



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0108106
 (43) 공개일자 2019년09월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1729 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7019175
- (22) 출원일자(국제) 2017년12월13일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년07월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/082535
- (87) 국제공개번호 WO 2018/108971
 국제공개일자 2018년06월21일
- (30) 우선권주장
 PA 2016 70991 2016년12월13일 덴마크(DK)

- (71) 출원인
디펜신 테라퓨틱스 에이피에스
 덴마크, 2200 코펜하겐, 올레 마알로에스베이 3,
 코비스 내
- (72) 발명자
노드킬드 피터
 덴마크, 2820 겐토프테, 바엘테가르드스베이 59
- 크예를프 소렌**
 덴마크, 2840 홀테, 클라크스베유 6
- (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **폐의 염증 상태를 치료하는 방법**

(57) 요약

본 발명은, 포유동물 α- 및/또는 β-디펜신의 투여에 의해 기도 과민성반응의 감소, 폐 탄성의 증가, 폐 염증의 감소, 기관지폐포액 중의 염증 세포 수의 감소 및 사이토킨 생산의 감소에 기반하는 천식, 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 폐렴, 기관지확장증, COPD, 사르코이드증 및 폐암의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/64 (2017.08)

A61K 9/0053 (2013.01)

A61K 9/007 (2013.01)

A61P 11/06 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

C07K 14/4723 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

호흡기계의 염증 질환의 치료 및/또는 예방 방법으로서,
상기 방법은 적어도 하나의 디펜신(defensin)의 경구 또는 폐내(intrapulmonary) 투여를 포함하고,
바람직하게는, 대상체는 천식을 앓고 있는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 질환이 경도(mild) 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 기관지확장증, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 기관지염, 폐렴 및 폐기종, 사르코이드증, 폐섬유증, 바람직하게는 스테로이드 난치성 천식으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 상기 방법이 적어도 하나의 디펜신의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 염증이 폐암에 의해 유발되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 조직학적 폐 염증, 기관지폐포 세정액에서 염증 세포 수를 감소시키고, 폐 조직 균질물에서 염증 사이토킨 생산의 정상화 및 사이토킨 폭풍(cytokine storm)의 예방/치료에 의해 면역계를 재조정하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 폐 탄성(pulmonary compliance)을 증가시키고 기도 과민성반응을 감소시키고/시키거나 최대 날숨 유량(peak expiratory flow)을 증가시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 유전자 풍부함(gene richness), 파일리(phylae) 수를 증가시키고, 부티레이트 생산 및/또는 트립토판 생산을 증가시키고, 폐 미생물총(microbiota)의 아세테이트 생산 및/또는 폐 미생물총으로부터의 아세테이트 생산을 감소시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 폐 내의 정상 미생물총을 유지 및/또는 안정화하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, 1초에서의 강제 호흡 용적(FEV1) 및/또는 최대 날숨 유량(PEFR)을 증가시키거나, PEFR 변동성을 감소시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신이 HD5, HD6, hBD-1, hBD-2, 절단형(truncated) hBD2, hBD-3 및 hBD-4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 조성물에 포함되고, 상기 조성물이 하나 이상의 디펜신, 예를 들면, 2개의 디펜신, 예를 들면, 3개의 디펜신을 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 2개의 디펜신이 hBD-2 및 HD5인, 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적 조성물인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신이 세포 침투성 펩티드(CPP), 알부민 결합 부분(ABM), 검출가능한 부분(Z) 및 반감기 연장 펩티드로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가 부분을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 추가 부분이 반감기 연장 펩티드인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 반감기 연장 펩티드가 신생아 Fc 수용체(FcRn), 트랜스페린, 알부민(HAS), XTEN[®] 또는 PEG, 호모-아미노산 중합체(HAP), 프롤린-알라닌-세린 중합체(PAS) 또는 엘라스틴-유사 펩티드(ELP), 히알루론산, 음으로 하전된 고도로 시알릴화된 펩티드, 예를 들면, 옴모막 고키나도트로핀(CG) β 쇠의 카복시-말단 펩티드(CTP), 인간 IgG 및 CH₃(CH₂)_nCO-(여기서, n은 8 내지 22이다)에 결합할 수 있는 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 1주당 2회 초과인 천식 증상, 예를 들면, 일상적 증상, 예를 들면, 연속 증상을 갖는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 상이한 강도의 천식 발작, 예를 들면, 활동에 영향을 미치는 발작, 예를 들면, 신체 활동을 제한하는 발작을 갖는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 1개월당 2회 초과인 야간 천식 증상, 예를 들면, 주간 동안 지속할 수 있는 1주당 2회 초과, 예를 들면, 야간에 빈발하는 증상을 갖는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 1초에서의 강제 호흡 용적(FEV1) < 80%, 예를 들면, 60 내지 80%의 FEV1, 예를 들면, FEV1 < 60%를 갖는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 20% 초과인 변동성, 예를 들면, 20-30%의 PEFr 변동성, 예를 들면, 30% 초과인 PEFr 변동성, 예를 들면, 60% 초과인 PEFr 변동성을 갖는 최대 날숨 유량 PEFr을 갖는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신이 글루코코르티코이드, β-작용제(β-agonist), 류코트리엔 수용체 길항제, 테오필린, 항생제, 리팍시민, 면역억제제, 화학요법 또는 면역요법, 프레바이오틱스(prebiotics), 프로바이오틱스(probiotics), 트립토판, 단쇄 지방산, HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4, 카텔리시딘, 락토펜, 락토펜리신, 리소자임, 대변 이식물 또는 이들의 임의의 조합물과 조합하여 투여되는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 1일 투여량이 0.1 내지 10mg 디펜신/kg, 예를 들면, 0.5 내지 5mg 디펜신/kg, 예를 들면, 1일당 1 내지 2mg 디펜신/kg, 예를 들면, 1일당 1.2mg 디펜신/kg인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 디펜신이 1일에 적어도 1회, 예를 들면, 1일에 적어도 2회, 예를 들면, 1일에 적어도 3회, 예를 들면, 1일에 적어도 4회, 예를 들면, 1일에 적어도 5회 또는 연속적으로 투여되는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폐내 투여가 기관내, 기관지내 또는 기관지-폐포인, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폐내 투여가 흡입기, 네블라이저(nebulizer) 또는 기화기에 의한 것인, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폐암이 소세포 폐암 또는 비-소세포 폐암이고, 임의로 상기 암이 방사선 요법, 화학요법 및/또는 수술에 의해 치료되는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중의 어느 한 항에 따르는 치료 방법에 사용하기 위한 디펜신 폴리펩티드.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 정의된 장애를 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한 디펜신 폴리펩티드의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 포유동물 α- 및/또는 β-디펜신(defensin)의 투여에 의해 기도 과민성반응의 감소, 폐 탄성(pulmonary compliance)의 증가, 폐 염증의 감소, 혈관주변 또는 기관지주변 염증의 감소, 기관지폐포액 중의 염증 세포 수의 감소 뿐만 아니라 사이토킨 생산의 정상화 및 사이토킨 폭풍(cytokine storm)의 예방에 의한 면역계의 재조정에 기반하는 천식, 경도(mild) 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 폐렴, 기관지확장증, COPD 및 폐암을 포함하는 폐의 염증 상태의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 천식은 만성 염증, 기도 과민성반응, 및 재발성 천명, 기침 및 짧은 호흡의 증상을 특징으로 하는 기도의 이질성 염증 질환이다. 천식은 세계적으로 3억명이 발병하는 주요한 공중 위생 문제이고, 과거 30년에 걸쳐, 특히 서양에서 유병율이 상당히 증가하고 있다[참조: Cosmi et al., 2011]. 그러나, 병인의 메카니즘은 여전히 규정하기 힘든 상태이다. 스테로이드 및 장시간 작용형 β-작용제(β-agonist)와의 병용 요법은 천식 치료의 주류이다. 이들 요법은 급성 염증 증상 및 사이토킨 방출을 효과적으로 억제하지만, 현재까지 질환의 예방 또는 치료법은 없다.

[0003] 경도 내지 중등도 알러지성 천식은 일반적으로 IgE 생산, 점액 분비 세포, 과형성 및 이형성, 기도벽의 재구성 및 기도 과민성반응(AHR)과 관련하여 활성화 Th2 림프구 및 호산구 침윤으로 이루어진 급성 또는 만성 기도 염증을 특징으로 한다. AHR은 메타콜린 등의 비특이적 연속형성 자극에 대한 기도의 반응성 및 수축의 증강을 특

징으로 한다[참조: Hansbro et al., 2011]. Th2 세포는, 그 중에서도, 이들의 사이토킨 IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13의 분비를 통해, 질환의 다양한 병리학적 특징에 기여한다.

[0004] 심각한, 호중구성 또는 스테로이드 난치성 천식은 경도 내지 중등도 알러지성 천식과는 상이한 병리학적 특징을 갖고, Th17 세포의 기여 가능성을 갖는 혼합 Th2/Th1 표현형을 특징으로 한다. 중앙 괴사 인자(TNF)- α , 인터페론(IFN)- γ , IL-17 및 IL-27은 상승하고, 천식의 이러한 아형에 특징적인 호중구(호산구가 아님)의 유입 또는 혼합 과립구 기도 침윤을 유도할 수 있다. 이러한 아형의 천식을 갖는 환자는 글루코코르티코이드 치료에 난치성이고, 세균 및 바이러스 감염 둘 다가 질환의 유도 및 진행에 관여하고 있다[참조: Hansbro et al., 2004]. 또한, 천식 환자 및 아토피성 피부염 환자는 비-아토피성 개체와 비교하여 감염증, 예를 들면, 폐렴을 발증할 가능성이 높다.

[0005] 단일 사이토킨, 예를 들면, 항 IL-4; 항 IL-5; 항 TNF- α 를 표적화하여 천식을 치료하는 개념은 제한된 성공을 가졌다. 실제, 현재 주류 치료법인 스테로이드 요법은 프로-염증 경로의 범위를 억제함으로써 작용하는 것으로 생각된다[참조: Hansbro et al., 2011].

[0006] 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD). COPD는 2020년까지 세계적으로 4번째의 사망 원인을 유도할 것으로 예측되는 주요 공중 위생상 문제이다. 독성 입자 및 가스의 지속적 흡입이 주요 위험 인자이고, 흡연이 이러한 유형의 위험의 최상의 예이지만, 15%의 흡연자만이 COPD를 발증한다[참조: Fletcher and Peto, 1977]. 흡연자는 기능부전 면역계를 갖고 있지만[참조: Bouloukaki et al., 2011], COPD의 발증 및 질환 중증도의 증가는 염증 세포 부담을 계속해서 악화시킨다[참조: Hogg et al., 2004].

[0007] 마이크로바이옴(Microbiome). 유아 미생물총(microbiota)은 초기에는 다양한 신체 부위에 걸쳐 균일하고, 그 후에 수일간 및 수주간에 부위-특이적 커뮤니티로 상이하다. 건강한 성인의 폐 마이크로바이옴은, 슈도모나스(*Pseudomonas*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 프레보텔라(*Prevotella*), 푸소박테리아(*Fusobacteria*), 베일로넬라(*Veillonella*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 네이세리아(*Neisseria*) 및 포르피로모나스(*Porphyromonas*)로 이루어진 코어 미생물총과 함께 과일리(phylae) 박테로이데테스(*Bacteroidetes*), 피르미쿠테스(*Firmicutes*) 및 프로테오박테리아(*Proteobacteria*)에 의해 지배된다[참조: Charlson et al., 2011]. 천식 환자 중에서, 증가된 빈도의 프로테오박테리아(특히, 헤모필루스, 모락셀라(*Moraxella*) 및 네이세리아) 및 피르미쿠테스(특히 락토바실러스 종(*Lactobacillus spp.*)) 및 감소된 빈도의 박테로이데테스(특히 프레보텔라)가 대조군과 비교하여 관찰되었다[참조: Hilty et al., 2010]. 유사하게는, 역학적 데이터는 장내 미생물총이 천식 유아 및 비-천식 유아에서 상이하다는 것을 나타낸다[참조: Penders et al., 2007].

[0008] 디펜신

[0009] 디펜신은, 건강한 마이크로바이옴을 유지하고 잠재적인 병원체를 배제하도록 작용하는 우성의 선천적인 숙주 방어 중의 하나를 나타낸다[참조: Wehkamp et al., 2002 및 Salzman et al., 2007]. 디펜신은 그람 양성 및 음성 세균, 진균 및 고세균에 대한 항균 활성, 또한 항-염증 활성을 갖는 펩티드이다. 디펜신 및 특히 hBD2는 염증성 장 질환의 치료에서 치료적 잠재성을 나타내고 있다(WO 2010/007166; WO 2013/007596).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 결론적으로, 폐의 염증 상태를 앓고 있는 대상체의 신규한 치료법이 요구되고 있다. 약물을 그 자체로 투여할 수 있는, 예를 들면, 흡입할 수 있는 환자를 위한 기도를 통해 투여할 수 있는 치료법이 특히 필요하고, 약물을 효율적으로 흡입할 수 없는 환자에 대해 다른 투여 경로에 의한 치료법이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0011] 요약

[0012] 본 발명자들은, 놀랍게도, 포유동물 디펜신이 기도 과민증(AHR)을 감소시키고 기도 컴플라이언스(Cdyn)을 증가시키고; 폐 염증을 감소시키고; 기관지-폐포-세정액(BALF)에서 호중구-, 호산구- 및 마크로파지 수를 감소시키고; 폐 세포에서 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 및 IL-13을 감소시키는 능력을 갖는 것을 입증했다. 본 발명자들은 또한 천식 모델에서 조직학적 염증 파라미터의 감소, 예를 들면, 혈관주변 염증 및 기관지주변 염증을 감소에서 유효성을 입증했다.

- [0013] 데이터는, 포유동물 디펜신의 투여가 천식, COPD 및 사르코이드증의 주요 특징의 정상화 또는 감소를 야기하고, 따라서 천식, 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 폐렴, 기관지확장증, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 및 사르코이드증을 포함하는 폐의 염증 상태의 치료 또는 예방에 유용한 것을 나타낸다.
- [0014] 놀랍게도, 집먼지 진드기 알러지의 마우스 모델에서, 디펜신의 경구 및 비강내 투여가 적어도 시험된 파라미터의 몇몇에 대해 동등하게 유효한 것이 입증되었다. 이는, 약물 흡입이 곤란한 대상체로의 경구 투여에 의한 염증성 폐 상태의 치료 가능성을 열어 둔다. 실시예에서 입증된 바와 같이, 인간 베타-디펜신 2(hBD-2)의 투여량은 AHR을 감소시키고, Cdyn을 증가시키고, 조직학적 폐 염증, BALF에서 염증 세포 수 및 스테로이드-감수성 류린 모델에서 염증 사이토킨 생산을 감소시킬 수 있고, 여기서 마우스를 오브알부민(OVA)으로 감작화시키고 씨. 무리다름(*C. muridarum*)으로 감염시키고, 스테로이드-감수성 마우스 모델에서는 마우스를 집먼지 진드기(HDM) + 프로인드 애쉴버트에 의해 면역화시키고 HDM으로 챌린지한다. hBD-2 치료의 부재하에, 동물은 유의적으로 증가된 AHR, 감소된 Cdyn, 폐 조직의 염증성 조직학적 변화, 증가된 백혈구 세포 수, 특히 호중구, 호산구 및 마크로파지, 및 염증성 사이토킨의 증가된 농도를 특징으로 하는 천식을 발증했다.
- [0015] 이들 관찰로 인해, 본 발명자들은 또한 폐의 염증을 치료하기 위해 일반적으로 디펜신의 사용을 고려하고 있다. 폐 염증을 일으킬 수 있는 상태의 예는 사르코이드증, 폐암, 및 항균 치료, 화학요법, 면역요법, 면역억제 요법 및 방사선 요법을 포함하지만 이들로 한정되지 않는, 숙주 방어에 영향을 미치는 다양한 종류의 의학적 치료를 포함한다.
- [0016] 본 발명자들은, 디펜신이 사이토킨 수준을 완전하게 정상화하여 면역계를 재조정하고, 따라서 소정 사이토킨 또는 일반적 면역 억제를 녹아웃하는, 예를 들면, 인터류킨 항체를 사용한 현재의 천식 치료에 반해서 사이토킨 폭풍을 방지하고, 이는 고유한 면역계의 일반적 억제를 야기하는 것을 실험적으로 입증했다. 따라서, 디펜신은 현재의 치료법을 대체하는 유망한 대안이다.
- [0017] 본 발명자들은 디펜신이, 폐에 직접 투여될 때 뿐만 아니라, 보다 중요하고 놀랍게도, 장 내로 단독으로 경구 투여될 때에, 폐에서 이들의 효과를 발휘할 수 있는 것을 추가로 입증했다.
- [0018] 천식 발작의 치료에서, 뿐만 아니라 유지 치료를 위한 경구 투여는 세계적으로 천식환자의 생활을 용이하게 할 것이다.
- [0019] 따라서, 한 가지 양태에서, 면역계의 재조정, 사이토킨 생산의 정상화 및 사이토킨 폭풍의 예방을 포함하는 호흡기계의 염증 질환의 치료 및/또는 예방 방법으로서, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신의 경구 또는 폐내 (intrapulmonary) 투여를 포함하고, 바람직하게는, 대상체는 천식을 앓고 있는, 방법이 제공된다.
- [0020] 다른 양태에서, 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 기관지확장증, 기관지염, COPD, 사르코이드증, 폐렴 및 폐기종, 폐섬유증, 바람직하게는 스테로이드 난치성 천식으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 질환의 치료 및/또는 예방 방법이 제공되고, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신의 투여를 포함한다.
- [0021] 추가로, 대상체에서 폐암의 치료 및/또는 예방 방법이 제공되고, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에서 조직학적 폐 염증, 혈관주변 및 기관지 혈관 염증, 기관지폐포 세정액 중의 염증 세포 수 및/또는 폐 조직 균질물에서 염증 사이토킨 생산을 감소시키는 것이고, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0022] 여전히 추가의 양태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 조직학적 폐 염증, 기관지폐포 세정액 중의 염증 세포 수를 감소시키고, 폐 조직 균질물에서 염증 사이토킨 생산의 정상화 및 사이토킨 폭풍의 예방/치료에 의해 면역계를 재조정하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0023] 또 다른 양태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 폐 탄성을 증가시키고 기도 과민성반응을 감소시키고/시키거나 최대 날숨 유량(peak expiratory flow)을 증가시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0024] 이를 필요로 하는 대상체에서 1초에서의 강제 호흡 용적(FEV1) 및/또는 최대 날숨 유량(PEFR)을 증가시키거나 PEFR 변동성을 감소시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0025] 적어도 하나의 디펜신을 대상체에게 투여함으로써, 유전자 풍부함(gene richness), 파일리 수를 증가시킬 수 있고, 부티레이트 및/또는 트립토판 생산을 증가시킬 수 있고, 폐 미생물로부터의 아세테이트 생산을 이를 필요로 하는 대상체에서 감소시킬 수 있다.

[0026] 추가로, 폐에서 정상 미생물총을 유지 및/또는 안정화시키고, 이를 필요로 하는 대상체에서 중요한 공생 세균 및 단쇄 지방산 및/또는 부티레이트 및/또는 트립토판 생산자의 존재 및 존재량을 증가시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 적어도 하나의 디펜신을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0027] 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 방법 중의 어느 하나에 따른 치료 방법에 사용하기 위한 디펜신 폴리펩티드, 및 본원에 정의된 장애를 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한 디펜신 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은, 마우스를 오브알부민에 의해 감각화시키고, 썸. 무리다룸(*C. muridarum*)으로 감염시킨, 천식의 뮤린 스테로이드-비감수성 모델에서 포유동물 β-디펜신의 효과를 조사하는 실험 설정의 개략도이다[참조: Essilfie et al., 2015].

도 2는, 마우스를 집먼지 진드기(HDM) + 프로인트 애쥬번트에 의해 면역화시키고 HDM으로 챌린지한, 천식의 뮤린 스테로이드-감수성 모델에서 포유동물 β-디펜신의 효과를 조사하는 실험 설정의 개략도이다.

도 3a는 인간 베타 디펜신 1-4의 클루스탈(Clustal) W(2.1) 다중 서열 정렬이다:

클루스탈 W 정렬에서:

*는 단일의, 완전히 보존된 잔기를 갖는 위치를 나타낸다.

:는 하기 "강력한" 그룹 중의 하나가 완전히 보존되어 있는 것을 나타낸다: -S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W.

.는 하기 "약한" 그룹 중의 하나가 완전히 보존되어 있는 것을 나타낸다: -C,S,A; A,T,V; S,A,G; S,T,N,K; S,T,P,A; S,G,N,D; S,N,D,E,Q,K; N,D,E,Q,H,K; N,E,Q,H,R,K; V,L,I,M; H,F,Y.

도 3b는 HD5 및 HD6의 클루스탈 정렬이다.

도 4는 hBD-2의 비강내 투여 후 오브알부민/썸. 무리다룸 뮤린 스테로이드-비감수성 천식 모델에서 기도 과민성 반응이다. Y-축은 Rn-기도-특이적 저항 단위(450 호흡/분의 호흡 속도에서 8mL/kg의 호흡량)를 나타낸다. ****는 p<0.05의 p 값에서 만 휘트니 시험(Mann Whitney test)을 사용한 통계적으로 유의한 차를 나타낸다.

도 5a 및 5b는 각각 hBD-2의 비강내(도 5a) 및 경구(도 5b) 투여 후에 집먼지 진드기 뮤린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 기도 과민성반응이다. 생리식염수는 비-챌린지 대조군이다. HDM/비히클은 비히클로 처리한 집먼지 진드기 챌린지 대조군이다.

"hBD2 IN 1.2mpk"는 1.2mg/kg의 비강내 투여한 hBD2이다. 5mpk는 5mg/kg이다.

범례, 도 5a: ● - 비히클 IN; ■ - hBD2 IN 1.2mpk; ▲ - 생리식염수; ◆ - hBD2 IN 5mpk.

범례, 도 5b: ● - HDM/비히클 IN; ■ - 생리식염수; ▲ - HDM/텍사메타손; ◆ - HDM/hBD2 1.2mg/kg p.o.

도 6a 및 6b는 각각 비강내(도 6a) 및 경구(도 6b) 투여 후에 집먼지 진드기 뮤린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 폐 탄성이다.

범례, 도 6a: ● - 비히클 IN; ■ - hBD2 IN 1.2mpk; ▲ - 생리식염수; ◆ - hBD2 IN 5mpk.

범례, 도 6b: ● - HDM/비히클 IN; ■ - 생리식염수; ▲ - HDM/텍사메타손; ◆ - HDM/hBD2 1.2mg/kg p.o.

도 7은 hBD-2의 비강내 투여 후 오브알부민/썸. 무리다룸 뮤린 스테로이드-비감수성 천식 모델에서 BALF 중의 전체 및 분화 세포 수이다.

도면 범례:

A: SPG/Sa1

- B: SPG/Ova
- C SPG/Ova/Dex
- D: Cmu/Sa1
- E: Cmu/Ova
- F: Cmu/Ova/Dex
- G: Cmu/Ova/hBD2
- H: Cmu/Ova/hBD2/Dex

처리 그룹

	D0	D12+13	D14	D32	D33+34
SPG/Sa1	Sa1 IP	Ova IN	SPG IN	PBS IN	Ova IN
Cmu/Sa1	Sa1 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

도 8a 및 8b는 각각 hBD-2의 비강내 및 경구 투여 후에 집먼지 진드기 무린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 BALF 중의 전체 및 분화 세포 수이다. 도 8a는 경구 hBD2로 처리된 동물을 나타낸다. 도 8b는 비강내 hBD2를 제공받은 동물로부터의 결과를 나타낸다. 결과는 평균 +/- SEM으로 제시되어 있다. *p<0.05 대 비히클, 대응하지 않는(unpaired) 시험.

도면 범례. 생리식염수 IN은 챌린지하지 않은 무처리 대조군이다. HDM/비히클은 무처리했지만 HDM 챌린지한 동물을 나타낸다. HDM은 집먼지 진드기로 챌린지한 동물이다. PO는 경구 투여이고 IN은 비강내 투여이다. 컬럼 표지 *는 비히클 처리된 대조군과 통계학적으로 유의하게 상이하다.

도 9 내지 18은 각각 hBD2의 비강내 및 경구 투여 후에 집먼지 진드기 무린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 IFN- γ (도 9), TNF- α (도 10), IL-1 β (도 11), IL-4(도 12), IL-5(도 13), IL-6(도 14), IL-8(도 15), IL-9(도 16), IL-10(도 17) 및 IL-13(도 18)의 사이토킨 농도이다. 각 도면은 좌측에 비강내 암(arm) 및 우측에 경구 암(arm)으로부터의 데이터를 갖는다. 결과는 평균 +/- SEM로서 pg/mL으로 제시되어 있다. *p<0.05 대 비히클, 만 휘트니 시험.

도 19는 각각 hBD-2의 비강내 및 경구 투여 후에 집먼지 진드기 무린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 H&E/PAS 제제를 사용한 폐 조직학이다. 상부 좌측 패널: 무처리 및 비챌린지 대조군. 상부 우측 패널: 무처리 및 HDM 챌린지 대조군. 하부 좌측 패널: hBD2 PO로 처리한 챌린지 HDM. 하부 우측 패널: hBD2 IN로 처리한 챌린지 HDM. 50X 확대.

