

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 381**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2017 PCT/EP2017/082535**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018 WO18108971**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2017 E 17835461 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024 EP 3554532**

54 Título: **HBD2 para su uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias de los pulmones**

30 Prioridad:

13.12.2016 DK PA201670991

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2025

73 Titular/es:

**DEFENSIN THERAPEUTICS APS (100.00%)
c/o COBISole Maaloesvej 3
2200 København N, DK**

72 Inventor/es:

**NORDKILD, PETER y
KJÆRULFF, SØREN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 994 381 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

hBD2 para su uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias de los pulmones

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una defensiva seleccionada del grupo que consiste en hBD2 (SEQ ID NO: 2) y hBD2 truncada (SEQ ID NO:7), o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO.: 2) o hBD-2 truncada (SEQ ID NO.: 7), para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del asma, bronquiectasia, trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC) o enfisema, comprendiendo el método la administración oral o intrapulmonar de dicha defensiva.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El asma es un trastorno inflamatorio heterogéneo de las vías respiratorias caracterizado por inflamación crónica, hiperreactividad de las vías respiratorias, y por síntomas de sibilancias recurrentes, tos y dificultad para respirar. El asma es un problema principal de salud pública que afecta a 300 millones de personas a nivel mundial, y su prevalencia ha aumentado considerablemente durante las últimas tres décadas, en particular en el mundo occidental (Cosmi et al., 2011). Sin embargo, los mecanismos de la patogénesis siguen siendo difíciles. Los esteroides y la combinación de terapias con beta-agonistas de efecto prolongado son el fundamento de tratamiento del asma. Estas terapias suprimen efectivamente los síntomas agudos inflamatorios y la liberación de citoquinas, aunque no existen prevenciones o cura de la enfermedad hasta la fecha.

El asma alérgico, leve a moderado en general se caracteriza por la inflamación aguda o crónica de las vías respiratorias y consiste en linfocitos Th2 activados e infiltrados eosinofílicos en asociación con la producción de IgE, células secretoras de moco, hiperplasia y metaplasia, remodelación de la pared de las vías respiratorias y la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR). La AHR está caracterizada por la reactividad intensificada y la constricción de las vías respiratorias a estímulos espasmogénicos no específicos, tales como metacolina (Hansbro et al., 2011). Las células Th2, a través de la secreción de sus citoquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, entre otras, contribuyen a las diversas características patológicas de la enfermedad.

El asma refractario neutrofílico o esteroideo, grave tiene diferentes características patológicas para el asma alérgico leve o moderado y se caracteriza por un fenotipo Th2/Th1 mezclado con una contribución posible de células Th17. El factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (IFN)- γ , IL-17 y IL-27 son elevados y pueden inducir el influjo de neutrófilos (en lugar de eosinófilos) o un infiltrado granulocítico mezclado de las vías respiratorias que es característico para este subtipo de asma. Los pacientes con este subtipo de asma son refractarios al tratamiento con glucocorticoides y las infecciones tanto bacterianas como virales están implicadas en la inducción y progreso de la enfermedad (Hansbro et al., 2004). También, los pacientes asmáticos y los pacientes con dermatitis atópica tienen mayor probabilidad de desarrollar infecciones, por ejemplo, neumonía en comparación con los individuos no atópicos.

El concepto de tratar el asma mediante el enfocamiento de una citoquina individual, por ejemplo, anti-IL-4; anti-IL-5; anti-TNF- α tuvo un éxito limitado. De hecho, la terapia con esteroides, que actualmente es la terapia base, se piensa que actúa al suprimir una gama de trayectorias pro-inflamatorias (Hansbro et al, 2011).

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). La EPOC es un problema principal de salud pública proyectado para que sea la cuarta causa que conduzca a la muerte a nivel mundial en el 2020. Aunque la inhalación persistente de partículas y gases tóxicos son los principales factores de riesgo, con el fumar tabaco que será el mejor ejemplo de este tipo de riesgo, sólo el 15 % de los fumadores desarrollarán EPOC (Fletcher and Peto, 1977). Aunque los fumadores tienen un sistema inmunitario disfuncional (Bouloukaki et al., 2011), el desarrollo y aumentar la gravedad de la enfermedad de la EPOC progresivamente empeora la carga de células inflamatorias (Hogg et al., 2004).

Microbioma. La microbiota infantil inicialmente es uniforme a través de los diversos sitios del cuerpo, diferente en los días y semanas posteriores en las comunidades sitio-específicas. El microbioma pulmonar de adultos sanos está dominado por el *Phylae Bacteroidetes*, *Firmicutes*, y *Proteobacteria* con la microbiota central que consiste en *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Porphyromonas* (Charlson et al, 2011). Entre los asmáticos se ha observado una frecuencia aumentada de *Proteobacteria* (en particular, *Haemophilus*, *Moraxella* y *Neisseria*) y *Firmicutes* (en particular, *Lactobacillus spp.*) y la frecuencia disminuida de *Bacteroidetes* (en particular *Prevotella*) en comparación con los controles (Hilty et al., 2010). Similarmente, los datos epidemiológicos muestran que la microbiota intestinal difiere entre niños asmáticos y no asmáticos (Penders et al., 2007).

65 Defensinas

Las defensinas representan una de las defensas hospederas innatas dominantes que sirven para mantener un microbioma sano y rechazar patógenos potenciales (Wehkamp et al, 2002 y Salzman et al, 2007). Las defensinas son péptidos que poseen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas, hongos y archaea así como una actividad anti-inflamatoria. Las defensinas, y, en particular hBD2 han mostrado potencial terapéutico en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria del Intestino (WO 2010/007166; WO 2013/007596).

Se ha demostrado (Shen et al.) que la sobreexpresión de β -defensina 2 mediada por un vector lentiviral en ratas protegía los pulmones de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* al afectar a la expresión de citoquinas y reducir la inflamación inducida por *Pseudomonas aeruginosa*.

En conclusión, existe una necesidad por tratamientos novedosos de sujetos que padezcan de afecciones inflamatorias del pulmón. Existe una necesidad particular por tratamientos que se puedan administrar a través de las vías respiratorias para pacientes que ellos mismos se puedan administrar, por ejemplo, inhalar, los medicamentos, y existe una necesidad por un tratamiento vía otras rutas de administración a pacientes que sean incapaces de inhalar medicamentos eficientemente.

COMPENDIO

Los inventores han demostrado sorprendentemente que las defensinas de mamífero tienen la capacidad para reducir la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) y aumentar la compliancia de las vías respiratorias (Cdyn); reducir la inflamación pulmonar; reducir el conteo de neutrófilos-, eosinófilos- y macrófagos en el fluido para lavado bronquio-alveolar (BALF), así como disminuir los IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-13 en las células pulmonares. Los inventores también han demostrado la eficacia para reducir los parámetros de inflamación histológica en un modelo con asma, por ejemplo, una reducción en la inflamación perivascular y la inflamación peribronquial.

Los datos indican que la administración de las defensinas de mamíferos dan por resultado en la normalización o reducción de las características fundamentales del asma y EPOC y por lo tanto son útiles para el tratamiento o prevención de afecciones inflamatorias del pulmón incluyendo asma, asma intermitente leve, asma persistente leve, asma persistente moderada, asma persistente severa, asma eosinofílica, asma neutrofilica, asma refractaria esteroidea, estado asmático, bronquiectasia y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Sorprendentemente, se ha demostrado en un modelo de ratón con alergia a ácaros del polvo doméstico que la administración oral e intranasal de defensinas es igualmente eficaz al menos para algunos de los parámetros probados. Esto abre posibilidades para el tratamiento de las afecciones inflamatorias del pulmón mediante administración oral a sujetos que tengan dificultad para inhalar medicamentos. Como se demuestra en los ejemplos, una dosificación de la beta-defensina 2 humana (hBD-2) tiene la capacidad para reducir AHR, aumentando Cdyn, reducir la inflamación histológica del pulmón, el conteo de células inflamatorias en BALF y la producción de citoquinas inflamatorias en un modelo murino inmune a esteroides, donde los ratones se sensibilizaron ovoalbúmina (OVA) y se infectaron con *C. muridarum* y en un modelo murino sensible a esteroides, donde los ratones se inmunizaron mediante ácaros del polvo doméstico (HDM) + adyuvante de Freund y se inocularon con HDM. Sin el tratamiento de hBD-2, los animales desarrollaron asma caracterizado por AHR aumentado dramáticamente, Cdyn disminuido, cambios histológicos inflamatorios del tejido pulmonar, conteo aumentado de glóbulos blancos, en particular neutrófilos, eosinófilos y macrófagos y la concentración aumentada de citoquinas inflamatorias.

Los inventores han demostrado experimentalmente que las defensinas reequilibran el sistema inmunitario al normalizar completamente los niveles de citoquinas evitando así una tormenta de citoquinas contraria al tratamiento actual del asma con por ejemplo, anticuerpos de interleuquina, que inactiva a una citoquina determinada o una inmunosupresión que en general da por resultado en la supresión de sistemas inmunitarios innato. Por lo tanto, las defensinas representan una alternativa prometedora a los tratamientos actuales.

Los inventores han demostrado adicionalmente que las defensinas tienen la capacidad para ejercer su efecto en los pulmones, no sólo cuando se administra directamente en el pulmón sino que también de manera más importante y, sorprendentemente, cuando se administran únicamente de manera oral en el intestino.

La administración oral en el tratamiento de un ataque de asma, así como para el mantenimiento del tratamiento facilitará la vida de asmáticos alrededor del mundo.

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos. Las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En un aspecto, se proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en asma, tal como asma intermitente leve, asma persistente leve, asma persistente moderada, asma persistente grave, asma eosinofílica, asma neutrofílica, asma refractaria esteroidea, estado asmático, bronquiectasias, EPOC, y enfisema, preferiblemente, comprendiendo dicho método la administración de una defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente del mismo que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO.: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO.: 7), comprendiendo el método la administración oral o intrapulmonar de dicha defensina..

Los efectos pueden ser mediados reduciendo la inflamación histológica del pulmón, el conteo de células inflamatorias en el fluido para lavado broncoalveolar, reequilibrio del sistema inmunitario con la normalización de la producción de citoquinas inflamatorias en homogenados de tejido pulmonar y la prevención/tratamiento de una tormenta de citoquinas.

En otro aspecto, los efectos terapéuticos incluyen aumentar la compliancia pulmonar, reducir la hiperreactividad de las vías respiratorias, y aumentar el flujo espiratorio pico.

Otros efectos incluyen aumentar el volumen espiratorio forzado a 1 segundo (FEV1) y/o a la velocidad de flujo espiratorio pico PEFR, o reducir la variabilidad PEFR.

Mediante la administración de al menos una defensina a un sujeto, se puede aumentar la riqueza génica, el número de grupos, la producción de butirato y/o triptófano se puede aumentar y la producción de acetato a partir de la microbiota pulmonar se puede disminuir en un sujeto que necesite del mismo.

Los usos médicos pueden resultar en mantener y/o estabilizar una microbiota normal en el pulmón, aumentar la presencia y abundancia de bacterias comensales clave y un ácido graso de cadena corta y/o productores de butirato y/o triptófano.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Trazado esquemático del ajuste experimental para investigar los efectos de las β -defensinas de mamífero en un modelo murino inmune a esteroides de asma, donde los ratones se sensibilizaron mediante ovoalbúmina y se infectaron con *C. muridarum* (Essilfie et al., 2015).

Figura 2. Trazado esquemático del ajuste experimental para investigar los efectos de las β -defensinas de mamífero en un modelo murino inmune a esteroides de asma, donde los ratones se inmunizaron mediante mitos del polvo doméstico (HDM) + adyuvante de Freund y se inocularon con HDM.

Figura 3a. Alineación de secuencias múltiples Clustal W (2.1) de una beta defensina humana 1-4: En los alineamientos Clustal W:

* Indica las posiciones que tienen un solo residuo, totalmente conservado.

: indica que uno de los siguientes grupos "fuertes" está totalmente conservado:

- 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.

• indica que uno de los siguientes grupos "más débiles" está totalmente conservado:

- 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.

Figura 3b. Alineamiento Clustal de HD5 y HD6.

Figura 4: Hiperreactividad de las vías respiratorias en el modelo murino inmune a esteroides con Ovalbúmina/*C. muridarum* después de la administración intranasal de hBD-2. El eje Y muestra Rn - unidades de resistencia específica de las vías respiratorias (volumen corriente de 8 mL/kg a una frecuencia respiratoria de 450/respiraciones/minuto). **** indica las diferencias estadísticamente significativas utilizando la prueba Mann Whitney con un valor p de $p < 0.05$.

Figuras 5a y 5b: Hiperreactividad de las vías respiratorias en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal (Figura 5a) y oral (Figura 5b) de hBD-2 respectivamente. La solución salina es el control no inoculado. HDMA vehículo es el control inoculado de ácaros del polvo doméstico tratado con vehículo. "hBD2 IN 1.2 mpk" es hBD2 administrado intranasalmente a 1.2 mg/kg. 5 mpk es 5 mg/kg. Leyenda, Figura 5a: • - vehículo IN; ▪ - hBD2 IN 1.2 mpk; ▲ - solución salina; ◆ - hBD2 EN 5 mpk. Leyenda, Figura 5b: • - HDMA/vehículo IN; ▪ - solución salina; ▲ - HDM/dexametasona;

◆ - HDM/hBD2 1.2 mg/kg p.o.

Figura 6a y 6b: compliancia pulmonar en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal (figura 6a) y oral (figura 6b) de hBD-2, respectivamente.

5

Leyenda, Figura 6a : • - vehículo IN; ▪ - hBD2 IN 1.2 mpk; ▲ – solución salina; ◆ - hBD2 IN 5 mpk. Leyenda, Figura 6b : • - HDM/Vehículo IN; ▪ - solución salina; ▲ - HDM/dexametasona; ◆ - HDM/hBD2 1.2 mg/kg p.o. Figura 7 . Recuento total y diferencial de células en el líquido cefalorraquídeo del bebé en la Ovalbumina/C. Modelo murino de asma insensible a esteroides después de la administración intranasal de hBD-2.

10

Leyenda de la figura:

A: SPG/Sal

15

B: SPG/Ova

C SPG/Ova/Dex

D: Cmu/Sal

20

E: Cmu/Ova

F: Cmu/Ova/Dex

25

G: Cmu/Ova/hBD2

H: Cmu/Ova/hBD2/Dex

30

Grupos de tratamiento

	D0	D12+13	D14	D32	D33+34
SPG/Sal	Sal IP	Ova IN	SPG IN	PBS IN	Ova IN
Cmu/Sal	Sal IP	Ova IN	Cmu IN	PBS IN	Ova IN
SPG/Ova	Ova IP	Ova IN	SPG IN	PBS IN	Ova IN
Cmu/Ova	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	PBS IN	Ova IN
SPG/Ova/Dex	Ova IP	Ova IN	SPG In	Dex IN	Ova+Dex IN
Cmu/Ova/Dex	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	Dex IN	Ova+Dex IN
Cmu/Ova/hBD-2	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	hBD2 IN	Ova+hBD2 IN
Cmu/Ova/hBD-2/Dex	Ova IP	Ova IN	Cmu IN	hBD2+Dex IN	Ova+hBD2+Dex IN

Figuras 8a y 8b: Conteo celular total y diferencial en BALF en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal y oral de hBD-2, respectivamente. La Figura 8a representan los animales tratados con hBD2 per-oral. La Figura 8b representan los resultados provenientes de animales que recibieron hBD2 intranasal. Los resultados se muestran como la media +/- SEM. *p<0.05 contra vehículo, prueba no independiente.

35

Leyenda de la figura. Solución salina IN en el control no inoculado y no tratado. HDM/vehículo representa los animales no tratados pero inoculados con HDM. HDM son los animales inoculados con ácaros del polvo doméstico. PO es la administración oral per-oral e IN es la administración intranasal. Las columnas marcadas * son estadísticamente significativas diferentes del control tratado con el vehículo.

40

Figuras 9-18. Concentraciones de citoquinas de IFN- γ (Figura 9), TNF- α (Figura 10), IL-1 β (Figura 11), IL-4 (Figura 12), IL-5 (Figura 13), IL-6 (Figura 14), IL-8 (Figura 15), IL-9 (Figura 16), IL-10 (Figura 17) e IL-13 (Figura 18) en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal y oral de hBD-2, respectivamente. Cada figura tiene los datos provenientes de la ramificación intranasal a la izquierda y la ramificación per-oral a la derecha. Los resultados se muestran en pg/mL como la media +/- SEM. *p<0.05 contra vehículo, prueba de Mann Whitney.

45

- Figura 19. Histología pulmonar con la preparación de H&E/PAS en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal y oral de hBD-2, respectivamente. Panel izquierdo superior: control no tratado y no inoculado. Panel a la derecha superior: control no tratado e inoculado con HDM. Panel izquierdo inferior: inoculado con HDM tratado con hBD2 PO. Panel derecho inferior: inoculado con HDM tratado con hBD2 IN. Aumento de 50X.
- Figura 20. Gravedad de la inflamación pulmonar en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal y oral de hBD-2, respectivamente.
- * p <0.05 contra vehículo, Prueba de Mann Whitney
- #p <0.05 contra vehículo, Prueba de Clasificación de Wilcoxon.
- Figura 21. Inflamación perivascular y peribronquial en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal y oral de hBD-2 respectivamente ◆ eosinófilos; □ monocitos.
- * p <0.05 contra vehículo para la infiltración perivascular de eosinófilos, prueba de Mann Whitney
- #p <0.05 contra vehículo para la infiltración perivascular/peribronquial de eosinófilos y monocitos, Prueba de Clasificación de Wilcoxon.
- Figura 22. Datos farmacocinéticos después de la administración oral de 4 mg/kg hBD-2 a ratones hembra NMRI. El eje Y muestra hBD2 en µg/g de tejido. Los resultados se obtienen como la media grupal +/- SEM.
- Figura 23 (para ilustración). Datos farmacocinéticos para hBD-2 después de la administración subcutánea e intravenosa de 1 mg/kg respectivamente. El eje Y muestra hBD2 en µg/ml. Las diferentes curvas representan los diferentes experimentos y métodos de detección (HPLC y ELISA).
- Figura 24 (para ilustración). Datos farmacocinéticos para la "fusión N-terminal con hBD-2-albúmina" después de la administración subcutánea e intravenosa de 16.5 mg/kg respectivamente. El eje Y muestra la concentración de la proteína de fusión en µg/ ml. Los resultados son la media de 4 ratones/tiempo de muestreo +/- SD.
- Figura 25 (para ilustración). Datos farmacocinéticos para la "fusión C-terminal con hBD-2-albúmina" después de la administración subcutánea e intravenosa de 16.5 mg/kg respectivamente. El eje Y muestra la concentración de la proteína de fusión en µg/ml. Los resultados son la media de 4 ratones/tiempo de muestreo +/- SD.
- Figura 26 (para ilustración). Progreso de la Marca del Índice de Actividad de la Enfermedad durante el estudio con la administración IV de la "C-terminal de fusión con hBD-2-albúmina". Los resultados se muestran como la media +/- el error estándar de la media para 9-10 animales por grupo. Las diferencias significativas a partir de los valores del grupo control (vehículo) a unos datos determinados se muestran como * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Albucult® es una albúmina recombinante disponible de Novozymes A/S. donde no se menciona ningún compuesto en la gráfica, el compuesto es C-terminal de fusión con hBD2-albúmina.
- Figura 27 (para ilustración). Colon proximal con marca histológica de la "C-terminal de fusión con hBD-2-albúmina". La marca histológica de muestras de colon proximal. Los resultados se muestran como la media ± el error estándar de la media para n = 9-10 animales por grupo. Las diferencias significativas a partir de los valores del grupo control (vehículo) a un dato determinado se muestran como *** P <0.001; * P <0.05 (Prueba Kruskal-Wallis + Prueba posterior de Dunn para datos no paramétricos). Albucult® es una albúmina recombinante disponible de Novozymes A/S. donde no se mencione ningún compuesto en la gráfica, el compuesto es C-terminal de fusión con hBD2-albúmina.
- Figura 28. Trazado esquemático del ajuste experimental para investigar los efectos de las defensinas de mamífero en un modelo murino sensible a esteroides para la prevención de asma, donde los ratones se inmunizaron mediante el ácaro de polvo doméstico (HDM) + adyuvante de Freund y se inocularon con HDM.
- Figura 29: Hiperreactividad de las vías respiratorias en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal y oral profiláctica de hBD-2, respectivamente.
- Figura 30: Compliancia pulmonar en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración intranasal y oral profiláctica de hBD-2, respectivamente.

Figura 31: Conteo celular de neutrófilos en BALF en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración oral profiláctica de hBD-2. * P <0.05 contra vehículo, prueba de Mann Whitney.

5

Figuras 32-37. Concentraciones de citoquinas (pg/ml) de TNF- α (Figura 32), IL-4 (Figura 33), IL-5 (Figura 34), IL-6 (Figura 35), IL-9 (Figura 36) y IL-13 (Figura 37) en un homogenado de pulmón en el modelo murino con asma sensible a esteroides por ácaros del polvo doméstico después de la administración oral profiláctica de hBD-2. Los resultados se muestran como la media +/- SEM. * p<0.05 contra vehículo, prueba de Mann Whitney.

10

Figuras 38-39. Trazado esquemático del ajuste experimental para investigar los efectos de las defensinas de mamífero (HD5, hBD2 y HD5 + hBD2) sobre la composición de la microbiota en un modelo murino con dieta alta en grasas.

Figura 40. Análisis de género de la abundancia microbiana después del tratamiento profiláctico con HD5, hBD2 y HD5 + hBD2 orales en un modelo murino con dieta alta en grasas.

Figura 41. Abundancia de *Allobaculum* en el intestino delgado después del tratamiento profiláctico con HD5 y hBD2 orales en un modelo murino con dieta alta en grasas.

20

Figura 42. Abundancia de *Lactobacillaceae* en el colon después del tratamiento profiláctico con hBD2 oral en un modelo murino alta en grasa.

Figura 43. Abundancia relativa de *Barnesiella* en el colon después de 4 (panel izquierdo) y 10 semanas (panel derecho) de tratamiento profiláctico con hBD2 oral en un modelo murino con dieta alta en grasas.

25

Figura 44. Abundancia relativa de *Alloprevotella* en el colon después de la intervención terapéutica con HD5 y hBD2 orales en un modelo murino con dieta alta en grasas.

Figura 45. Abundancia relativa de *Bifidobacteriaceae* en el intestino delgado (panel izquierdo) y colon (panel derecho) después de la intervención terapéutica con HD5 o hBD2 en un modelo murino con dieta alta en grasas.

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35

Definiciones:

Defensina: El término “defensina” en el sentido como se utiliza en la presente, se refiere a polipéptidos que pertenecen a la clase de defensinas de péptidos antimicrobianos. Las defensinas representan una de las defensas dominantes innatas del hospedero que sirven para mantener un microbioma sano y rechazar patógenos potenciales (Wehkamp et al. et al., 2002 y Salzman et al., 2007). Las defensinas son péptidos que poseen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas, hongos y archaea, así como ejercer una actividad anti-inflamatoria.

40

Las defensinas humanas son pequeños péptidos catiónicos divididos en α - y β -defensinas con base en la topología de sus tres enlaces disulfuro de cisteína intramoleculares, las α -defensinas se pueden subdividir adicionalmente en aquellas expresadas en gránulos neutrofilicos (HNP1-4) y aquellas expresadas por células Paneth en las criptas en el intestino delgado (HD5 y HD6 o DEFA5 y DEFA6). Las β -defensinas (DEFBn) se producen principalmente por células epiteliales en diversos tejidos y órganos, entre los que se incluyen la piel, ojo, oído medio, boca, tráquea, pulmones, tracto gastrointestinal, sistema urogenital, riñones, vagina, hígado, páncreas y glándulas mamarias. Los ejemplos de defensinas incluyen la alfa defensina 5 intestinal humana (HD5; SEQ ID NO: 5); la alfa defensina 6 intestinal humana (HD6; SEQ ID NO: 6); el péptido 1 de neutrófilos humanos (HNP-1); el péptido 2 de neutrófilos humanos (HNP-2); el péptido 3 de neutrófilos humanos (HNP-3), todos pertenecen a la clase de alfa defensina; y también la beta defensina 1 humana (hBD1; SEQ ID NO: 1); la beta defensina 2 humana (hBD2; SEQ ID NO: 2); la beta defensina 3 humana (hBD3; SEQ ID NO: 3); la beta defensina 4 humana (hBD4; SEQ ID NO: 4); y la beta defensina 2 humano truncada (SEQ ID NO: 7). La WO 2013/026794 documenta que la hBD2 truncada y la hBD2 no truncada tienen la misma bioactividad.

