



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0083435  
(43) 공개일자 2020년07월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 7/06 (2006.01) A61K 35/741 (2014.01)  
A61K 38/08 (2019.01) A61K 9/00 (2006.01)  
A61K 9/06 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)  
C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 7/06 (2013.01)  
A61K 35/741 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7007412
- (22) 출원일자(국제) 2018년08월31일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년03월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/049237
- (87) 국제공개번호 WO 2019/046801  
국제공개일자 2019년03월07일
- (30) 우선권주장  
62/553,025 2017년08월31일 미국(US)

- (71) 출원인  
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아  
미합중국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111, 5층
- (72) 발명자  
갈로 리차드 엘.  
미국, 캘리포니아 92117, 샌디에고, 3036 세르비안 플레이스  
윌리엄스, 마이클  
미국, 캘리포니아 92102, 샌디에고, #21, 2956 씨. 스트리트
- (74) 대리인  
특허법인한일

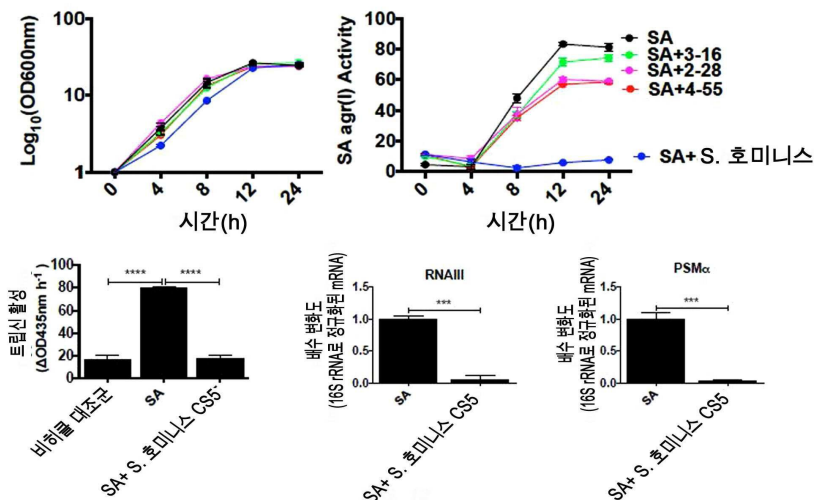
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 피부 효소 활성을 제어하기 위한 분자 박테리아요법

(57) 요약

본 발명은 (i) 각질형성세포의 프로테아제 생성 및/또는 활성을 억제, (ii) 각질형성세포의 IL-6 생성 및/또는 활성을 억제, (iii) 스태피로코커스 아우레우스로부터 페놀 가용성 모듈린 알파 3의 생성을 억제 및/또는 (iv) S. 아우레우스에 의한 agr 생성 및/또는 활성을 억제하는 정제된 폴리펩티드를 제공한다. 폴리펩티드를 포함하는 국소 제제가 추가로 제공된다. 폴리펩티드를 암호화하는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 미생물이 제공된다. 재조합 미생물을 포함하는 프로바이오틱 조성물이 추가로 제공된다. 본 발명은 또한 폴리펩티드 및/또는 재조합 미생물을 포함하는 키트 및 제품을 제공한다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

*A61K 38/08* (2019.01)

*A61K 9/0014* (2013.01)

*A61K 9/06* (2013.01)

*A61P 17/00* (2018.01)

*C12N 1/20* (2013.01)

*C12R 1/25* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하고 (i) 각질형성세포의 프로테아제 생성 및/또는 활성을 억제, (ii) 각질형성세포의 IL-6 생성 및/또는 활성을 억제, (iii) 스타필로코커스 아우레우스(S. 아우레우스)로부터 페놀 가용성 모듈린 알파 3의 생성을 억제 및/또는(iv) S. 아우레우스에 의한 agr 생성 및/또는 활성을 억제하는 정제된 폴리펩티드.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 서열번호: 2와 적어도 98% 동일한 것인, 정제된 폴리펩티드.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17을 포함하는 것인, 정제된 폴리펩티드.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17로 이루어진 것인, 정제된 폴리펩티드.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 것인, 정제된 폴리펩티드.

#### 청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 화학식 I, IA 또는 IB의 화합물을 포함하는 것인, 정제된 폴리펩티드.

#### 청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 국소 제제.

#### 청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 엄격한 조건 하에 서열번호: 1로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하는 서열을 포함하고 서열번호: 4를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 것인, 단리된 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 1 또는 3을 포함하는 것인, 단리된 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 11

제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

#### 청구항 12

제9항 또는 제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

**청구항 13**

제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 14**

제9항 또는 제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 미생물.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 미생물이 약독화 미생물인, 재조합 미생물.

**청구항 16**

제13항에 있어서, 미생물이 공생 미생물인, 재조합 미생물.

**청구항 17**

제15항 또는 제16항의 재조합 미생물을 포함하는 국소 프로바이오틱 조성물.

**청구항 18**

제1항의 폴리펩티드를 발현하는 미생물로 이루어진 국소 프로바이오틱 조성물.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 미생물이 *S. 호미니스*, *S. 에피더미디스*, *S. 와르네리* 또는 이의 임의의 조합인, 국소 프로바이오틱 조성물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 미생물이 *S. 호미니스* C5, *S. 호미니스* A9, *S. 에피더미디스* A11 및/또는 *S. 와르네리* G2인, 국소 프로바이오틱 조성물.

**청구항 21**

제18항에 있어서, ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 에피더미디스* A11 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 호미니스* C5 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 호미니스* A9 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 와르네리* G2 81618, 2018년 8월 28일 기탁) 및 전술한 균주의 임의의 조합을 갖는 미생물의 균으로부터 선택된 미생물을 포함하는, 국소 프로바이오틱 조성물

**청구항 22**

피부 상에 프로테아제 활성을 억제하기에 충분한 유효량의 코아굴라제 음성 스태필로코커스 종(CoNS), 또는 유효량의 CoNS의 발효 추출물을 투여하는 단계를 포함하는 피부과학적 장애를 치료하는 방법으로서, 여기서 CoNS가 서열번호: 4와 적어도 98% 동일하고 프로테아제 생성을 억제하는 서열을 포함하는 폴리펩티드를 생성하는 것인, 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 피부과학적 장애가 네더튼 증후군, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 습진, 건선, 여드름, 표피 과다각화증, 가시세포증, 표피 염증, 진피 염증 및 소양증으로 이루어진 균으로부터 선택된 것인, 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 투여하는 단계가 국소 적용에 의한 것인, 방법.

**청구항 25**

제22항에 있어서, CoNS가 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코커스 캐피티

스(*Staphylococcus capitis*), 스태피로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스태피로코커스 사카로리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*), 스태피로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 스태피로코커스 파스퇴리(*Staphylococcus pasteurii*), 스태피로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태피로코커스 데브리예세이(*Staphylococcus devriesei*), 스태피로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 스태피로코커스 제텐시스(*Staphylococcus jettensis*), 스태피로코커스 페트라시이(*Staphylococcus petrasii*), 및 스태피로코커스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

**청구항 26**

제22항에 있어서, CoNS의 발효 추출물이 서열번호: 4의 폴리펩티드 서열 및/또는 화학식 I의 화합물을 포함하는 것인, 방법.

**청구항 27**

제22항에 있어서, CoNS가 *S. 에피더미디스* A11, *S. 호미니스* C4, *S. 호미니스* C5, *S. 호미니스* A9, *S. 와르네리* G2 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

**청구항 28**

피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

대상체의 피부로부터의 배양물 또는 대상체로부터의 피부의 프로테아제 활성을 측정하는 단계;

프로테아제 활성을 정상 대조군과 비교하는 단계;

코아굴라제 음성 스태피로코커스로부터의 공생 피부 박테리아 조성물 및/또는 발효 추출물을 투여하는 단계를 포함하고,

여기서 공생 피부 박테리아 조성물 또는 발효 추출물이 서열번호: 4와 적어도 98% 동일한 폴리펩티드를 포함하고/거나 화학식 I의 화합물을 포함하고,

여기서 조성물이 공생 피부 박테리아의 성장 및 복제 능력을 유지하는 크림, 연고 또는 제약 조성물로 제제화되는 것인, 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 코아굴라제 음성 스태피로코커스가 스태피로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태피로코커스 캐피티스(*Staphylococcus capitis*), 스태피로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스태피로코커스 사카로리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*), 스태피로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 스태피로코커스 파스퇴리(*Staphylococcus pasteurii*), 스태피로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태피로코커스 데브리예세이(*Staphylococcus devriesei*), 스태피로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 스태피로코커스 제텐시스(*Staphylococcus jettensis*), 스태피로코커스 페트라시이(*Staphylococcus petrasii*), 및 스태피로코커스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

**청구항 30**

제1항의 정제된 폴리펩티드 또는 칼리크레인 발현을 억제하는 서열번호: 4와 적어도 95% 동일한 폴리펩티드를 생성하는 박테리아를 포함하는 프로바이오틱 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 31**

피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

페놀 가용성 모듈린 발현을 억제하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고,

여기서 조성물이 제1항의 정제된 폴리펩티드 또는 화학식 I의 화합물을 포함하는 것인, 방법.

**청구항 32**

제30항 또는 제31항에 있어서, 투여가 국소인, 방법.

**청구항 33**

제30항 또는 제31항에 있어서, 조성물이 코아굴라제 음성 스태필로코커스의 발효 추출물인, 방법.

**청구항 34**

*S. 에피더미디스* A11, *S. 호미니스* C4, *S. 호미니스* C5, *S. 호미니스* A9, *S. 와르네리* G2 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 복수의 프로바이오틱 공생 피부 박테리아를 포함하는 국소 프로바이오틱 조성물.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 로션, 웨이크 로션, 크림, 연고, 젤, 폼, 분말, 고체, 페이스트 또는 팅크로 제제화되는, 국소 프로바이오틱 조성물.

**청구항 36**

약물 및 가용성 페놀 모듈린 알파 3을 포함하는 *S. 아우레우스* 발효 추출물 또는 *S. 아우레우스*-바이오틱을 포함하는 약물 조성물.

**청구항 37**

피부를 제36항의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 피부를 통한 약물 전달 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **연방 후원 연구에 관한 진술**

[0002] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 허가 번호 AI117673, AR067547, AR062496, 및 AR064781 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 특정 권리를 가진다.

[0003] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0004] 본 출원은 2017년 8월 31일에 출원된 가출원 제62/553,025호에 대해 35 U.S.C. § 119에 따른 우선권 주장하며, 이 가출원의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시내용은 피부과학적 질환 및 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법, 및 피부 장벽 투과성을 조정하는 조성물에 관한 것이다.

[0007] **미생물 기탁**

[0008] 본 개시내용의 예시적인 미생물(스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) A11, 스태필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*) C5, 스태필로코커스 호미니스 A9 및 스태필로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*) G2)은 ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 에피더미디스*(*S. epidermidis*) A11 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 호미니스*(*S. hominis*) C5 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 호미니스* A9 81618, 2018년 8월 28일 기탁)로서 및 ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 *S. 와르네리*(*S. warneri*) G2 81618, 2018년 8월 28일 기탁)로서 부다페스트 조약 하에 2018년 8월 28일에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection), 미국 버지니아주 20110-2209 마나사스 유니버시티 블러바드 10801)에 기탁되었다. 본 기탁물은 기탁 기관이 받은 샘플의 공개를 위한 가장 최근의 요청 이후 적어도 5년의 기간 동안, 기탁일 이후 적어도 30년의 기간 동안, 또는 관련 특허의 실행가능 기간 동안에, 이 기간 중 최장 기간 동안 공인 기탁기관에 유지될 것이며, 돌연변이, 생존불능 또는 파괴된 경우에 대체될 것이다. 이들 세포주의 공중에게의 이용가능성에 대한 모든 제한은 본 출원으로부터 특허 허여시 최종적으로 철회될 것이다.

**배경 기술**

- [0009] 표피는 면역 방어의 제일선이며 미생물과 숙주 유기체 사이의 상호작용을 보호하고 조절한다. 박테리아가 표피 성 각질형성세포(keratinocyte)에 영향을 미치는 표면에 상주할 뿐만 아니라, 일부 박테리아 종이 면역 기능에 영향을 미치는 진피 내와 각질층 아래에 침투하기 때문에 이러한 상호작용의 제어가 중요하다. 예를 들어, 스타필로코커스 에피더미디스(S. 에피더미디스(*S. epidermidis*))는 표피 각질형성세포와 상호작용하여 톨-유사 수용체 3-매개 염증을 예방하고, 비만 세포 및 T 세포를 동원하며, 치밀 이음부 및 항미생물성 펩티드 생산을 증가시킨다. 일반적인 피부 공생 박테리아와 대조적으로, S. 에피더미디스, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(S. 아우레우스(*S. aureus*))는 종종 병원성이며 피부 기능에 부정적인 영향을 미친다. 이것은 아토피성 피부염(atopic dermatitis)(AD)과 같은 피부 질환에서 특별히 분명하며 여기서 S. 아우레우스가 이 질환을 촉진한다.
- [0010] AD를 가진 대상체의 피부에 서식하는 마이크로바이옴(microbiome)은 전반적인 미생물 다양성의 감소 및 S. 아우레우스 존재도(abundance)의 증가를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 증가된 S. 아우레우스 콜로니형성은 AD를 가진 환자의 증가된 질환 중증도와 관련이 있다. 기계론적으로, S. 아우레우스가 어떻게 질환을 악화시키는지 불확실하다. S. 아우레우스로부터의 몇몇 생성물은 장벽을 손상시키고/시키거나 염증을 유발하는 것으로 나타났다. 이들 생성물은 a-독소, 초항원(superantigen), 독성 쇼크 증후군 독소(toxic shock syndrome toxin) 1, 장독소, 단백질 A, 펜톤-발렌타인 류코시딘(Panton-Valentine leukocidin), 표피박리 독소(exfoliative toxin), 및 V8 세린 프로테아제를 포함한다. 이들 분자의 잠재적인 병원성 효과 때문에, 감염의 분명한 임상적 징후의 부재 하에 S. 아우레우스 콜로니형성에 대한 피부의 반응을 이해하는 것은 AD의 병인을 이해하고 미래의 치료법을 개발하는 데 대단히 중요하다.