도 20은 각각 hBD-2의 비강내 및 경구 투여 후에 집먼지 진드기 무린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 폐 염증 중증도이다.

*p<0.05 대 비히클, 만 휘트니 시험

#p<0.05 대 비히클, 윌콕슨 사인 랭크 시험(Wilcoxon Signed Rank Test).

도 21은 각각 hBD-2의 비강내 및 경구 투여 후에 집먼지 진드기 무린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 혈관주변 및 기관지주변 염증이다. ◆ 호산구; □ 단구.

호산구의 혈관주변 침윤에 대한 *p<0.05 대 비히클, 만 휘트니 시험

호산구 및 단구의 혈관주변/기관지주변 침윤에 대한 #p<0.05 대 비히클, 윌콕슨 사인 랭크 시험.

도 22는 암컷 NMRI 마우스에 대한 4mg/kg hBD-2의 경구 투여 후의 약동학적 데이터이다. Y-축은 hBD2를 $\mu\text{g/g}$

조직으로 나타낸다. 결과는 그룹 평균 +/-SEM으로 제공되어 있다.

도 23은 각각 1mg/kg의 피하 및 정맥내 투여 후에 hBD-2에 대한 약동학적 데이터이다. Y-축은 hBD2를 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타낸다. 상이한 곡선은 상이한 실험 및 검출 방법(HPLC 및 ELISA)을 나타낸다.

도 24는 각각 16.5mg/kg의 피하 및 정맥내 투여 후에 "hBD-2-알부민 융합 N-말단"에 대한 약동학적 데이터이다. Y-축은 융합 단백질의 농도를 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타낸다. 결과는 4마리 마우스의 평균/샘플링 시간 +/- SD이다.

도 25는 각각 16.5mg/kg의 피하 및 정맥내 투여 후에 "hBD-2-알부민 융합 C-말단"에 대한 약동학적 데이터이다. Y-축은 융합 단백질의 농도를 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타낸다. 결과는 4마리 마우스의 평균/샘플링 시간 +/- SD이다.

도 26은 "hBD-2-알부민 융합 C-말단"의 IV 투여에 의한 시험 중의 질환 활성 지수 스코어 진행이다. 결과는 그룹당 9 내지 10마리 동물에 대한 평균 +/- 표준 오차로서 나타낸다. 소정 일에서 대조군(비히클) 그룹 값과의 유의차는 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (비-파라미터 데이터에 대한 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis)시험)으로 제시되어 있다. 알부컷트(Albucult)[®]는 노보자임스(NovoZymes) A/S로부터 입수가 가능한 재조합 알부민이다. 그래프에서 화합물이 언급되지 않은 경우, 화합물은 hBD2-알부민 융합 C-말단이다.

도 27은 "hBD-2-알부민 융합 C-말단"의 조직학적 스코어 근위 결장이다. 근위 결장 샘플의 조직학적 스코어. 결과는 그룹당 $n=9-10$ 동물에 대한 평균 \pm 표준 오차로서 제시되어 있다. 소정 일에서 대조군(비히클) 그룹 값과의 유의차는 *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$ (비-파라미터 데이터에 대한 크루스칼-왈리스 시험 + 둔(Dunn)의 후-시험)로서 제시되어 있다. 알부컷트[®]는 노보자임스 A/S로부터 입수가 가능한 재조합 알부민이다. 그래프에서 화합물이 언급되지 않은 경우, 화합물은 hBD2-알부민 융합 C-말단이다.

도 28은 천식의 예방을 위한 류린 스테로이드-감수성 모델에서 포유동물 디펜신의 효과를 조사하기 위한 실험 설정의 개략도이고, 여기서 마우스는 집먼지 진드기(HDM) + 프로인트 애쥬번트에 의해 면역화시키고, HDM으로 챌린지한다.

도 29는 각각 hBD-2의 예방적 비강내 및 경구 투여 후에 류린 집먼지 진드기 스테로이드-감수성 천식 모델에서 기도 과민성반응이다.

도 30은 각각 hBD-2의 예방적 비강내 및 경구 투여 후에 류린 집먼지 진드기 스테로이드-감수성 천식 모델에서 폐 탄성이다.

도 31은 hBD-2의 예방적 경구 투여 후에 집먼지 진드기 류린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 BALF 중의 호중구 세포 수이다.

* $p < 0.05$ 대 비히클, 만 휘트니 시험.

도 32-37은 hBD-2의 예방적 경구 투여 후에 집먼지 진드기 류린 스테로이드-감수성 천식 모델에서 폐 균질물 중의 TNF- α (도 32), IL-4(도 33), IL-5(도 34), IL-6(도 35), IL-9(도 36) 및 IL-13(도 37)의 사이토킨 농도(pg/mL)이다. 결과는 평균 +/- SEM으로 제시되어 있다.

* $p < 0.05$ 대 비히클, 만 휘트니 시험.

도 38-39는 고지방 식이 류린 모델에서 미생물총의 조성물에 대한 포유동물 디펜신(HD5, hBD2 및 HD5+hBD2)의 효과를 조사하는 실험 설정의 개략도이다.

도 40은 류린 고지방 식이 모델에서 경구 HD5, hBD2 및 HD5+hBD2을 사용한 예방적 치료 후에 미생물 존재량의 속 분석이다.

도 41은 류린 고지방 식이 모델에서 경구 HD5 및 hBD2를 사용한 예방적 치료 후에 소장에서 알로바쿨룸(Allobaculum)의 존재량이다.

도 42는 류린 고지방 모델에서 경구 hBD2를 사용한 예방적 치료 후에 결장에서 락토바실라세아에(Lactobacillaceae)의 존재량이다.

도 43은 류린 고지방 식이 모델에서 경구 hBD2를 사용한 예방적 치료의 4주(좌측 패널) 및 10주(우측 패널) 후에 결장에서 바르네시엘라(Barnesiella)의 상대적 존재량이다.

도 44는 류린 고지방 식이 모델에서 경구 HD5 및 hBD2를 사용한 예방적 개입 후에 결장에서 알로프레보텔라

(*Alloprevotella*)의 상대적 존재량이다.

도 45는 묶린 고지방 식이 모델에서 HD5 또는 hBD2를 사용한 치료적 개입 후에 소장(좌측 패널) 및 결장(우측 패널)에서 비피도박테리움세아에(*Bifidobacteriaceae*)의 상대적 존재량이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의:

[0030] 디펜신: 본원에 사용되는 바와 같은 "디펜신"이란 용어는 항균 펩티드의 디펜신 부류에 속하는 폴리펩티드를 지칭한다. 디펜신은 건강한 마이크로바이옴을 유지하고 잠재적인 병원체를 막는 작용을 하는 우성의 선천적인 숙주 방어 중의 하나를 나타낸다[참조: Wehkamp et al, 2002 및 Salzman et al, 2007]. 디펜신은 그람 양성 및 음성 세균, 진균 및 고세균에 대한 항균 활성을 보유할 뿐만 아니라 항-염증성 활성을 갖는 펩티드이다.

[0031] 인간 디펜신은 이의 3개의 분자내 시스테인 디설파이드 결합의 위상을 기준으로 α- 및 β-디펜신으로 분리될 수 있는 작은 양이온성 펩티드이다. 상기 α-디펜신을, 호중구 과립에서 발견된 것들(HNP1-4) 및 소장의 음에서 파넬트 세포에 의해 발견된 것들(HD5 및 HD6 또는 DEFA5 및 DEFA6)으로 추가 세분할 수 있다. 상기 β-디펜신(DEFBn)은 주로 피부, 눈, 중이, 입, 기관지, 폐, 위장관, 비뇨생식계, 신장, 질, 간, 췌장 및 유선을 포함한 다양한 조직 및 기관 중의 상피세포에 의해 생산된다. 디펜신의 예는 알파 디펜신 부류에 속하는 인간 장내 알파 디펜신 5(HD5; 서열번호 5); 인간 장내 알파 디펜신 6(HD6; 서열번호 6); 인간 호중구 펩티드 1(HNP-1); 인간 호중구 펩티드 2(HNP-2); 인간 호중구 펩티드 3(HNP-3); 및 또한 인간 베타 디펜신 1(hBD1; 서열번호 1); 인간 베타 디펜신 2(hBD-2; 서열번호 2); 인간 베타 디펜신 3(hBD3; 서열번호 3); 인간 베타 디펜신 4(hBD4; 서열번호 4); 및 절단형(truncated) 인간 베타 디펜신 2(서열번호 7)을 포함한다. 국제공개공보 제WO 2013/026794호는 절단형 hBD2 및 비-절단형 hBD2가 동일한 생활성을 갖는 것을 기재한다.

[0032] 디펜신은 전구체로서 발견되고, 신호 펩티드 및 또한 일부의 경우에 세포외 공간으로 분비 전의 전구-펩티드의 절단에 의해 가공된다. 인간 β-디펜신 패밀리의 가장 특징적 멤버는 hBD1-4이다. 인간 디펜신의 일부, 예를 들면, hBD-1은 구성적으로 생산되지만, 다른 것들, 예를 들면, hBD-2, hBD-3 및 hBD-4는 프로-염증성 사이토킨 또는 외인성 미생물 산물에 의해 유도된다. 상기 동정된 서열은 예측된 성숙 생활성(bioactive) 디펜신을 나타낸다. 당해 기술분야의 숙련가는 가공이 세포마다 상이할 수 있고 생성되는 분비된 성숙 펩티드가 상기 예측된 서열과 하나 또는 2개의 C- 또는 N-말단 아미노산마다 상이할 수 있으며 생활성을 여전히 유지한다는 것을 이해할 것이다.

[0033] 동일성: 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 뉴클레오티드 서열간의 관련성은 "동일성"이란 파라미터에 의해 기재된다. 2개의 아미노산 서열간의 동일성 정도를 EMBOSS 팩키지(Rice et al., 2000, <http://emboss.org>), 바람직하게는 버전 3.0.0 또는 그 이후의 니들(Needle) 프로그램으로 실행되는 바와 같은 니들맨 분취 알고리즘(Needleman-Wunsch algorithm)(Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453)을 사용하여 측정한다. 사용되는 임의의 파라미터는 10의 갭 개방 페널티, 0.5의 갭 확장 페널티, 및 EBLOSSUM62(BLOSSUM62의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스이다. 니들 표시된 "최장 동일성"(-nobrief 옵션을 사용하여 획득됨)의 결과를 동일성 퍼센트로서 사용하며, 하기와 같이 계산한다:

[0034] (동일한 잔기 x 100)/(정렬의 길이 - 정렬 중 갭의 총 수)

[0035] 정상 미생물총: 용어 "정상 미생물총"은 본원에서 배노곤란이 없는 미생물총을 나타내기 위해 사용된다. 정상 미생물총은 거대 유전자 풍부함을 갖는 것을 특징으로 한다. 정상 장내 미생물총은 속 박테로이데테스(*Bacteroidetes*), 파에칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 로세부리아(*Roseburia*), 블라우티아(*Blautia*), 루미노콕쿠스(*Ruminococcus*), 코프로콕쿠스(*Coprococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 메타노브레비박터(*Methanobrevibacter*), 락토바실루스(*Lactobacillus*), 코프로콕쿠스(*Coprococcus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 악커만시아(*Akkermansia*), 유박테리움(*Eubacterium*)에 속하는 세균을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0036] 정상 폐 미생물은 속 박테로이데테스(*Bacteroidetes*), 피르미쿠테스(*Firmicutes*) 및 프로테오박테리아(*Proteobacteria*)에 속하는 세균을 슈도모나스(*Pseudomonas*), 스트렙토콕쿠스(*Streptococcus*), 프레보텔라(*Prevotella*), 푸소박테리아(*Fusobacteria*), 베일로넬라(*Veillonella*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 네이세리아(*Neisseria*) 및 포르피로모나스(*Porphyromonas*)로 이루어진 코어 미생물총과 함께 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0037] **치료:** 본원에 사용되는 바와 같은 "치료" 및 "치료하는"이란 용어는 상태, 질환 또는 장애를 방지할 목적으로 환자를 관리하고 보살피는 것을 지칭한다. 상기 용어는 상기 환자가 앓고 있는 주어진 상태에 대한 전체 치료 스펙트럼, 예를 들면, 증상 또는 합병증의 개선 또는 완화; 상기 상태, 질병 또는 장애의 진행의 지연; 상기 상태, 질병 또는 장애의 치유 또는 제거; 및/또는 상기 상태, 질병 또는 장애의 예방을 위한 활성 화합물의 투여를 포함하고자 하며, 여기에서 "예방하는" 또는 "예방"은 증상 또는 합병증의 개시 위험을 방지하거나 감소시키기 위해 상기 활성 화합물을 저해, 감소시킬 목적으로 환자를 관리하고 보살피는 것을 지칭한다는 것이 이해되어야 한다. 상기 치료되는 환자는 바람직하게는 포유동물, 특히 인간이다. 상기 치료되는 환자는 다양한 연령일 수 있다.
- [0038] **환자:** 환자는 폐의 염증 장애 등의 특정 장애로 진단되었거나 이러한 폐의 염증성 장애 등의 장애를 나타내는 특정 증상을 앓고 있는 대상체이다.
- [0039] **포유동물 알파 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신**
- [0040] 본 개시는, 특히 천식, 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 기관지확장증 및 COPD에서 포유동물 알파 및/또는 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 베타 디펜신, 보다 바람직하게는 호미니다에(Hominidae)의 용도에 관한 것이다.
- [0041] 한 가지 실시형태에서, 포유동물 알파 및/또는 베타 디펜신은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7의 아미노산 서열 중의 어느 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 동일성 정도를 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 디펜신은 10 미만, 예를 들면, 8 미만, 예를 들면, 5 미만, 예를 들면, 4 미만, 예를 들면, 3 미만, 예를 들면, 2 미만의 아미노산이 서열번호 1 내지 7의 하나와 상이하다.
- [0042] 바람직한 실시형태에서, 인간 알파 디펜신은 알파 디펜신 5(서열번호 5) 및/또는 알파 디펜신 6(서열번호 6)으로 이루어진다. 바람직한 실시형태에서, 포유동물 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 1(서열번호 1), 인간 베타 디펜신 2(서열번호 2), 인간 베타 디펜신 3(서열번호 3), 인간 베타 디펜신 4(서열번호 4) 또는 절단형 인간 베타 디펜신 2(서열번호 7)로 이루어진다.
- [0043] 바람직한 실시형태에서, 인간 알파 디펜신은 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 동일성 정도를 갖는다. 바람직한 실시형태에서, 인간 포유동물 알파 디펜신은 알파 디펜신 5(서열번호 5)로 이루어진다. 바람직한 실시형태에서, 인간 베타 디펜신은 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 동일성 정도를 갖는다. 바람직한 실시형태에서, 인간 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 2(서열번호 2) 또는 절단형 인간 베타 디펜신 2(서열번호 7)로 이루어진다.
- [0044] 여전히 또 다른 실시형태에서, 포유동물 알파 디펜신은 인간 알파 디펜신 및/또는 마우스 알파 디펜신, 및 이의 기능적 등가 변이체로 이루어진다. 바람직하게는, 포유동물 알파 디펜신은 인간 알파 디펜신 5, 인간 알파 디펜신 6 및 이의 기능적 등가 변이체로 이루어진다. 보다 바람직하게는, 포유동물 알파 디펜신은 인간 알파 디펜신 5 및, 이의 기능적 등가 변이체 또는 오르톨로그로 이루어진다.
- [0045] 여전히 추가의 실시형태에서, 포유동물 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 및/또는 마우스 베타 디펜신, 및 이들의 기능적 등가 변이체로 이루어진다. 바람직하게는, 포유동물 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 1, 인간 베타 디펜신 2, 인간 베타 디펜신 3, 인간 베타 디펜신 4, 및 이의 기능적 등가 변이체로 이루어진다. 보다 바람직하게는, 포유동물 베타 디펜신은 인간 베타 디펜신 2, 및 이의 기능적 등가 변이체 또는 오르톨로그로 이루어진다.
- [0046] 한 가지 실시형태에서, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 적어도 하나의 포유동물 α -디펜신의 유효량의 투여를 포함한다.
- [0047] 포유동물(예: 인간) 알파 또는 베타 디펜신의 "기능적 등가 변이체"는 부모 포유동물(예: 인간) 알파 및/또는 베타 디펜신과 폐 또는 장내의 미생물총에 대해 대략 동일한 효과를 나타내는 변형된 포유동물(예: 인간) 알파 또는 베타 디펜신이다. 포유동물(예: 인간) 디펜신의 기능적 등가 변이체는, 포유동물(예: 인간) 디펜신 아미노산 서열(예: 서열번호 1 내지 7 중 임의)과 비교하여, 1 내지 5개 아미노산 변형, 바람직하게는 1 내지 4개 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 1 내지 3개 아미노산 변형, 가장 바람직하게는 1 내지 2개 아미노산

변형(들), 및 특히 1개 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 베타 포유동물 디펜신의 경우에는 서열번호 2 또는 절단형 인간 베타 디펜신 2(서열번호 7)을 갖는 인간 베타 디펜신 2와 비교하고, 알파 디펜신의 경우에는 HD5(서열번호 5)와 비교한다.

- [0048] 용어 "변형"은 본원에서 포유동물(예: 인간) 디펜신의 임의의 화학적 변형을 의미한다. 변형(들)은 아미노산(들)의 치환(들), 결실(들) 및/또는 삽입(들)일 뿐만 아니라, 아미노산 측쇄(들)의 치환(들); 또는 아미노산 서열에서 유사한 특징을 갖는 비천연 아미노산의 사용일 수 있다. 특히, 변형(들)은 C-말단의 아미드화 등의 아미드화일 수 있다. 바람직하게는, 아미노산 변형은 경미한 성질의 것, 즉 폴리펩티드의 폴딩 및/또는 활성에 유의적으로 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환 또는 삽입; 단일 결실; 작은 아미노- 또는 카복실-말단 신장; 또는 순전하 또는 또 다른 기능을 변화시킴으로써 정제를 용이하게 하는 작은 신장부, 예를 들면, 폴리-히스티딘 태그, 항원성 에피토프 또는 결합 도메인이다. 한 가지 실시형태에서, 작은 신장부, 예를 들면, 폴리-히스티딘 태그, 항원성 에피토프 또는 결합 도메인은 최대 약 20-25개 잔기의 작은 링커 펩티드를 통해 포유동물(예: 인간) 알파 또는 베타 디펜신에 부착되고, 상기 링커는 제한 효소 절단 부위를 함유할 수 있다.
- [0049] 도 3 중의 클루스탈 W 정렬을 사용하여, 어떠한 아미노산 잔기가 단백질의 생물학적 활성에 실질적으로 영향을 미치지 않고서 치환될 수 있는지를 예측할 수 있다.
- [0050] 서열은 클루스탈 W 2.1(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) 및 하기 설정을 사용하여 정렬되었다: 갭 개방 페널티: 10, 갭 신장 페널티: 0.05, 중량 전이: 없음, 단백질의 친수성 잔기: GPSNDQE, 친수성 갭: 있음, 중량 매트릭스: BLOSUM(단백질용). 하기 그룹 내의 치환(Clustal W, '강력한' 보존 그룹)은 보존적 치환으로 간주되어야 한다: -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.
- [0051] 하기 그룹 내의 치환(Clustal W, '약한' 보존 그룹)은 반-보존적 치환으로 간주되어야 한다: -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.
- [0052] 보존적 치환의 예는 염기성 아미노산(아르기닌, 리신 및 히스티딘), 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산), 극성 아미노산(글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산(류신, 이소류신 및 발린), 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신), 및 작은 아미노산(글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌 및 메티오닌) 그룹 내에서 이루어진 치환이다.
- [0053] 일반적으로 특이 활성을 변화시키지 않는 아미노산 치환은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Neurath and Hill (1979)]에 기재되어 있다. 가장 일반적으로 발생하는 교환은 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly이다.
- [0054] 20개의 표준 아미노산에 추가하여, 비-표준 아미노산(예를 들면, 4-하이드록시프롤린, 6-N-메틸 리신, 2-아미노 이소부티르산, 이소발린 및 알파-메틸 세린)은 야생형 폴리펩티드의 아미노산 잔기를 치환할 수 있다. 제한된 수의 비-보존적 아미노산, 유전자 코드에 의해 코딩되지 않은 아미노산, 및 비천연 아미노산은 아미노산 잔기를 치환할 수 있다. "비천연 아미노산"은 단백질 합성 후에 변형되고/되거나, 표준 아미노산의 것과 상이한 이들의 측쇄(들)에서 화학적 구조를 갖는다. 비천연 아미노산은 화학적으로 합성할 수 있고, 바람직하게는 상업적으로 입수가능하며, 피페콜린산, 티아졸리딘 카복실산, 테하이드로프롤린, 3- 및 4-메틸프롤린 및 3,3-디메틸프롤린을 포함한다.
- [0055] 포유동물 알파 및/또는 베타 디펜신의 필수 아미노산은 당해 기술분야에 공지된 절차, 예를 들면, 부위-지시된 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발에 따라 동정할 수 있다[참조: Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085]. 후자의 기술에서, 단일 알라닌 돌연변이는 분자 중의 전체 잔기에 도입하고, 수득된 돌연변이 분자는 생물학적 활성(즉, 기도 과민성반응 또는 억제 사이토킨에 대한 활성, 예를 들면, TNF-알파 활성)에 대해 시험하여, 분자의 활성에 중요한 아미노산 잔기를 동정한다[참조: Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708]. 또한, 필수 아미노산의 동정은, 포유동물 알파 및/또는 베타 디펜신과 관련되는 폴리펩티드와의 동일성 분석으로부터 추측할 수 있다[참조: 도 3 중의 클루스탈 W 정렬].
- [0056] 단일 또는 복수 아미노산 치환은 돌연변이유발, 재조합 및/또는 서플링의 공지된 방법, 이어서 문헌[참조: Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; 또는 WO 95/22625]에 기재된 것들 등의 관련 스크리닝 절차를 사용하여 제조 및 시험할 수 있다. 사용될 수 있는 기타 방법은 예러-유발 PCR, 파지 디스플레이[참조: Lowman *et al.*, 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; U.S. Patent No. 5,223,409; WO 92/06204] 및 영역-지시된 돌연변이유발[참조:

Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46:145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7:127]을 포함한다. 소정 치환의 결과를 확실하게 예측할 수 없는 경우, 생물학적 활성의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 상기 본원에 기재된 방법에 따라 유도체를 용이하게 시험할 수 있다.

[0057] **장시간-작용형 디펜신**

[0058] α - 또는 β -디펜신의 반감기는, α - 또는 β -디펜신을 또 다른 부분 또는 분자와 융합 또는 접합시킴으로써, 즉 약제학적으로 허용되는 분자에 결합된 장시간 작용하는 생물학 활성 α - 또는 β -디펜신을 작제함으로써 연장시킬 수 있고, 이는 접합된 α - 또는 β -디펜신과 동일한 방식으로 투여된 비-접합된 α - 또는 β -디펜신의 생체내 혈장 반감기와 비교하여 실질적으로 증가되는 α - 또는 β -디펜신의 생체내 혈장 반감기를 제공한다.

[0059] 장시간 작용하는 생물학적 활성 α - 또는 β -디펜신은, 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합할 수 있는 분자, 트랜스페린, 알부민(HAS), 엑스텐(XTEN[®]) 또는 PEG, 호모-아미노산 중합체(HAP), 프롤린-알라닌-세린 중합체(PAS), 또는 엘라스틴-유사 펩티드(ELP), 히알루론산, 음으로 하전된 고도로 시아실화된(siacylated) 펩티드, 예를 들면, 용모성 성선자극호르몬(CG) β -쇄의 카복시-말단 펩티드(CTP), 인간 IgG 및 CH3(CH2)nCO-(여기에서 n은 8 내지 22이다)로부터 선택된 약제학적으로 허용되는 분자에 결합된 포유동물 α -디펜신 또는 이의 유사체 또는 포유동물 β -디펜신 또는 이의 유사체를 포함한다.

[0060] α - 또는 β -디펜신 유사체는 또한 비-포유동물 기원의 것일 수 있고, 작은 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질로부터 선택될 수 있다.

[0061] α - 또는 β -디펜신 작용제는 선행 기술 문헌에 기재된 다양한 방식, 예를 들면, 한정 없이, 기술적으로는 디펜신의 N-말단 또는 C-말단, 예를 들면, α -디펜신 또는 β -디펜신을 알부민 또는 알부민 유사체 등의 약제학적으로 허용되는 분자에 커플링시킴으로써 이작용성 링커, 유전자를 통한 화학적 커플링으로 약제학적으로 허용되는 분자에 결합시킬 수 있다. 특히, 알부민 또는 알부민 유사체, 예를 들면, 인간 알부민의 N-말단은 α - 또는 β -디펜신의 C-말단 또는 α - 또는 β -디펜신의 N-말단에 커플링시킬 수 있거나; 알부민, 예를 들면, 인간 알부민의 C-말단은 α -디펜신 또는 β -디펜신의 C-말단 또는 α - 또는 β -디펜신의 N-말단에 커플링시킬 수 있다. 링커 서열은 알부민과 α - 또는 β -디펜신 쇄 사이에 삽입할 수 있다.