50

55

Las defensinas se expresan como precursores y se procesan mediante la segmentación del péptido señal y en algunos casos los pro-péptidos, así como antes de la secreción en el espacio extracelular. Los miembros mejor caracterizados de la familia de β -defensinas humanas son hBD1-4. Algunas de las defensinas humanas por ejemplo la hBD-1 se producen constitutivamente, mientras que otras, por ejemplo, hBD-2, hBD-3 y hBD-4 se inducen mediante citoquinas pro-inflamatorias o productos microbianos exógenos. Las secuencias identificadas anteriormente representan las defensinas bioactivas maduras predichas. Se debe entender por alguien con experiencia en la técnica que el procesamiento puede diferir de célula a célula y que el péptido maduro secretado resultante puede diferir en uno o dos aminoácidos N- o C-terminales a partir de las

65

secuencias predichas y todavía conservan la bioactividad.

Identidad: el parentesco entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad". El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se implementan en el programa Needle del paquete EMBOSS (Rice et al., 2000, <http://emboss.org>), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son la penalización de espacios abiertos de 10, la penalización de extensión de espacios de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). La salida de Needle marcada "identidad más larga" (obtenida utilizando la -opción no breve) se utiliza como la identidad porcentual y se calcula como sigue: (residuos idénticos x 100)/(Longitud de Alineamiento - Número total de espacios en el alineamiento).

Microbiota normal: El término "microbiota normal" se utiliza en la presente para indicar una microbiota que no sea disbiótica. La microbiota normal está caracterizada por tener gran riqueza génica. La microbiota intestinal normal está caracterizada por comprender bacterias que pertenecen a los géneros *Bacteroidetes*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Blautia*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Bifidobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Lactobacillus*, *Coprococcus*, *Clostridium*, *Akkermansia*, *Eubacterium*.

La microbiota normal del pulmón está caracterizada por comprender bacterias que pertenecen a los géneros *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, y *Proteobacteria* con la microbiota central que consiste en *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Neisseria* and *Porphyromonas*.

Tratamiento: Los términos "tratamiento" y "tratar" en el sentido como se utilizan en la presente, se refieren al manejo y cuidado de un paciente con el fin de combatir una afección, enfermedad o trastorno. El término está destinado para incluir el espectro total de tratamientos para una afección determinada que el paciente esté padeciendo, tal como la administración del compuesto activo con el fin de: aliviar o ayudar con los síntomas o complicaciones; retrasar la progresión de la afección, enfermedad o trastorno; curar o eliminar la afección, enfermedad o trastorno; y/o evitar la afección, enfermedad o trastorno, mientras que "prevenir" o "prevención" se debe entender que hace referencia al manejo y cuidado de un paciente con el fin de impedir, reducir los compuestos activos para evitar o reducir el riesgo de la aparición de síntomas o complicaciones. El paciente que será tratado preferiblemente un mamífero, en particular un ser humano. Los pacientes que serán tratados pueden ser de diversas edades.

Paciente: un paciente es un sujeto, al que se le puede haber diagnosticado con un trastorno particular tal como un trastorno inflamatorio de los pulmones o que padece de síntomas particulares indicativos de un trastorno, tales como un trastorno inflamatorio de los pulmones.

Defensinas alfa de mamíferos y defensinas beta de mamíferos

Esta divulgación se refiere a una defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7). para su uso en el tratamiento del asma, asma intermitente leve, asma persistente leve, asma persistente moderada, asma persistente grave, asma eosinofílica, asma neutrofílica, asma refractaria a esteroides, estado asmático, bronquiectasia y EPOC, en donde la defensina se administra por vía oral o intrapulmonar.

En otra realización, una defensina difiere de una de las SEQ ID NO: 2 o 7 en menos de 5, tal como menos de 4, por ejemplo menos de 3, tal como menos de 2 aminoácidos. En una realización preferida, las defensinas beta de mamíferos consisten en la beta defensina 2 humana (SEQ ID NO: 2), o la beta defensina 2 humana truncada (SEQ ID NO: 7).

En una realización preferida, las defensinas beta humanas consisten en la beta defensina 2 humana (SEQ ID NO: 2) o la beta defensina 2 humana truncada (SEQ ID NO: 7).

Más preferiblemente, las defensinas beta de mamíferos consisten en la beta defensina 2 humana, y las variantes u ortólogos funcionalmente equivalentes de las mismas que difieren en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 (SEQ ID NO: 7)..

En una realización, los métodos para el tratamiento y/o prevención del asma, bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o enfisema comprenden la administración oral o intrapulmonar de una cantidad efectiva de al menos una defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

Una "variante funcionalmente equivalente" de una defensinas alfa o beta de mamífero (por ejemplo, un ser

humano) es una alfa o beta defensina de mamífero modificada (por ejemplo, humana) que exhiba aproximativamente el mismo efecto sobre la microbiota en el pulmón o el intestino al igual que las defensinas alfa y/o beta de mamífero parentales (por ejemplo, un ser humano). Una variante funcionalmente equivalente de una defensina de mamífero (por ejemplo, humana) puede comprender preferiblemente 1-4 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente 1-3 modificaciones de aminoácidos, lo más preferiblemente 1-2 modificaciones de aminoácidos, y en particular una modificación de aminoácidos, con beta defensina 2 humano, que tiene la SEQ ID NO 2 o la beta defensina 2 humana truncada (SEQ ID NO: 7).

El término "modificación" significa en la presente cualquier modificación química de una defensina de mamífero (por ejemplo, humana). Las modificaciones pueden ser sustituciones, supresiones y/o inserciones de los aminoácidos, así como reemplazos de las cadenas laterales de aminoácidos; o el uso de aminoácidos no naturales con características similares en la secuencia de aminoácidos. En particular, las modificaciones pueden ser amidaciones, tales como la amidación del término C. Preferiblemente, las modificaciones de aminoácidos son de una naturaleza menor, es decir las sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadores que no afecten significativamente al plegado y/o actividad del polipéptido; supresiones individuales; pequeñas extensiones amino o carboxilo-terminales; o una pequeña extensión que facilite la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como una marca de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión. En una realización, la pequeña extensión, tal como una marca de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión se une a defensina para su uso según la reivindicación 1 a través de un péptido enlazante de hasta aproximadamente 20-25 residuos y el enlazante puede contener un sitio para segmentación enzimática por restricción.

Los alineamientos Clustal W en la Figura 3 se puede utilizar para predecir cuáles residuos de aminoácidos se pueden sustituir sin afectar sustancialmente la actividad biológica de la proteína. Las secuencias se alinearon utilizando Clustal W 2.1 (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) y los siguientes ajustes: Penalización de Espacios Abiertos: 10, penalización de Extensión de Espacios: 0.05, Transición de Peso: NO, Residuos Hidrofílicos para Proteínas: GPSNDQE, Espacios Hidrofílicos: SÍ, Matriz de Peso: BLOSUM (para la PROTEÍNA). Las sustituciones dentro del siguiente grupo (Clustal W, grupo de conservación "fuerte") se deben considerar como sustituciones conservadoras:

-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.

Las sustituciones dentro del siguiente grupo (Clustal W, grupo de conservación "débil") se deberán considerar como sustituciones semi-conservadoras: -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.

Los ejemplos de sustituciones conservadoras son sustituciones hechas dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y pequeños aminoácidos (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que en general no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por Neurath and Hill (1979). Los intercambios que se presentan más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gli, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gli, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Ala, Ala/Glu, y Asp/Gli.

Además de los 20 aminoácidos estándar, los aminoácidos no estándar (tales como, 4-hidroxi prolina, 6-N-metilisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina, y alfa-metilserina) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido tipo silvestre. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, los aminoácidos que no están codificados por el código genético, y los aminoácidos no naturales se pueden sustituir por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales", se han modificado después de la síntesis de proteínas, y/o tienen una estructura química en sus cadenas laterales diferente de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales se pueden sintetizar químicamente y preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido pipercolico, ácido tiazolidincarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.

Los aminoácidos esenciales en una alfa y/o beta defensina de mamífero se pueden identificar según los procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis sitio-dirigida o mutagénesis de exploración con alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para actividad biológica (es decir, la actividad contra la hiperreactividad de las vías respiratorias o las citoquinas de supresión por ejemplo, la actividad de TNF-alfa) para identificar los residuos de aminoácidos que sean decisivos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. Las identidades de aminoácidos esenciales también se pueden deducir a partir de análisis de identidades con polipéptidos que estén relacionados con las defensinas alfa y/o beta de mamífero (véase el alineamiento Clustal W en la Figura 3).

Las sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples se pueden realizar y probar utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o recombinación al azar, seguida por un procedimiento relevante de selección, tales como aquellos descritos por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; la WO 95/17413; o la WO 95/22625. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen PCR propensa a errores, exhibición de fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; Patente de los US No. 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis región dirigida (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46:145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7:127). Cuando el resultado de una sustitución determinada no se pueda predecir con certeza, los derivados se pueden ensayar fácilmente según los métodos descritos en la presente en lo anterior para determinar la presencia o ausencia de actividad biológica.

Defensinas de acción prolongada

La vida media de α -defensina para su uso según la reivindicación 1 se puede extender al fusionar o conjugar la β -defensina con otra porción o molécula es decir, construir una α - o β -defensina biológicamente activa de acción prolongada vinculada a una farmacéuticamente aceptable que proporcione una vida media en plasma *in vivo* de la β -defensina, que se aumenta sustancialmente en comparación con la vida media en plasma *in vivo* de la β -defensina no conjugada administrada de la misma forma que la β -defensina conjugada.

Una defensina biológicamente activa de acción prolongada para su uso según la reivindicación 1 puede estar vinculada a una molécula farmacéuticamente aceptable seleccionada de una molécula que tenga una unión al receptor Fc neonatal (FcRn), transferrina, albúmina (HAS), XTEN® o PEG, un polímero de homo-aminoácido (HAP), un polímero de prolina-alanina-serina (PAS), o un péptido similar a elastina (ELP), ácido hialurónico, un péptido bastante sialilado cargado negativa tal como el péptido carboxi-terminal (CTP) de la cadena β de gonadotropina coriónica (CG), IgG humana, y CH3 (CH₂)_nCO- en donde n es de 8 a 22.

Las defensinas para su uso según la reivindicación pueden estar vinculadas a la molécula farmacéuticamente aceptable en diversas formas como se describe en la bibliografía de la técnica anterior, tal como sin limitación un acoplamiento químico a través de un enlazante bifuncional, al acoplar la N-terminal o la C-terminal de las defensinas para su uso según la reivindicación 1 a la molécula farmacéuticamente aceptable, tal como albúmina o un análogo de albúmina. En particular, la N-terminal de la albúmina o un análogo de albúmina, por ejemplo, la albúmina humana, se pueden acoplar a la C-terminal de una α -defensina para uso según la reivindicación 1, o la N-terminal de una defensina de la reivindicación 1; o la C-terminal de albúmina, por ejemplo, la albúmina humana, se puede acoplar a la C-terminal de una α -defensina para su uso según la reivindicación 1, o la N-terminal de α - o β -defensina. Una secuencia enlazante se puede insertar entre la albúmina y la cadena de α -defensina para su uso según la reivindicación 1.

La defensina para su uso según la reivindicación 1 puede estar enlazado a la molécula farmacéuticamente aceptable a través de un enlazante estable o un enlazante más lábil. Se conocen en la técnica diversos enlazantes, entre los que se incluyen moléculas PEG bifuncionales (por ejemplo, véase, Paige *et al.*, *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 12, 1995), enlazantes hidrolizables (Shechter *et al.* *Bioconjugate Chem.* 2005, 16: 913-920 y *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, Vol. 13, Nos. 1-2, Junio de 2007 y W02009095479), PDPH y EMCH véase ejemplo, en la W02010092135. En el caso especial donde la conjugación química (enlazamiento de dos o más moléculas) de la defensina, a la molécula farmacéuticamente aceptable, reduce fuertemente la actividad funcional de la defensina, se puede preferir utilizar un enlazante más lábil que pueda liberar el agonista funcional de defensina para su uso en la reivindicación 1.

La extensión de la vida media también se puede llevar a cabo a través de la acilación de la estructura del péptido con un separador, por ejemplo, un separador de γ -L-glutamilo y una cadena de di-ácido graso de C-18 a lisina. La cadena del sitio di-ácido y el separador media una unión fuerte aunque reversible a albúmina, disminuyen la liberación del sitio de inyección y reducen el aclaramiento renal.

Métodos y Usos

Se encontró que la beta defensina 2 humana será capaz de reducir las hiperreactividad de las vías respiratorias; aumentar la compliancia pulmonar; reducir la inflamación pulmonar; reducir el conteo de neutrófilos BALF, eosinófilos y macrófagos, así como reequilibrar el sistema inmunitario con la normalización de las concentraciones de IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-13 evitando una tormenta de citoquinas; mostrando con esto una potente actividad al igual que un medicamento para la prevención o tratamiento de afecciones inflamatorias de los pulmones, tales como asma y EPOC.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la administración oral de las defensinas es efectiva para tratar afecciones inflamatorias del pulmón. Esto es inesperado, ya que se sabe que hBD2 no se absorbe desde del intestino, como se demuestra en el Ejemplo 4 de la actual descripción. Una ventaja de esta observación es que los pacientes con capacidad comprometida de la respiración pueden tomar su medicamento de defensina oralmente. También se espera que los pacientes enfermos gravemente, tales como los pacientes en

ventiladores médicos y los pacientes en estado asmático se pueden tratar mediante la administración parenteral de al menos una defensina.

5 Preferiblemente, la administración es oral. La administración oral es ventajosa para pacientes con respiración comprometida o pacientes que estén experimentando ventilación médica.

10 En otro aspecto, se proporcionan los métodos para el tratamiento de asma, tal como asma intermitente leve, asma persistente leve, asma persistente moderada, asma persistente grave, asma eosinofílica, asma neutrofílica, asma refractaria esteroidea, estado asmático, , bronquiectasia, o EPOC, , al administrar una cantidad efectiva de una defensina seleccionada del grupo que consiste en hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) a un sujeto que necesite dicho tratamiento mediante la administración intrapulmonar o la administración oral..

15 Los métodos proporcionados pueden tratar o prevenir asma, bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o enfisema al reducir la migración de glóbulos blanco, por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos en BALF. La administración de hBD2 ha probado que será efectiva para reducción en particular los neutrófilos y macrófagos en BALF. Los usos según la reivindicación 1 también reequilibran el sistema inmunitario, normalizando la producción de citoquinas de por ejemplo, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, 20 IL-8, IL-9, IL-10 e IL-13 en un homogenado de tejido pulmonar evitando o tratando con esto una tormenta de citoquinas en un sujeto afectado por una de dichas afecciones de la reivindicación 1 como se describe en la presente. Preferiblemente, los usos resultan en una producción reducida de citoquinas en donde la citoquina es el IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 o IL-13. En particular, los métodos pueden reducir la cantidad de IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. La cantidad de citoquinas se puede determinar en una biopsia de pulmón 25 o en BALF.

Además, los usos según la reivindicación 1 pueden reducir la hiperreactividad de las vías respiratorias y aumentar la compliancia pulmonar en un sujeto afectado por una asma, bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o enfisema como se describe en la presente.

30 Los usos según la reivindicación 1 proporcionados pueden tratar o prevenir la inflamación pulmonar al cambiar los fenotipos bacterianos a través de un cambio en el nivel transcripcional así como la estructura y composición de la flora bacteriana de los pulmones o el metaboloma pulmonar de un sujeto afectado por una de las afecciones como se describe en la presente.

35 Sin estar limitados por la teoría, los efectos observados utilizando la administración oral se pueden atribuir a un cambio en la microflora intestinal y el metaboloma intestinal que pueden tener un efecto sobre los pulmones a través del denominado eje intestino-pulmón.

40 Los trastornos crónicos del pulmón tales como asma, EPOC y fibrosis quística todos exhiben un componente de manifestación de enfermedad intestinal que indica que existe una diafonía vital entre estos dos sitios mucosos del cuerpo humano y una variedad de enfermedades respiratorias se han asociado con una disbiosis no sólo de la microbiota de las vías respiratorias sino que también de la microbiota intestinal (Marsland et al, 2015). El parto por cesárea reduce la diversidad y altera la composición de la microbiota intestinal al principio 45 de la vida y está vinculado al mismo tiempo a una predisposición hacia el asma durante la niñez (Jakobsson et al, 2014). Se ha encontrado que la exposición en los primeros años a microorganismos ambientales será protector contra el asma (Ege et al, 2011), mientras que la exposición a antibióticos en los primeros años así como antes del nacimiento aumenta el riesgo de asma alérgica (Marra et al 2009). La relación inversa entre infecciones de la niñez y el desarrollo de asma y alergias se ha reconocido durante años, originado la "hipótesis de higiene"; de que una disminución de exposiciones infecciosas temprana en la vida da por resultado en una tolerancia trastornada y una patología autoinmune aumentada (Herencia-Karp et al, 2001). Una hipótesis complementaria es que las perturbaciones en la composición de la microbiota gastrointestinal debidas al uso 50 de antibióticos y a una dieta deficiente (baja en fibras, alta en azúcares) en las zonas occidentalizadas han interrumpido los mecanismos mediados de la microbioma gastrointestinales de la tolerancia de las mucosas.

55 Los microbios comensales calibrar las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas e impactan los umbrales de activación para estimulaciones patógenos, en gran medida al producir pequeñas moléculas que median las interacciones microbianas del hospedero (Donia and Fishback, 2015). Mientras que la barrera epitelial asegura que los microorganismos se confinen en gran medida al intestino, los metabolitos microbianos pueden penetrar 60 la barrera epitelial, permitiendo que entren y se acumulen en el sistema circulatorio del hospedero donde se detectan por las células inmunitarias (Dorrestein et al., 2014). Trompette et al., 2013 demostraron en ratones que las fibras fermentables en la dieta cargaron la composición no sólo del intestino, sino que también la microbiota pulmonar, en particular, la proporción de *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, lo último conduciendo a niveles aumentados locales y sistémicos de Ácidos Grasos de Cadena Corta, los cuales a su vez influyen en la hematopoyesis de Células Dendríticas y la funcionalidad conformando así el entorno inmunológico en el 65 pulmón e influyendo en la gravedad de la inflamación alérgica. Schirmer et al., demostraron Human Functiona

Genomics Project que la variación interindividual en la respuesta a citoquinas está vinculada a organismos microbianos específicos, así como las funciones microbianas. La mayoría de las asociaciones detectadas fueron tanto las citoquinas como el estímulo específico, lo que sugiere que el sistema inmunitario reconoce e interactúa con los organismos microbianos y los productos con alta especificidad y que estos factores microbianos están asociados con un fenotipo inmunológico particular. La capacidad de producción de TNF- α e IFN- γ parece ser estar influido en mayor medida por el microbioma, mientras que otras citoquinas tales como IL-1 β , IL-6 y Th17, IL-17 e IL-22 derivados exhibieron menos asociaciones, aunque más específicas con la microbiota intestinal.

Un aspecto adicional proporciona los métodos para la prevención o tratamiento de asma, tal como asma intermitente leve, asma persistente leve, asma persistente moderada, asma persistente grave, asma eosinofílica, asma neutrofílica, asma refractaria esteroidea, estado asmático, bronquiectasia, EPOC mediante la administración de una cantidad efectiva de α -defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) a un sujeto que necesite de este tratamiento, comprendiendo el método la administración oral o intrapulmonar de dicha defensina. En una realización preferida, el asma es asma refractario de esteroides. En una realización, la administración es oral, bucal, sublingual, intratraqueal, intrapulmonar, o intranasal. Preferiblemente, la administración es oral o intrapulmonar. La administración oral puede ser ventajosa para pacientes con respiración comprometida o que estén experimentando ventilación médica.

Los métodos de tratamiento descritos en la presente se pueden tratar mediante la administración de una composición que comprende al menos una defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) en combinación con ya sea glucocorticoides, beta-agonistas, antagonistas del receptor de leucotrienos, teofilina, antibióticos, rifaximina, quimio o inmunoterapia, inmunosupresores, prebióticos, probióticos, triptófano, ácidos grasos de cadena corta, HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4, catelicidina, lactoferrina, lactoferricina, lisozima, trasplantes fecales o una combinación de éstos. Las defensinas para su uso en la reivindicación 1 se pueden utilizar para aliviar uno o más síntomas de los antibióticos, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, o terapia inmunosupresora. Las defensinas para su uso según la reivindicación 1 se pueden administrar por separado o junto con una o más de estas terapias. Las defensinas para su uso según la reivindicación 1 también se pueden administrar junto con otros medicamentos que se pueden utilizar para tratar asma. Dentro de los usos de la reivindicación los métodos descritos se pueden utilizar para el tratamiento, prevención o normalización de una microbiota disbiótica/metaboloma en el pulmón de un sujeto que haya experimentado o esté experimentando un tratamiento con antibióticos o quimioterapia o inmunoterapia o una terapia inmunosupresora o una terapia por radiación, u otro tratamiento que tenga efectos negativos sobre el pulmón o la microbiota intestinal. La normalización de la microbiota en el pulmón puede incluir estimular la población de bacterias pulmonares que pertenecen a los géneros *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, y *Proteobacteria* con la microbiota central que consiste en *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Porphyromonas*.

La normalización de la microbiota pulmonar también puede implicar cambiar el metaboloma a uno que produzca relativamente más triptófano y/o butirato y relativamente menos acetato.

El sujeto que será tratado puede tener síntomas asmáticos <2 veces a la semana, tal como síntomas diarios, tal como síntomas continuos.

El sujeto que será tratado puede tener ataques asmáticos de intensidad variable, tales como ataques que afecten la actividad, tales como ataques que limiten la actividad física, y/o síntomas asmáticos en la noche >2 veces al mes, tales como >2 veces a la semana que duran por días, tales como síntomas nocturnos frecuentes.

En una realización, el sujeto que será tratado tiene un volumen espiratorio forzado a 1 segundo (FEV1) <80 %, tal como una FEV1 del 60-80 %, tal como un FEV1 <60 % del valor predicho.

Además, el sujeto puede tener una velocidad de flujo espiratorio pico PEFR con una variabilidad de >20 %, tal como una variabilidad PEFR del 20-30 %, tal como una variabilidad PEFR >30 %, tal como una variabilidad PEFR >60 %.

El sujeto que necesita del tratamiento proporcionado por los métodos descritos puede presentar uno o más de los siguientes síntomas antes del tratamiento:

Intermitente leve:

- síntomas <2 veces a la semana
- asintomático y velocidad de flujo pico normal (PEFR) entre ataques

- los ataques son breves con intensidad variable
- síntomas nocturnos <2 veces en un mes
- 5 - flujo espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) o PEFr >80 % de predicción
- variabilidad PEFr <20 %

10 Persistente leve:

- síntomas >2 veces a la semana, aunque <1 vez al día
- las exacerbaciones pueden afectar la actividad
- 15 - síntomas nocturnos > 2 veces en un mes
- FEV1 >80 % de lo predicho
- 20 - variabilidad PEFr entre el 20 % y el 30 %

Persistente moderada:

- síntomas diarios
- 25 - uso de beta agonistas de acción rápida diariamente
- los ataques afecta la actividad
- 30 - exacerbaciones >2 veces a la semana y pueden durar por días
- síntomas nocturnos >1 vez a la semana
- FEV1 mayor del 60 % pero menor del 80 % de lo predicho
- 35 - variabilidad PEFr >30 %

Persistente severo:

- 40 - síntomas continuos
- actividad física limitada
- exacerbaciones frecuentes
- 45 - síntomas nocturnos frecuentes
- FEV1 <60 % de lo predicho
- 50 - variabilidad PEF >60 %

En una realización, el tratamiento da por resultado en una mejora de al menos un síntoma de tal forma que un sujeto tratado cambie de persistente severo a persistente moderado, persistente leve, a intermitente leve. El tratamiento puede dar por resultado en una mejora de los síntomas para que un sujeto tratado cambie de persistente moderado, a persistente leve, o intermitente leve, o de persistente leve a intermitente leve.

