原贮积病(IDC10:E74);鞘脂代谢和脂质贮积症(IDC10:E75);脂质贮积症(IDC10:E75.6);神经节苷脂沉积症(IDC10:E75)和神经鞘脂沉积症(IDC10:E 75.2)。

[0154] 这些障碍的共同之处在于它们是基因突变的结果,或者由西方生活方式引起或加剧,引起代谢综合征伴肥胖症、血脂异常、葡萄糖耐受不良和胰岛素抵抗以及腹部/内脏或肝脏脂肪的积累。

[0155] 在优选实施方案中公开的方法可以通过给予至少一种哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或至少一种哺乳动物 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物(如利拉鲁肽)来治疗如上所述的肝脏、胆道、胰腺或代谢障碍。

[0156] 需要由所公开方法提供的治疗的受试者受如上所述的肝脏、胆道、胰腺或代谢障碍的影响。

[0157] 需要由所公开的方法提供的治疗的受试者可能呈现以下症状中的一种或多种:

[0158] • 血压升高: $\geq 140/90$ mmHg;

[0159] • 血脂异常:甘油三酯(TG): $\geq 1.695$ mmol/L,且高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) $\leq 0.9$ mmol/L(雄性), $\leq 1.0$ mmol/L(雌性);

[0160] • 空腹血糖 $>6.1$ mmol/L;

[0161] • AST/ALT $>1$ ;

[0162] • 中心性肥胖:腰:臀比 $>0.90$ (雄性); $>0.85$ (雌性),或体重指数 $>30$

[0163] kg/m<sup>2</sup>;以及

[0164] • 微量白蛋白尿:尿白蛋白排泄率 $\geq 20$  $\mu$ g/min或白蛋白:肌酐比 $\geq 30$ mg/g。

[0165] 在一个实施方案中,根据所公开的方法,至少一种哺乳动物 $\alpha$ -防御素和/或至少一种哺乳动物 $\beta$ -防御素的给予通常是口服的。

[0166] 可以在配制用于通过任何常规途径给予的组合物中治疗地采用哺乳动物 $\alpha$ 防御素和 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物。在一个实施方案中,口服给予哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物。在其他实施方案中,给药是肠胃外的,如静脉内的、肌内的、皮下的、腹膜内的或肺部的。

[0167] 在一些实施方案内,优选实施方案的组合物可以配制成冻干物,利用提供作为冻干物的稳定性的适当赋形剂,并且随后再水合。

[0168] 含有哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或哺乳动物 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物(如人 $\alpha$ 防御素和/或人 $\beta$ 防御素和/或人组织蛋白酶抑制素和/或利拉鲁肽)的药物组合物可以根据常规方法制备,例如通过混合、制粒、包衣、溶解或冻干过程。在一个优选的实施方案中,将含有哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或哺乳动物 $\beta$ 防御素的药物组合物配制成无菌且等渗的溶液。

[0169] 在一个实施方案中,所提供的药物组合物包含至少一种哺乳动物 $\alpha$ 防御素。哺乳动物 $\alpha$ 防御素的例子是HD5和HD6。在一个优选的实施方案中,该组合物包含哺乳动物 $\alpha$ 防御素HD5。在另一个实施方案中,该药物组合物包含至少一种哺乳动物 $\beta$ 防御素。哺乳动物 $\beta$ 防御素的例子是hBD1、hBD-2、截短的hBD-2、hBD3和hBD4。在一个优选的实施方案中,该组合物包含哺乳动物 $\beta$ 防御素hBD-2。在一个进一步的实施方案中,该药物组合物包含至少一种哺乳动物 $\alpha$ 防御素和至少一种哺乳动物 $\beta$ 防御素。哺乳动物 $\alpha$ 防御素的例子是HD5和HD6。哺乳动物 $\beta$ 防御素的例子是hBD-2。在一个优选的实施方案中,该组合物包含哺乳动物 $\alpha$ 防御素HD5和哺乳动物 $\beta$ 防御素hBD-2。在其他实施方案中,该组合物或饲料组合物包含一种或多种选自以下项的非人防御素:具有选自SEQ ID NO:1-3和10-15的氨基酸序列的防御素以及如本文所定义的序列变体。在另一个实施方案中,该药物组合物包含至少一种组织蛋白酶抑制素,例如人组织蛋白酶抑制素,例如SEQ ID NO:16的人LL37。在另一个实施方案中,该药物组合物包含至少一种GLP-1类似物,如利拉鲁肽。

[0170] 优选实施方案的药物组合物包含哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或哺乳动物 $\beta$ 防御素(如人 $\alpha$ 防御素和人 $\beta$ 防御素)和/或组织蛋白酶抑制素(如人组织蛋白酶抑制素)和/或GLP-1类似物(如利拉鲁肽)以及药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0171] 药学上可接受的载体和/或稀释剂是本领域技术人员熟悉的。对于配制成液体溶液的组合物,可接受的载体和/或稀释剂包括盐水和无菌水,并且可以任选地包括抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和其他常用添加剂。

[0172] 所公开的化合物可以配制成广泛多样的口服给予制剂。固体形式制剂可以包括散剂、片剂、滴剂、胶囊剂、扁囊剂、锭剂和可分散的颗粒剂。适于口服给予的其他形式可以包括液体形式制剂(包括乳液、糖浆、酞剂、水溶液、水性悬浮液、牙膏、凝胶洁齿剂(dentrifrice)、口香糖)或固体形式制剂(其意在使用前不久转化为液体形式制剂,如溶液、悬浮液和乳液)。

[0173] 该制剂可以含有(除哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或哺乳动物 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素和其他任选的活性成分外)载体、填充剂、崩解剂、流动调节剂、糖和甜味剂、香料、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐、缓冲剂、稀释剂、分散剂和表面活性剂、粘合剂、润滑剂和/或本领域已知的其他药物赋形剂。

[0174] 本领域技术人员能以适当的方式并且根据公认的实践(如Remington'

sPharmaceutical Sciences, Gennaro (1990) 中所述的那些) 进一步配制哺乳动物 $\alpha$ 防御素和哺乳动物 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素。

[0175] 哺乳动物 $\alpha$ 防御素和哺乳动物 $\beta$ 防御素(如人 $\alpha$ 防御素和人 $\beta$ 防御素)可以单独使用,或与一种、两种或更多种其他药物化合物或药物物质用在联合疗法中,例如与胰岛素或胰岛素类似物、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 或GLP-1类似物、或二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 抑制剂,和/或与一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0176] 哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或哺乳动物 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素(如人 $\alpha$ 防御素、人 $\beta$ 防御素和/或人组织蛋白酶抑制素)可以单独使用,或与一种、两种或更多种其他药物化合物或药物物质用在联合疗法中,例如与抗生素;胰岛素或胰岛素类似物;胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 或GLP-1类似物;胰高血糖素样肽-2 (GLP2) 或GLP-2类似物;二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 抑制剂;二甲双胍;钠葡萄糖转运蛋白-2 (SGLT-2) 抑制剂;胰高血糖素受体拮抗剂和/或瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员1 (TRPV1) 拮抗剂和/或与一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0177] 哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或哺乳动物 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素(如人 $\alpha$ 防御素、人 $\beta$ 防御素和人组织蛋白酶抑制素)也可以与化学疗法、免疫疗法、放射疗法或这些的组合用在联合疗法中。

[0178] 同样地, GLP-1类似物可以单独使用,或与一种、两种或更多种其他药物化合物或药物物质用在联合疗法中,例如与抗生素;胰岛素或胰岛素类似物;胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 或另外的GLP-1类似物;胰高血糖素样肽-2 (GLP2) 或GLP-2类似物;二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 抑制剂;二甲双胍;钠葡萄糖转运蛋白-2 (SGLT-2) 抑制剂;胰高血糖素受体拮抗剂和/或瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员1 (TRPV1) 拮抗剂和/或与一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0179] GLP-1类似物(利拉鲁肽)也可以与化学疗法、免疫疗法、放射疗法或这些的组合用在联合疗法中。

[0180] 体外合成

[0181] 哺乳动物 $\alpha$ 防御素、哺乳动物 $\beta$ 防御素、组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物可以通过体外合成使用如本领域已知的常规方法制备。各种商业合成装置是可供使用的,例如应用生物系统公司(Applied Biosystems Inc.)、贝克曼公司(Beckman)等的自动合成仪。通过使用合成仪,天然存在的氨基酸可以被非天然氨基酸(特别是D-异构体(或D-形式),例如D-丙氨酸和D-异亮氨酸、非对映异构体、具有不同长度或官能度的侧链等)取代。具体的序列和制备方式将由方便性、经济性、所需纯度等决定。

[0182] 可以向各种肽或蛋白质提供化学连接,包括方便的键合官能度,如用于酰胺或取代的胺形成(例如还原胺化)的氨基、用于硫醚或二硫化物形成的硫醇基团、用于酰胺形成的羧基等。

[0183] 如果需要,可以在合成期间或在表达期间将各个基团引入肽中,这允许连接到其他分子或表面。因此,半胱氨酸可以用于制备硫醚,组氨酸用于连接到金属离子络合物,羧基用于形成酰胺或酯,氨基用于形成酰胺等。

[0184] 哺乳动物 $\alpha$ 防御素和哺乳动物 $\beta$ 防御素组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物或其功能等效物也可以根据常规重组合成方法分离和纯化。可以使用适当的表达载体和真核表

达系统进行重组合成。可以制备表达宿主和培养基以及使用HPLC、排阻层析、凝胶电泳、亲和层析或其他纯化技术纯化存在的防御素的溶液。WO 2010/007166 (诺维信公司 (Novozymes)) 中披露了在大肠杆菌中重组表达人 $\beta$ 防御素2的方法。

#### [0185] 剂量

[0186] 在药物组合中优选以有效治疗肝病、胆道或胰腺障碍或代谢障碍且优选对患者具有可接受的毒性的量采用哺乳动物 $\alpha$ 防御素、哺乳动物 $\beta$ 防御素、组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物,如人 $\alpha$ 防御素、人 $\beta$ 防御素、组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物(如利拉鲁肽)。在药物组合中还优选以有效治疗肝脏、胆道或胰腺的炎症且优选对需要治疗的患者或动物具有可接受的毒性的量采用哺乳动物 $\alpha$ 防御素、哺乳动物 $\beta$ 防御素、哺乳动物组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物,物如人 $\alpha$ 防御素、人 $\beta$ 防御素、人组织蛋白酶抑制素和/或GLP-1类似物。

[0187] 对于此类治疗,适当的剂量当然将根据例如所用化合物的化学性质和药代动力学数据、个体宿主、给药方式和所治疗病症的性质和严重程度而变化。

[0188] 通常,在哺乳动物(例如人)中,人 $\alpha$ 防御素的指定日剂量优选为约0.1mg HD5/kg体重至约10mg HD5/kg体重、更优选约0.5mg HD5/kg体重至约10mg HD5/kg体重;如1mg HD5/kg体重至10mg HD5/kg体重、更优选约1.2mg HD5/kg体重至约10mg HD5/kg体重、优选约1.2mg HD5/kg体重至约5mg HD5/kg体重、甚至更优选1.2mg HD5/kg体重,例如以高达一天一次、两次或三次的分剂量给予。类似的剂量可以用于其他 $\alpha$ -防御素。在一些实施方案中,该 $\alpha$ -防御素一天给予至少两次,如一天三次。

[0189] 在一个实施方案中,人 $\beta$ 防御素的指定日剂量优选为约0.1mg hBD-2/kg体重至约10mg hBD-2/kg体重、更优选约0.5mg hBD-2/kg体重至约10mg hBD-2/kg体重;如1mg hBD-2/kg体重至10mg hBD-2/kg体重、更优选约1.2mg hBD-2/kg体重至约10mg hBD-2/kg体重、优选约1.2mg hBD-2/kg体重至约5mg hBD-2/kg体重、甚至更优选1.2mg hBD-2/kg体重,例如以高达一天一次、两次或三次的分剂量给予。类似的剂量可以用于其他 $\beta$ -防御素。在一些实施方案中,该 $\beta$ -防御素一天给予至少两次,如一天三次。在优选的实施方案中,给药是口服的。

[0190] 在一个实施方案中,人组织蛋白酶抑制素的指定日剂量优选为约0.1mg组织蛋白酶抑制素/kg体重至约10mg组织蛋白酶抑制素/kg体重,例如以高达一天一次、两次或三次的分剂量给予。在一些实施方案中,该组织蛋白酶抑制素一天给予至少两次,如一天三次。在优选的实施方案中,给药是口服的。

[0191] 在一个实施方案中,GLP-1类似物(如利拉鲁肽)的指定日剂量优选为每天约0.6mg GLP-1类似物至约3mg GLP-1类似物。例如,利拉鲁肽的剂量方案可以是一天0.6mg持续一周,然后是一天1.2mg持续一周,然后是一天1.8mg持续一周,然后是一天2.4mg持续一周,然后是一天3mg持续一周或更长时间,如两周、如三周、如四周或更长时间。在一个优选的实施方案中,该GLP-1类似物静脉内地、肌内地或皮下地给予。

[0192] 人 $\alpha$ 防御素连同入 $\beta$ 防御素或人组织蛋白酶抑制素的指定日剂量优选为约0.1mg防御素或组织蛋白酶抑制素/kg体重至约10mg防御素/kg体重、更优选约0.5mg防御素或组织蛋白酶抑制素/kg体重至约10mg防御素/kg体重;如1mg防御素或组织蛋白酶抑制素/kg体重至10mg防御素或组织蛋白酶抑制素/kg体重、更优选约1.2mg防御素或组织蛋白酶抑制素/

kg体重至约10mg防御素/kg体重、优选约1.2mg防御素或组织蛋白酶抑制素/kg体重至约5mg防御素/kg体重、甚至更优选1.2mg防御素或组织蛋白酶抑制素/kg体重,例如以高达一天一次、两次或三次的分剂量给予。

[0193] 当以一个剂量给予两种不同的防御素时,该剂量可以包含基于重量或基于摩尔测定的等量或近似等量的两种防御素。该比率也可以不同,使得 $\alpha$ 防御素与 $\beta$ -防御素的比率在10:1至1:10、如5:1至1:5、例如2:1至1:2变化(基于重量或摩尔测定)。

[0194] 该日剂量可以对应于0.6mg HD5/kg体重加0.6mg hBD-2/kg体重。

[0195] 在某些实施方案中,优选实施方案的药物组合物可以包含哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或哺乳动物 $\beta$ 防御素和/或哺乳动物组织蛋白酶抑制素,如人 $\alpha$ 防御素和/或人 $\beta$ 防御素和/或人组织蛋白酶抑制素,其量为每单位剂型约0.1mg或更少至约1500mg或更多,约每单位剂型0.5mg或更少至约1500mg或更多,优选约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9mg至约150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900或1000mg,更优选约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25mg至约30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100mg。然而,在某些实施方案中,可以优选比上述那些更低或更高的剂量。本领域技术人员可以容易地确定适当的浓度和剂量。在某些实施方案中,优选实施方案的药物组合物包含哺乳动物 $\alpha$ 防御素,如人 $\alpha$ 防御素。在其他实施方案中,优选实施方案的药物组合物包含哺乳动物 $\beta$ 防御素,如人 $\beta$ 防御素。在进一步的实施方案中,优选实施方案的药物组合物包含哺乳动物 $\alpha$ 防御素和哺乳动物 $\beta$ 防御素(如人 $\alpha$ 防御素和人 $\beta$ 防御素),其中该 $\alpha$ 防御素和该 $\beta$ 防御素基于摩尔浓度或基于mg/mL等量存在。

[0196] 在一个实施方案中,该哺乳动物 $\alpha$ 防御素和/或 $\beta$ 防御素和/或组织蛋白酶抑制素每天至少给予一次,如每天至少两次,例如每天至少3次。在一个实施方案中,该GLP-1类似物每天至少给予一次,如每天至少两次,例如每天至少3次。在一个实施方案中,该GLP-1类似物皮下、静脉内地或肌内地给予。

[0197] 通过以下实施例进一步描述本公开文本,所述实施例不应解释为限制本发明的范围。

## 实施例

[0198] 实施例1.通过防御素预防体重增加和改善肌肉/脂肪比以及预防肝脏中的脂

[0199] 肪积累。

[0200] 材料和方法

[0201] 小鼠:将小鼠一式三份地圈养,每组4只笼子。恰在关灯(6pm)之前每天登记饲料摄入量。对各小鼠进行分组和笼子改变顺序的实验程序。在SPF标准条件下,将小鼠在12小时光照/黑暗循环下保持在室温下。

[0202] 饮食:对于给药,平均体重估计为每只小鼠25克。每只小鼠每天吃大约3克饲料。

[0203] 处理方案:给小鼠饲喂高脂肪饮食(HFD)或低脂肪(LF)对照饮食。HFD含有4个亚组;1个hBD-2,1个HD5,1个hBD-2/HD5和1个标准HFD而不补充防御素。防御素浓度为每千克小鼠每天1,2mg hBD-2。以与hBD-2等摩尔的浓度给予HD5。组合组给予50%hBD-2+50%HD5,因此防御素的总量等同于其余测试组。

[0204] 测试:两天内进行胰岛素耐量测试(ITT)、葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)测试、

口服葡萄糖耐量测试 (OGTT) 和五小时空腹胰岛素测试 (每天每组 50% 的小鼠), 因此避免逐日变化作为混淆因素。

[0205] 进行微生物分析以研究肠道的微生物群。对来自 60 只小鼠的 4 对样品进行纵向 16S 表征, 总共 240 个样品。在饮食改变之前、饮食改变后 1 周、饮食改变后 4 周和终止时, 对每只小鼠进行取样, 从而确保彻底表征作为防御素处理的结果的粪便微生物群。此外, 在终止时 (通过 16S 或深度测序) 分析小肠的内容物, 因此为在营养摄取的关键位点处的可能改变提供有价值的见解。最后, 进行盲肠内容物的完整代谢组分析以允许微生物改变转化为全身代谢。还进行肝脏、十二指肠、空肠、回肠和结肠的详细组织学和免疫组织化学分析。

[0206] 实施例 2. 通过防御素预防体重增加和改善肌肉/脂肪比以及预防肝脏中的脂肪积累。

[0207] 材料和方法

[0208] 小鼠: 将小鼠一式三份地圈养, 每组 4 只笼子。恰在关灯 (6pm) 之前每天登记饲料摄入量。对各小鼠进行分组和笼子改变顺序的实验程序。在 SPF 标准条件下, 将小鼠在 12 小时光照/黑暗循环下保持在室温下。

[0209] 饮食: 对于给药, 平均体重估计为每只小鼠 25 克。每只小鼠每天吃大约 3 克饲料。

[0210] 处理方案: 给小鼠饲喂高脂肪饮食 (HFD) 或低脂肪 (LF) 对照饮食。HFD 含有 3 个亚组; 1 个 hBD-2, 1 个 HD5 和 1 个标准 HFD 而不补充防御素。防御素浓度为每千克小鼠每天 1, 2mg hBD-2。以与 hBD-2 等摩尔的浓度给予 HD5。测试: 两天内进行胰岛素耐量测试 (ITT)、葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 测试、口服葡萄糖耐量测试 (OGTT) 和五小时空腹胰岛素测试 (每天每组 50% 的小鼠), 因此避免逐日变化作为混淆因素。

[0211] 结果 (实施例 1 和 2)

[0212] 在 HFD 组中, 在终止时, 用  $\alpha$  防御素、 $\beta$  防御素以及  $\alpha$  防御素和  $\beta$  防御素处理的小鼠显示出比未经处理的小鼠更少的体重增加、更高的肌肉/脂肪比以及肝脏中更少的脂肪积累。

[0213] 体重变化。虽然在所有三个实验饮食组中食物摄入量类似, 但在 10 周研究期间, 两个高脂肪饮食 (HFD) 组均比低脂肪饮食 (LFD) 参考组增加显著更多的体重 (\* $p < 0.0001$ , 双因素方差分析, 图基事后检验)。然而, HFD 加 hBD-2 组比 HFD 参考组增加显著更少的体重 (\* $p = 0.0028$ ) (图 7 和 10A)。

[0214] 瘦肉量/脂肪量发展。在研究开始时, 在三个实验组之间瘦肉量/脂肪量均匀分布。在研究结束时, 两个 HFD 组均增加了相同量的瘦肉量, 这显著高于 LFD 组 (\* $p < 0.0001$ , 单因素方差分析, 图基事后检验), 可能是由于增加的身体质量。在研究结束时, 与 LFD 组相比, HFD 加 hBD-2 组趋向于增加的脂肪量。然而, 这没有统计学意义 (\* $p = 0.25$ )。HFD 组的脂肪量的量与 LFD 组相比增加近 4 倍, 并且脂肪量的量与 HFD 加 hBD-2 组相比增加 2 倍 (分别为 \* $p < 0.0001$  和 \* $p = 0.005$ ) (图 8A)。

[0215] 胰岛素耐量测试。LFD 组和 HFD 加 hBD-2 组均比 HFD 组对胰岛素显著更敏感 ( $p < 0.05$ ) (图 9A 和 13A)。

[0216] 葡萄糖耐量测试。HFD 组葡萄糖耐受不良, 从 15min 处的峰值的延长葡萄糖清除到 120min 处的半清除。LFD 组具有从 15min 处的峰值起的快速葡萄糖清除。HFD 加 hBD-2 组具有略微延长的葡萄糖清除, 但达到显著低于 HFD 组的葡萄糖水平 ( $p < 0.05$ ) (图 9B 和 12A)。

[0217] 葡萄糖刺激的胰岛素分泌。HFD 组葡萄糖体内平衡受损, 给予葡萄糖后胰岛素浓度

显著更高且持续 ( $p < 0.05$ )。在葡萄糖刺激后, LFD组的胰岛素浓度几乎没有增加。HFD加hBD-2组具有比LFD组更高但不显著不同的胰岛素浓度 (图12B和9B)。

[0218] 五小时空腹胰岛素。HFD组患有严重糖尿病, 空腹胰岛素水平显著高于LFD ( $*p = 0.0004$ ), 并且临界空腹胰岛素显著高于HFD加hBD-2组 ( $*p = 0.057$ )。LFD和HFD加hBD-2组之间没有显著差异 ( $*p = 0.17$ ) (图9D)。

[0219] \*图基事后检验, 否则邓尼特事后检验。

[0220] 用于评估 $\beta$ 细胞功能和胰岛素抵抗的稳态模型评估 (HOMA-IR)。HFD加hBD-2组的HOMA-IR显著低于HFD组, 表明保留了 $\beta$ 细胞功能并限制了胰岛素抵抗 (图13B)。

[0221] 肝脏代谢。肝脏中的过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma 2$  (PPAR  $\gamma 2$ ) 表达诱导肝脏脂肪变性, 并且发现在饲喂HFD的对照组中上调 ( $*p < 0.001$ )。HFD加hBD-2导致PPAR  $\gamma 2$  的表达显著降低 ( $*p = 0.03$ ), 预期其与减少的脂肪积累相关, 从而潜在地使免受肝脏脂肪变性 (图14A)。HFD加hBD-2组和HFD组之间的肝脏量没有显著差异; 与LFD小鼠相比, 两组的肝脏量均显著增加 (图11B)。然而, HFD加hBD-2组中的eWAT显著低于HFD组 (图11C)。

[0222] hBD-2作为饲喂高脂肪饮食的小鼠中的体重增加、肥胖症和肝脏中的脂肪积累的发展的预防的结论:

[0223] 尽管饲喂60% HFD, 50%的饲喂HFD-hBD-2的小鼠具有类似LFD参考小鼠的体脂百分比。一些小鼠的脂肪%甚至低于最低LFD参考小鼠。

[0224] 令人惊讶的是, 最受保护的饲喂hBD-2的小鼠具有与LFD参考小鼠相同或更小的内脏脂肪量, 这在饲喂60% HFD时高度罕见。

[0225] 改善的胰岛素敏感性。饲喂hBD-2的小鼠与LFD参考小鼠没有显著差异。胰岛素耐量测试和HOMA-IR均指示改善的胰岛素信号传导。

[0226] 与HFD对照小鼠相比, 葡萄糖耐受显著改善。重要的是, 葡萄糖激发期间的葡萄糖耐受和葡萄糖刺激的胰岛素反应均得到改善。饲喂hBD-2的小鼠因此比HFD对照小鼠需要更少的胰岛素来处理葡萄糖推注。

[0227] 与HFD对照小鼠相比, HFD加hBD-2小鼠的附睾脂肪减少。HFD加hBD-2导致PPAR  $\gamma 2$  的表达显著降低, 表明脂肪积累减少。

[0228] HD-5用于预防体重增加和改善肌肉/脂肪比以及预防肝脏中的脂肪积累:

[0229] 体重变化。所有饲喂HFD的组在研究期间具有相同的食物摄入量并且在13周的磨合期中具有相等的体重增加 (图20A)。

[0230] 葡萄糖耐量测试。HFD+HD5处理的动物和HFD小鼠的葡萄糖耐受高于LFD小鼠 (图22A)。

[0231] 胰岛素耐量测试。LFD组比饲喂HFD的组具有显著更大的胰岛素敏感性 (图23A)。

[0232] 葡萄糖刺激的胰岛素分泌。HFD组葡萄糖体内平衡受损, 给予葡萄糖后胰岛素浓度显著更高且持续 ( $p < 0.05$ )。在葡萄糖刺激后, LFD组的胰岛素浓度几乎没有增加 (图22B)。

[0233] 用于评估 $\beta$ 细胞功能和胰岛素抵抗的稳态模型评估 (HOMA-IR)。HFD加HD-5组的HOMA-IR不显著低于HFD组 (图23B)。

[0234] 肝脏代谢。与LFD对照相比, 饲喂HFD的组中肝脏中的过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma 2$  (PPAR  $\gamma 2$ ) 表达增加 ( $*p < 0.001$ ), 并且HD-5对HFD没有保护作用 (图24A)。与LFD对照组相比, HFD加HD-5组中肝脏中的过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶1 (Acox1) 的表达显著增加 (\*

$p=0.0009$ ),并且在HFD对照和HFD加HD-5组之间观察到临界显著差异( $*p=0.07$ ,单因素方差分析),表明通过HD-5进行的脂肪酸氧化的水平较高(图24B)。

[0235] HD5作为饲喂高脂肪饮食的小鼠中的体重增加、肥胖症和肝脏中的脂肪积累的发展的预防的结论:

[0236] 饲喂HD5的小鼠具有比饲喂HFD的对照小鼠小的临界内脏脂肪。

[0237] 葡萄糖耐受没有改善,表明hBD-2和HD5之间的作用方式存在差异。

[0238] 肝脏代谢。然而,hBD-2显著降低PPAR  $\gamma$  2的表达,从而使免受肝脏脂肪变性,HD5显著增加Acox1的表达,从而增加脂肪酸代谢。肝酶表达的这些变化是不同的并且可能具有协同作用,因为它们都可能预防肝脏中的脂肪积累。

[0239] 实施例3.通过防御素治疗肝脏脂肪性肝炎中的脂肪积累。

[0240] 材料和方法

[0241] 小鼠:将小鼠一式三份地圈养,每组4只笼子。每周登记3次饲料摄入量。对各小鼠进行分组和笼子改变顺序的实验程序。在SPF标准条件下将小鼠保持在室温下。

[0242] 饮食:对于给药,平均体重估计为每只小鼠25克。每只小鼠每天吃大约3克饲料。

[0243] 处理方案:给小鼠饲喂12周高脂肪饮食(HFD)。在这12周中,小鼠的体重加倍,达到大约50克。将小鼠分成四个亚组;1个hBD-2,1个HD5,1个hBD-2/HD5和1个标准HFD而不补充防御素。防御素浓度为每千克小鼠每天1,2mg hBD-2。以与hBD-2等摩尔的浓度给予HD5。组合组给予50%hBD-2+50% HD5,因此防御素的总量等同于其余测试组。

[0244] 测试:两天内进行胰岛素耐量测试(ITT)、葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)测试和口服葡萄糖耐量测试(OGTT)(每天每组50%的小鼠),因此避免逐日变化作为混淆因素。