[0062] α - 또는 β -디펜신 작용제는 안정한 링커 또는 보다 불안정한 링커를 통해 약제학적으로 허용되는 분자에 결합시킬 수 있다. 몇몇 링커는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 이작용성 PEG 분자[참조: Paige *et al.* *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 12, 1995], 가수분해가능한 링커[참조: Shechter *et al.* *Bioconjugate Chem.* 2005,16: 913- 920 and *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, Vol. 13, Nos. 1-2, June 2007 and W02009095479], PDPH 및 EMCH[참조: W02010092135]를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 분자에 대한 α - 또는 β -디펜신 작용제의 화학적 접합(2개 이상의 분자의 결합)이 기능적 α - 또는 β -디펜신 활성을 강력하게 감소시키는 특별한 경우에, 기능적 α - 또는 β -디펜신 작용제를 방출할 수 있는 보다 불안정한 링커를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0063] 반감기 연장은 또한 리신에 대해 스페이서, 예를 들어, γ -L-글루타미드 스페이서 및 C-18 지방산 이-산 쇄에 의한 펩티드 골격의 아실화를 통해 달성할 수 있다. 지방산 이-산 부위 쇄 및 스페이서는 알부민에 대해 강력하지만 가역적 결합을 매개하고, 주사 부위로부터의 방출을 지연시키고 신장 클리어런스를 감소시킨다.

[0064] **방법 및 용도**

[0065] 인간 베타 디펜신 2는 기도 과민성반응을 감소시키고; 폐 탄성을 증가시키고; 폐 염증을 감소시키고; BALF 호중구-, 호산구- 및 마크로파지 수를 감소시킬 뿐만 아니라, 사이토킨 폭풍을 방지하는 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 및 IL-13 농도의 정상화에 의해 면역계를 재조정하고; 따라서 천식 및 COPD 등의 폐의 염증 상태의 예방 또는 치료를 위한 의약으로서 강력한 활성을 나타낼 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0066] 놀랍게도, 디펜신의 비경구 및 경구 투여는 폐의 염증 상태를 치료하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 이는, 본 개시의 실시예 3에서 입증된 바와 같이, hBD2가 장으로부터 흡수되지 않는 것으로 공지되어 있기 때문에 예상치 못한 것이다. 이러한 관찰의 이점은 호흡 능력이 저하된 환자가 이들의 디펜신 의약을 경구 섭취할 수 있다는 것이다. 또한, 의료용 인공호흡기를 사용하는 환자 및 천식 지속상태 환자 등의 중증 환자는 적어도 하나의 디펜신의 비경구 투여에 의해 치료될 수 있을 것으로 예상된다.

[0067] 따라서, 한 가지 양태에서, 본 개시는 적어도 하나의 디펜신의 비경구 또는 경구 투여에 의해 염증성 폐 상태의 치료 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 투여는 경구이다. 경구 및 비경구 투여는 호흡 장애를 갖는 환자 또

는 의료용 인공호흡을 받고 있는 환자에게 유리하다.

- [0068] 또 다른 양태에서, 포유동물 디펜신의 유효량을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 폐렴, 기관지확장증, COPD, 사르코이드증, 폐섬유증 또는 폐암의 치료 방법이 제공된다. 이들 상태는 폐내 투여, 경구, 또는 비경구 투여에 의해 치료될 수 있다. 바람직하게는, 투여는 폐내 또는 경구이다.
- [0069] 제공된 방법은 백혈구 세포, 예를 들면, BALF 중의 호중구, 호산구 및 마크로파지의 이행을 감소시킴으로써 폐염증을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0070] hBD2의 투여는 특히 BALF 중의 특정 호중구 및 마크로파지의 감소에 효과적인 것으로 증명되어 있다.
- [0071] 상기 방법은 또한 면역계를 재조정하고, 예를 들면, 폐 조직 균질물에서 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 및 IL-13의 사이토킨 생산을 정상화하여 본원에 기재된 바와 같은 상기 상태 중의 하나에 의해 영향을 받은 대상체에서 사이토킨 폭풍을 예방하거나 치료할 수 있다. 바람직하게는, 치료 방법은 감소된 사이토킨 생산을 야기하고, 여기서 사이토킨은 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 또는 IL-13이다. 특히, 상기 방법은 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-9 및 IL-13의 양을 감소시킬 수 있다. 사이토킨의 양은 폐 생검 또는 BALF에서 결정할 수 있다.
- [0072] 추가로, 상기 방법은 본원에 기재된 상기 상태 중의 하나에 의해 영향을 받은 대상체에서 기도 과민성반응을 감소시킬 수 있고 폐 탄성을 증가시킬 수 있다.
- [0073] 제공된 방법은, 본원에 기재된 상기 상태 중의 하나에 의해 영향을 받은 대상체의 폐 미생물총 또는 폐 대사체의 구조 및 조성 뿐만 아니라 전사 수준에서 변화를 통해 세균 표현형을 변화시킴으로써 폐염증을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0074] 이론에 국한시키는 것 없이, 경구 투여를 사용하여 관찰된 효과는, 소위 장-폐 축을 통해 폐에 대한 영향을 미칠 수 있는 장 미생물총 및 장 대사체의 변화에 기인할 수 있다.
- [0075] 천식, COPD 및 낭포성 섬유증 등의 만성 폐 질환 모두는 장 질환 발현의 일요소를 나타내고, 이는 인체의 2개 점막 부위 사이에 활발한 크로스 토크(cross talk)가 있고, 다양한 호흡 질환이 기도 미생물총 뿐만 아니라 장내 세균총의 장내세균불균형(dysbiosis)과 연관되어 있다[참조: Marsland et al, 2015]. 제왕절개는 다양성을 감소시키고, 인생의 초기 단계에서 장내 미생물총의 조성을 변화시키고 동시에 소아기 동안 천식에 대한 소인과 관련되어 있다[참조: Jakobsson et al, 2014]. 환경 미생물에 대한 유아기 노출은 천식에 대해 보호적인 것으로 밝혀졌고[참조: Ege et al, 2011], 반면 유아기 및 출생전 항생물질 노출은 알러지성 천식의 위험을 증가시킨다[참조: Marra et al 2009]. 소아 감염증과 천식 및 알러지 발증 사이의 역 관계는 수년간 인식되어 왔고, "위생 가설"을 발생시키며; 인생의 초기 단계에서 감염성 노출의 감소는 내성을 저하시키고 자가면역 병리를 증가시킨다[참조: Wills-Karp et al, 2001]. 보완적 가설은, 서구화 지역에서 항생물질 사용 및 식사 부족(저섬유, 고당)에 기인하는 위장관 조성의 혼란이 위장관 마이크로바이옴-매개된 점막 관용성의 메카니즘을 혼란시킨다는 것이다.
- [0076] 공생 미생물은, 주로 숙주-미생물 상호작용을 매개하는 소분자를 생성함으로써, 선천적 및 적응적 면역 반응을 교정하고 병원성 자극에 대한 활성화 역치에 영향을 미친다[참조: Donia and Fishback, 2015]. 상피 배리어는 미생물이 주로 장내에 국한되는 것을 보장하지만, 미생물 대사산물은 상피 배리어를 관통하고, 면역 세포에 의해 감지되는 숙주 순환 시스템에 침입하여 축적할 수 있다[참조: Dorrestein et al, 2014]. 트롬펫 등 (Trompette et al 2013)은 식사 중의 발효성 섬유가 장 뿐만 아니라 폐 미생물총의 조성도 변화시키는 것, 특히 피르미쿠테스(*Firmicutes*) 대 박테리오테테스(*Bacterioidetes*)의 비율이 마우스에서 변화하는 것을 입증했고, 후자는 단쇄 지방산의 국소적 및 전신적 수준의 증가를 유도하고, 이는 또한 수지상 세포의 조절 및 기능에 영향을 미치고, 따라서 폐의 면역학적 환경을 형성하고 알러지성 염증의 중증도에 영향을 미친다. 슈르머 등 (Schirmer et al)은 추가로 인간 작용성 게놈 프로젝트(Human Functional Genomics Project)에서 사이토킨 반응의 개체간 변동이 미생물 기능 뿐만 아니라 특정 미생물 생물과 관련되는 것을 입증했다. 검출된 회합의 대다수는 사이토킨 및 자극 특이적 둘 다였고, 이는 면역계가 미생물 생물 및 생성물과 고도 특이성으로 인식 및 상호작용하는 것, 및 이들 미생물 인자가 특정 면역학적 표현형과 연관되는 것을 시사한다. TNF- α 및 IFN- γ 생성 능력은 마이크로바이옴에 의해 보다 강력하게 영향을 받는 것으로 관찰되었고, 반면 기타 사이토킨, 예를 들면, IL-1 β , IL-6 및 Th17 유래된 IL-17 및 IL-22는 장내 미생물총과의 보다 적지만 보다 특이적인 연관을 나

타냈다.

- [0077] 추가의 양태는, 유효량의 α - 및/또는 β -디펜신을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 경구 투여함으로써 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 폐렴, 기관지확장증, COPD 또는 폐암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 천식은 스테로이드 난치성 천식이다. 한 가지 실시형태에서, 투여는 경구, 구강내, 설하, 직장내, 질내, 기관내, 폐내, 비강내, 두개내, 피하, 정맥내, 피부 또는 경피이다. 바람직하게는, 투여는 경구 또는 폐내이다. 경구 투여는 호흡장애가 있는 환자 또는 의료용 호흡을 받고 있는 환자에게 유리할 수 있다.
- [0078] 추가로, 유효량의 α - 및/또는 β -디펜신을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 비경구, 예를 들면, 피하 또는 정맥내 투여함으로써 천식, 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 기관지확장증 및 COPD의 치료 방법이 제공된다.
- [0079] 본원에 기재된 치료 방법은, 글루코코르티코이드, β -작용제, 류코트리엔 수용체 길항제, 테오필린, 항생제, 리팍시민, 화학요법 또는 면역요법, 면역억제제, 프레바이오틱스(prebiotics), 프로바이오틱스(probiotics), 트립토판, 단쇄 지방산, HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4, 카텔리시딘, 락토페린, 락토페리신, 리소자임, 대변 이식물 또는 이들의 조합물과 조합하여 적어도 하나의 포유동물 α - 및/또는 β -디펜신을 포함하는 조성물의 투여에 의해 치료할 수 있다. 본원에 기재된 디펜신은 항생제, 화학요법, 방사선 요법, 면역요법, 또는 면역억제 요법의 하나 이상의 증상을 완화시키기 위해 사용될 수 있다. 디펜신은 별도로 또는 하나 이상의 이들 요법과 함께 투여될 수 있다. 또한, 디펜신은 천식을 치료하기 위해 사용될 수 있는 기타 의약과 함께 투여될 수 있다.
- [0080] 중요하게는, 개시된 방법은, 항생물질 치료 또는 화학요법 또는 면역요법 또는 면역억제 요법 또는 방사선 요법, 또는 폐 또는 장내 미생물총에 대해 악영향을 미치는 또 다른 치료를 실시했고/했거나 실시하고 있는 대상체의 폐에서 생체독성 미생물총/대사체의 치료, 예방 또는 정상화를 위해 사용될 수 있다.
- [0081] 폐 미생물의 정상화는 속 박테로이데테스(*Bacteroidetes*), 피르미쿠테스(*Firmicutes*) 및 프로테오박테리아(*Proteobacteria*)에 속하는 폐 세균의 모집단을 슈도모나스(*Pseudomonas*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 프레보텔라(*Prevotella*), 푸소박테리아(*Fusobacteria*), 베일로넬라(*Veillonella*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 네이세리아(*Neisseria*) 및 포르피로모나스(*Porphyromonas*)로 이루어진 코어 미생물총으로 자극하는 것을 포함할 수 있다.
- [0082] 또한, 폐 미생물의 정상화는 대사체를, 비교적 보다 많은 트립토판 및/또는 부티레이트 및 비교적 보다 적은 아세테이트를 생산하는 것으로 변화시키는 것을 수반할 수 있다.
- [0083] 치료되는 대상체는 1주당 2회 미만의 천식 증상, 예를 들면, 일상적 증상, 예를 들면, 연속 증상을 가질 수 있다.
- [0084] 치료되는 대상체는 신체 활동을 제한하는 발작 등의 활동에 영향을 미치는 발작, 및/또는 1개월당 2회 초과 야간 천식 증상, 예를 들면, 주간에 지속할 수 있는 1주 2회 초과, 예를 들면, 야간에 빈발하는 증상 등의 상이한 강도의 천식 발작을 가질 수 있다.
- [0085] 한 가지 실시형태에서, 치료되는 대상체는 80% 미만의 1초간 강제 호흡 용적(FEV1), 예를 들면, 60 내지 80%의 FEV1, 예를 들면, 예측된 값의 60% 미만의 FEV1을 갖는다.
- [0086] 추가로, 대상체는 20% 초과 변동성, 예를 들면, 20 내지 30%의 PEFr 변동성, 예를 들면, 30% 초과 변동성, 예를 들면, 60% 초과 변동성을 갖는 최대 날숨 유량(PEFR)을 가질 수 있다.
- [0087] 개시된 방법에 의해 제공된 치료를 필요로 하는 대상체는 치료전 하기 증상 중의 하나 이상을 나타낼 수 있다:
- [0088] 경도 간헐성:
- [0089] - 증상 < 1주 2회
- [0090] - 발작 사이의 무증후성 및 통상 최고 유속(PEFR)
- [0091] - 발작은 상이한 강도로 짧다
- [0092] - 야간 증상 < 1개월 2회

- [0093] - 1초간 강제 호흡 유량(FEV1) 또는 PEFR > 예측치의 80%
- [0094] - PEFR 변동성 < 20%
- [0095] 경도 지속성:
- [0096] - 증상 > 1주 2회, 그러나 < 1일 1회
- [0097] - 악화는 활동에 영향을 미칠 수 있다
- [0098] - 야간 증상 > 1개월 2회
- [0099] - FEV1 > 예측치의 80%
- [0100] - 20% 내지 30%의 PEFR 변동성
- [0101] 중등도 지속성:
- [0102] - 일상적 증상
- [0103] - 단시간 작용형 베타 작용제의 매일 사용
- [0104] - 발작은 활동에 영향을 미친다
- [0105] - 1주간 2회 초과 악화가 있고 수일간 지속할 수 있다
- [0106] - 야간시 증상 > 1주 1회
- [0107] - 예측치의 60% 초과, 그러나 80% 미만의 FEV1
- [0108] - PEFR 변동성 > 30%
- [0109] 심각한 지속성:
- [0110] - 계속적 증상
- [0111] - 제한된 신체 활동
- [0112] - 빈번한 악화
- [0113] - 빈번한 야간 증상
- [0114] - FEV1 < 예측치의 60%
- [0115] - PEFR 변동성 > 60%
- [0116] 한 가지 실시형태에서, 치료는 적어도 하나의 증상의 개선을 야기하고, 이에 의해 치료 대상체는 심각한 지속성으로부터 중등도 지속성, 경도 지속성 또는 경도 간헐성으로 변화한다. 치료는 치료 대상이 중등도 지속성으로부터 경도 지속성 또는 경도 간헐성으로, 또는 경도 지속성으로부터 경도 간헐성으로 변화하도록 증상의 개선을 야기할 수 있다.
- [0117] 다른 실시형태에서, 디펜신은 폐암과 관련하여 폐의 염증을 치료하기 위해 사용된다. 폐암은 소세포 폐암 또는 비-소세포 폐암(NSCLC)일 수 있다. NSCLC는 선암, 편평상피암, 대세포암 및 세기관지폐암으로부터 선택될 수 있다. 폐암 환자에 대한 하나 이상의 디펜신의 투여는 질환의 하나 이상의 염증 증상 또는 암 요법의 하나 이상의 부작용을 완화시킬 것으로 기대된다. 암 요법의 부작용은 방사선, 화학요법, 면역요법 또는 수술의 부작용일 수 있다. 또한, 폐의 숙주 방어를 개선시킴으로써 적어도 하나의 α - 및/또는 β -디펜신의 투여는 종양 세포의 성장을 감소시킬 것으로 기대된다.
- [0118] **시험관내 합성**
- [0119] 포유동물 알과 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신을 당해 분야에 공지된 바와 같은 통상적인 방법을 사용하여 시험관내 합성에 의해 제조할 수 있다. 다양한 상업적인 합성 장치, 예를 들면, 어플라이드 바이오시스템스 인코포레이티드(Applied Biosystems Inc.), 벡크만(Beckman) 등의 자동화된 합성기를 이용할 수 있다. 합성기를 사용함으로써, 천연 아미노산을 비천연 아미노산, 특히 D-이성질체(또는 D-형태), 예를 들면, D-알라닌 및 D-이소류신, 부분입체이성질체, 상이한 길이 또는 작용기를 갖는 측쇄 등으로 치환시킬 수 있다. 특정한 서열 및 제조 방식은 편의성, 경제성, 필요한 순도 등에 의해 결정될 것이다. 화학적 결합이, 결합에 편리한 작용기,

예를 들면, 아미드 또는 치환된 아민 형성, 예를 들면, 환원적 아민화를 위한 아미노 그룹, 티오에테르 또는 디설파이드 형성을 위한 티올 그룹, 아미드 형성을 위한 카복실 그룹 등을 포함하는 다양한 펩티드 또는 단백질에 제공될 수 있다. 경우에 따라, 다양한 그룹들을 합성 또는 발현 중 펩티드에 도입시킬 수 있으며, 이는 다른 분자 또는 표면에의 결합을 허용한다. 따라서, 시스테인을 사용하여 티오에테르, 금속 이온 착체에의 결합을 위한 히스티딘, 아미드 또는 에스테르 형성을 위한 카복실 그룹, 아미드 형성을 위한 아미노 그룹 등을 생성시킬 수 있다.

[0120] 포유동물 알파 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신, 또는 이의 기능적 균등물을 또한 통상적인 재조합 합성 방법에 따라 분리 및 정제할 수 있다. 재조합 합성은 적합한 발현 벡터 및 진핵 또는 원핵생물 발현 시스템을 사용하여 수행할 수 있다. 용액을 발현 숙주 및 배지로 제조하고 존재하는 디펜신을 HPLC, 배체 크로마토그래피, 겔 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 또는 다른 정제 기법을 사용하여 정제할 수 있다. 이. 콜라이에서 인간 베타 디펜신-2의 재조합 발현 방법은 WO 2010/007166(노보자임스)에 개시되어 있다.

[0121] 포유동물 알파 및 베타 디펜신은 또한 상응하는 mRNA의 투여에 의해 유도할 수 있다.

[0122] **투여량**

[0123] 포유동물 알파 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신을 바람직하게는 환자에게 허용되는 독성으로, 일반적으로 폐 염증의 치료 또는 경도 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 심각한 지속성 천식, 호산구성 천식, 호중구성 천식, 스테로이드 난치성 천식, 천식 지속상태, 기관지확장증, COPD 또는 폐암의 치료에 효과적인 양으로 약제학적 조성물 중에 사용한다. 포유동물 알파 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신을 또한, 바람직하게는 치료가 필요한 환자에게 허용되는 독성으로, 바람직하게는 폐 및/또는 장에서 정상 미생물총 조성물을 유지하거나 폐 및/또는 장에서 생체독성 미생물총을 치료 또는 정상화하기에 효과적인 양으로 약제학적 조성물 중에 사용한다.

[0124] 상기와 같은 치료를 위해서, 적합한 투여량은 물론, 예를 들면, 사용되는 화합물의 화학적 성질 및 약동학적 데이터, 개별적인 숙주, 투여 방식 및 치료되는 상태의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다.

[0125] 그러나, 일반적으로, 포유동물, 예를 들면, 인간에서 만족스런 결과를 위해, 인간 알파 디펜신의 지시된 1일 투여량은 바람직하게는 약 0.1mg HD5/kg 체중 내지 약 10mg HD5/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.5mg HD5/kg 체중 내지 약 10mg HD5/kg 체중; 예를 들면, 1mg HD5/kg 체중 내지 10mg HD5/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 1.2mg HD5/kg 체중 내지 약 10mg HD5/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2mg HD5/kg 체중 내지 약 5mg HD5/kg 체중, 훨씬 더 바람직하게는 1.2mg HD5/kg 체중으로, 예를 들면, 1일 1, 2 또는 3회 이하의 분할 용량으로 투여된다.

[0126] 하나의 실시형태에서, 인간 베타 디펜신의 지시된 1일 투여량은 바람직하게는 약 0.1mg hBD-2/kg 체중 내지 약 10mg hBD-2/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.5mg hBD-2/kg 체중 내지 약 10mg hBD-2/kg 체중; 예를 들면, 1mg hBD-2/kg 체중 내지 10mg hBD-2/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 1.2mg hBD-2/kg 체중 내지 약 10mg hBD-2/kg 체중, 바람직하게는 약 1.2mg hBD-2/kg 체중 내지 약 5mg hBD-2/kg 체중, 훨씬 더 바람직하게는 1.2mg hBD-2/kg 체중으로, 예를 들면, 1일 1, 2 또는 3회 이하의 분할 용량으로 투여된다.

[0127] 2개의 상이한 디펜신이 하나의 투여량으로 투여되는 경우, 투여량은 중량 기준 또는 몰 기준으로 결정되는 2개 디펜신의 동등한 또는 대략 동등한 양을 포함할 수 있다. 또한, 비율은 알파 디펜신 대 베타-디펜신이, 중량 또는 몰 기준으로 결정된, 10:1 내지 1:10, 예를 들면, 5:1 내지 1:5, 예를 들면, 2:1 내지 1:2로 상이할 수 있다.

[0128] 바람직한 실시형태의 화합물은 포유동물, 예를 들면, 인간에게 종래 사용되는 유사한 투여량으로 유사한 투여 방식에 의해 투여될 수 있다.

[0129] 한 가지 실시형태에서, 본원에 기재된 방법에서, 1일 투여량은 1일당 0.1 내지 10mg 디펜신/kg, 예를 들면, 0.5 내지 5mg 디펜신/kg, 예를 들면, 1 내지 2mg 디펜신/kg, 예를 들면, 1.2mg 디펜신/kg이다.

[0130] 특정 실시형태에서, 바람직한 실시형태의 약제학적 조성물은 포유동물 알파 디펜신 및/또는 포유동물 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 알파 디펜신 및/또는 인간 베타 디펜신을 단위 투여형당 약 0.5mg 이하 내지 약 1500mg 이상, 바람직하게는 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 또는 0.9mg 내지 약 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000mg, 및 보다 바람직하게는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25mg 내지 약 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100mg의 양으로 포함할 수 있다. 그러나, 특정 실시형태에서, 상기 언급된 것들보다 낮거나 높은 투여량이 바람직할 수 있다. 적절한 농도 및 투여량은

당해 기술분야의 숙련가에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 바람직한 실시형태의 약제학적 조성물은 포유동물 알파 디펜신, 예를 들면, 인간 알파 디펜신을 포함한다. 다른 실시형태에서, 바람직한 실시형태의 약제학적 조성물은 포유동물 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 베타 디펜신을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 바람직한 실시형태의 약제학적 조성물은 포유동물 알파 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신을 포함하고, 여기서 알파 및 베타 디펜신은 몰농도 기준 또는 mg/ml 기준으로 동일한 양으로 존재한다.

[0131] 한 가지 실시형태에서, 포유동물 알파 및/또는 베타 디펜신은 적어도 1일 1회, 예를 들면, 적어도 1일 2회, 예를 들면, 적어도 1일 3회 또는 연속적으로 투여된다.

[0132] 한 가지 실시형태에서, 포유동물 알파 및/또는 베타 디펜신은 환자에서 외부 인공호흡기를 장착한 상태에서 연속 주입으로 정맥내 또는 연속 기계적 환기에 의해 폐내에 투여된다.

[0133] **경구 또는 비경구 투여를 위한 제형**

[0134] 포유동물 알파 및 베타 디펜신은 임의의 통상의 경로에 의한 투여용으로 제형화된 조성물에서 치료학적으로 사용될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 개시된 방법에 따르는 적어도 하나의 포유동물 β-디펜신의 투여는 일반적으로 비강내이다. 비강내 투여는 폐 약물 전달에 대한 표준이다.

[0135] 한 가지 실시형태에서, 개시된 방법에 따르는 적어도 하나의 포유동물 α-디펜신 및/또는 적어도 하나의 포유동물 β-디펜신의 투여는 경구이다.

[0136] 한 가지 실시형태에서, 개시된 방법에 따르는 적어도 하나의 포유동물 α-디펜신 및/또는 적어도 하나의 포유동물 β-디펜신의 투여는 피하 또는 정맥내이다.

[0137] 일부 실시형태 내에서, 바람직한 실시형태의 조성물은, 동결건조물로서 안정성을 제공하는 적절한 부형제를 사용하여, 및 이어서 재수화 후에 동결건조물로서 제형화될 수 있다. 포유동물 알파 디펜신 및/또는 포유동물 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 알파 디펜신 및/또는 인간 베타 디펜신을 함유하는 약제학적 조성물은 종래의 방법에 따라, 예를 들면, 혼합, 과립화, 코팅, 용해 또는 동결건조 프로세스에 의해 제조할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 포유동물 알파 디펜신 및/또는 포유동물 베타 디펜신을 함유하는 약제학적 조성물은 무균 및 등장성 용액으로 제형화된다.