Síntesis *in vitro*

Las defensinas para su uso según la reivindicación 1 se pueden preparar mediante síntesis *in vitro*, utilizando métodos convencionales como se sabe en la técnica. Están disponibles diversos aparatos sintéticos comerciales, por ejemplo los sintetizadores automatizados de Applied Biosystems Inc., Beckman, etc. al utilizar sintetizadores, los aminoácidos de origen natural se pueden sustituir con aminoácidos no naturales, en particular de isómeros D (o formas D), por ejemplo D-alanina y D-isoleucina, diastereoisómeros, cadenas laterales que tienen diferentes longitudes o funcionalidades, similares. La secuencia particular y forma de preparación se determinarán por conveniencia, economía, pureza requerida, similares. El enlazamiento químico se puede proporcionar a diversos péptidos o proteínas que comprenden funcionalidades convenientes

para unión, tales como los grupos amino para la formación de amidas o aminas sustituidas, por ejemplo, aminación reductiva, grupos tiol para la formación de tioéter o disulfuro, grupos carboxilo para la formación de amidas, similares. Si se desea, se pueden introducir varios grupos en el péptido durante la síntesis o durante la expresión, lo cual permite el enlazamiento a otras moléculas o a una superficie. De esta forma, las cisteínas se pueden utilizar para producir tioéteres, histidinas para enlazamiento a un complejo de iones metálicos, grupos carboxilo para formar amidas o ésteres, grupos amino para formar amidas, similares.

Las defensinas para su uso según la reivindicación 1 también se pueden aislar y purificar según los métodos convencionales de la síntesis recombinante. La síntesis recombinante se puede realizar utilizando vectores de expresión adecuados y un sistema de expresión eucariota o procariota. Se puede preparar una solución del hospedero de expresión y los medios y las defensinas presentes purificadas utilizando HPLC, cromatografía por exclusión, electroforesis en gel, cromatografía por afinidad, u otra técnica de purificación. Los métodos para la expresión recombinante de la beta defensina-2 humana en *E. coli* se describen en el documento WO 2010/007166 (Novozymes).

Las defensinas alfa y beta de los mamíferos también pueden inducirse mediante la administración del ARNm correspondiente.

Dosificaciones

Defensinas seleccionadas del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7), preferiblemente se emplean en composiciones farmacéuticas para su uso en un método de tratamiento y/o prevención como se describe en la reivindicación 1 en una cantidad para el tratamiento de asma intermitente leve, asma persistente leve, asma persistente moderada, asma persistente grave, asma eosinofílica, asma neutrofílica, asma refractaria esteroidea, estado asmático, bronquiectasia, EPOC preferiblemente con toxicidad aceptable para el paciente. Las defensinas seleccionadas del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7), se pueden emplear en composiciones farmacéuticas para su uso en un método de tratamiento y/o prevención como se describe en la reivindicación 1 en una cantidad que sea efectiva para mantener una composición de microbiota normal en el pulmón y/o el intestino o para tratar o normalizar una microbiota disbiótica en el pulmón y/o el intestino, preferiblemente con una toxicidad aceptable para el paciente que necesite del tratamiento.

Para estos tratamientos, por supuesto, la dosificación adecuada, variará dependiendo de, por ejemplo, la naturaleza química y los datos farmacocinéticos de un compuesto utilizado, el hospedero individual, el modo de administración y la naturaleza y gravedad de las afecciones que serán tratadas.

Sin embargo, en general, para resultados satisfactorios en mamíferos, por ejemplo seres humanos, una dosificación diaria indicada de una alfa defensina humana preferiblemente es de aproximadamente 0.1 mg HD5/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg de peso HD5/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0.5 mg HD5/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg HD5/kg de peso corporal; tal como 1 mg HD5/kg de peso corporal hasta 10 mg de peso HD5/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 1.2 mg HD5/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg HD5/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 1.2 mg HD5/kg de peso corporal hasta aproximadamente 5 mg HD5/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente 1.2 mg HD5/kg de peso corporal, por ejemplo, administradas en dosis divididas de hasta una, dos o tres veces al día.

En una realización, una dosificación diaria indicada de una beta defensina humana preferiblemente es de aproximadamente 0.1 mg hBD-2/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg hBD-2/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0.5 mg hBD-2/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg hBD-2/kg de peso corporal; preferiblemente 1 mg hBD-2/kg de peso corporal hasta 10 mg hBD-2/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 1.2 mg hBD-2/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg hBD-2/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 1.2 mg hBD-2/kg de peso corporal hasta aproximadamente 5 mg hBD-2/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente 1.2 mg hBD-2/kg de peso corporal, por ejemplo, administradas en dosis divididas de hasta una, dos o tres veces al día.

Cuando se administran dos defensinas diferentes en una dosificación, la dosificación puede comprender cantidades iguales o aproximadamente iguales de dos defensinas determinadas sobre una base en peso o sobre una base molar. La proporción también puede diferir de tal forma que la proporción de alfa-defensina a beta-defensina varíe de 10:1 hasta 1:10, tal como de 5:1 hasta 1:5, por ejemplo de 2:1 hasta 1:2 determinada sobre una base en peso o molar.

La defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7)

o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) se pueden administrar a mamíferos, por ejemplo seres humanos, mediante modos de administración similares a dosificaciones similares que las utilizadas convencionalmente.

5

En una realización, los métodos se proporcionan como se describe en la presente, en donde la dosificación diaria es entre 0.1 y 10 mg de defensina/kg, tal como entre 0.5 y 5 mg de defensina/kg, tal como entre 1 y 2 mg de defensina/kg, tal como 1.2 mg de defensina/kg por día.

10

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de las realizaciones preferidas pueden incluir una alfa defensina de mamífero y una defensina para su uso según la reivindicación 1, tal como una cantidad de aproximadamente 0.5 mg o menos de aproximadamente 1500 mg o más por forma de dosificación unitaria, preferiblemente de aproximadamente 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, o 0.9 mg hasta aproximadamente 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 mg, y más preferiblemente de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, a 25 mg hasta aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, e 100 mg. En otras realizaciones, la alfa defensina opcional y las beta defensinas de la reivindicación 1 pueden estar presentes en cantidades iguales en base a la molaridad o en base a mg/mL.

15

En una realización, la alfa y la beta defensina de mamífero opcional para su uso según la reivindicación 1 se administra al menos una vez al día, tal como al menos dos veces al día, por ejemplo al menos 3 veces al día o continuamente.

20

En una realización, la alfa y la beta defensina de mamífero opcional de la reivindicación 1 se administra intrapulmonar mediante ventilación mecánica continua en un paciente sobre un ventilador externo.

25

Formulaciones para la administración oral o parenteral

En una realización, la administración de al menos una defensina seleccionado del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente del mismo que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO.: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO.: 7), según los métodos descritos, en general es intranasal. La administración intranasal es normal para un suministro de medicamentos pulmonar.

30

En una realización, la administración de al menos una α -defensina seleccionado del grupo que consiste en hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO.: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO.: 7), según los métodos descritos, es oral.

35

En algunas realizaciones, las composiciones de realizaciones preferidas pueden formularse tal como un liofilizado, utilizando excipientes apropiados que proporcionen estabilidad como un liofilizado, y posteriormente después de la rehidratación. Las composiciones farmacéuticas que contienen una defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7), se pueden fabricar de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, granulado, recubrimiento, disolución o liofilización. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas que contienen una defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2), hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO.: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO.: 7) se formulan como una solución estéril e isotónica. Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables están familiarizados con aquellos expertos en la técnica. Para las composiciones formuladas como soluciones líquidas, los portadores y/o diluyentes aceptables incluyen solución salina y se debe incluir agua estéril, y la composición opcionalmente puede incluir antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y otros aditivos comunes.

40

45

50

La defensina seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) se puede formular en una amplia variedad de formulaciones para administración oral. Las preparaciones en forma sólida pueden incluir polvos, tabletas, gotas, cápsulas, sellos, pastillas, y gránulos dispersables. Otras formas adecuadas para administración oral pueden incluir preparaciones en forma líquida que incluyen emulsiones, jarabes, elixires, soluciones acuosas, suspensiones acuosas, pasta de dental, dentífrico en gel, goma de mascar, o preparaciones en forma sólida que están destinadas para ser convertidas poco antes de utilizarse a preparaciones en forma líquida, tales como soluciones, suspensiones y emulsiones.

55

60

El compuesto defensina seleccionado del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente del mismo que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) se puede formular en una amplia

65

variedad en formulaciones para administración intranasal. La formulación puede contener portadores, materiales de relleno, desintegradores, acondicionadores de flujo, azúcares y edulcorantes, fragancias, conservadores, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, solubilizadores, sales para regular la presión osmótica, tampones, diluyentes, agentes dispersantes y tensioactivos, aglutinantes, lubricantes, y/u otros excipientes farmacéuticos como se sabe en la técnica. Un experto en la técnica puede formular además una defensiva seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) de una forma adecuada, y según las prácticas aceptadas, tales como aquellas descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro (1990).

Una defensiva seleccionada del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7), se pueden utilizar solas, o en terapias de combinación con uno, dos, o más de otros compuestos farmacéuticos o sustancias farmacológicas, por ejemplo con glucocorticoides, β -agonistas, antagonistas del receptor de leucotrienos, teofilina, antibióticos, quimioterapia o inmunoterapia o una combinación de éstos y/o con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Administración por vías respiratorias

La administración por vías respiratorias se puede utilizar para administrar las composiciones de la descripción. Por administración intrapulmonar se debe entender la administración tópica a los pulmones. Cuando se utilizan en la presente los términos "administración intratraqueal, intrabronquial o intra-alveolar" incluye todas las formas de esta terapia de administración con la cual se aplica una defensiva en las tráqueas, los bronquios o los alvéolos, respectivamente, ya sea mediante la instilación de una solución de una defensiva, al aplicar una defensiva en forma en polvo, o al permitir que una defensiva alcance la porción relevante de las vías respiratorias mediante la inhalación de una defensiva como una solución aerosolizada o nebulizada o una suspensión o polvo inhalado o gel, con o sin estabilizantes agregados u otros excipientes.

Los métodos para administración intrabronquial/alveolar incluyen, de manera enunciativa, lavado broncoalveolar (BAL) según los métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, utilizando como un fluido de lavado una composición fisiológicamente aceptable en la cual se haya disuelto una defensiva o de hecho mediante cualquier otra forma efectiva de administración intrabronquial incluyendo el uso de polvos inhalados que contengan defensinas en forma seca, con o sin excipientes, o la aplicación directa de una defensiva, en solución o suspensión o en forma de polvo durante una broncoscopia. Los métodos para administración intratraqueal incluyen, de manera enunciativa, lavado traqueal ciego con una solución similar de defensinas disueltas o una suspensión de defensiva, o la inhalación de gotitas de fluido nebulizadas que contengan defensinas disueltas o una suspensión de defensiva obtenida por el uso de cualquier aparato nebulizador adecuado para este fin.

En otra realización, la administración intratraqueal, intrabronquial, o intra-alveolar no incluye la inhalación del producto sino más bien la instilación o aplicación de una solución de una defensiva o un polvo o un gel que contenga la defensiva en la tráquea o las vías respiratorias inferiores.

Otros métodos de administración preferidos pueden incluir la utilización de los siguientes dispositivos:

1. Nebulizadores presurizados utilizando una mezcla de aire/oxígeno comprimidos
2. Nebulizadores ultrasónicos
3. Nebulizadores con microbomba electrónica
4. Inhalador de dosificación medida (MDI)
5. Sistemas inhaladores de polvo seco (DPI),

El aerosol puede se puede suministrar vía a) mascarillas o b) vía tubos endotraqueales en pacientes intubados durante una ventilación mecánica (dispositivo 1, 2 y 3). Los dispositivos 4 y 5 también se pueden utilizar por el paciente sin la ayuda proporcionada ya que el paciente tiene la capacidad para auto-activar el dispositivo de aerosol.

Las concentraciones preferidas para una solución que comprende una defensiva y/o los homólogos o variantes funcionales de una defensiva están en la variación de aproximadamente 0.1 mg hasta 1000 mg por ml de solución, tal como en la variación de aproximadamente 0.1 mg hasta 250 mg por ml de solución.

Composición farmacéutica para administración intrapulmonar

Las composiciones o formulaciones farmacéuticas para utilizarse en la presente descripción incluyen una defensina seleccionado del grupo que consiste en: hBD-2 (SEQ ID NO: 2) hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) o una variante funcionalmente equivalente del mismo que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO: 2) o hBD-2 truncado (SEQ ID NO: 7) en combinación con, preferiblemente disuelta en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador o diluyente acuoso, o llevada a las vías respiratorias inferiores como una preparación pegilada o como una preparación liposómica o de nanopartículas administrada como un aerosol vía inhalación, o como un fluido de lavado administrado vía un broncoscopio como un lavado broncoalveolar o como un lavado intratraqueal ciego. Se pueden utilizar una variedad de portadores acuosos, entre los que se incluyen de manera enunciativa, solución salina al 0.9 %, solución salina amortiguada, tampones fisiológicamente compatibles similares. Las composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas convencionales bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para utilizarse o se filtran bajo afecciones asépticas y se liofilizan, la preparación liofilizada se disolverá en una solución acuosa estéril antes de la administración.

En una realización la preparación de defensina liofilizada se puede pre-ensasar por ejemplo, en unidades individuales de dosificación. En una realización incluso más preferida, la unidad de dosificación individual se ajusta al paciente.

Las composiciones pueden contener sustancias o adyuvantes auxiliares farmacéuticamente aceptables, incluyendo, sin limitación, agentes para ajustar el pH y amortiguadores y/o agentes para ajustar la tonicidad, tales como por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

Las formulaciones pueden contener portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables, entre los que se incluyen microesferas, liposomas, microcápsulas, nanopartículas o lo semejante.

Los liposomas convencionales típicamente están compuestos de fosfolípidos (neutros o cargados negativamente) y/o colesterol. Los liposomas son estructuras vesiculares basadas en bicapas lipídicas que circundan compartimentos acuosos. Pueden variar en las propiedades fisicoquímicas tales como tamaño, composición de lípido, carga superficial y número y fluidez de las bicapas de fosfolípidos. Los lípidos utilizados con mayor frecuencia para la formación de liposomas son: 1,2-Dilaurooil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DLPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DMPC), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DPPC), 1,2-Distearoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DSPC), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DOPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-Fosfato (Sal monosódica) (DMPA), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfato (Sal Monosódica) (DPPA), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfato (Sal monosódica) (DOPA), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sal sódica) (DMPG), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sal sódica) (DPPG), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sal sódica) (DOPG), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal sódica) (DMPS), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal sódica) (DPPS), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal sódica) (DOPS), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-(glutaril) (Sal sódica) y 1,1',2,2'-Tetramiristoil Cardiolipina (Sal amónica). Las formulaciones compuestas de DPPC en combinación con otros lípidos o modificadores de liposomas se prefieren, por ejemplo, en combinación con colesterol y/o fosfatidilcolina.

Los liposomas de circulación prolongada se caracterizan por su capacidad para extravasarse en los sitios corporales donde se aumenta la permeabilidad de la pared vascular. La forma más popular de producir liposomas de circulación prolongada es unir el polietilenglicol (PEG) polimérico hidrofílico covalentemente a la superficie externa del liposoma. Algunos de los lípidos preferidos son: 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-2000] (Sal amónica), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-5000] (Sal amónica), 1,2-Dioleoil-3-Trimetilamonio-Propano (Sal de cloruro) (DOTAP).

Los lípidos posibles aplicados para liposomas se suministran por Avanti, Polar Lipids, Inc, Alabaster, AL. Adicionalmente, la suspensión de liposomas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen a los lípidos contra el daño por radicales libres y peroxidativos de lípidos en almacenamiento. Se prefieren atenuadores de radicales libres lipofílicos, tales como alfa-tocoferol y quelantes hierro-específicos solubles en agua, tales como ferrioxianina.

Están disponibles una variedad de métodos para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,235,871, 4,501,728 y 4,837,028. Otro método produce vesículas multilamelares de tamaños heterogéneos. En este método, los lípidos formadores de vesículas se disuelven en un solvente orgánico adecuado o un sistema de solvente y se secan bajo vacío o un gas inerte para formar una película fina de lípidos. Si se desea, la película se puede volver a disolver en un solvente adecuado, tal como butanol terciario, y luego se liofiliza para formar una mezcla más homogénea de lípidos que está en una forma similar a polvo que se puede hidratar más fácilmente. La

5 película está cubierta con una solución acuosa del medicamento dirigido y el componente de dirección y se deja hidratar, típicamente durante un período de 15-60 minutos con agitación. La distribución del tamaño de las vesículas multilamelares resultantes se puede desplazar hacia tamaños más pequeños al hidratar los lípidos bajo afecciones de agitación más vigorosas o al agregar detergentes solubilizantes tales como desoxicolato.

Se forman micelas mediante tensioactivos (moléculas que contienen una porción hidrofóbica y uno o más grupos iónicos o de otra manera fuertemente hidrofílicos) en solución acuosa.

10 En las micelas de la presente invención se pueden utilizar tensioactivos comunes bien conocidos por un experto en la técnica. Los tensioactivos adecuados incluyen laureato de sodio, oleato de sodio, laurilsulfato de sodio, monododeciléter de octaoxietilenglicol, octoxinol 9 y PLURONIC F-127 (Wyandotte Chemicals Corp.). Los tensioactivos preferidos son detergentes no iónicos de polioxietileno y polioxipropileno compatibles con una inyección IV tal como, TWEEN-80, PLURONIC F-68, n-octil-beta-D-glucopiranosido, similares. Además, también se pueden utilizar para la formación de micelas fosfolípidos, tales como aquellos descritos para utilizarse en la producción de liposomas.

Ejemplos

20 Ejemplo 1.

Para determinar y evaluar la eficacia de las beta-defensinas de mamífero en un modelo murino, con infección inducida, enfermedad severa, inmune a esteroides, neutrofílica, alérgica de las vías respiratorias de asma (figura 1).

25

Materiales y métodos

Régimen de tratamiento:

30 Ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad se sensibilizaron intraperitonealmente (IP) para 50 µg de ovoalbúmina con el adyuvante alum 1 mg en 200 µL con solución salina al 0.9 %. Los ratones se inocularon intranasalmente (IN) con Ova en los días 12-13 y los días 33-34 (10 g en 50 µL de solución salina estéril). En el día 14, los ratones se inocularon IN con el patógeno de ratón natural *Chlamydia muridarum* (Cmu: 100 unidades formadoras de inclusión, ATCCVR-123, 30 µL de tampón de sacarosa fosfato glutamato (SPG). Se administró IN dexametasona (DEX) (2 mg/kg; fosfato 50 µL de solución salina amortiguada con fosfato (PBS)) en los días 32-34 con inoculaciones de Ova, Se administró IN hBD-2 (5 mg/kg; 50 µL de solución salina amortiguada con fosfato) en los días 30, 32 y 34.

35

40 Los medicamentos administrados a través de suministro intranasal a ratones se esperó que alcanzaran los pulmones vía las vías respiratorias y es un modelo reconocido en la técnica de administración intrapulmonar.

40

Prueba:

45 Inflamación de las vías respiratorias: se obtuvieron conteos diferenciales de leucocitos obtenidos a partir de células BALF teñidas con May-Grunwald Giemsa, utilizando un microscopio de luz.

45

Función pulmonar: se midió la AHR, mediante ratones anestesiados canulados utilizando el sistema Scireq Flexivent FX1. Los datos se representan como resistencia de las vías respiratorias a 10 mg/kg de metacolina y como las curvas de respuesta a la dosis.

50

Resultados

55 Inflamación de las vías respiratorias: Los ratones sensibilizados con Ova e infectados con *C. muridarum* desarrollaron un aumento estadísticamente bastante significativo de leucocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos totales y a un grado menor de eosinófilos. El grupo tratado IN con hBD-2 mostró una completa normalización del conteo de neutrófilos y a un grado menor de linfocitos, mientras que no hubo cambio de macrófagos ni eosinófilos. El grupo IN con hBD-2 más DEX mostró una normalización completa de eosinófilos, aunque aparte de esto no se observó ningún efecto adicional (Figura 7).

55

60 Función pulmonar: los ratones sensibilizados con Ova (Ova) tuvieron una AHR mayor en comparación con los controles de solución salina (Sal) (no asmáticos). La diferencia es estadísticamente bastante significativa. El grupo tratado IN con hBD-2 (Cmu/Ova/hBD2) mostró una AHR completamente normalizada un par con el grupo control de solución salina. El grupo IN con hBD-2 más DEX mostró una AHR completamente normalizada con par con el grupo control de Solución salina aunque DEX no parece tener un efecto adicional (Figura 4).

65

Conclusión: el ejemplo demuestra la hBD2 administrada intranasalmente puede normalizar completamente la

hiperreactividad de las vías respiratorias y el conteo de neutrófilos en BALF en un modelo animal de asma refractario a esteroides conocido.

Ejemplo 2.

5

Para determinar y evaluar la eficacia de las beta-defensinas de mamíferos administradas IN contra oral en un modelo murino conducido con ácaros del polvo doméstico/adyuvante completo Freund de asma alérgica (Figura 2).

10 Materiales y métodos

Régimen de tratamiento: Ratones BALB/c hembra de 7-10 semanas de edad se asignaron aleatoriamente en 7 grupos de estudio un día antes de iniciar el estudio y se sensibilizaron subcutáneamente (SC) con ácaros de polvo (100 µg de HDM en 200 µL de solución salina más adyuvante completo de Freund en solución salina al 0.9 %). Los ratones luego se inocularon intranasalmente (IN) con HDM en el día 14 (HDM 25 µg en 50µL de solución salina). Se administró oralmente dexametasona (1 mg/kg BID; 50 µL de solución salina amortiguada con fosfato (PBS)) en el día 14. Se administró IN u oralmente hBD-2 (1.7 mg/kg de TID IN; 0.4 mg/kg de TID IN; 0.4 mg/kg de TID oralmente, 50 µL de solución salina amortiguada con fosfato) en el día 14. La dosis inicial se administró 60 minutos antes de la inoculación, y las dosis posteriores aproximadamente 6 horas después.

20

Pruebas:

Inflamación de las vías respiratorias: A las 48 horas después de la inoculación, se realizó un lavado broncoalveolar lavando los pulmones con 3 volúmenes de PBS frío (0.4; 0.3 y 0.3 mL, total 1 mL). En un analizador hematológico Sysmex XT-2000iV automatizado se determinaron los conteos de células de leucocitos totales y diferenciales.

25

Función pulmonar: Al iniciar 48 horas después de la inoculación de HDM, se llevaron a cabo mediciones de la resistencia pulmonar y la compliancia pulmonar después de la inoculación con metacolina (3.125 MCH1; 6.25 MCH2; 12.5 MCH3 y 25 mg/ml MCH4) mediante ratones canulados, anestesiados utilizando un sistema DSI's Buxco Finepoint RC. Los datos se representan como resistencia de las vías respiratorias a 10 mg/kg de metacolina y como curvas que responden a las dosis.

30

Muestreo pulmonar para análisis de citoquinas: Después del término de cada BAL, los pulmones se retiraron del tórax, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron congelados a -80 grados Celsius hasta el análisis de la concentración de citoquinas de IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 e IFNγ mediante ELISA.

35

Resultados

Se observó un aumento de los valores de resistencia pulmonar y una disminución de los valores de compliancia pulmonar en animales tratados con el vehículo inoculados con HDM en comparación con los ratones inoculados con solución salina (no asmáticos). Una respuesta inflamatoria en ambos grupos de ratones tratados con vehículo (oral e intranasal) se indujo mediante una sola inoculación de HDM, 14 días después de la sensibilización con HDM y un adyuvante. Esto se caracterizó por un aumento estadísticamente significativo en los conteos totales de células, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos en BALF ($p < 0.05$) en comparación con los controles inoculados con solución salina. También, los análisis de la concentración de cinco citoquinas IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 y IFN-γ en homogenados de tejido pulmonar revelaron niveles significativamente mayores en los animales inoculados con HDM en comparación con los controles inoculados con solución salina.

40

45

50

El tratamiento con dexametasona inhibió significativamente los conteos totales de células y eosinófilos, aunque no los conteos de neutrófilos, macrófagos y linfocitos en BALF. Según los datos celulares, la dexametasona no influyó en los niveles del IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 e IFN-γ en los homogenados de tejido pulmonar en comparación con el control de HDM/vehículo. Sin embargo, se influyó en las mediciones de AHR relacionadas con los conteos de eosinófilos. Los resultados obtenidos indican que este modelo es resistente a esteroides a cierto grado.