[0245] 进行微生物分析以研究肠道的微生物群。对来自60只小鼠的4对样品进行纵向16S表征,总共240个样品。在防御素处理之前、防御素处理开始后1周、防御素处理开始后4周和终止时,对每只小鼠进行取样,从而确保彻底表征作为防御素处理的结果的粪便微生物群。此外,在终止时(通过16S或深度测序)分析小肠的内容物,因此为在营养摄取的关键位点处的可能改变提供有价值的见解。最后,进行盲肠内容物的完整代谢组分析以允许微生物改变转化为全身代谢。还进行肝脏、十二指肠、空肠、回肠和结肠的详细组织学和免疫组织化学分析。

[0246] 结果

[0247] 与未经处理的HFD小鼠相比,在防御素处理的组中,在终止时,用 $\alpha$ 防御素、 $\beta$ 防御素以及 $\alpha$ 防御素和 $\beta$ 防御素处理的小鼠显示出肝脏中脂肪积累的正常化、体重减轻、肌肉/脂肪比改善和标准化代谢参数(如胰岛素耐量测试(ITT)、葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)测试和口服葡萄糖耐量测试(OGTT))。

[0248] 实施例4.通过防御素治疗体重增加、肥胖症和肝脏脂肪性肝炎中的脂肪积累。

[0249] 材料和方法

[0250] 小鼠:将小鼠一式三份地圈养,每组4只笼子。每周登记3次饲料摄入量。对各小鼠进行分组和笼子改变顺序的实验程序。在SPF标准条件下将小鼠保持在室温下。

[0251] 饮食:对于给药,平均体重估计为每只小鼠25克。每只小鼠每天吃大约3克饲料。

[0252] 处理方案:给小鼠饲喂12周高脂肪饮食(HFD)。在这12周中,小鼠的体重加倍,达到大约50克。将小鼠分成三个亚组;1个hBD-2,1个HD5和1个标准HFD而不补充防御素。防御素

浓度为每千克小鼠每天1,2mg hBD-2。以与hBD-2等摩尔的浓度给予HD5。

[0253] 测试:两天内进行胰岛素耐量测试 (ITT)、葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 测试和口服葡萄糖耐量测试 (OGTT) (每天每组50%的小鼠),因此避免逐日变化作为混淆因素。

[0254] 结果

[0255] 体重变化。饲喂标准高脂肪饮食 (HFD) 的组在整个研究期间具有相等的食物摄入量,并且在前13周具有相同的体重发展与相等的脂肪量和瘦肉量,因此在饮食干预之前具有相同的起始点。体重增加显著大于饲喂低脂肪饮食 (LFD) 的组 (\* $p < 0.05$  双因素方差分析) (图15A)。在饮食干预后,HFD组的体重继续增加,然而HFD加hBD-2组在饮食干预后的前4周趋于增加较少体重,尽管不显著 (\* $p = 0.07$  双因素方差分析)。从第4周到研究期结束,HFD加hBD-2组增加与标准HFD组类似的体重 (\* $p = 0.82$  双因素方差分析) (图15B)。

[0256] 脂肪百分比。在研究期开始时,三个实验组之间总体重的脂肪百分比类似。在饮食干预时,两个饲喂HFD的组的脂肪百分比相同,并且均显著大于饲喂LFD的组,这在饮食干预后的10周内是一致的 (\* $p < 0.05$  双因素方差分析) (图16A)。在饮食干预后第4周,约75%的HFD加hBD-2组的脂肪百分比比干预前小,与标准HFD组形成鲜明对比,其中所有小鼠的脂肪百分比均增加。(图16B) 在这个时间点,HFD加hBD-2组的脂肪百分比变化显著小于标准HFD组。(\* $p = 0.003$  双因素方差分析)。在终止时,饲喂HFD的组中肝脏的重量显著大于LFD组 (\* $p < 0.05$  单因素方差分析) (图17A)。在终止时,HFD组中内脏脂肪 (eWAT) 的量也高于LFD (\* $p < 0.05$  单因素方差分析)。在饲喂HFD的组之间内脏脂肪 (eWAT) 没有显著差异 (图17B)。

[0257] 葡萄糖耐量测试。HFD加hBD-2组中的葡萄糖耐受从饮食干预时迅速改善,其显示较小的血糖峰值,以及在2周后更快地葡萄糖清除 (图18A)。观察到该研究中大多数葡萄糖耐受不良的小鼠在从标准HFD转换为HFD加hBD-2后的前两周急剧改善 (图18B)。

[0258] 胰岛素耐量测试。LFD组比两个HFD组对胰岛素显著更敏感 (\* $p < 0.05$  双因素方差分析)。与HFD对照组相比,HFD加hBD-2组同时对胰岛素更敏感,这意味着自饮食干预以来胰岛素耐受的改善 (\* $p < 0.05$  双因素方差分析) (图18C)。

[0259] 肝脏代谢。与LFD对照组相比,HFD加hBD-2组肝脏中过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶1 (Acox1) 的表达显著增加 (\* $p = 0.0027$ ),表明通过hBD-2的饮食干预,脂肪酸氧化的水平较高 (图19)。对照HFD组和HFD加hBD-2组之间的肝脏重量和eWAT重量没有显著差异 (图17)。

[0260] hBD-2作为饲喂高脂肪饮食的小鼠中的体重增加、肥胖症和肝脏中的脂肪积累的治疗的结论:

[0261] -总体而言,饲喂hBD-2的小鼠在干预的前4周比HFD对照小鼠增加更少的体重 (图15A)。

[0262] -7/8肥胖且葡萄糖耐受不良的小鼠在仅2周的干预后显著改善其葡萄糖耐受 (图18A)。单只小鼠是基线时最葡萄糖耐受不良的小鼠,50克体重中的脂肪量为大约20克。尽管存在这种严重不健康的表型,但通过2周的干预,该小鼠在葡萄糖耐受不良方面被完全挽救 (图18B)。

[0263] -在全身水平上,饲喂hBD-2的小鼠比HFD对照小鼠具有更低的胰岛素抵抗 (图18C)。这是一个关键点,因为严重的全身胰岛素抵抗非常难以逆转,并且是治疗人类疾病 (例如糖尿病、CVD、某些癌症等) 的主要限制因素。

[0264] -饲喂hBD-2的小鼠的肝脏中的脂肪酸氧化增加 (图19)。

[0265] HD-5作为饲喂高脂肪饮食的小鼠中的体重增加、肥胖症和肝脏中的脂肪积累的治疗:

[0266] 体重变化。所有饲喂HFD的组在研究期间具有相同的食物摄入量并且在13周的磨合期中具有相等的体重增加(图25A)。在饮食干预后,饲喂HFD加HD-5的组比HFD对照增加显著更少的体重(\* $p < 0.05$ 双因素方差分析)(图25B)。此外,观察到HFD加HD-5组中脂肪百分比降低的趋势(图26A),并且与HFD对照相比,在饮食改变后4周测量到HFD加HD-5中显著更低的脂肪百分比(\* $p = 0.009$ 双因素方差分析)(图26B)。在终止时,与HFD对照相比,在饲喂HFD加HD-5的组中肝脏的重量趋于降低。确切地说,约50%的饲喂标准HFD的小鼠的得分高于饲喂最高HFD加HD-5的小鼠(图27A)。饲喂HFD的组的内脏脂肪重量大于饲喂LFD的组。(\* $p < 0.05$ 单因素方差分析)(图27B)。

[0267] 葡萄糖耐量测试。代表性笼子第2笼中HFD+HD5处理的动物的葡萄糖耐受从干预开始(第13-0周)直至第13.8周随时间改善(图28A)。

[0268] 胰岛素耐量测试。LFD组比饲喂HFD的组具有显著更大的胰岛素敏感性(\* $p < 0.05$ 双因素方差分析)。与HFD对照相比,HFD加HD-5组对胰岛素更敏感,这意味着自饮食干预以来胰岛素耐受的改善。(\* $p < 0.05$ 双因素方差分析)(图28B)。

[0269] 肝脏代谢。在所有三个组中在肝脏中过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶1(Acox1)的表达基本相同(图29B),而与LFD组相比,两个HFD组中的PPAR  $\gamma$  2的表达显著更高(图29A)。

[0270] HD5作为饲喂高脂肪饮食的小鼠中的体重增加、肥胖症和肝脏中的脂肪积累的治疗的结论:

[0271] 与饲喂HFD的对照小鼠相比,饲喂HD5的小鼠具有显著降低的体重变化(图25B)。

[0272] -饲喂HFD-HD5的肥胖小鼠的脂肪量有降低的总趋势(图26A和B)。

[0273] -与饲喂HFD的对照小鼠相比,饲喂HD5的小鼠的肝脏质量趋于降低(图27A)。由于内脏和皮下贮库没有显著差异(图27B),这个观察结果表明HD5小鼠中适度降低的脂肪%限于肝脏脂解/脂质氧化。

[0274] -饲喂的HD5小鼠的葡萄糖耐受随时间改善(图28A),

[0275] -饲喂HD5的小鼠比饲喂HFD的对照小鼠具有更低的胰岛素抵抗

[0276] (图28b)。

[0277] 重要的是,HFD小鼠、HFD加hBD-2小鼠和HFD加HD-5小鼠之间的膳食脂肪摄取没有显著差异(图30A),这与所有三个组中粪便脂肪含量也基本相似(图30B)。

[0278] 实施例5.用胰高血糖素样肽-1(GLP-1)类似物(利拉鲁肽)治疗饲喂高脂肪饮食的小鼠的体重增加、肥胖症和肝脏中的脂肪积累。

[0279] 材料和方法。

[0280] 小鼠:给4周龄的C57B1/6J DIO雄性小鼠饲喂36周高脂肪饮食(HFD 60%脂肪,SSNIFF(饮食#D12492))或普瑞纳粮。到开始干预,饲喂HFD的组达到大约55克的平均体重。将小鼠每笼10只分组圈养直至第-2周。从第-2周开始,在整个研究期间将小鼠单独圈养。恰在关灯(在3pm)之前每天登记饲料摄入量。对各小鼠进行分组和笼子改变顺序的实验程序。在SPF标准条件下,将小鼠在12小时光照/黑暗循环下保持在室温下。

[0281] 处理方案:给小鼠饲喂高脂肪饮食(HFD)或低脂肪(LF)对照饮食。HFD含有2个亚组;1个GLP-1类似物和1个标准HFD而不补充GLP-1类似物。将GLP-1类似物利拉鲁肽溶解在

PBS中并加入0.1% BSA。以0.2mg/kg BID皮下给予该GLP-1类似物。

[0282] 结果。

[0283] 发现该GLP-1类似物具有降低体重的作用,因为与未经处理的HFD参考组小鼠相比,用该GLP-1类似物处理的小鼠体重减轻25%-30%或平均减轻15克(图32)。

[0284] 该GLP-1类似物似乎也减少肝脏中的脂肪积累,因为在终止时,在GLP-1类似物处理组小鼠中的肝脏重量(以克计)与饲喂粮的小鼠组的肝脏重量没有统计学显著差异( $p < 0.001$ ) (图33)。

[0285] 与这些作用一致,与HFD参考组小鼠相比,GLP-1类似物处理组小鼠的血浆胆固醇水平在统计学上显著更低( $p < 0.01$ ) (图34)。

[0286] 实施例6.用以在向NMRI小鼠单次口服强饲给予4mg/kg后确定口腔生物利用度并建立hBD-2的药代动力学曲线的药代动力学研究。

[0287] 材料和方法

[0288] 处理方案:根据在给药当天获得的个体体重,使用强饲管和1ml注射器向21只雌性NMRI小鼠通过口服强饲给予5ml/kg。通过轻轻按摩腹部腹股沟区域,在随机时间点对尿进行取样。使用下颌下采样方法采集第一份血样。从异氟烷麻醉的小鼠收集第二份血样。安乐死后采集肠道样品。打开每只小鼠的腹部并对肠的三个肠段取样。

[0289] 结果

[0290] hBD-2似乎并不从健康肠道吸收,因为在任何血清或尿液品中都不能通过HPLC检测到hBD-2,因为所有值都低于 $< 10\text{pg/ml}$ 的检测水平。这表明在小鼠中口服给药4mg/kg后hBD-2不是全身可用的(图35)。

[0291] 实施例7.在向NMRI雌性小鼠皮下或静脉内给予摩尔当量为1mg/kg hBD-2(分子量66437Da)后与人血清白蛋白的C末端(分子量71.336Da)或N末端(分子量71.666Da)融合的hBD-2的药代动力学曲线。

[0292] 材料和方法

[0293] 处理方案:根据个体体重向动物给药1.65mg/ml的物料浓度10ml/kg

[0294] (30克小鼠为300 $\mu\text{L}$ )。使用下颌下采样方法采集第一份血样,并且在异氟烷麻醉并安乐死后采集第二份血样。

[0295] 结果

[0296] hBD-2显示半衰期为1小时,并且两种融合蛋白的半衰期为12小时。AUC发生了巨大变化。肾清除率也从hBD-2的10ml/min变为两种融合分子的0.5-2.2ml/min(图36、37和38)。

[0297] 该实施例证明hBD-2的半衰期可以通过C末端或N末端缀合至白蛋白而显著延长。

[0298] 实施例8.“hBD-2-白蛋白融合N末端”在小鼠中急性10天葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎模型中的抗炎作用。

[0299] 材料和方法

[0300] 处理方案:使用无菌25G针以10ml/kg体重的给药量通过尾静脉静脉内给予或者皮下给予“hBD-2-白蛋白N末端”。动物每天接受1剂,持续10个行政日。在10ml/kg体重OD的给药量中以1mg/kg的剂量皮下给予活性对照地塞米松(DEX)。

[0301] 结果

[0302] 当每天以1.65mg/kg的剂量通过静脉内途径给予时,用“hBD-2-白蛋白N末端”处理

使得疾病活动指数 (DAI) 得到显著抑制 ( $p < 0.05$ )。此外,当每天分别以 1.65mg/kg 的剂量和 125mg/kg 的剂量皮下给予“hBD-2-白蛋白N末端”时,在第10天也观察到DAI得分的显著抑制 ( $p < 0.05$ )。

[0303] 葡聚糖硫酸钠的给予导致结肠组织的显著炎症和损伤,如组织学检查后所证明的。用“hBD-2-白蛋白N末端”处理没有导致此组织学损伤的任何统计学显著降低,但类似地,活性对照DEX也未能显著减少组织学损伤。

[0304] 结果进一步显示,用“hBD-2-白蛋白N-末端”处理的动物在第7天体重显著增加,尽管在第2天和第3天体重短暂下降,表明“hBD-2-白蛋白N-末端”在鼠类DSS模型中具有显著的体重保持作用,这通常与显著的体重减轻相关。相比之下,DEX处理的动物从第5天起展示出非常显著的体重降低 ( $p < 0.01$ )。

[0305] 该实施例证明在炎性病症的动物模型中hBD-2-白蛋白融合N末端具有生物活性。

[0306] 实施例9.“hBD-2-白蛋白融合C末端”在小鼠中急性10天葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的结肠炎模型中的抗炎作用。

[0307] 材料和方法

[0308] 处理方案:使用无菌25G针以10ml/kg体重的给药量通过尾静脉静脉内给予或者皮下给予“hBD-2-白蛋白C末端”。动物每天接受1剂,持续10个行政日。通过强饲法,在10ml/kg 体重OD的给药量中以1mg/kg的剂量口服给予活性对照泼尼松龙 (Pred)。

[0309] 结果

[0310] 当每天以1.6mg/kg的剂量通过静脉内途径给予时,用“hBD-2-白蛋白C末端”处理使得DAI得到显著抑制 ( $p < 0.05$ )。此外,当在交替的第0天、第2天、第4天、第6天、第8天和第10天以1.6mg/kg的剂量通过静脉内途径给予时,“hBD-2-白蛋白C末端”导致DAI的显著抑制 ( $p < 0.05$ )。用Pred每日处理导致第9天DAI的显著抑制 ( $p < 0.05$ )。

[0311] 葡聚糖硫酸钠的给予导致结肠组织的显著炎症和损伤,如组织学检查后所证明的。用1.6mg/kg剂量的“hBD-2-白蛋白C末端”处理导致此组织学损伤的统计学显著降低 ( $p < 0.05$ )。类似地,在第0天、第2天、第4天、第6天、第8天和第10天,以1.6mg/kg和16.5mg/kg的剂量用“hBD-2-白蛋白C末端”每日处理导致对结肠的组织学损伤显著减少 ( $p < 0.01$ )。用活性对照Pred处理未能显著减少结肠近端部分的组织学损伤,却减少了远端结肠的损伤 ( $p < 0.01$ )。

[0312] 结果进一步显示,用“hBD-2-白蛋白C末端”处理的动物体重显著增加 ( $p < 0.05$ ),表明“hBD-2-白蛋白C-末端”的体重保持作用。

[0313] 该实施例证明在炎性病症的动物模型中hBD-2-白蛋白融合C末端具有生物活性。

[0314] 实施例10. 序列

SEQ ID NO.	名称	序列
[0315] 1	牛 $\beta$ 防御素2	GVGNPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKCCRK
2	鸡 $\beta$ 防御素2	LFCKGGSCHFGGCPSHLIKVGSCFRSCKWPWNA
3	红猩猩 $\beta$ 防御素2	VFGDISNPVTCLRSGAICHPGFCPRRYKHIGTCGLSVIKCCKKP
4	hBD1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYRGKAKCCK
5	hBD2	GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
6	hBD3	GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRKCCRK
7	hBD4	ELDRICGYGTARCRKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK
8	HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
9	HD6	AFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL
10	黑猩猩 $\beta$ 防御素2	GISDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
11	猕猴 $\beta$ 防御素2	GIGDPVTCLKNGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
[0316] 12	小鼠 $\beta$ 防御素3	KINNPVSCLRKGGRCWNRCIGNTRQIGSCGVPFLKCCRK
13	马 $\beta$ 防御素2	GIGNPISCARNRGVCPIGCLPGMKQIGTCGLPGTKCCRK
14	猪 $\beta$ 防御素1	NIGNSVSCLRNGVCMGPKCAPMKQIGTCGMPQVKCCRK
15	山羊 $\beta$ 防御素2	GIINHRSCYRNKGVCAPARCPNMRQIGTCHGPPVKCCRK
16	人LL37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
17	截短的hBD2	PVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP

[0317] 参考文献

[0318] 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).

[0319] 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).

- [0320] 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.
- [0321] Armogida SA, et al, 2004. Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy Asthma Proc.* 25(5): 297-304.
- [0322] **Bäckhed** 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.
- [0323] Belkaid W and Hand TW, 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 157(1):121-41.
- [0324] 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.
- [0325] Chassaing B, et al, 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519(7541):92-6.
- [0326] Cunningham BC and Wells JA, 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244:1081-1085.
- [0327] Derbyshire KM, Salvo JJ and Grindley ND, 1986. A simple and efficient procedure for saturation mutagenesis using mixed oligodeoxynucleotides. *Gene* 46:145-152.
- [0328] Everard A and Cani PD, 2013. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27(1):73-83.
- [0329] Faulds MH and Dahlman-Wright K, 2012. Metabolic diseases and cancer risk. *Curr Opin Oncol.* 24(1):58-61.
- [0330] 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.
- [0331] Feng Q, et al, 2015. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun* 6:6528.
- [0332] 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 Microbiol* 14:228.
- [0333] Hilton DJ, et al, 1996. Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708.
- [0334] Harada K, et al, 2004. Peptide antibiotic human beta-defensin-1 and -2 contribute to antimicrobial defense of the intrahepatic biliary tree. *Hepatology*, vol 40:925-932.

- [0335] Khan M, et al, 2007. Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens. *Br Poult Sci* 48(6): 732-5.
- [0336] Koren O, et al, 2012. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 150(3):470-80.
- [0337] Le Chatelier E et al. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500(7464):541-6.
- [0338] Leviten M, 2016. The Finnish connection. *Biocentury Innovations*, June 16.
- [0339] 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.
- [0340] Lowman HB, Bass SH, Simpson N and Wells JA, 1991. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochem* 30:10832-10837.
- [0341] Mowat AM and Agace WW, 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 14(10):667-85.
- [0342] 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.
- [0343] 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.
- [0344] Neurath H and Hill RL, 1979. *The Proteins*. Academic Press, New York.
- [0345] Paige et al. *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 12, 1995. Prolonged circulation of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor by covalent linkage to albumin through a heterobifunctional polyethylene glycol.
- [0346] Qin J, et al 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490(7418):55-60.
- [0347] Reidhaar-Olson JF and Sauer RT, 1988. Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241:53-57;
- [0348] Gennaro AR, 1990. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Ed. Mack Publishing Co., Easton, PA.
- [0349] Rice P, Longden I and Bleasby A, 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16:276-277.
- [0350] Ridaura VK, et al, 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341(6150):1241214.
- [0351] 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。

[0352] Shechter et al.Bioconjugate Chem.2005,16:913-920。

[0353] Shechter et al.International Journal of Peptide Research and Therapeutics,Vol.13,Nos.1-2,June 2007。

[0354] Suez J,et al,2014.Artificial sweeteners induce glucose intolerance byaltering the gut microbiota.Nature 514(7521):181-6。

[0355] 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。

[0356] Turnbaugh PJ,Ley RE,Mahowald MA,Magrini V,Mardis ER andGordon JI, 2006.An obesity-associated gut microbiome with increased capacityfor energy harvest.Nature.2006 Dec 21;444(7122):1027-31。

[0357] Turnbaugh PJ, **Bäckhed** F,Fulton L and Gordon JI,2008.Diet-inducedobesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gutmicrobiome.Cell Host Microbe 3(4):213-23。

[0358] Vrieze A,et al 2012.Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome.Gastroent143(4):913-6。

[0359] Walter,2015.Murine gut microbiota-diet trumps genes.Cell Host Microbe17(1):3-5。

[0360] Wehkamp J,et al,2002.Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins.Dig Dis Sci.47(6):1349-55。

[0361] Wertenbruch S,et al,2015.The anti-microbial peptide LL-37/CRAMP is elevated in patients with liver diseases and acts as a protective factor during mouse liver injury.Digestion,91:307-317。

[0362] Zhang X,et al,2015.The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment.Nat Med21(8):895-905。

[0363] 以及以下专利和专利申请:

[0364] WO 2010/007166;

[0365] WO 92/06204;

[0366] WO 95/17413;

[0367] WO 95/22625;

[0368] US 5,223,409;

[0369] CN104971343。



[0039]	Ile Cys His Pro Gly Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys His Ile Gly Thr
[0040]	20 25 30
[0041]	Cys Gly Leu Ser Val Ile Lys Cys Cys Lys Lys Pro
[0042]	35 40
[0043]	<210> 4
[0044]	<211> 36
[0045]	<212> PRT
[0046]	<213> 智人
[0047]	<400> 4
[0048]	Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
[0049]	1 5 10 15
[0050]	Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
[0051]	20 25 30
[0052]	Lys Cys Cys Lys
[0053]	35
[0054]	<210> 5
[0055]	<211> 41
[0056]	<212> PRT
[0057]	<213> 智人
[0058]	<400> 5
[0059]	Gly Ile Gly Asp Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His
[0060]	1 5 10 15
[0061]	Pro Val Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu
[0062]	20 25 30
[0063]	Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro
[0064]	35 40
[0065]	<210> 6
[0066]	<211> 45
[0067]	<212> PRT
[0068]	<213> 智人
[0069]	<400> 6
[0070]	Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly Gly
[0071]	1 5 10 15
[0072]	Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile Gly Lys
[0073]	20 25 30
[0074]	Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys
[0075]	35 40 45
[0076]	<210> 7
[0077]	<211> 37

[0078] <212> PRT  
 [0079] <213> 智人  
 [0080] <400> 7  
 [0081] Glu Leu Asp Arg Ile Cys Gly Tyr Gly Thr Ala Arg Cys Arg Lys Lys  
 [0082] 1 5 10 15  
 [0083] Cys Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile Gly Arg Cys Pro Asn Thr Tyr Ala  
 [0084] 20 25 30  
 [0085] Cys Cys Leu Arg Lys  
 [0086] 35  
 [0087] <210> 8  
 [0088] <211> 32  
 [0089] <212> PRT  
 [0090] <213> 智人  
 [0091] <400> 8  
 [0092] Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Thr Gly Arg Cys Ala Thr Arg Glu Ser Leu  
 [0093] 1 5 10 15  
 [0094] Ser Gly Val Cys Glu Ile Ser Gly Arg Leu Tyr Arg Leu Cys Cys Arg  
 [0095] 20 25 30  
 [0096] <210> 9  
 [0097] <211> 32  
 [0098] <212> PRT  
 [0099] <213> 智人  
 [0100] <400> 9  
 [0101] Ala Phe Thr Cys His Cys Arg Arg Ser Cys Tyr Ser Thr Glu Tyr Ser  
 [0102] 1 5 10 15  
 [0103] Tyr Gly Thr Cys Thr Val Met Gly Ile Asn His Arg Phe Cys Cys Leu  
 [0104] 20 25 30  
 [0105] <210> 10  
 [0106] <211> 41  
 [0107] <212> PRT  
 [0108] <213> 黑猩猩  
 [0109] <400> 10  
 [0110] Gly Ile Ser Asp Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His  
 [0111] 1 5 10 15  
 [0112] Pro Val Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu  
 [0113] 20 25 30  
 [0114] Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro  
 [0115] 35 40  
 [0116] <210> 11



[0156]	Pro Gly Lys Cys Ala Pro Lys Met Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Met
[0157]	20 25 30
[0158]	Pro Gln Val Lys Cys Cys Lys Arg
[0159]	35 40
[0160]	<210> 15
[0161]	<211> 40
[0162]	<212> PRT
[0163]	<213> 野山羊
[0164]	<400> 15
[0165]	Gly Ile Ile Asn His Arg Ser Cys Tyr Arg Asn Lys Gly Val Cys Ala
[0166]	1 5 10 15
[0167]	Pro Ala Arg Cys Pro Arg Asn Met Arg Gln Ile Gly Thr Cys His Gly
[0168]	20 25 30
[0169]	Pro Pro Val Lys Cys Cys Arg Lys
[0170]	35 40
[0171]	<210> 16
[0172]	<211> 37
[0173]	<212> PRT
[0174]	<213> 智人
[0175]	<400> 16
[0176]	Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
[0177]	1 5 10 15
[0178]	Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
[0179]	20 25 30
[0180]	Pro Arg Thr Glu Ser
[0181]	35
[0182]	<210> 17
[0183]	<211> 37
[0184]	<212> PRT
[0185]	<213> 智人
[0186]	<400> 17
[0187]	Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His Pro Val Phe Cys
[0188]	1 5 10 15
[0189]	Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu Pro Gly Thr Lys
[0190]	20 25 30
[0191]	Cys Cys Lys Lys Pro
[0192]	35