**발명의 내용**

- [0011] 본 개시내용은 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하고 (i) 각질형성세포의 프로테아제 생성 및/또는 활성을 억제, (ii) 각질형성세포의 IL-6 생성 및/또는 활성을 억제, (iii) 스타필로코커스 아우레우스(S. 아우레우스)로부터 페놀 가용성 모듈린(modulin) 알과 3의 생성을 억제 및/또는 (iv) S. 아우레우스에 의한 agr 생성 및/또는 활성을 억제하는 정제된 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열번호: 2와 적어도 98% 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17로 이루어진다. 전술한 것 중 어느 하나의 또 다른 또는 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 하나 이상의 D-아미노산을 포함한다. 또 다른 또는 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 화학식 I, IA 또는 IB의 화합물(하기 참조)을 포함한다.
- [0012] 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩티드 또는 화학식 I, IA 또는 IB에 대한 화합물을 포함하는 국소 제제(topical formulation)를 또한 제공한다.
- [0013] 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 엄격한 조건 하에 서열번호: 1 또는 3으로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하는 서열을 포함하고 서열번호: 4를 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 1 또는 3을 포함한다.
- [0014] 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 또한 제공한다. 벡터는 세포 또는 미생물 숙주에서의 발현에 적합한 임의의 벡터일 수 있다.
- [0015] 본 개시내용은 본 개시내용의 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 미생물을 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 미생물은 본 개시내용의 폴리펩티드를 자연적으로 발현하지 않으며 제조합 공학에 의해 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 조작된다. 또 다른 실시양태에서, 미생물은 동일한 종의 야생형 유기체와 비교하여 비-병원성이되거나 병원성을 감소시켰다는 점에서 약독화된다. 또 다른 실시양태에서, 제조합 미생물은 포유동물(예를 들어, 인간)의 피부에 정상적으로 발견되는 미생물(예를 들어, 편리공생균)이다.
- [0016] 본 개시내용은 본 개시내용의 제조합 미생물을 포함하는 프로바이오틱 조성물을 또한 제공한다.
- [0017] 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 및/또는 17)를 발현하는 미생물을 포함하는 프로바이오틱 조성물을 또한 제공한다. 한 실시양태에서 미생물은 S. 호미니스, S. 에피더미디스, S. 와르네리 또는 이의 임의의 조합이다. 추가 실시양태에서 미생물은 S. 호미니스 C5, S. 호미

니스 A9, S. 에피더미디스 A11 및/또는 S. 와르네리 G2이다. 또 다른 또는 추가 실시양태에서, 조성물은 ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 S. 에피더미디스 A11 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 S. 호미니스 C5 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 S. 호미니스 A9 81618, 2018년 8월 28일 기탁), ATCC 번호 \_\_\_\_\_(균주 명칭 S. 와르네리 G2 81618, 2018년 8월 28일 기탁) 및 전술한 균주의 임의의 조합을 갖는 미생물의 균으로부터 선택된 미생물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 프로바이오틱 조성물은 비-자연적이다(예를 들어, 피부 상에서 발견되는 전체 미생물 범위를 포함하지 않거나, 피부 상에서 발견되지 않는 단위 부피당 미생물의 양을 포함하거나, 미생물은 유전자 변형되었거나, 조성물은 피부 상에서 정상적으로 발견되지 않는 구성요소 또는 화합물을 함유한다).

[0018] 본 개시내용은 피부 상에 프로테아제 활성을 억제하기에 충분한 유효량의 코아굴라제 음성 스태필로코커스 종 (coagulase negative *Staphylococcus sp.*)(CoNS), 또는 유효량의 CoNS의 발효 추출물을 투여하는 단계이며 여기서 CoNS가 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하고 프로테아제 생성을 억제하는 폴리펩티드를 생성하는 것인 단계를 포함하는, 피부과학적 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 피부과학적 장애는 네터튼 증후군(Netherton syndrome), 아토피성 피부염, 접촉성 피부염(contact dermatitis), 습진, 건선, 여드름, 표피 과다각화증(epidermal hyperkeratosis), 가시세포증(acanthosis), 표피 염증(epidermal inflammation), 진피 염증(dermal inflammation) 및 소양증(pruritus)으로 이루어진 균으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 투여하는 단계는 국소 적용에 의한다. 또 다른 또는 추가 실시양태에서, CoNS는 스태필로코커스 에피더미디스, 스태필로코커스 캐피티스(*Staphylococcus capitis*), 스태필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스태필로코커스 사카로리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*), 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 파스퇴리(*Staphylococcus pasteurii*), 스태필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태필로코커스 데브리예세이(*Staphylococcus devriesei*), 스태필로코커스 호미니스, 스태필로코커스 제텐시스(*Staphylococcus jettensis*), 스태필로코커스 페트라시이(*Staphylococcus petrasii*), 및 스태필로코커스 리그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*)로 이루어진 균으로부터 선택된다. 전술한 것 중 어느 하나의 또 다른 또는 추가 실시양태에서, CoNS의 발효 추출물은 서열번호: 4의 폴리펩티드 서열 및/또는 화학식 I, IA, 또는 IB의 화합물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CoNS는 S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5, S. 호미니스 A9, S. 와르네리 G2 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된다.

[0019] 본 개시내용은 대상체의 피부로부터의 배양물 또는 대상체로부터의 피부의 프로테아제 활성을 측정하는 단계; 프로테아제 활성을 정상 대조군과 비교하는 단계; 코아굴라제 음성 스태필로코커스로부터의 공생 피부 박테리아 조성물 및/또는 발효 추출물을 투여하는 단계이며 여기서 공생 피부 박테리아 조성물 또는 발효 추출물이 서열 번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17과 적어도 98% 동일한 폴리펩티드를 포함하고/거나 화학식 I, IA 또는 IB의 화합물을 포함하고, 여기서 조성물이 공생 피부 박테리아의 성장 및 복제 능력을 유지하는 크림, 연고 또는 제약 조성물로 제제화되는 것인 단계를 포함하는, 피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 코아굴라제 음성 스태필로코커스는 스태필로코커스 에피더미디스, 스태필로코커스 캐피티스, 스태필로코커스 카프라에, 스태필로코커스 사카로리티쿠스, 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 파스퇴리, 스태필로코커스 헤몰리티쿠스, 스태필로코커스 데브리예세이, 스태필로코커스 호미니스, 스태필로코커스 제텐시스, 스태필로코커스 페트라시이, 및 스태필로코커스 리그두넨시스로 이루어진 균으로부터 선택된다.

[0020] 본 개시내용은 본 개시내용의 정제된 폴리펩티드 또는 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17과 적어도 98% 동일하고 칼리크레인 생성 또는 활성을 억제하는 폴리펩티드를 생성하는 박테리아를 포함하는 프로바이오틱 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다.

[0021] 본 개시내용은 페놀 가용성 모듈린 발현을 억제하는 조성물을 투여하는 단계이며 여기서 조성물이 본 개시내용의 정제된 폴리펩티드 또는 화학식 I, IA, 또는 IB의 화합물을 포함하는 것인 단계를 포함하는, 피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 투여하는 단계는 국소이다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 코아굴라제 음성 스태필로코커스의 발효 추출물이다.

[0022] 본 개시내용은 S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5, S. 호미니스 A9, S. 와르네리 G2 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 프로바이오틱 공생 피부 박테리아를 포함하는 국소 프로바이오틱 조성물을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 로션, 웨이크 로션, 크림, 연고, 젤, 폼, 분말, 고체, 페이스트 또는 텅크로서 제제화된다.

[0023] 본 개시내용은 약물 및 가용성 페놀 모듈린 알파 3을 포함하는 S. 아우레우스 발효 추출물 또는 S. 아우레우스-

프로바이오틱을 포함하는 약물 조성물을 또한 제공한다. 본 개시내용은 대상체의 피부를 통해 약물을 전달하기 위한 조성물의 용도를 또한 제공한다

- [0024] 본 개시내용은 피부에서 증가된 프로테아제 활성을 예방하기 위해 공생/건강에 유익한 박테리아 및/또는 그의 생성물을 제공한다. 이것은 아토피성 피부염, 네티튼 증후군 및 비정상적으로 높은 프로테아제 활성 및 장벽 파괴로 고통받는 다른 피부 병태를 포함한 많은 질환 상태에서 중요하다.
- [0025] 본 개시내용은 프로테아제 활성을 유도하고 따라서 상처 치유(wound repair), 노화, 일광 손상(sun damage), 색소 이상(pigment abnormalities) 및 흉터형성(scarring)과 관련된 장애의 치료에서 피부의 단백질분해 재형성(proteolytic remodeling)을 돕는 인자 및 조성물을 또한 제공한다.
- [0026] 본 개시내용은 피부 상에 프로테아제 활성을 억제하기에 충분한 유효량의 코아귤라제 음성 스태필로코커스 종(CoNS), 또는 유효량의 CoNS의 발효 추출물을 투여하는 단계를 포함하는, 피부과학적 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 피부과학적 장애는 네티튼 증후군, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 습진, 건선, 여드름, 표피 과다각화증, 가시세포증, 표피 염증, 진피 염증 및 소양증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 투여하는 단계는 국소 적용에 의한다. 또 다른 실시양태에서, CoNS는 스태필로코커스 에피데미디스, 스태필로코커스 캐피티스, 스태필로코커스 카프라에, 스태필로코커스 사카로리티쿠스, 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 파스퇴리, 스태필로코커스 헤몰리티쿠스, 스태필로코커스 데브리예세이, 스태필로코커스 호미니스, 스태필로코커스 제텐시스, 스태필로코커스 페트라시이, 및 스태필로코커스 리그두넨시스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 실시양태에서, CoNS는 S. 에피데미디스이다.
- [0027] 본 개시내용은 대상체의 피부로부터의 배양물 또는 대상체로부터의 피부의 프로테아제 활성을 측정하는 단계; 프로테아제 활성을 정상 대조군과 비교하는 단계; 코아귤라제 음성 스태필로코커스로부터의 공생 피부 박테리아 조성물 및/또는 발효 추출물을 투여하는 단계이며, 여기서 공생 피부 박테리아 조성물이 배양물 또는 피부의 세린 프로테아제 활성을 감소시키는 적어도 하나의 공생 박테리아를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 공생 박테리아가 공생 피부 박테리아의 성장 및 복제 능력을 유지하는 크립, 연고 또는 제약 조성물로 제제화되는 것인 단계를 포함하는, 피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 코아귤라제 음성 스태필로코커스는 스태필로코커스 에피데미디스, 스태필로코커스 캐피티스, 스태필로코커스 카프라에, 스태필로코커스 사카로리티쿠스, 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 파스퇴리, 스태필로코커스 헤몰리티쿠스, 스태필로코커스 데브리예세이, 스태필로코커스 호미니스, 스태필로코커스 제텐시스, 스태필로코커스 페트라시이, 및 스태필로코커스 리그두넨시스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0028] 본 개시내용은 칼리크레인 발현을 억제하는 작용제를 투여하는 단계를 포함하는, 피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 본 개시내용은 페놀 가용성 모듈린 발현을 억제하는 작용제를 투여하는 단계를 포함하는, 피부 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 전술한 것 중 어느 한 쪽의 한 실시양태에서, 투여하는 단계는 국소이다. 또 다른 실시양태에서, 작용제는 코아귤라제 음성 스태필로코커스의 발효 추출물이다. 또 다른 실시양태에서, 코아귤라제 음성 스태필로코커스는 스태필로코커스 에피데미디스, 스태필로코커스 캐피티스, 스태필로코커스 카프라에, 스태필로코커스 사카로리티쿠스, 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 파스퇴리, 스태필로코커스 헤몰리티쿠스, 스태필로코커스 데브리예세이, 스태필로코커스 호미니스, 스태필로코커스 제텐시스, 스태필로코커스 페트라시이, 및 스태필로코커스 리그두넨시스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0029] 본 개시내용은 복수개의 피부 박테리아를 포함하는 국소 조성물을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 코아귤라제 음성 스태필로코커스 종이다. 또 다른 구별되는 실시양태에서, 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 스태필로코커스 아우레우스를 포함한다. 전술한 실시양태 중 어느 한 쪽의 한 실시양태에서, 박테리아는 크립, 로션, 팅크, 젤, 또는 다른 국소 제제로 제제화되고, 여기서 박테리아는 계속 생존 가능하다.
- [0030] 본 개시내용은 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물을 포함하는 국소 프로바이오틱 조성물이며, 여기서 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물이 코아귤라제 음성 스태필로코커스(CoNS) 종으로부터 수득되는 것인 국소 프로바이오틱 조성물을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, CoNS는 스태필로코커스 에피데미디스, 스태필로코커스 캐피티스, 스태필로코커스 카프라에, 스태필로코커스 사카로리티쿠스, 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 파스퇴리, 스태필로코커스 헤몰리티쿠스, 스태필로코커스 데브리예세이, 스태필로코커스 호미니스, 스태필로코커스 제텐시스, 스태필로코커스 페트라시이, 및 스태필로코커스 리그두넨시스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0031] 기재된 실시양태 중 어느 하나에서, 국소 프로바이오틱 조성물은 로션, 웨이크 로션, 크림, 연고, 겔, 폼, 분말, 고체, 페이스트 또는 팅크로서 제제화된다,
- [0032] 본 개시내용은 약물 및 S. 아우레우스 발효 추출물 또는 S. 아우레우스-바이오틱 조성물을 포함하는 약물 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 개시내용은 피부를 약물 및 S. 아우레우스 발효 추출물 또는 S. 아우레우스-바이오틱 조성물을 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 피부를 통한 약물 전달 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 약물은 피부를 통해 흡수되거나 흡착되는 국소 약물이다.
- [0034] 본 개시내용은 대상체의 피부를 S. 아우레우스 또는 S. 아우레우스의 발효 추출물을 포함하는 조성물과 일정 시간 동안 및 일정 용량 및 조건 하에 접촉시켜 피부의 침투성을 증가시킨 다음에, 피부를 전달되는 약물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 국소 약물을 전달하는 방법을 또한 제공한다.
- [0035] 본 개시내용은 S. 아우레우스로부터의 발효 추출물을 포함하는 조성물 또는 생존 가능한 S. 아우레우스를 함유하는 로션, 웨이크 로션, 크림, 연고, 겔, 폼, 분말, 고체, 페이스트 또는 팅크를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 세부사항은 하기 첨부 도면 및 설명에서 제시된다. 본 발명의 다른 특징, 목적, 및 이점은 설명 및 도면으로부터, 및 청구범위로부터 분명할 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0037] **도 1a 내지 d**는 (a 내지 c) NHEK를 24시간 동안 S. 아우레우스(SA; 뉴먼(Newman), USA300, 113, 생거(SANGER) 252) 및 S. 에피데미디스(ATCC12228, ATCC1457) 멸균 여과된 상청액으로 처리하고 NHEK 컨디셔닝된 배지를 특정 트립신-유사, 엘라스타제-유사, 및 MMP 프로테아제 기질로 분석하였음을 나타낸다. (d) S. 아우레우스(뉴먼) 분비된 프로테아제를 트립신 활성에 미치는 그의 영향에 대해 분석하였다. 데이터는 평균 ± SEM(n = 4)을 나타내며 적어도 3회의 독립적인 실험을 나타낸다. 일원분산분석(One-way ANOVA)(a-c) 및 이원분산분석(two-way ANOVA)(d)을 사용하였으며 유의성을 \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001로 표시하였다. ANOVA, 분산분석; MMP, 매트릭스 메탈로프로테이나제; NHEK, 정상 인간 표피 각질형성세포.

**도 2a 내지 c**는 (a) 0-48시간 동안 S. 아우레우스(SA, 뉴먼) 상청액 처리 후 NHEK 컨디셔닝된 배지에서 총 프로테아제 활성(5 µg ml BODIPY FL 카세인)을 측정하였으며, (b) 한편 세린 프로테아제 억제제 아프로티닌(800 µg ml)을 24-시간 처리 후 컨디셔닝된 배지에 적용하였음을 나타낸다. (c) S. 아우레우스(USA300 LAC) WT 및 프로테아제-결핍(protease-null) 균주를 NHEK 컨디셔닝된 배지 트립신 활성(Boc-Val-Pro-Arg-AMC, 200 mM)에 미치는 영향에 대해 비교하였다. 이원분산분석(a, b) 및 일원분산분석(c) 둘 다를 사용하였으며 유의성을 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001로 표시하였다. ANOVA, 분산분석; NHEK, 정상 인간 표피 각질형성세포; WT, 야생형.