[0138] 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제는 당해 기술분야의 숙련가에게 친숙하다. 액체 용액으로 제형화된 조성물의 경우, 허용되는 담체 및/또는 희석제는 생리식염수 및 멸균수를 포함해야 하고, 조성물은 항산화제, 완충제, 정균제 및 기타 통상의 첨가제를 임의로 포함할 수 있다.

[0139] 개시된 화합물은 경구 투여를 위해 광범위한 제형으로 제형화될 수 있다. 고형 제제는 산제, 정제, 액적제, 캡슐제, 카세제, 로젠지제 및 분산성 과립제를 포함할 수 있다. 경구 투여에 적합한 기타 형태는 에멀전, 시럽, 엘릭시르, 수용액, 수성 현탁액, 치약, 겔 치약, 츄잉 껌을 포함하는 액체형 제제, 또는 사용 직전에 액체 형태 제제, 예를 들면, 용액, 현탁액 또는 에멀전으로 전환되는 것을 의도하는 고체형 제제를 포함할 수 있다.

[0140] 개시된 화합물은 비강내, 피하 또는 정맥내 투여를 위해 광범위한 제형으로 제형화될 수 있다. 제형은 (포유동물 알파 디펜신 및/또는 포유동물 베타 디펜신, 및 기타 임의의 활성 성분에 추가하여) 담체, 충전제, 붕괴제, 유동조절제, 당 및 감미제, 향미제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 가용화제, 삼투압 조절 염, 완충제, 희석제, 분산제 및 계면활성제, 결합제, 윤활제 및/또는 당해 기술분야에 공지된 기타 약제학적 부형제를 함유할 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가는 포유동물 알파 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신을 적절한 방식으로 및 사용되는 관행, 예를 들면, 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro (1990)]에 기재된 것들에 따라 추가로 제형화할 수 있다.

[0141] 포유동물 알파 디펜신 및 포유동물 베타 디펜신, 예를 들면, 인간 알파 디펜신 및 인간 베타 디펜신은 단독으로 또는 1, 2 또는 그 이상의 기타 약제학적 화합물 또는 약물 물질, 예를 들면, 글루코코르티코이드, β-작용제, 류코트리엔 수용체 길항제, 테오필린, 항생제, 화학요법 또는 면역요법 또는 이들의 조합물 및/또는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제(들)와 병용 요법으로 사용할 수 있다.

[0142] **기도 투여**

[0143] 기도 투여는 본 개시의 조성물을 투여하기 위해 사용할 수 있다. 폐내 투여는 폐로의 국소 투여를 의미한다. 본원에 사용되는 경우, 용어 "기관내, 기관지내 또는 폐포내 투여"는 이러한 모든 투여 형태를 포함하고, 이에

의해 디펜신은, 디펜신 용액의 점액 주입에 의해서든지, 디펜신을 분말 형태로 적용하거나, 부가된 안정화제 또는 기타 부형제의 존재 또는 부재하에, 에어로졸화 또는 분무화 용액 또는 현탁액 또는 흡입 분말 또는 겔로서 디펜신의 흡입에 의해 디펜신을 기도의 관련 부분에 도달하게 함으로써 기관내, 기관지 또는 폐포에 각각 적용된다.

[0144] 기관지내/폐포 투여의 방법은, 이로써 한정되지 않지만, 부형제의 존재 또는 부재하에, 건조 형태로 디펜신을 함유하는 흡입 분말의 사용 또는 기관지내시경 검사 동안 용액 또는 현탁액 또는 분말 형태로 디펜신의 직접 적용을 포함하여, 세정액으로서, 디펜신이 용해되어 있거나 실제로 기타 유효 형태의 기관지내 투여에 의해 생리학적으로 허용되는 조성물을 사용하는 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 방법에 따르는 기관지폐포 세정(BAL)을 포함한다. 기관내 투여를 위한 방법은, 이로써 한정되지 않지만, 용해된 디펜신의 유사한 용액 또는 디펜신 현탁액을 사용한 블라인드 기관 세정, 또는 이러한 목적에 적절한 임의의 분무 장치의 사용에 의해 수득한 용해된 디펜신 또는 디펜신 현탁액을 함유하는 분무 유체 액적의 흡입을 포함한다.

[0145] 또 다른 실시형태에서, 기관내, 기관지내 또는 폐포내 투여는 생성물의 흡입을 포함하지 않지만, 점액주입, 또는 디펜신 용액 또는 디펜신을 함유하는 분말 또는 겔의 기관지 또는 하부 기도로의 적용을 포함한다.

[0146] 다른 바람직한 투여 방법은 하기 장치를 사용하는 것을 포함할 수 있다:

[0147] 1. 압축 공기/산소 혼합물을 사용한 가압 네블라이저(nebulizer)

[0148] 2. 초음파 네블라이저

[0149] 3. 전자 마이크로컴프 네블라이저

[0150] 4. 정량 흡입기(MDI)

[0151] 5. 건조 분말 흡입기 시스템(DPI),

[0152] 에어로졸은 기계적 환기 동안 삼관된 환자에서 a) 페이스마스크를 통해 또는 b) 기관내 튜브를 통해 전달될 수 있다(장치 1, 2 및 3). 장치 4 및 5는 또한 환자가 에어로졸 장치를 자가 작동시킬 수 있는 조건에서 보조 없이 환자에 의해 사용될 수 있다.

[0153] 디펜신 및/또는 디펜신의 기능적 상동체 또는 변이체를 포함하는 용액의 바람직한 농도는 용액 ml당 약 0.1 μ g 내지 1000 μ g의 범위, 예를 들면, 용액 ml당 약 0.1 μ g 내지 250 μ g의 범위이다.

[0154] **폐내 투여용의 약제학적 조성물**

[0155] 본 개시에서 사용하기 위한 약제학적 조성물 또는 제형은 디펜신을 약제학적으로 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체 또는 희석제와 조합하여, 바람직하게는 그 중에 용해된 상태로 포함하거나, 폐길화된 제제로서 또는 흡입을 통한 에어로졸로서 투여되는 리포솜 또는 나노입자 제제로서, 또는 기관지폐포 세정 또는 블라인드 기관내 세척 또는 세정으로 기관지내시경을 통해 투여되는 세정액으로서 하부 기도에 운반되는 것을 포함한다. 0.9% 생리식염수, 완충 생리식염수, 생리학 적합성 완충제 등을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다양한 수성 담체를 사용할 수 있다. 조성물은 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 종래의 기술에 의해 멸균시킬 수 있다. 수득된 수용액은 사용을 위해 패키징하거나, 멸균 조건하에서 여과하여 동결건조시킬 수 있고, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수용액에 용해시킨다.

[0156] 한 가지 실시형태에서, 동결-건조 디펜신 제제는, 예를 들면, 단일 용량 단위로 사전-팩키징할 수 있다. 보다 바람직한 실시형태에서, 단일 용량 단위는 환자에 맞춰 조정된다.

[0157] 조성물은, 예를 들면, 나트륨 아세테이트, 나트륨 락테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 등의, pH 조정제 및 완충제 및/또는 등장성 조정제를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 약제학적으로 허용되는 보조 물질 또는 애췌번트를 함유할 수 있다.

[0158] 제형은, 미소구체, 리포솜, 마이크로캡슐, 나노입자 등을 포함하는 약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 함유할 수 있다. 종래의 리포솜은 전형적으로 인지질(중성 또는 음으로 하전된) 및/또는 콜레스테롤로 이루어진다. 리포솜은 수성 구획을 포위하는 지질 이중층에 기초하는 소포 구조이다. 이들은 크기, 지질 조성, 표면 전하 및 인지질 이중층의 수 및 유동성 등의 이들의 물리화학적 특성에서 상이할 수 있다. 리포솜 형성을 위해 가장 빈번히 사용되는 지질은 1,2-디라우로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DMPC), 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포

콜린(DSPC), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DOPC), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DMPE), 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DPPE), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스페이트(일나트륨 염)(DMPA), 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스페이트(일나트륨 염)(DPPA), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스페이트(일나트륨 염)(DOPA), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-[포스포-*rac*-(1-글리세롤)](나트륨 염)(DMPG), 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-[포스포-*rac*-(1-글리세롤)](나트륨 염)(DPPG), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-[포스포-*rac*-(1-글리세롤)](나트륨 염)(DOPG), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-[포스포-L-세린](나트륨 염)(DMPS), 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-[포스포-L-세린](나트륨 염)(DPPS), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-[포스포-L-세린](나트륨 염)(DOPS), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-(글루타릴)(나트륨 염) 및 1,1',2,2'-테트라미리스토일 카디올리핀(암모늄 염)이다. 기타 지질 또는 리포솜의 개질제와 조합하여 DPPC로 구성된 제형은, 예를 들면, 콜레스테롤 및/또는 포스파티딜콜린과 조합하는 것이 바람직하다.

[0159] 장기-순환 리포솜은, 혈관 벽의 투과성이 증가되는 신체 부위에서 유출하는 이들의 능력을 특징으로 한다. 장기-순환 리포솜을 제조하는 가장 일반적 방법은 친수성 중합체 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 리포솜의 외부 표면에 공유 결합시키는 것이다. 일부 바람직한 지질은 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](암모늄 염), 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-5000](암모늄 염), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(염화물 염)(DOTAP)이다.

[0160] 리포솜에 적용가능한 가능한 지질은 아반티, 폴리 리피드 인코포레이티드(Avanti, Polar Lipids, Inc, Alabaster, AL)에 의해 공급되고 있다. 추가로, 리포솜 현탁액은 저장시의 유리-라디칼 및 지질-과산화성 손상으로부터 지질을 보호하는 지질-보호제를 포함할 수 있다. 알파-토코페롤 등의 친유성 유리-라디칼 키퍼 및 페리옥시안인 등의 수용성 철-특이적 킬레이트제가 바람직하다.

[0161] 다양한 방법은, 예를 들면, 문헌[참조: Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), U.S. Pat. Nos. 4, 235,871, 4,501,728 and 4,837,028, 모두는 본원에서 참조에 의해 도입된다]에 기재된 바와 같이, 리포솜의 제조에 이용가능하다. 또 다른 방법은 불균일 크기의 다층 소포를 제조한다. 이 방법에서, 소포-형성 지질을 적합한 유기 용매 또는 용매 시스템에 용해시키고, 진공 또는 불활성 기체하에 건조시켜 얇은 지질 필름을 형성한다. 필요에 따라, 필름은 적합한 용매, 예를 들면, 3급 부탄올에 재용해시킨 다음, 동결건조시켜, 보다 용이하게 수화된 분말-유사 형태인 보다 균질한 지질 혼합물을 형성할 수 있다. 이 필름을 표적 약물 및 표적 성분의 수용액으로 피복하고, 전형적으로 교반하면서 15 내지 60분에 걸쳐 수화시켰다. 수득된 다중층 소포의 크기 분포는, 보다 격렬한 진탕 조건하에 지질을 수화시킴으로써 또는 데옥시콜레이트 등의 가용화 세제를 첨가함으로써 보다 작은 크기로 이동시킬 수 있다.

[0162] 미셀은 수용액 중의 계면활성제(소수성 부분 및 하나 이상의 이온성 또는 달리는 강력한 친수성 그룹을 함유하는 분자)에 의해 형성된다.

[0163] 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 일반적 계면활성제를 본 발명의 미셀에 사용할 수 있다. 적합한 계면활성제는 나트륨 라우레이트, 나트륨 올레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 옥타옥시에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 옥트옥시놀 9 및 PLURONIC F-127(Wyandotte Chemicals Corp.)을 포함한다. 바람직한 계면활성제는, TWEEN-80, PLURONIC F-68, n-옥틸-베타-D-글루코피라노사이드 등의 IV 주사에 적합한 비이온성 폴리옥시에틸렌 및 폴리옥시프로필렌 세정제이다. 또한, 리포솜의 제조에서 사용에 대해 기재된 것 등의 인지질을 또한 미셀 형성에 사용할 수 있다.

[0164] 실시예

[0165] 실시예 1.

[0166] 뮤린, 감염 유도된, 심각한, 스테로이드-비감수성, 호중구성, 알리지성 기도 질환의 천식 모델에서 포유동물 β -디펜신의 유효성을 측정 및 평가하기 위한 것(도 1).

[0167] 재료 및 방법

[0168] 치료 섭생:

[0169] 암컷 6 내지 8주령 BALB/c 마우스를, 200 μ l의 0.9% 생리식염수 중의 애주번트 알BUM 1mg으로 오브알부민 50 μ g에 대해 복강내(IP) 감각시켰다. 마우스를 12 내지 13일차 및 33 내지 34일차에 Ova로 비강내(IN) 챌린지했다(50 μ l 멸균 생리식염수 중의 10 μ g). 14일차에, 마우스에게 천연 마우스 병원체 클라미디아 뮤리다툼(*Chlamydia*

muridarum)(Cmu: 100 봉입 형성 단위), ATCCVR-123, 30 μ l 슈크로즈 포스페이트 글루타메이트 완충제(SPG)를 IN 투여했다. 텍사메타손(DEX)를 Ova 켈린지로 32 내지 34일차에 IN 투여했다(2mg/kg; 50 μ l 포스페이트 완충 생리식염수(PBS)). hBD-2를 30, 32 및 34일차에 IN 투여했다(5mg/kg; 50 μ L 포스페이트 완충된 생리식염수).

- [0170] 마우스에게 비강내 전달을 통해 투여된 약물은 기도를 통해 폐에 도달할 것으로 예상되며, 당해 분야에서 인식되는 폐내 투여의 모델이다.
- [0171] 시험:
- [0172] 기도 염증: 광학 현미경을 사용하여, 마이-그룬발트 기엠사(May-Grunwald Giemsa) 염색된 BALF 세포로부터 상이한 백혈구 수를 수득했다.
- [0173] 폐 기능: 쉬렉 플레시벤트(Scireq Flexivent) FX1 시스템을 사용하여 마취된 캐놀라 삽입 마우스에 의해 AHR을 측정했다. 데이터는 10mg/kg 메타콜린에서의 기도 저항으로서 및 용량 반응 곡선으로서 나타낸다.
- [0174] 결과
- [0175] 기도 염증: Ova 감작화된 및 씨. 무리다룸 감염된 마우스는 총 백혈구, 마크로파지, 림프구, 호중구 및 보다 작은 정도의 호산구의 매우 통계학적으로 유의한 증가를 나타냈다. IN hBD-2 처리된 그룹은 호중구 수 및 보다 적은 정도의 림프구의 완전한 정상화를 나타냈지만, 마크로파지 및 호산구는 변화가 없었다. IN hBD-2 + DEX 그룹은 호산구의 완전한 정상화를 나타냈지만, 이것 이외에는 첨가 효과가 관찰되지 않았다(도 7).
- [0176] 폐 기능: Ova 감작 마우스(Ova)는 생리식염수(Sa1)(비-천식성) 대조군과 비교하여 보다 큰 AHR을 가졌다. 차이는 통계학적으로 매우 유의적이다. IN hBD-2 처리된 그룹(Cmu/Ova/hBD2)은 생리식염수 대조군 그룹과 동등하게 완전히 정상화된 AHR을 나타냈다. IN hBD-2 + DEX 그룹은 생리식염수 대조군 그룹과 동등하게 완전히 정상화된 AHR을 나타냈지만, DEX는 첨가 효과를 갖지 않는 것으로 보인다(도 4).
- [0177] 결론: 이 실시예는 비강내 투여된 hBD2가 천식의 공지된 스테로이드-난치성 동물 모델에서 기도 과민성반응 및 BALF 중의 호중구 수를 완전히 정상화할 수 있음을 입증한다.
- [0178] 실시예 2.
- [0179] 무린 집먼지 진드기/프로인트 완전 애주번트 유도된 알러지성 천식의 모델에서 IN 대 경구 투여된 포유동물 β -디펜신의 유효성을 결정하고 평가하기 위한 것(도 2).
- [0180] 재료 및 방법
- [0181] 치료 섭생: 연구 개시 1일 전에 암컷 7-10주령 BALB/c 마우스를 무작위로 7개 연구 그룹으로 할당하고, 집먼지 진드기(200 μ l 생리식염수 중의 100 μ g HDM + 0.9% 생리식염수 중의 프로인트 완전 애주번트)에 피하(SC) 감작시켰다. 이어서, 마우스를 14일차에 HDM으로 비강내(IN) 켈린지했다(50 μ L 생리식염수 중의 HDM 25 μ g). 텍사메타손을 14일차에 경구 투여했다(1mg/kg BID; 50 μ L 포스페이트 완충된 생리식염수(PBS)). hBD-2를 14일차에 IN 또는 경구 투여했다(1.7mg/kg TID IN; 0.4mg/kg TID IN; 0.4mg/kg TID 경구, 50 μ L 포스페이트 완충된 생리식염수). 최초 용량은 켈린지 60분 전에 투여했고, 후속 용량은 대략 6시간 간격으로 투여했다.
- [0182] 시험:
- [0183] 기도 염증: 켈린지후 48시간에서, 기관지폐포 세정은 3용적의 냉 PBS(0.4; 0.3 및 0.3mL, 총 1mL)으로 폐를 세척하는 것으로 수행했다. 전체 및 분화 백혈구 세포 수는 자동 혈액 분석장치 Sysmex XT-2000iV로 결정했다.
- [0184] 폐 기능: HMD 켈린지후 48시간에서 개시하여, DSI 북스코 파인포인트(Buxco Finepoint) RC 시스템을 사용하여 마취된 캐놀라 삽입 마우스에 의한 메타콜린 켈린지(3.125 MCH1; 6.25 MCH2; 12.5 MCH3 및 25mg/mL MCH4) 후에 폐 저항 및 폐 탄성의 측정을 수행했다. 데이터는 10mg/kg 메타콜린에서의 기도 저항성으로 및 용량 반응 곡선으로 나타낸다.
- [0185] 사이토킨 분석을 위한 폐 샘플링: 모든 BAL의 완료 후, 폐를 흉부에서 제거하고, 액체 질소에서 순간 동결시키고, ELISA에 의해 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 및 IFN γ 의 사이토킨 농도를 분석할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 동결 저장했다.
- [0186] 결과
- [0187] 생리식염수-켈린지(비-천식성) 마우스와 비교하여 HDN-켈린지 비히클 처리된 동물에서 폐 저항 값의 증가 및 폐

탄성 값의 감소가 관찰되었다. 마우스의 양 비히클-처리된 그룹(경구 및 비강내)에서 염증 반응은 HDM 및 애쥬번트에 의한 감작 14일 후에 단일 HDM 챌린지에 의해 유도되었다. 생리식염수-챌린지 대조군과 비교하는 경우, 이는 BALF에서 총 세포, 호산구, 호중구, 마크로파지 및 백혈구 수에서 통계학적으로 유의한 증가를 특징으로 한다($p < 0.05$). 또한, 폐 조직 균질물에서 5개 사이토킨 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 및 IFN- γ 의 농도 분석은 생리식염수-챌린지 대조군과 비교하여 HDM-챌린지 동물에서 유의적으로 높은 수준을 나타냈다.

[0188] 텍사메타손 치료는, BALF에서 총 세포 및 호산구 수를 유의적으로 억제시켰지만, 호중구, 마크로파지 및 림프구 수는 억제시키지 않았다. 세포 데이터에 따르면, 텍사메타손은 HDM/비히클 대조군과 비교하여 폐 조직 균질물에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 및 IFN- γ 의 수준에 영향을 미치지 않았다. 그러나, 이는 호산구 수와 관련된 AHR 측정에 영향을 미쳤다. 수득된 결과는 이 모델이 어느 정도 스테로이드 내성이 있는 것을 나타낸다.

[0189] 시험 항목 hBD-2는 경구 및 비강내 적용 TID 후의 양방에서, 14일차에, HDM 챌린지 비히클 처리된 동물과 비교하여, 기도 저항의 증가(도 5a 및 5b) 및 폐 탄성의 감소(도 6a 및 6b)를 효과적으로 억제시켰다. 비강내 적용 후에 측정된 일부 파라미터, 예를 들면, BALF에서의 세포 유입 등의 보다 현저한 효과가 관찰되었고, 양 용량 (0.4mg/kg/day TID 및 1.7mg/kg/day TID)은 호중구 수를 유의적으로 억제시켰지만, 스테로이드 표준 텍사메타손은 이들을 억제시키는 것에 실패했다. 양 투여 경로에서 폐 조직 균질물 중의 IL-6, IL-10 및 IFN- γ 사이토킨 수준에 대해 유사한 유의한 효과가 관찰되었다(도 9, 14, 17). 경구 투여된 hBD2는 TNF- α 를 유의적으로 감소시켰지만(도 10), 비강내 투여된 hBD2는 대조군과 유의차가 없었다. 도 11은 IL-1 β 에 대한 효과를 나타낸다.

[0190] 결론: 모든 수득된 결과는 알러지성 천식의 집먼지 진드기/프로인트 완전 애쥬번트 유도된 마우스 모델에서 hBD-2의 명백한 항-염증 효과를 나타낸다. 놀랍게도, 경구 투여된 hBD2는 또한 천식의 치료 및 천식성 마우스에서 염증의 감소에 효과적이었다.

[0191] **실시예 3.**

[0192] 무린 집먼지 진드기/프로인트 완전 애쥬번트 유래된 알러지성 천식 모델에서 IN 대 경구 포유동물 β -디펜신의 유효성을 결정 및 평가하기 위한 것(도 2).

[0193] **재료 및 방법**

[0194] 치료 섭생: 연구 개시 1일 전에 암컷 7-10주령 BALB/c 마우스를 무작위로 4개 연구 그룹으로 할당하고, 집먼지 진드기(200 μ l 생리식염수 중의 100 μ g HDM + 0.9% 생리식염수 중의 프로인트 완전 애쥬번트)에 피하(SC) 감작시켰다. 마우스를 14일차에 HDM으로 비강내(IN) 챌린지했다(50 μ l 생리식염수 중의 HDM 25 μ g). hBD-2를 14일차에 IN 또는 경구 투여했다(0.4mg/kg TID IN; 0.4mg/kg TID 경구, 50 μ L 포스페이트 완충된 생리식염수). 최초 용량은 챌린지 60분 전에 투여했고, 후속 용량은 대략 6시간 간격으로 투여했다.

[0195] 시험:

[0196] 폐 조직 샘플링: 폐를 흉부에서 제거하고, 액체 질소에서 순간 동결시키고, ELISA에 의해 IL-4, IL-5, IL-8(KC), IL-9 및 IL-13의 사이토킨 농도를 분석할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 동결 저장했다.

[0197] 폐는 그 장소에서 10% 완충된 포르말린에서 팽창시키고, 흉부로부터 제거하고, 10% 완충 포르말린 중에 개별적으로 넣고, 완전히 파라핀 매립하고, 절편화하고, H&E/PAS 염색했다.

[0198] 혈액 샘플링

[0199] 모든 말초 혈액 샘플을 경정맥 출혈에 의해 채취했다. 혈액을 Li-헤파린 튜브에 샘플링하고, 아이스에 배치한 직후, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리했다. 혈장을 분리하고, 전위 SCFA 분석 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 저장했다.

[0200] 폐 조직 샘플링

[0201] 흉부를 온화하게 개방하고 흉골 및 늑골의 어느 측면을 절단하고 다시 트리밍하여 폐를 노출시키고 절제했다. 그룹당 최초 6마리 동물의 폐를 흉부로부터 제거하고, 액체 질소에서 순간 동결시키고, ELISA에 의해 사이토킨 농도를 분석할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 동결 저장했다.

[0202] 그룹당 다른 8마리 동물의 폐를 그 장소에서 10% 완충된 포르말린으로 팽창시키고, 흉부로부터 제거하고, 개별적으로 10% 완충된 포르말린에 넣고, 완전히 파라핀 매립하고, 절편화하고, H&E/PAS 염색했다. 파라핀 차단용 IHC 분석용으로 유지했다.