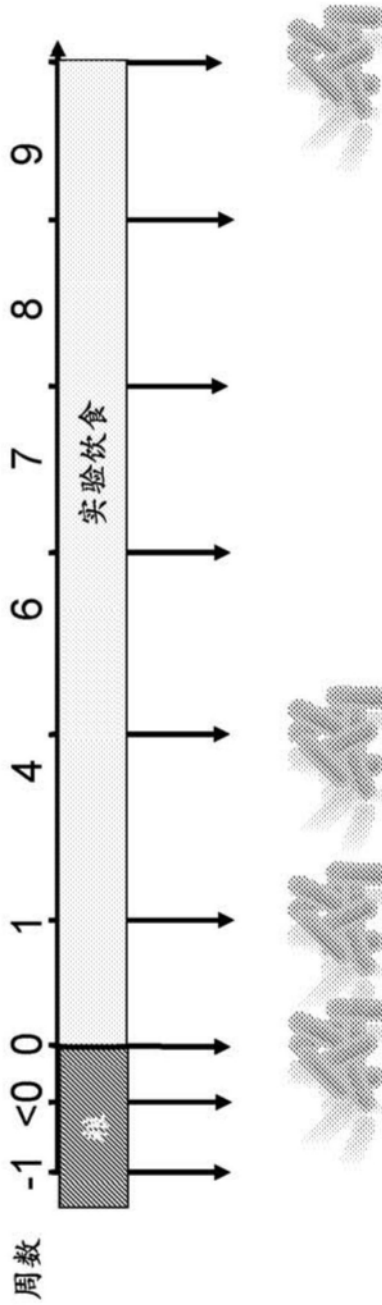


图1

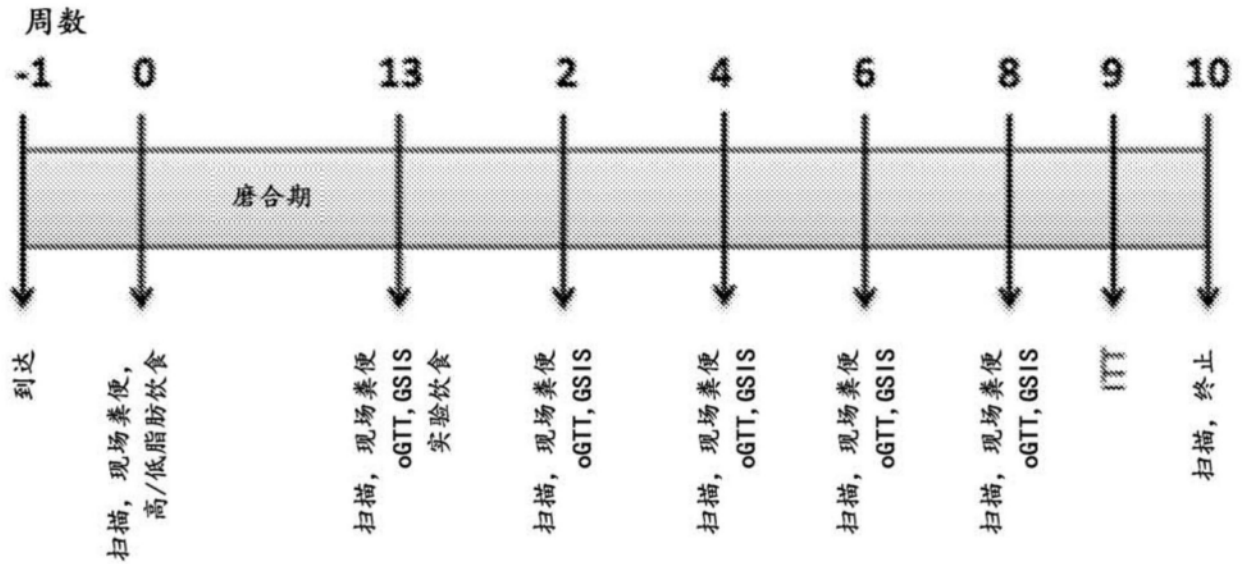


图2

HBD1 -----DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCKK---  
 HBD2 ---GIGDPVTKLKSAGIHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCKKPK-  
 HBD3 GIINTLQKYYCRVRGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK  
 HBD4 -----ELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYRIGRCPN-TYACCLRK-  
 \* . \* \* \*\* \*\*

图3

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

图4

HNP2 -CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC  
 HNP3 DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC  
 HNP1 ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC  
 \*\*\*\*\*

图5



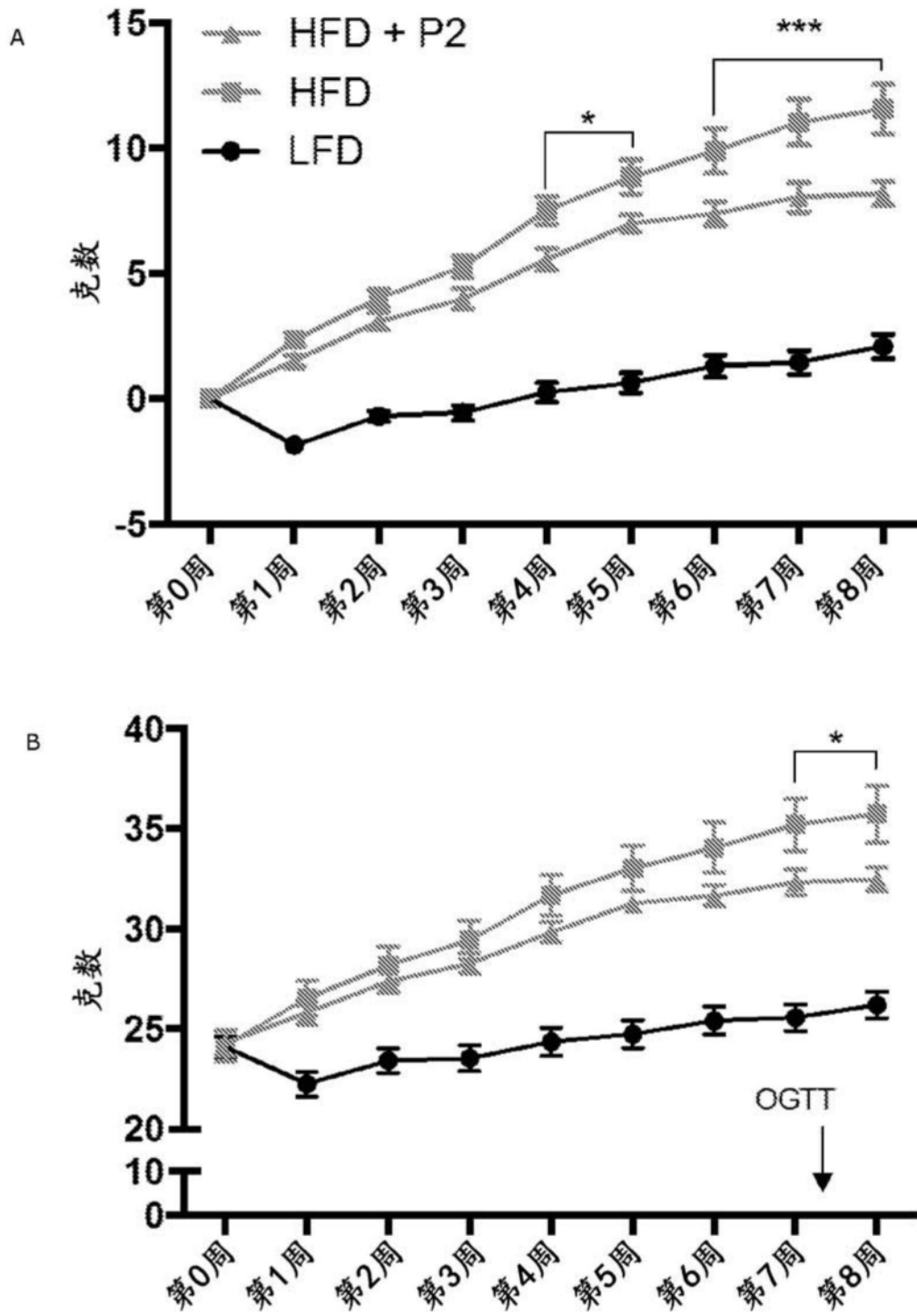


图7

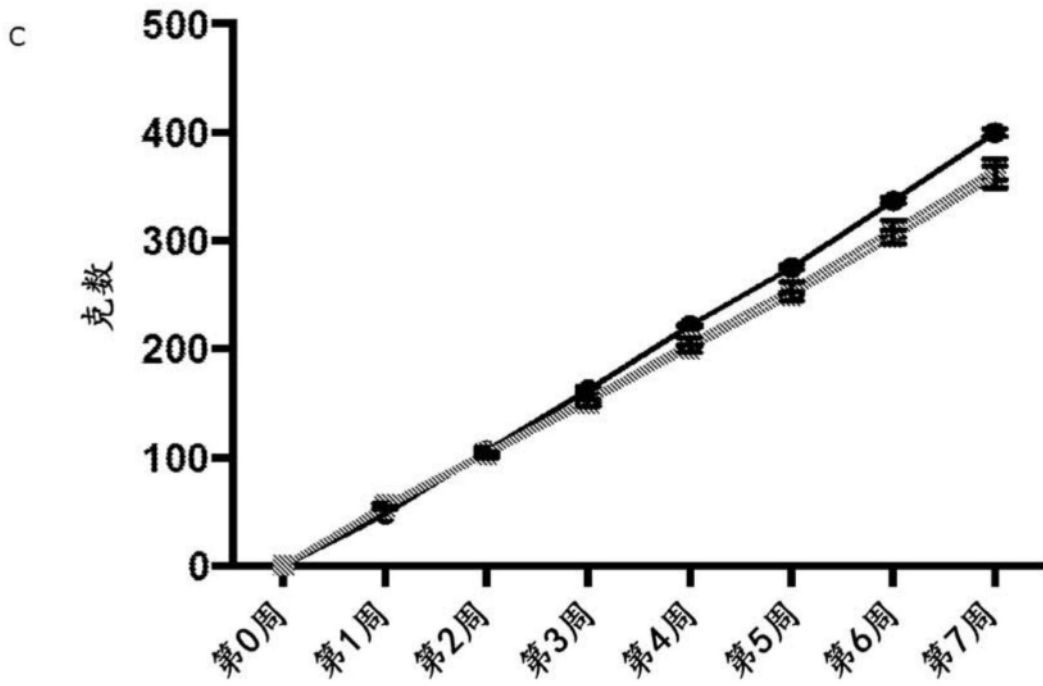


图7 (续)