**도 3a 내지 f**는 S. 아우레우스가 인간 각질형성세포에서 KLK 발현을 증가시킴을 나타낸다. (a) 24-시간 S. 아우레우스(SA, 뉴먼) 상청액 처리 후 NHEK에서의 KLK mRNA 발현의 상대적 존재도를 qPCR에 의해 분석하였다. (b 내지 e) KLK5, 6, 13, 및 14를 0-48시간 동안 S. 아우레우스 상청액으로 처리된 NHEK에서의 배수 변화도에 대해 분석하였다. 모든 mRNA 발현 수준을 하우스키핑 유전자(housekeeping gene), 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제(GAPDH)로 정규화하였다. (f) NHEK 컨디셔닝된 배지 및 세포 용해물을 공개 및 예측 분자량 둘 다를 사용하여 SA(뉴먼) 상청액으로 24-시간 처리 후 면역블롯팅(immunoblotting)에 의해 KLK5, 6, 13 및 14의 단백질 발현의 변화에 대해 분석하였다. 하우스키핑 유전자, α-튜블린을 세포 용해물의 로딩 대조군으로서 사용하였다. 데이터는 평균 ± SEM(n = 3)을 나타내며 적어도 3회의 독립적인 실험을 나타낸다. 이원분산분석(b-e)을 사용하였으며 유의성을 \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001로 표시하였다. ANOVA, 분산분석; KLK, 칼리크레인; NHEK, 정상 인간 표피 각질형성세포; qPCR, 정량적 실시간 PCR; SEM, 평균의 표준 오차.

**도 4a 내지 d**는 다수의 KLK가 인간 각질형성세포에서 S. 아우레우스-유도된 세린 프로테아제 활성의 원인이 됨을 나타낸다. NHEK를 CaCl2 분화 및 S. 아우레우스(뉴먼) 상청액의 첨가 전에 KLK6, 13 또는 14 siRNA(15 nM)로 처리하였다. siRNA 스크램블드(scrambled)(-) 대조군 1 및 2를 각각 15 nM 및 45 nM에서 사용하였다. (a) 컨디셔닝된 배지를 트립신 활성(Boc-Val-Pro-Arg-AMC, 200 µM)의 변화에 대해 분석하였다. (b 내지 d) KLK6, KLK13, 및 KLK14의 전사 수준을 qPCR에 의해 평가하고, 하우스키핑 유전자, GAPDH로 정규화하여, siRNA 녹다운(knockdown) 효율을 확인하였다. 데이터는 평균 ± SEM(n = 4)을 나타내며 적어도 3회의 독립적인 실험을 나타낸다. 일원분산분석(a)를 사용하였으며 유의성을 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001로 표시하였다.

ANOVA, 분산분석; GAPDH, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제; KLK, 칼리크레인; NHEK, 정상 인간 표피 각질형성세포; qPCR, 정량적 실시간 PCR; siRNA, 작은 간섭(small interfering) RNA; SEM, 평균의 표준 오차.

**도 5a 내지 c**는 다수의 KLK가 인간 각질형성세포에서 S. 아우레우스-유도된 DSG-1 및 FLG 절단을 조절함을 나타낸다. 24시간 동안 S. 아우레우스(뉴민) 상청액으로 처리된 NHEK를 면역블롯팅에 의한 KLK6, 13, 및 14(15 nM)의 siRNA 녹다운 후 **(a)** 데스모글레인(desmoglein)-1(DSG-1) 및 **(b)** 프로필라그린(profilaggrin)(Pro-FLG) 절단에 대한 변화에 대해 평가하였다. 하우스키핑 유전자, a-튜블린을 로딩 대조군으로서 사용하였다. DSG-1(전장) 및 Pro-FLG는 흑색 화살표로 표시된다. **(c)** a-튜블린으로 정규화된 평균 픽셀 수(n = 1)로 표시된 DSG-1(전장) 및 Pro-FLG 둘 다의 밀도계측(Densitometry) 분석. 면역블롯은 적어도 3회의 독립적인 실험을 나타낸다. KLK, 칼리크레인; NHEK, 정상 인간 표피 각질형성세포; siRNA, 작은 간섭 RNA.

**도 6**은 발효 추출물을 제조하는 방법 및 활성에 대한 검정을 도시한다.

**도 7**은 퀴럼 감지 시스템(quorum sensing system)의 제어 하에 S. 아우레우스 페놀-가용성 모듈린(PSM)이 증가된 각질형성세포 세린 프로테아제 활성의 원인이 됨을 나타낸다.

**도 8**은 S. 아우레우스 PSM이 마우스 세린 프로테아제 활성 및 피부 장벽 손상을 증가시킴을 나타낸다.

**도 9**는 아토피성 피부염(AD) 병변 피부로부터의 S. 아우레우스 단리물이 각질형성세포에서 세린 프로테아제 활성을 agr-유형 의존적 방식으로 유도할 수 있음을 나타낸다.

**도 10**은 코아굴라제-음성 스타필로코커스(CoNS) 균주 ATCC14490(S. 에피더미디스)가 자가-유도 펩티드(auto-inducing peptide)(AIP)를 생성하여 S. 아우레우스 agr 활성을 턴 오프(turn off)할 수 있음을 나타낸다.

**도 11**은 아토피성 피부염에서 세린 프로테아제 활성에 미치는 S. 아우레우스 및 공생 박테리아의 영향을 나타낸다.

**도 12**는 S. 아우레우스 agr 활성에 미치는 S. 호미니스 C5의 영향을 나타낸다.

**도 13**은 S. 아우레우스 agr 활성에 미치는 다양한 CoNS 균주의 영향을 나타낸다.

**도 14a 내지 j**는 S. 아우레우스 PSM  $\alpha$ 가 상피 장벽 항상성의 파괴를 야기함을 나타낸다. 인간 각질형성세포(NHEK)를 24시간 동안 야생형(WT), PSM  $\alpha$  ( $\Delta$ PSM  $\alpha$ ) 또는 PSM  $\beta$  ( $\Delta$ PSM  $\beta$ ) 녹아웃 균주로부터 S. 아우레우스(SA) 멸균-여과된 상청액으로 자극하고 **(a)** 트립신 활성 및 **(b)** 하우스키핑 유전자 GAPDH와 비교한 KLK6 mRNA를 분석하였음(n=4)을 나타낸다. **(c)** PSM 합성 펩티드를 최대 24시간 동안 NHEK에 첨가하여 트립신 활성의 변화를 분석하였다. **(d, e)** PSM  $\alpha$ 3 처리 후  $\geq 2$ 배 변화된 유전자의 RNA-Seq에 의한 전사물을 평가한 후 유전자 온톨로지(gene ontology)(GO) 분석. 8 주령 수컷 C57BL/6 마우스(n=6)를 72시간 동안 SA WT, SA  $\Delta$ PSM  $\alpha$ , 또는 SA 10 분비된 프로테아제 녹아웃 균주( $\Delta$  프로테아제)( $1e^7$  CFU)로 처리하였다. **(f, g)** 무린 피부 대표 사진(파선은 치료 영역을 나타냄) 및 치료 후 표피 두께에 대한 변화(스케일(scale)= 200  $\mu$ m). **(h 내지 k)** 경피 수분 손실(TEWL) 및 SA CFU/cm<sup>2</sup>에서 WT 또는 돌연변이체 SA 균주에 의한 무린의 등 피부(back skin)의 변화를 또한 평가하였다. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석을 사용하여 p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*, p<0.0001 \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**도 15a 내지 g**는 AD 피부에서 스타필로코커스 에피더미디스 agr 유형 I 자가-유도 펩티드 특성화 및 결핍(deficiency)을 나타낸다. **(a, b)** 24시간 후 S. 아우레우스(SA) USA300 LAC agr 유형 I 활성의 S. 에피더미디스 agr 유형 I-III 상청액 억제(n=4) 및 S. 에피더미디스 agr 유형 I 자가유도 펩티드(AIP)의 공지된 구조의 표시. **(c)** 24시간 후 SA agr 활성에 미치는 스타필로코커스 에피더미디스(S. epi) agr 유형 I 균주 RP62A 야생형(WT) 또는 자가유도 펩티드 녹아웃( $\Delta$ AIP) 영향. **(d)** S. epi WT 또는  $\Delta$ AIP 상청액을 갖거나 갖지 않는 SA 멸균-여과된 상청액 성장을 추가적 24시간 동안 NHEK에 적용한 후 NHEK 트립신 활성을 측정하였다(n=4). **(e)** AD 피부 상에서 발견된 S. 에피더미디스 agr 유형 I-III 계층의 공통(Consensus). **(f, g)** AD 중증도에 기초한 모든 대상체의 전반적인 조합 데이터 및 객관적 SCORAD에 기초한 '최소 중증(least severe)' 내지 '최대 중증('most severe)' AD 점수의 8개의 개별 AD 대상체의 발적 영역 상에서 SA 상대 존재도에 대한 S. 에피더미디스 agr 유형 I의 비. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석(**a, c, d**) 및 (비모수적(nonparametric)) 쌍형성되지 않은(unpaired) 만-위트니 검정(Mann-Whitney test)(**f**)을 사용하여 p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*, p<0.0001 \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**도 16a 내지 f**는 다수의 임상적으로 단리된 코아굴라제-음성 스타필로코커스가 S. 아우레우스 agr 활성을 억제함을 나타낸다. **(a)** 임상적으로 단리된 코아굴라제-음성 스타필로코커스(CoNS)의 멸균-여과된 상청액을 24시간 동안 S. 아우레우스(SA) USA300 LAC agr 유형 I P3-YFP 리포터 균주에 첨가한 후 SA agr 활성에 대해 분석하였다(n=3). **(b, c)** S. 호미니스 C5 균주 계능을 추가로 서열분석하고, 자가-유도 펩티드(AIP) 서열에 대한 agrD 유전자에서 분석하였다. S. 호미니스 C5 상청액의 생화학적 분석은 <3kDa 크기 배제 원심분리 여과, 80% 황산 암모늄 침전물, 및 또한 SA agr 활성을 수행하는 pH11 1시간 처리된 상청액을 시험하였다. **(d 내지 f)** 24시간 동안 S. 호미니스 C5 상청액의 존재 하에 성장한 SA를 멸균 여과하고 24시간 동안 인간 각질형성세포(NHEK)에 첨가한 후 트립신 활성, 하우스키핑 유전자 GAPDH와 비교한 KLK6 mRNA 발현, 및 IL-6 단백질 수준을 분석하였다. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석을 사용하여 p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*, p<0.0001 \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**도 17a 내지 h**는 AD 임상 CoNS 단리물이 SA 유도된 무린 피부 장벽 손상을 억제함을 나타낸다. 생(live) S. 호미니스 C5( $1e^8$  CFU)를 갖거나 갖지 않은 S. 아우레우스(SA) USA300 LAC agr 유형 I pAmi P3-Lux 리포터 균주( $1e^7$  CFU)를 48시간 동안 8주 암컷 C57BL/6 마우스(n=5)에 적용하였다. **(a, b)** SA agr 활성을 발광(luminescence)의 변화에 의해 무린의 등 피부 상에서 평가하였다. **(c)** 48시간 SA 처리 후 무린 피부의 대표적인 이미지(파선 박스는 처리 영역을 나타냄). **(d 내지 h)** SA CFU/cm<sup>2</sup>를 결정하고 I16 mRNA 발현, 경피 수분 손실(TEWL), 트립신 활성, 및 하우스키핑 유전자 Gapdh에 대해 정규화된 Klk6 mRNA 발현의 변화를 분석함으로써 무린 피부 장벽 손상 및 염증을 평가하였다. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석을 사용하여 p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*, p<0.0001 \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**도 18a 내지 h**는 S. 아우레우스 PSM α가 인간 각질형성세포에서 필수 장벽 유전자 및 시토카인 발현을 변화시킴을 나타낸다. **(a 내지 d)** 합성 PSM α3로 처리된 인간 각질형성세포를 트립신 활성 및 하우스키핑 유전자 GAPDH에 대해 정규화된 KLK6 전사물 발현의 변화에 대해 용량 및 시간 의존적 방식 둘 다로 평가하였다. **(E)** 24시간 동안 PSM α3로 처리된 인간 각질형성세포에서 대조군으로부터 ≥2배 하향 조절된 유전자의 GO-용어 분석. **(f 내지 h)** 24시간 동안 SA WT, SA Δpsm α, 또는 SA Δpsm β 상청액으로 처리된 IL-6, TNF-α, 또는 IL-1α의 인간 각질형성세포 시토카인 단백질 발현의 변화. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석을 사용하여 p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*, p<0.0001 \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**도 19a 내지 h**는 S. 아우레우스 PSM α 및 프로테아제가 무린 피부 상에서 장벽 손상 및 염증 유도의 원인이 됨을 나타낸다. S. 아우레우스(SA)( $1e^7$  CFU) 야생형(WT), PSM α 녹아웃(Δpsm α), 및 프로테아제 결핍(Δ프로테아제) 균주를 72시간 동안 수컷 무린의 등 피부에 적용하고(n=6) **(a, e)** 트립신 활성, **(b, f)** Klk6, **(c, g)** I16, 및 **(d, h)** IL17a/f mRNA 발현(하우스키핑 유전자 Gapdh로 정규화됨)의 변화를 측정하였다. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석을 사용하여 p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*, p<0.0001 \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**도 20a 내지 c**는 CoNS 균주가 SA 성장을 수행하지 않음을 나타낸다. 코아굴라제-음성 스타필로코커스(CoNS) 상청액은 **(a)** CoNS 임상적 단리물, **(b)** S. 에피더미디스(S. epi) agr 유형 I-III, 및 **(c)** 24시간 동안 SA agr 유형 I 리포터 균주에 첨가된 S. 에피더미디스(S. epi) 야생형(WT) 또는 자가-유도 펩티드 녹아웃(ΔAIP) 상청액을 포함하여 OD600nm(n=3-4)에 의해 평가된 바와 같은 SA agr 유형 I P3-YFP 리포터 균주 성장에 영향을 미친다. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시된다.

**도 21a 내지 b**는 S. 호미니스 C5가 SA agr 유형 I-III을 억제하나 유형 IV는 아님을 나타낸다. S. 호미니스 C5 상청액을 24시간 동안 SA agr 유형 I-IV P3-YFP 리포터 균주에 첨가하였다(n=3). **(a)** SA 리포터 균주 agr 유형 I-IV 활성 및 **(b)** S. 호미니스 C5 상청액의 존재 하에 배양될 때 OD600nm에 의한 성장의 측정. 모든 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석을 사용하여 p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*, p<0.0001 \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**도 22a 내지 f**는 S. 호미니스 C5 상청액이 SA 유도된 피부 장벽 손상을 억제함을 나타낸다. 10x 농축된 <3kDa S. 호미니스 C5 상청액을 갖거나 갖지 않는 S. 아우레우스(SA)( $1e^7$  CFU)를 48시간 동안 암컷 무린의 등 피부에 적용하였다(n=3). **(a 내지 b)** SA 처리 후 무린의 등(파선은 처리 영역을 나타냄)의 대표적인 이미지 및 무린 피부로부터 회수된 SA CFU/cm<sup>2</sup>. **(c 내지 f)** SA는 I16, 경피 수분 손실(TEWL), 트립신 활성, 및 Klk6 mRNA 발현(하우스키핑 유전자 Gapdh와 비교하여)을 포함한 피부 장벽 손상 마커를 유도하였다. 모든 오차 막대는 평균의