[0203] **판독**

- [0204] · 병리조직학(H&E; PAS)(N=8/그룹; 총 N=32)
- [0205] · 폐 조직 균질물 중의 사이토킨(IL-4, IL-5, KC, IL-9 및 IL-13)(N=6/그룹; 총 N=24)
- [0206] 병리조직학
- [0207] 세포 유입(단핵, 호산구, 호중구)은 기관지주변/세기관지 및 혈관주변 공간에 대해 별도로 H&E 염색된 슬라이드 상에서 반-정량적으로 다음과 같이 평가했다:
- [0208] 0 부재
- [0209] 1 소수의 산재하는 염증성 세포
- [0210] 2 보다 거대한 응집체
- [0211] 3 세포의 현저한 축적
- [0212] 염증의 총 스코어는 모든 개개 스코어의 합계로서 계산했다.
- [0213] 배상 세포 이형성은, 거대 기도 및 원위 기도의 수준에서 별도로, 다음과 같이 PAS-염색된 슬라이드에서 평가했다:
- [0214] 0 기저 막을 따라 점액 함유 세포 없음
- [0215] 1 75% 미만의 세포질이 염색된 기저 막을 따라 소수의 양성 세포
- [0216] 2 75% 초과와 세포질이 염색된 기저 막을 따라 소수의 양성 세포
- [0217] 3 75% 미만의 세포질이 염색된 기저 막을 따라 다수의 양성 세포
- [0218] 4 75% 초과와 세포질이 염색된 기저 막을 따라 다수의 양성 세포
- [0219] **통계적 평가**
- [0220] 데이터는 MS 엑셀을 사용하여 처리했다. GraphPad Prism 소프트웨어(버전 5.04)를 사용하여 통계적 분석을 수행했다. 그룹 사이의 차이는 $p < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.
- [0221] 선택된 조직학적 스코어-값 데이터의 통계적 분석은 중앙 및 비-파라미터 만-휘트니 시험을 사용하여 수행했다.
- [0222] **결과**
- [0223] 비히클-처리된 마우스 그룹(경구 및 비강내) 둘 다에서 염증 반응은 HDM 및 애쥬번트에 의한 감작화 14일 후에 단일 HDM 챌린지에 의해 유도했다. 이는, 생리식염수-챌린지 대조군과 비교하여, 폐 조직 균질물 중의 5개 사이토킨 IL-4, IL-5, IL-8, IL-9 및 IL-13 농도의 통계적으로 유의한 증가 및 HDM-챌린지 동물에서 폐 조직의 심각한 조직학적 염증 변화를 특징으로 했다.
- [0224] 시험 항목 hBD-2는, 경구 및 비강내 적용 TID 후의 양방에서, 14일차에, HDM 챌린지 비히클 처리된 동물과 비교하여 폐 조직의 조직학적 염증의 증가를 효과적으로 억제시켰다(도 19, 20, 21). 양 투여 경로에서 폐 조직 균질물 중의 IL-4, IL-5, IL-8, IL-9 및 IL-13 사이토킨 수준에 대하여 동일한 유의한 효과가 관찰되었다(도 12, 13, 15, 16, 18).
- [0225] 결론: 획득된 모든 결과는, 알러지성 천식의 집먼지 진드기/프로인드 완전 애쥬번트 유래된 마우스 모델에서 hBD-2의 명백한 항-염증 효과를 나타낸다. 이 효과는 hBD-2의 비강내 및 경구 투여 둘다를 사용하여 획득되었다.
- [0226] **실시예 4.**
- [0227] NMRI 마우스에게 4mg/kg 투여의 단일 경구 위관영양 후의 hBD-2의 약동학적 프로파일을 확립하기 위한 약동학적 연구
- [0228] **재료 및 방법**
- [0229] 치료 섭생: 투여 일에 획득된 개개 체중에 따라, 21마리 암컷 NMRI 마우스에게, 위관영양 튜브 및 1ml 시린지를 사용하여 5ml/kg의 경구 위관영양에 의해 투여했다. 복부의 서혜부를 온화하게 마사지하여 소변을 무작위 시점에서 샘플 채취했다. 제1 혈액 샘플은 하악 샘플링 방법을 사용하여 채취했다. 제2 혈액 샘플은 이소플루란

마취 마우스로부터 채취했다. 장 샘플은 안락사 후에 채취했다. 각 마우스의 복부를 개방하고, 장의 3개 절편을 샘플링했다.

[0230]

결과

[0231]

hBD-2는, 모든 값이 < 10pg/ml의 검출 수준을 하회했기 때문에, 혈청 또는 소변 샘플의 어느 것에서도 HPLC에 의해 검출할 수 없었다. 이는 마우스에서 4mg/kg의 경구 투여후 hBD-2가 전신적으로 이용할 수 없는 것을 나타낸다(도 22).

[0232]

실시예 5.

[0233]

NMRI 암컷 마우스에게 1mg/kg hBD-2(분자량 66437 Da)에 상당하는 몰농도의 피하 또는 정맥내 투여 후에 인간 혈청 알부민의 C-말단(분자량 71.336 Da) 또는 N-말단(분자량 71.666 Da)에 융합시킨 hBD-2의 약동학적 프로파일을 조사 및 비교하기 위한 것

[0234]

재료 및 방법

[0235]

치료 섭생: 동물에게 개개 체중에 따라 1.65mg/ml의 스톡 농도의 10mg/kg(30g 마우스에 대해 300 μ l)를 투여했다. 최초 혈액 샘플은 하악 샘플링 방법을 사용하여 채취하고, 제2 샘플은 이소플루란 마취 및 안락사 후에 채취했다.

[0236]

결과

[0237]

hBD-2는 1시간의 반감기를 나타냈고, 2개의 융합 단백질은 12시간의 반감기를 나타냈다. AUC는 극적으로 변화했다. 신장 클리어런스는 또한 hBD-2에 대해 10ml/분으로부터 2개 융합된 분자에 대해 0.5-2.2ml/분으로 변화했다(도 23, 24, 25).

[0238]

본 실시예는 hBD2의 반감기가 알부민에 대한 C- 또는 N-말단 접합에 의해 유의적으로 연장될 수 있음을 입증한다.

[0239]

실시예 6.

[0240]

마우스에서 급성 10일간 텍스트란 황산나트륨(DSS) 유도된 대장염 모델에서 "hBD-2-알부민 융합 N-말단"의 항-염증 효과를 결정하고 평가하기 위한 것

[0241]

재료 및 방법

[0242]

치료 섭생: "hBD-2-알부민 N-말단"을 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 또는 무균 25G 니들을 사용하여 피하로 10ml/kg 체중의 투여 용적으로 투여했다. 동물에게 10일 실험일 동안 1일 1용량을 제공했다. 활성 대조군 텍사메타손(DEX)는 10ml/kg 체중 OD의 투여 용적으로 1mg/kg의 용량에서 피하 제공했다.

[0243]

결과

[0244]

"hBD-2-알부민 N-말단"에 의한 치료는, 정맥내 경로를 통해 1.65mg/kg의 용량에서 매일 투여하는 경우, 질환 활성 지수(DAI)의 현저한 억제를 야기했다($p < 0.05$). 추가로, 10일차에, "hBD-2-알부민 N-말단"을 각각 1.65mg/kg의 용량 및 125mg/kg의 용량으로 매일 피하 투여하는 경우, DAI 스코어의 현저한 억제가 또한 관찰되었다($p < 0.05$).

[0245]

텍스트란 황산나트륨의 투여는, 조직학적 검사 후에 증명된 바와 같이, 결장 조직의 현저한 염증 및 손상을 야기했다. "hBD-2-알부민 N-말단"을 사용한 치료는 이러한 조직학적 손상의 통계학적으로 유의한 감소를 야기하지 않았지만, 유사하게는 활성 대조군 DEX는 조직학적 손상을 유의적으로 감소시킬 수 없었다.

[0246]

이 결과는 추가로, 2일 및 3일차에 체중의 일시적 감소에도 불구하고, "hBD-2-알부민 N-말단"으로 치료한 동물에서 7일차에 체중의 현저한 증가를 나타냈다. 대조적으로, DEX 치료한 동물은 5일차 이래로 체중의 매우 현저한 감소를 나타냈다($p < 0.01$).

[0247]

본 실시예는 hBD2-알부민 융합 N-말단이 염증 상태의 동물 모델에서 생물학적으로 활성적이라는 것을 입증한다.

[0248]

실시예 7.

[0249]

마우스에서 급성 10일 텍스트란 황산나트륨(DSS) 유도된 대장염 모델에서 "hBD-2-알부민 융합 C-말단"의 항-염증 효과를 결정하고 평가하기 위한 것

[0250] **재료 및 방법**

[0251] 치료 섭생: "hBD-2-알부민 C-말단"은 꼬리 정맥을 통해 정맥내에 또는 무균 25G 니들을 사용하여 10ml/kg 체중의 투여 용적으로 피하에 투여했다. 동물은 10일 실험일 동안 매일 1용량을 제공받았다. 활성 대조군 프레드니솔론(Pred)는 10ml/kg 체중 OD의 투여 용적으로 1mg/kg의 용량에서 위관영양에 의해 경구로 제공했다.

[0252] **결과**

[0253] "hBD-2-알부민 C-말단"을 사용한 치료는, 정맥내 경로를 통해 1.6mg/kg의 용량으로 매일 투여하는 경우, DAI의 현저한 억제를 야기했다(p<0.05). 추가로, "hBD-2-알부민 C-말단"은, 정맥내 경로를 통해 1.6mg/kg의 용량으로 격일 0, 2, 4, 6, 8 및 10일에 투여하는 경우, DAI의 유의한 억제를 야기했다(p<0.05)(도 26). Pred를 사용한 매일 치료는 9일차에 DAI의 유의한 억제를 야기했다(p<0.05).

[0254] 텍스트란 황산나트륨의 투여는, 조직학적 검사 후에 증명된 바와 같이, 결장 조직의 현저한 염증 및 손상을 야기했다. 1.6mg/kg의 용량에서 "hBD-2-알부민 C-말단"을 사용한 치료는 이러한 조직학적 손상의 통계학적으로 유의한 감소를 야기했다(p<0.05). 유사하게는, 0, 2, 4, 6, 8 및 10일차에 1.6mg/kg 및 16.5mg/kg의 용량에서 "hBD-2-알부민 C-말단"을 사용한 매일 치료는 결장에 대한 조직학적 손상의 유의한 감소를 야기했다(p<0.01)(도 27). 활성 대조군 Pred를 사용한 치료는 결장의 근위 부분에서 조직학적 손상을 유의적으로 감소시키지 못했지만, 원위 결장에서 손상을 감소시켰다(p<0.01).

[0255] 이 결과는 추가로 "hBD-2-알부민 C-말단"으로 치료한 동물에서 체중의 유의한 증가를 나타냈다(p<0.05).

[0256] 본 실시예는 hBD2-알부민 융합 C-말단이 염증 상태의 동물 모델에서 생물학적으로 활성적이라는 것을 입증한다.

[0257] **실시예 8.**

서열

서열번호	명칭	서열
1	hBD1	DHYNVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCKK
2	hBD2	GIGDPVTCLKSGAICHVPFPRRYKQIGTCGLPGTKCKCKP
3	hBD3	GIINTLQKYICRVGGRCVLSCLPKKEQIGKCSRGRKCCRRKK
4	hBD4	ELDRICGYGTARCKKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK
5	HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
6	HD6	AFTCHCRRCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCLL
7	절단형 hBD2	PVTCLKSGAICHVPFPRRYKQIGTCGLPGTKCKCKP

[0258]

[0259] **실시예 9.**

[0260] 알러지성 천식의 무린 집먼지 진드기 유래된 모델에서 IN 대 경구 포유동물 β-디펜신을 사용한 예방적 치료의 유효성을 결정하고 평가하기 위한 것

[0261] **재료 및 방법**

[0262] 치료 섭생: 연구 개시 1일 전에 암컷 7 내지 10주령 BALB/c 마우스를 5개 연구 그룹으로 무작위 할당하고 집먼지 진드기(200μl 생리식염수 중의 100μg HDM + 0.9% 생리식염수 중의 프로인트 완전 애쥬번트)에 피하(SC) 감각시켰다. 마우스를 아침에 12일차에 개시하여 1.2mg/kg/일(0.4mg/kg TID)의 용량으로 hBD-2로 각각 경구 및 비강내 처리하고, 대략 6시간 간격으로 TID를 계속했다. 최종 용량은 챌린지 1시간 전에 14일차에 투여했다. 총 용량 수는 8회 용량 또는 총 2mg/kg hBD-2였다. 이어서, 마우스를 14일차에 HDM으로 비강내(IN) 챌린지했다(생리식염수 50μl 중의 HDM 25μg).

[0263] 시험:

[0264] 기도 염증: 챌린지후 48시간에서, 기관지폐포 세정은 3용적의 냉 PBS(0.4; 0.3 및 0.3mL, 총 1mL)으로 폐를 세척하여 수행했다. 전체 및 분화 백혈구 세포 수를 자동 혈액 분석기 Sysmex XT-2000iV로 측정했다.

[0265] 폐 기능: HDM 챌린지후 48시간에서 개시하여, DSI의 북스코 파인포인트 RC 시스템을 사용하여 마취된, 캐놀라 삽입 마우스에 의한 메타콜린 챌린지(3.125 MCH1; 6.25 MCH2; 12.5 MCH3 및 25mg/mL MCH4) 후에 폐 저항 및 폐 탄성의 측정을 수행했다. 데이터는 10mg/kg 메타콜린에서의 기도 저항으로 및 용량 반응 곡선으로 나타낸다.

[0266] 사이토킨 분석을 위한 폐 샘플링: 모든 BAL의 완료 후, 폐를 흉부로부터 제거하고, 액체 질소에서 순간 동결시키고, ELISA에 의한 폐 균질물 중의 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 및 IL-33의 사이토킨 농도의 분석 때까지 -80°C에서 동결 저장했다.

[0267] **결과**

[0268] 생리식염수-켈린지(비-천식성) 마우스와 비교하여, HDM-켈린지 비히클 치료된 동물에서 폐 저항 값의 증가 및 폐 탄성 값의 감소가 관찰되었다. 마우스의 양 비히클-치료된 그룹(경구 및 비강내)에서 염증 반응은 HDM에 의한 감작화 14일 후의 단일 HDM 켈린지에 의해 유도되었다. 이는, 생리식염수-켈린지 대조군과 비교했을 때, BALF에서 총 세포, 호산구, 호중구, 마크로파지 및 림프구 수의 통계학적으로 유의한 증가를 특징으로 한다 ($p < 0.05$). 또한, 폐 조직 균질물 중의 7개 사이토킨 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 및 IL-33의 농도 분석은, 생리식염수-켈린지 대조군과 비교하여, HDM-켈린지 동물에서 유의적으로 높은 수준을 나타냈다.

[0269] 12일부터 14일까지 투여된(8회 투여로 총 2.0mg/kg) hBD-2는, 경구 및 비강내 적용 TID 둘 다 후에, HDM 켈린지 비히클 치료된 동물과 비교하여, 기도 저항의 증가(도 29) 및 폐 탄성의 감소(도 30)를 억제하는 정상 폐 기능을 효과적으로 보존했다. BALF 중의 세포 유입에 대한 효과는 경구 적용 후에 관찰되었고, 이는 호중구 수를 유의적으로 억제시켰지만(도 31), 달리는 면역 세포는 천식에서 정상적으로 관찰되는 바와 같이 BALF로 이행했고, 그러나 중요하게는 사이토킨 폭풍이 종종 천식에서 관찰되었고, 천식 발작에 대한 기준은 특히 hBD-2의 경구 투여 후에 폐 조직 균질물 중의 사이토킨 농도의 완전한 정상화로 방지되었다. 경구 투여 후의 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 및 IL-13 사이토킨 수준은 도 32 내지 37에 제시되어 있다. hBD-2를 비강내 투여한 후에 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 및 IL-13이 저하되는 경향이 있었지만, 이는 대조군과 통계학적으로 유의차는 없었다. 결론: 수득된 모든 결과는 알려지성 천식의 집먼지 진드기 유래된 마우스 모델에서 hBD-2의 명백한 예방적, 방지적 및 항-염증 효과를 나타낸다.

[0270]

[0271] **실시예 10.**

[0272] 디펜신을 사용한 예방적 치료에 의한 장 미생물총의 보호 및 보존

[0273] 마우스: 마우스는 3마리가 한 조로, 그룹당 4 케이지에 수용했다. 사료 섭취는, 오후 6시에 점등이 소멸되기 직전에 매일 기록했다. 각 마우스를, 그룹 및 케이지 양방과 관련하여 순서를 변경하여 실험 절차에 제공했다. 마우스를 SPF 표준 조건에서 12시간 명/암 사이클하에 실온에서 유지했다. 치료 섭생은 도 38에 기재되어 있다.

[0274] 식이: 투약을 위해, 평균 체중은 마우스당 25g인 것으로 추정했다. 마우스는 1일 1마우스당 대략 3g의 사료를 먹었다.

[0275] 치료 섭생: 마우스는 고지방 식이(HFD) 또는 저지방(LF) 대조군 식이를 섭취했다. HFD는 4개 아그룹; 1 hBD2, 1 HD5, 1 hBD2/HD5 및 디펜신을 첨가하지 않은 1 표준 HFD를 함유했다. 디펜신 농도는 1일 마우스 1kg당 1.2mg hBD2였다. HD5는 hBD2와 등물 농도로 제공했다. 병용 그룹은 50% hBD2 + 50% HD5을 제공했고, 따라서 나머지 시험 그룹과 동등한 총량의 디펜신을 제공했다.

[0276] 시험:

[0277] 장의 미생물총을 연구하기 위해 미생물 분석을 수행했다. 중방향 16S 특성화는 60마리 마우스로부터의 4쌍의 샘플, 총 240 샘플에 대해 수행했다. 각 마우스는 식이 교환 전, 식이 교환 1주일 후, 식이 교환 4주 후 및 종료시에 샘플링하고, 따라서 디펜신 치료의 결과로서 대변 미생물총의 철저한 특성화를 확실하게 했다.

[0278] **결과**

[0279] 미생물총. hBD2는 주로 미생물의 존재에 영향을 미쳤지만, HD5 및 hBD2+HD5는 주로 미생물 존재량에 영향을 미쳤다. 도 40은 상이한 처리 그룹에서 종의 상대적 존재량을 나타내고, 장내 세균총에 대한 hBD2 및 HD5의 현저한 효과를 설명한다. 알로바쿨룸의 존재량의 통계학적으로 유의한 증가는 HD5에 의한 예방 후의 소장에서 관찰되었다($p < 0.02$; 도 41). 알로바쿨룸은 단쇄 지방산 생산 종이다. 단쇄 지방산은 GPCR43을 통해 매개된 결장 Treg 세포 항상성의 조절에 중요한 역할을 담당한다. 결장에서 바르네시엘라의 존재량에서 통계학적으로 유의한 증가는 hBD2에 의한 예방적 치료 후에 관찰되었다($p < 0.03$; 도 43). 바르네시엘라는, 입원 환자에서 관찰될 수 있는 항생물질 내성 병원성 세균의 장내 우세를 배제 및 보호할 수 있는 세균이다. 바르네시엘라의 존재량

은 몇몇 면역조절 세포의 양에 상응한다. 결장에서 바르네시엘라의 수준이 보다 높으면, 비장 및 간장에서 보다 많은 주연부 B 세포 및 불변 천연 킬러 T 세포가 계수된다. IL-10-/- 마우스에서 대장염의 발증에서, 보다 높은 수준의 바르네시엘라 표현형은 질환의 보다 낮은 활성 수준과 상관관이 있었다. 락토바실라세아에의 보다 낮은 존재량의 경향은 hBD2에 의한 예방적 치료 후에 결장에서 관찰되었다(p=0.1; 도 42).

[0280] 결론: 장내 미생물총과 마찬가지로 폐는 장-폐 축을 통해 후자의 천식에서 중요한 역할을 담당한다. 주요 공생 세균 및 결장 T 세포 항상성의 존재 및 존재량에 대한 디펜신의 증대한 영향은 디펜신에 의한 경구 치료 후에 알러지성 천식 마우스에서 관찰된 폐 효과를 설명할 수 있을 뿐만 아니라, 비강내 대 경구 투여 후에 관찰된 폐 효과 사이의 차이도 설명할 수 있다. 본 실시예 10은 알파 및 베타 디펜신, 특히 HD5 및 hBD2 둘 다가 세균의 전체 수 뿐만 아니라 존재하는 종의 수와 관련하여 미생물총 구성물에 증대한 영향을 갖고, 따라서 건강한 미생물총을 보호하고 보존한다는 것을 입증한다. 보다 구체적으로, 디펜신은 단쇄 지방산 생산 세균, 결장 Treg 세포 항상성에 중요한 역할을 하는 SCFA를 촉진하는 것으로 보인다.

[0281] 실시예 11. 디펜신을 사용한 개입 치료에 의한 장내세균불균형의 치료

[0282] 마우스 및 식이. 실험은 식이-유도된 비만 마우스에서 미생물총에 대한 hBD2 및 HD5의 효과를 명료하게 한다. 마우스에게 매우 높은 HFD(지방으로서 60% 에너지)를 제공한 13주간의 치료전 단계(run-in period)는 개입을 선행했다. 치료전 단계 동안 최저 12g의 체중 증가(대략 초기 체중의 50%)의 기준을 만족하는 마우스만을 최종 분석에 포함시켰다. 이러한 기준을 만족시키지 못한 마우스는 계층 "키퍼"로서 그들 각각의 케이지에 유지했다. 이들은 모든 실험 시험에 노출되었지만, 분석으로부터 제외시켰다.

[0283] 치료 섭생. 개입 전에, 모든 마우스는 MR 스캔했다. 마우스의 케이지를 이들의 체지방량에 기초하여 실험 그룹으로 할당했다. 모든 후속 측정은 개입 전의 동일한 마우스로부터의 데이터와 쌍을 형성했다. LFD(저지방 식이) 참조 그룹은 병행하여 실시하였다. 개입의 대조군으로서, 2개 추가 그룹을 포함시켰다: 1개는 매우 HFD 및 1개는 LFD. 실험 마우스는 개입 동안 매우 HFD에 유지했다. 마우스는 10주 동안 실험 식이를 제공했다. 이들은 실험 전체에 걸쳐 케이지당 4마리, 그룹당 3케이지로 사육했다. 모든 시험은 3일에 걸쳐 1일 그룹당 1 케이지로 실시했다. 치료 섭생은 도 39에 제시되어 있다.

[0284] 시험. 장의 미생물총을 조사하기 위해 미생물 분석을 수행했다. 종방향의 16S 특성화는 60마리 마우스로부터의 4개 쌍의 샘플, 총 240개 샘플에 대해 수행했다. 각 마우스는 식이 교환 전, 식이 교환 1주 후, 식이 교환 4주 후 및 종료시에 샘플링하고, 따라서 디펜신 치료의 결과로서 대변 미생물총의 철저한 특성화를 확실하게 했다.

[0285] **결과**

[0286] 미생물총.

[0287] 양방 디펜신은 세균 부재 뿐만 아니라 세균 존재에 대해 증대한 영향을 갖는 것으로 밝혀졌다. HD5는 결장에서 알로프레보텔라의 존재량을 통계학적으로 유의하게 증가시켰지만(p<0.02)(도 44), hBD2는 알로프레보텔라 존재량에 영향을 미치지 않았다. hBD2는 소장 및 결장 둘 다에서 비피도박테리아세아에의 상대 존재량을 극적으로 및 통계학적으로 유의하게 증가시켰다(각각 p<0.0001 및 p<0.04; 도 45). HD5가 소장 내에서 비피도박테리아세아에의 존재량을 증가시키는 경향이 있었다(도 45).

[0288] 장내 미생물총 뿐만 아니라 폐는 장-폐 축을 통해 후자의 천식에 중요한 역할을 한다. 주요 공생 세균의 존재 및 존재량 및 결장 T 세포 항상성에 대한 디펜신의 증대한 영향은 디펜신에 의한 경구 치료 후에 알러지성 천식 마우스에서 관찰된 폐 효과를 설명할 수 있을 뿐만 아니라, 비강내 대 경구 투여 후에 관찰된 폐 효과 사이의 차이도 설명할 수 있다.

[0289] 결론: 본 실시예 11은 알파 및 베타 디펜신, 특히 hBD2 및 HD5 둘 다가 세균의 전체 수 뿐만 아니라 존재하는 종의 수와 관련하여 미생물총 구성물에 대한 증대한 영향을 갖고, 따라서 건강한 미생물총을 보호하고 보존하는 것을 입증한다. 보다 구체적으로는, 디펜신은 단쇄 지방산 생산 세균, 결장 Treg 세포 항상성에 중요한 역할을 하는 SCFA를 촉진하는 것으로 보인다.