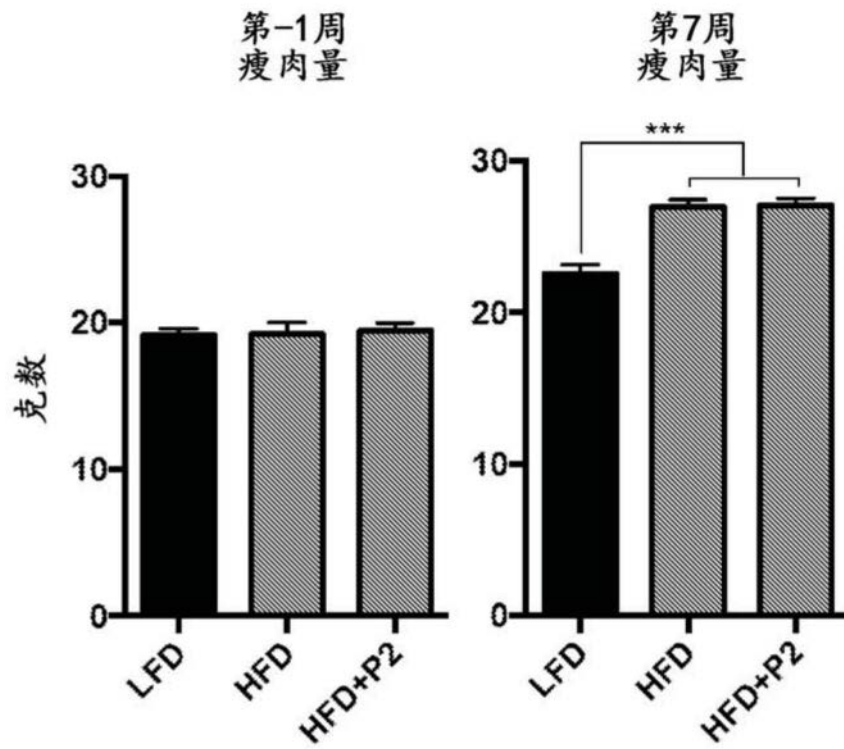


图8A

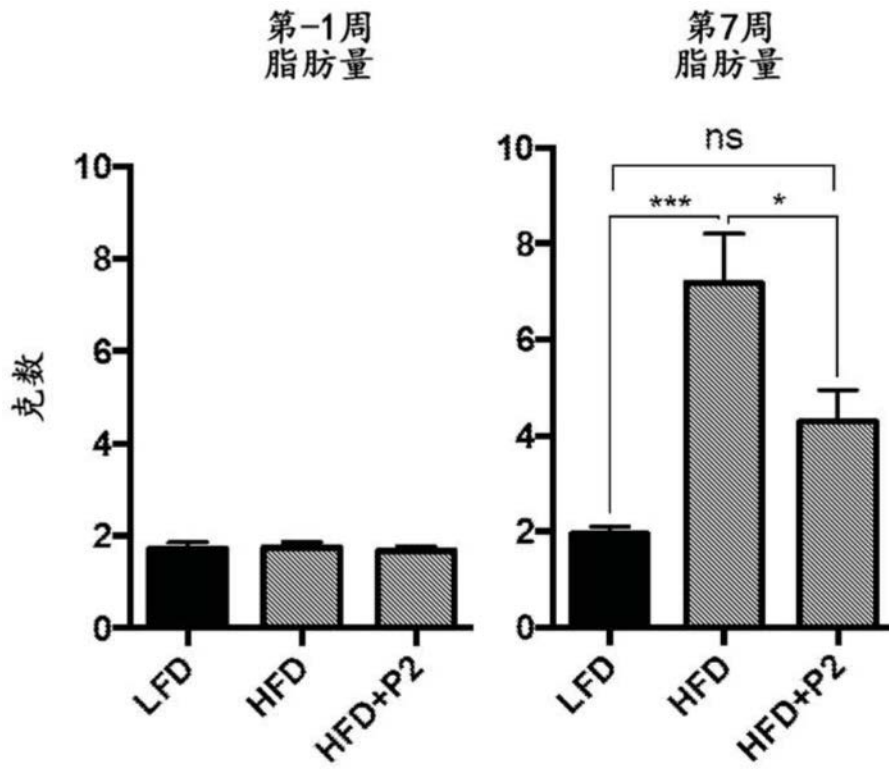


图8B

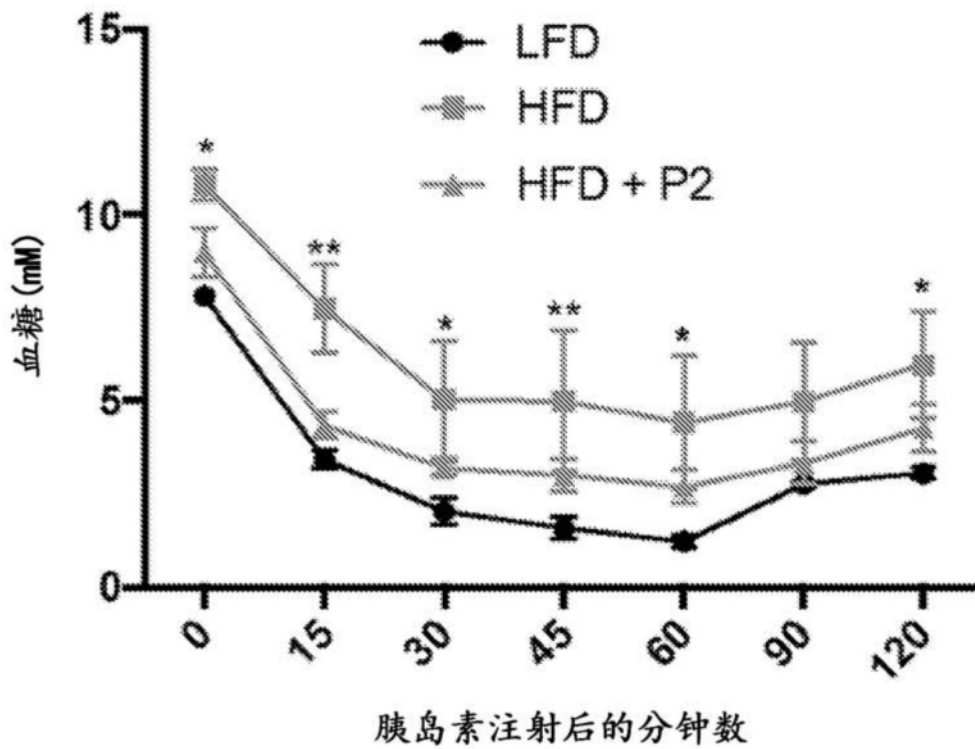


图9A

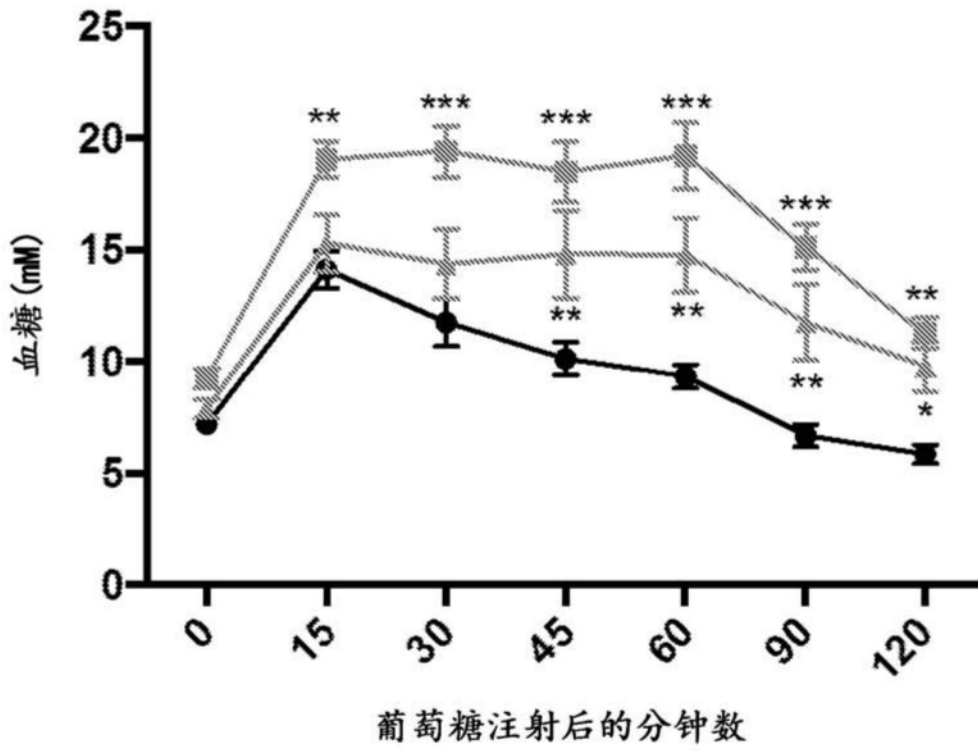


图9B

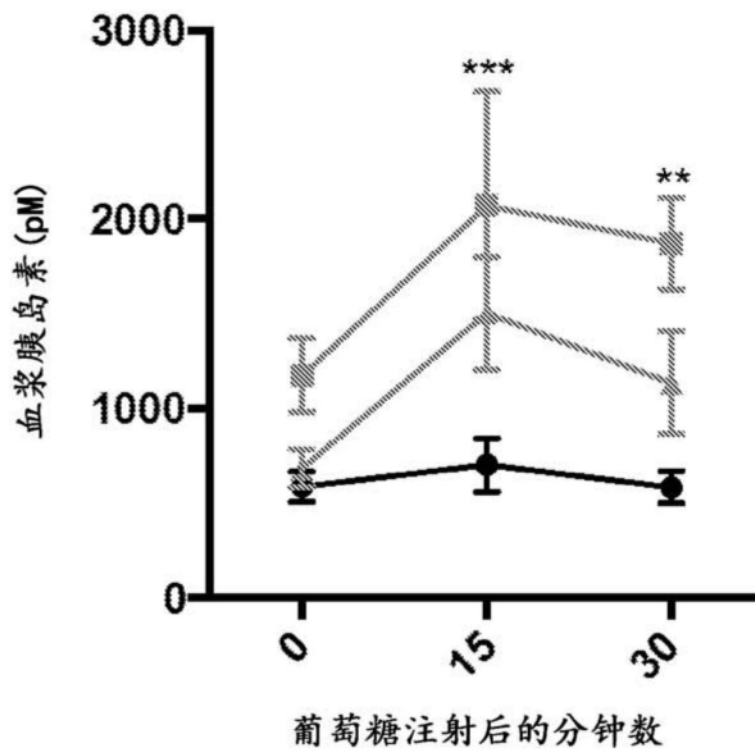


图9C

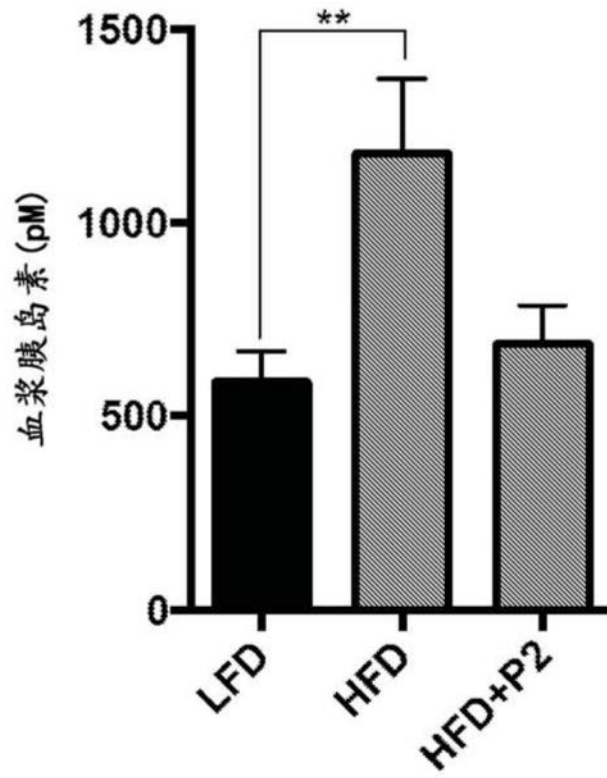


图9D

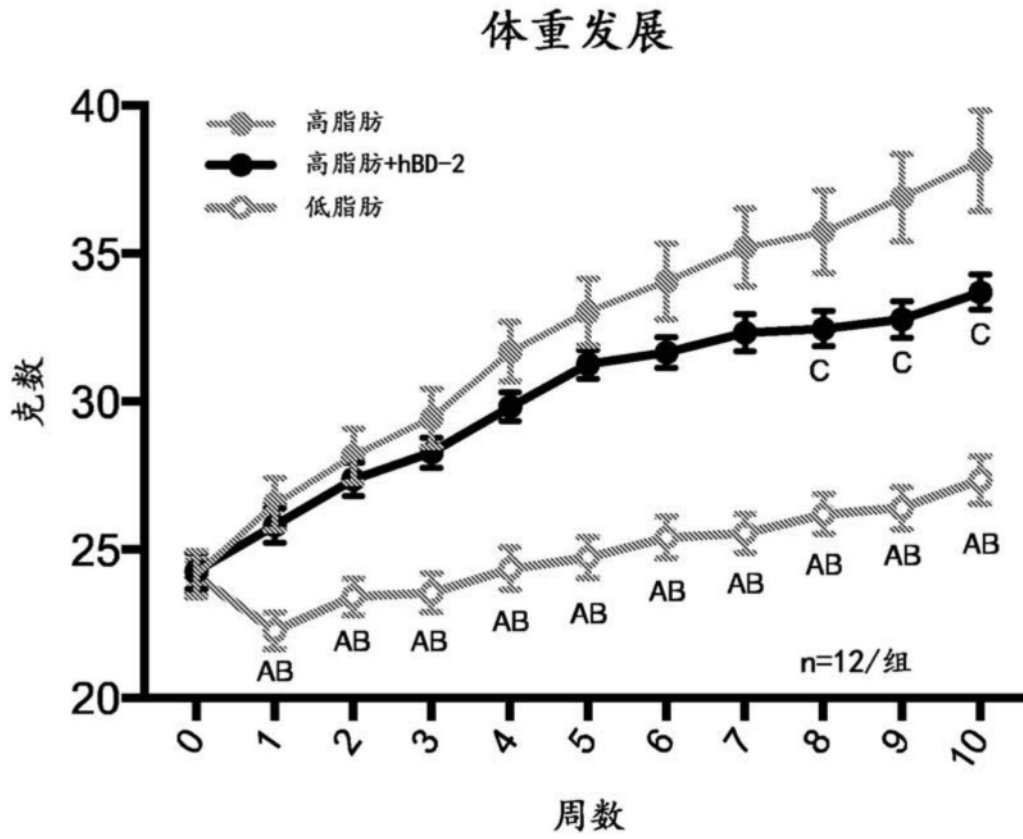


图10A

### 饲料效率

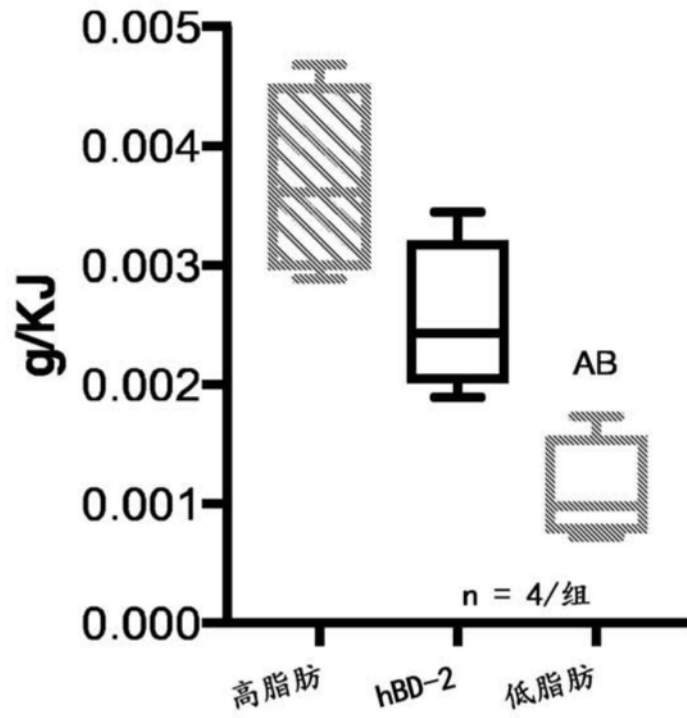


图10B

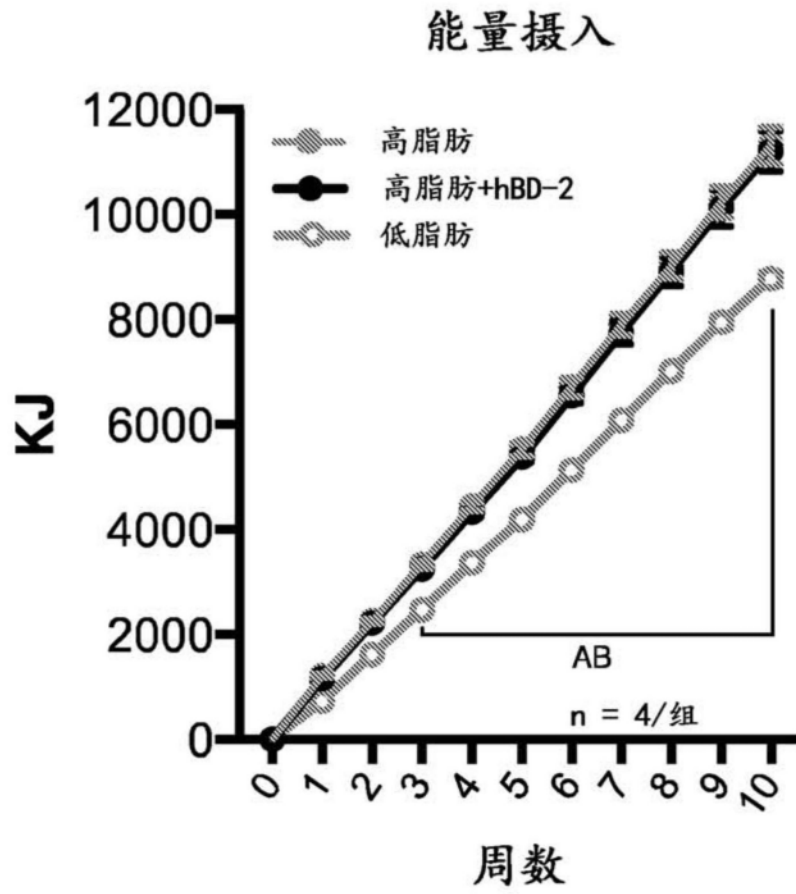


图10C

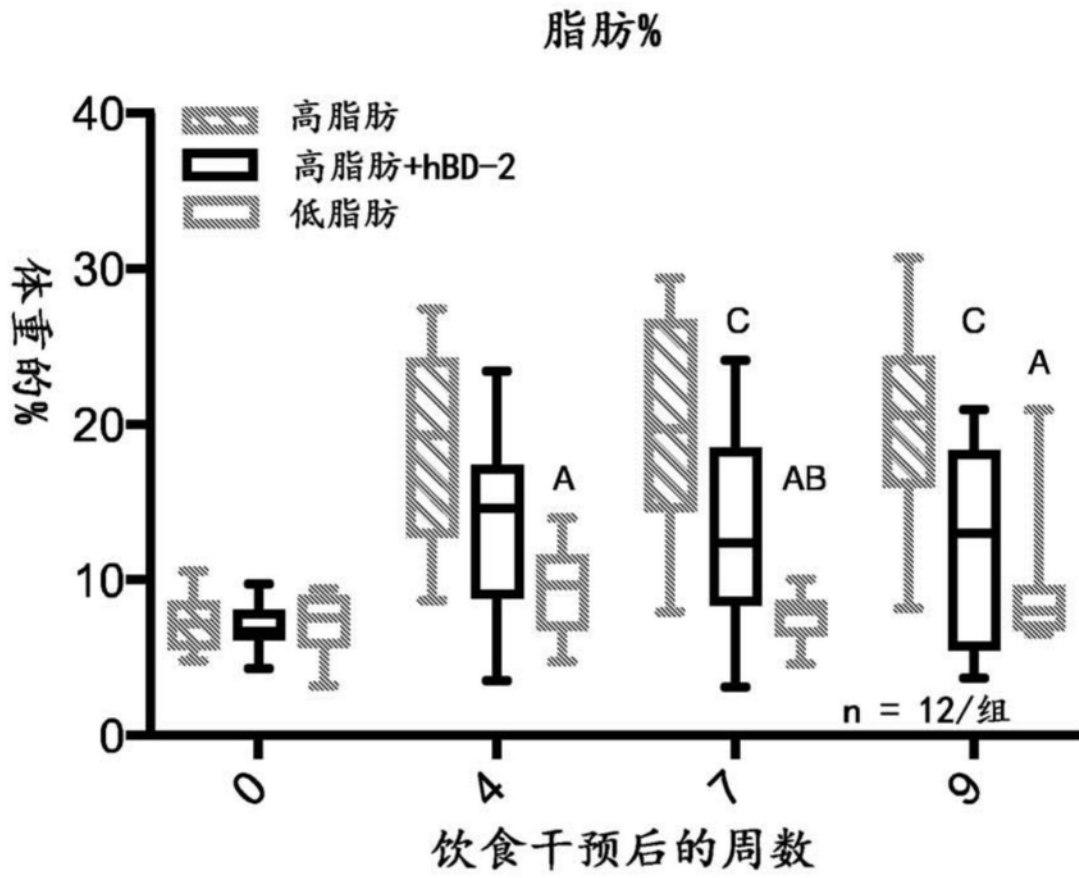


图11A

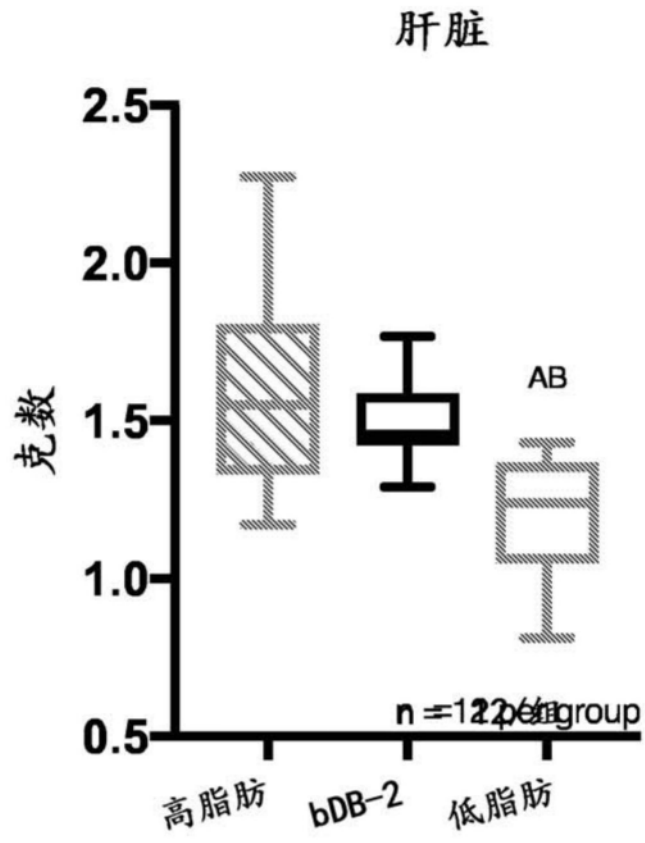


图11B

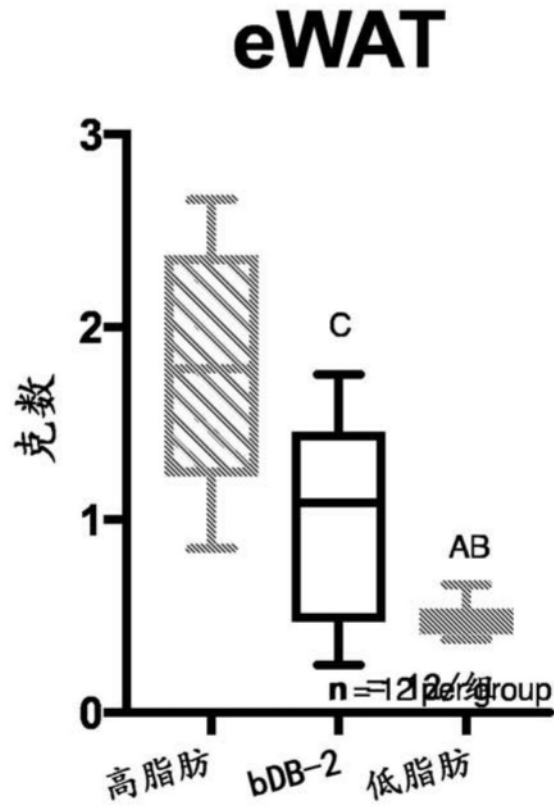


图11C

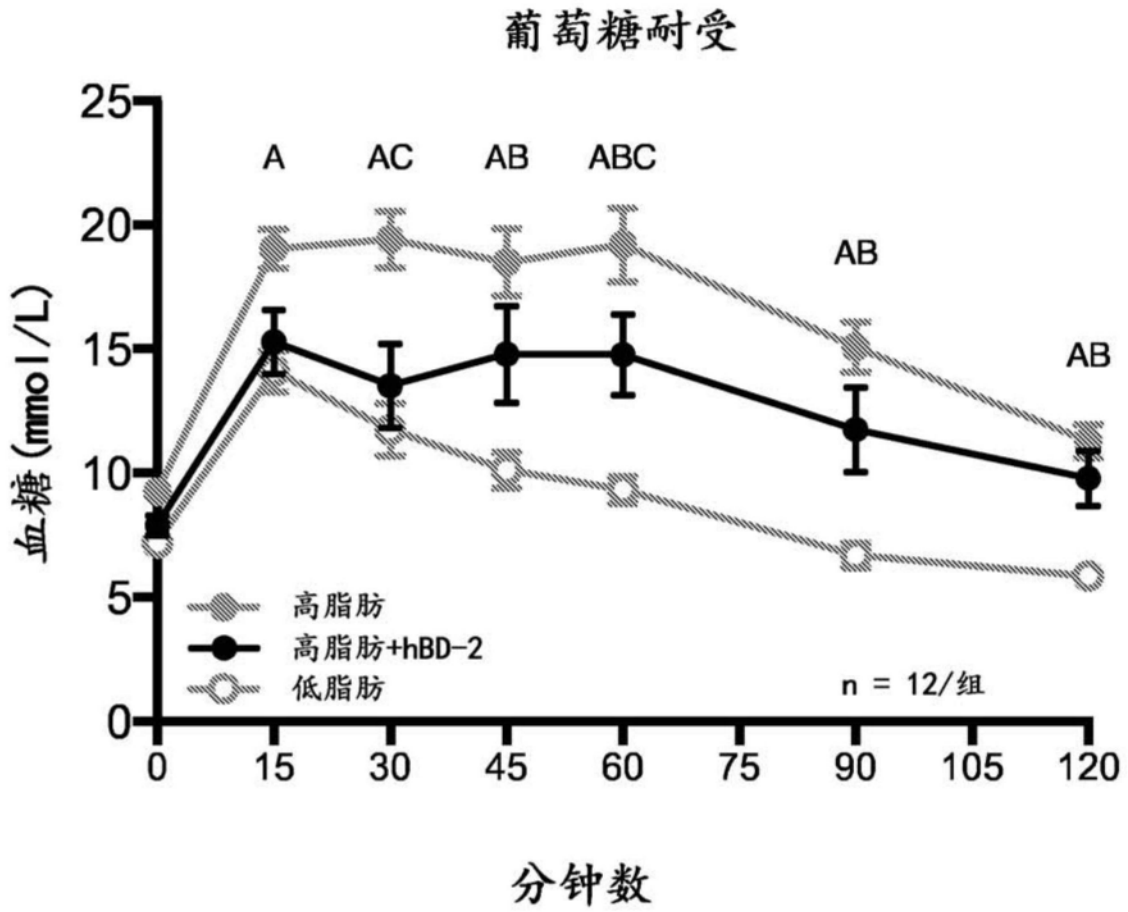


图12A

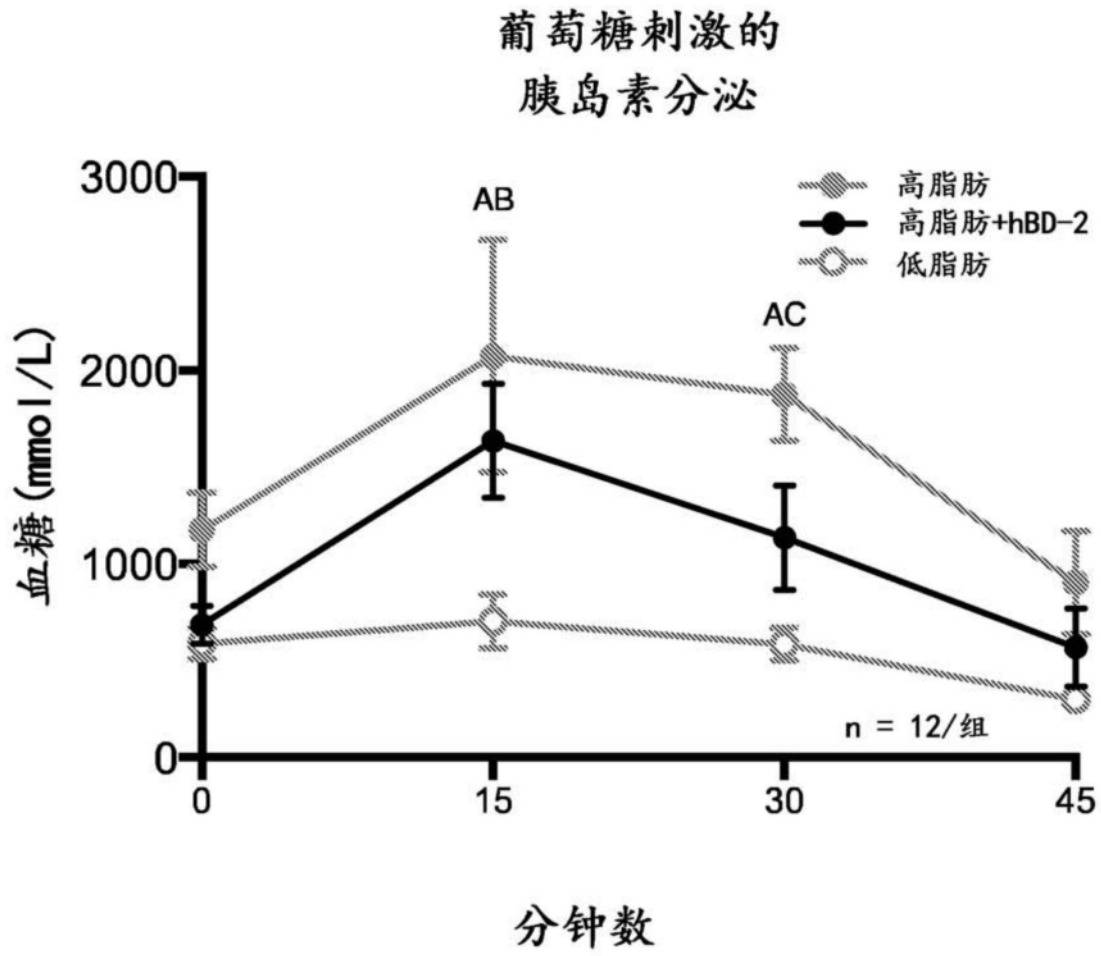