표준 오차(SEM)로 표시되며 일원분산분석을 사용하여  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.0001$  \*\*\*\*로 표시된 통계적 유의성을 결정하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0038] **상세한 설명**
- [0039] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an", 및 "the"는 문맥상 분명히 달리 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "작용제"에 대한 언급은 복수개의 이러한 작용제를 포함하고 "미생물"에 대한 언급은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 하나 이상의 미생물 및 그의 등가물에 대한 언급 등을 포함한다.
- [0040] 또한, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 유사하게, "포함하다", "포함하다", "포함하는" "포함한다", "포함한다", 및 "포함한"은 상호교환 가능하며 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [0041] 다양한 실시양태의 기재가 용어 "포함하는"을 사용하는 경우, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 일부 구체적 경우에, 일 실시양태가 표현 "로 본질적으로 이루어진" 또는 "로 이루어진"을 사용하여 대안적으로 기재될 수 있음을 이해할 것이라는 점을 추가로 이해하여야 한다
- [0042] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 과학기술 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 대등한 임의의 방법 및 시약이 개시된 방법 및 조성물의 실시에서 사용될 수 있다.
- [0043] 아토피성 피부염(AD)은 가장 흔한 면역 장애 중 하나이며, 환자의 삶의 질과 재정에 심각한 부담을 야기할뿐만 아니라 동반질환의 심각한 위험을 끼친다. 피부 장벽 기능의 결함은 AD의 중요한 특성이다. AD를 가진 환자의 습진성 피부 병변은 증가된 수준의 Th2 시토카인 예컨대 IL4 및 IL13을 갖는다. Th2 시토카인은 필라그린의 발현을 억제함으로써 피부 장벽의 기능 감소를 촉진한다. 이들 시토카인은 피부 박테리아 공동체(bacterial community)의 장내 세균 불균형(dysbiosis) 및 S. 아우레우스에 의한 향상된 콜로니형성을 야기할 수 있는 AD의 결함인 인간 항미생물성 펩티드 예컨대 카텔리시딘(cathelicidin) 및 b-디펜신(defensin)-2의 발현을 또한 억제한다. IL4 수용체 알파를 표적으로 하는 요법은 질환의 상당한 개선을 결과한다. Th2 시토카인 활성화, 장벽 기능, 항미생물성 활성화 및 질환 결과 사이의 강한 연관성은 이러한 본질적인 표피 기능 사이의 인과 관계를 정의하려는 노력을 뒷받침한다.
- [0044] AD를 가진 환자의 피부 장벽은 이들이 증가된 칼리크레인(KLK) 발현을 나타내는 것으로 밝혀졌기 때문에 증가된 단백질분해 활성화에 의해 손상될 수 있다. KLK는 15개의 세린 프로테아제의 패밀리어며, 이들 중 몇몇은 표피의 상부 과립상 및 각질층에서 주로 발견된다. 네터튼 증후군에서, 세린 프로테아제 억제제 카잘(Kazal)-유형 5의 감소된 활성으로 인해 증가된 세린 프로테아제 활성이 관찰된다. 효소 활성의 결과적인 증가는 증가된 표피탈락(desquamation), 변경된 항미생물성 펩티드 및 필라그린(FLG) 프로세싱, 및 프로테아제-활성화된 수용체 2 활성화 및 염증을 야기한다. 증가된 프로테아제 활성은 피부 면역 시스템과의 마이크로바이옴의 신호전달(communication)에 중요한 역할을 또한 할 수 있으며, 최근에는 표피를 통한 박테리아의 침투를 향상시켜 표피 시토카인 생성 및 염증에 직접 영향을 미치는 것으로 나타났다.
- [0045] 스타필로코커스 아우레우스에 의한 피부의 마이크로바이옴의 장내 세균 불균형 및 피부의 콜로니형성은 아토피성 피부염(AD)의 악화와 연관이 있다. 본 개시내용은 S. 아우레우스가 각질형성세포로부터 특이적 KLK의 발현을 유도하고 피부에서 전반적인 단백질분해 활성을 증가시키는 능력을 갖는다는 것을 입증한다. 이것은 피부 상의 박테리아가 숙주와 신호전달하는 시스템을 설명하며, S. 아우레우스 콜로니형성이 어떻게 AD를 가진 환자에서 질환 중증도를 증가시킬 수 있는 지에 대해 이전에 공지되어 않았으나 아마도 중요한 메커니즘을 시사한다.
- [0046] S. 아우레우스는 피부 장벽 완전성을 변경시키는 다수의 프로테아제를 피부 상에 분비할 수 있다. 세린 프로테아제 V8 및 세린-유사 프로테아제 표피박리 독소는 DSG-1을 포함한 각질교소체(corneodesmosome) 유착 단백질을 절단하여 증가된 표피탈락을 야기하는 것으로 나타났다. MMP인 아우레오리신은 피부에 중요한 항미생물성 펩티드인 LL-37을 절단하고 불활성화시키는 것으로 공지되어 있다. 그러나, S. 아우레우스 생성물의 이들 직접 단백질분해 작용은 높은 수준의 효소 및 박테리아를 필요로 하며, 이 유기체에 감염 동안에 발생하는 사건과 더 일치한다.
- [0047] 각질형성세포가 S. 아우레우스에 의해 활성화된 후 장벽 단백질의 증가된 소화가 관찰되었다. FLG는 더 큰

Pro-FLG(400 kDa)로부터, 케라틴으로 각질층의 물리적 장벽을 형성하는 데 중요한 역할을 하는 단량체 형태(37kDa)로 절단되는 것으로 공지되어 있다. 가속된 Pro-FLG 절단이 피부의 증가된 표피탈락을 증가시키는 것과 관련될 수 있는 것으로 나타났다(Hewett *et al.*, 2005). 흥미롭게도, S. 아우레우스 상청액으로 처리된 인간 각질형성세포에서 Pro-FLG의 증가된 절단이 관찰되었다. KLK6 또는 KLK13이 침묵되었을 때 Pro-FLG 절단이 부분적으로 차단되었는데, 이는 S. 아우레우스가 Pro-FLG의 절단을 통해 KLK-의존적 방식으로 피부 장벽 완전성을 감소시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[0048] DSG-1은 절단시 증가된 표피탈락을 야기하는 중요한 각질교소체 유착 단백질이다. 각질형성세포에서 전장 DSG-1(160 kDa)은 S. 아우레우스에 의해 자극된 KLK 활성화에 의해 용이하게 절단된다. KLK5, 6, 7, 14는 DSG-1을 절단할 수 있으며, 한편 KLK13은 그렇지 않을 것으로 보고되었다. 이는 상향조절된 KLK6 및 KLK14가 전장 DSG-1의 향상된 절단을 야기할 수 있으며 한편 KLK13이 DSG-1 절단에 관여되지 않는다는 개념에 반대되는 증거를 제공할 수 있음을 나타냈다. 따라서, S. 아우레우스는 KLK가 FLG 절단을 변경하게 할 수 있으나, 또한 표피 피부 장벽 완전성을 감소시키는 또 다른 방법으로서 DSG-1 절단을 증가시키게 할 수 있다. 특정 siRNA 녹다운은 KLK의 증가된 발현이, 적어도 부분적으로, S. 아우레우스에 의해 자극된 증가된 세린 프로테아제 활성의 원인이 됨을 시사하였다. 도 2C는 S. 아우레우스로부터 분비된 프로테아제가 각질형성세포에서 증가된 트립신 활성의 유도에 한 원인이 됨을 입증한다. S. 아우레우스를 포함한 박테리아는 피부 표면에 침투하여 강한 피부 면역 반응을 도출할 있기 때문에(Nakatsuji *et al.*, 2013, 2016; Zhang *et al.*, 2015), 이들 박테리아는 또한 피부 세포의 프로테아제 활성화에 또한 영향을 줄 수 있다. 이들 관찰은 또한 주사(Rosacea) 또는 네더튼 증후군과 관련이 있다.

[0049] 본 개시내용은 S. 아우레우스에 의해 생성된 가용성 인자(들)가 각질형성세포에 의해 생성된 내인성 프로테아제 활성을 변경시키는 강력하고 이전에는 예상치 못한 능력을 갖는다는 것을 입증한다. 이것은 박테리아 프로테아제의 활성을 검출할 수 없는 S. 아우레우스 생성물의 회석액에서 발생하였다. 따라서, S. 아우레우스는 표피를 촉진하여 내인성 단백질분해 활성의 발현을 증가시켜, 총 표피 단백질분해 활성의 균형을 크게 변경시킬 수 있다.

[0050] S. 아우레우스(뉴먼, USA300, 113, 및 생거252) 및 S. 에피더미디스(ATCC12228 및 ATCC1457)의 상이한 균주는 인간 각질형성세포 프로테아제 활성화에 상이한 영향을 미쳤다. 뉴먼 및 USA300을 포함한 S. 아우레우스 균주는 트립신 활성을 증가시켰으며, 한편 S. 아우레우스 및 S. 에피더미디스의 다른 균주는 엘라스타제 또는 MMP 활성을 증가시켰다. 따라서, 박테리아는 박테리아의 종 및 균주 둘 다에 따라 표피 프로테아제 활성을 변경할 수 있을 것이다. S. 아우레우스의 다른 박테리아 종 및 균주가 인간 피부의 효소 균형에 추가로 독특하게 영향을 미칠 수 있을 것이 가능하다. 흥미롭게도, 예비 데이터는 정제된 툴-유사 수용체 리간드가 각질형성세포에서 트립신 활성 또는 KLK 발현을 유도하지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0051] 프로테아제 활성은 다수의 피부 질환에서 고도로 상향조절되어 손상된 피부 장벽을 야기한다. 이것은 거의 모든 경우에 악화된 질환 상태와 연관이 있다. 본 개시내용은, 하나의 측면에서, 공생 미생물 및 그의 박테리아 생성물이 피부에서 증가된 프로테아제 활성을 방지하는 데 유용하다는 것을 입증한다. 특히, 본 개시내용은 코아굴라제 음성 스태필로코커스가 agr 퀴럼 감지 시스템을 억제함으로써 피부에서 스태필로코커스 아우레우스로 유도된 세린 프로테아제 활성을 방지할 수 있음을 입증한다. 스태필로코커스 아우레우스, 병원성 박테리아 균주는 피부에서 세린 프로테아제 활성을 유도할 수 있다. 증가된 프로테아제 활성은 피부 장벽을 파괴하고 네더튼 증후군 및 아토피성 피부염을 포함한 악화된 질환 상태를 야기한다. 본 개시내용은 이러한 증가된 세린 프로테아제 활성이 공생, 또는 건강에 유익한, 피부 박테리아 및 그로부터 유래된 인자의 사용을 통해 방지될 수 있음을 입증한다.

[0052] 본 개시내용은 S. 아우레우스에 대한 각질형성세포의 예기치 않은 반응을 제시한다. 증가된 DSG-1 및 FLG 절단 때문에, S. 아우레우스는 KLK-의존적 방식으로 피부 장벽의 완전성을 감소시키는 하나 이상의 인자를 생성한다.

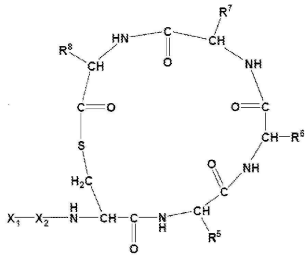
[0053] 본 개시내용은 S. 아우레우스가 프로테아제를 분비할뿐만 아니라 각질형성세포를 특이적으로 활성화시켜 내인성 프로테아제의 발현을 증가시킬 수 있음을 입증한다. 본 개시내용은 페놀-가용성 모듈린 알파(PSM α)가 S. 아우레우스에 의해 분비되고 표피의 자가-소화(auto-digestion)를 유발한다는 것을 입증한다. 예를 들어, KLK 패밀리의 세 가지 구성원은 이러한 증가된 효소 활동에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

[0054] 본 개시내용은 S. 아우레우스의 보조 유전자 조절제(accessory gene regulator)(agr) 퀴럼 감지 시스템을 억제하고 PSM α를 턴 오프하여 프로테아제 활성을 억제하는 공생 박테리아, 유전자 및 폴리펩티드를 또한 확인한다. 따라서, 본 개시내용은 아토피성 피부염뿐만 아니라 피부 상에서 아토피성 피부염 및 프로테아제 활성을 조정하

는 작용제 및 프로바이오틱 제제를 조정하기 위한 표적을 제공한다.

- [0055] 본 개시내용은 피부 상에 정상적으로 상주하는 코아굴라제-음성 스타필로코커스(CoNS) 중 예컨대 S. 에피더미디스 및 S. 호미니스가 S. 아우레우스의 보조 유전자 조절제(agr) 퀴럼 감지 시스템을 억제하고 PSM α를 턴 오프하는 자가-유도 펩티드(AIP)를 생성함으로써 S. 아우레우스의 이러한 생물학적 활성으로부터 보호한다는 것을 입증한다.
- [0056] 사실상 모든 S. 아우레우스 독소는 병독성(virulence) 보조 유전자 조절제(agr)의 제어 하에 있다. agr 시스템은 퀴럼 감지라고 칭해지는 프로세스에 의해 특정 세포 밀도에서 유전자 발현의 변화를 유발한다. 독소 이외에, agr은 다종다양한 병독성 결정인자, 예컨대 세포외효소(exoenzyme)(프로테아제, 리파제, 뉴클레아제)를 상향조절하고, 표면 결합 단백질의 발현을 하향조절하는 것으로 공지되어 있다. 이러한 적응은 이들이 필요할 때(예를 들어, 세포 밀도가 낮고 숙주 조직에 대한 유착이 중요할 때 처음에 단백질 결합, 및 감염이 확립되고 영양소가 숙주 조직으로부터 획득될 필요가 있을 때 독소 및 분해적(degradative) 세포외효소), 감염의 특정 병독성 결정인자의 생성을 제어하는 것으로 여겨진다.
- [0057] 상이한 CoNS 종의 다수의 임상적 단리물은 S. 아우레우스의 존재도를 변화시키지 않으면서 시험관내 및 생체내 둘 다에서 프로테아제 활성화를 억제하고 상피 손상을 방지하였다(예를 들어, S. 아우레우스 밀도를 변화시키지 않으면서 프로테아제/agr 활성의 생물학적 활성을 억제하였다). 게다가, 본 개시내용은 활성 AD를 가진 환자가 S. 아우레우스와 비교하여 이들 유익한 미생물(예를 들어, CoNS)의 상대 존재도의 감소를 나타내어, 퀴럼 감지의 억제를 극복하고 S. 아우레우스에 의한 장벽 파괴를 가능하게 한다는 것을 나타낸다. 종합하면, 본 개시내용은 정상 인간 피부 마이크로바이옴의 구성원이 어떻게 S. 아우레우스 독소 생성의 제어에 대한 공동체로서 기여함으로써 면역 항상성을 유지하는 지를 나타낸다.
- [0058] 본 개시내용은 agr 퀴럼 감지 활성을 억제하는 생성물을 제공하는 폴리뉴클레오티드 서열, 폴리펩티드 서열 및 그의 단편을 또한 확인하였다. 이들 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 S. 아우레우스 감염 및/또는 아토피성 피부염을 치료하기 위한 국소 제제에서 사용하기 위한 치료제 및 재조합 비-병원성 또는 약독화 피부 박테리아를 제공하는 데 사용될 수 있다.
- [0059] 예를 들어, 본 개시내용은 agr 활성을 하향조절하는 자가-유도 펩티드(AIP)를 제공한다. AIP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 명세서에 제공된다.
- [0060] 본 개시내용은 AD 피부에서 증가된 S. 아우레우스 콜로니형성과 증가된 세린 프로테아제 활성 사이의 관련성을 제공하고, 프로테아제 활성을 상향 조절하기 위한 발효 추출물(예를 들어, S. 아우레우스로부터의 발효 추출물) 또는 피부에서 프로테아제 활성을 하향 조절하는 공생 박테리아로부터의 발효 추출물(예를 들어, 본 개시내용의 하나 이상의 AIP를 함유)을 포함하나 이에 제한되지 않는 신규한 표적 및 요법을 제공한다. 게다가, 본 개시내용은(i) 이러한 추출물 또는 정제된 AIP 펩티드를 포함하는 국소 제제, (ii) 공생 프로바이오틱 박테리아(예를 들어, AIP 코딩 서열로 형질전환된 비-병원성 또는 약독화 박테리아, 또는 국소 제제 중 정제된 공생 박테리아 제제)를 포함하는 국소 제제를 제공한다. 추가의 치료적 표적은 KLK에 대한 항체, 및/또는 DSG-1 및/또는 FLG 요법(예를 들어, AD 대상체에 대한 이들 인자의 증가된 발현 또는 전달)일 수 있다.
- [0061] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 AIP 폴리펩티드는  $X_1X_2X_3X_4CX_5X_6X_7X_8$ (서열번호: 10)의 공통 서열을 가지며, 여기서  $X_1$ 은 S, K, V, G 또는 T이고;  $X_2$ 는 Y, Q, A, 또는 I이고;  $X_3$ 은 N, S, T, 또는 D이고;  $X_4$ 는 V, P, M, 또는 T이고;  $X_5$ 는 G, S, A, N, 또는 T이고;  $X_6$ 은 G, N, T, 또는 L이고;  $X_7$ 은 Y 또는 F이고;  $X_8$ 은 F, L, 또는 Y이고, 여기서 서열번호: 10의 아미노산 5-9는 티오락톤 고리를 형성한다. 서열번호: 10의 공통 서열에 속하는 예시적인 펩티드 서열은 SYNVCGGYF(서열번호: 4), KYNPCSNYL(서열번호: 11), SYSPCATYF(서열번호: 12), SQTVCSGYF(서열번호: 13), GANPCALYY(서열번호: 14), TINTCGGYF(서열번호: 15), VQDMCNGYF(서열번호: 16), 및 GYSPCTNFF(서열번호: 17)를 포함한다. 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 화학식 I 또는 IA의 구조를 생성한다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 D- 또는 L-아미노산의 조합을 포함할 수 있다. 전술한 실시양태 중 어느 하나에서, 폴리펩티드는 S. 아우레우스 프로테아제 활성, agr 활성 또는 각질형성세포 프로테아제 활성을 억제한다.