- [0290] **참고문헌**
- 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.
- [0291]
- 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.
- Ege, M.J. et al., 2011. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *NEJM* 364: 701-709.
- 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
- Hansbro, P.M. et al., 2011. Cytokine/anti-cytokine therapy – novel treatments for asthma? *BJP* 163: 81-95.
- Hilty, M. et al., 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE* 5, e8578
- Hogg, J.C. et al. 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *NEJM*: 350: 2645-2653.
- Jakobsson, H.E. et al. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonization and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarian section. *Gut* 63: 559-566.
- Marra, F. et al., 2009. Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma. *Pediatrics* 123: 1003-1010.
- Marsland, B.J. et al., 2015. The gut-lung axis in respiratory disease. *Annals ATS* 12: S150-156
- Penders, J. et al., 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 2007: 1223-1236
- Salzman NH, Underwood MA and Bevins CL, 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 19(2):70-83.
- Schirmer, M. et al., 2016. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell* 167: 1125-1136
- [0292]

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

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

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

WO 2010/007166

WO 92/06204

WO 95/17413

WO 95/22625

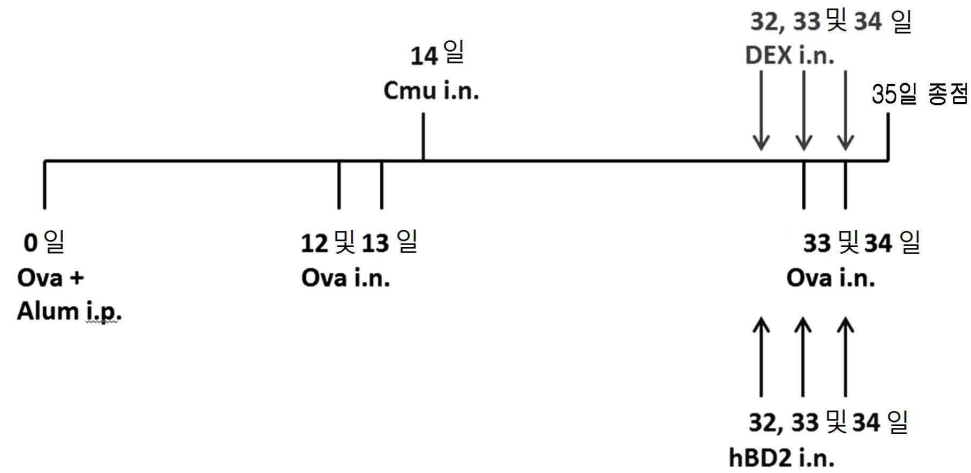
US 5,223,409

WO 2013/007596

[0293]

도면

도면1



도면2

구분	N	s.c. 감염화 (0 일)	챌린지 i.n./마우스 14 일	치료 14일 합의된 투여 섭생 및 경로	챌린지(16일) 48시간 후에 측정 및 샘플링
1	14	생리식염수 중 100 µL of CFA	50 µL 생리식염수	-	● 혈장용 혈액 (N=14)
2	14	100 µg HDM/0.2 mL 생리식염수+CFA/ 마우스	25µg HDM/50µL 생리식염수	비히클	● 조직병리학용 폐 (N=8)
3	14			hbD2 <i>p.o.</i> 1.2 mg/kg/일 (0.4 mg/kg TID)	● 사이토킨 측정을 위해 냉동된 폐 (N=6)
4	14			hbD2 <i>i.n.</i> 1.2 mg/kg/일 (0.4 mg/kg TID)	

도면3a

```

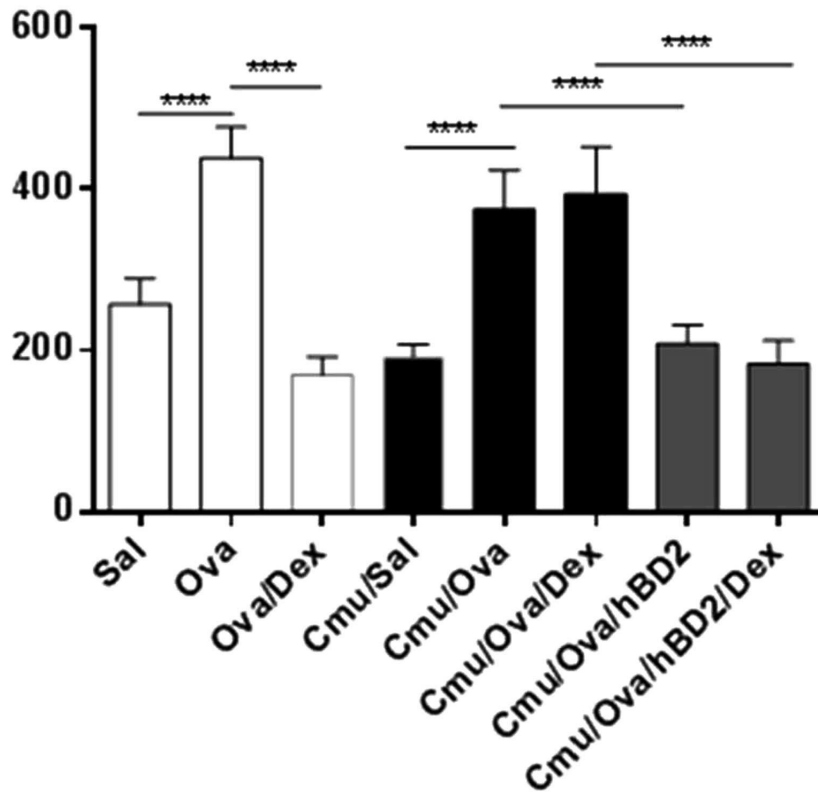
HBD1 -----DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTTCYRGKAKCK--
HBD2 ---GIGDPVTC LKSGAICHVFPCPRRYKQIGTCGLPGTKCKKP-
HBD3 GIINTLQKYCYRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRKK
HBD4 -----ELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYRIGRCPN-TYACCLRK-
          * . * * * *
    
```

도면3b

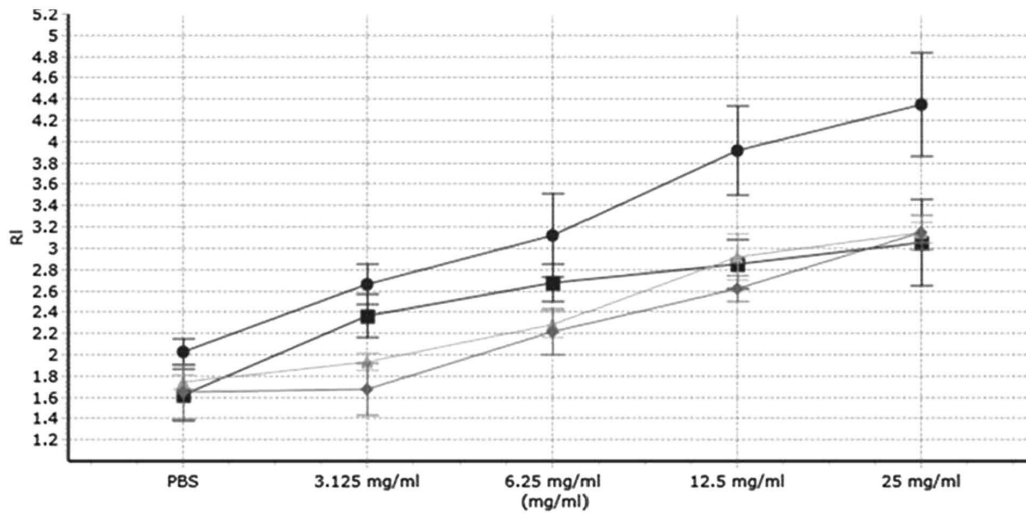
```

HD5 -ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
HD6 AFTCHCRR-SCYSTEYSYGTC TVMGINHRFCCL
      **:*** * : * *. * : * :*:***
    
```