图12B

### 胰岛素耐受

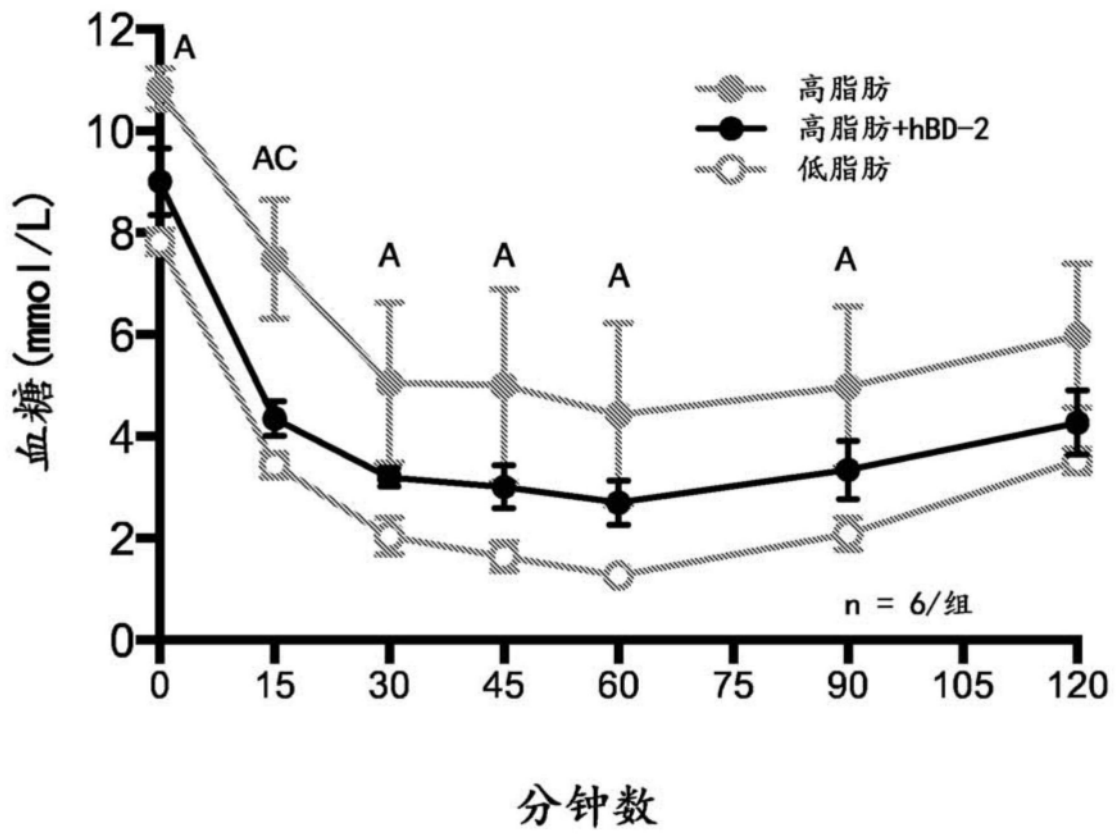


图13A

# HOMA-IR

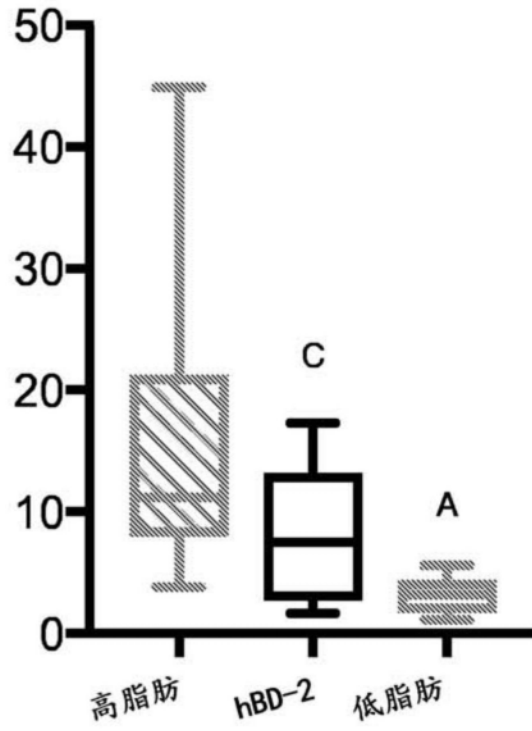


图13B

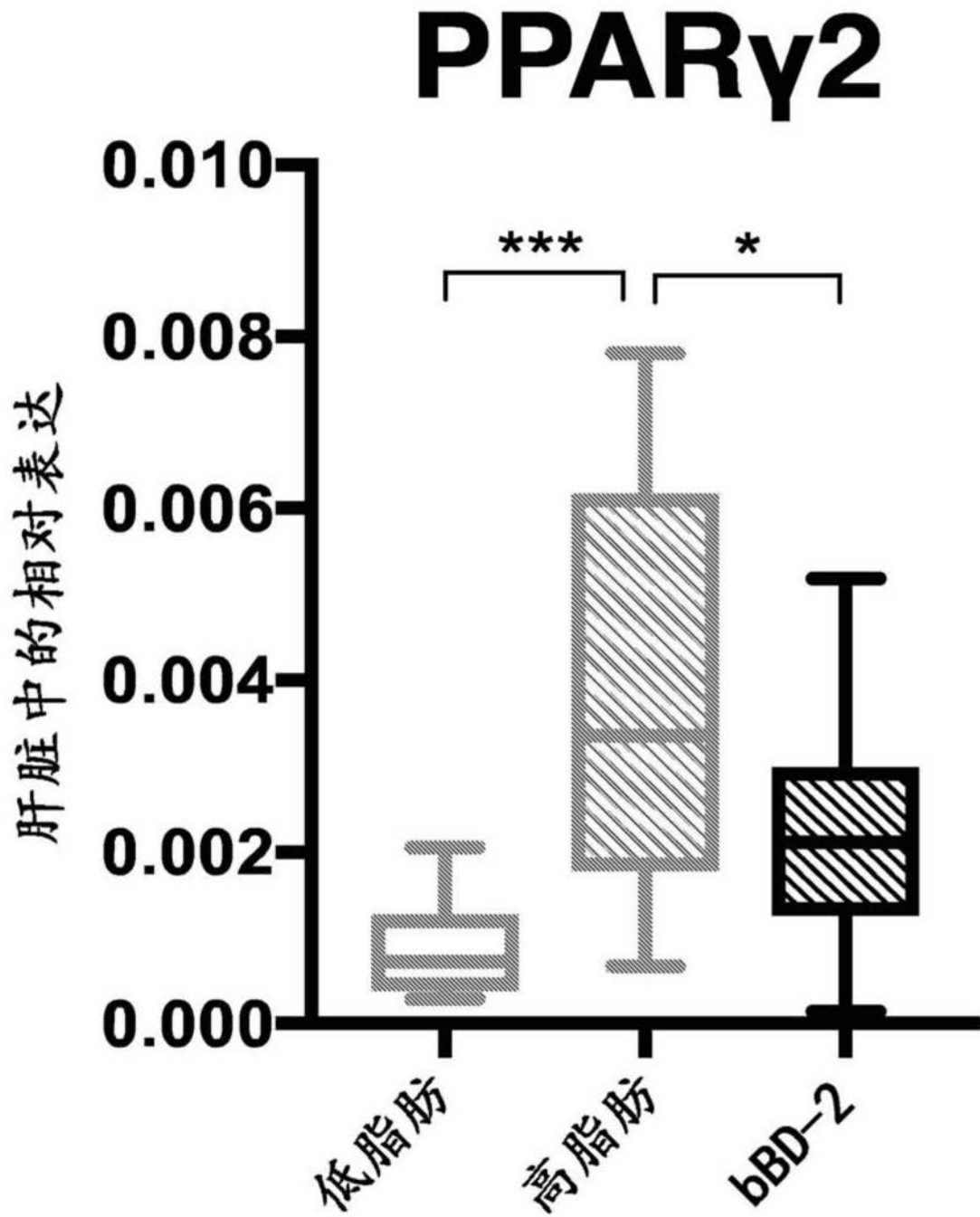


图14A

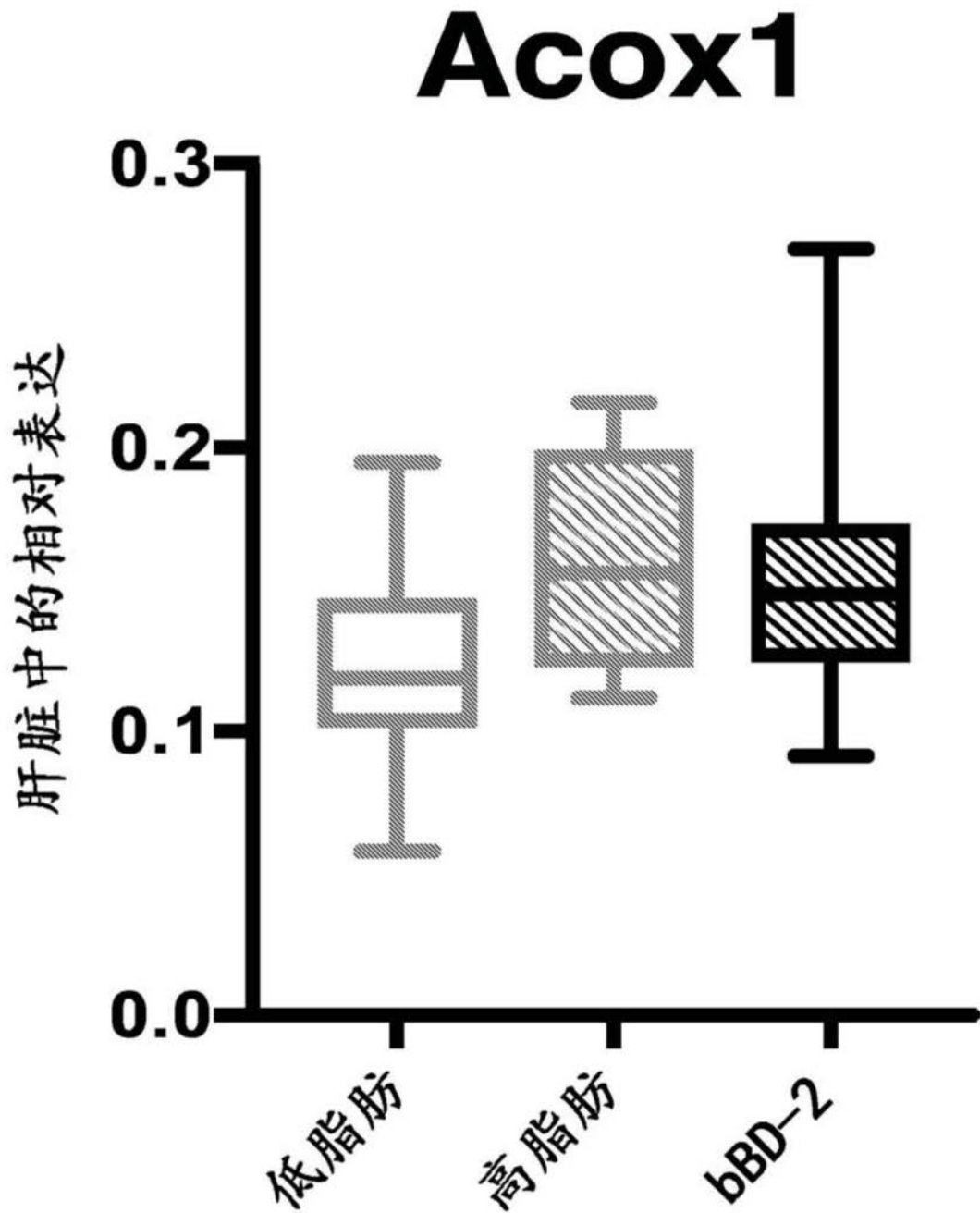


图14B

### 体重发展

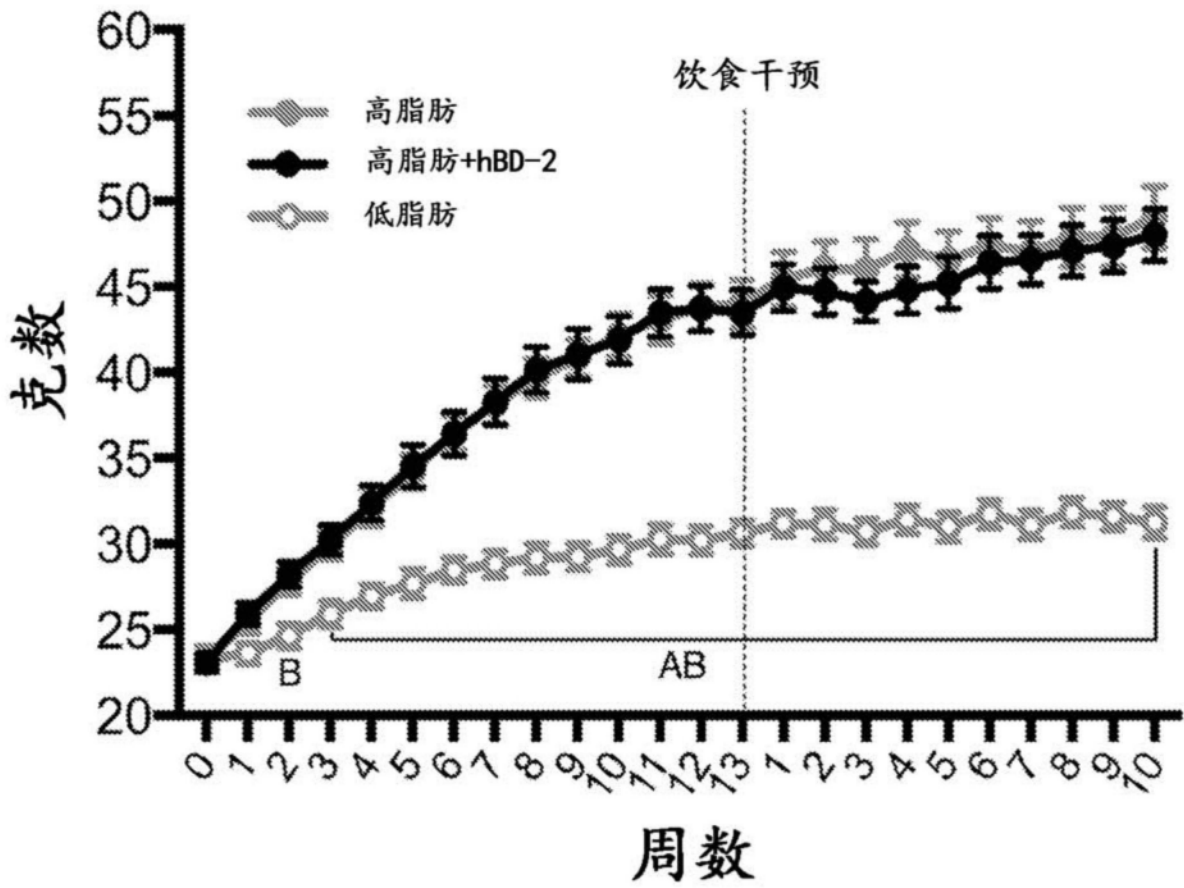


图15A

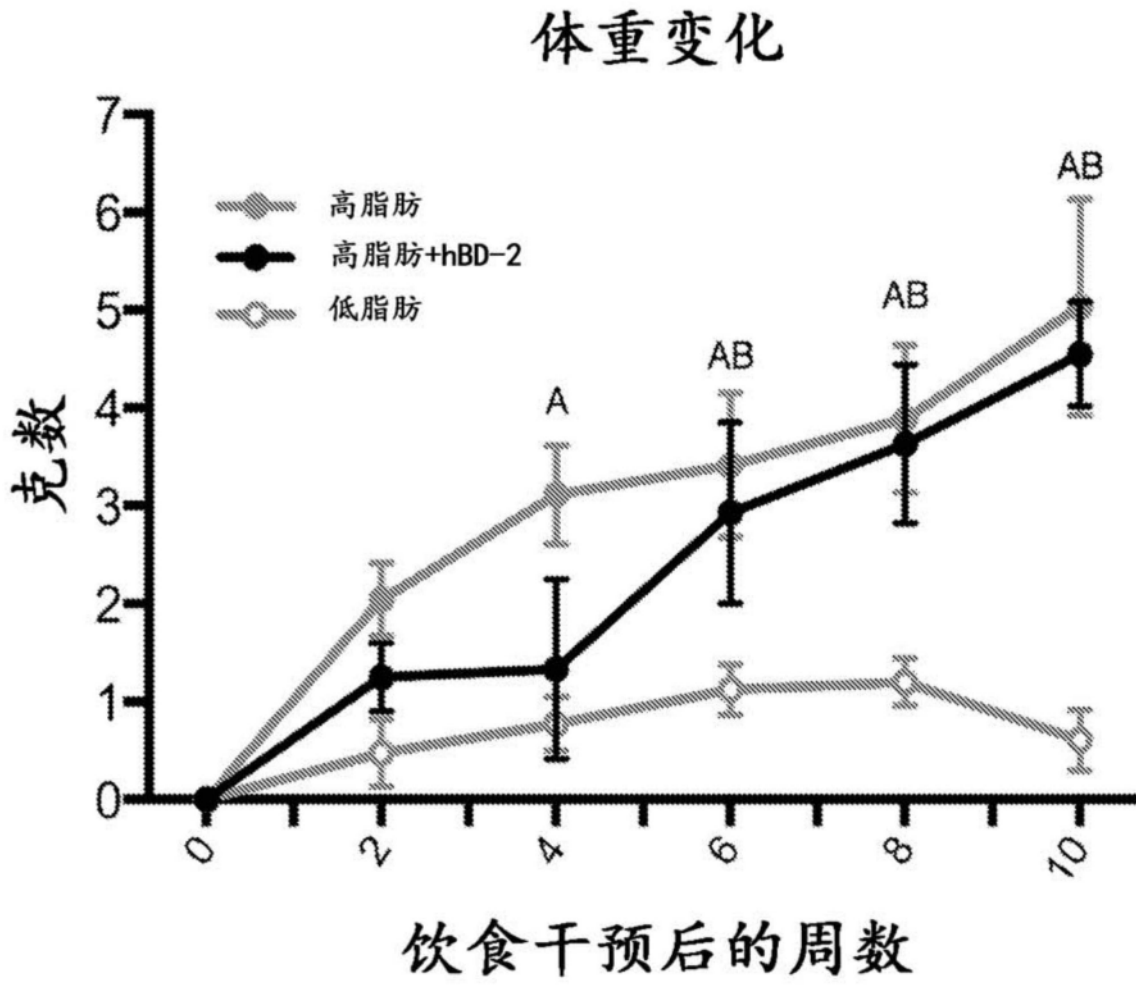


图15B

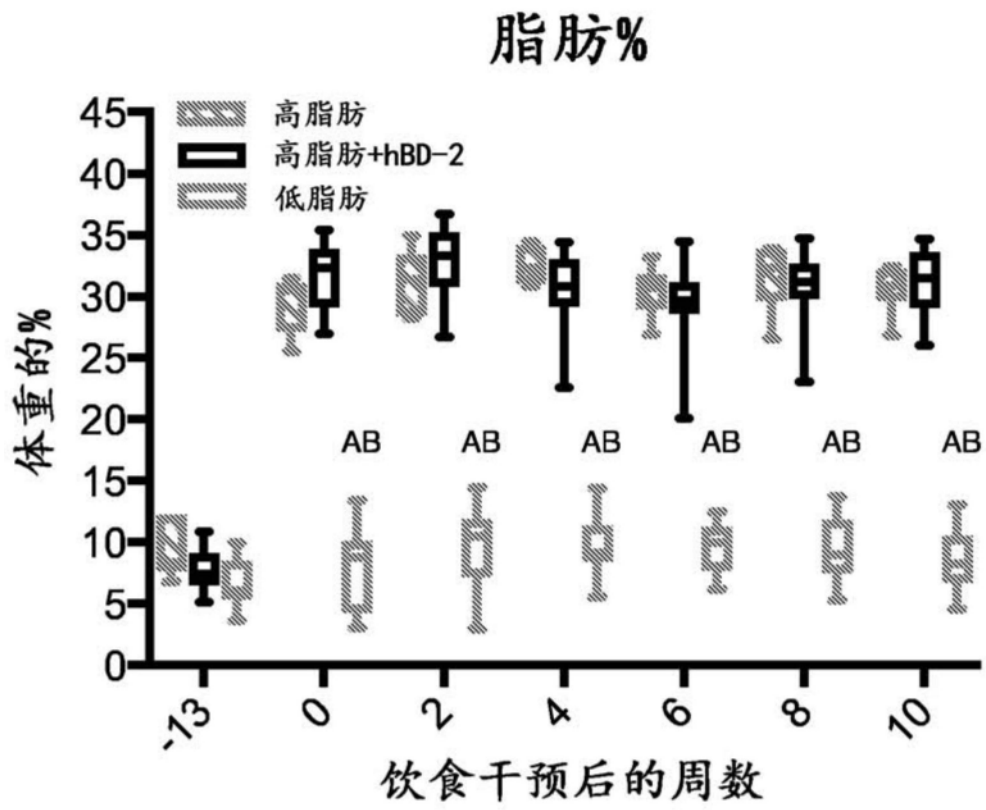


图16A

### 脂肪%变化 第0-4周

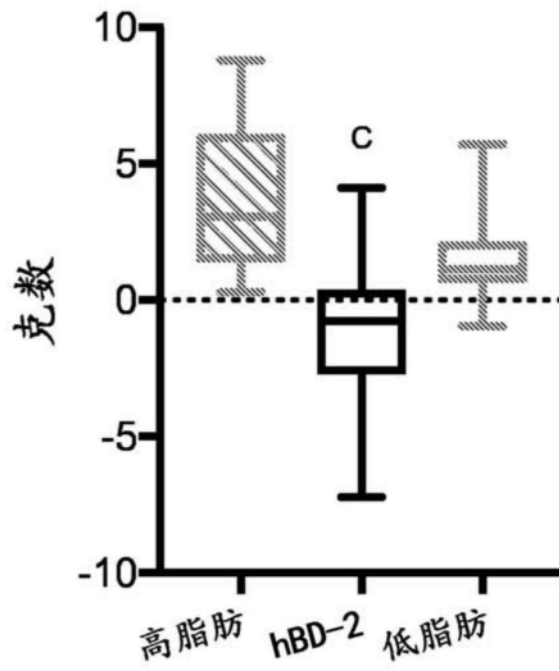


图16B

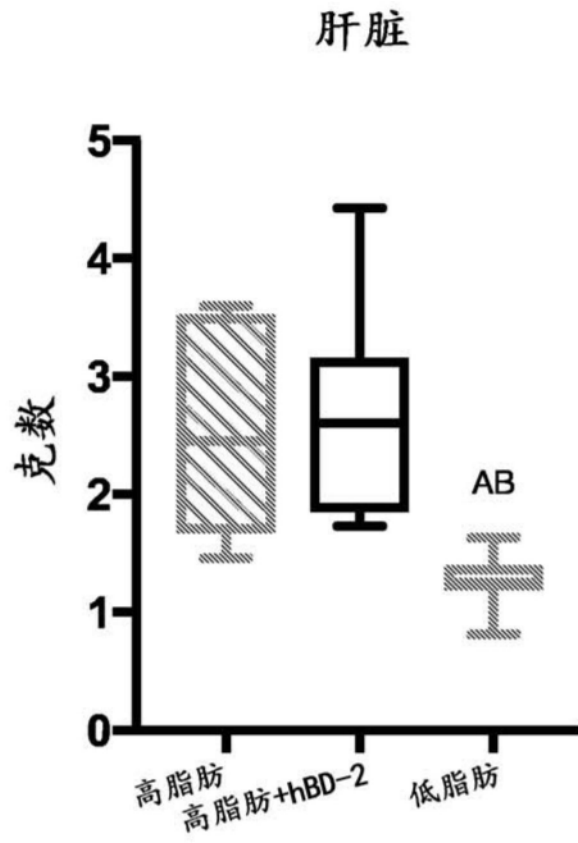


图17A

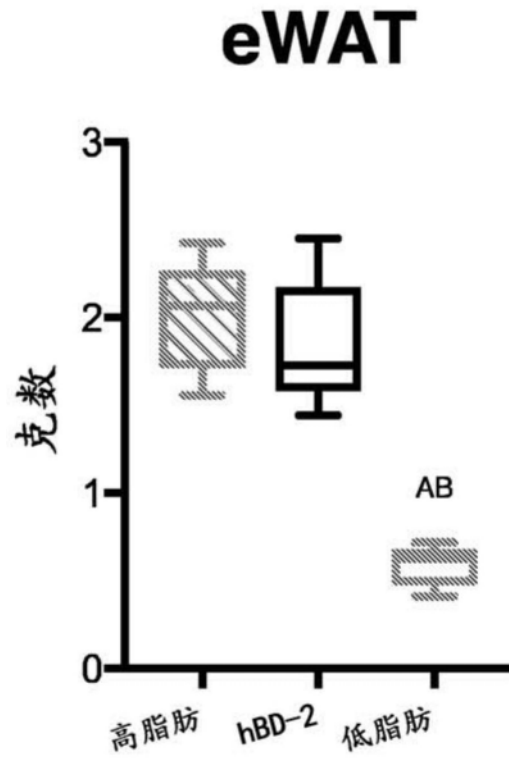


图17B

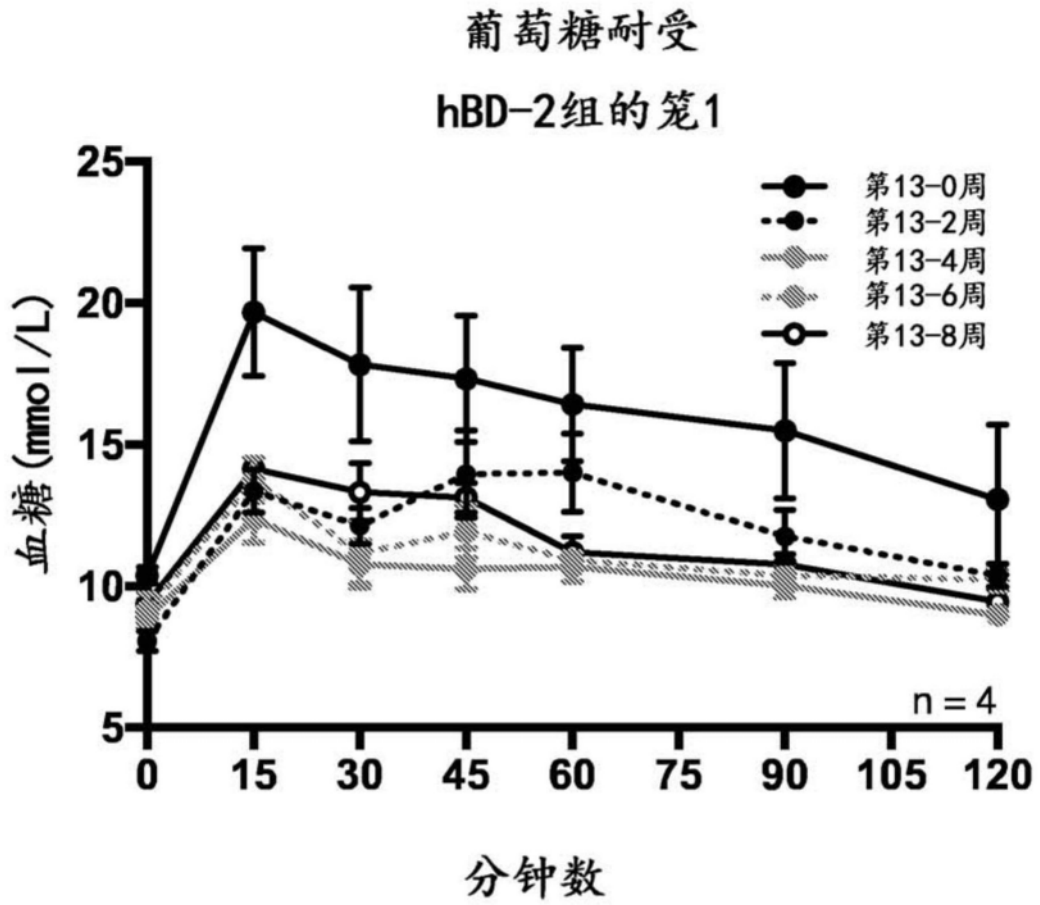


图18A

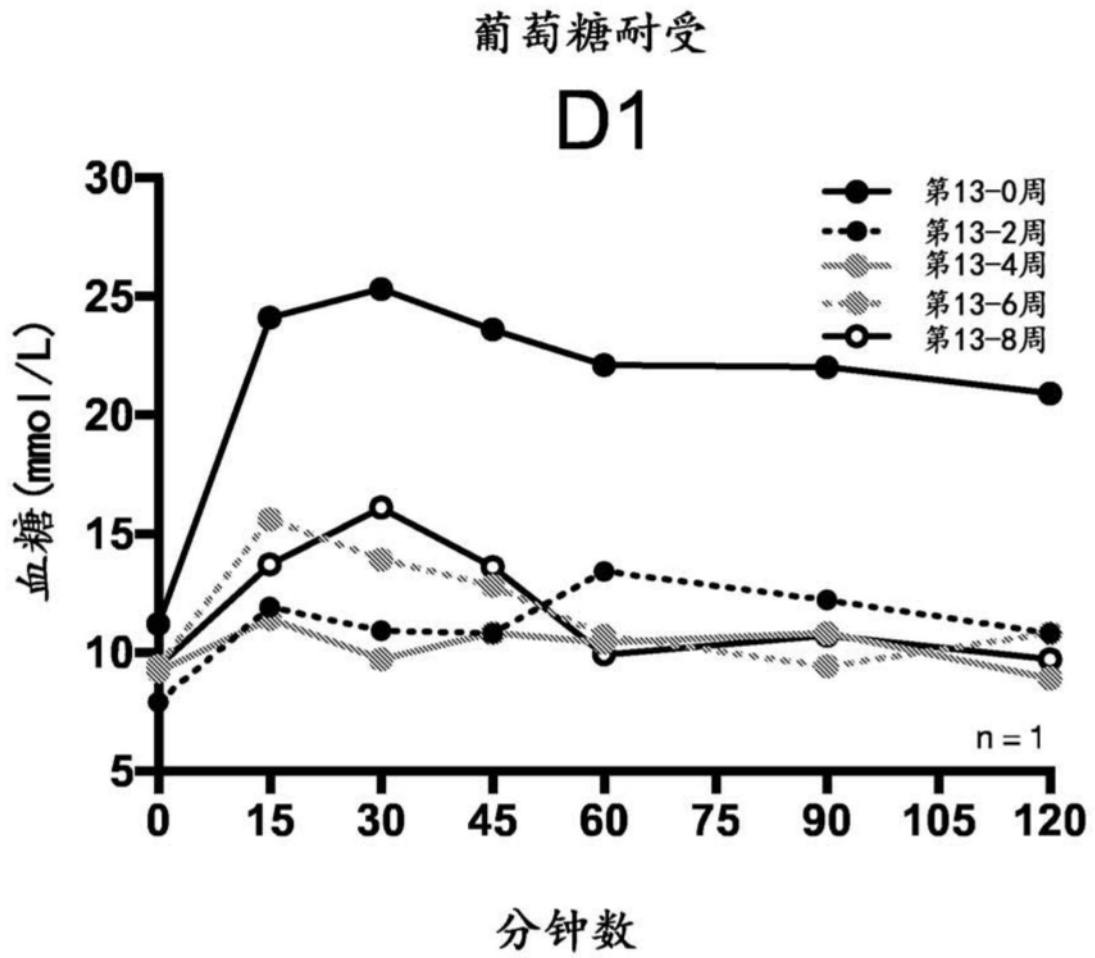


图18B