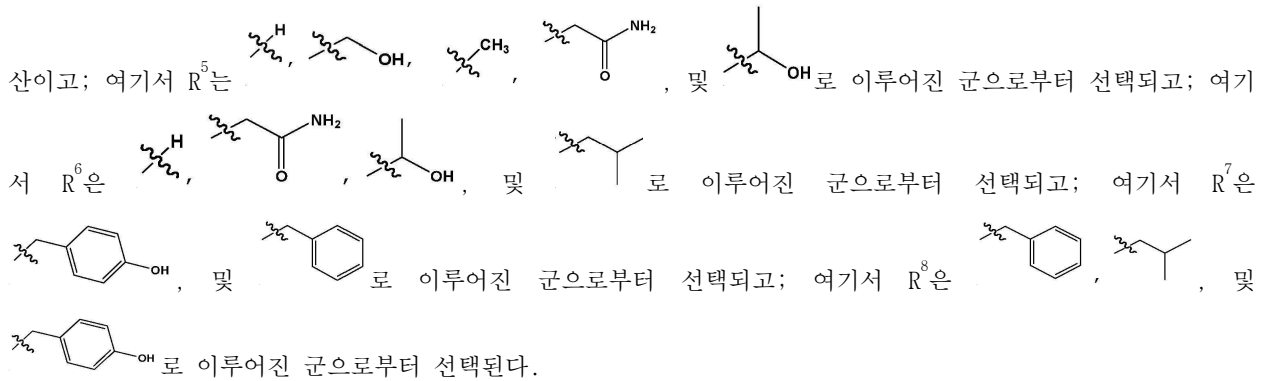
[0062] 본 개시내용은 화학식 I의 화합물을 제공한다



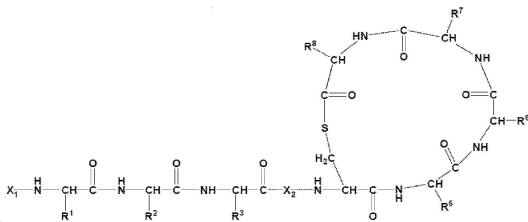
[0063]

[0064] 화학식 I

[0065] 여기서, X<sub>1</sub>은 1-6 아미노산이고; X<sub>2</sub>는 발린(V), 프롤린(P), 메티오닌(M) 및 트레오닌(T)으로부터 선택된 아미노



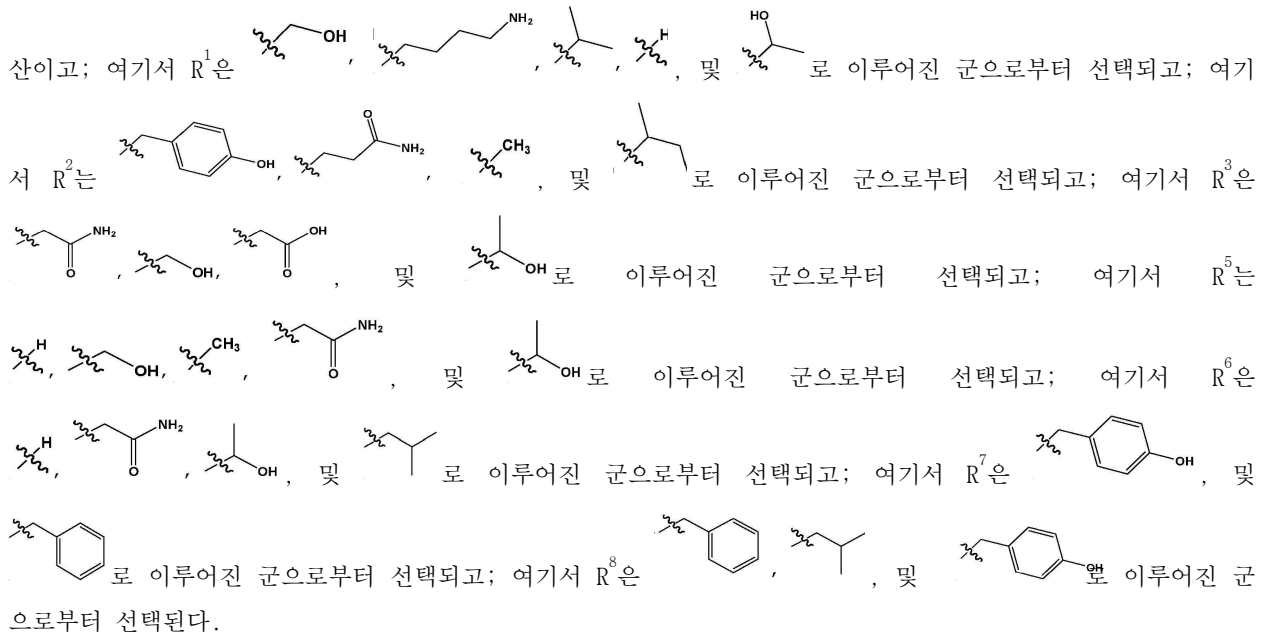
[0066] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 화학식 IA의 화합물을 제공한다:



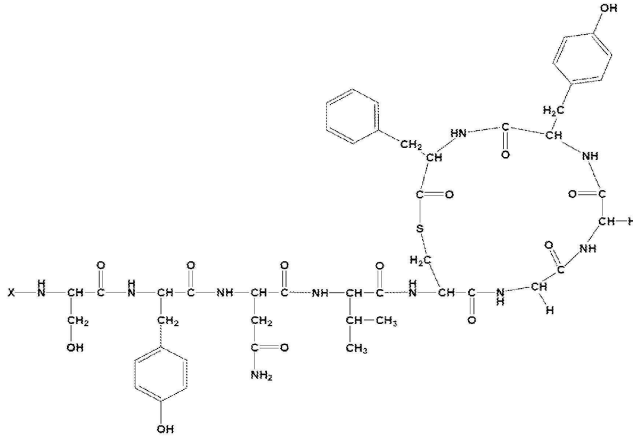
[0067]

[0068] 화학식 IA

[0069] 여기서, X<sub>1</sub>은 1-6 아미노산이고; X<sub>2</sub>는 발린(V), 프롤린(P), 메티오닌(M) 및 트레오닌(T)으로부터 선택된 아미노



[0070] 본 개시내용은 서열번호: 4와 적어도 98% 동일한 서열을 포함하고 (i) 각질형성세포의 프로테아제 생성 및/또는 프로테아제 활성을 억제, (ii) 각질형성세포의 IL-6 생성 및/또는 활성을 억제, (iii) 스타필로코커스 아우레우스(S. 아우레우스)로부터 페놀 가용성 모듈린 알파 3의 생성을 억제 및/또는(iv) S. 아우레우스에 의한 agr 생성 및/또는 활성을 억제하는 정제된 폴리펩티드(예를 들어, AIP 펩티드)를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 화학식 IB의 화합물을 제공한다:



[0071]

[0072] 화학식 IB

[0073] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17을 포함하거나, 이로 이루어진 정제된 폴리펩티드를 제공한다. 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 화학식 I, IA 또는 IB의 구조를 형성한다.

[0074] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 AIP 펩티드는 하나 이상의 D-아미노산을 포함할 수 있다.

[0075] 본 개시내용은 서열번호: 10의 공통 서열을 갖는 AIP 펩티드 또는 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17의 펩티드 또는 화학식 I, IA 또는 IB의 화합물을 포함하는 국소 제제를 제공한다.

[0076] "실질적으로 동일한"은 아미노산 서열이 대체로 동일하나, 전체적으로 동일한 것은 아니나, 그것이 관련된 서열의 기능적 활성을 보유함을 의미한다. 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 공유에 대한 동일성의 백분율은 서열의 정렬에 기초한다. 다양한 프로그램을 사용하여 정렬을 수행하고 동일성을 결정하는 것이 관련 기술분야에 일반적이다. 일반적으로, 2개의 폴리펩티드 또는 도메인은 그의 서열이 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 경우, 또는 서열에 보존적 변이가 있는 경우 "실질적으로 동일한" 것이다. 컴퓨터 프로그램, 예컨대 BLAST 프로그램(Altschul *et al.*, 1990)을 사용하여 서열 동일성을 비교할 수 있다.

[0077] 본 개시내용은 본 개시내용의 AIP 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(즉, "AIP 폴리뉴클레오티드")를 또한 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 서열번호: 2 또는 4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 엄격한 조건 하에 서열번호: 3으로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하고 서열번호: 4의 폴리펩티드를 코딩한다. 하이브리드화 반응의 "엄격성"은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도, 및 염 농도에 의존하는 경험적 계산이다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 더 높은 온도를 필요로 하며, 한편 프로브가 짧을수록 더 낮은 온도를 필요로 한다. 하이브리드화는 일반적으로 상보적 가닥이 그의 용융 온도 미만의 환경에 존재할 때 제어닐링하는 변성된 DNA의 능력에 의존한다. 프로브와 하이브리드화 가능한 서열 사이의 원하는 상동성의 정도가 높을수록, 사용될 수 있는 상대 온도가 더 높다. 결과적으로, 상대 온도가 높을수록 반응 조건이 더 엄격해질 것이며, 한편 온도가 낮을수록 덜 엄격해지는 경향이 있다. 하이브리드화 반응의 엄격성에 대한 추가 세부사항 및 설명은 문헌 [Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다. 본 명세서에 정의된 바와 같은, "엄격한 조건" 또는 "높은 엄격성 조건"은 전형적으로: (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 고온, 예를 들어 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트를 50°C에서 이용하거나; (2) 하이브리드화 동안에 변성제, 예컨대 포름아미드, 예를 들어, 50%(v/v) 포름아미드와 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/pH 6.5에서 50 mM 인산나트륨 완충제와 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨을 42°C에서 이용하거나; (3) 50% 포름아미드, 5xSSC(0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 소듐 피로포스페이트, 5x덴하르트 용액(Denhardt's solution), 초음파처리된 연어 정자 DNA(50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10%

텍스트란 술페이트를 42℃에서, 42℃에서 0.2xSSC(염화나트륨/시트르산나트륨) 중 세척 및 55℃에서 50% 포름아미드 세척 후 55℃에서 EDTA를 함유하는 0.1xSSC로 이루어진 높은-염격성 세척을 이용한다. 서열번호: 11, 12, 13, 14, 15, 16 및 17을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 코돈 차트를 사용하여 추론될 수 있다.

[0078] AIP 폴리뉴클레오티드는 본 개시내용에서 사용하기 위해 다양한 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, AIP 폴리뉴클레오티드는 재조합 숙주 세포에서의 형질전환 및/또는 발현에서 사용하기 위해 발현 벡터 또는 플라스미드로 클로닝될 수 있다. 박테리아 형질전환에서 사용하기 위한 벡터가 공지되어 있다. 4 가지 주요 유형의 벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터, 코스미드, 및 인공 염색체이다. 모든 조작된 벡터에 공통적인 것은 복제 기점, 다중 클로닝 부위, 및 선택 가능한 마커이다. 이들 중 임의의 것이 본 명세서에서 사용하기에 적합하다. AIP 폴리뉴클레오티드는 클론, 벡터, 셔틀(shuttle), 플라스미드, BAC에 삽입될 수 있거나, 박테리아 계능에 통합될 수 있다. 플라스미드가 사용되는 경우, 플라스미드의 카피 수는 세포당 5-500 카피 수일 수 있다. 예시적인 플라스미드 및 발현 벡터는 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: p252, p256, p353-2(Leer *et al.* 1992), p8014-2, pA1, pACYC, pAJ01, pA1-유래(Vujcic & Topisirovic 1993), pA11, pAM-베타-1,2,3,5,8(simon and chopin 1988), pAR1411, pBG10, pBK, pBM02, pBR322, pBR328, pBS-slpGFP, pC194(McKenzie *et al.* 1986, 1987; Horinouchi & Weisblum 1982b), PC194/PUB110, pC3011, pC3011(Skaugen 1989), pCD034-1, pCD034-2, pCD256, pC12000, pC1305, pC1528, pCIS3, pCL2.1, pCT1138, pD125, pE194, pE194/PLS1, pEGFP-C1, pEH, pF8801, pFG2, pFK-시리즈, pGK-시리즈, pGK12, pGK13, pIA, pIAV1,5,6,7,9, pIL.CatT, pIL252/3, pIL253, pIL7, pISA(*E. coli*의 경우 낮음), pJW563, pKRV3, pLAB1000(Josson *et al.* 1990), pLB4(Bates & Gilbert 1989, pLBS, pLE16, pLEB124, pLEB590, pLEB591, pLEB600, pLEB604, pLEP24mcp, pLJ1(Takiguchi *et al.* 1989), pLKS, pLTK2, pWCFS101 및 pMD5057(Bates & Gilbert, 1989; Skaugen, 1989; Leer *et al.*, 1992; Vujcic & Topisirovic, 1993; Eguchi *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2000; Danielsen, 2002; Daming *et al.*, 2003; de las Rivas *et al.*, 2004; van Kranenburg *et al.*, 2005), pLP1/18/30, pLP18, pLP317, pLP317cop, pLP3537, pLP3537xyl, pLP402, pLP825, pLP825 and pLPE323, pLP82H, pLPC37, pLPE23M, pLPE323, pLPE350, pLPI(Bouia *et al.* 1989), pLS1, pLS1 및 pE194(Lacks *et al.* 1986; Horinouchi & Weisblum 1982a), plul631, 에리트르마이신-내성 유전자를 보유하는 엘. 루테리(*L. reuteri*)로부터의 pLUL631, pM3, pM4, pMD5057, pMG36e, pND324, pNZ-시리즈, pPSC 시리즈, pSH71(de vos, 1987), pSIP-시리즈, pSK11L, pSL2, pSN2, pSN2(Khan & Novick 1982), pT181(Koepsel *et al.* 1987), (Khan & Novick 1983), pT181, pC194 및 pE194는 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)에서 기능적이지 않고(Gruss *et al.* 1987), pT181, pE194/pLS1, pC194/pUB110 및 pSN2(Khan, 2005), pTL, pTRK 패밀러, pTRT 패밀러, pTUAT35, pUBI10 및 pC194(McKenzie *et al.* 1986, 1987; Horinouchi & Weisblum 1982b), pUCL22, pULP8/9, pVS40, pWC1, pWCFS101, pWV02, pWV04, pWV05, RepA, 시스템 BetL.