55

El artículo de prueba hBD-2, después de la aplicación tanto oral como intranasal TID, en el día 14, inhibió efectivamente el aumento de la resistencia de las vías respiratorias (Figuras 5a y 5b) y la disminución de la compliancia pulmonar (Figuras 6a y 6b) en comparación con los animales tratados con el vehículo inoculados con HDM. Se observó un efecto más prominente en algunos parámetros medidos después de la aplicación intranasal, tal como el flujo celular en BALF, donde ambas dosis (0.4 mg/kg/día de TID y 1.7 mg/kg/día de TID) inhibieron significativamente los conteos de neutrófilos, mientras que la dexametasona estándar esteroidea fracasó en inhibirlos. Se observaron efectos significativos similares que los niveles de las citoquinas IL-6, IL-10 e IFN-γ en homogenados de tejido pulmonar con ambas rutas de dosificación (Figura 9, 14, 17). La hBD2 administrada per-oralmente redujo significativamente el TNF-α (Figura 10), mientras que la hBD2

60

65

administrada intranasalmente no fue significativamente diferente del control. La Figura 11 muestra el efecto de la IL-1 β .

5 Conclusión: Todos los resultados obtenidos indican los efectos anti-inflamatorios de la hBD-2 en el modelo de ratón impulsado con ácaros del polvo doméstico/adyuvante completo de Freund de asma alérgica. Sorprendentemente, la hBD2 administrada oralmente también fue efectiva en el tratamiento del asma y en la reducción de inflamación en ratones asmáticos.

10 Ejemplo 3.

Para determinar y evaluar la eficacia de las β -defensinas de mamífero IN contra oral en un modelo murino conducido con ácaros de polvo doméstico/adyuvante completo de Freund de asma alérgica (Figura 2).

15 Materiales y métodos

15 Régimen de tratamiento: se asignaron aleatoriamente ratones BALB/c hembra de 7-10 semanas de edad en 4 grupos de estudio un día antes de iniciar el estudio se sensibilizaron subcutánea (SC) para ácaros del polvo doméstico (100 μ g de HDM en 200 μ L de solución salina más adyuvante completo de Freund en solución salina al 0.9 %). Los ratones se inocularon intranasalmente (IN) con HDM en el día 14 (HDM 25 μ g en 50 μ L de solución salina). La hBD-2 se administró IN u oralmente (0.4 mg/kg de TID IN; 0.4 mg/kg de TID oralmente, 50 μ L de solución salina amortiguada con fosfato) en el día 14. La dosis inicial se administró 60 minutos antes de la inoculación, y las dosis posteriores aproximadamente 6 horas después.

20 Pruebas:

25 Muestreo de tejido pulmonar: Los pulmones se retiraron del tórax, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron al menos -80 grados Celsius hasta que el análisis de la concentración de citoquinas de IL-4, IL-5, IL-8 (KC), IL-9 e IL-13 mediante ELISA.

30 Los pulmones se inflaron *in situ* en formalina amortiguada al 10 %, se retiraron del tórax, se colocaron individualmente en formalina amortiguada al 10 %, se incrustaron en parafina *in toto*, se seccionaron y se tiñeron con H&E/PAS.

35 Muestreo sanguíneo

Todas las muestras de sangre terminal se recolectaron vía sangrados de la vena yugular. La sangre se muestreo para tubos de Li-heparina, se colocaron en hielo y se centrifugaron inmediatamente a 4°C. El plasma se separó y se almacenó a -80°C hasta el análisis potencial de SCFA.

40 Muestreo de tejido pulmonar

45 Los pulmones se expusieron y se extirparon al abrir suavemente el tórax y mediante el corte lateral del esternón y costillas y lomo recortado. Los pulmones de los primeros 6 animales por grupo se retiraron del tórax, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron congelados a -80°C hasta el análisis de la concentración de citoquinas mediante ELISA.

50 Los pulmones de otros 8 animales por grupo se inflaron *in situ* con formalina amortiguada al 10 %, se retiraron del tórax, se colocaron individualmente en formalina amortiguada al 10 %, se incrustaron en parafina *in toto*, se seccionaron y se tiñeron con H&E/PAS. Los bloques de parafina se conservaron para el análisis IHC.

Lecturas

• Histopatología (H&E; PAS) (N = 8/grupo; N total = 32)

55 • Citoquinas en homogenados de tejido pulmonar (IL-4, IL-5, KC, IL-9 e IL-13) (N = 6/grupo; N total = 24)

Histopatología

60 El influjo celular (mononucleares, eosinófilos, neutrófilos) se evaluó semi-cuantitativamente en portaobjetos teñidos con H&E por separado para espacio peri-bronquial/bronquiolar y perivascular como sigue:

- | | |
|---|----------------------------------------------|
| 0 | ausente |
| 1 | unas cuantas células inflamatorias dispersas |
| 2 | agregados mayores |
| 3 | acumulación marcada de células |

La marca general para inflamación se calculó como la suma de todas las marcas individuales.

5 La metaplasia de células caliciformes, por separado a un nivel de vías respiratorias mayores y vías respiratorias distales, se evaluó en porta-objetos teñido con PAS como sigue:

0 sin células que contengan muco a lo largo de la membrana basal

10 1 unas cuantas células positivas a lo largo de la membrana basal con menos del 75 % de citoplasma teñido

2 unas cuantas células positivas a lo largo de la membrana basal con más del 75 % del citoplasma teñido

3 muchas células positivas a lo largo de la membrana basal con menos del 75 % del citoplasma teñido

15 4 muchas células positivas a lo largo de la membrana basal con más del 75 % del citoplasma teñido

Evaluación estadística

20 Los datos se procesaron utilizando MS Excel. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.04). Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

25 Utilizando la prueba de Mann-Whitney mediana y no paramétrica se realizaron análisis estadísticos de los datos de valores de marcas histológicas seleccionados.

Resultados

30 Una respuesta inflamatoria en ambos grupos tratados con el vehículo de ratones (oral e intranasal) se indujo mediante una sola inoculación de HDM 14 días después de la sensibilización con HDM y un adyuvante. Esto se caracterizó por un aumento estadísticamente significativo en la concentración de cinco citoquinas IL-4, IL-5, IL-8, IL-9 e IL-13 en homogenados de tejido pulmonar y mediante cambios inflamatorios histológicos severos del tejido pulmonar en animales inoculados con HDM en comparación con controles inoculados con solución salina.

35 El artículo de prueba hBD-2, después de la aplicación TID tanto oral como intranasal, en el día 14, inhibió efectivamente el aumento en la inflamación histológica del tejido pulmonar en comparación con los animales tratados con el vehículo inoculados con HDM (Figuras 19, 20, 21). Se observaron efectos significativos similares en los niveles de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-8, IL-9 e IL-13 en homogenados de tejido pulmonar con ambas rutas de dosificación (Figura 12, 13, 15, 16, 18).

40 Conclusión: Todos los resultados obtenidos indican claros efectos antiinflamatorios de hBD-2 en el modelo de ratón conducido con ácaros del polvo doméstico/adyuvante completo de Freund de asma alérgica. Los efectos se obtuvieron utilizando una administración tanto intranasal como oral de hBD-2.

45 Ejemplo 4.

Estudio farmacocinético para establecer el perfil farmacocinético de hBD-2 después de una sola sonda gástrica para la administración de 4 mg/kg a ratones NMRI.

50 Materiales y métodos

55 Régimen de tratamiento: Mediante sonda gástrica oral 5 ml/kg se dosificaron 21 ratones NMRI hembras utilizando un tubo de sonda gástrica y una jeringa de 1 ml según el peso corporal individuales obtenidos en el día de la dosificación. La orina se muestreo aspirada en puntos de tiempo aleatorios al masajear suavemente el área inguinal del abdomen. La primera muestra de sangre se tomó utilizando un método de muestreo submandibular. La segunda muestra de sangre se recolectó de ratones anestesiados con isoflurano. Después de la eutanasia se tomaron muestras intestinales. El abdomen de cada ratón se abrió y se muestrearon tres secciones de intestinos.

60 Resultados

La hBD-2 podría no ser detectada mediante HPLC en cualquiera de las muestras de suero u orina ya que todos los valores estuvieron por debajo del nivel de detección de < 10 pg/ml. Esto indica que la hBD-2 no está disponible sistémicamente después de la dosificación oral de 4 mg/kg en ratones (Figura 22).

65

Ejemplo 5 (para ilustración).

Para investigar y comparar el perfil farmacocinético de la hBD-2 fusionada a la C-terminal (peso molecular de 71.336 Da) o la N-terminal (peso molecular 71.666 Da) de albúmina sérica humana después de la administración subcutánea o intravenosa de un equivalente molar para 1 mg/kg de hBD-2 (peso molecular de 66.437 Da) para ratones hembra NMRI.

Material y métodos

Régimen de tratamiento: Los animales se dosificaron con 10 ml/kg de concentración típica de 1.65 mg/ml según el peso corporal individual (300 µL para un ratón de 30 gramos). La primera muestra de sangre se extrajo utilizando un método de muestreo submandibular y la segunda después de anestesia con isoflurano y se realizó la eutanasia.

Resultados

La hBD-2 mostró una vida media de 1 hora y las dos proteínas fusionadas una vida media de 12 horas. La AUC se cambió dramáticamente. También se cambió el aclaramiento renal a partir de 10 ml/min para hBD-2 hasta 0.5-2.2 ml/min para las dos moléculas fusionadas (Figuras 23, 24, 25).

El ejemplo demuestra que la vida media de hBD2 se puede extender marcadamente mediante la conjugación C- o N-terminal a albúmina.

Ejemplo 6 (para ilustración).

Para determinar y evaluar el efecto anti-inflamatorio de la "N-terminal de fusión con hBD-2-albúmina" en un modelo con colitis aguda inducida por dextran sulfato de sodio (DSS) durante 10 días en ratones.

Material y métodos

Régimen de tratamiento: Se administró "hBD-2-albúmina N-terminal" intravenosamente vía la vena de la cola o subcutáneamente con el uso de una aguja 25G estéril en un volumen de dosificación de 10 ml/kg de peso corporal. Los animales recibieron 1 dosis diaria durante 10 días ejecutivos. La dexametasona (DEX) de control activo se administró subcutáneamente a una dosis de 1 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 ml/kg de peso corporal OD.

Resultados

El tratamiento con "hBD-2-albúmina N-terminal" dio por resultado en una inhibición significativa del índice de actividad de la enfermedad (DAI) cuando se administró diariamente a una dosis de 1.65 mg/kg vía la ruta intravenosa ($p < 0.05$). Adicionalmente, en el día 10 también se observó una inhibición significativa de la marca DAI cuando la "hBD-2-albúmina N-terminal" se administró diariamente a una dosis de 1.65 mg/kg y a una dosis de 125 mg/kg de manera subcutánea respectivamente ($p < 0.05$).

La administración de sulfato sódico con dextrano dio por resultado en una inflamación significativa y una lesión del tejido colónico como resulta evidente después de un examen histológico. El tratamiento con "hBD-2-albúmina N-terminal" no dio por resultado en ninguna reducción estadísticamente significativa de este daño histológico, aunque similarmente el DEX con control activo fracasó en reducir significativamente la lesión histológica.

Los resultados muestran adicionalmente un aumento significativo en el peso corporal en el día 7 en los animales tratados con "hBD-2-albúmina N-terminal" a pesar de una caída transitoria en el peso corporal en los días 2 y 3. Por el contrario, los animales tratados con DEX exhibieron una disminución muy significativa en el peso corporal desde el día 5 en adelante ($p < 0.01$).

El ejemplo demuestra que la fusión de hBD2-albúmina N-terminal es biológicamente activa en un modelo animal de una afección inflamatoria.

Ejemplo 7 (para ilustración).

Para determinar y evaluar el efecto anti-inflamatorio de "C-terminal de fusión de hBD-2-albúmina" en un modelo con colitis aguda inducida por sulfato de sodio y dextrano (DSS) durante 10 días en ratones.

Material y métodos

Régimen de tratamiento: Se administró intravenosamente la "hBD-2-albúmina C-terminal" vía la vena de la cola o subcutáneamente con el uso de una aguja 25G estéril en un volumen de dosificación de 10 ml/kg del peso

corporal. Los animales recibieron 1 dosis diaria durante 10 días ejecutivos. La prednisolona (Pred) de control activo se administró oralmente mediante sonda gástrica a una dosis de 1 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 ml/kg de peso corporal OD.

5 **Resultados**

El tratamiento con "hBD-2-albúmina C-terminal" dio por resultado en una inhibición significativa de la DAI cuando se administró diariamente a una dosis de 1.6 mg/kg vía la ruta intravenosa (p<0.05). Adicionalmente "hBD-2-albúmina C-terminal" dio por resultado en una inhibición significativa de DAI cuando se administró en los días alternativos 0, 2, 4, 6, 8 y 10 a una dosis de 1.6 mg/kg vía la ruta intravenosa (p<0.05) (Figura 26). El tratamiento diario con Pred dio por resultado en una inhibición significativa del DAI en el día 9 (p<0.05).

La administración de sulfato de sodio y dextrano dio por resultado en una inflamación significativa y una lesión del tejido colónico como resulta evidente después de un examen histológico. El tratamiento con "hBD-2-albúmina C-terminal" a una dosis de 1.6 mg/kg dio por resultado en una reducción estadísticamente significativa de este daño histológico (p<0.05). Similarmente, el tratamiento diario con "hBD-2-albúmina C-terminal" a una dosis de 1.6 mg/kg y de 16.5 mg/kg en los días 0, 2, 4, 6, 8, y 10 dio por resultado en una reducción significativa del daño histológico al colon (p<0.01) (Figura 27). El tratamiento con Pred y control activo fracasó en reducir significativamente la lesión histológica en la porción próxima del colon, aunque redujo la lesión en el colon distal (p<0.01).

Los resultados muestran además un aumento significativo en el peso corporal en los animales tratados con "hBD-2-albúmina C-terminal" (p<0.05).

25 El ejemplo demuestra que la fusión de hBD2-albúmina C-terminal es biológicamente activa un modelo animal de una afección inflamatoria.

Ejemplo 8.

30 **Secuencias**

SEQ ID	Nombre	Secuencia
1	hBD1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK
2	hBD2	GIGDPVTCLKSGAICHVPFPPRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
3	hBD3	GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK
4	hBD4	ELDRICGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK
5	HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
6	HD6	AFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL
7	hBD2 Truncada	PVTCLKSGAICHVPFPPRYKQIGTCGLPGTKCCKKP

Ejemplo 9.

Para determinar y evaluar la eficacia del tratamiento profiláctico con beta-defensinas de mamífero IN contra oral en un modelo murino conducido con ácaros de polvo doméstico de asma alérgica.

Materiales y métodos

Régimen de tratamiento: Ratones BALB/c hembra de 7-10 semanas de edad se asignaron aleatoriamente en 5 grupos de estudio un día antes de iniciar el estudio y se sensibilizaron subcutáneamente (SC) para ácaros de polvo doméstico (100 µg de HDM en 200 µL de solución salina más adyuvante completo de Freund en solución salina al 0.9 %). Los ratones se trataron con hBD-2 oralmente e intranasalmente respectivamente a una dosis de 1.2 mg/kg/día (0.4 mg/kg de TID) iniciando en el día 12 en la mañana y TID continuó a intervalos de aproximadamente 6 horas. La última dosis se administró en el día 14 una hora antes de la inoculación. El número total de dosis fueron 8 dosis o un total de 2 mg/kg de hBD-2. Los ratones luego se inocularon intranasalmente (IN) con HDM en el día 14 (HDM 25 µg en 50 µL de solución salina).

Pruebas:

5 Inflamación de las vías respiratorias: A las 48 horas después de la inoculación, se realizó un lavado broncoalveolar lavando los pulmones con 3 volúmenes de PBS fría (0.4; 0.3 y 0.3 mL, total 1 mL). Los conteos de células de leucocitos totales y diferenciales se determinaron en un analizador hematológico automatizado Sysmex XT-2000iV.

10 Función pulmonar: Iniciando a las 48 horas después de la inoculación con HDM, se llevaron a cabo mediciones de la resistencia pulmonar y la compliancia pulmonar después de la inoculación con metacolina (3.125 MCH1; 6.25 MCH2; 12.5 MCH3 y 25 mg/ml de MCH4), mediante ratones canulados, anestesiados utilizando el sistema Buxco Finepoint RC DSI's. Los datos se representan como la resistencia de las vías respiratorias a 10 mg/kg de metacolina y como las curvas de respuesta a la dosis.

15 Muestreo pulmonar para análisis de citoquinas: Después de terminar cada BAL, los pulmones se retiraron del tórax, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron congelado a -80 grados Celsius hasta que el análisis de la concentración de citoquinas de TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-33 en un homogenado de pulmón mediante ELISA.

20 Resultados

25 Se observó un aumento de los valores de resistencia pulmonar y una disminución de los valores de compliancia pulmonar en animales tratados con el vehículo inoculados con HDM en comparación con los ratones inoculados con solución salina (no asmáticos). Una respuesta inflamatoria en ambos grupos de ratones tratados con vehículo (oral e intranasal) se indujo mediante una sola inoculación de HDM de 14 días después de la sensibilización con HDM. Se caracterizó por un aumento estadísticamente significativo en los conteos totales de células, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos en BALF ($p < 0.05$) en comparación con los controles inoculados con solución salina. También, el análisis de la concentración de siete citoquinas TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-33 en homogenados de tejido pulmonar reveló niveles significativamente superiores en animales inoculados con HDM en comparación con los controles inoculados con solución salina.

35 La hBD-2, después de la aplicación TID tanto oral como intranasal, administrada desde el día 12 hasta el día 14 (un total de 2.0 mg/kg en 8 administraciones), preservó efectivamente una función pulmonar normal inhibiendo el aumento de resistencia de las vías respiratorias (Figura 29) y la disminución de la compliancia pulmonar (Figura 30) en comparación con los animales tratados con el vehículo inoculados con HDM. Se observó un efecto de flujo celular en BALF después de la aplicación oral, que inhibió significativamente los conteos de neutrófilos (Figura 31), aunque de otra manera las células inmunitarias migraron en BALF como se observa normalmente en el asma, aunque de manera importante, la tormenta de citoquinas con frecuencia observada en asma y la base para un ataque de asma se evitó con una normalización completa de las concentraciones de citoquinas en homogenados de tejido pulmonar en especial después de la administración oral de hBD-2. Los niveles de citoquinas TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 después de la administración oral como se muestran en las Figuras 32-37. Hubo una tendencia hacia la disminución de TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 después de la hBD-2 administrada intranasalmente, aunque esto no fue estadísticamente significativo diferente del control. Conclusión: Todos los resultados obtenidos indican efectos profilácticos, preventivos, y anti-inflamatorios claros de la hBD-2 en el modelo de ratón conducido con ácaros del polvo doméstico de asma alérgica.

Ejemplo 10.

50 Protección y preservación de la microbiota intestinal mediante un tratamiento profiláctico con defensinas. Ratones: Los ratones se alojaron en tríos, 4 jaulas por grupo. Se registró la ingestión de alimento diariamente justo antes de apagar las luces a las 6 pm. Los ratones individuales se sometieron a procedimientos experimentales en orden alterado tanto por grupo como por jaula. Los ratones se mantuvieron a temperatura ambiente bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a aficciones estándar SPF. El régimen de tratamiento se describe en la Figura 38.

Dietas: Para la dosificación, el peso promedio se estimó que será de 25 gramos por ratón. Los ratones comieron aproximadamente 3 gramos de alimento por ratón al día.

60 Régimen de tratamiento: los ratones se alimentaron ya sea con una dieta alta en grasas (HFD) o una dieta control baja en grasas (LF). La HFD contuvo 4 sub-grupos; 1 hBD2, 1 HD5, 1 hBD2/HD5 y 1 HFD estándar sin suplementación de defensinas. La concentración de defensinas fue 1.2 mg de hBD2 por kg de ratón al día. La HD5 se administró en una concentración equimolar para hBD2. Al grupo combinatoria se le administró hBD2 al 50 % + HD5 50 %, por lo tanto, una cantidad total de defensinas equivalentes a los grupos de prueba restantes.

Pruebas:

Se llevaron a cabo análisis microbianos para estudiar la microbiota del intestino.

- 5 Se condujo una caracterización 16S longitudinal en 4 muestras pareadas de 60 ratones, 240 muestras en total. Cada ratón se muestreó antes del cambio de dieta, 1 semana después del cambio de dieta, 4 semanas después de cambio de dieta y al término, asegurando con esto una caracterización completa de la microbiota fecal como resultado del tratamiento con defensina.

10 **Resultados**

15 Microbiota. La hBD2 afectó principalmente la presencia microbiana, mientras que la HD5 y la hBD2 + HD5 afectaron principalmente la abundancia microbiana. La Figura 40 muestra la abundancia relativa de las especies en los diferentes grupos de tratamiento e ilustra el efecto profundo de hBD2 y HD5 sobre la flora intestinal. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la abundancia de *Allobaculum* en el intestino delgado después de la profilaxis con HD5 ($p < 0.02$; Figura 41). El *Allobaculum* es una especie productora de ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos grasos de cadena corta desempeñan una función importante en la regulación de la homeostasis de células Treg colónicas mediadas vía GPCR43. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la abundancia de *Barnesiella* en el colon después del tratamiento profiláctico con hBD2 ($p < 0.03$; Figura 43). *Barnesiella* es una bacteria que es capaz de eliminar y proteger contra la dominancia intestinal de bacterias patógenas resistentes a antibióticos que se pueden observar en pacientes hospitalizados. La abundancia de *Barnesiella* corresponde con la cantidad de diversas células inmuno-reguladoras. Entre mayor sea el nivel de *Barnesiella* en el colon, mayores serán las células B en la zona marginal y las células T citolíticas invariantes enumeradas del bazo y el hígado. En el desarrollo de colitis en ratones IL-10^{-/-}, niveles mayores de un filotipo de *Barnesiella* se correlaciona con niveles de menor actividad de la enfermedad. Se observó una tendencia hacia una abundancia menor de *Lactobacillaceae* en el colon después de un tratamiento profiláctico con hBD2 ($p = 0.1$; Figura 42).

30 Conclusión: El pulmón, así como la microbiota intestinal parece desempeñar una función importante en el asma, lo último a través del eje intestino-pulmón. La influencia profunda de las defensinas sobre la presencia y abundancia de bacterias comensales clave y la homeostasis de células T colónicas se podría explicar los efectos en el pulmón observados en ratones asmáticos alérgicos después del tratamiento oral con las defensinas aunque también la diferencia entre los efectos en el pulmón observados después la administración intranasal contra oral. Este ejemplo 10 demuestra que las defensinas tanto alfa como beta, específicamente HD5 y hBD2 tienen una influencia profunda sobre la composición de la microbiota en los términos del número de especies presentes así como el número total de bacterias y de esta forma parece proteger y preservar una microbiota sana. Más específicamente, las defensinas parecen promover las bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta AGCC, que desempeñan una función clave en la homeostasis de células Treg colónicas.

40 **Ejemplo 11.** Tratamiento de las disbiosis mediante un tratamiento intervencional con defensinas.

45 Ratones y dietas. El experimento aclara el efecto de hBD2 y HD5 sobre la microbiota en ratones obesos con dieta inducida. Un periodo de rodaje de 13 semanas, donde se los ratones se alimentaron con una misma HFD (60 % de energía proveniente de la grasa) precedió la intervención. Únicamente los ratones que cumplieron con los criterios de un mínimo de 12 gramos de ganancia de peso (aproximadamente el 50 % del peso corporal inicial) durante el periodo de rodaje se incluyeron en los análisis finales. Los ratones que no cumplieron con estos criterios permanecieron en sus jaulas respectivas como "cuidadores" jerárquicos. Los mismos se expusieron a todas las pruebas experimentales, aunque se excluyeron de los análisis.

50 Régimen de tratamiento. Antes de la intervención todos los ratones se exploraron MR. Las jaulas de los ratones se asignaron a grupos experimentales con base en su masa de grasa. Todas las mediciones posteriores se parearon con los datos provenientes de los mismos ratones antes de la intervención. Un grupo de referencia con LFD (dieta baja en grasas) se ejecutó en paralelo. Como controles para los grupos adicionales con la intervención 2 se incluyeron: 1 con misma HFD y 1 con LFD. Los ratones experimentales permanecieron con la misma HFD durante la intervención. Los ratones estuvieron en dieta experimental durante 10 semanas. Los mismos se co-alojaron durante todo el experimento, 4 ratones por jaula, 3 jaulas por grupo. Todas las pruebas se ejecutaron durante 3 días, 1 jaula por grupo al día. El régimen de tratamiento se muestra en la Figura 39.

60 Pruebas. Se llevaron a cabo análisis microbianos para estudiar la microbiota del intestino. Se condujo una caracterización 16S longitudinal en 4 muestras pareadas de 60 ratones, 240 muestras en total. Cada ratón se muestreó antes del cambio de dieta, 1 semana después del cambio de dieta, 4 semanas después del cambio de dieta y al término, asegurando así una caracterización completa de la microbiota fecal como resultado del tratamiento con defensinas.