### 胰岛素耐受

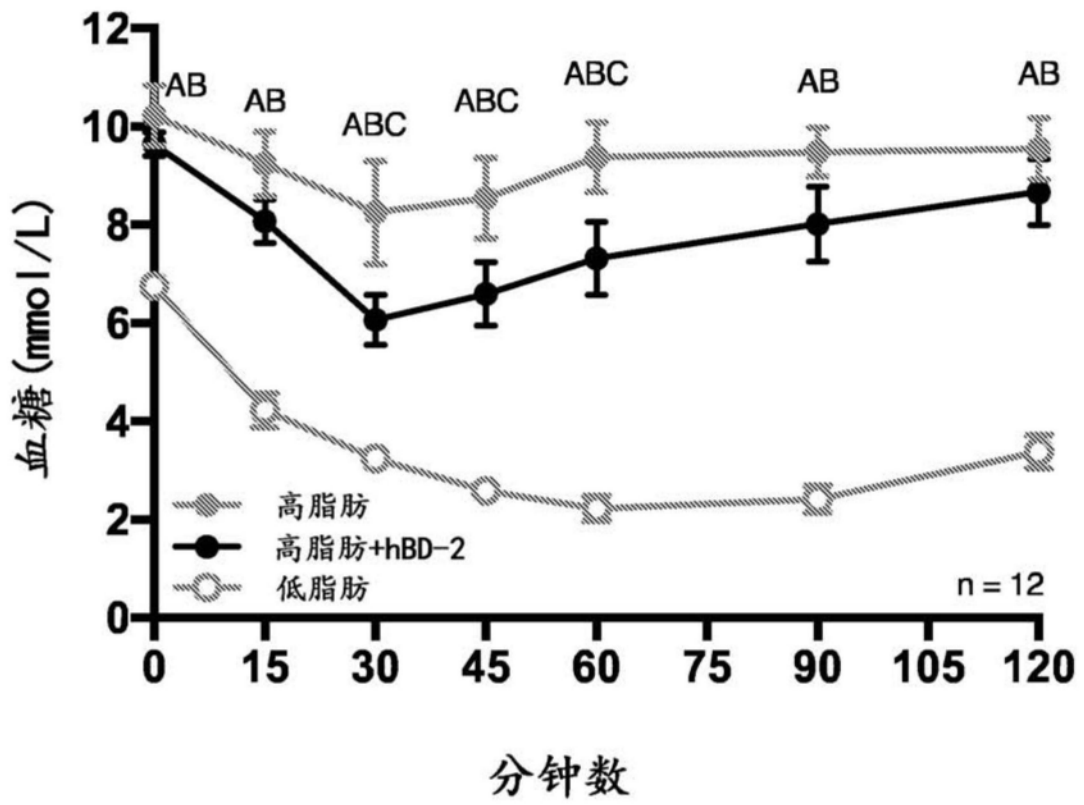


图18C

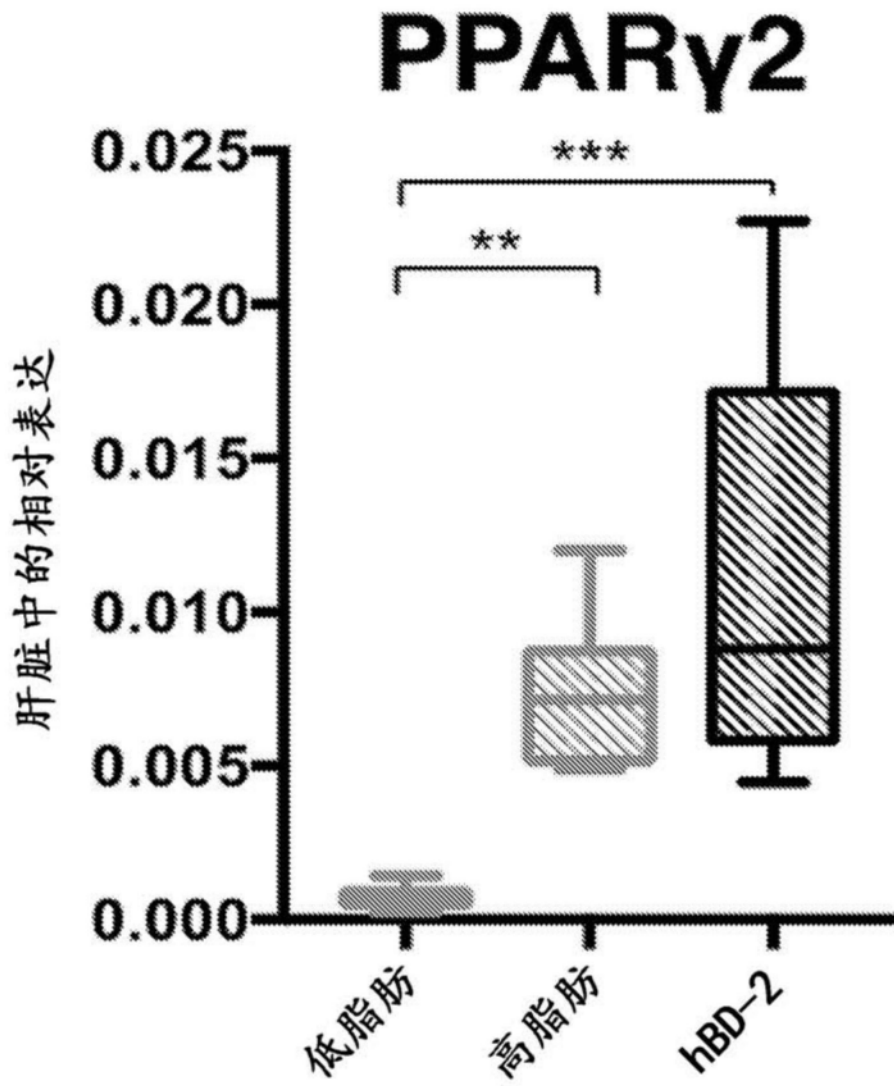


图19A

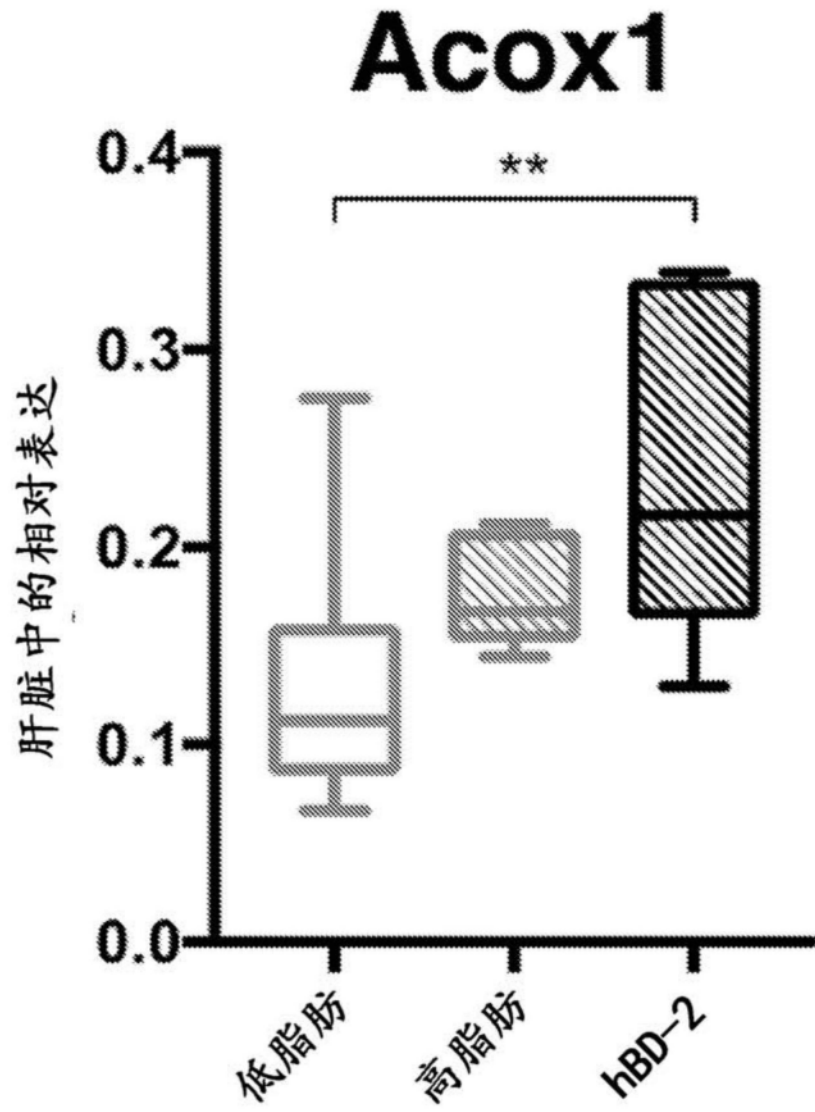


图19B

### 体重发展

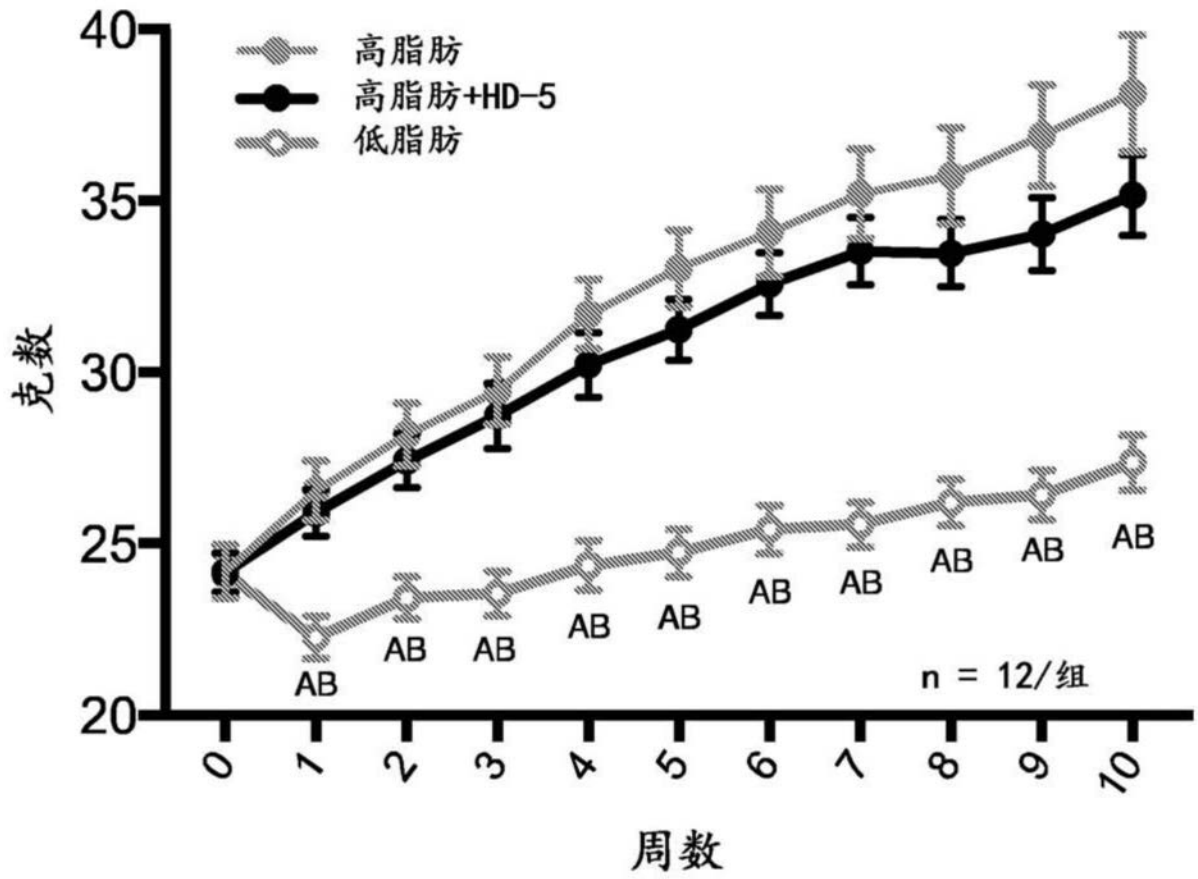


图20A

### 饲料效率

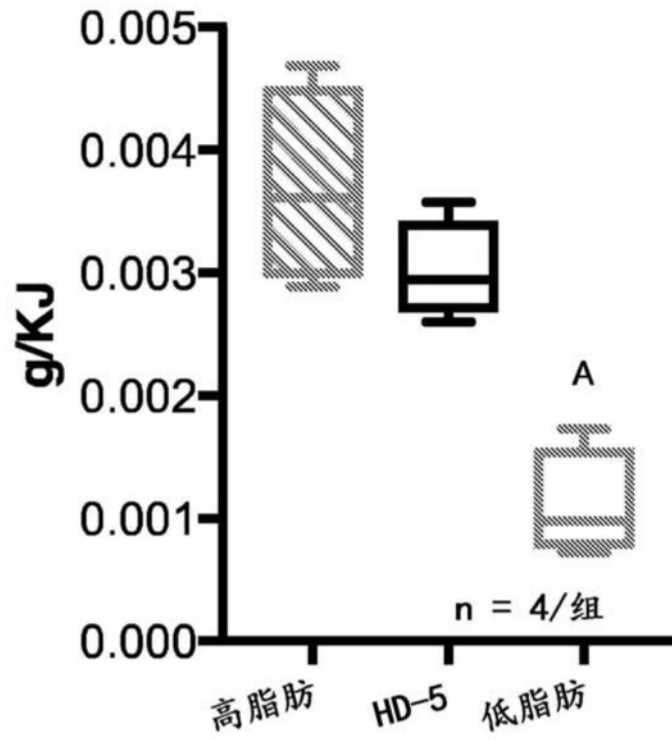


图20B

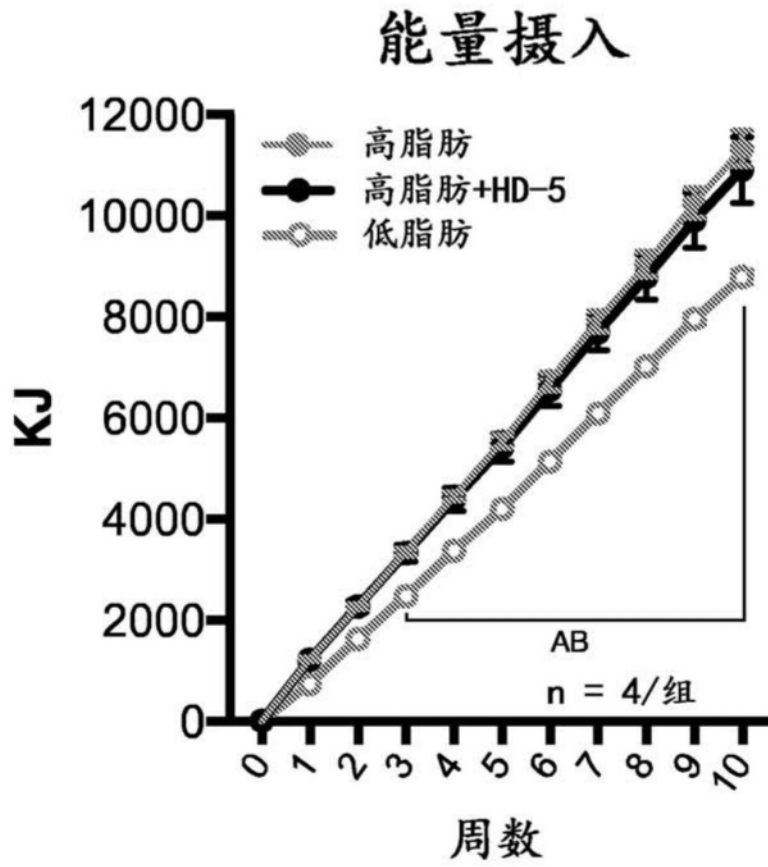


图20C

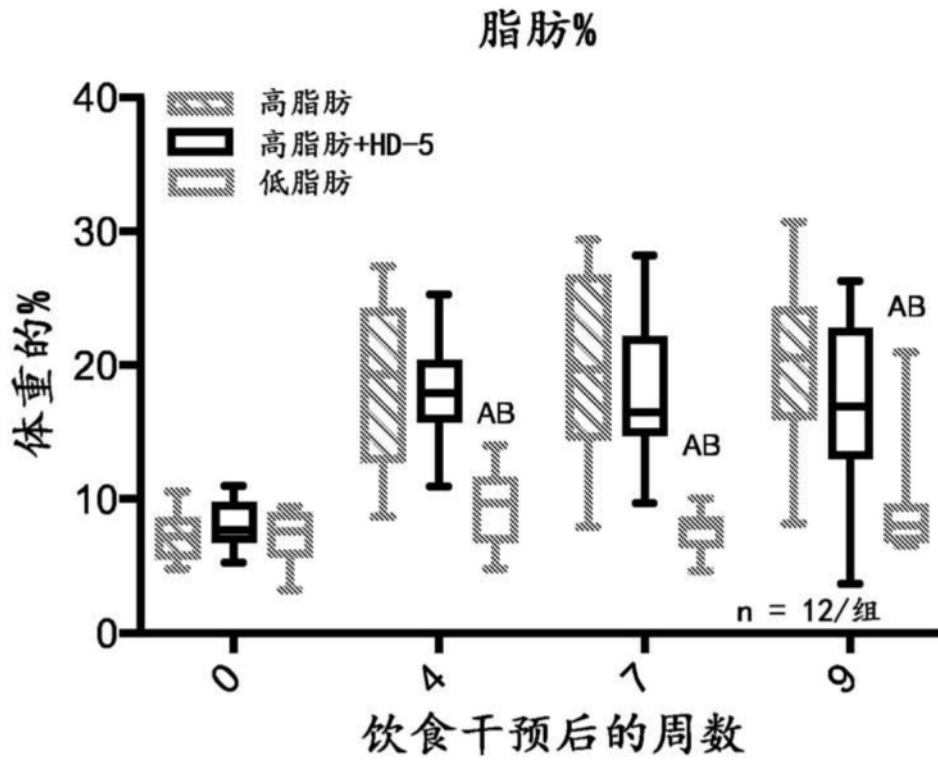


图21A

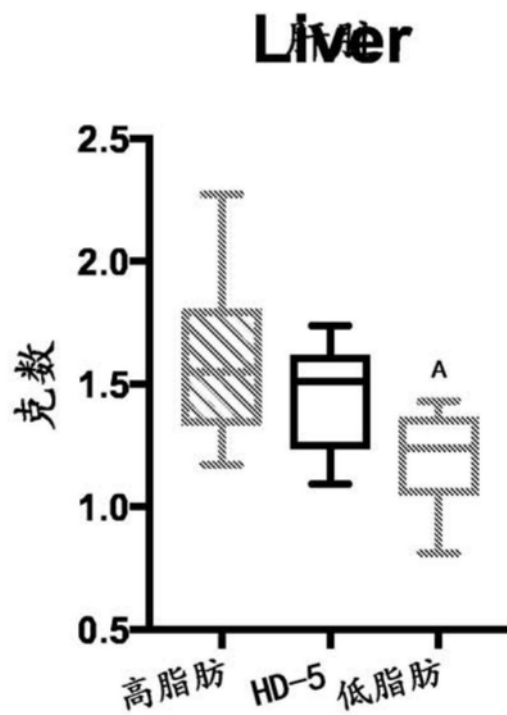


图21B

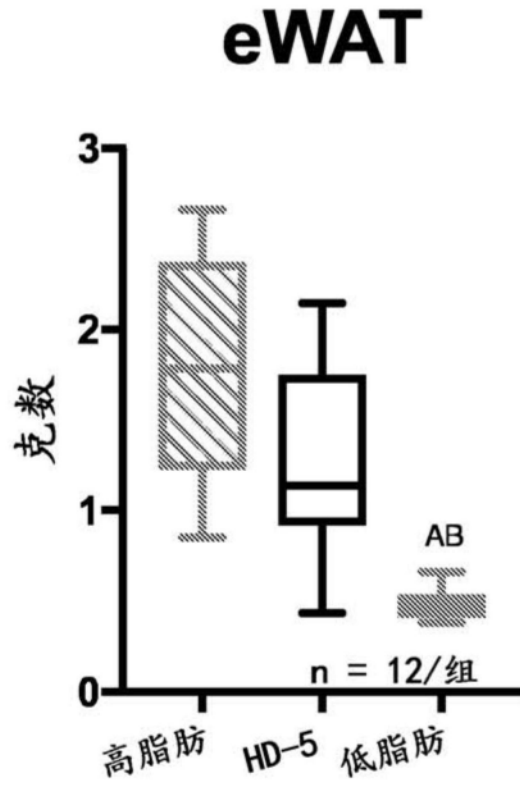


图21C

### 葡萄糖耐受

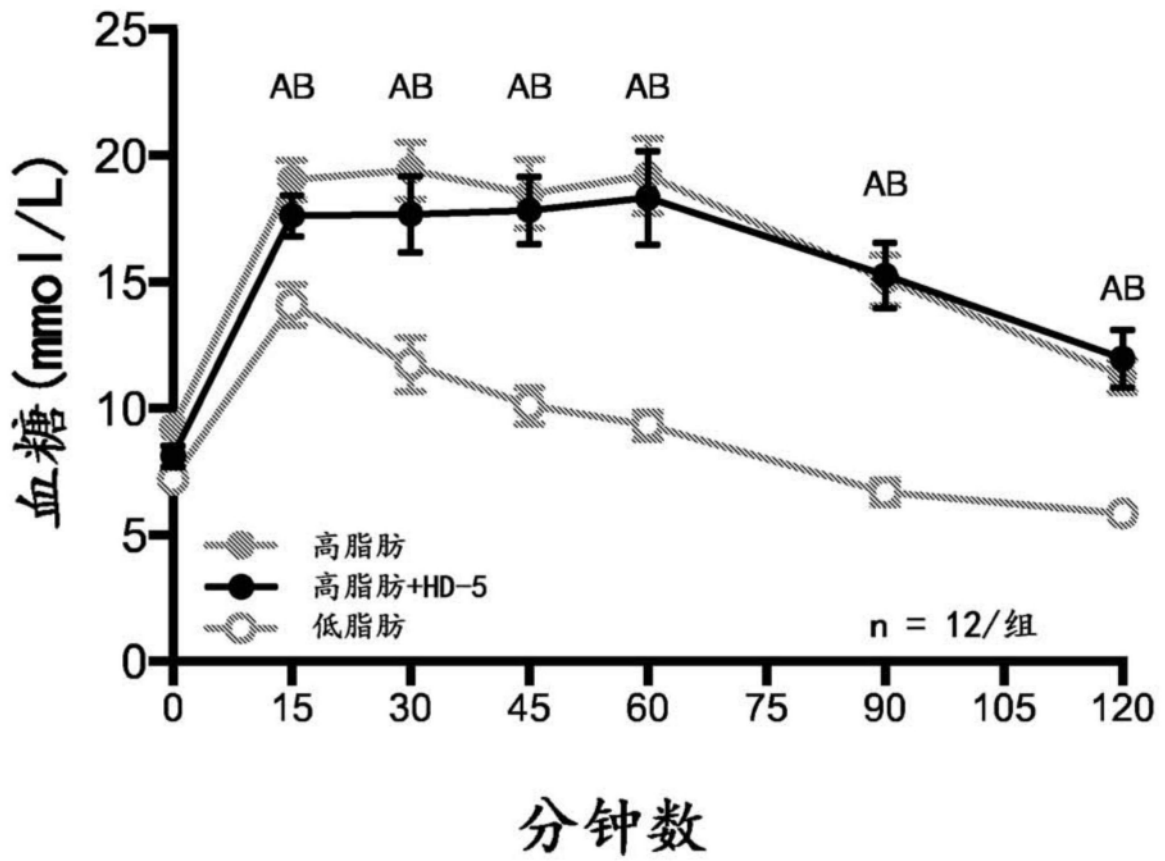


图22A

### 葡萄糖刺激的 胰岛素分泌

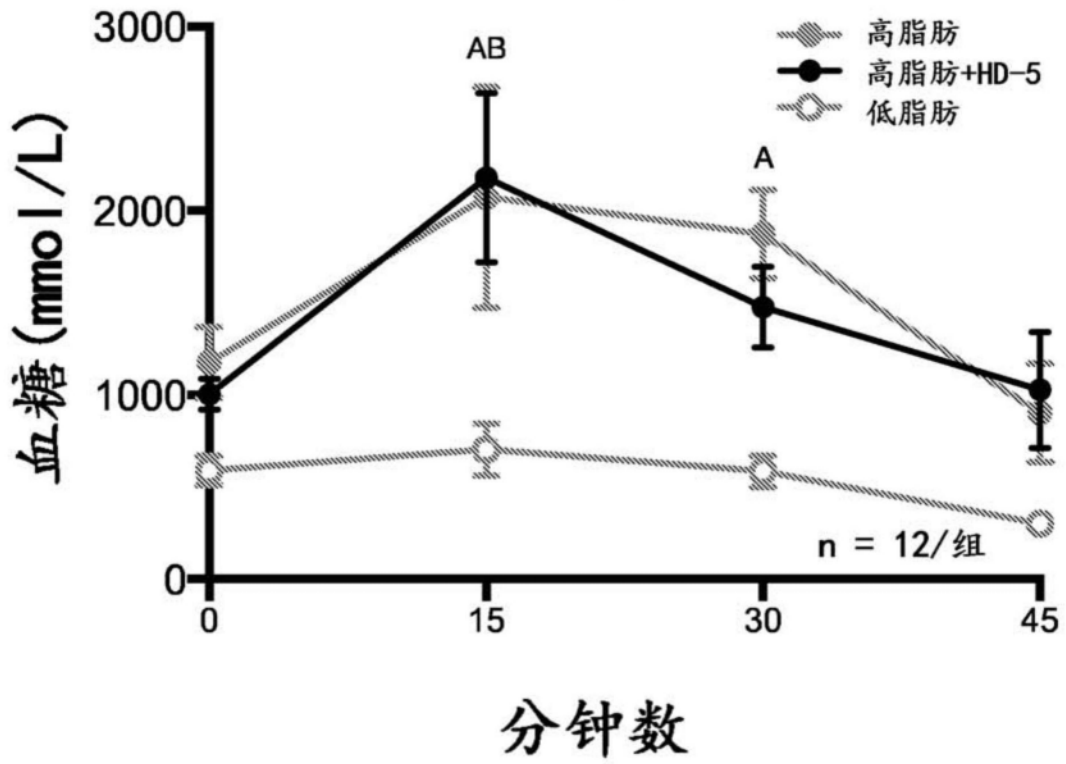


图22B

### 胰岛素耐受

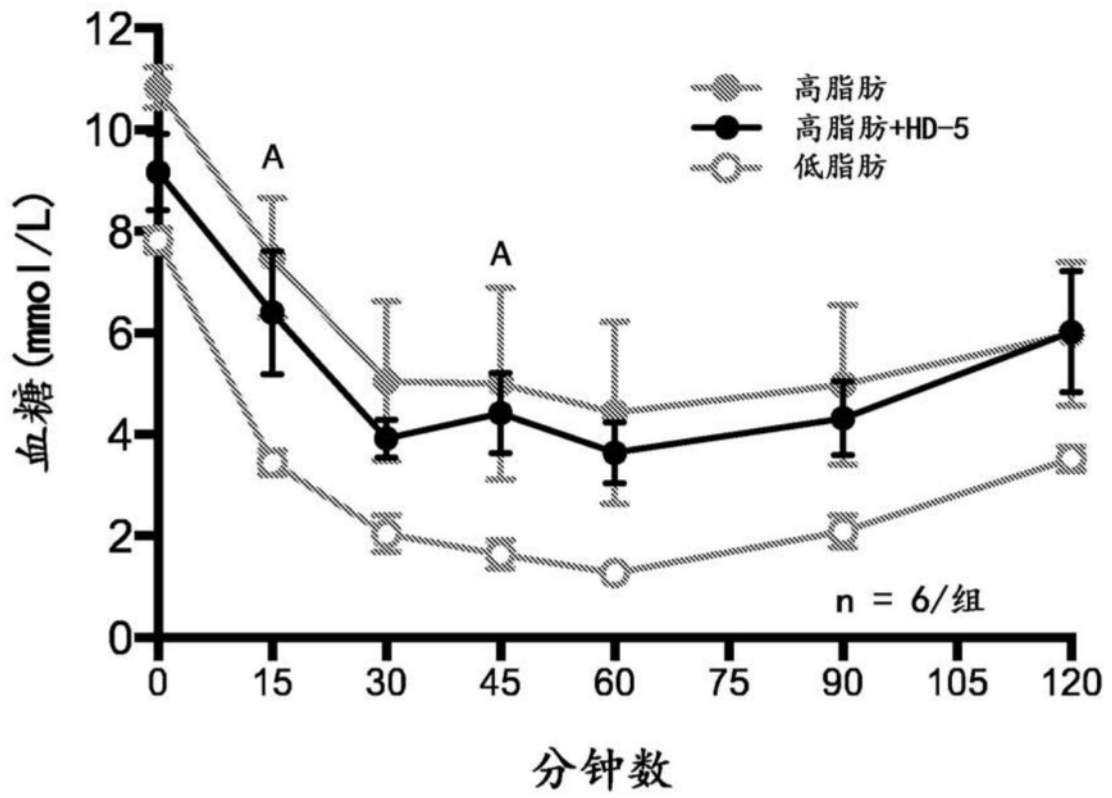


图23A