[0079] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 AIP 폴리펩티드 또는 펩티드를 포함하는 국소 조성물을 제공한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 국소 조성물은 서열번호: 10의 공통 서열, 또는 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하고 (i) 각질형성세포의 프로테아제 생성 및/또는 프로테아제 활성을 억제, (ii) 각질형성세포의 IL-6 생성 및/또는 활성을 억제, (iii) 스태필로코커스 아우레우스(*S. 아우레우스*)로부터 페놀 가용성 모듈린 알파 3의 생성을 억제 및/또는(iv) *S. 아우레우스*에 의한 agr 생성 및/또는 활성을 억제하는 정제된 폴리펩티드(예를 들어, AIP 펩티드)를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 국소 조성물은 화학식 I, IA, 또는 IB의 화합물(상기 정의된 바와 같음)을 포함한다.

[0080] 또 다른 실시양태에서, 국소 조성물은 비-병원성 미생물(병원성 활성을 감소시키거나 제거하도록 조작된 약독화 미생물 포함)을 포함할 수 있으며, 여기서 미생물은 AIP 폴리펩티드를 발현하도록 조작되었다. 미생물은 벡터 및/또는 AIP 폴리뉴클레오티드를 함유하도록 조작될 수 있다. 한 실시양태에서, 미생물은 화학식 I, IA 및/또는 IB의 화합물을 생성한다.

[0081] 한 실시양태에서, 본 명세서의 조성물 및 방법은 박테리아를 본 개시내용의 AIP 폴리뉴클레오티드로 형질전환시킴으로써, 화학식 I, IA 및/또는 IB의 화합물을 생성하도록 조작된 비-병원성 박테리아를 사용한다. 한 실시양태에서, 집단의 박테리아는 비-병원성 및 비-침습성 미생물이고, 특정 실시양태에서 그람-양성 식품 등급의 박테리아 균주일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 형질전환된 박테리아의 집단은 피부 마이크로바이옴에서 자연적으로 발생하는 박테리아로부터 제조된다.

[0082] 특정 실시양태에서, 조성물에서 박테리아의 집단을 형성하고, 화학식 I, IA 및/또는 IB의 화합물을 발현하도록 형질전환된 박테리아는 상이한 계통발생 수준에서, 동일한 박테리아 또는 상이한 박테리아의 혼합물의 무리(collection)일 수 있다. 건강한 인간의 피부 상에 상주하는 박테리아는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속

및 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*) 속의 박테리아를 포함하여 악티노박테리아(*Actinobacteria*)와 같이 인간의 얼굴에 전형적으로 상주하는 박테리아 종을 포함한다. 다른 실시양태에서, 건강한 인간 대상체의 피부 상에 상주하는 박테리아는 예를 들어 박테로이데테스(*Bacteroidetes*) 및 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 속의 박테리아를 포함하여, 얼굴 이외의 피부 상에 전형적으로 상주하는 박테리아 종을 포함한다. 피부 마이크로바이옴에서의 다른 박테리아는 하기 본 명세서에 열거된 것들을 포함한다.

[0083]

한 실시양태에서, 박테리아는 프로피오박테리움 액시디파시엔스(*Propionibacterium acidifaciens*), 프로피오박테리움 액시디프로피오니시(*Propionibacterium acidipropionici*), 프로피오박테리움 액시디프로피오니시(*Propionibacterium acidipropionici*) 균주 4900, 프로피오박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*), 프로피오박테리움 아우스트랄리엔스(*Propionibacterium australiense*), 프로피오박테리움 아비둠(*Propionibacterium avidum*), 프로피오박테리움 시클로헥사니쿰(*Propionibacterium cyclohexanicum*), 프로피오박테리움 프레우텐레이키이 아종 프레우텐레이키이(*Propionibacterium freudenreichii subsp. Freudenreichii*), P. 프레우텐레이키이 아종 프레우텐레이키이(*P. freudenreichii ssp. freudenreichii*) 균주 20271, 프로피오박테리움 프레우텐레이키이 아종 셔마니이(*Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermanii*), P. 프레우텐레이키이 아종 셔마니이(*P. freudenreichii ssp. shermanii*) 균주 4902, P. 프레우텐레이키이 아종 셔마니이(*P. freudenreichii ssp. shermanii*) 균주 4902, 프로피오박테리움 그라놀로숨(*Propionibacterium granulosum*), 프로피오박테리움 이노쿠움(*Propionibacterium innocuum*), P. 젠세니이(*P. jensenii*) 균주 20278, 프로피오박테리움 림포필룸(*Propionibacterium lymphophilum*), 프로피오박테리움 마이크로에로필룸(*Propionibacterium microaerophilum*), 프로피오박테리움 프로피오니쿰(*Propionibacterium propionicum*), 프로피오박테리움 토에니이(*Propionibacterium thoenii*), 및 P. 토에니이(*P. thoenii*) 균주 20277을 포함하나 이에 제한되지는 않는 프로피오박테리움 속으로부터 비롯된다. 한 실시양태에서, 박테리아는 프로피오박테리움 아크네스가 아니다. 한 실시양태에서, 박테리아는 C. 액콜렌스(*C. accolens*), C. 아페르멘탄(*C. afermentan*), C. 아미콜라툼(*C. amycolatium*), 코리네박테리움 아르젠토라텐스(*C. argentoratense*), 코리네박테리움 아쿠아티쿰(*C. aquaticum*), 코리네박테리움 아우리스(*C. auris*), 코리네박테리움 보비스(*C. bovis*), 코리네박테리움 디프테리아(*C. diphtheria*), C. 에퀴(*C. equi*)(현재 로도코커스 에퀴(*Rhodococcus equi*)), C. 플라베센스(*C. flavescens*), C. 글루쿠로놀라이티쿰(*C. glucuronolyticum*), C. 글루타미쿰(*C. glutamicum*), C. 그라놀로숨(*C. granulosum*), C. 헤몰라이티쿰(*C. haemolyticum*), C. 할로피티카(*C. halofytica*), C. 제이케이움(*C. jeikeium*)(균 JK), C. 맥긴레이(*C. macginleyi*), C. 마트루초티이(*C. matruchotii*), C. 미누티시뭉(*C. minutissimum*), C. 파르븀(*C. parvum*)(프로피오니박테리움 아크네스), C. 프로핀쿠움(*C. propinquum*), C. 슈도디프테리티쿰(*C. pseudodiphtheriticum*)(C. 호프만니이(*C. hofmannii*)), C. 슈도투베르쿨로시스(*C. pseudotuberculosis*)(C. 오비스(*C. ovis*)), C. 피오게네스(*C. pyogenes*), C. 우레아라이티쿰(*C. urealyticum*)(균 D2), C. 레날레(*C. renale*), C. 스펙(*C. spec*), C. 스트리아툼(*C. striatum*), C. 테누이스(*C. tenuis*), C. 울세란스(*C. ulcerans*), C. 우레아라이티쿰(*C. urealyticum*) 및 C. 크세로시스(*C. xerosis*)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 코리네박테리움 속으로부터 비롯된다. 친지성 기 및 비친지성 기를 가진 박테리아가 고려되고, 비친지성 박테리아는 발효 코리네박테리아 및 비발효 코리네박테리아를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 박테리아는 C. 디프테리아, C. 아미콜라툼, C. 스트리아툼, C. 제이케이움, C. 우레아라이티쿰, C. 크세로시스, 슈도투베르쿨로시스, C. 테누이스, C. 스트리아툼 또는 C. 미누티시뭉이 아니며, 그 이유는 이들이 병원성일 수 있기 때문이다. 한 실시양태에서, 박테리아는 GRAS 박테리아 종 아르트로박테르 아릴라이텐시스(*Arthrobacter arilaitensis*), 아르트로박테르 베르케레이(*Arthrobacter bergerei*), 아르트로박테르 글로비포르미스(*Arthrobacter globiformis*), 아르트로박테르 니코티아나에(*Arthrobacter nicotianae*), 코쿠리아 리조필라(*Kocuria rhizophila*), 코쿠리아 바리안스(*Kocuria varians*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 마이크로코커스 릴라에(*Micrococcus lylae*), 마이크로박테리움 구베에넨스(*Microbacterium gubbeenense*), 브레비박테리움 아우란티아쿰(*Brevibacterium aurantiacum*), 브레비박테리움 카세이(*Brevibacterium casei*), 브레비박테리움 리넨스(*Brevibacterium linens*), 브라키박테리움 알리멘타리움(*Brachybacterium alimentarium*) 및 브라키박테리움 티로페르멘탄스(*Brachybacterium tyrofermentans*)를 포함하나 이에 제한되지 않는 마이크로코시네아에(*Micrococcineae*) 하위목으로부터 비롯된다. 또 다른 실시양태에서, 박테리아는 스태필로코커스 아그네티스(*Staphylococcus agnetis*), S. 아를레타(*S. arlettae*), S. 아우리쿨라리스(*S. auricularis*), S. 캐피티스(*S. capitis*), S. 카프라에(*S. caprae*), S. 카르노수스(*S. carnosus*), 스태필로코커스 카세올리티쿠스(*Staphylococcus caseolyticus*), S. 크로모게네스(*S. chromogenes*), S. 코니이(*S. cohnii*), S. 콘디멘트(*S. condiment*), S. 델피니(*S. delphini*), S. 데브리예세이(*S. devriesei*), S. 에쿠오룸(*S. equorum*), S. 펠리스(*S. felis*), S. 플레우레티이(*S. fleurettii*), S. 갈리나룸(*S. gallinarum*), S. 헤몰

리터쿠스(*S. haemolyticus*), *S. 호미니스*(*S. hominis*), *S. 하이커스*(*S. hyicus*), *S. 인터메디우스*(*S. intermedius*), *S. 클로오시이*(*S. kloosii*), *S. 레에이*(*S. leei*), *S. 렌투스*(*S. lentus*), *S. 루그두넨시스*(*S. lugdunensis*), *S. 루트라에*(*S. lutrae*), *S. 마실리엔시스*(*S. massiliensis*), *S. 마이크로티*(*S. microti*), *S. 무스카에*(*S. muscae*), *S. 네팔렌시스*(*S. nepalensis*), *S. 파스퇴리*(*S. pasteurii*), *S. 페텐코페리*(*S. pettenkoferi*), *S. 피스시페르멘탄스*(*S. piscifermentans*), *S. 슈덴테르메디우스*(*S. pseudintermedius*), *S. 슈도러그두넨시스*(*S. pseudolugdunensis*), *S. 풀베레리*(*S. pulvereri*), *S. 로스트라*(*S. rostra*), *S. 사카로리티쿠스*(*S. saccharolyticus*), *S. 사프로파이티커스*(*S. saprophyticus*), *S. 슬레이페리*(*S. schleiferi*), *S. 스시우리*(*S. sciuri*), *S. 시미아에*(*S. simiae*), *S. 시물란스*(*S. simulans*), *S. 스테파노비치이*(*S. stepanovicii*), *S. 석시누스*(*S. succinus*), *S. 비틀리누스*(*S. vitulinus*), *S. 와르네리*(*S. warneri*) 및 *S. 자일로서스*(*S. xylosus*)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 스타필로코커스 속으로부터 비롯된다. 한 실시양태에서, 박테리아는 *S. 아우레우스* 또는 *S. 에피데미디스*가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 박테리아는 스트렙토코커스 역시도 미니무스(*Streptococcus acidominimus*), 스트렙토코커스 아드자센스(*Streptococcus adjacens*), 스트렙토코커스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 알락토리티커스(*Streptococcus alactolyticus*), 스트렙토코커스 안기노서스(*Streptococcus anginosus*), 스트렙토코커스 아우스트랄리스(*Streptococcus australis*), 스트렙토코커스 보비스(*Streptococcus bovis*), 스트렙토코커스 카발리(*Streptococcus caballi*), 스트렙토코커스 캐니스(*Streptococcus canis*), 스트렙토코커스 카프리누스(*Streptococcus caprinus*), 스트렙토코커스 카스토레우스(*Streptococcus castoreus*), 스트렙토코커스 세코룸(*Streptococcus cecorum*), 스트렙토코커스 콘스텔라투스(*Streptococcus constellatus*), 스트렙토코커스 콘스텔라투스 아종 콘스텔라투스(*Constellatus*), 스트렙토코커스 콘스텔라투스 아종 파린기스(*Pharyngis*), 스트렙토코커스 크레모리스(*Streptococcus cremoris*), 스트렙토코커스 크리세티(*Streptococcus criceti*), 스트렙토코커스 크리스타투스(*Streptococcus cristatus*), 스트렙토코커스 다니엘리아에(*Streptococcus danieliae*), 스트렙토코커스 데펙티브스(*Streptococcus defectives*), 스트렙토코커스 덴타프리(*Streptococcus dentapri*), 스트렙토코커스 덴티로우세티(*Streptococcus dentirousetti*), 스트렙토코커스 디델피스(*Streptococcus didelphis*), 스트렙토코커스 디피실리스(*Streptococcus difficilis*), 스트렙토코커스 두란스(*Streptococcus durans*), 스트렙토코커스 디스갈락티아에(*Streptococcus dysgalactiae*), 스트렙토코커스 디스갈락티아에 아종 디스갈락티아에(*Streptococcus dysgalactiae subsp. Dysgalactiae*), 스트렙토코커스 디스갈락티아에 아종 에퀴시밀리스(*Streptococcus equi subsp. Equisimilis*), 스트렙토코커스 엔테리커스(*Streptococcus entericus*), 스트렙토코커스 에퀴(*Streptococcus equi*), 스트렙토코커스 에퀴 아종 에퀴(*Streptococcus equi subsp. Equi*), 스트렙토코커스 에퀴 아종 루미나토룸(*Ruminatorum*), 스트렙토코커스 에퀴 아종 주에피데미커스(*Zooepidemicus*), 스트렙토코커스 에퀴네스(*Streptococcus equines*), 스트렙토코커스 페칼리스(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코커스 페시움(*Streptococcus faecium*), 스트렙토코커스 페루스(*Streptococcus ferus*), 스트렙토코커스 갈리나세우스(*Streptococcus gallinaceus*), 스트렙토코커스 갈로리티커스(*Streptococcus gallolyticus*), 스트렙토코커스 갈로리티커스 아종 갈로리티커스(*Streptococcus gallolyticus subsp. Gallolyticus*), 스트렙토코커스 갈로리티커스 아종 마세도니커스(*Macedonicus*), 스트렙토코커스 갈로리티커스 아종 파스퇴리아누스(*Pasteurianus*), 스트렙토코커스 가르비에아에(*Streptococcus garvieae*), 스트렙토코커스 고르도니아(*Streptococcus gordonii*), 스트렙토코커스 할리코에리(*Streptococcus halichoeri*), 스트렙토코커스 한세니아(*Streptococcus hansenii*), 스트렙토코커스 헨라이(*Streptococcus henryi*), 스트렙토코커스 히요인테스티날리스(*Streptococcus hyointestinalis*), 스트렙토코커스 히요바기날리스(*Streptococcus hyovaginalis*), 스트렙토코커스 익탈루리(*Streptococcus ictaluri*), 스트렙토코커스 인판타리우스(*Streptococcus infantarius*), 스트렙토코커스 인판타리우스 아종 콜라이(*Streptococcus infantarius subsp. Coli*), 스트렙토코커스 인판타리우스 아종 인판타리우스(*Infantarius*), 스트렙토코커스 인판티스(*Streptococcus infantis*), 스트렙토코커스 이니아에(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 인터메디우스(*Streptococcus intermedius*), 스트렙토코커스 인테스티날리스(*Streptococcus intestinalis*), 스트렙토코커스 락타리우스(*Streptococcus lactarius*), 스트렙토코커스 락티스(*Streptococcus lactis*), 스트렙토코커스 락티스 아종 크레모리스(*Streptococcus lactis subsp. Cremoris*), 스트렙토코커스 락티스 아종 디아세틸락티스(*Diacetilactis*), 스트렙토코커스 락티스 아종 락티스(*Lactis*), 스트렙토코커스 루테티엔시스(*Streptococcus lutetiensis*), 스트렙토코커스 마카카에(*Streptococcus macacae*), 스트렙토코커스 마세도니커스(*Streptococcus macedonicus*), 스트렙토코커스 마리맘말리움(*Streptococcus marimammalium*), 스트렙토코커스 마실리엔시스(*Streptococcus massiliensis*), 스트렙토코커스 메리오니스(*Streptococcus merionis*), 스트렙토코커스 마이너(*Streptococcus minor*), 스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*), 스트렙토코커스 모르빌로룸(*Streptococcus morbillorum*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 올리고페르멘탄스(*Streptococcus oligofermentans*), 스트렙토코커스