65 **Resultados**

Microbiota.

5 Se mostró que ambas defensinas tuvieron una influencia profunda en la presencia bacterias, así como la ausencia bacteriana. HD5 aumentó la abundancia de *Alloprevotella* estadísticamente significativa en el colon ($p < 0.02$) (Figura 44), mientras que hBD2 no tuvo influencia sobre la abundancia de *Alloprevotella*. hBD2 aumentó dramática y estadísticamente de manera significativa la abundancia relativa de *Bifidobacteriaceae* tanto en el intestino delgado como en el colon ($p < 0.0001$ y $p < 0.04$, respectivamente; Figura 45). Hubo una
10 tendencia hacia HD5 que aumenta la abundancia de *Bifidobacteriaceae* en el intestino delgado (Figura 45). El pulmón, así como la microbiota intestinal parecen desempeñar una función importante en el asma lo último a través del eje intestino-pulmón. Las defensinas influyen profundamente en la presencia y ausencia de bacterias comensales clave y la homeostasis de células T colónicas podría explicar los efectos en el pulmón observados en ratones asmáticos alérgicos después del tratamiento oral con defensinas, la diferencia entre los efectos en el pulmón observados después de la administración intranasal contra oral.

15 Conclusión: Este ejemplo 11 demuestra que las defensinas tanto alfa como beta, específicamente hBD2 y HD5, tienen una influencia profunda sobre la composición de la microbiota en los términos del número de especies presentes así como el número total de bacterias y de esta forma parecen proteger y conservar una microbiota sana. Más específicamente las defensinas parecen estimular las bacterias productoras de ácido graso de
20 cadena corta, AGCC, que desempeñan una función clave en la homeostasis de células Treg colónicas.

REFERENCIAS

- 25 Bouloukaki, I. et al., 2011. Sputum and nasal lavage lung-specific biomarkers before and after smoking cessation. BMC Pulmonary Medicine 11:35
- Charlson, E.S. et al. 2011. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. Am J Respir Crit Care Med 184:957-963.
- 30 Cosmi, L et al., 2011. TH17 cells: new players in asthma pathogenesis. Allergy 66:989-998.
- Donia, M.S. and Fischbach, M.A. 2015. Small molecules from the human microbiota. Science 349, 1254766
- Dorrestein, P.C. et al., 2014. Finding the missing links among metabolites, microbes, and the host. Immunity 40:824-832.
35
- Ege, M.J. et al., 2011. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. NEJM 364:701-709.
- 40 Essilfie, A. et al., 2015. Macrolide therapy suppresses key features of experimental steroid-sensitive and steroid-insensitive asthma. Thorax 70:458-467.
- Fletcher, C. and Peto, R. 1977. The natural history of chronic airflow obstruction. BMJ: 1: 1645-1648.
- Hansbro, P.M. et al, 2004. Role of atypical bacterial infection on the lung in predisposition/protection of asthma. Pharmacol Ther 101: 193-210
45
- Hansbro, P.M. et al., 2011. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? BJP 163: 81-95.
- Hilty, M. et al., 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. PLoS ONE 5, e8578
50
- Hogg, J.C. et al. 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. NEJM: 350: 2645-2653.
- Jakobsson, H.E. et al. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonization and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarian section. Gut 63: 559-566.
55
- Marra, F. et al., 2009. Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma. Pediatrics 123: 1003-1010.
- 60 Marsland, B.J. et al., 2015. The gut-lung axis in respiratory disease. Annals ATS 12: S150-156
- Penders, J. et al., 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. Allergy 2007: 1223-1236

Shen et al., 2014. β -Defensin 2 Ameliorates Lung Injury Caused by Pseudomonas Infection and Regulates Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rat. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15(8), 13372-13387; <https://doi.org/10.3390/ijms150813372>

5 Saizman 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.

Schirmer, M. et al., 2016. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell* 167: 1125-1136

10

Trompette, A. et al., 2013. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine* 20: 159-168.

15

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

Wills-Karp, M. et al., 2001. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene Hypothesis. *Nat Rev Immunol* (1): 69-75.

20

WO 2010/007166

WO 92/06204

WO 95/17413

25

WO 95/22625

US 5,223,409

30

WO 2013/007596

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una defensina seleccionada del grupo que consiste en hBD2 (SEQ ID NO: 2) y hBD2 truncada (SEQ ID NO:7), o una variante funcionalmente equivalente de la misma que difiere en 1 a 4 aminoácidos en comparación con hBD-2 (SEQ ID NO.: 2) o hBD-2 truncada (SEQ ID NO.: 7), para el uso en un método de tratamiento y/o prevención del asma, bronquiectasia, trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC) o enfisema, comprendiendo el método la administración oral o intrapulmonar de dicha defensina.
- 10 2. La defensina para el uso de la reivindicación 1, en donde el asma se selecciona del grupo que consiste en asma intermitente leve, asma persistente leve, asma persistente moderada, asma persistente grave, asma eosinofílica, asma neutrofílica, asma refractaria a esteroides y estado asmático.
- 15 3. La defensina para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la administración es oral.
- 20 4. La defensina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento comprende reducir la inflamación pulmonar histológica, el recuento de células inflamatorias en el líquido de lavado broncoalveolar, reequilibrar el sistema inmunitario con normalización de la producción de citoquinas inflamatorias en homogeneizados de tejido pulmonar y prevención/tratamiento de una tormenta de citoquinas.
- 25 5. La defensina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tratamiento comprende el aumento de la distensibilidad pulmonar, en la reducción de la hiperreactividad de las vías respiratorias, y/o en el aumento del flujo espiratorio máximo en un sujeto que lo necesite.
- 30 6. La defensina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento comprende aumentar la riqueza génica, el número de filos, aumentar la producción de butirato y/o la producción de triptófano, disminuir la producción de acetato de y/o de la microbiota pulmonar.
- 35 7. La defensina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto tiene
- 40 a. síntomas asmáticos > 2 veces por semana, tales como síntomas diarios, tales como síntomas continuos,
- b. ataques asmáticos de intensidad variable, tales como ataques que afectan a la actividad, tales como ataques que limitan la actividad física,
- 45 c. síntomas asmáticos nocturnos > 2 veces al mes, como > 2 veces a la semana que pueden durar días, como síntomas nocturnos frecuentes,
- d. un volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) < 80 %, como un FEV1 de 60 - 80 %, como un FEV1 < 60 %, y/o
- 50 e. una tasa de flujo espiratorio máximo PEFr con una variabilidad de > 20 %, como una variabilidad PEFr de 20-30 %, como una variabilidad PEFr > 30 %, como una variabilidad PEFr > 60 %.
- 55 8. La defensina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la defensina se administra en combinación con glucocorticoides, β-agonistas, antagonistas de los receptores de leucotrienos, teofilina, antibióticos, rifaximina, inmunosupresores, quimioterapia o inmunoterapia, ácidos grasos de cadena corta, HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4, trasplantes fecales o cualquier combinación de los mismos.
9. La defensina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la dosis diaria está comprendida entre 0.1 y 10 mg defensina/kg, tal como entre 0.5 y 5 mg defensina/kg, tal como entre 1 y 2 mg defensina/kg al día, tal como 1.2 mg defensina/kg al día.
10. La defensina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha defensina se administra al menos una vez al día, tal como al menos dos veces al día, tal como al menos tres veces al día, tal como al menos cuatro veces al día, tal como cinco veces al día.
- 60 11. La defensina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha administración intrapulmonar es intratraqueal, intrabronquial o bronquioalveolar.

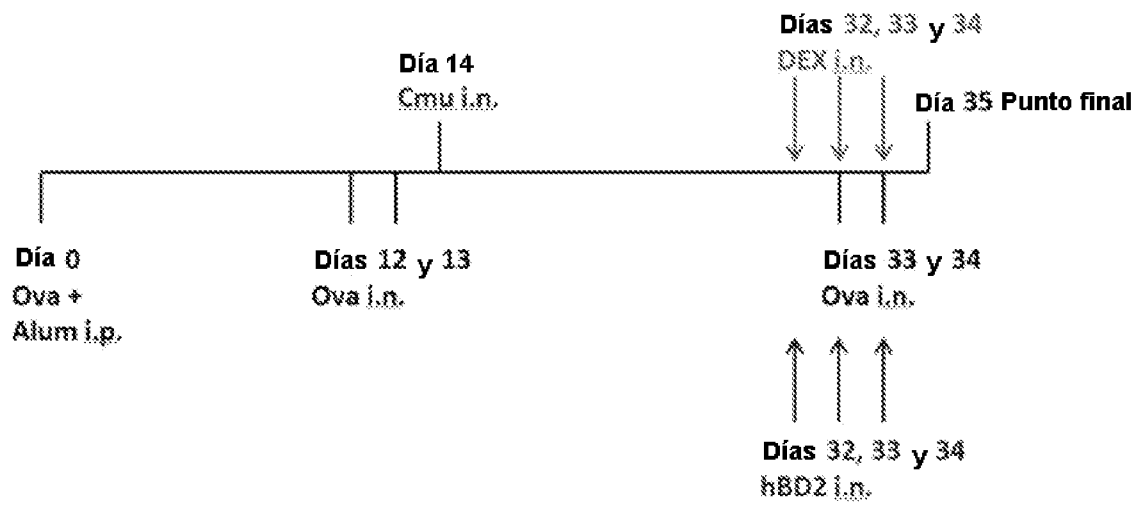


Figura 1

# de Grupo	N	Sensibilización	Inoculado	Tratamiento	Mediciones
		s.c. (día 0)	<i>i.n./ratón</i> Día 14	Día 14 Régimen de dosificación y ruta para aceptación	y muestreo 48 hrs. seguidas de la inoculación (día 16)
1	14	100 μ L de CFA en solución salina	50 μ L de solución salina	-	* Sangre para plasma {N=14}
2	14	100 μ g HDM/0.2 mL solución salina + CFA/ratón	25 μ g HDM/50 μ L de solución salina	Vehículo	* Pulmones para histopatología {N=8}
3	14			hbD2 <i>p.o.</i> 1.2 mg/kg/día {0.4 mg/kg TID}	* Pulmones congelados para determinación de citoquinas (N=6)
4	14			hbD2 <i>i.n.</i> 1.2 mg/kg/día {0.4 mg/kg TID}	