# HOMA-IR

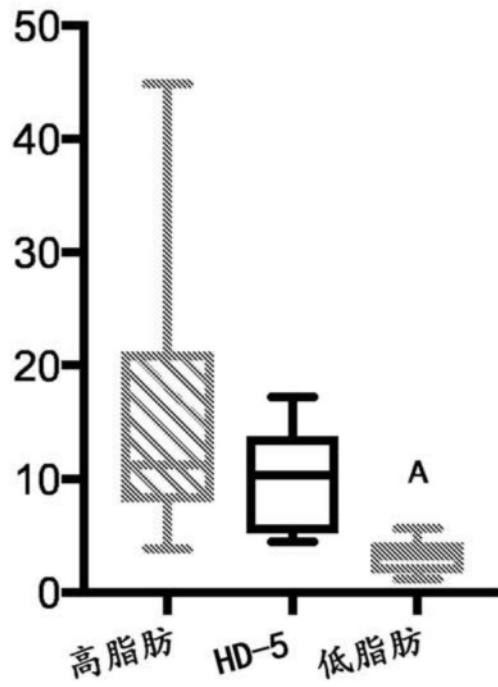


图23B

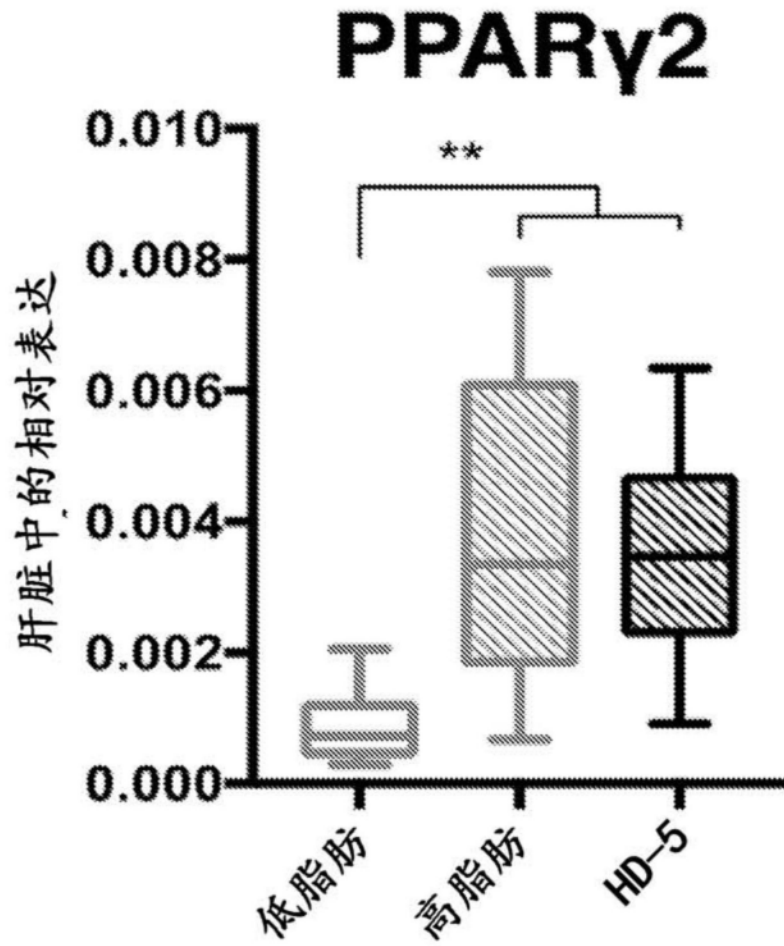


图24A

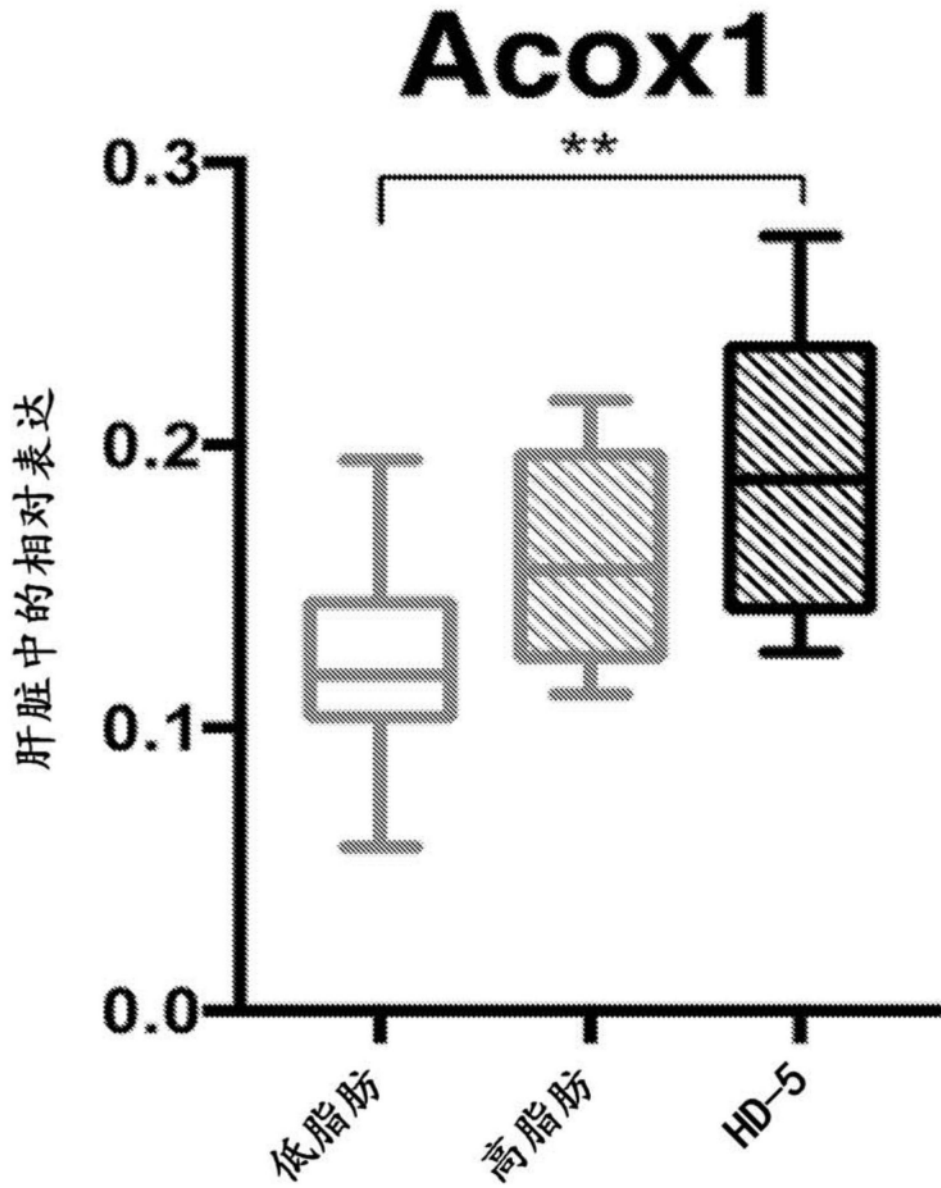


图24B

### 体重发展

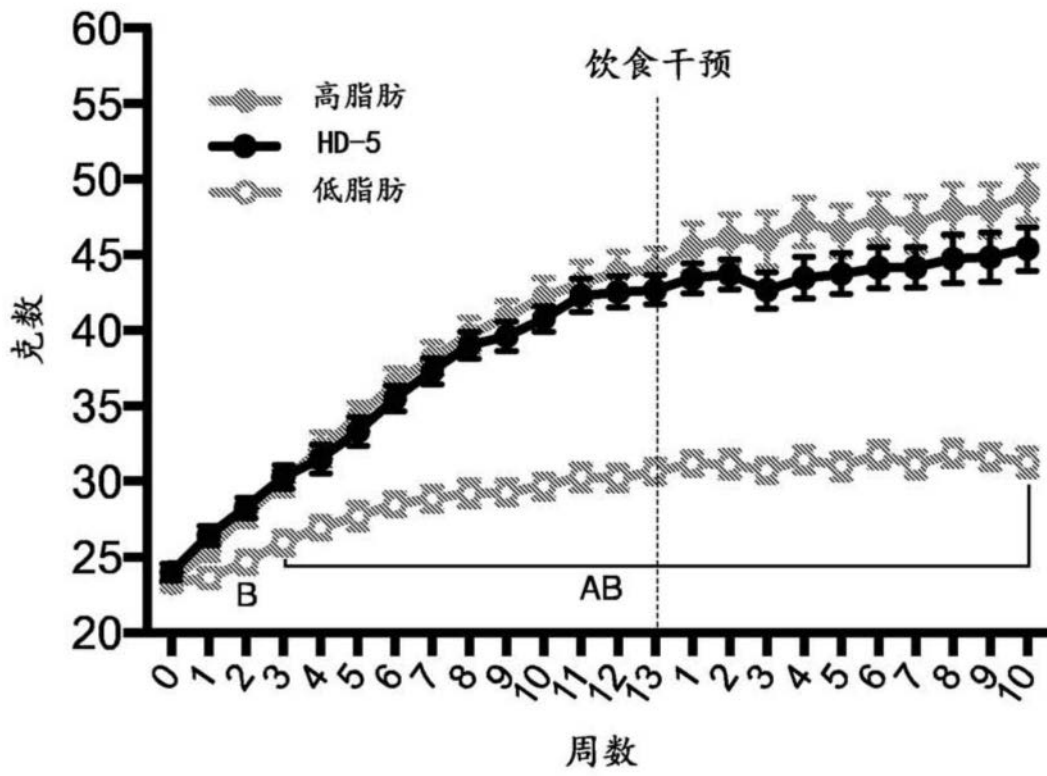


图25A

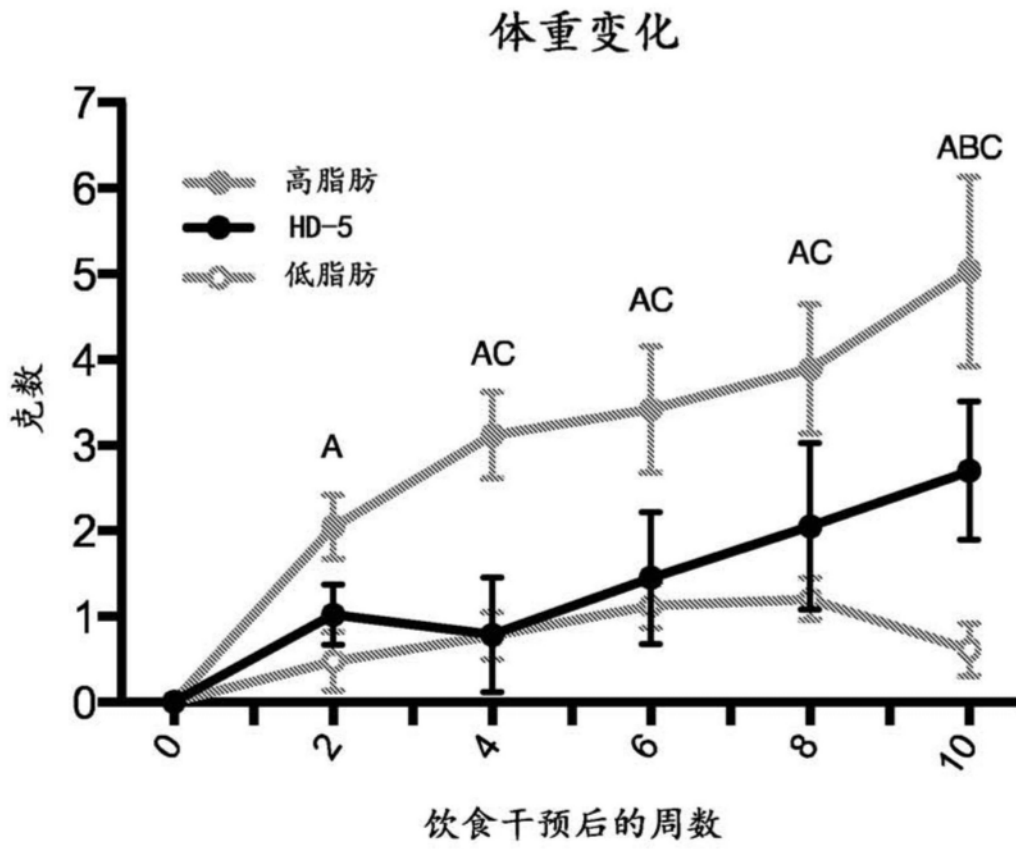


图25B

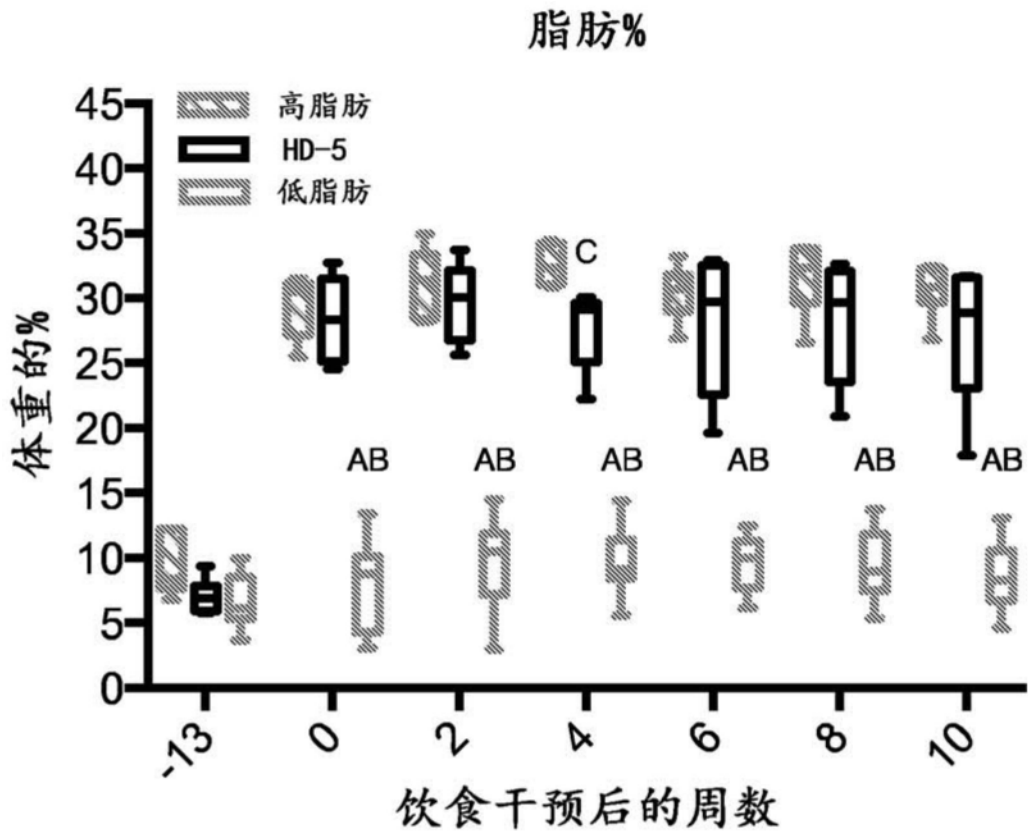


图26A

### 脂肪%变化 第0-4周

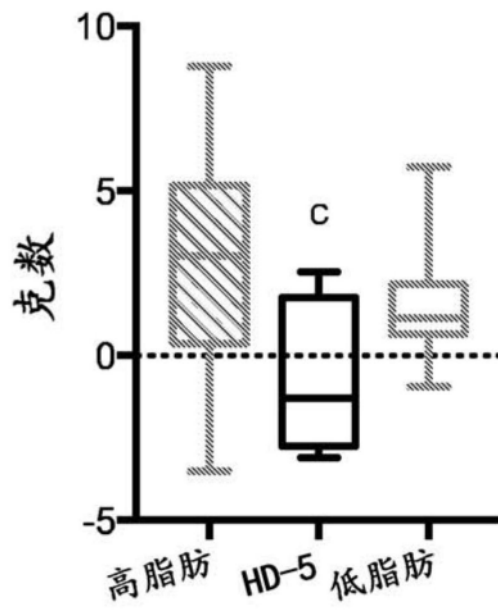


图26B

### 肝脏

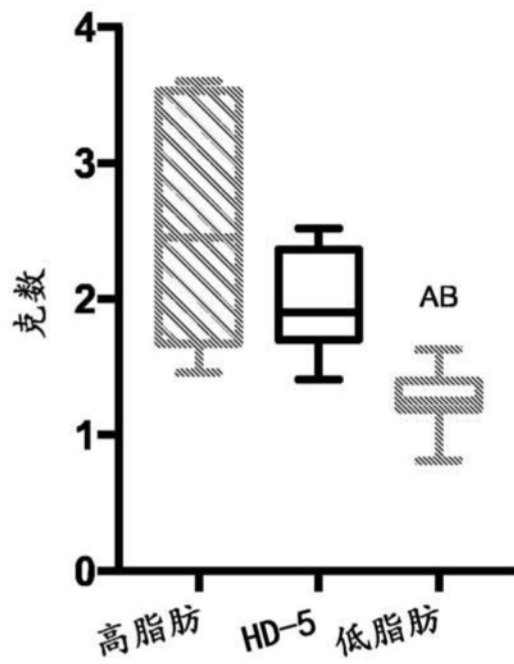


图27A

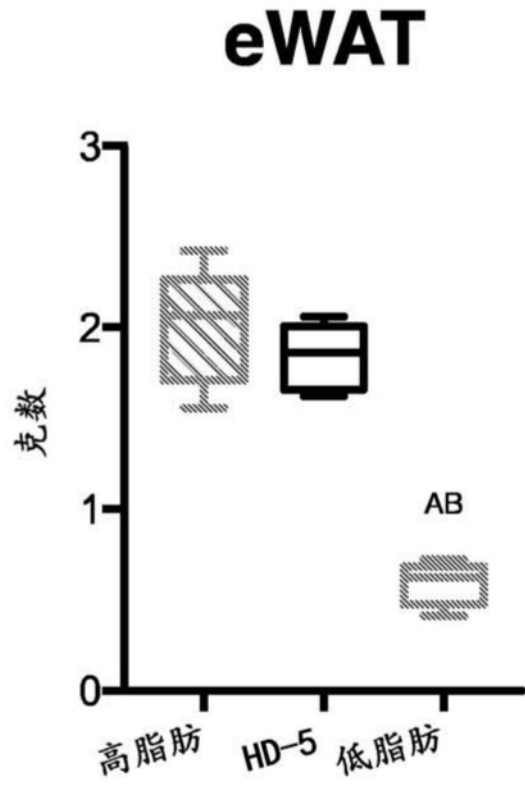


图27B

### HD-5组的笼2 葡萄糖耐受

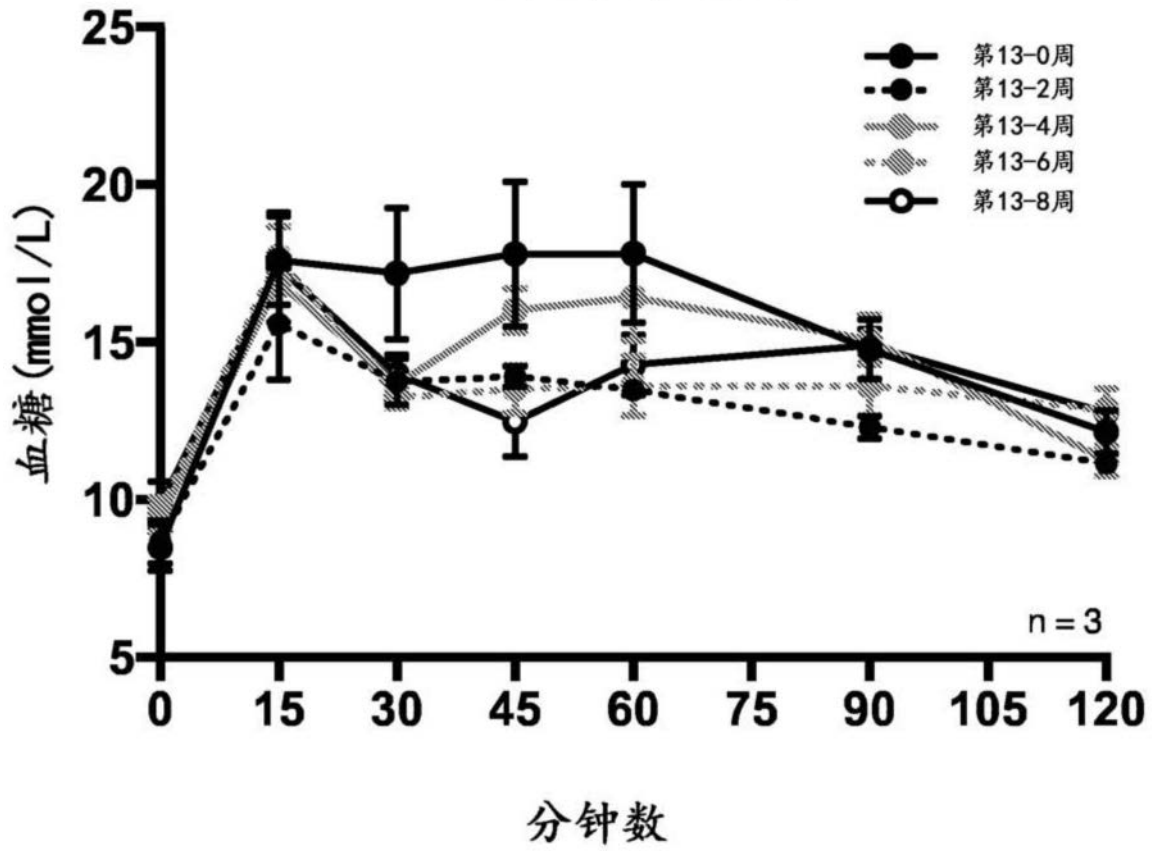


图28A

# 胰岛素耐受

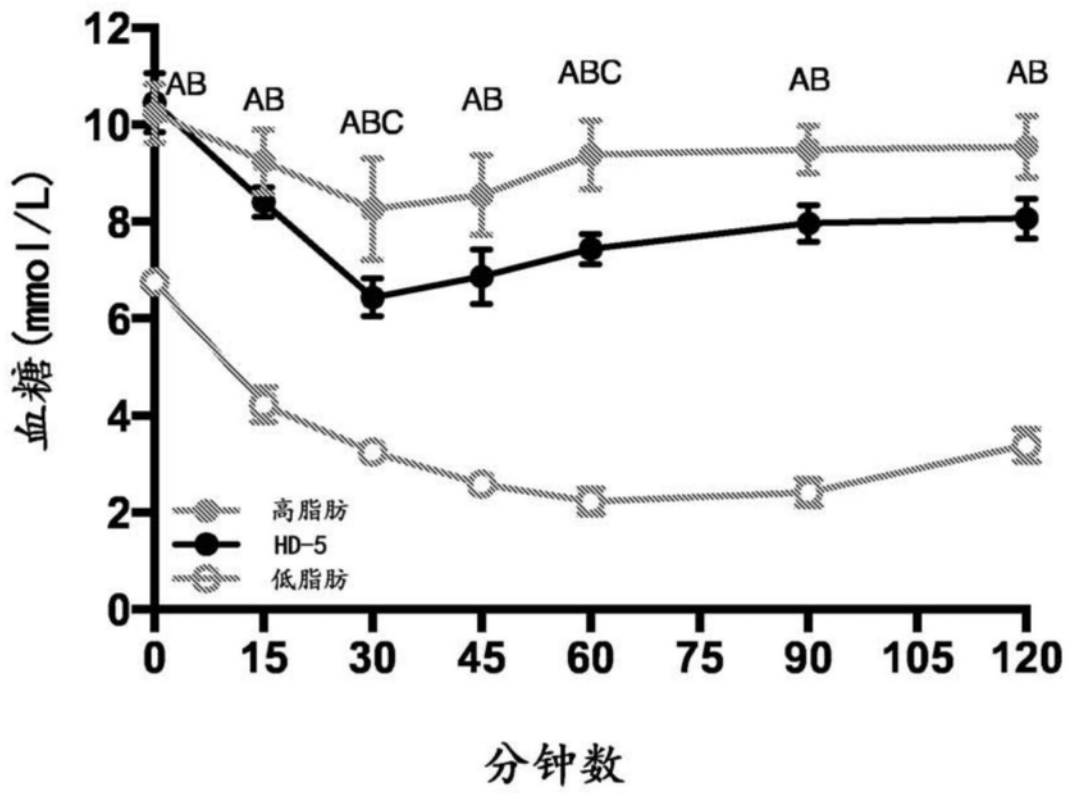


图28B

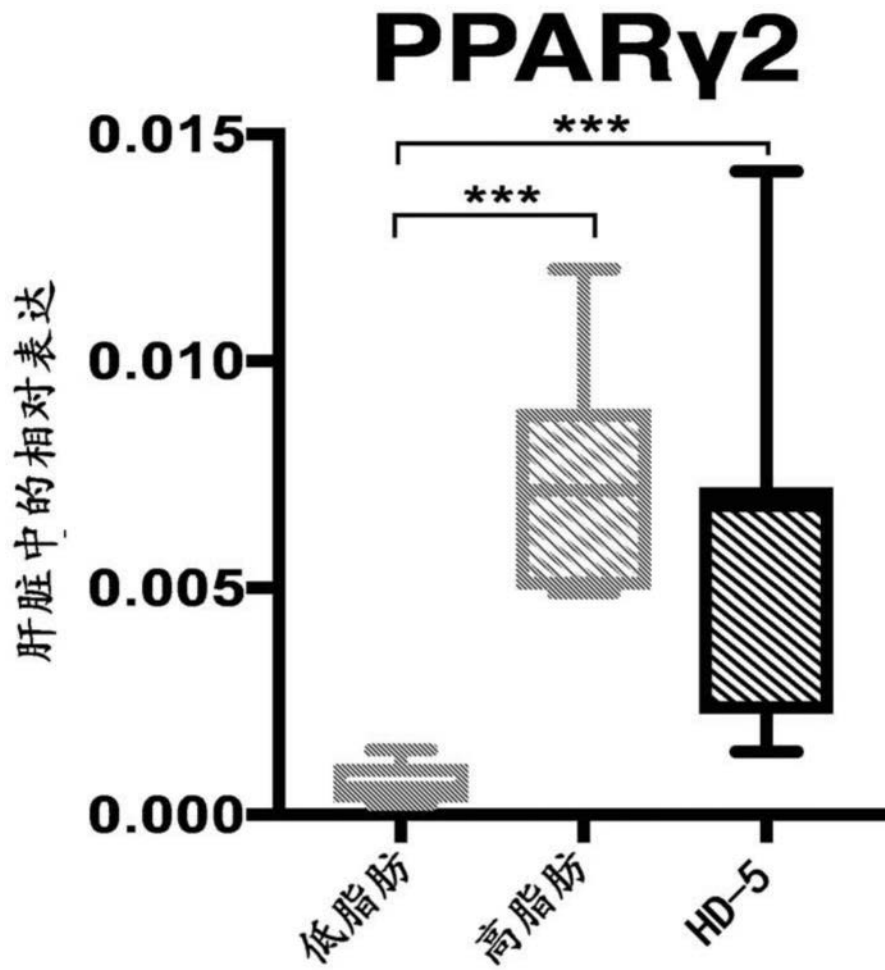


图29A