오랄리스(*Streptococcus oralis*), 스트렙토코커스 오리사라티(*Streptococcus orisratti*), 스트렙토코커스 오비스(*Streptococcus ovis*), 스트렙토코커스 파라산귀니스(*Streptococcus parasanguinis*), 스트렙토코커스 파라우베리스(*Streptococcus parauberis*), 스트렙토코커스 파르블루스(*Streptococcus parvulus*), 스트렙토코커스 파스퇴리아누스(*Streptococcus pasteurianus*), 스트렙토코커스 페로리스(*Streptococcus peroris*), 스트렙토코커스 포카에(*Streptococcus phocae*), 스트렙토코커스 플란타룸(*Streptococcus plantarum*), 스트렙토코커스 플레오모르푸스(*Streptococcus pleomorphus*), 스트렙토코커스 플루라니말리움(*Streptococcus pluranimalium*), 스트렙토코커스 플루렉스토룸(*Streptococcus plurextorum*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 스트렙토코커스 포르시(*Streptococcus porci*), 스트렙토코커스 포르시누스(*Streptococcus porcicus*), 스트렙토코커스 포르코룸(*Streptococcus porcorum*), 스트렙토코커스 슈도뉴모니아에(*Streptococcus pseudopneumoniae*), 스트렙토코커스 슈도포르시누스(*Streptococcus pseudoporcinus*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 라피놀락티스(*Streptococcus raffinolactis*), 스트렙토코커스 라티(*Streptococcus ratti*), 스트렙토코커스 루피카프라에(*Streptococcus rupicaprae*), 스트렙토코커스 사카로리티커스(*Streptococcus saccharolyticus*), 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*), 스트렙토코커스 살리바리우스 아종 살리바리우스(*Streptococcus salivarius subsp. Salivarius*), 스트렙토코커스 살리바리우스 아종 썬모필루스(*Thermophilus*), 스트렙토코커스 산귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코커스 실로이(*Streptococcus shiloi*), 스트렙토코커스 시넨시스(*Streptococcus sinensis*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스 수이스(*Streptococcus suis*), 스트렙토코커스 썬모필루스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 토랄텐시스(*Streptococcus thoralensis*), 스트렙토코커스 티구리누스(*Streptococcus tigurinus*), 스트렙토코커스 트로글로디타에(*Streptococcus troglodytae*), 스트렙토코커스 트로글로다이티디스(*Streptococcus troglodytidis*), 스트렙토코커스 우베리스(*Streptococcus uberis*), 스트렙토코커스 우리날리스(*Streptococcus urinalis*), 스트렙토코커스 베스티볼라리스(*Streptococcus vestibularis*) 및 스트렙토코커스 와이우스(*Streptococcus waius*)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 스트렙토코커스 속으로부터 비롯된다. 또 다른 실시양태에서, 박테리아는 락토코커스 가르비아에(*Lactococcus garvieae*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 락토코커스 락티스 아종 크레모리스(*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), 락토코커스 락티스 아종 호르드니아에(*hordniae*), 락토코커스 락티스, 락토코커스 락티스 아종 락티스(*Lactis*), 락토코커스 피스시움(*Lactococcus piscium*), 락토코커스 플란타룸(*Lactococcus plantarum*), 락토코커스 라피놀락티스(*Lactococcus raffinolactis*), 락토바실러스 아세토톨레란스(*Lactobacillus acetotolerans*), 락토바실러스 액시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 아길리스(*Lactobacillus agilis*), 락토바실러스 알기두스(*Lactobacillus algidus*), 락토바실러스 알리멘타리우스(*Lactobacillus alimentarius*), 락토바실러스 아밀로리티커스(*Lactobacillus amylolyticus*), 락토바실러스 아밀로필루스(*Lactobacillus amylophilus*), 락토바실러스 아밀로보루스(*Lactobacillus amylovorus*), 락토바실러스 애니말리스(*Lactobacillus animalis*), 락토바실러스 아비아리우스(*Lactobacillus aviarius*), 락토바실러스 아비아리우스 아종 아라피노서스(*Lactobacillus aviarius subsp. araffinosus*), 락토바실러스 아비아리우스 아종 아비아리우스(*aviarius*), 락토바실러스 바바리커스(*Lactobacillus bavaricus*), 락토바실러스 비페르멘탄스(*Lactobacillus bif fermentans*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*), 락토바실러스 불가리커스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 카르니스(*Lactobacillus carnis*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 카세이 아종 알락토서스(*Lactobacillus casei subsp. alactosus*), 락토바실러스 카세이 아종 카세이(*casei*), 락토바실러스 카세이 아종 슈도플란타룸(*pseudoplantarum*), 락토바실러스 카세이 아종 람노서스(*rhamnosus*), 락토바실러스 카세이 아종 톨레란스(*tolerans*), 락토바실러스 카테나포르미스(*Lactobacillus catenaformis*), 락토바실러스 셀로바이오서스(*Lactobacillus cellobiosus*), 락토바실러스 콜리노이데스(*Lactobacillus collinoides*), 락토바실러스 콘푸서스(*Lactobacillus confusus*), 락토바실러스 코리니포르미스(*Lactobacillus coryniformis*), 락토바실러스 코리니포르미스 아종 코르니포르미스(*Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis*), 락토바실러스 코리니포르미스 아종 토르쿠엔스(*torquens*), 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*), 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*), 락토바실러스 쿠르바투스 아종 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus subsp. curvatus*), 락토바실러스 쿠르바투스 아종 멜리바이오서스(*melibiosus*), 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 델브루엑키 아종 불가리커스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 아종 델브루엑키(*delbrueckii*), 락토바실러스 델브루엑키 아종 락티스(*lactis*), 락토바실러스 디베르겐스(*Lactobacillus divergens*), 락토바실러스 파르시미니스(*Lactobacillus farciminis*), 락토바실러스 페르멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 포르미칼리스(*Lactobacillus formicalis*), 락토바실러스 프럭티보란스(*Lactobacillus fructivorans*), 락토바실러스 프럭토서스

(*Lactobacillus fructosus*), 락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasserii*), 락토바실러스 그라미니스(*Lactobacillus graminis*), 락토바실러스 할로톨레란스(*Lactobacillus halotolerans*), 락토바실러스 햄스테리(*Lactobacillus hamsteri*), 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 헤테로히오키이(*Lactobacillus heterohiochii*), 락토바실러스 힐가르디이(*Lactobacillus hilgardii*), 락토바실러스 호모히오키이(*Lactobacillus homohiochii*), 락토바실러스 이네르스(*Lactobacillus iners*), 락토바실러스 인테스티날리스(*Lactobacillus intestinalis*), 락토바실러스 젠세니이(*Lactobacillus jensenii*), 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 칸들레리(*Lactobacillus kandleri*), 락토바실러스 케피리(*Lactobacillus kefirii*), 락토바실러스 케푸라노파시엔스(*Lactobacillus kefiranoferiensis*), 락토바실러스 케피르그라눔(*Lactobacillus kefirgranum*), 락토바실러스 쿤케이이(*Lactobacillus kunkeei*), 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*), 락토바실러스 레이크만니이(*Lactobacillus leichmannii*), 락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*), 락토바실러스 말레페르멘탄스(*Lactobacillus malefermentans*), 락토바실러스 말리(*Lactobacillus mali*), 락토바실러스 말타로미커스(*Lactobacillus maltaromicus*), 락토바실러스 만니호티보란스(*Lactobacillus manihotivorans*), 락토바실러스 마이너(*Lactobacillus minor*), 락토바실러스 미누투스(*Lactobacillus minutus*), 락토바실러스 무코사에(*Lactobacillus mucosae*), 락토바실러스 무리누스(*Lactobacillus murinus*), 락토바실러스 나겔리이(*Lactobacillus nagelii*), 락토바실러스 오리스(*Lactobacillus oris*), 락토바실러스 파니스(*Lactobacillus panis*), 락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*), 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 파라카세이 아종 파라카세이(*Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*), 락토바실러스 파라카세이 아종 톨레란스(*tolerans*), 락토바실러스 파라케피리(*Lactobacillus parakefirii*), 락토바실러스 파라리멘타리우스(*Lactobacillus paralimentarius*), 락토바실러스 파라플란타룸(*Lactobacillus paraplanatarum*), 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 페롤렌스(*Lactobacillus perolens*), 락토바실러스 피스시콜라(*Lactobacillus piscicola*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 폰티스(*Lactobacillus pontis*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 람노서스 균주 5/E5a, 락토바실러스 리마에(*Lactobacillus rimae*), 락토바실러스 로고사에(*Lactobacillus rogosae*), 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 사케이 아종 카모서스(*Lactobacillus sakei subsp. camosus*), 락토바실러스 사케이 아종 사케이(*sakei*), 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*), 락토바실러스 살리바리우스 아종 살리시니우스(*Lactobacillus salivarius subsp. salicinii*), 락토바실러스 살리바리우스 아종 살리바리우스(*salivarius*), 락토바실러스 산프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*), 락토바실러스 샤프페아에(*Lactobacillus sharpeae*), 락토바실러스 수에비커스(*Lactobacillus suebicus*), 락토바실러스 트리코데스(*Lactobacillus trichodes*), 락토바실러스 울리(*Lactobacillus ulii*), 락토바실러스 백신노스테르커스(*Lactobacillus vaccinostercus*), 락토바실러스 바기날리스(*Lactobacillus vaginalis*), 락토바실러스 비리데센스(*Lactobacillus viridescens*), 락토바실러스 비툴리누스(*Lactobacillus vitulinus*), 락토바실러스 자일로서스(*Lactobacillus xylosus*), 락토바실러스 야마나쉬엔시스(*Lactobacillus yamanashiensis*), 락토바실러스 야마나쉬엔시스 아종 말리(*Lactobacillus yamanashiensis subsp. mali*), 락토바실러스 야마나쉬엔시스 아종 야마나쉬엔시스(*Yamanashiensis*) 및 락토바실러스 제아에(*Lactobacillus zaei*)를 포함하나 이에 제한되지 않는 락토바실러스 속으로부터 비롯된다. 또 다른 실시양태에서, 박테리아는 락토코커스 슬레이페르(*Lactococcus Schleifer*), 락토코커스 춘강젠시스(*Lactococcus chungangensis*), 락토코커스 푸지엔시스(*Lactococcus fujiensis*), 락토코커스 가르비아에, 락토코커스 락티스, 락토코커스 락티스 아종 크레모리스, 락토코커스 락티스 아종 호르드니아에, 락토코커스 락티스 아종 락티스, 락토코커스 락티스 아종 트룩타에(*Tructae*), 락토코커스 플란타룸, 및 락토코커스 라피놀락티를 포함하나 이에 제한되지 않는 락토코커스 속으로부터 유래된다.

[0084] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 CoNS 공생 피부 박테리아를 포함하는 국소 전달용 프로바이오틱 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, CoNS 박테리아는 AIP 폴리펩티드 및/또는 화학식 I의 화합물을 생성하는 박테리아를 포함한다. 추가 실시양태에서, 국소 조성물은 AIP 폴리펩티드 또는 화학식 I의 화합물을 생성하는 단일 종의 미생물만을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 공생 피부 박테리아는 S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5, 및 S. 와르네리 G2로 이루어진 군으로부터 선택된 미생물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 국소 프로바이오틱 조성물은 S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5, S. 와르네리 G2, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공생 피부 박테리아를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다.