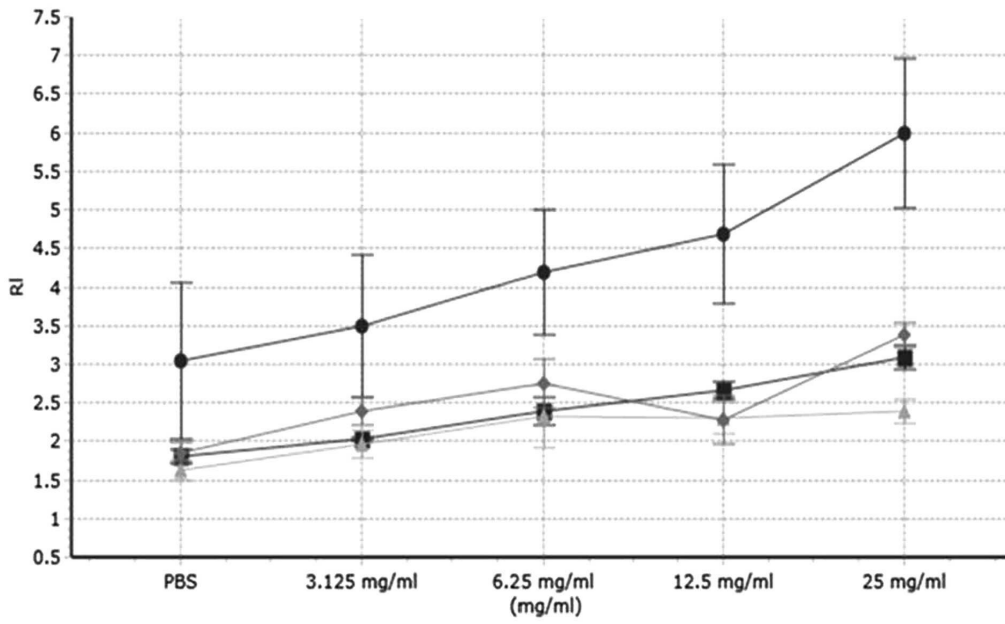
도면4



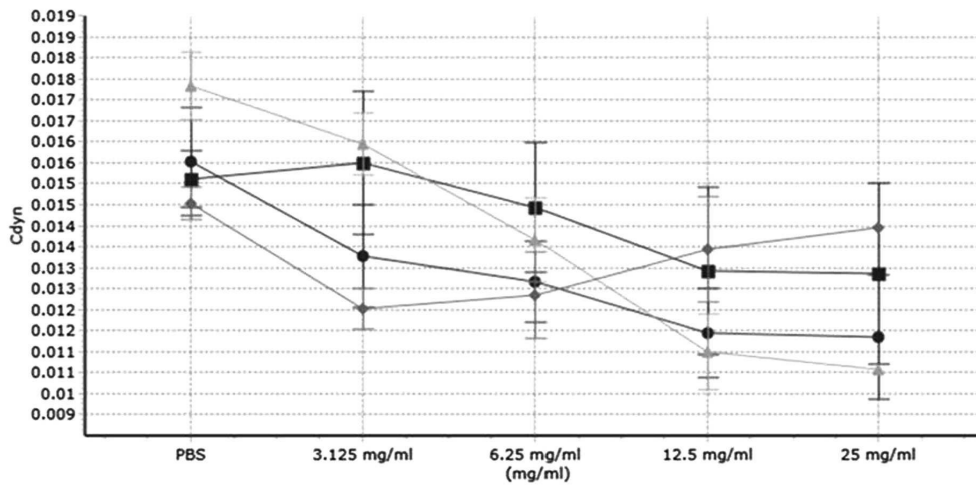
도면5a



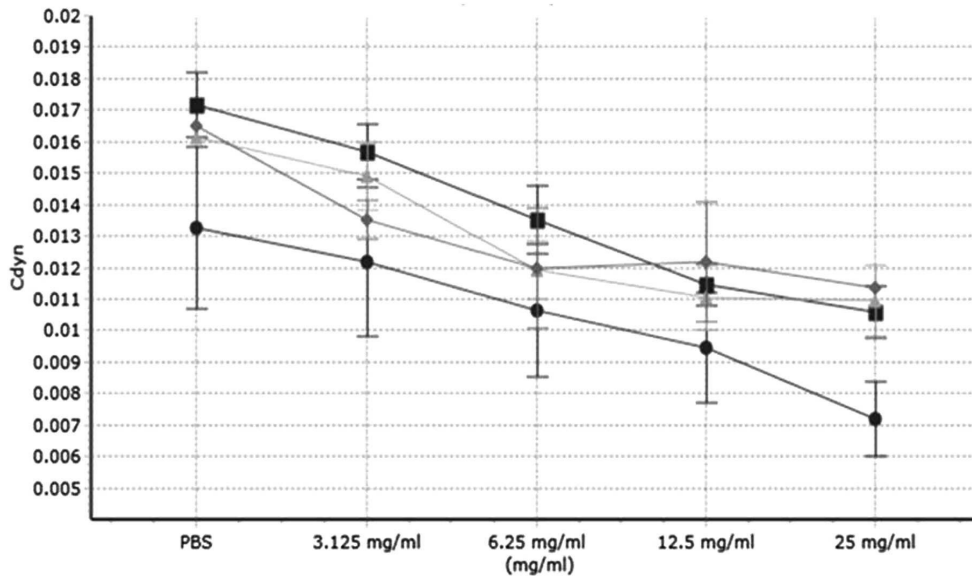
도면5b



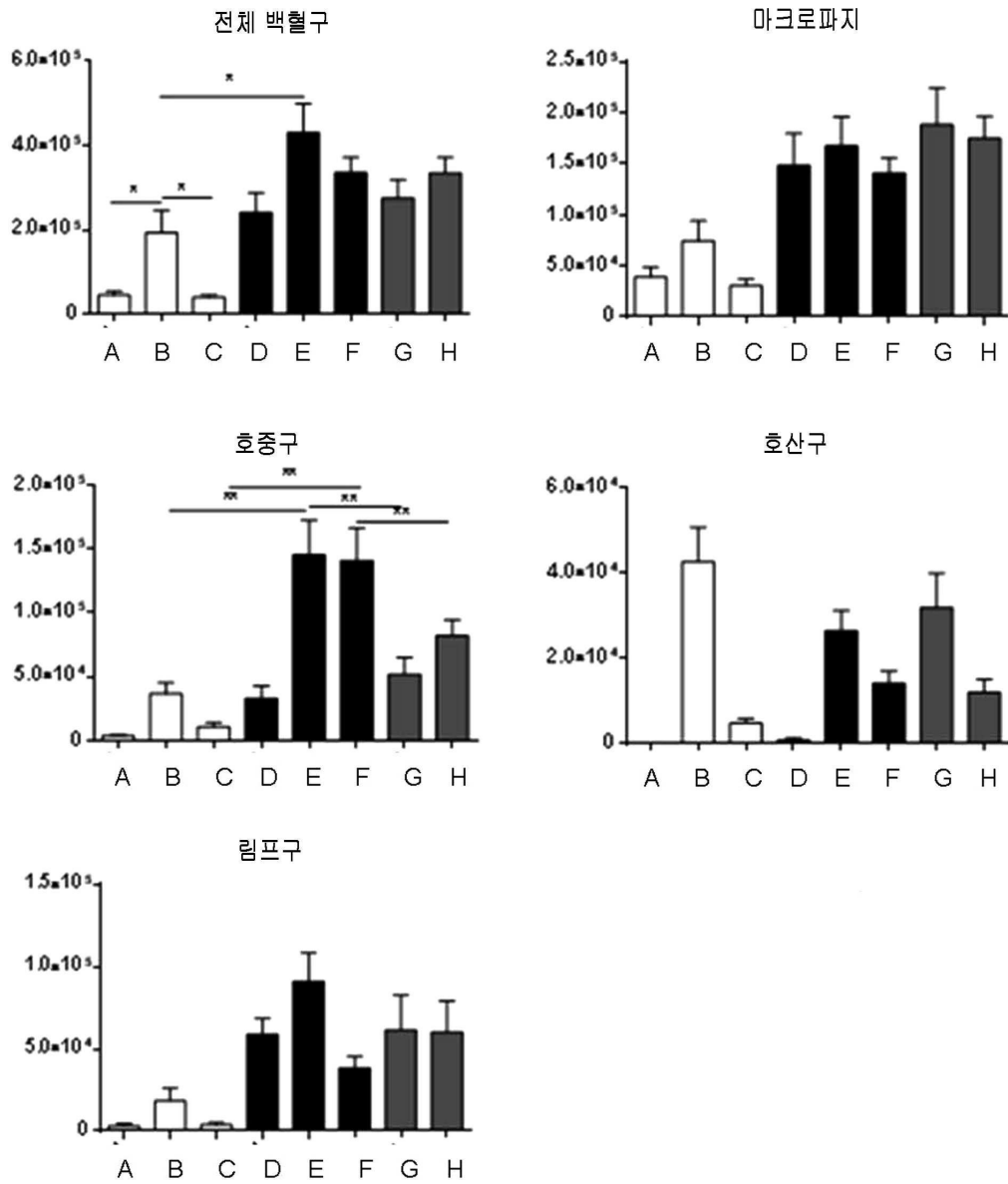
도면6a



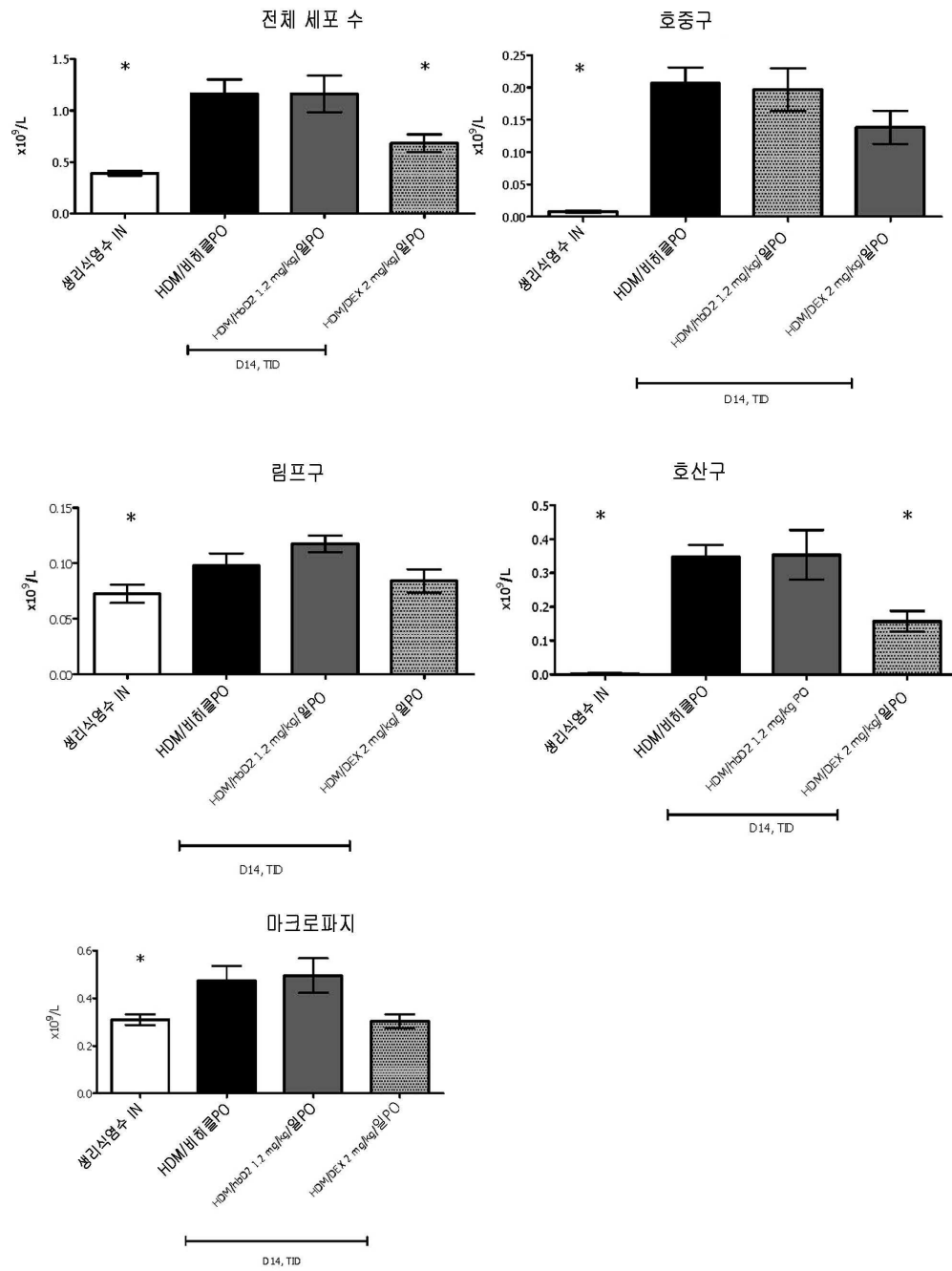
도면6b



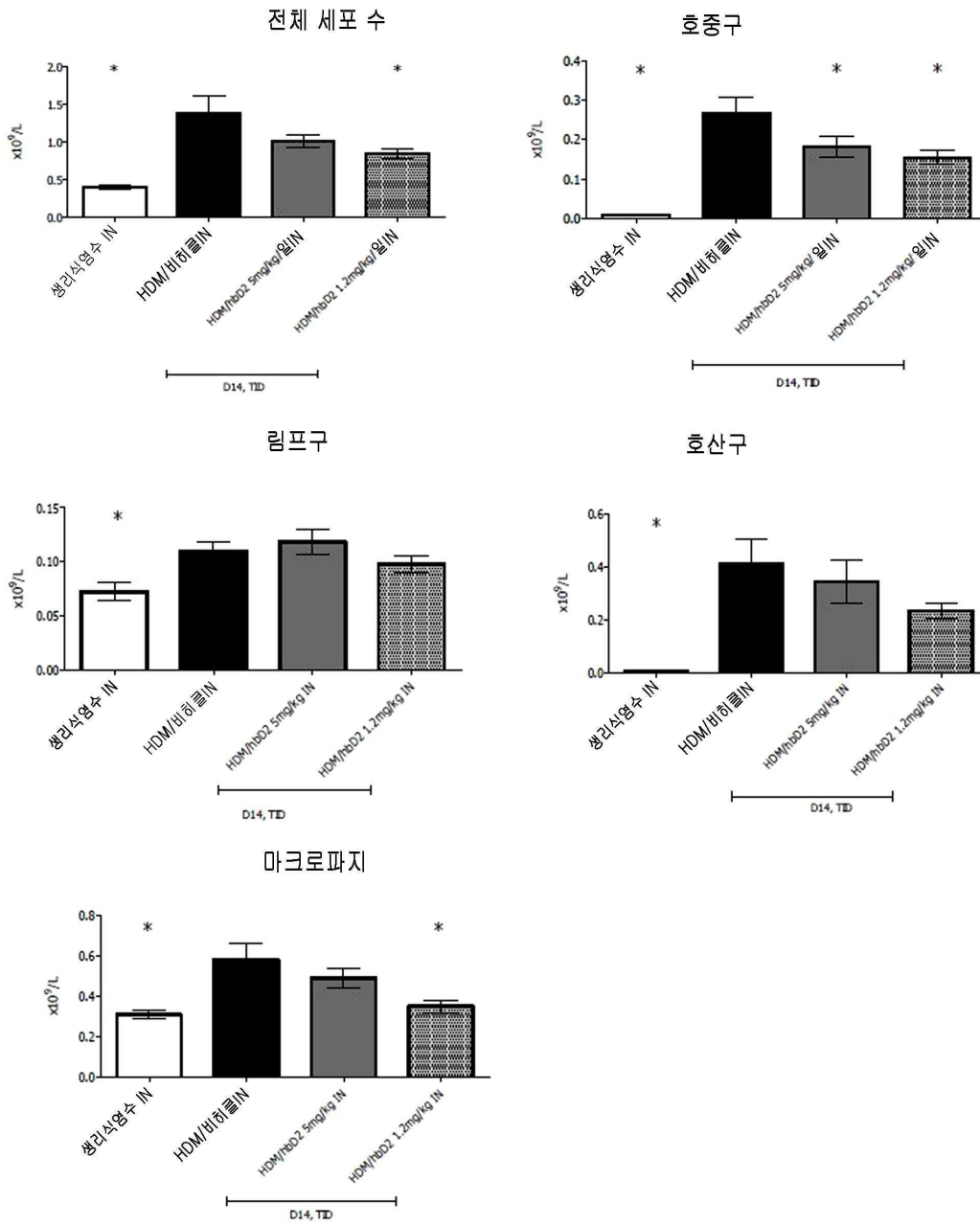
도면7



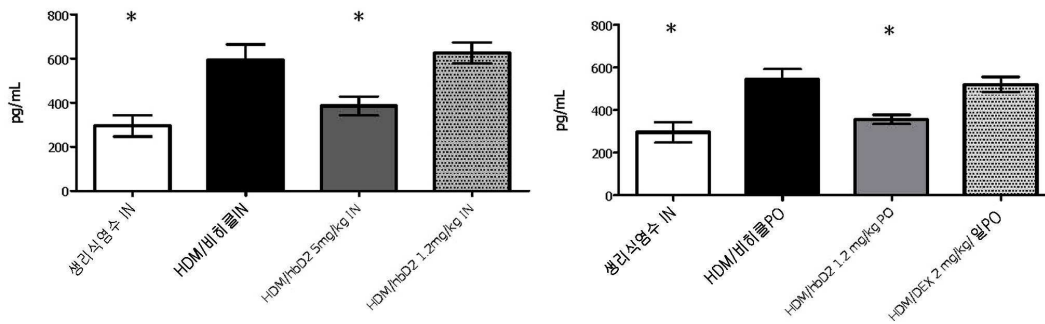
도면8a



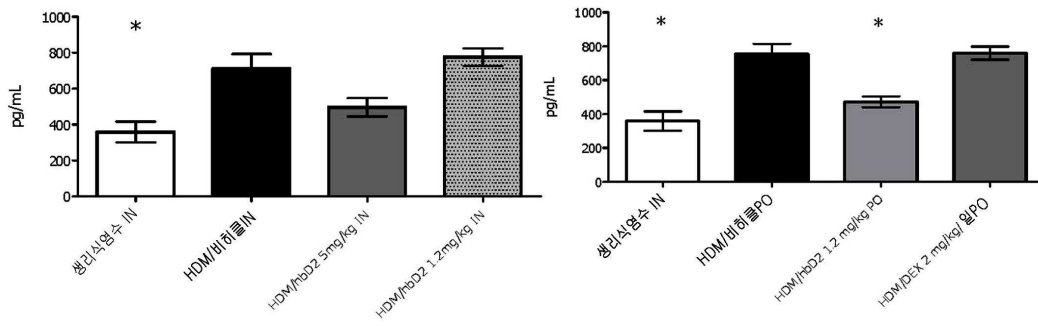
도면8b



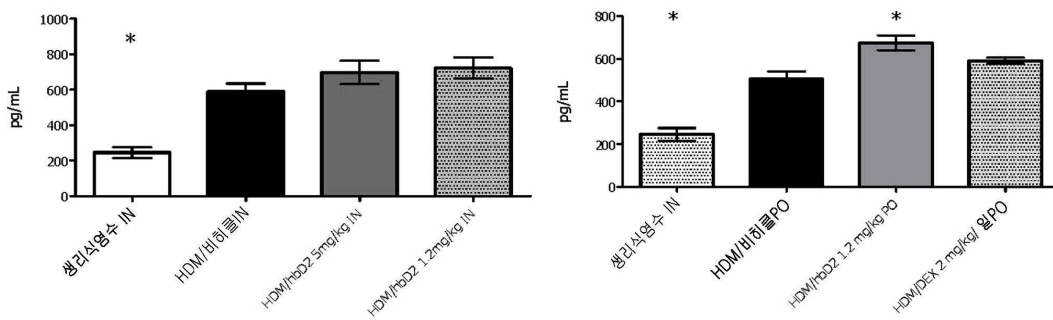
도면9



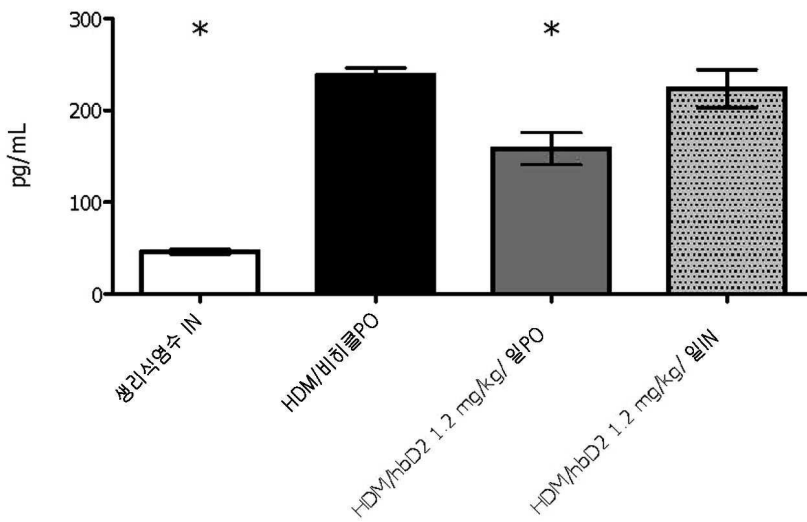
도면10



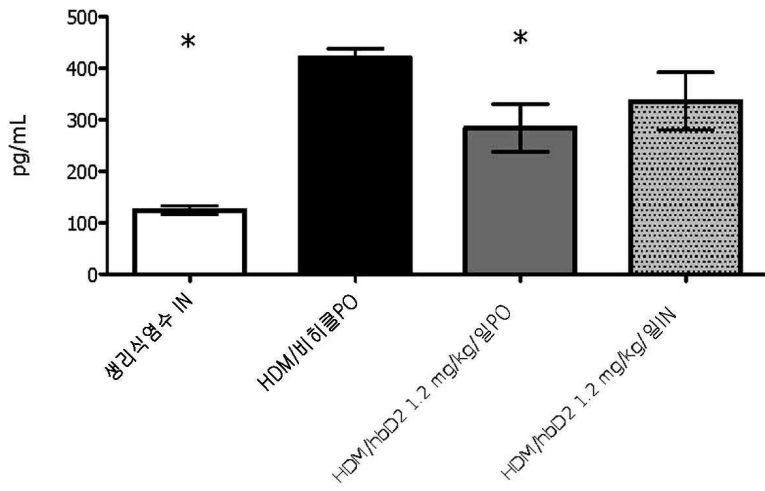
도면11



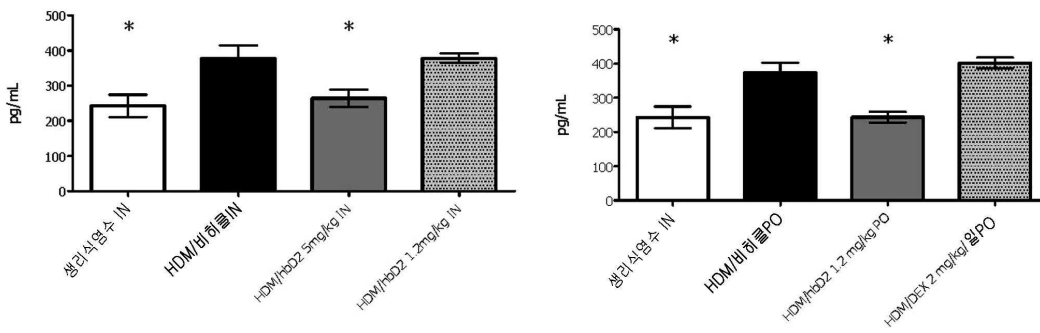
도면12



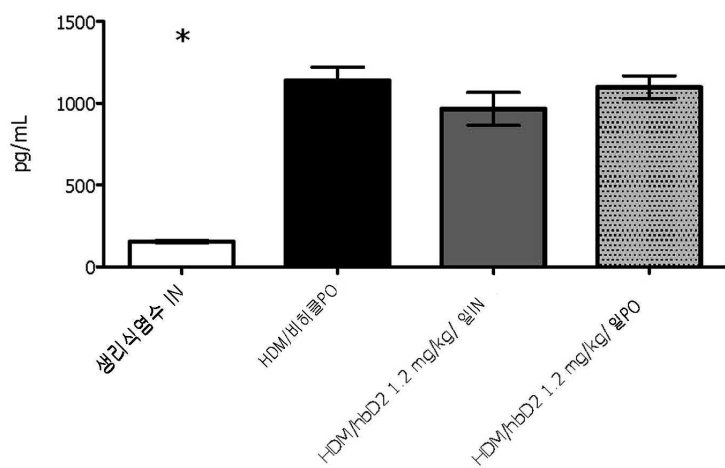
도면13



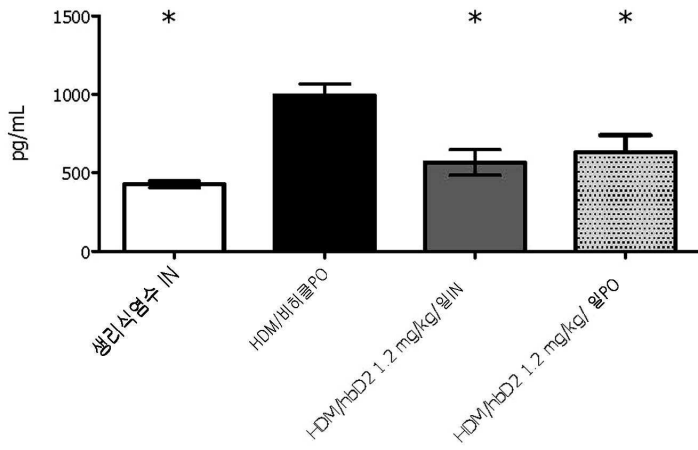
도면14



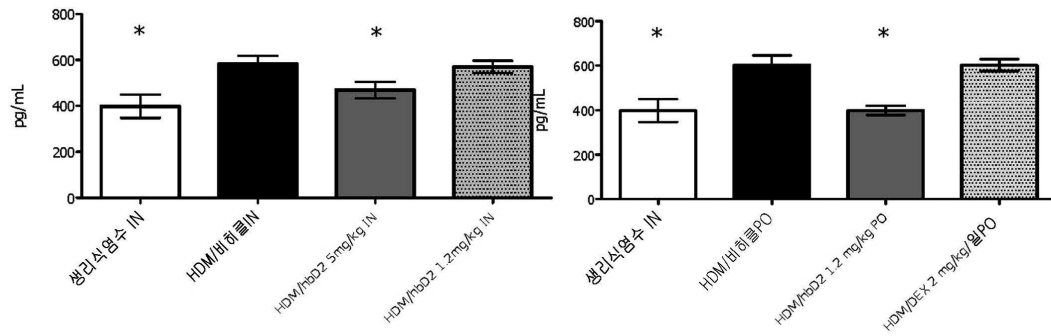
도면15



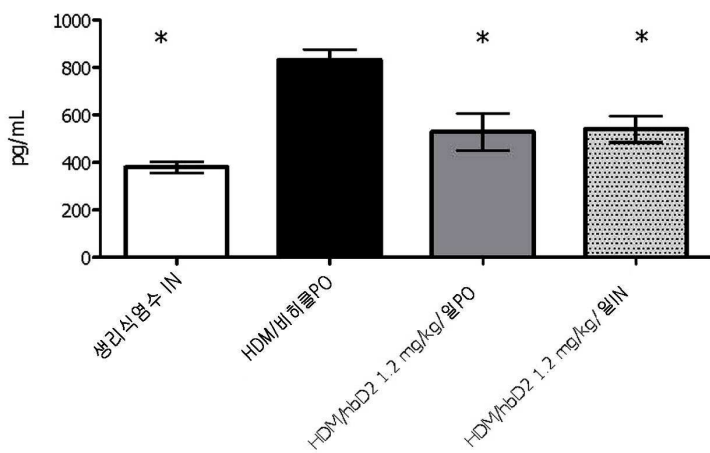
도면16



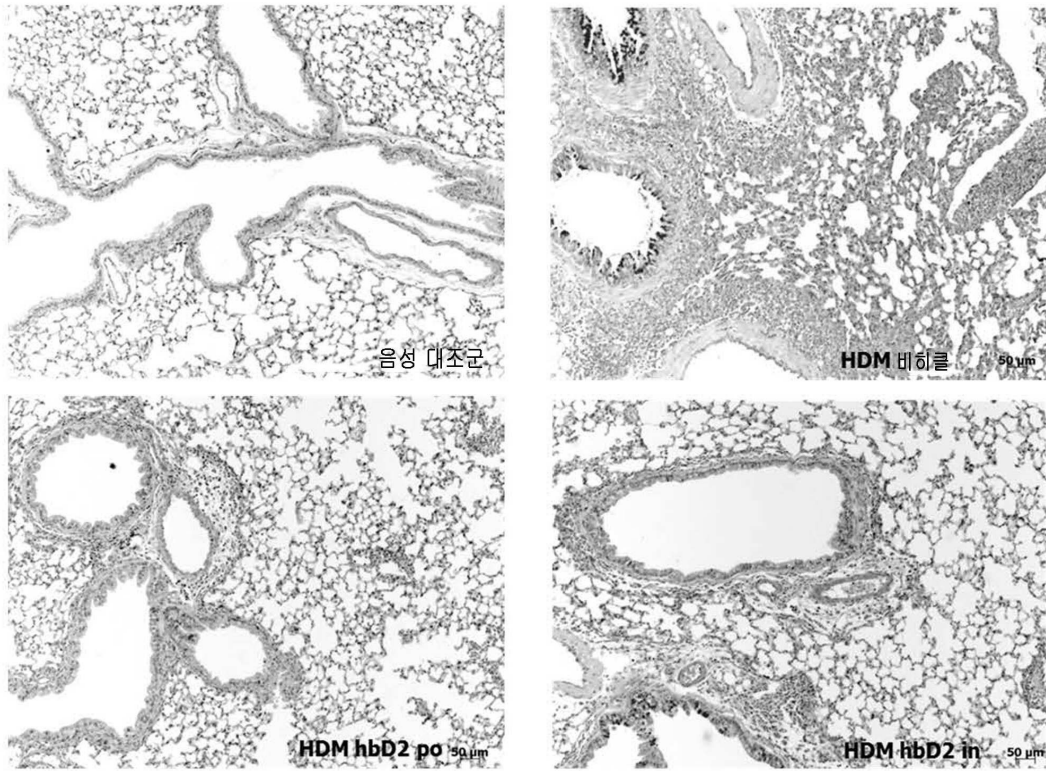
도면17



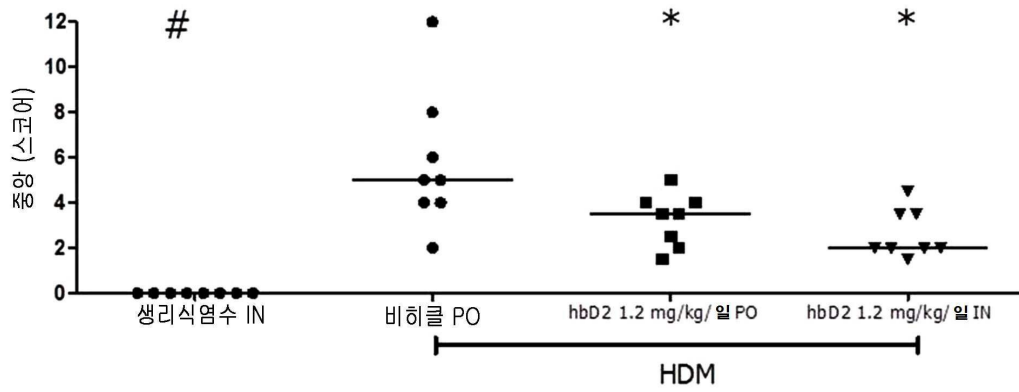
도면18



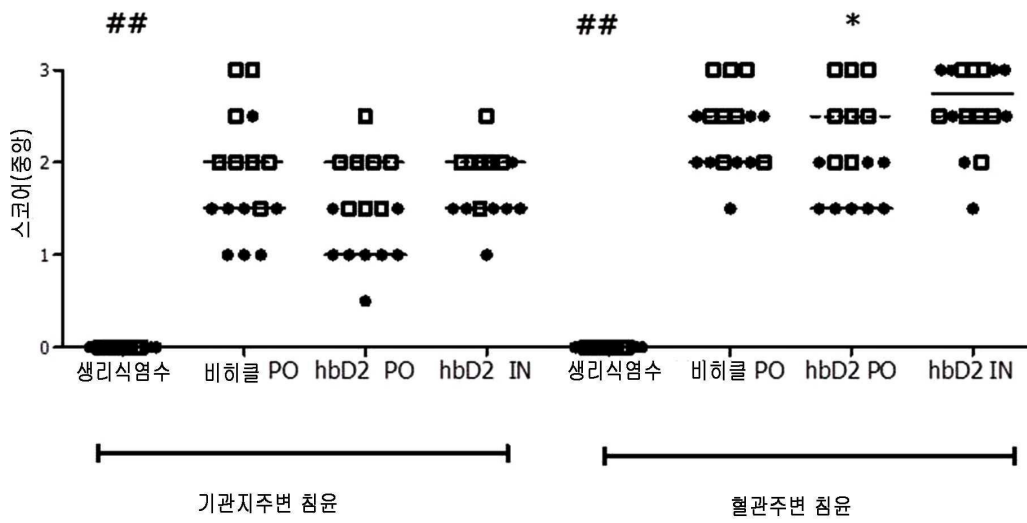
도면19



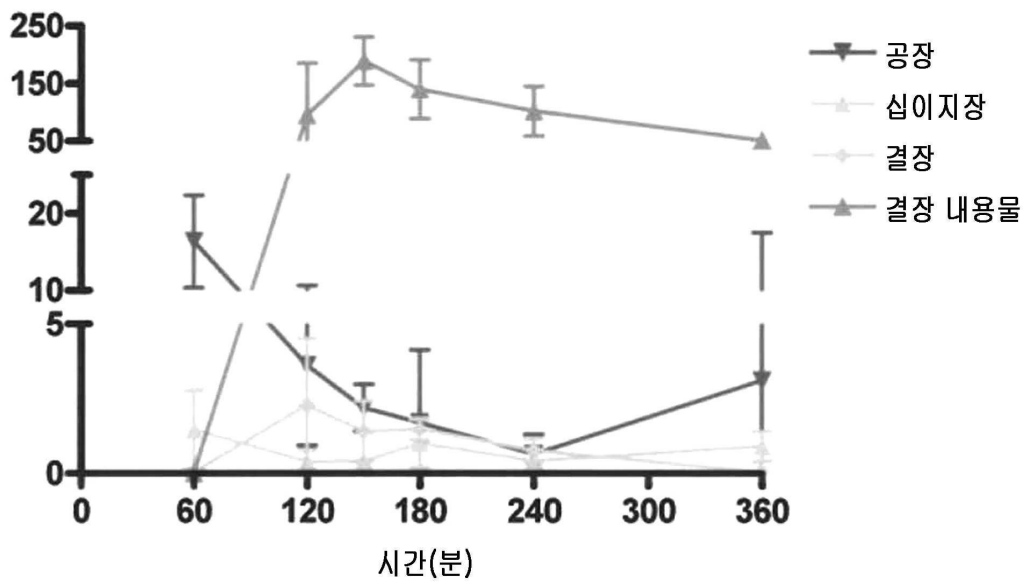
도면20



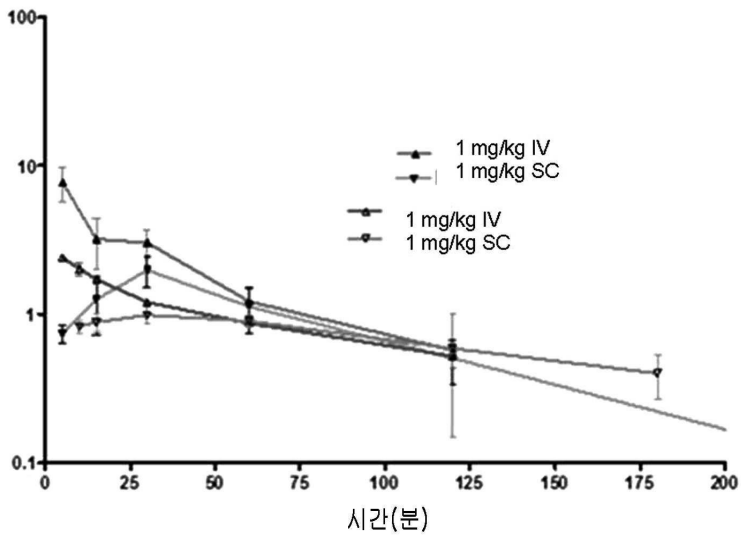
도면21



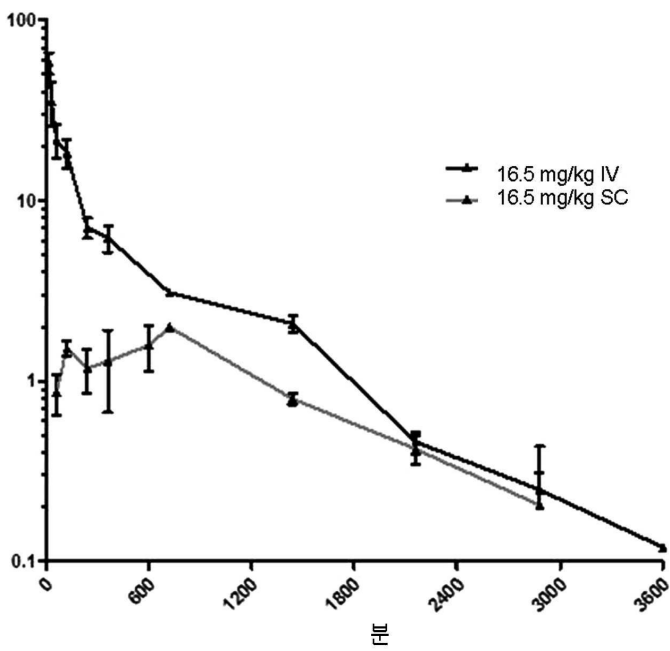
도면22



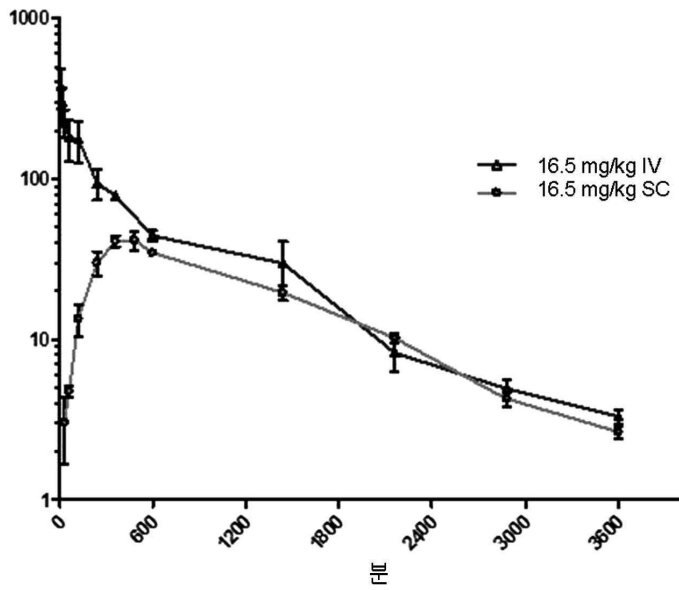
도면23



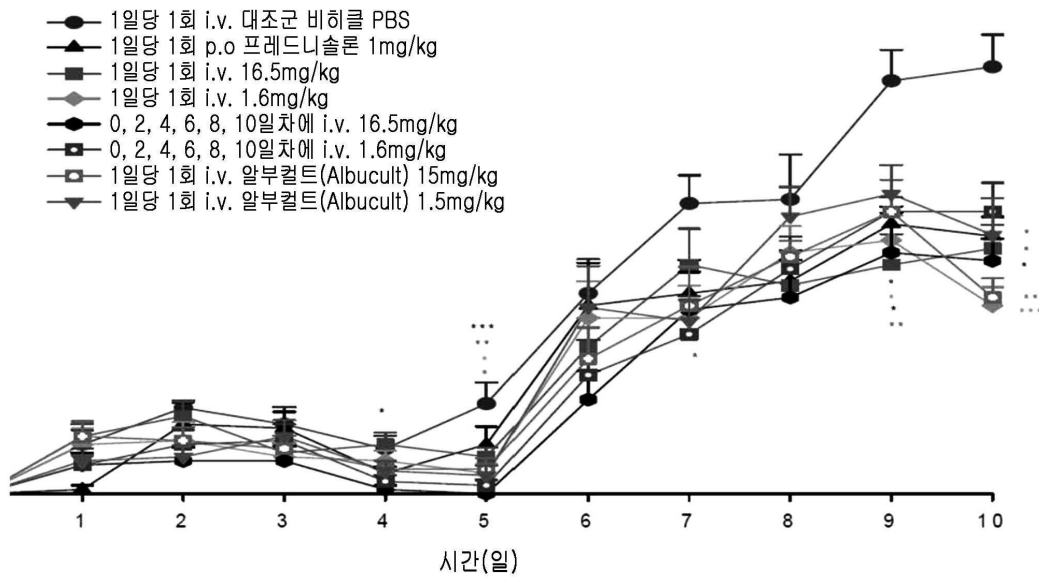
도면24



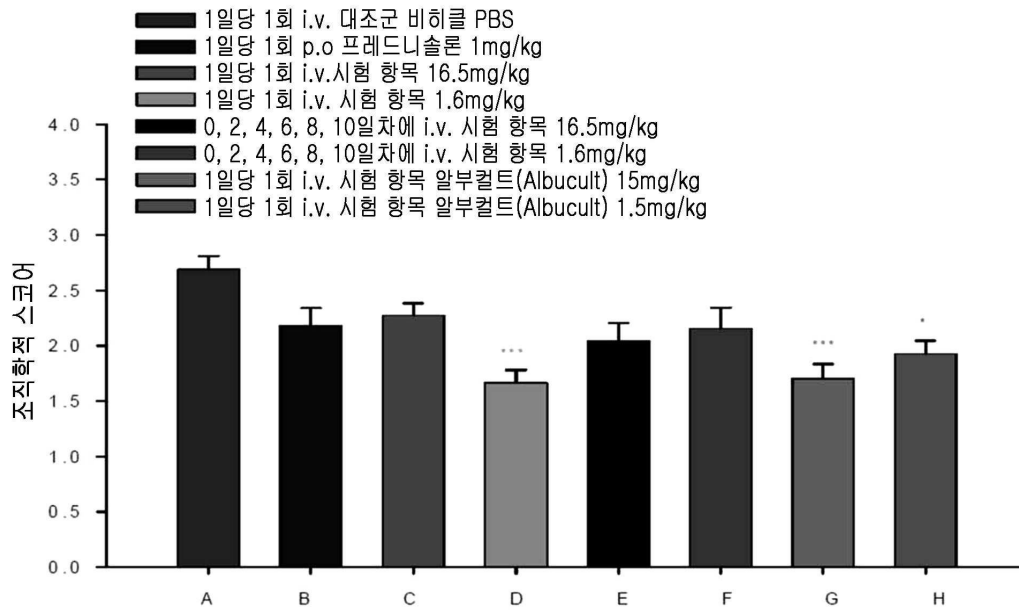
도면25



도면26



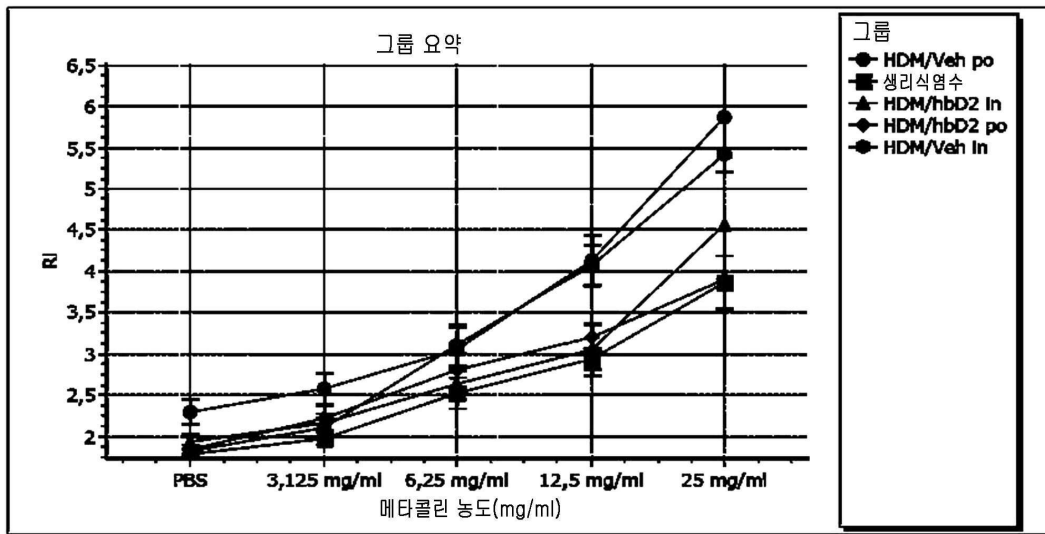
도면27



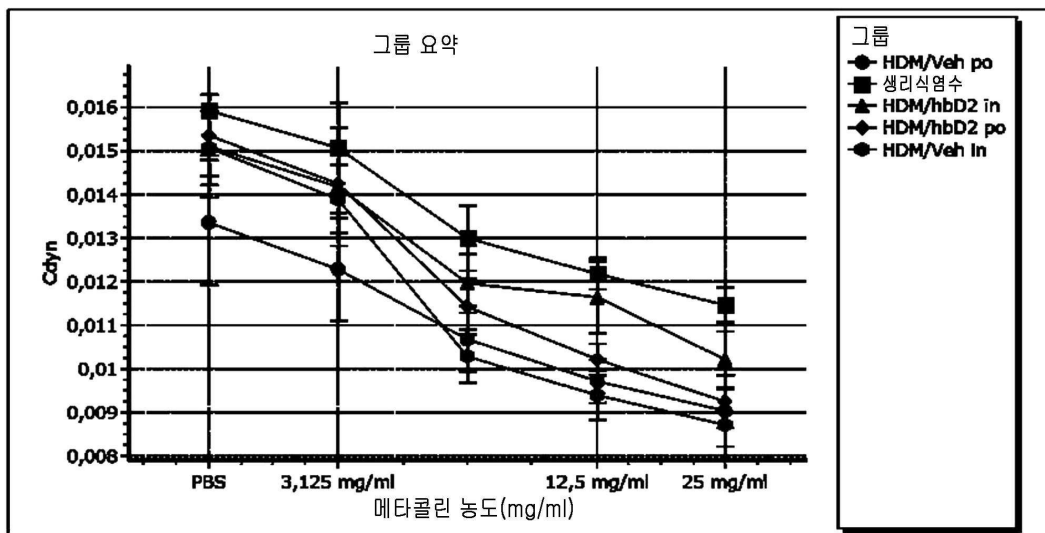
도면28

#	N	s.c. 감작화 (0일)	챌린지 i.n./마우스 14일	치료 11, 12 및 13일	챌린지(16일) 48시간 후에 측정 및 샘플링
1	12	생리식염수에 용해된 100 μ l의 CFA	50 μ L 생리식염수	-	<ul style="list-style-type: none"> AHR(저항 및 탄성; 북스코(Buxco)) N=6/ 그룹
2	12	100 μ g HDM/0.2 mL 생리식염수+CFA/마우스	25 μ g HDM/50 μ L 생리식염수	비히클 <i>i.n.</i>	<ul style="list-style-type: none"> BALF(전체 및 분화 세포 수) N=12/ 그룹 폐(사이토킨 농도를 위해 냉동) N=12/ 그룹
3	12			비히클 <i>p.o.</i>	
4	12			hbD2 <i>i.n.</i> 1.2 mg/kg/일 (0.4 mg/kg TID)	
5	12			hbD2 <i>p.o.</i> 1.2 mg/kg/일 (0.4 mg/kg TID)	