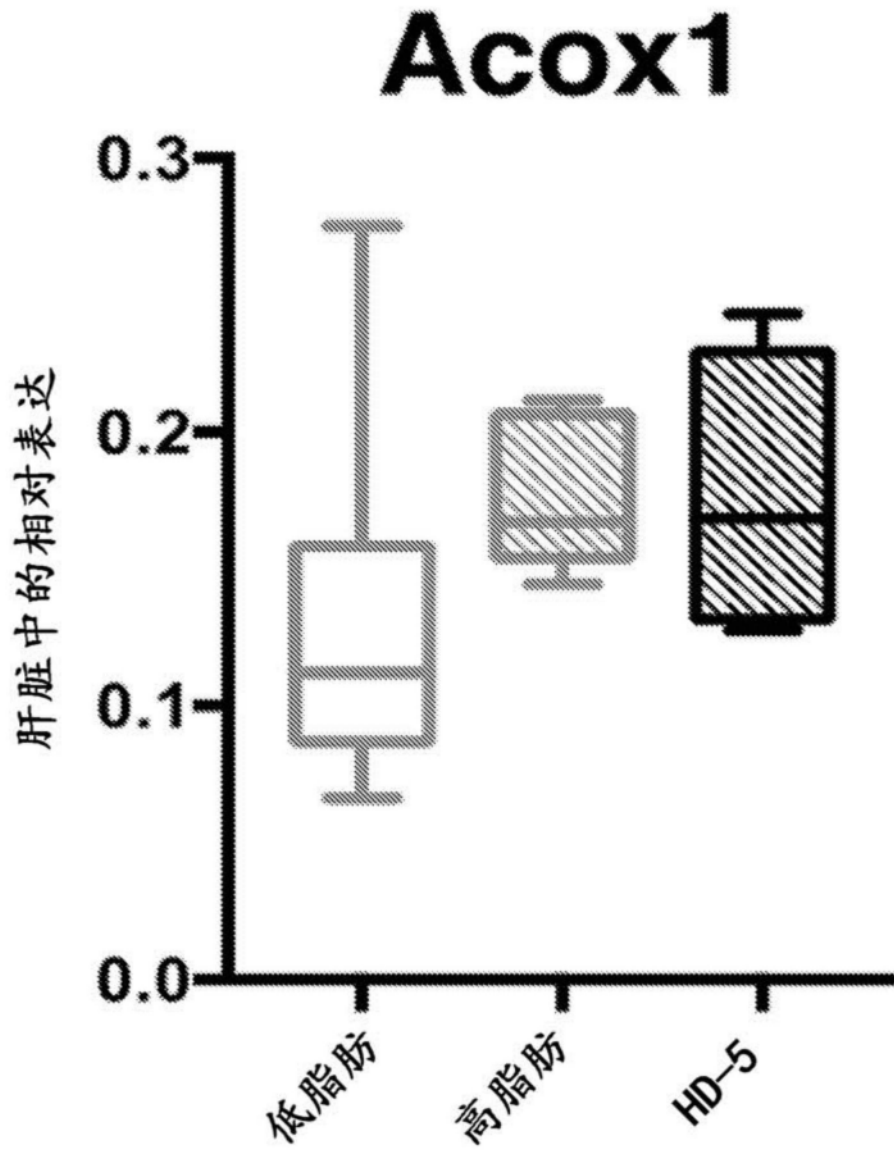


图29B

### 膳食脂肪的摄取

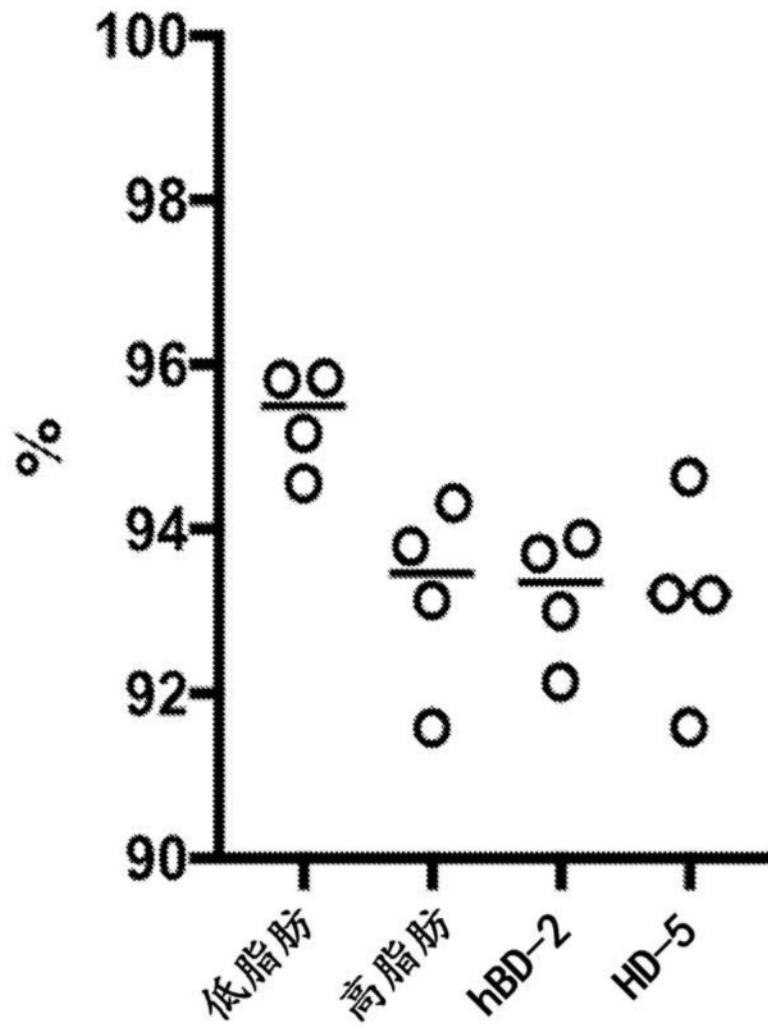


图30A

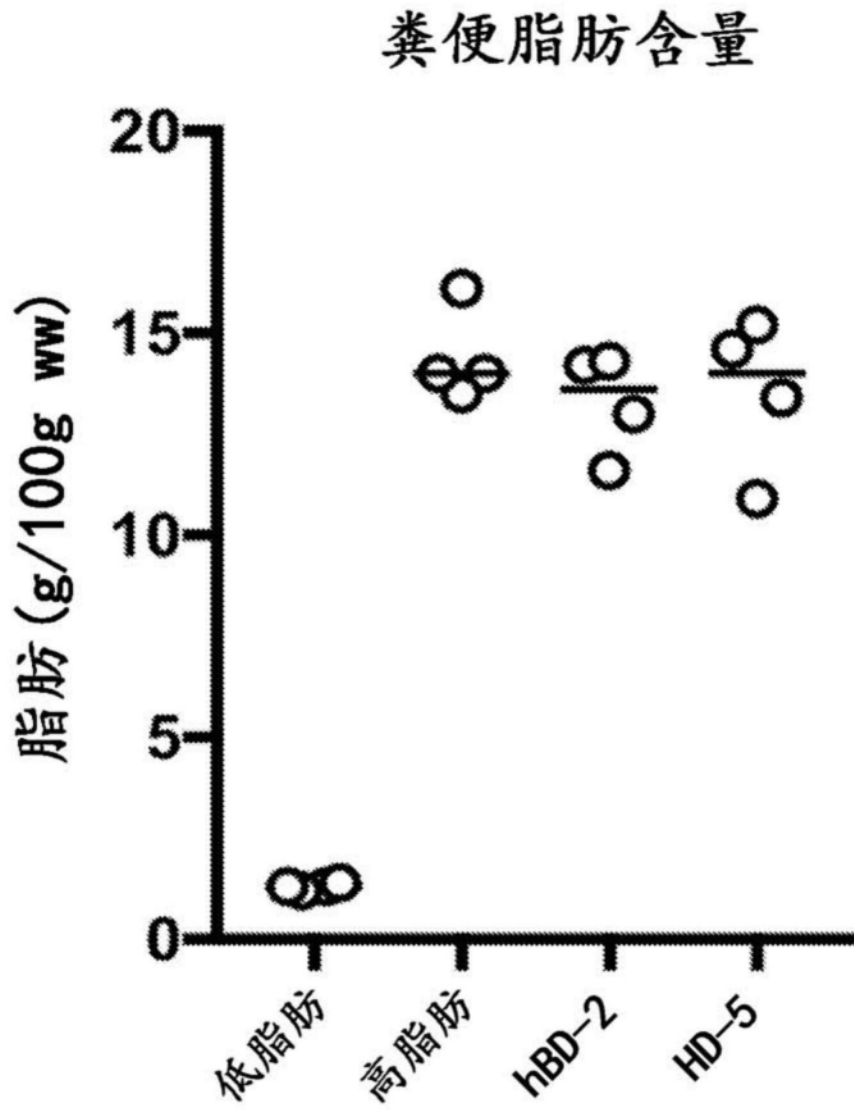


图30B

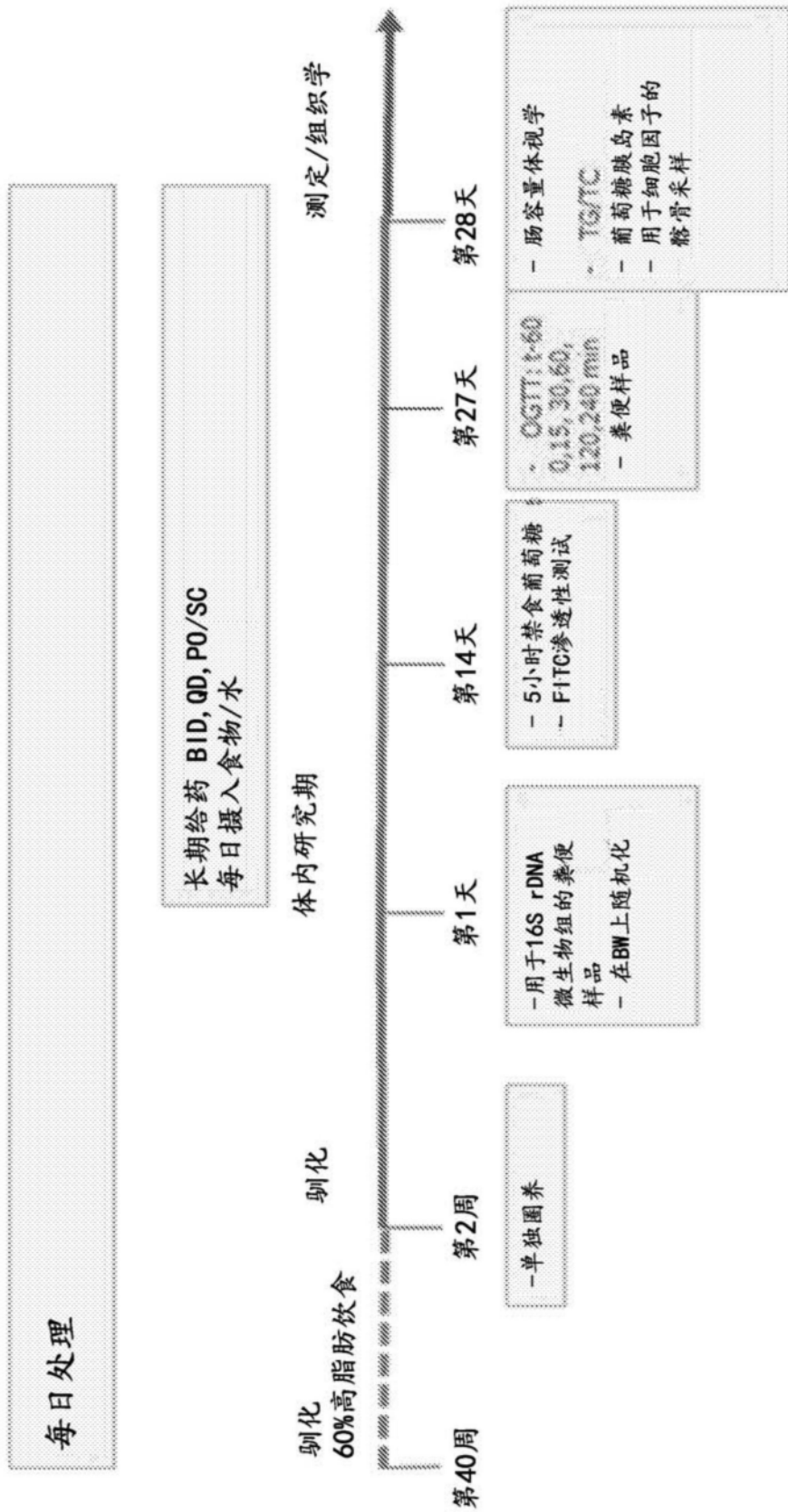
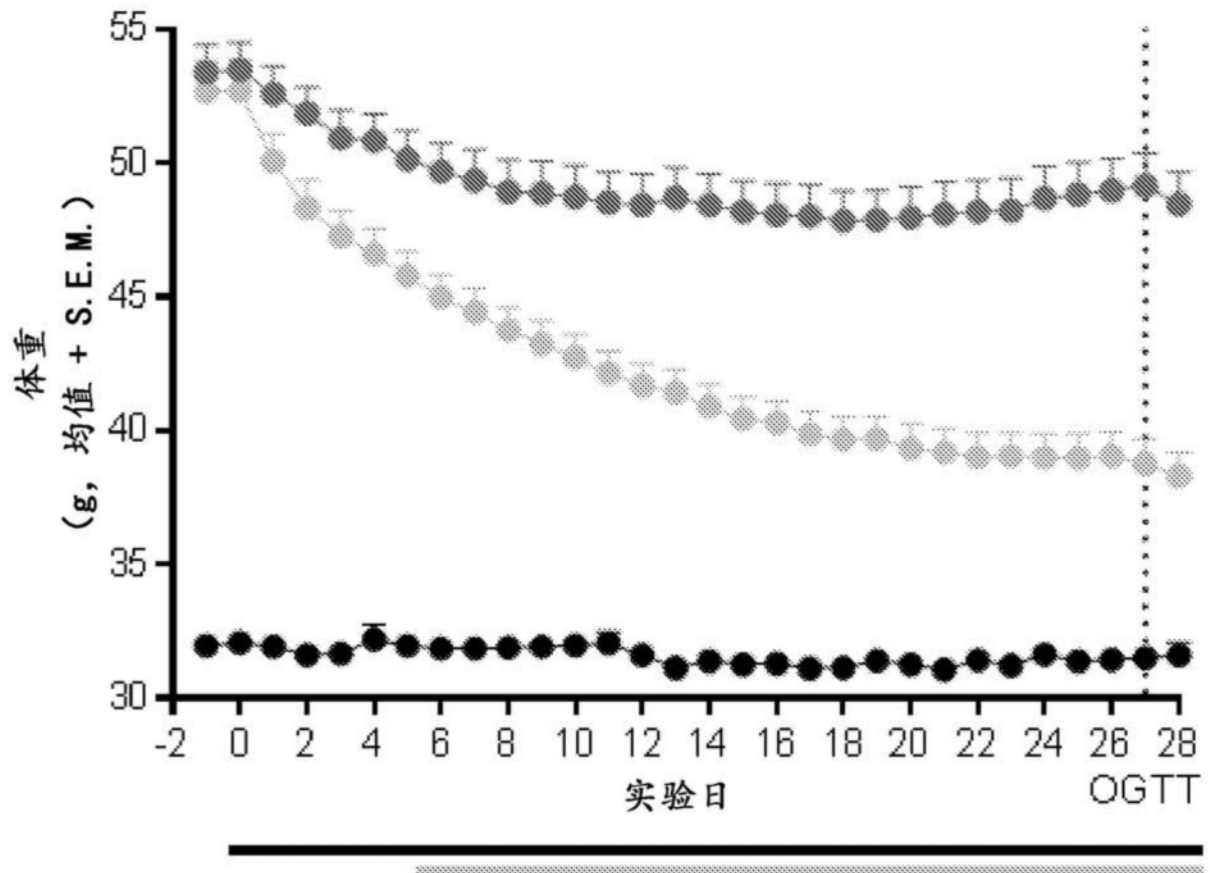


图31

体重



- 粮 媒介物/媒介物 po/sc QD, n=10
- D10 媒介物/媒介物 po/sc QD, n=10
- 利拉鲁肽/媒介物 0.2mg/kg sc/po BID, n=15

图32A

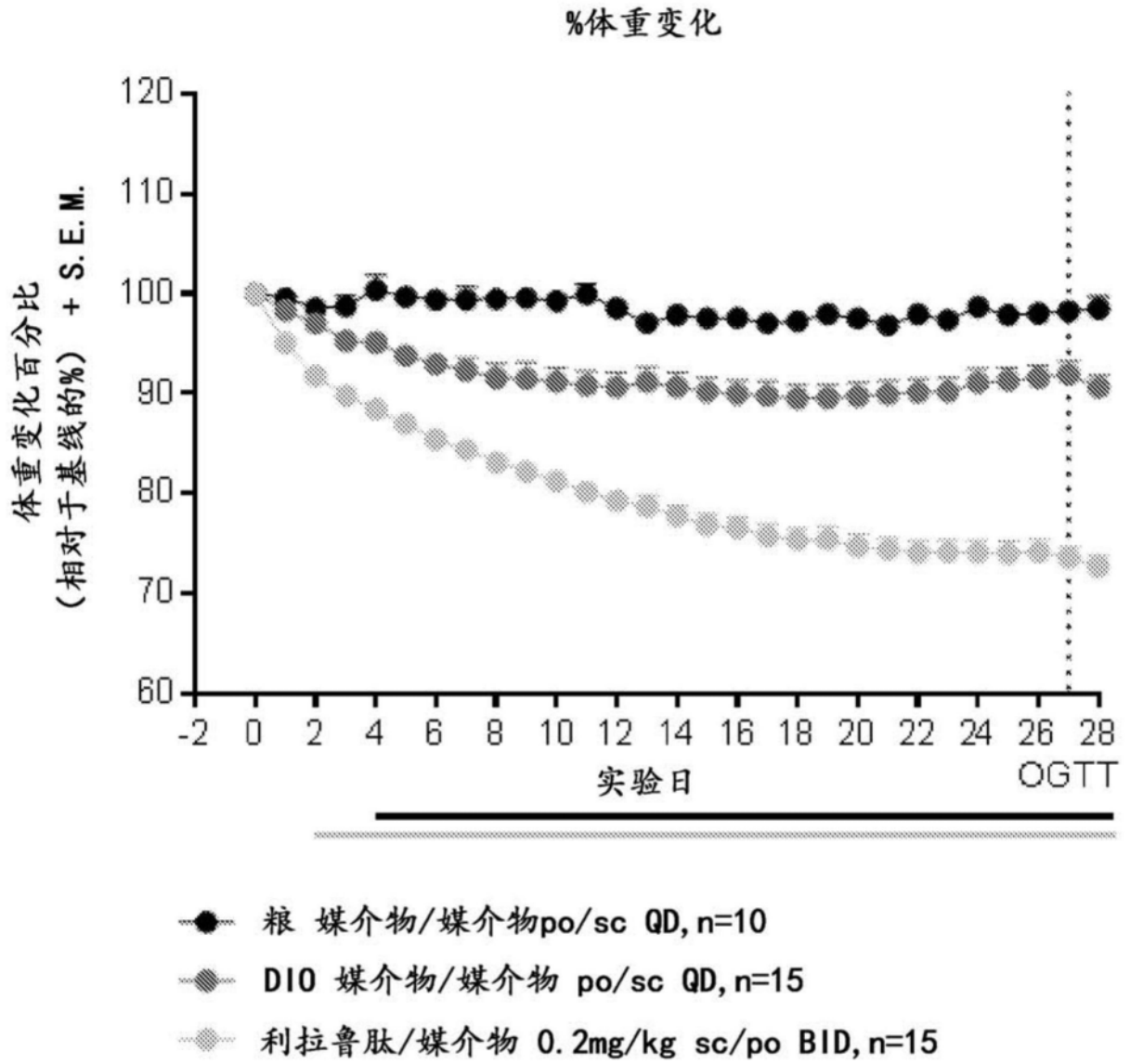


图32B

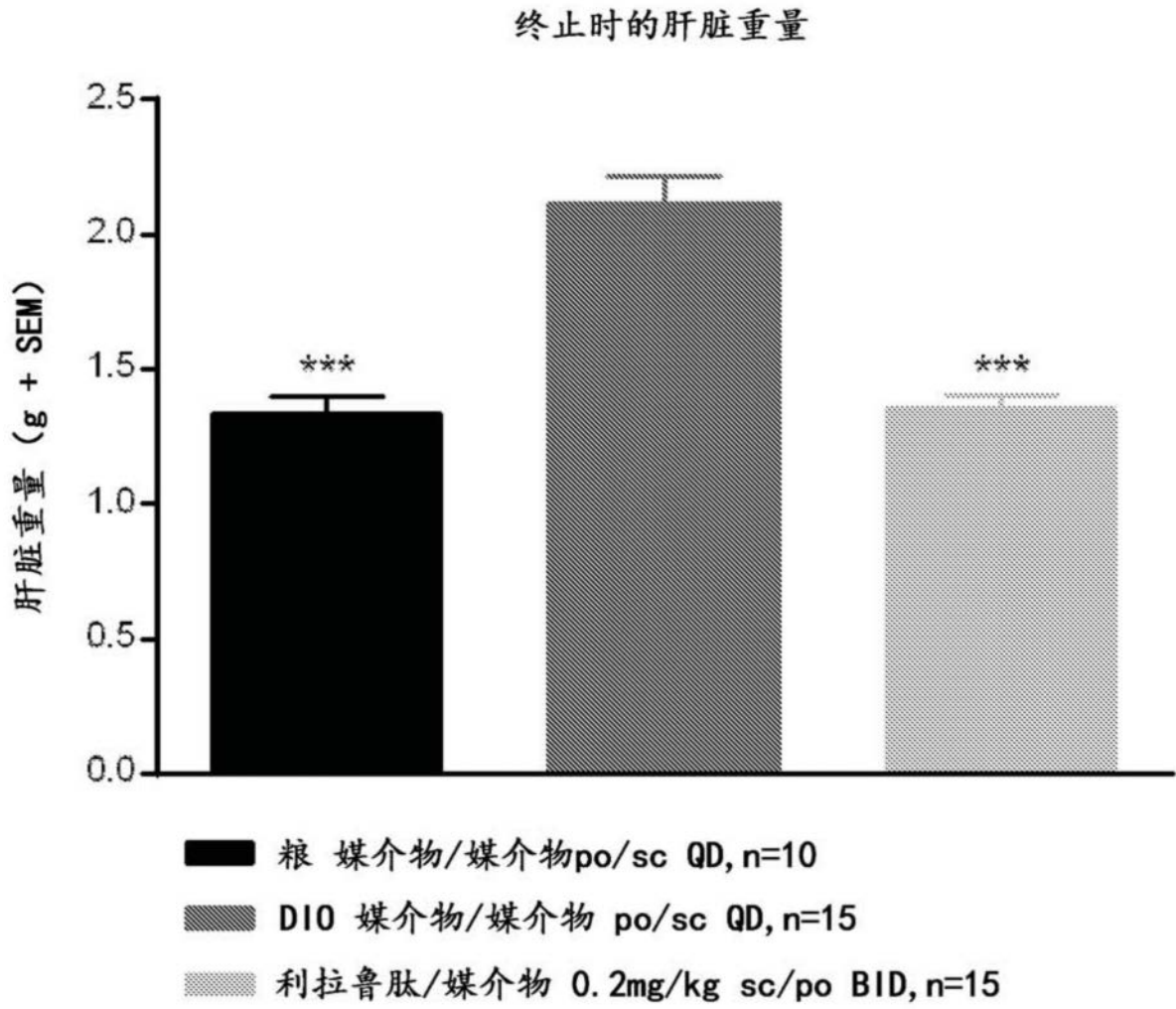


图33

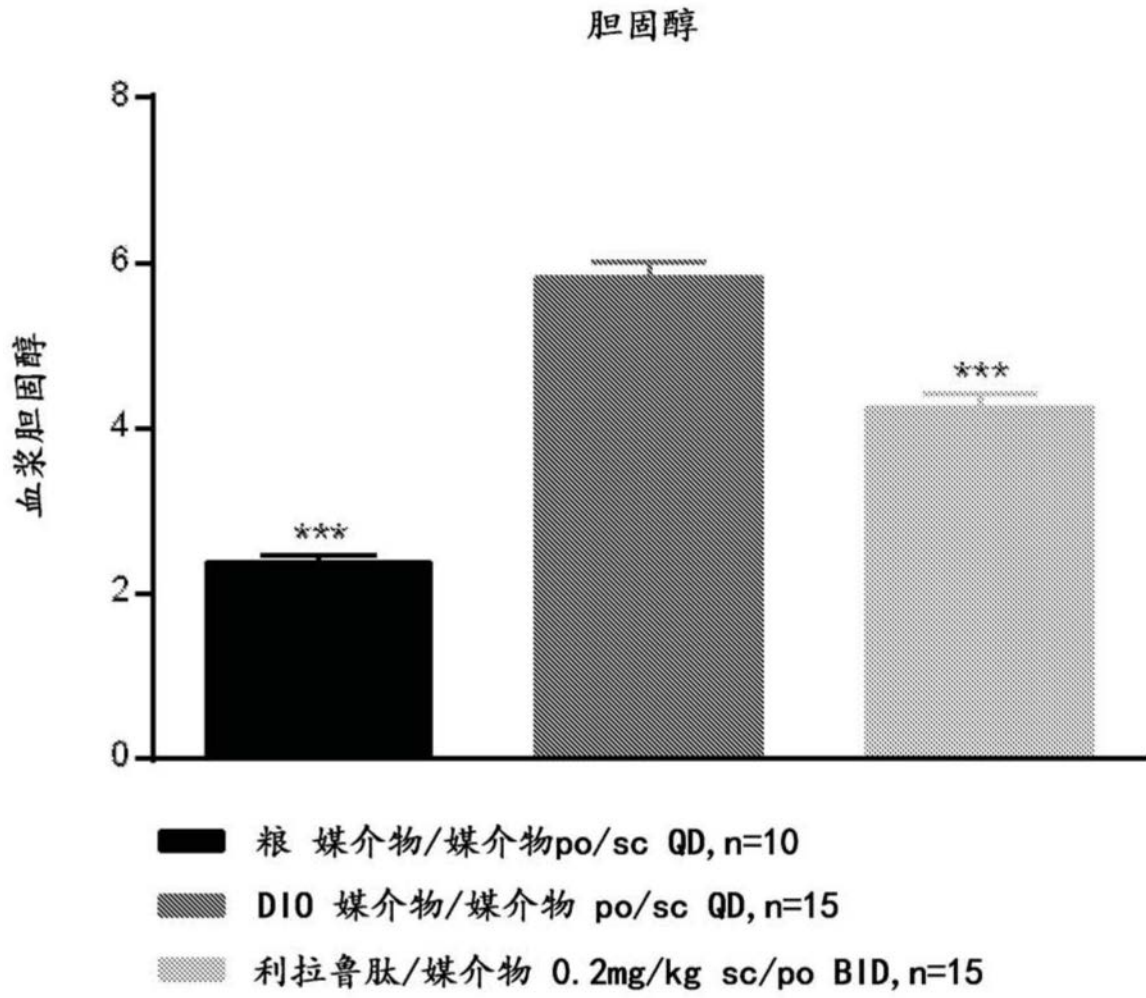


图34

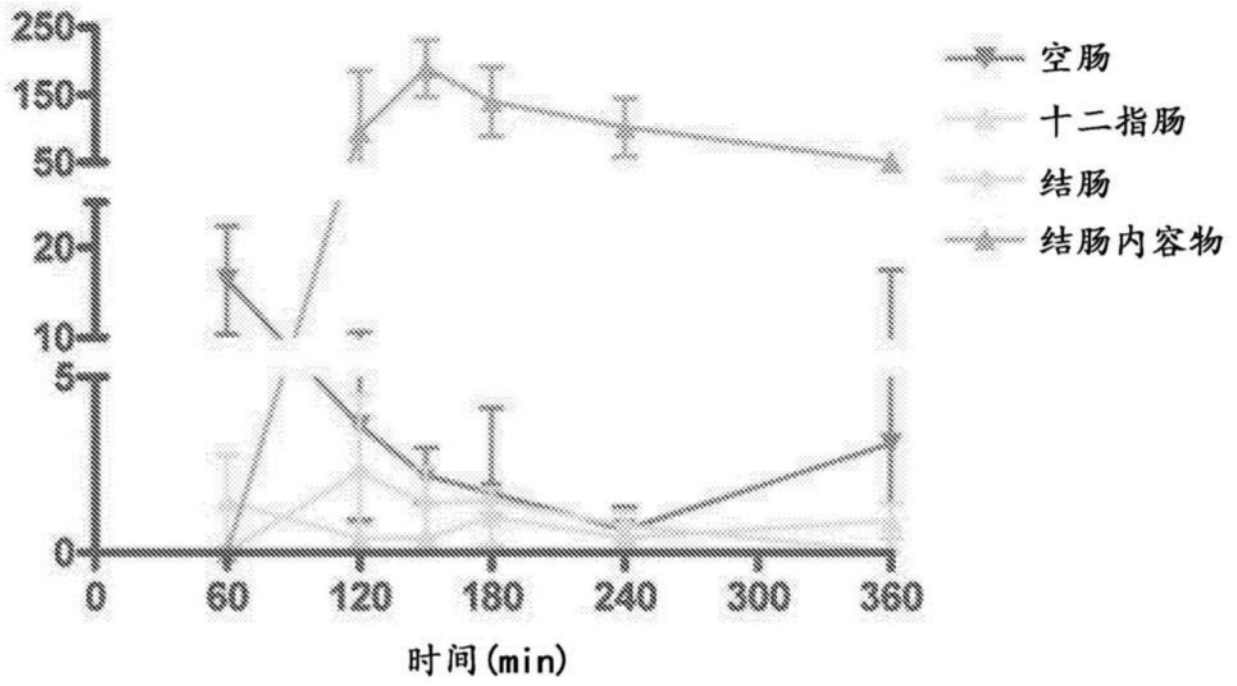


图35

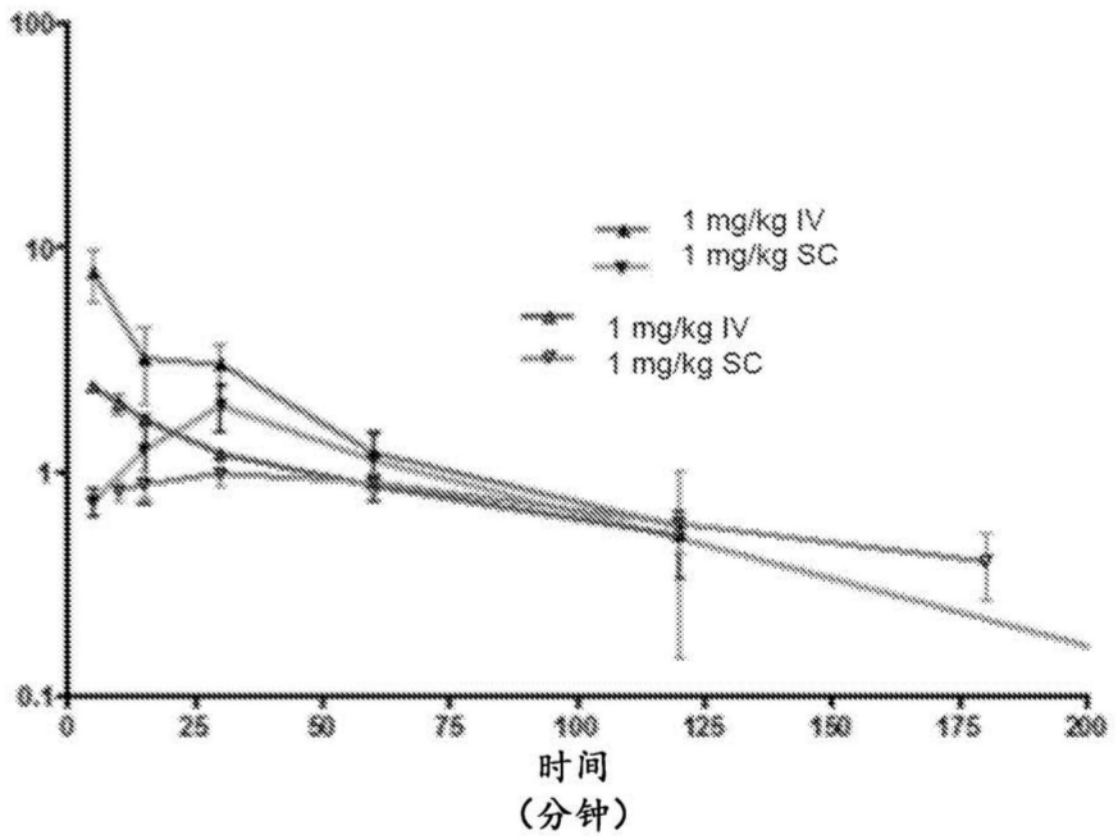


图36

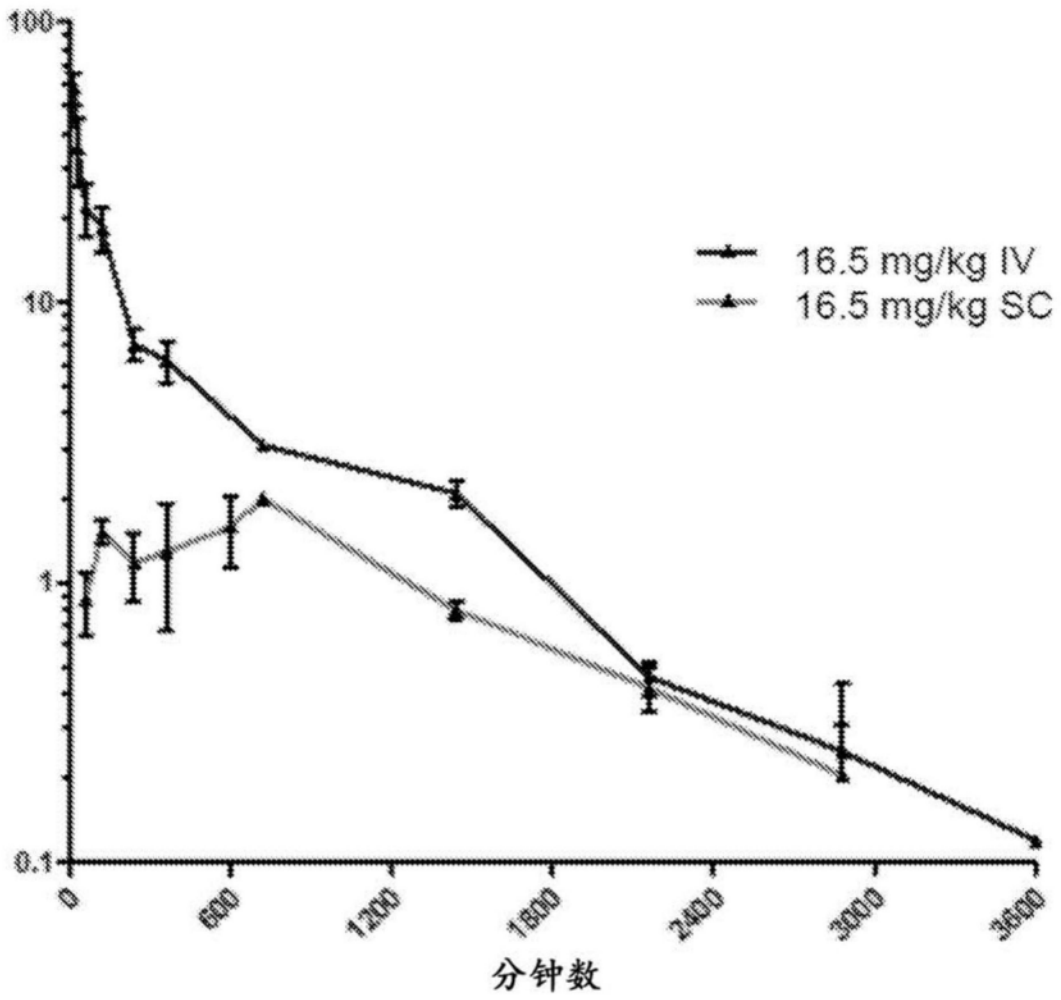


图37

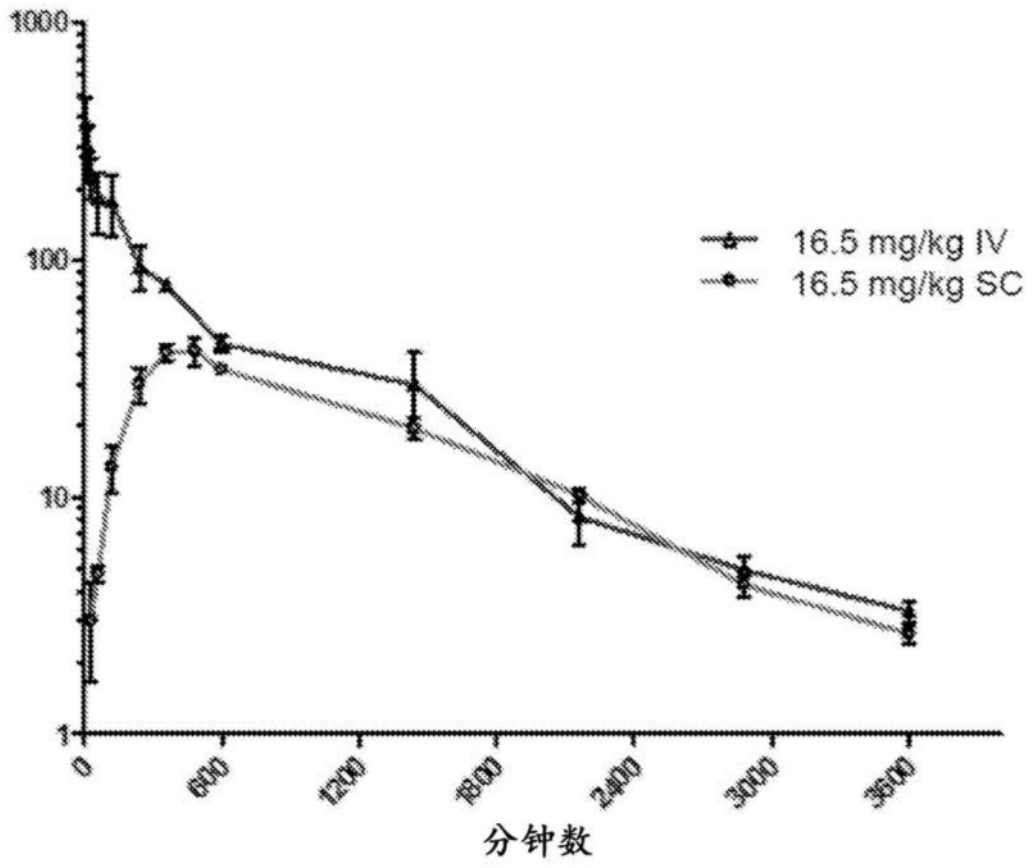


图38