Figura 2

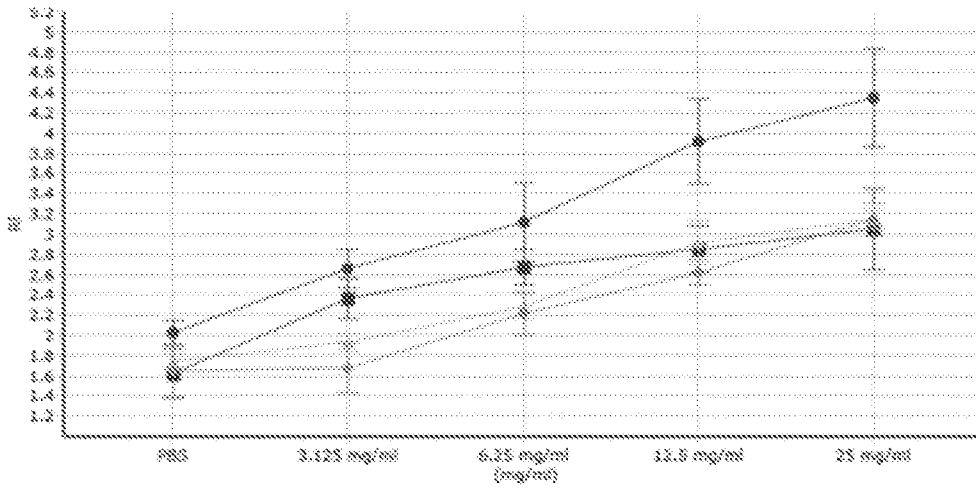


Figura 5A

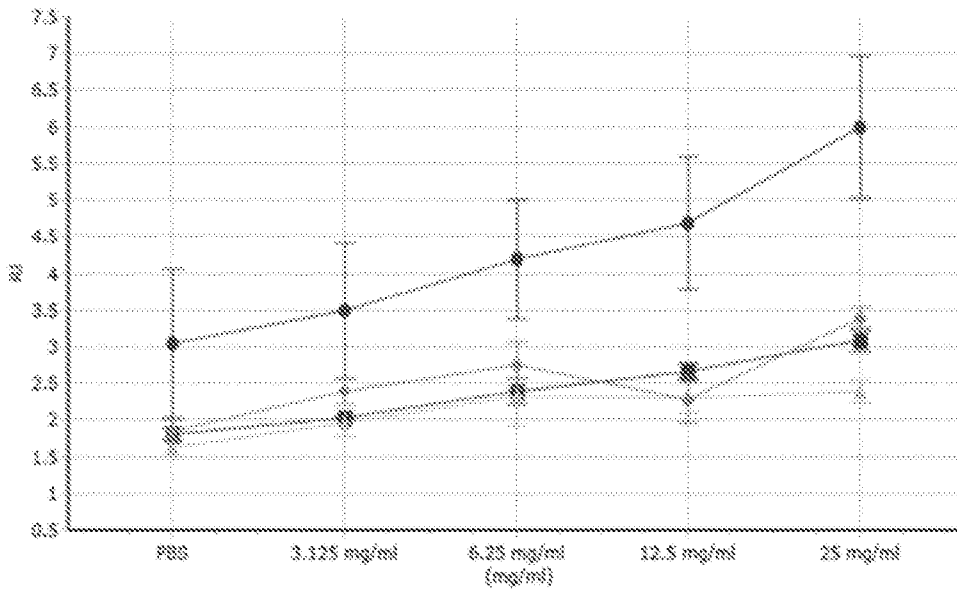


Figura 5B

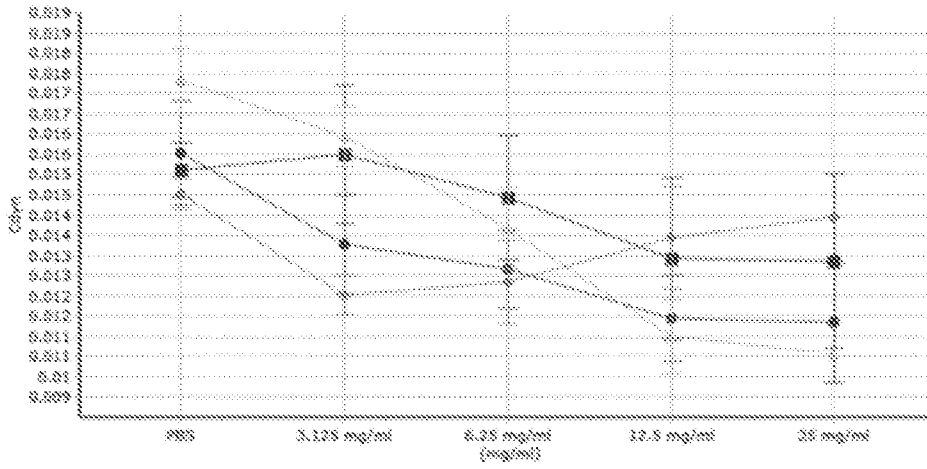


Figura 6A

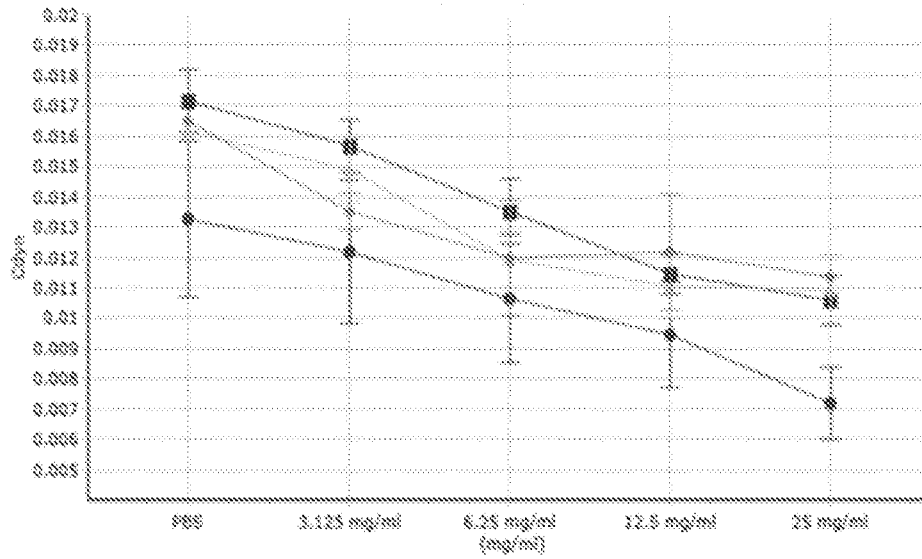


Figura 6B

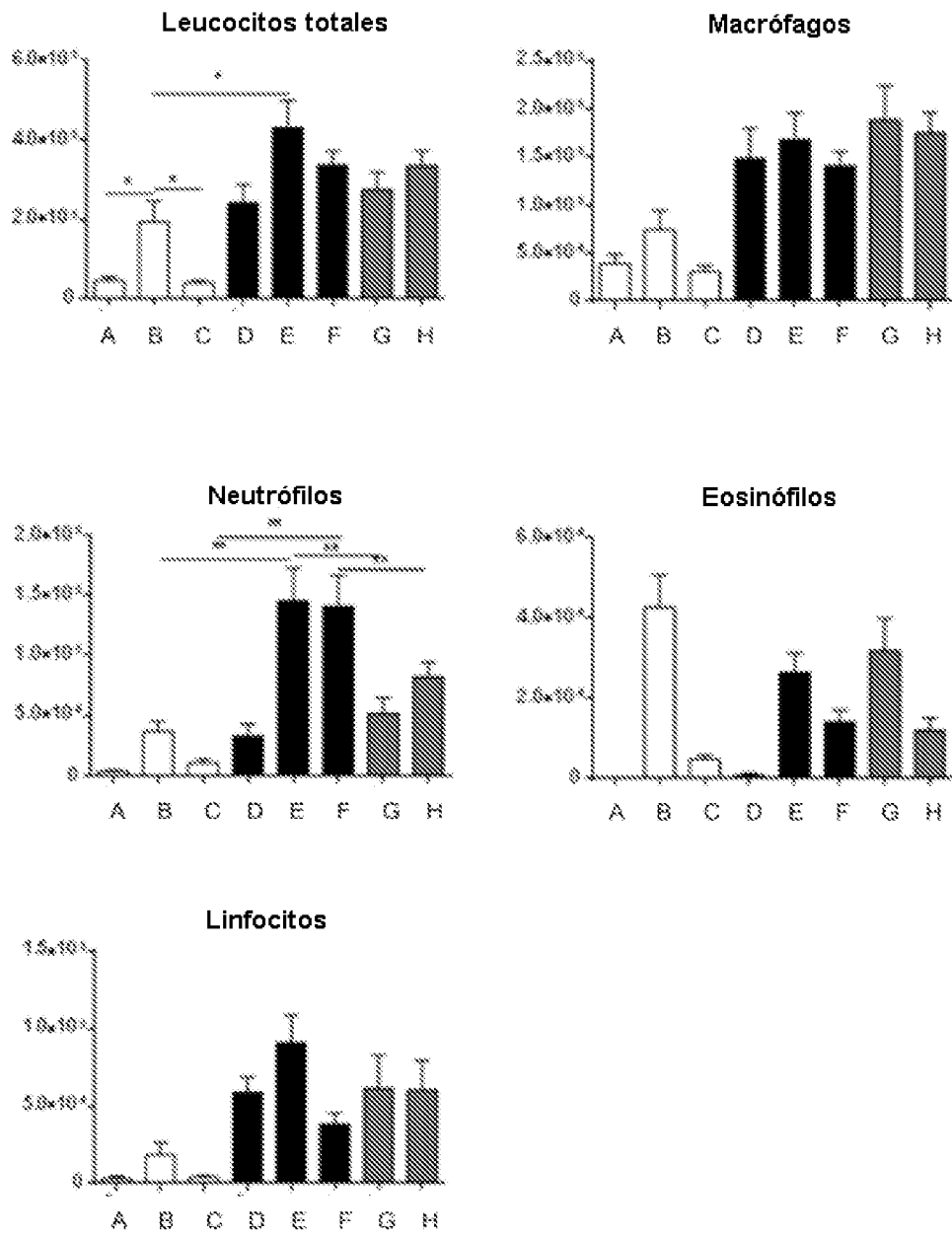


Figura 7

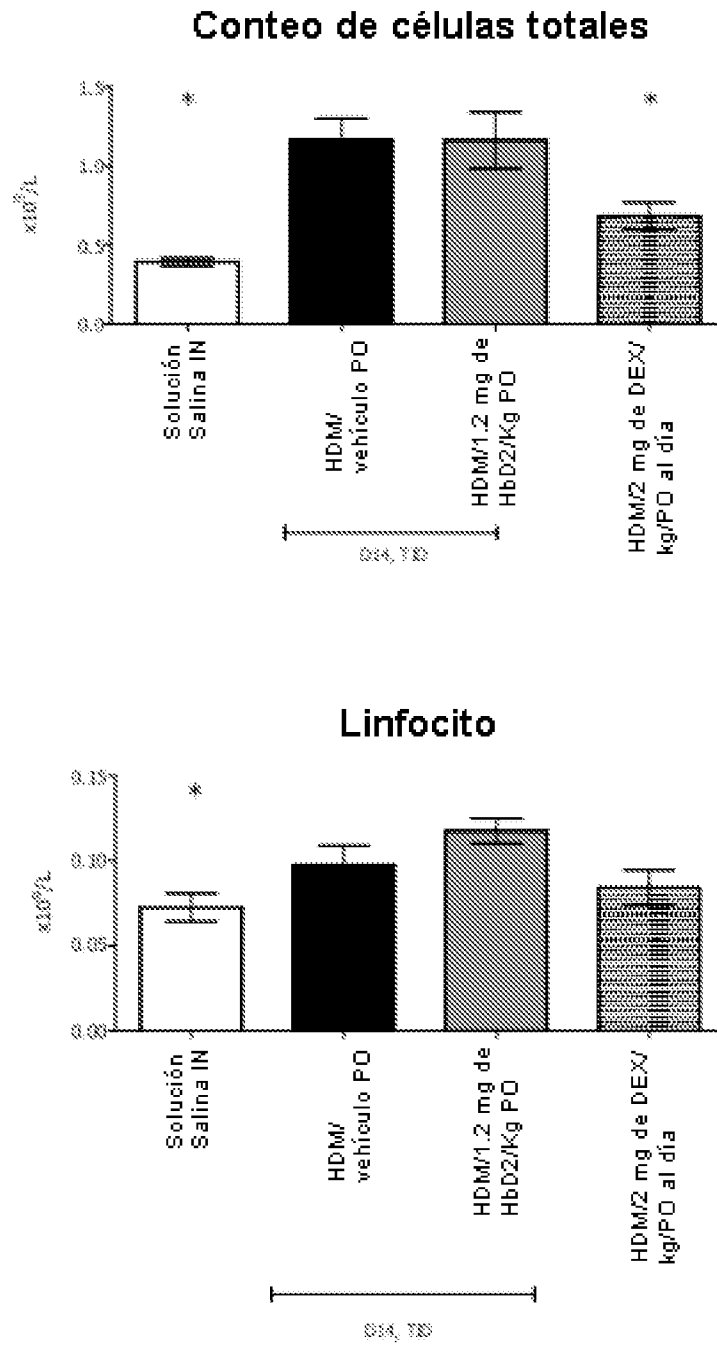


Figura 8a

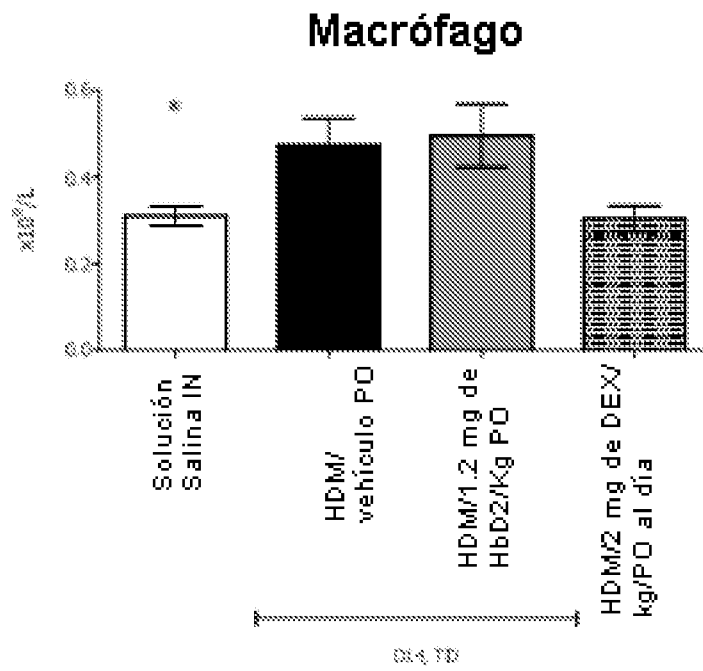


Figura 8a continuación

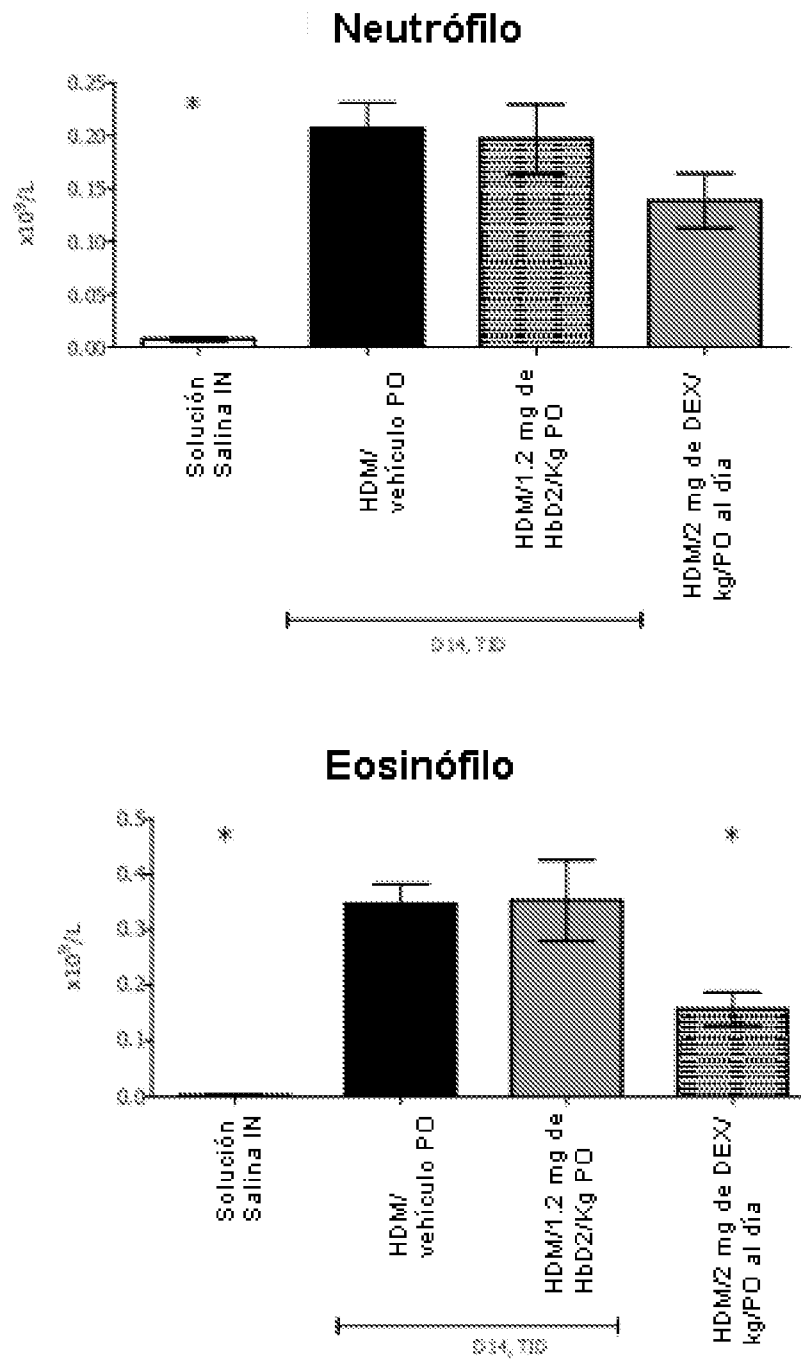
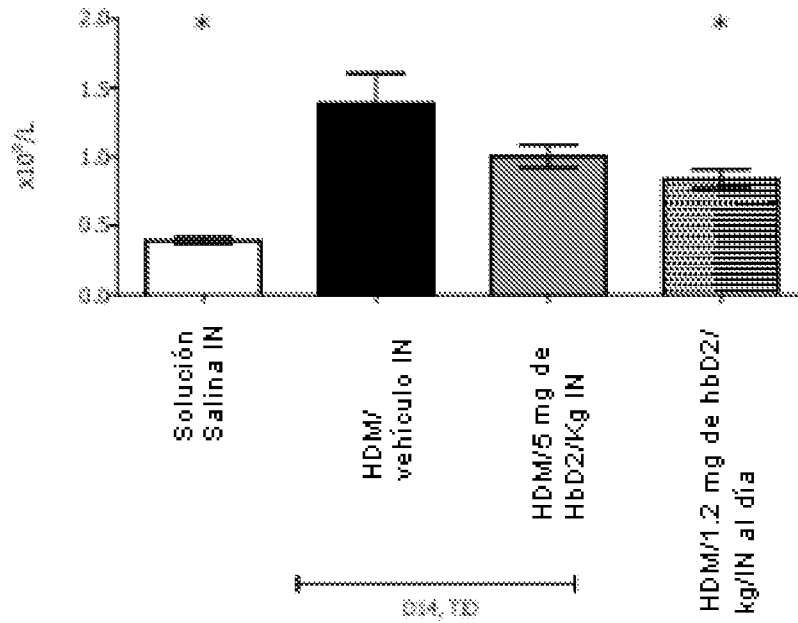