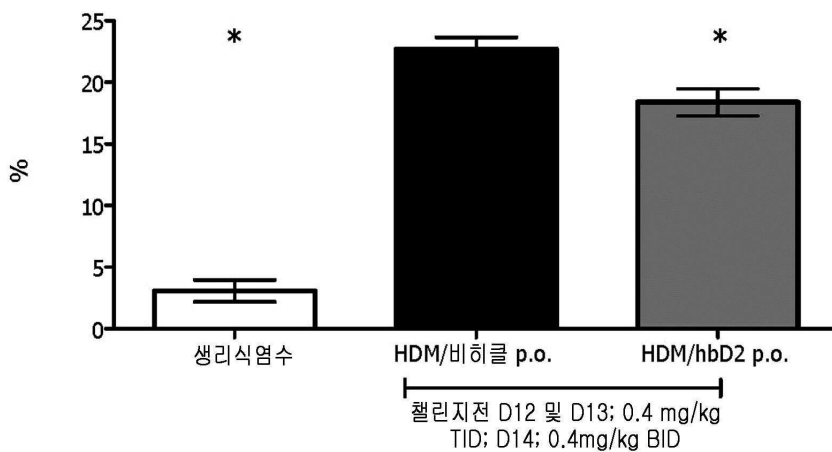
도면29



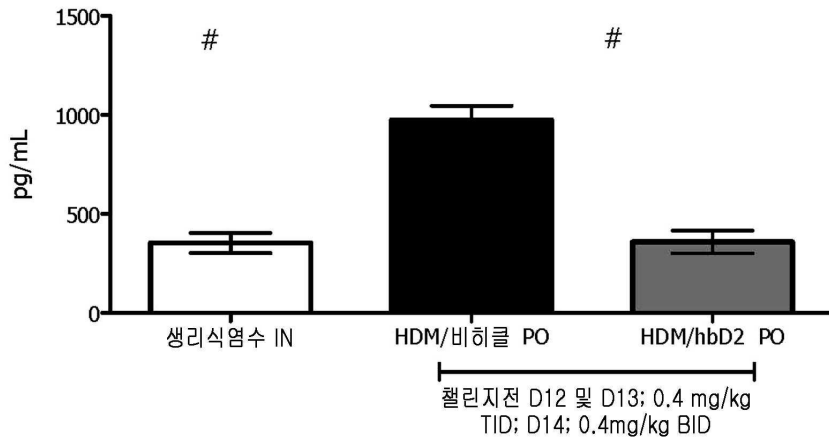
도면30



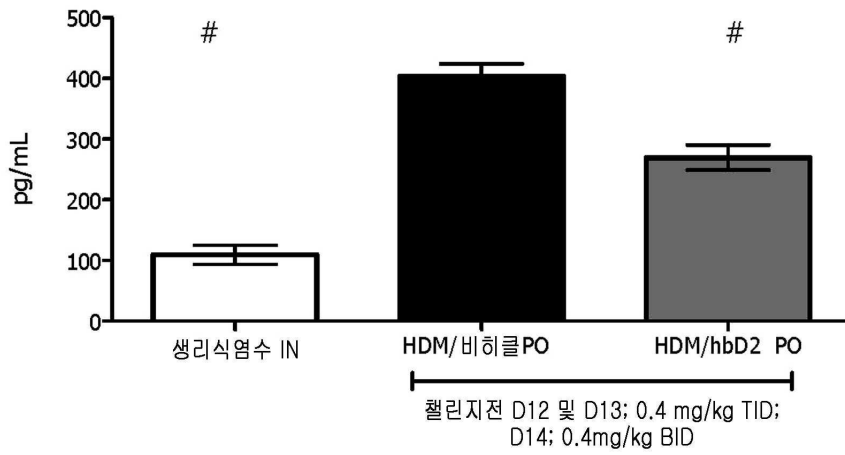
도면31



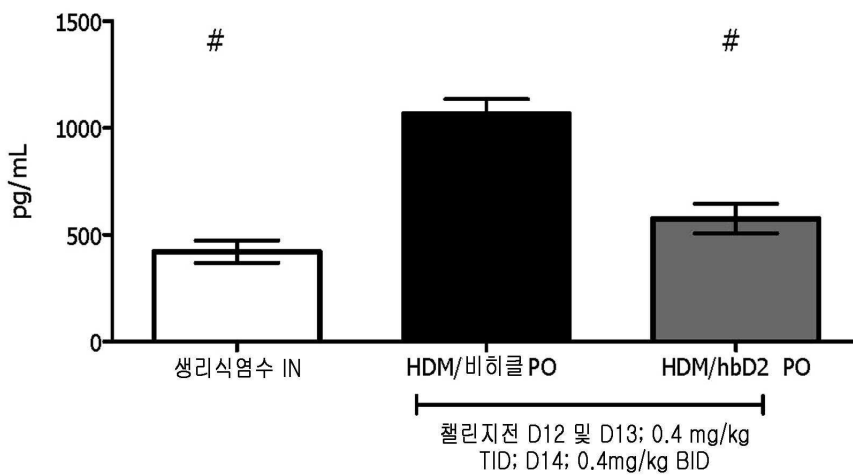
도면32



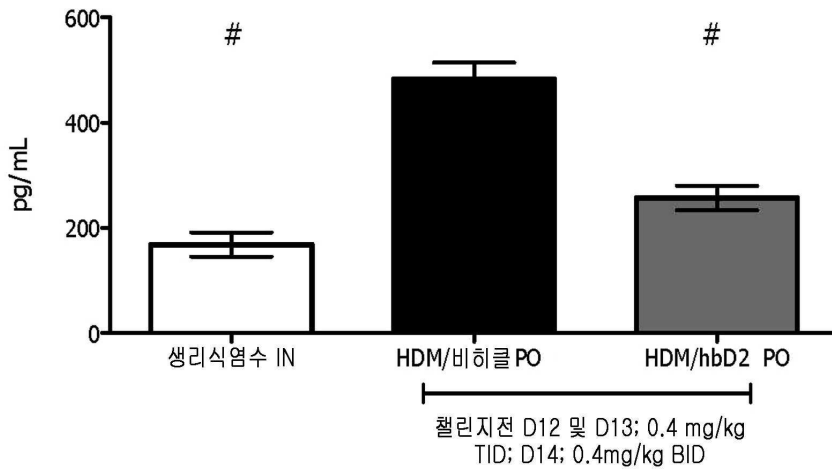
도면33



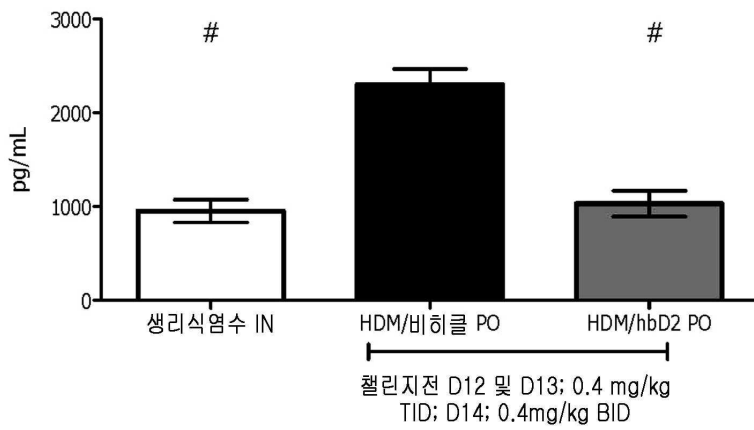
도면34



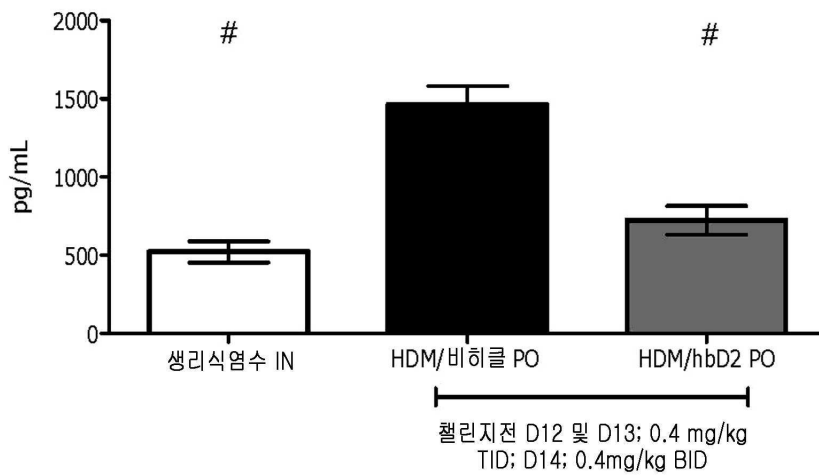
도면35



도면36

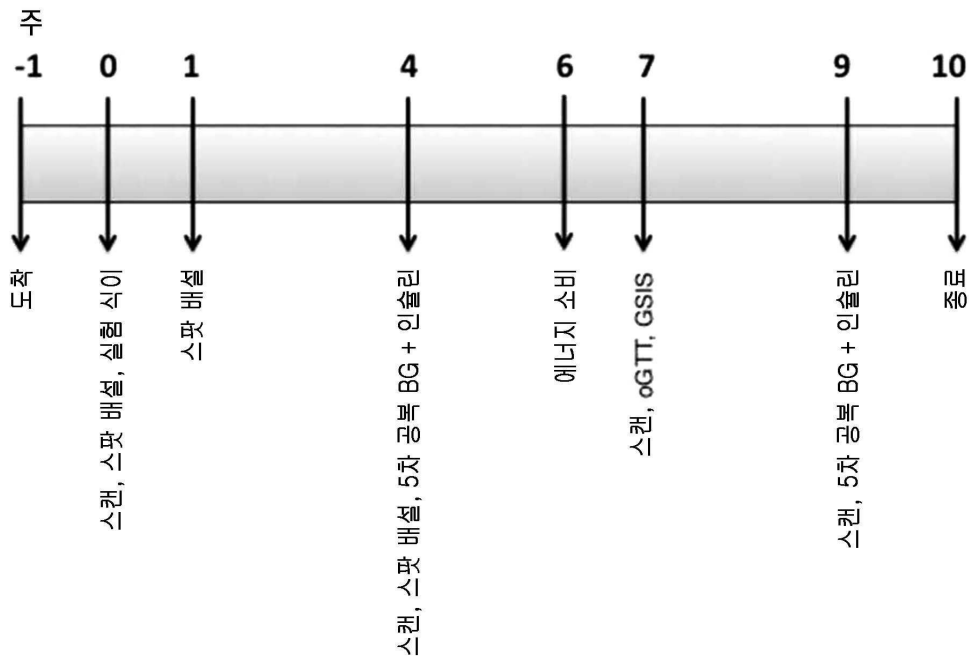


도면37

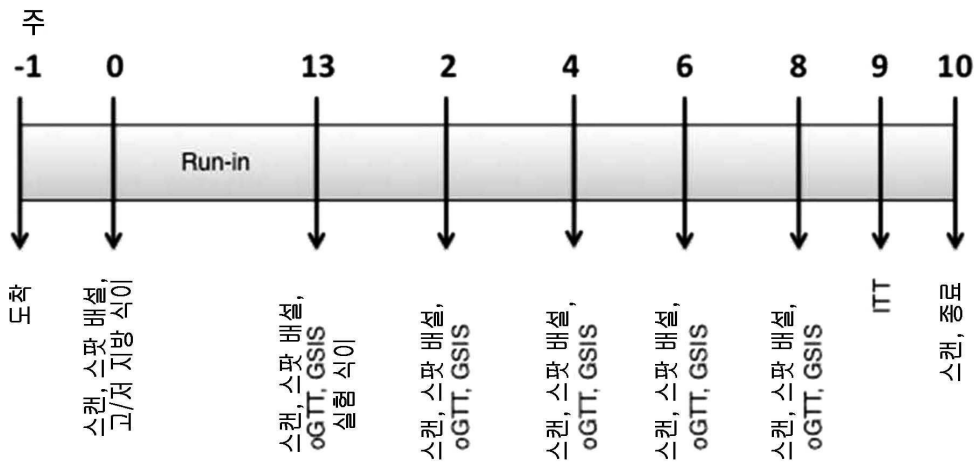


도면38

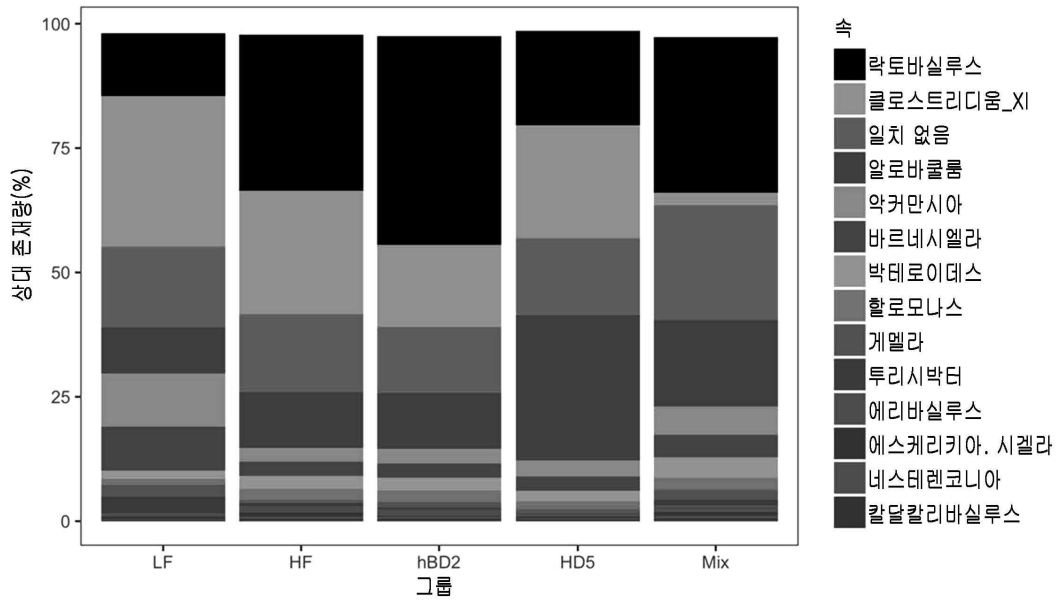
예방적 연구



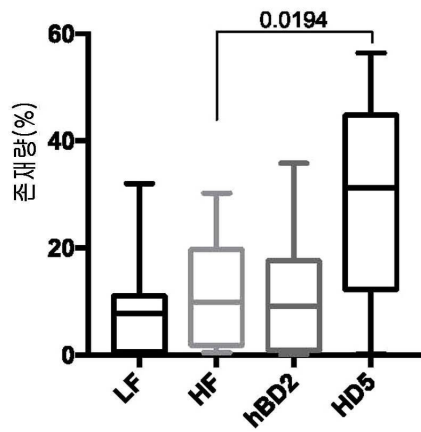
도면39



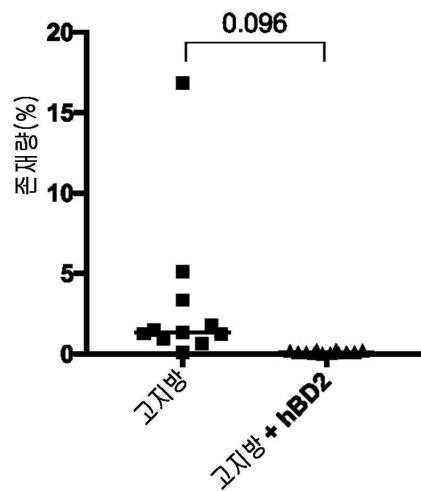
도면40



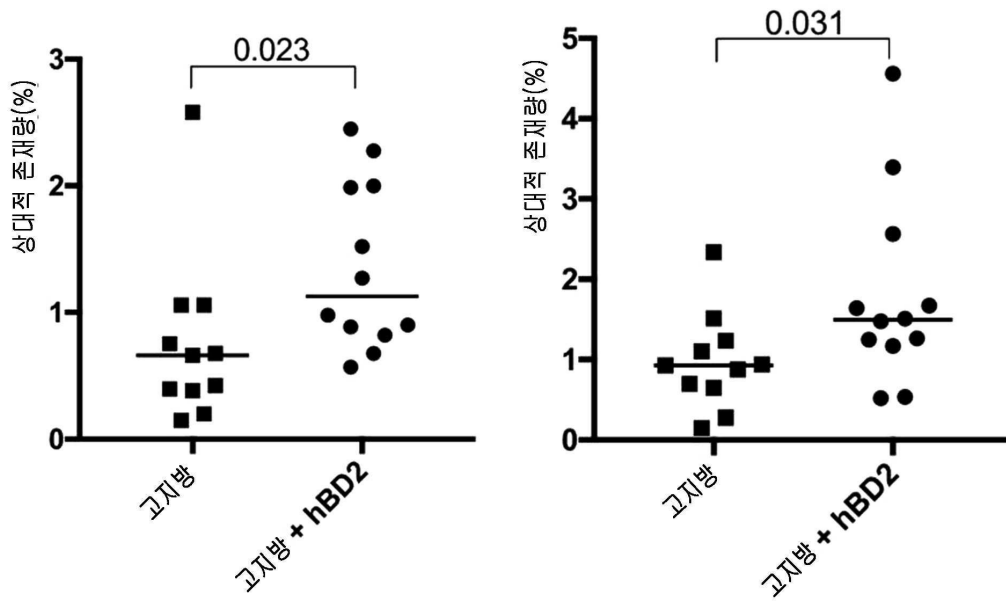
도면41



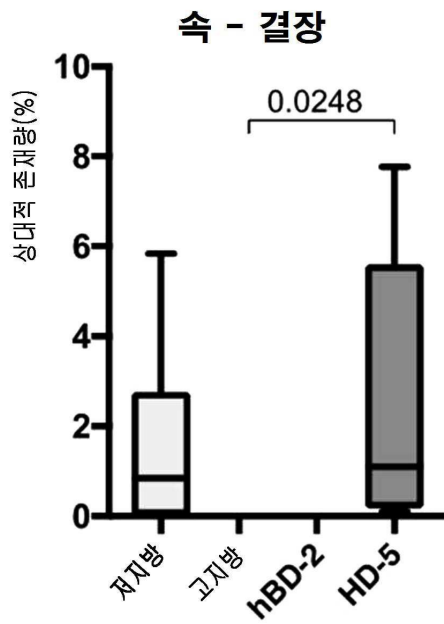
도면42



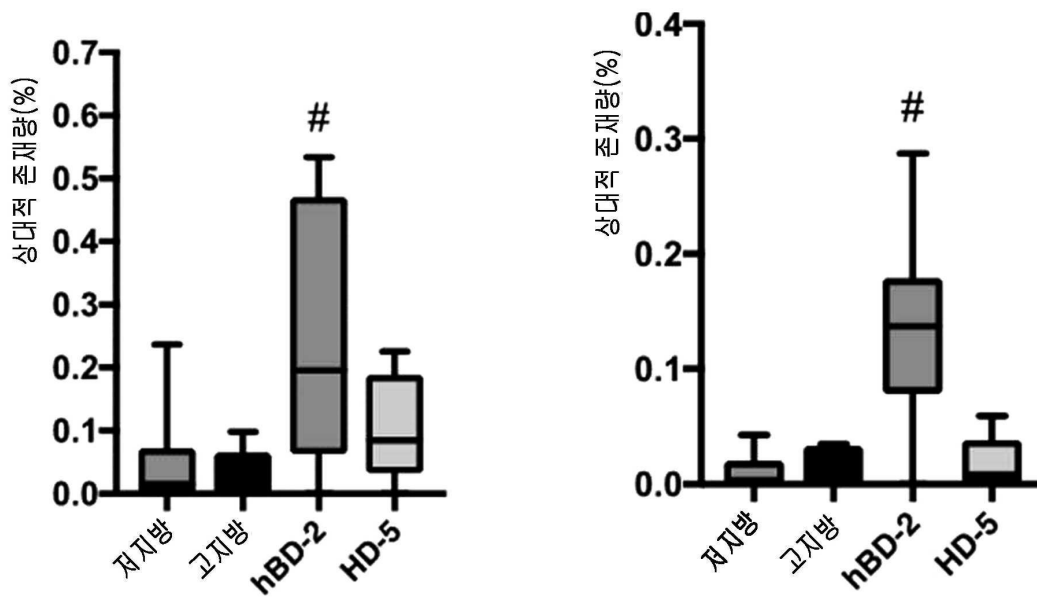
도면43



도면44



도면45



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DEFENSIN THERAPEUTICS APS

<120> METHODS FOR TREATING INFLAMMATORY CONDITIONS OF THE LUNGS

<130> IPA190692-DK

<150> DK PA 2016 70991

<151> 2016-12-13

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala

20 25 30

Lys Cys Cys Lys

35

<210> 2
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gly Ile Gly Asp Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His
 1 5 10 15
 Pro Val Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu
 20 25 30
 Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro
 35 40

<210> 3
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly Gly
 1 5 10 15
 Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile Gly Lys
 20 25 30
 Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys
 35 40 45

<210> 4
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Glu Leu Asp Arg Ile Cys Gly Tyr Gly Thr Ala Arg Cys Arg Lys Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile Gly Arg Cys Pro Asn Thr Tyr Ala
 20 25 30
 Cys Cys Leu Arg Lys
 35

<210> 5
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Thr Gly Arg Cys Ala Thr Arg Glu Ser Leu
 1 5 10 15

Ser Gly Val Cys Glu Ile Ser Gly Arg Leu Tyr Arg Leu Cys Cys Arg
 20 25 30

<210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

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

<400> 7
 Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His Pro Val Phe Cys
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu Pro Gly Thr Lys
 20 25 30

Cys Cys Lys Lys Pro
 35