Figura 8a continuación

Conteo de células totales



Linfocito

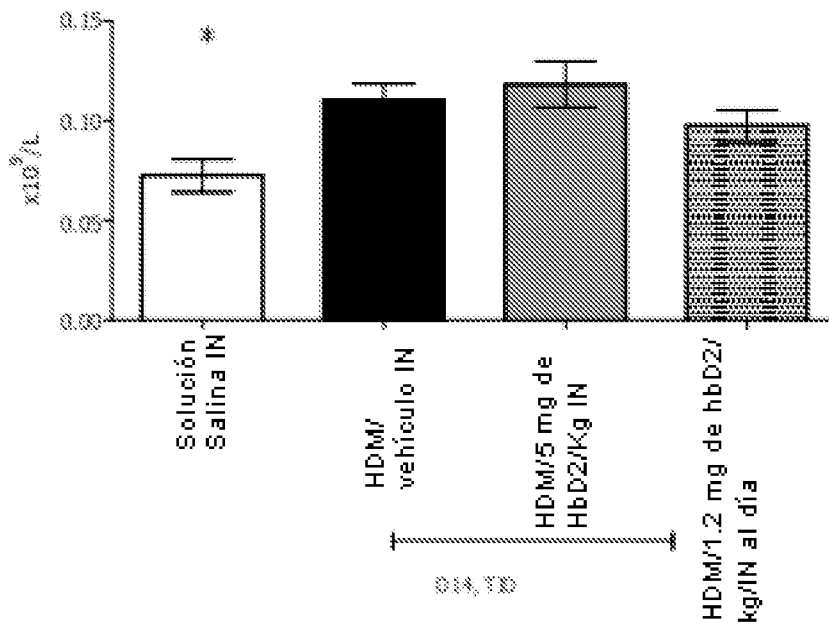


Figura 8b

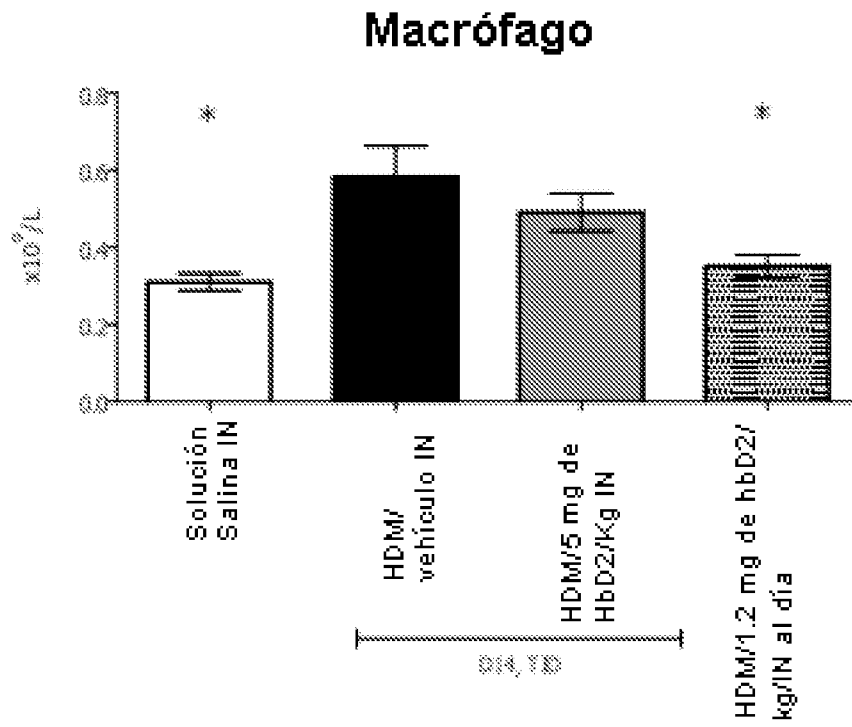


Figura 8b continuación

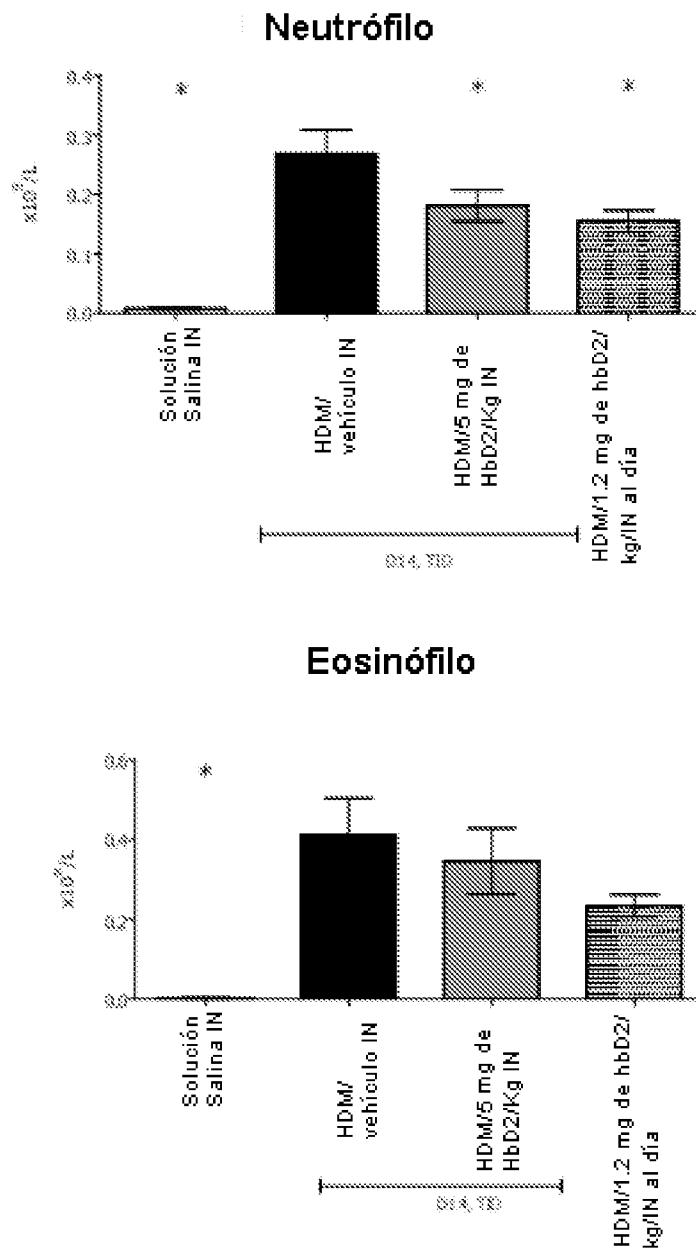


Figura 8b continuación

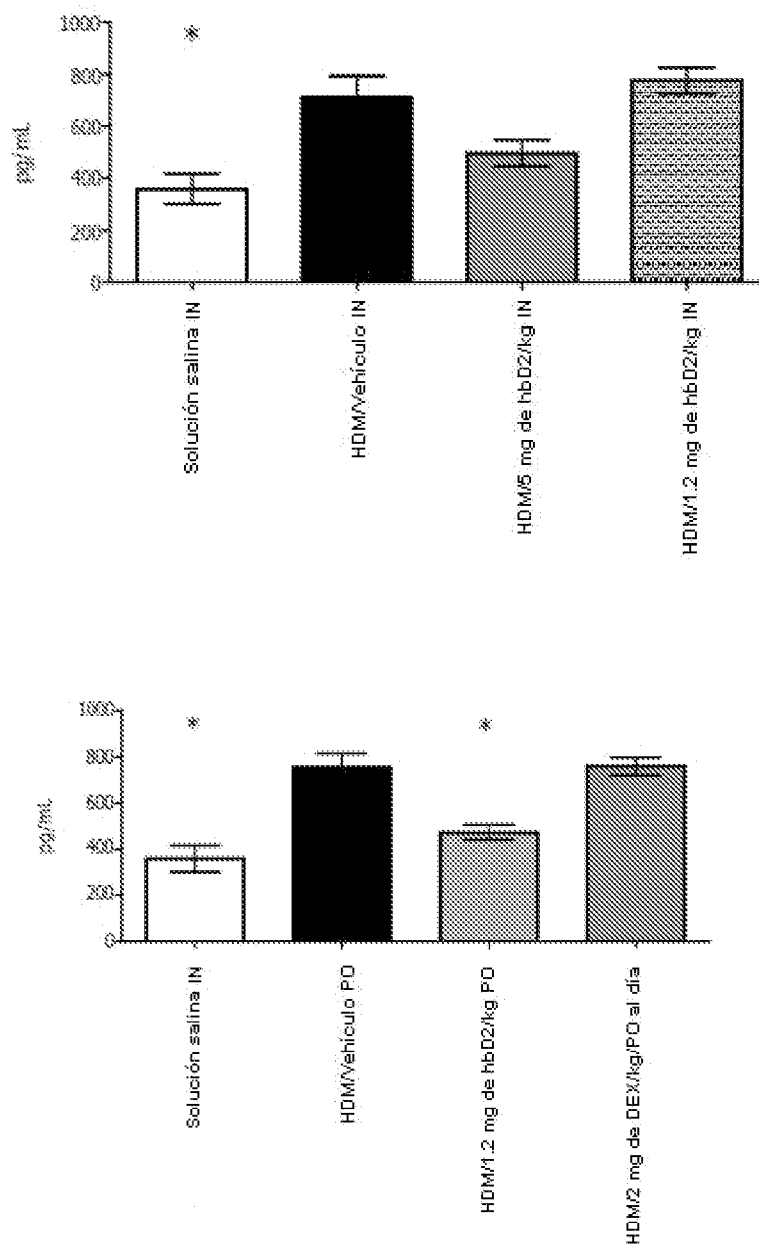


Figura 9

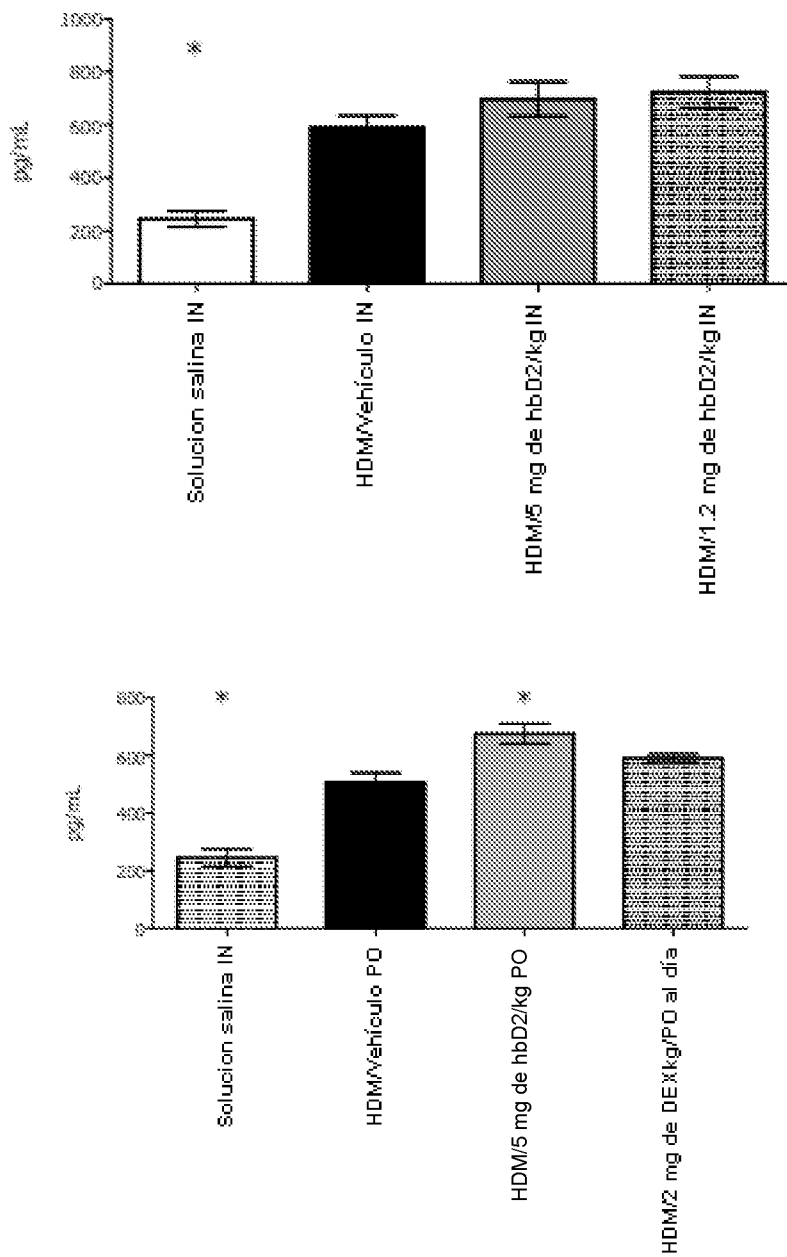


Figura 10

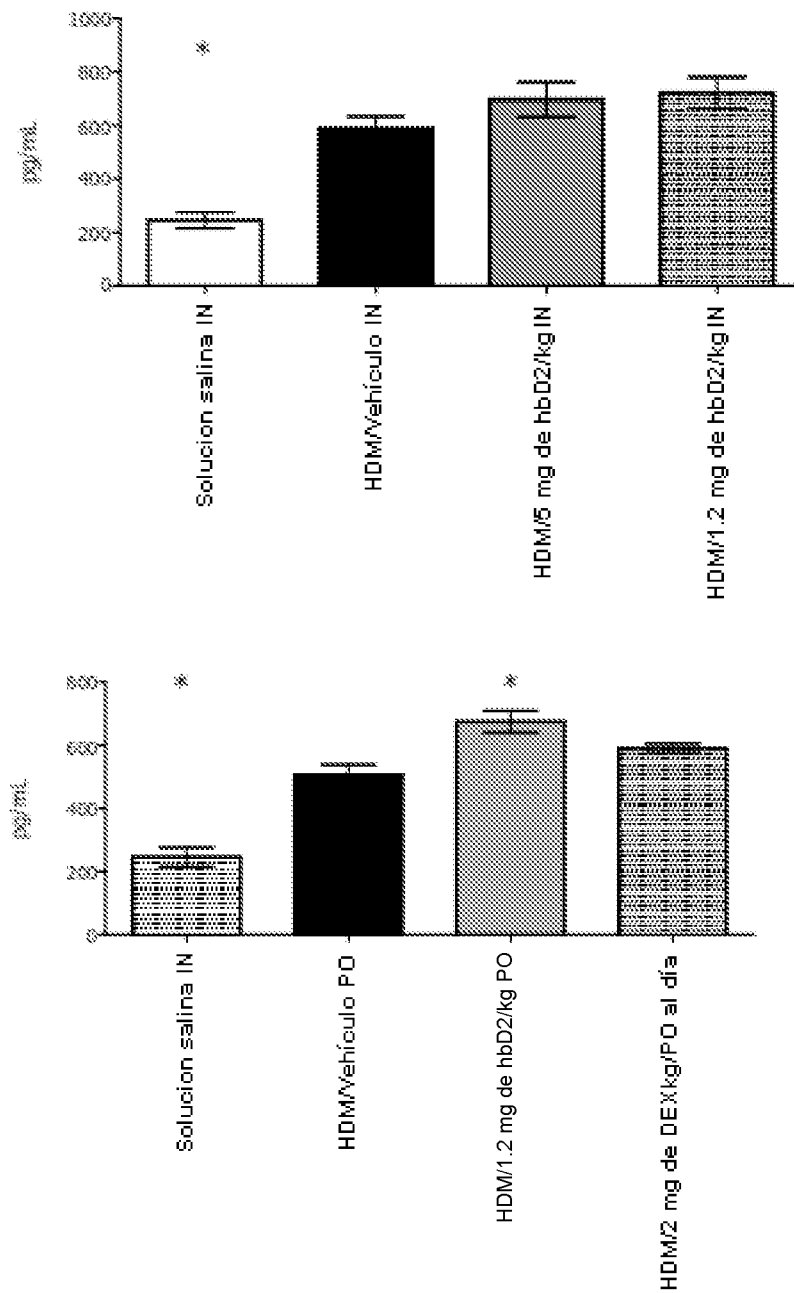


Figura 11

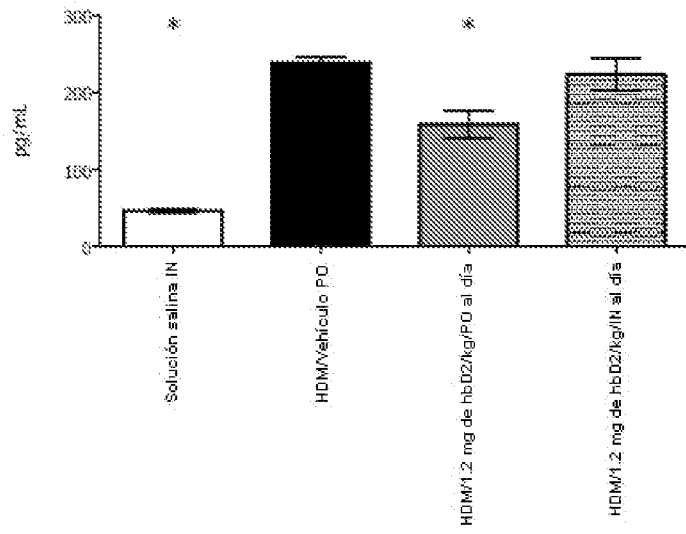


Figura 12

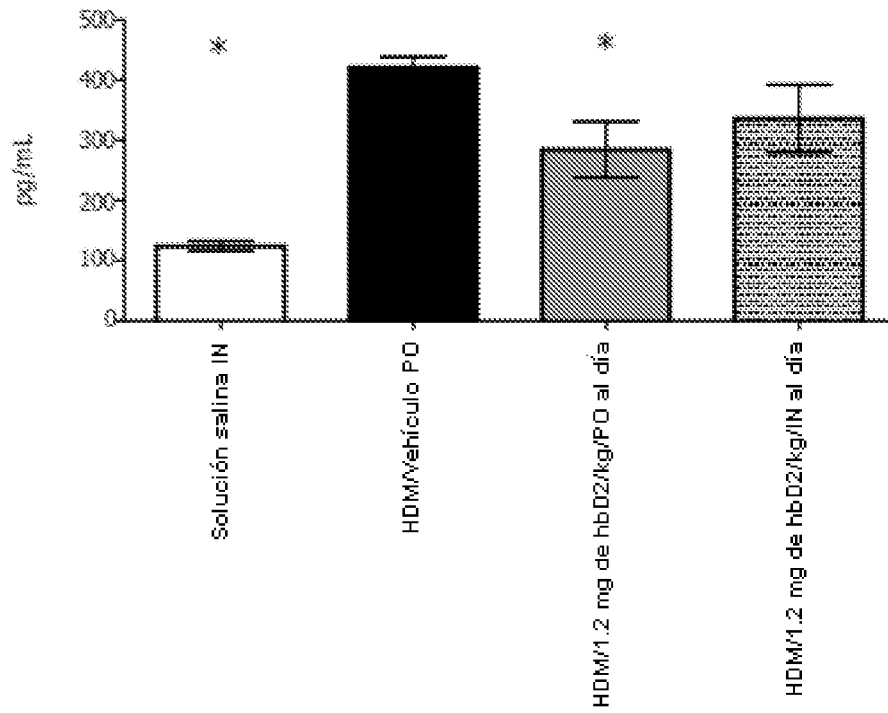


Figura 13

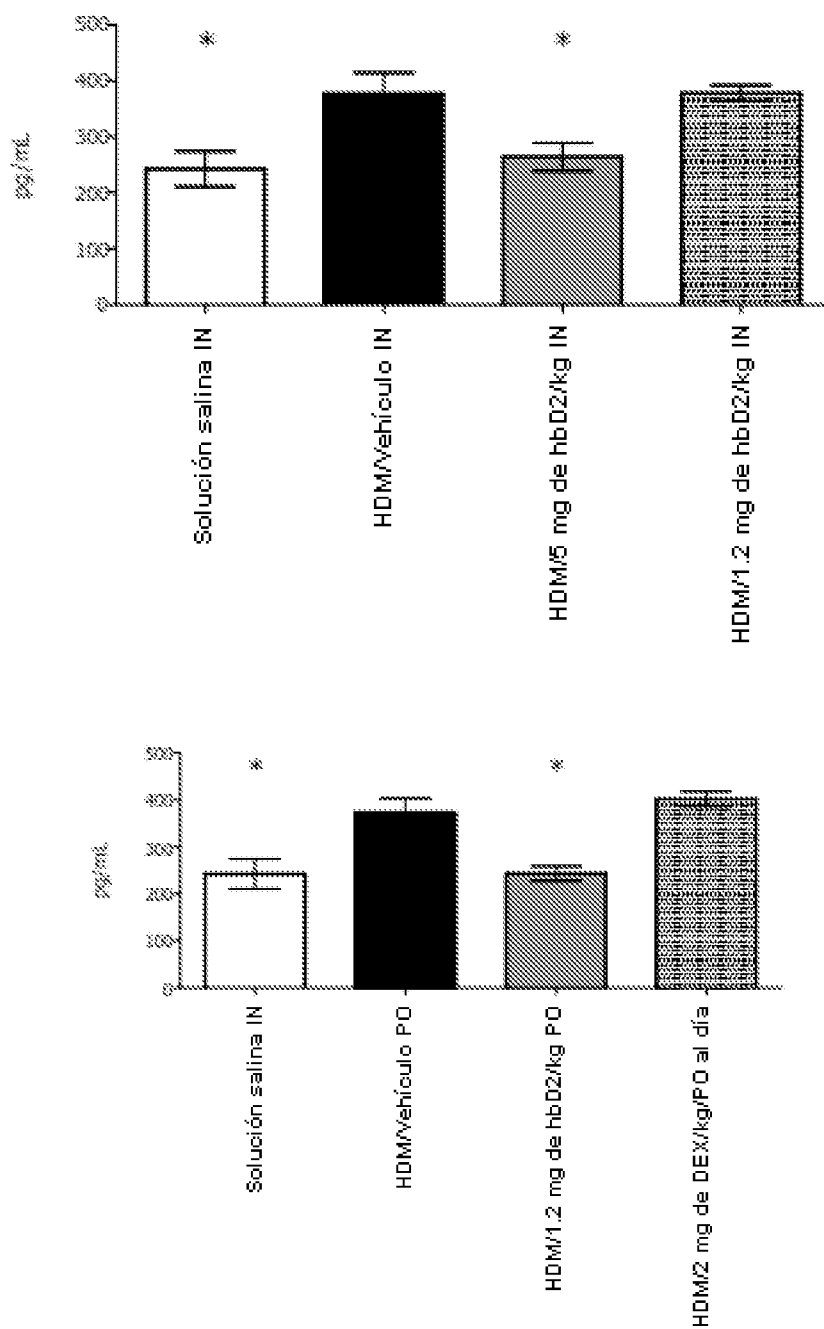


Figura 14

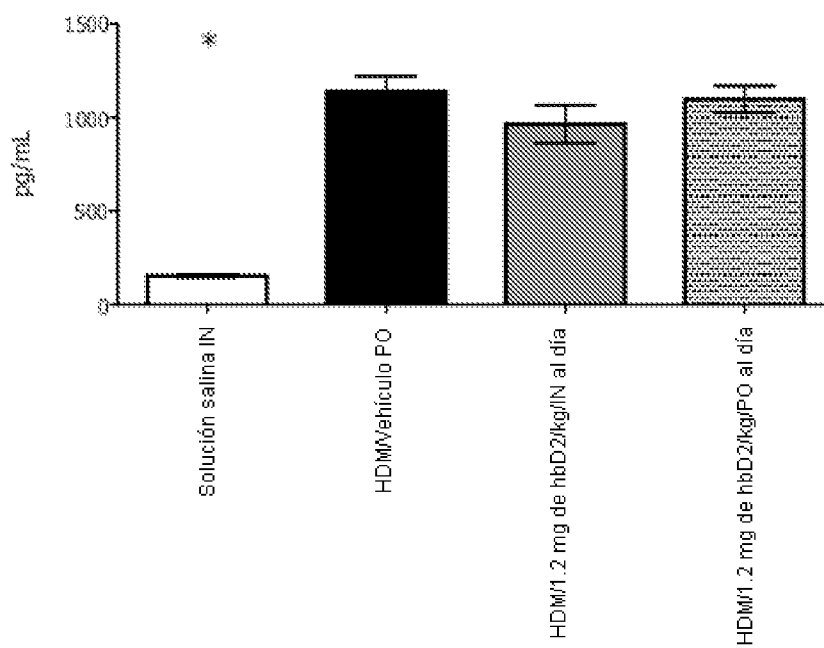


Figura 15

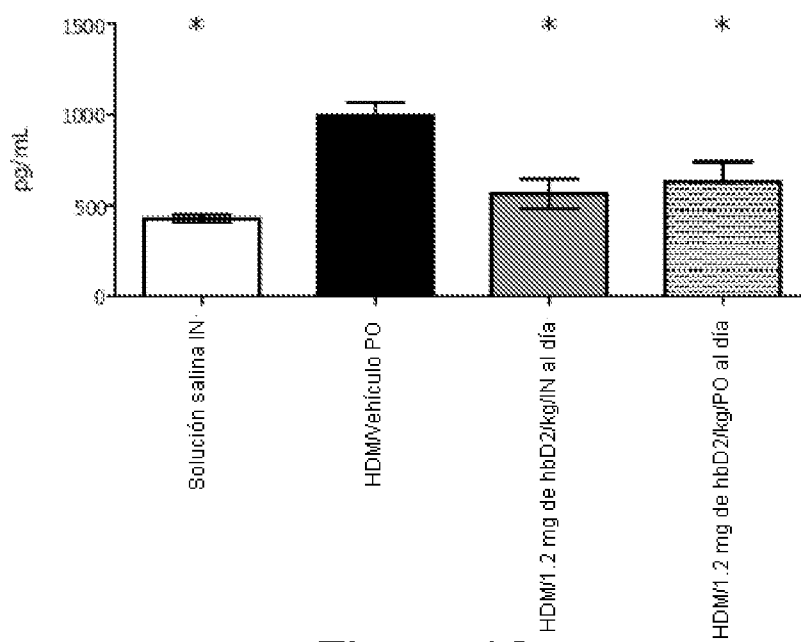


Figura 16

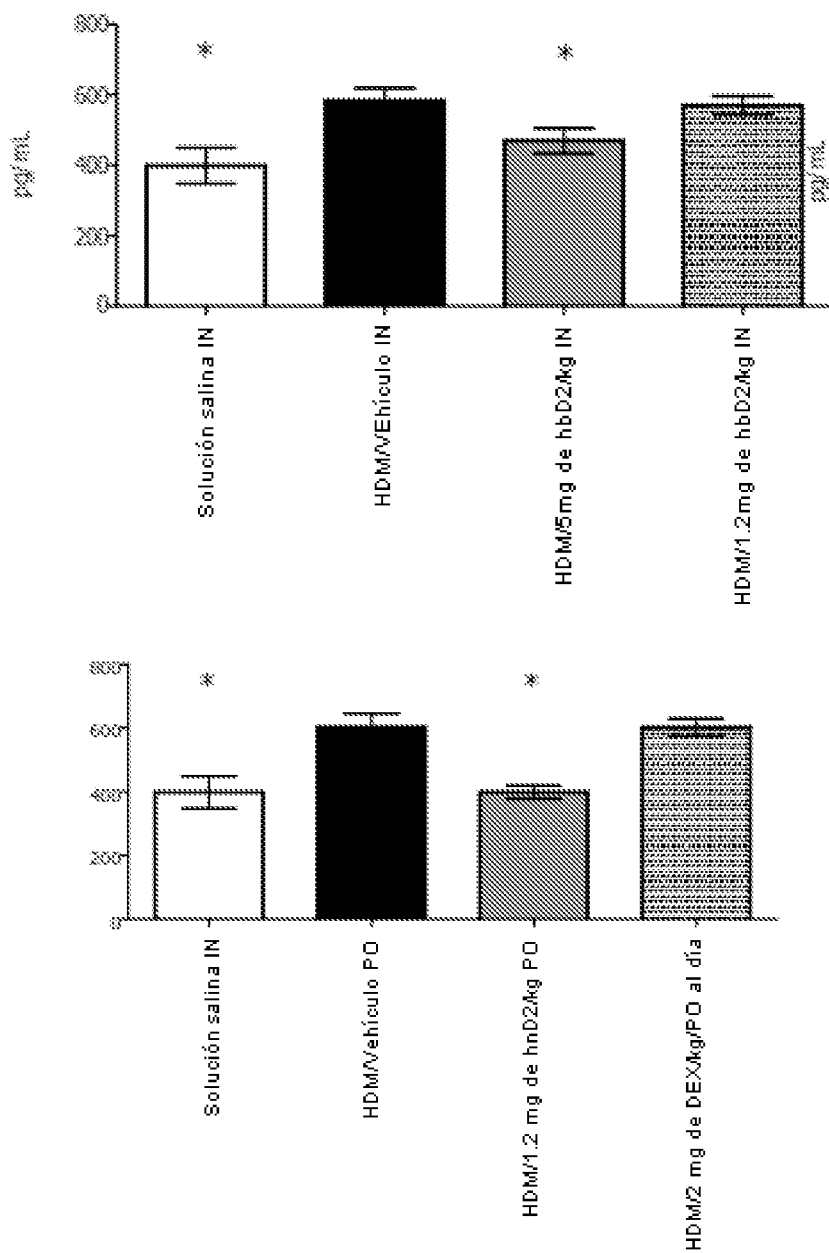


Figura 17

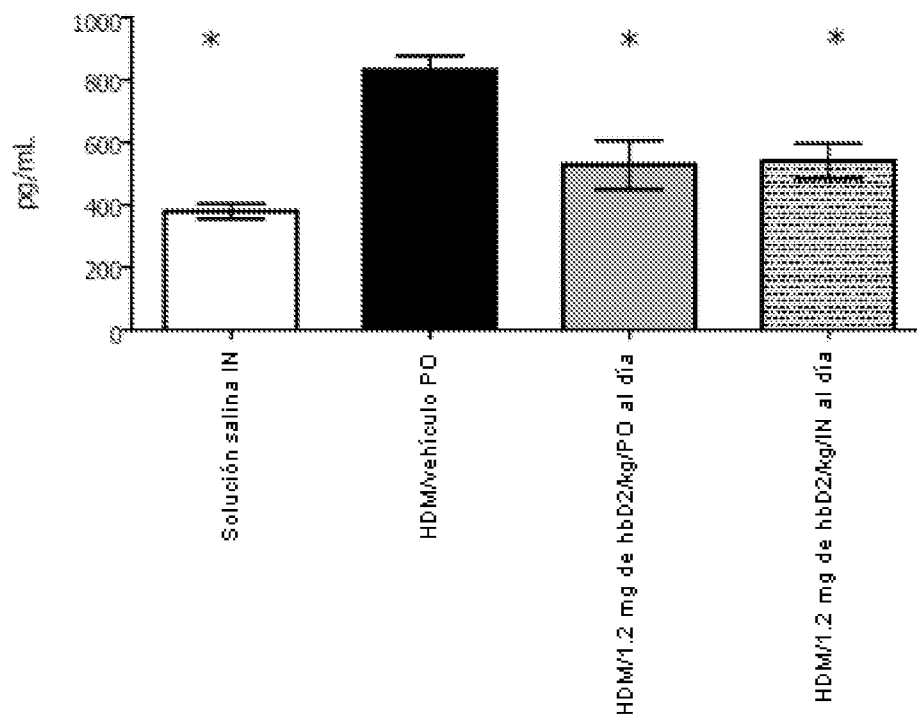


Figura 18

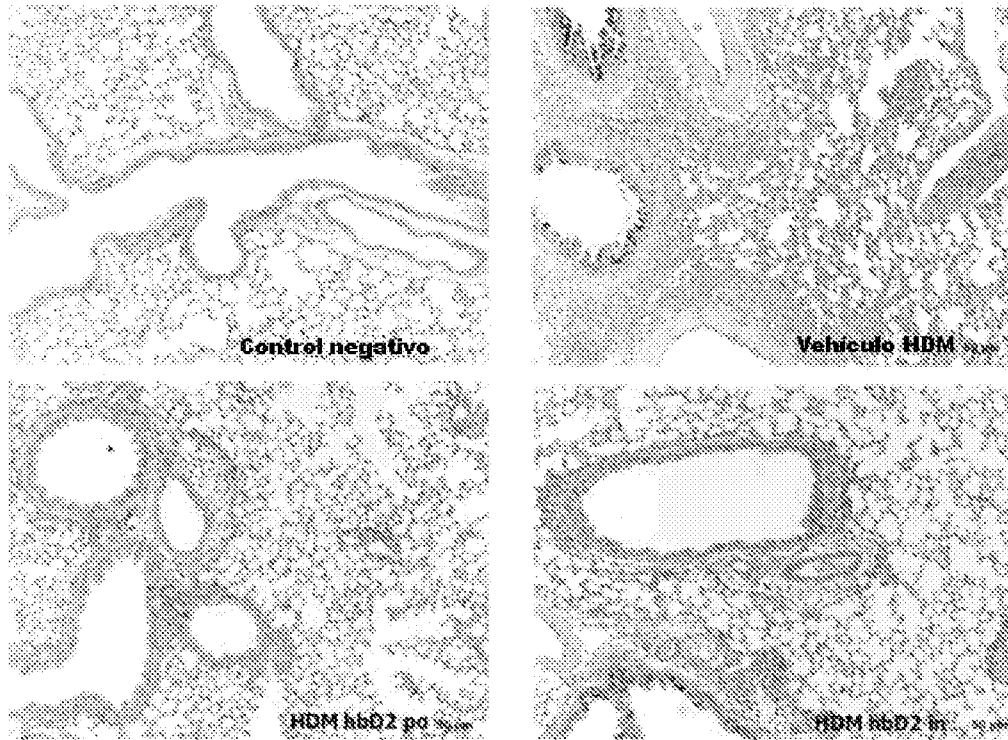


Figura 19

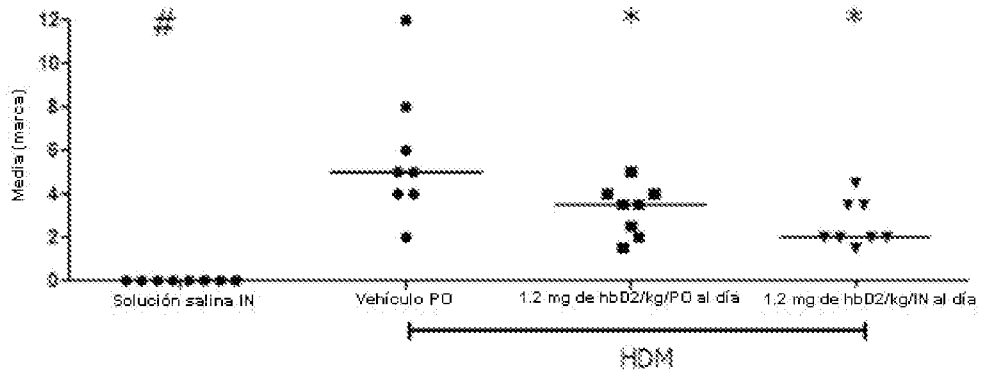


Figura 20

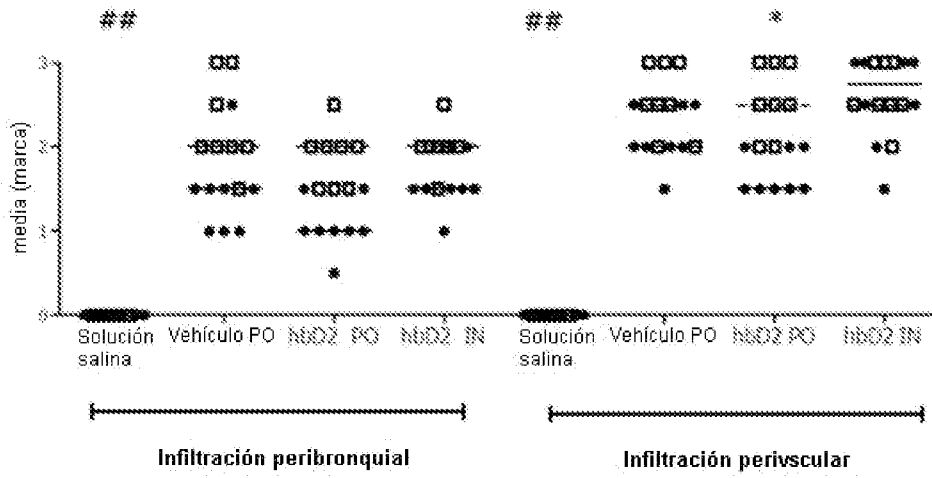


Figura 21

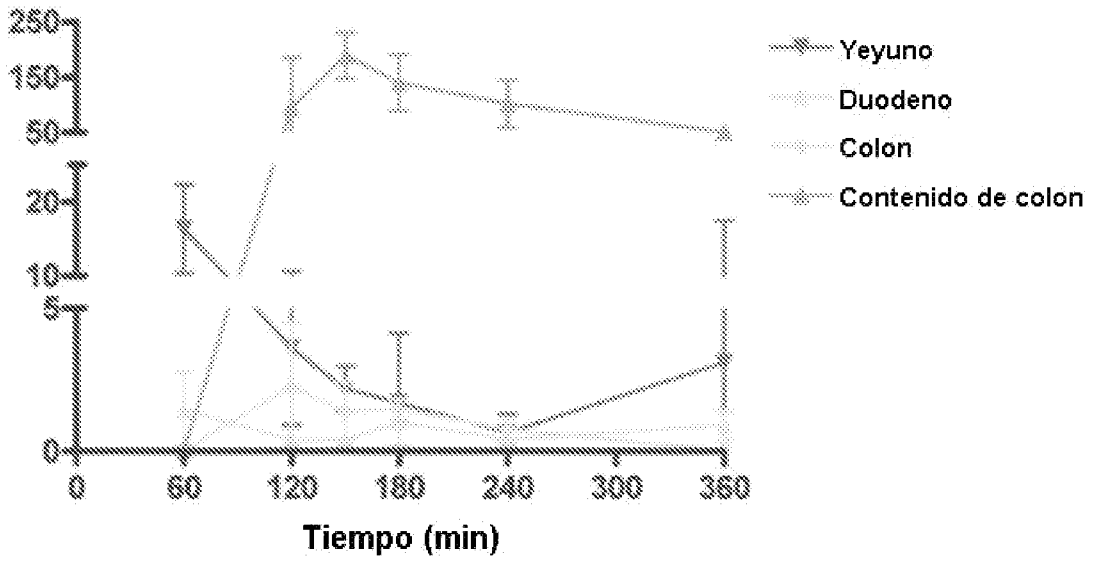


Figura 22

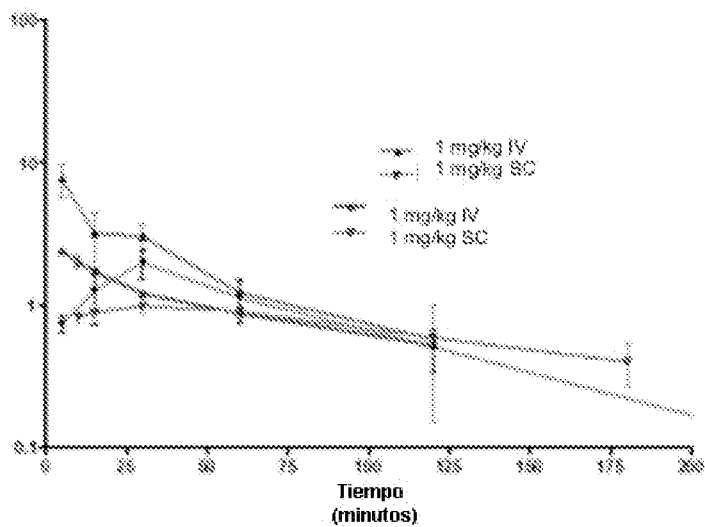


Figura 23

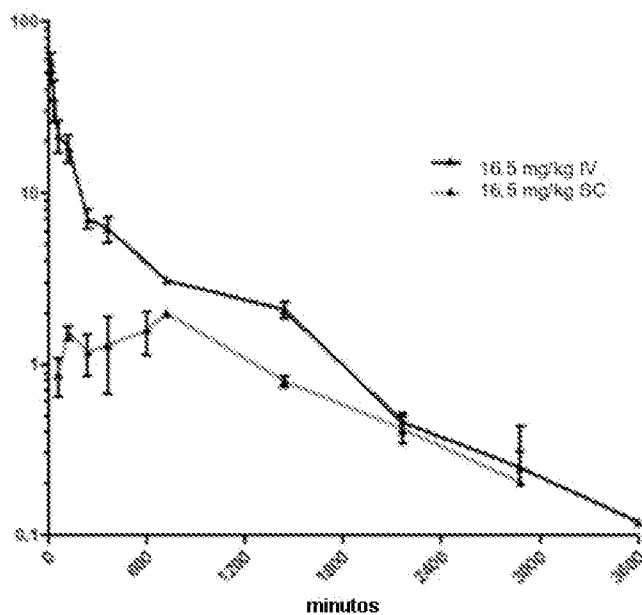


Figura 24

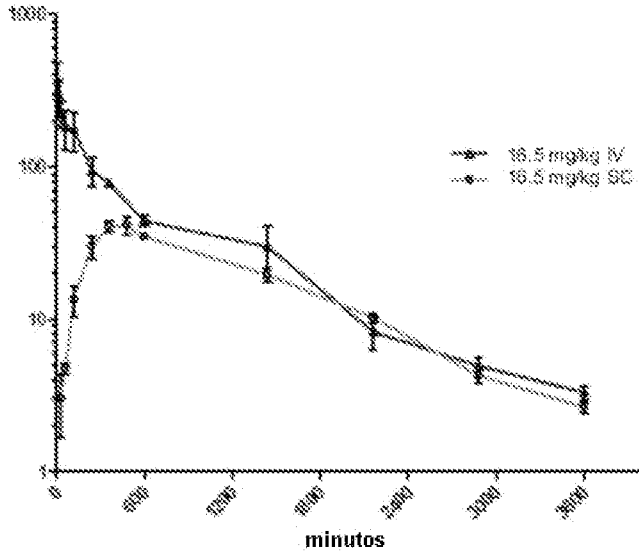


Figura 25

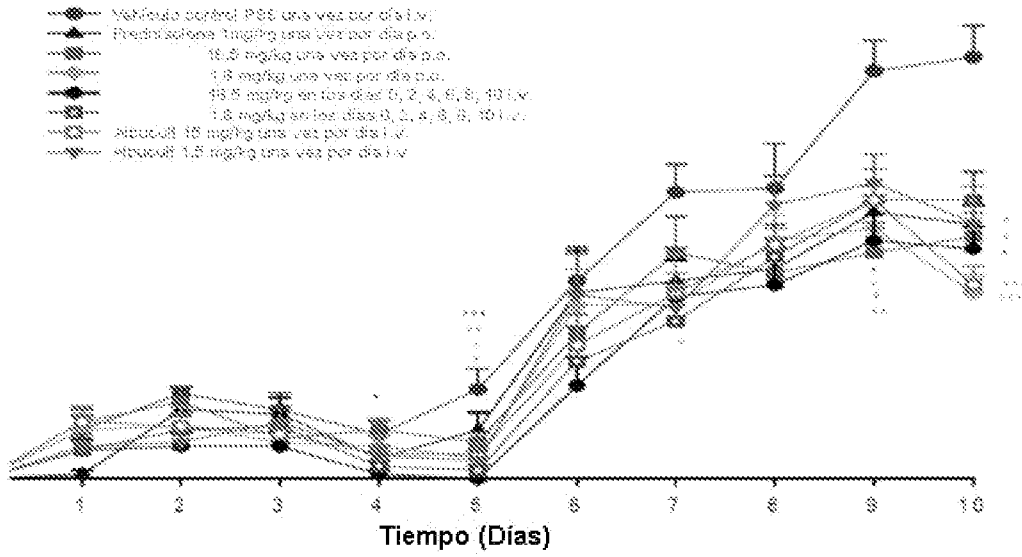


Figura 26

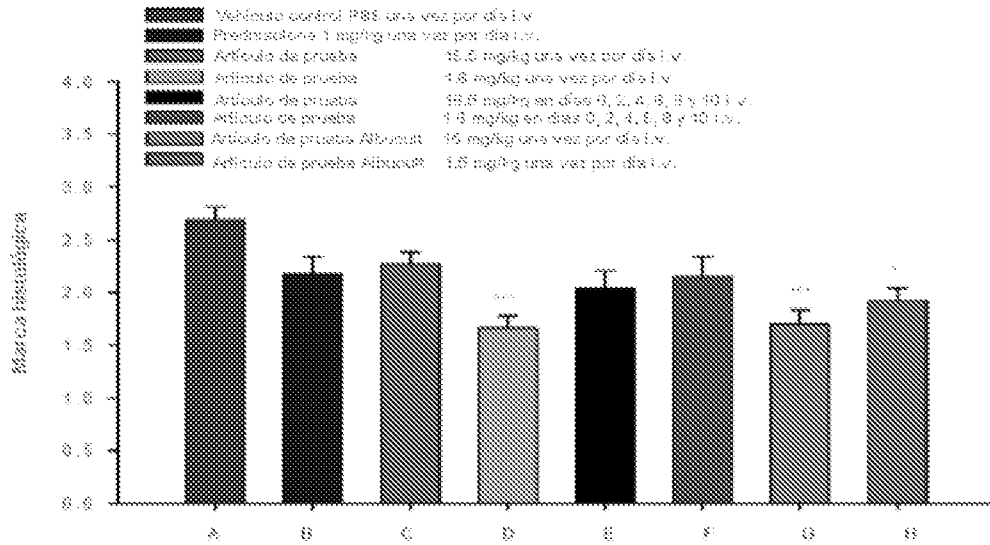


Figura 27

# de Grupo	N	Sensibilización s.c. (día 0)	Inoculado i.o./ratón Día 14	Tratamiento Días 11, 12 y 13	Mediciones y muestreo 48 hrs. seguidas de la inoculación (día 16)
1	12	100 µl de CFA disuelta en solución salina	50 µL de solución salina		• AHR (resistencia y compliancia; Buxco) N=6/grupo
2	12	100 µ de HDM/0.2 mL de solución salina+CFA/ ratón	25 µg de HDM/50 µL de solución salina	Vehículo i.n.	• BALF (conteo celular diferencial y total) N=12/grupo
3	12			Vehículo p.o.	• Pulmones (Congelados para concentración de citoquinas) N=12/grupos
4	12			hbD2 i.n. 1.2 mg/kg/día (0.4 mg/kg TID)	
5	12			hbD2 p.o. 1.2 mg/kg/día (0.4 mg/kg TID)	

Figura 28

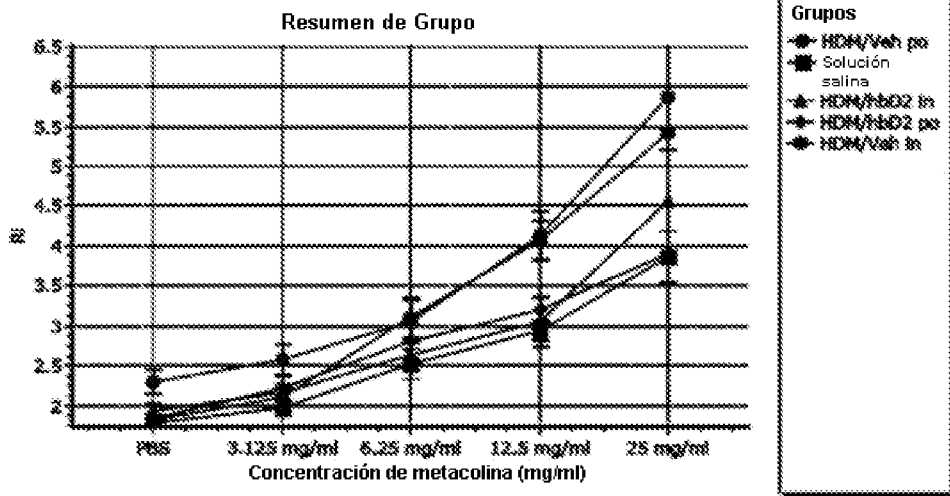


Figura 29

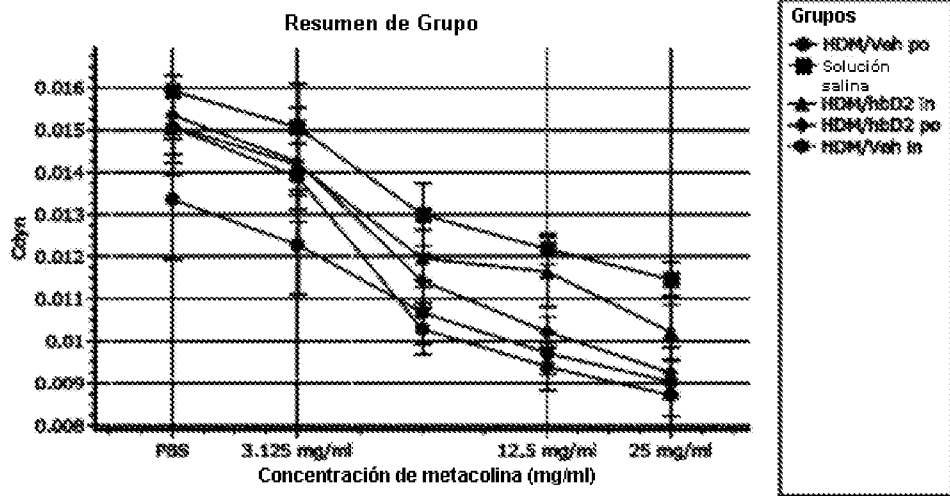


Figura 30

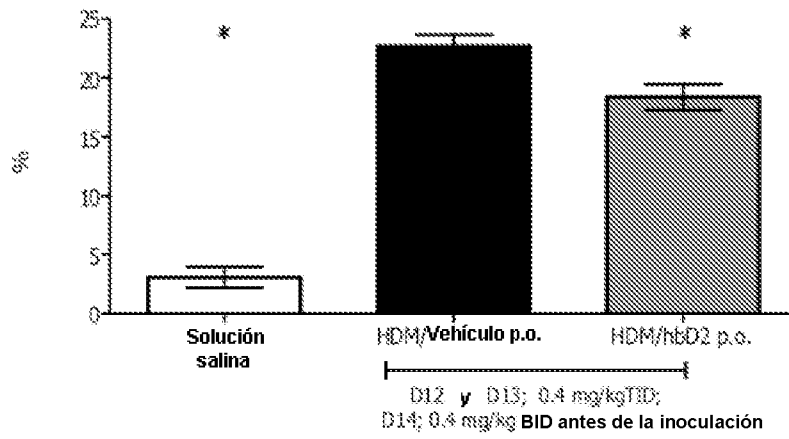


Figura 31

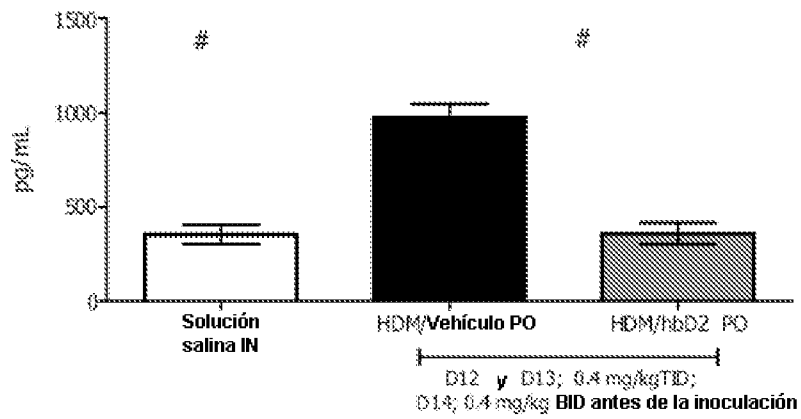


Figura 32

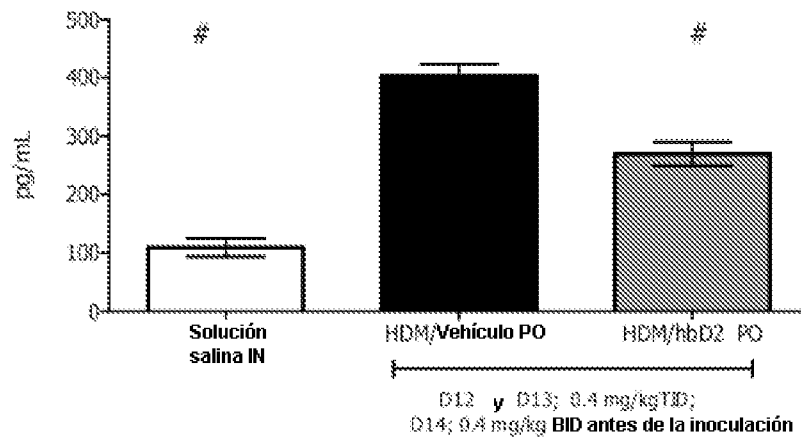


Figura 33

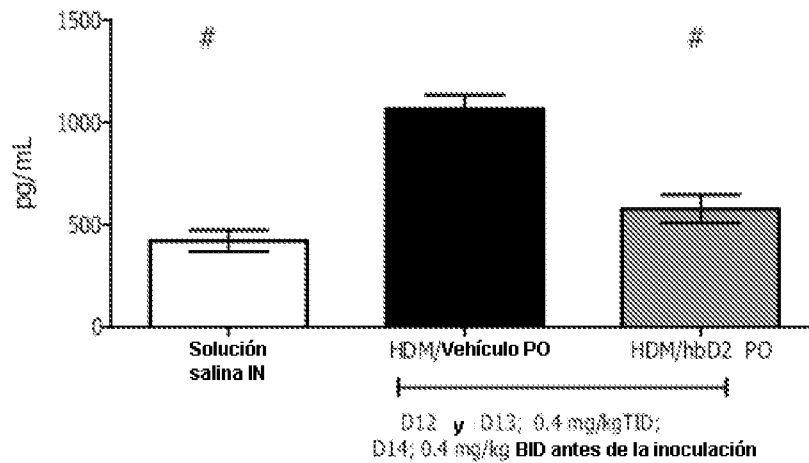


Figura 34

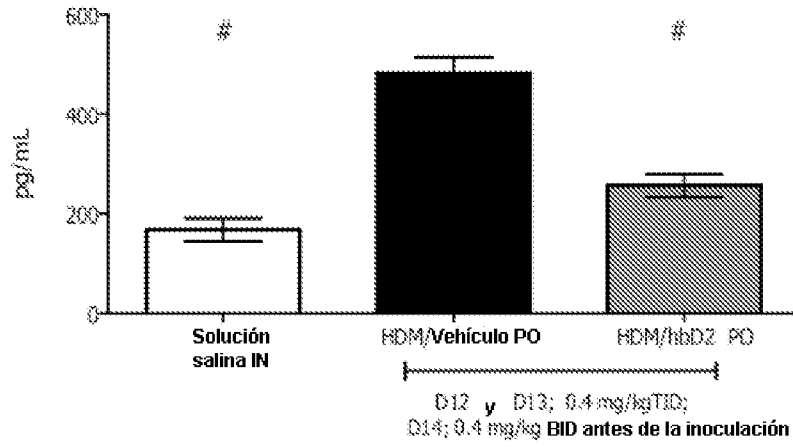


Figura 35

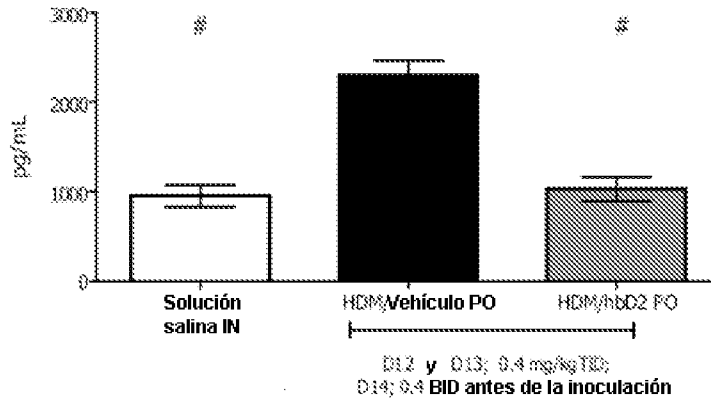


Figura 36

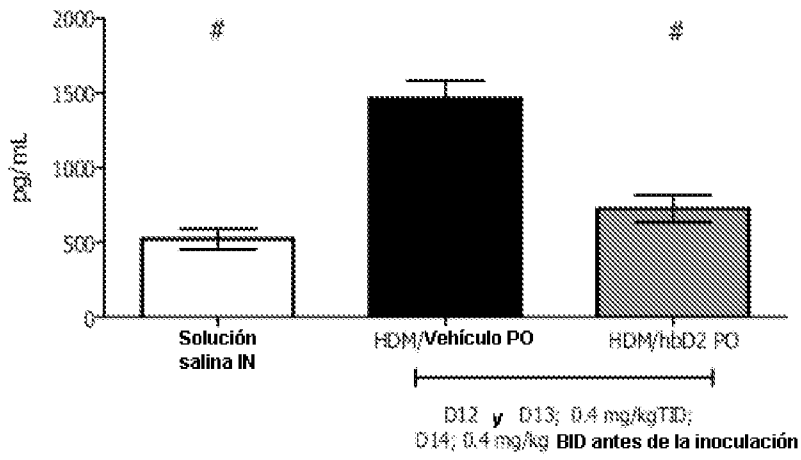


Figura 37

Estudio profiláctico

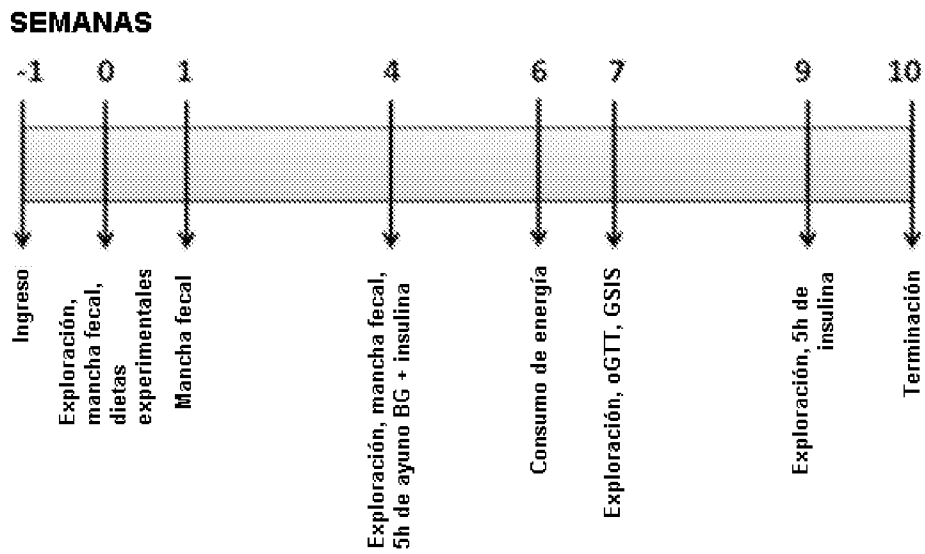


Figura 38

Estudio terapéutico

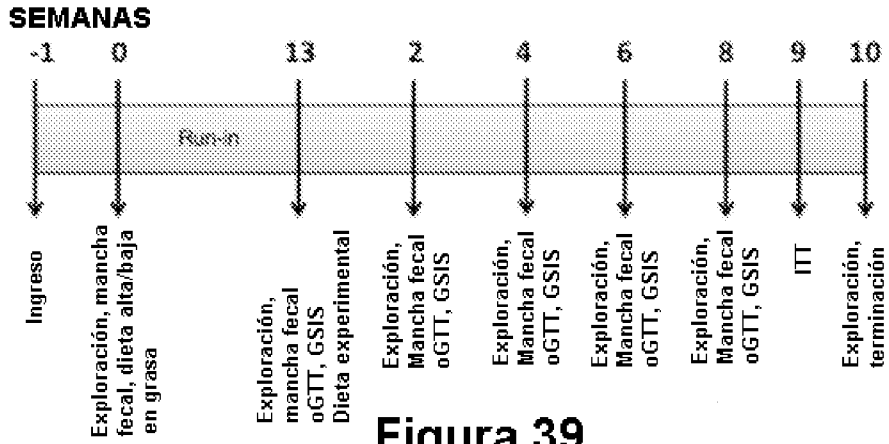


Figura 39

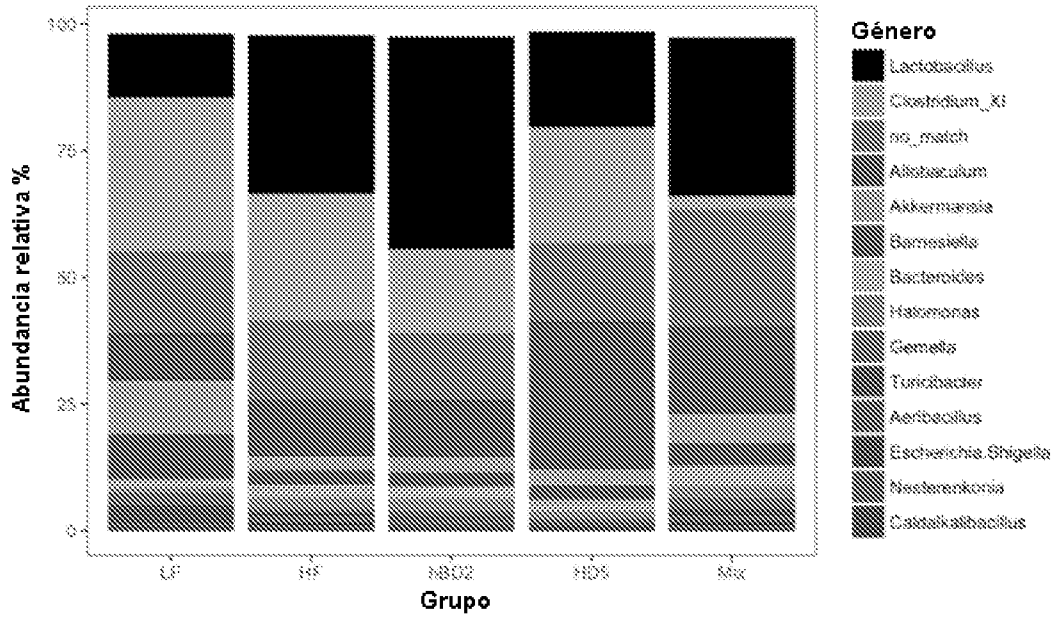


Figura 40

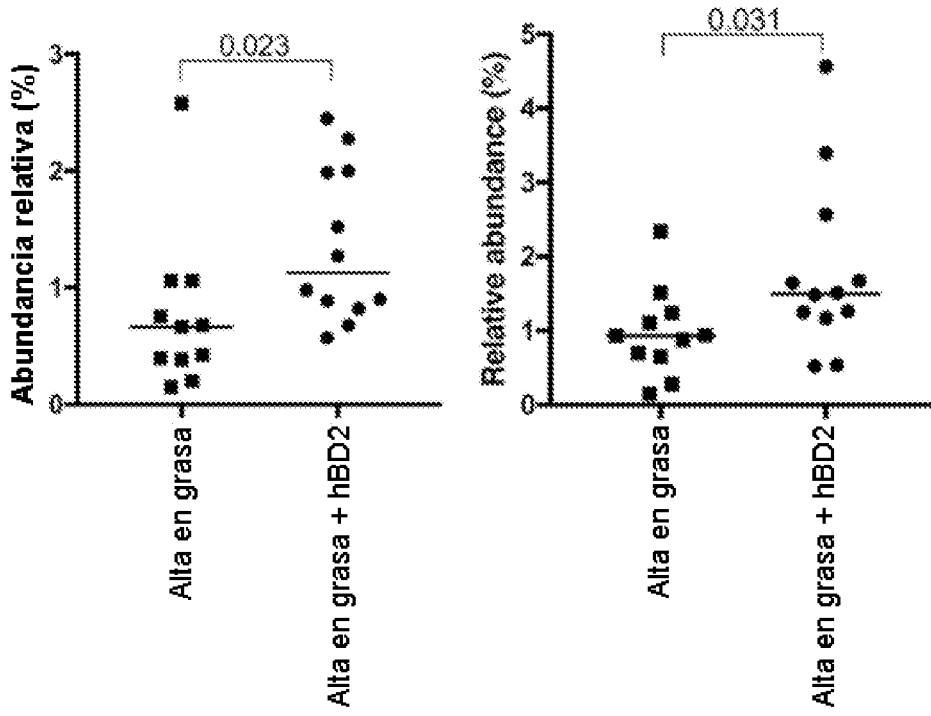


Figura 43

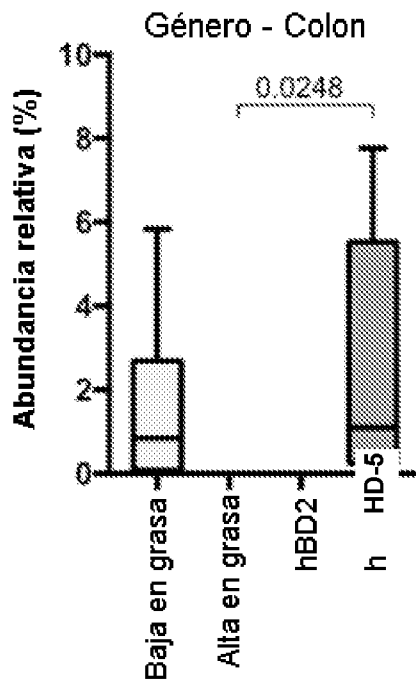


Figura 44

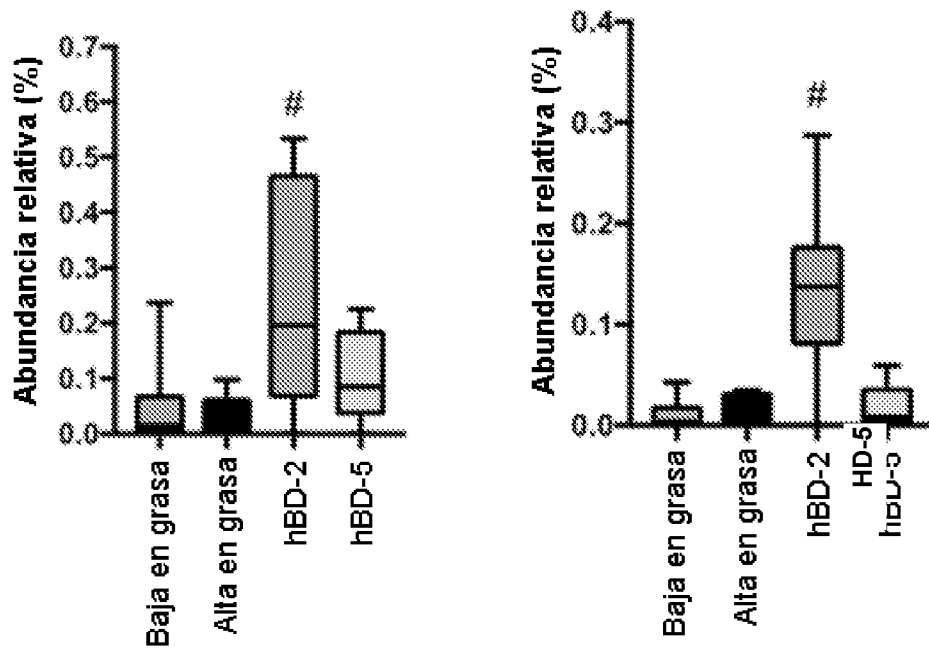


Figura 45