- [0085] 본 개시내용의 공생 박테리아는 인간 피부로부터 단리될 수 있고 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은, 예를 들어, 폼 팁 면봉(foam tip swab)을 사용하여 인간 피부 표면을 면봉으로 닦음으로써 본 명세서에 기재된 공생 박테리아를 수득, 확인 및 배양하는 방법을 제공한다. 면봉을 트립신 소이 브로쓰(tryptic soy broth)에 넣는다. 브로쓰를 3% 난황이 보충된 만니톨 염 한천 플레이트(MSA) 상으로 희석시킨다. 코아굴라제-음성 스타필로코커스(CoNS) 균주를 나타내는 헤일로(halo)가 없는 핑크 콜로니는 25 부피%의 멸균-여과된 상청액을 신선한 TSB 중에서 성장시킨 *S. 아우레우스 agr* 유형 I YFP 리포터 균주에 첨가하기 전에 트립신 소이 브로쓰(TSB)에서 수집하고 성장시킨다(24시간 인큐베이션 후 *S. 아우레우스 agr* 활성 억제의 측정을 위해). *S. 아우레우스* 리포터 균주의 Agr 활성은 형광계를 사용하여 측정된다. *S. 아우레우스 agr* 활성의 강한 억제를 가진 균주는 gDNA 단리 및 서열분석에 의해 추가로 특성화된다. gDNA는 임의의 수의 시판되는 키트(예를 들어, 디엔이지 울트라클린 마이크로바이알 키트(DNeasy UltraClean Microbial Kit), 퀴아젠(Qiagen))을 사용하여 단리된다. gDNA는 다양한 서열 플랫폼(예를 들어, MiSeq; 일루미나 인크.(Illumina Inc.), 캘리포니아주 샌디에이고)을 사용하여 2 사이클 동안 서열분석될 수 있으며, 이는 2x 250 bp 쌍형성-말단(paired-end) 관독을 생성할 수 있다. 어댑터는 cutadapt를 사용하여 제거된다(예를 들어, cutadapt.readthedocs.io/en/stable/의 월드 와이드 웹을 참조한다). 디폴트 파라미터를 가진 트림 갈로어(Trim Galore)(예를 들어, bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\_galore/의 월드 와이드 웹을 참조한다)를 사용하여 품질이 낮은 서열을 제거할 수 있다. 인간 게놈에 대한 서열 맵핑은 인간 참조 게놈 hg19 및 파라미터(-D20-R3-N1-L20- 매우 민감한-로컬)를 가진 보우티(Bowtie)2 프로그램(ver. 2.28)(*I*)을 사용하여 품질이 트리밍된(quality-trimmed) 데이터셋으로부터 제거된다. 필터링된 관독 값은 33-127 범위의 k-mer 길이를 가진 SPAdes(버전 3.8.0)를 사용하여 새로 어셈블리된다. 게놈은 디폴트 파라미터를 가진 서브시스템 기술(subsystems technology)(RASY)을 사용하여 미생물 게놈의 신속한 주석으로 주석이 달린다. 주석이 달린 CDS로부터의 아미노산 서열(코딩 DNA 서열)은 유니프로트(Uniprot) 데이터베이스로부터 수득된 박테리아성 agr 단백질에 정렬된다. 어셈블리된 게놈으로부터의 Agr 유전자는 하기 3 가지 기준에 따라 식별된다:(i) 서열 동일성 >60%, (ii) e-값 <e100; 및 (iii) agr 유전자자리 조직화(locus organization), 4개의 유전자의 오픈론, agrBDCA. 서열번호: 1 또는 3의 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 가진 미생물이 본 개시내용의 방법 및 조성물에서 유용하다.
- [0086] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "프로바이오틱 조성물" 또는 "국소 프로바이오틱 조성물" 또는 "프로바이오틱 피부 조성물"은 프로바이오틱 공생 피부 박테리아, 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물, AIP 폴리펩티드를 발현하는 약독화 또는 조작된 미생물 및 (i) 프로테아제 활성을 억제하거나(ii) 프로테아제 활성을 촉진하는 작용제, 및 공생 피부 박테리아의 생존력을 유지하는 제약 담체를 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0087] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "국소"는 국소 프로바이오틱 조성물이 피부와 직접 접촉하도록 얇은 주사(예를 들어, 피부내 및 병변내) 뿐만 아니라, 피부 외부로의 투여를 포함할 수 있다.
- [0088] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "발효 추출물"은 배양물 중에서 및 적절한 발효 조건 하에 프로바이오틱 공생 피부 박테리아를 발효시키는 생성물을 의미한다. 예를 들어, *S. 아우레우스* 배양은 피부 장벽 투과성을 증가시키는 데 유용한 PSM α3을 생성할 수 있다. *S. 아우레우스*로부터의 추출물은, 피부에 적용되어 투과성을 개선하고, 피부 재형성을 유도하거나, 약물 전달을 위한 피부 장벽 투과성을 촉진할 수 있는 PSM α3을 함유한다. 유사하게, 본 개시내용의 AIP를 생성하는 CoNS 박테리아의 발효 추출물이 배양될 수 있고, 이러한 배양으로부터의 추출물은 *S. 아우레우스* 연관 병리(예를 들어, 프로테아제 활성, 피부염 등)를 억제하는 데 사용된다.
- [0089] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "프로바이오틱 공생 피부 박테리아"는 피부 마이크로바이옴의 미생물을 포함한다. 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 프로테아제 활성을 촉진하는 박테리아("프로테아제 촉진 프로바이오틱 공생 피부 박테리아")의 조성물을 포함할 수 있다. 프로테아제 촉진 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 전형적으로 페놀 가용성 모듈 알파 3(PSM α3)을 생성하는 피부의 박테리아이다. 프로테아제 촉진 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 조성물(또는 그의 발효 추출물)은, 예를 들어, 피부 재형성, 상처 치유, 노화, 일광 손상, 색소 이상 및 흉터형성을 촉진하는 데 유용하다. 한 실시양태에서, 프로테아제 촉진 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 세린 프로테아제 활성을 갖고/거나 피부의 세린 프로테아제 활성을 유도하는 하나 이상의 박테리아를 포함한다. 예를 들어, 프로테아제 촉진 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 페놀 가용성 모듈 알파 3(PSM α3)을 생성하는 *S. 아우레우스* 균주를 포함할 수 있다.
- [0090] 또 다른 실시양태에서, 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 프로테아제 활성을 억제하는 박테리아("프로바이오틱 공생 피부 박테리아를 억제하는 프로테아제")의 조성물을 포함할 수 있다. 프로테아제 억제 프로바이오틱

공생 피부 박테리아 조성물은 질환 예컨대 주사, 아토피성 피부염 및 네덜튼 증후군을 치료하는 데 유용하다. 한 실시양태에서, 프로바이오틱 억제 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 피부의 다른 박테리아의 세린 프로테아제 활성을 억제하고/거나 피부의 세린 프로테아제 활성을 억제하는 하나 이상의 박테리아를 포함한다. 예를 들어, 프로테아제 억제 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 코아굴라제 음성 스타필로코커스 종을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 코아굴라제 음성 균주는 스타필로코커스 에피더미디스, 스타필로코커스 캐피티스, 스타필로코커스 카프라이에, 스타필로코커스 사카로리티쿠스, 스타필로코커스 와르네리, 스타필로코커스 파스티리, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스, 스타필로코커스 데브리에세이, 스타필로코커스 호미니스, 스타필로코커스 제텐시스, 스타필로코커스 페트라시이, 및 스타필로코커스 리그두넨시스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 프로테아제 억제 공생 피부 박테리아는 S. 에피더미디스 균주, S. 호미니스 균주, S. 와르네리 균주 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 실시양태에서, S. 에피더미디스 균주는 S. 에피더미디스 14990 및/또는 S. 에피더미디스 A11이다. 또 다른 실시양태에서, S. 호미니스 균주는 S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5, 및/또는 S. 호미니스 A9이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, S. 와르네리 균주는 S. 와르네리 G2이다. 한 실시양태에서, CoNS 박테리아는 AIP 폴리펩티드 및/또는 화학식 I의 화합물을 생성하는 박테리아를 포함한다. 추가 실시양태에서, 국소 조성물은 AIP 폴리펩티드 또는 화학식 I의 화합물을 생성하는 단일 종의 미생물만을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 공생 피부 박테리아는 S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5, 및 S. 와르네리 G2로 이루어진 군으로부터 선택된 미생물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 국소 프로바이오틱 조성물은 S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5, S. 와르네리 G2, 및 전술한 것의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공생 피부 박테리아를 포함하거나 그로 이루어질 수 있다

[0091] 용어 "접촉하는"은 피부를 국소 프로바이오틱 조성물에 노출시켜 프로바이오틱 피부 조성물이 피부상의 프로테아제 활성(예를 들어, 세린 프로테아제 활성)을 조정할 수 있도록 하는 것을 지칭한다.

[0092] 용어 "억제하는" 또는 "억제 유효량"은 예를 들어, 피부 상에 또는 피부 배양물 중에서 프로테아제 활성(예를 들어, 세린 프로테아제 활성)의 억제를 야기하기에 충분한, 하나 이상의 프로바이오틱 미생물 및/또는 발효 배지 또는 추출물 및/또는 발효 부산물 및/또는 합성 분자로 이루어진 프로바이오틱 피부 조성물의 양을 지칭한다. 용어 "억제하는"은 또한 장애의 징후 또는 증상(예를 들어, 발진, 미란(sore) 등)을 예방 또는 개선하는 것을 포함한다.

[0093] 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체의 치료를 위해 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "치료 유효량"은 질환 또는 장애의 징후 또는 증상을 개선하기에 충분한 양의 프로바이오틱 피부 조성물 또는 그의 추출물을 의미한다. 예를 들어, 치료 유효량은 피부 미란의 중증도의 빈도를 측정함으로써 피부염 또는 발진의 대상체 증상을 감소시키기에 충분한 양으로서 측정될 수 있다. 전형적으로, 대상체는 질환 또는 장애의 증상을 적어도 50%, 90% 또는 100% 감소시키는 양으로 치료된다. 일반적으로, 최적의 투여량은 장애 및 대상체의 체중, 박테리아의 유형, 대상체의 성별, 및 증상의 정도와 같은 인자에 좌우될 것이다. 그럼에도 불구하고, 적합한 투여량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0094] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "정제된" 및 "실질적으로 정제된"은 생체내에서 생성된 작용제가 자연적으로 연관될 자연 환경에서 발견되는 다른 세포 또는 구성요소가 실질적으로 없는 미생물 또는 생물학적 작용제의 배양물, 또는 공동 배양물(예를 들어, 발효 배지 및 추출물, 분별 발효 배지, 발효 부산물, AIP 펩티드, 폴리펩티드, 유전자, 폴리뉴클레오티드, 화학식 I의 화합물 등)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 공동 배양 프로바이오틱은 복수개의 공생 피부 박테리아를 포함할 수 있다.

[0095] 본 개시내용은 S. 에피더미디스, S. 호미니스 및/또는 S. 와르네리의 실질적으로 균질한 제제를 포함하는 전세포 제제를 제공한다. 이러한 제제는 염증 및 미생물 감염의 치료를 위한 조성물의 제조에서 사용될 수 있다. 전세포 제제는 S. 에피더미디스, S. 호미니스 및/또는 S. 와르네리를 포함할 수 있거나 하기 기재된 바와 같이 비-병원성(예를 들어, 약독화된 미생물) 벡터를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 S. 아우레우스 활성으로부터 생긴 피부에서 프로테아제 활성을 감소시키는 작용제를 포함하는 이러한 전세포로부터 유래된 분획을 또한 제공한다.

[0096] 제2 박테리아 조성물의 프로테아제 활성을 억제하는 제1 박테리아 조성물의 능력은 제2 조성물을 제1 조성물과 접촉하기 전후에 제2 박테리아 조성물의 프로테아제 활성을 측정함으로써 접촉함으로써 결정될 수 있다. 본 개시내용의 국소 프로바이오틱 조성물과 유기체의 접촉은, 예를 들어, 박테리아의 프로테아제 억제 활성을 시험하기 위해 국소 프로바이오틱 조성물을 박테리아 배양액에 첨가함으로써 시험관내에서 일어날 수 있다. 대안적으

로, 접촉은, 예를 들어 국소 프로바이오틱 조성물을 피부 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체와 접촉시킴으로써 생체내에서 일어날 수 있다.

- [0097] 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 제제는 임의의 수의 방식으로 제조될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 여러 가지의 방법 중 임의의 것을 사용하여 국소 프로바이오틱 조성물을 대상체에게 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 프로바이오틱 피부 조성물 또는 추출물 또는 합성 제제는 국소 투여를 위해 제제화될 수 있다(예를 들어, 로션, 크림, 스프레이, 젤, 또는 연고). 이러한 국소 제제는 피부 상의 미생물, 진균, 바이러스 존재 또는 감염 또는 염증을 치료 또는 억제하는 데 유용하다. 제제의 예는 국소 로션, 크림, 비누, 와이프(wipe) 등을 포함한다.
- [0098] 또 다른 실시양태에서, 복수개의 프로바이오틱 공생 피부 박테리아를 포함하는 국소 프로바이오틱 조성물이 제공된다. 증가된 프로테아제(예를 들어, 세린 프로테아제) 활성과 연관된 피부염 또는 다른 피부 질환 또는 장애의 치료에 사용되는 경우, 조성물은 피부 상에서 프로테아제 활성을 억제하는 하나 이상의 박테리아를 포함한다. 이러한 경우에, 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 코아굴라제 음성 스타필로코커스 종이다. 한 실시양태에서, 프로바이오틱 공생 피부 박테리아는 S. 에피더미디스 균주, S. 호미니스 균주, S. 와르네리 균주 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된다. 증가된 프로테아제 활성이 요구되는 경우(예를 들어, 상처의 치료, 피부 재형성 등을 위해), 프로바이오틱 공생 박테리아 조성물은 프로테아제 활성을 증가시키거나 피부 프로테아제 활성(예를 들어, 세린 프로테아제 활성)을 자극하는 박테리아를 함유한다. 이 실시양태에서, 예시적인 공생 박테리아 조성물은 S. 아우레우스 박테리아 또는 PSM α3을 생성하는 병독성-약독화 S. 아우레우스를 포함할 것이다.
- [0099] 또 다른 실시양태에서, 국소 프로바이오틱 조성물은 피부 상의 프로테아제 활성을 촉진하는 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물을 포함한다. 다양한 측면에서, 추출물이 생성되는 박테리아는 스타필로코커스 아우레우스를 포함한다.
- [0100] 또 다른 실시양태에서, S. 아우레우스 발효 추출물 단독으로 또는 S. 아우레우스와 조합하여 본질적으로 이루어진 국소 프로바이오틱 조성물이 제공된다. 추가 측면에 따르면, 상기 국소 프로바이오틱 조성물은 로션, 웨이크 로션, 크림, 연고, 젤, 폼, 분말, 고체, 페이스트 또는 텅크로서 제제화될 수 있다.
- [0101] 또 다른 실시양태에서, 국소 프로바이오틱 조성물은 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물을 포함한다. 다양한 측면에서, 그로부터 추출물이 생성되는 박테리아는 코아굴라제 음성 스타필로코커스 종을 포함한다. 한 실시양태에서, 스타필로코커스 종은 피부 또는 피부의 마이크로바이옴에서 agr 퀴럼 센싱 시스템 및/또는 프로테아제 생성을 억제하는 AIP를 생성하는 S. 에피더미디스 균주, S. 호미니스 균주, S. 와르네리 균주 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, AIP는 서열번호: 10의 공통 서열 또는 agr 퀴럼 조정(quorum modulating) 활성을 갖는 서열번호: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17과 적어도 98% 동일한 서열 및/또는 화학식 I, IA 또는 IB의 화합물을 포함한다.
- [0102] 또 다른 실시양태에서, 코아굴라제 음성 스타필로코커스 종 발효 추출물 또는 S. 에피더미디스 발효 추출물 단독으로 또는 코아굴라제 음성 스타필로코커스 종 또는 S. 에피더미디스와 조합하여 본질적으로 이루어진 국소 프로바이오틱 조성물이 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 본 명세서에 기재된 하나 이상의 기탁된 미생물 균주(예를 들어, S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C5 및/또는 S. 와르네리 G2)를 포함한다.
- [0103] 추가 실시양태에 따르면, 상기 국소 프로바이오틱 조성물은 로션, 웨이크 로션, 크림, 연고, 젤, 폼, 분말, 고체, 페이스트 또는 텅크로 제제화될 수 있다.
- [0104] 또 다른 실시양태에서, S. 에피더미디스 균주, S. 호미니스 균주, S. 와르네리 균주 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 박테리아를 발효 조건 하에 발효시킴으로써 수득할 수 있는 발효 추출물이 제공된다. 다양한 측면에서, 이러한 발효 추출물은 피부 상에서 세린 프로테아제 활성을 억제하는 데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 발효 추출물은 본 명세서에 기재된 기탁된 미생물 균주(예를 들어, S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C5 및/또는 S. 와르네리 G2) 중 임의의 하나 이상으로부터 수득된다. 추가 실시양태에 따르면, 발효 추출물은 로션, 웨이크 로션, 크림, 연고, 젤, 폼, 분말, 고체, 페이스트 또는 텅크로서 제제화될 수 있다.
- [0105] 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 국소 프로바이오틱 조성물, 상기 기재된 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물, 상기 기재된 프로바이오틱 공생 피부 박테리아, 및 이의 임의의 조합을 포함하는 봉대 또는 드레

싱이 제공된다. 다양한 측면에서, 그의 주요 구성성분이 피부 상에 프로테아제 활성을 억제하는 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 다양한 측면에서, 그의 주요 구성성분이 피부 상에 프로테아제 활성을 억제하는 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다.

[0106] 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 국소 프로바이오틱 조성물, 상기 기재된 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물, 상기 기재된 프로바이오틱 공생 피부 박테리아, 및 그의 임의의 조합을 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 다양한 측면에서, 그의 주요 구성성분이 피부 상에 프로테아제 활성을 촉진하는 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 다양한 측면에서, 그의 주요 구성성분이 피부 상에 프로테아제 활성을 촉진하는 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다.

[0107] 본 개시내용은 프로테아제(예를 들어, 세린 프로테아제 활성)와 연관된 피부의 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 이러한 질환 또는 장애의 예는 네티튼 증후군, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 습진, 건선, 여드름, 표피 과다각화증, 가시세포증, 표피 염증, 진피 염증 및 소양증을 포함한다. 한 실시양태에서, 질환 또는 장애의 존재는 먼저 질환 또는 장애를 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터의 샘플(예를 들어, 피부 또는 피부로부터의 박테리아의 배양물)의 프로테아제 활성을 측정함으로써 결정된다. 샘플이 정상 프로테아제 활성(예를 들어, 세린 프로테아제 활성)보다 높은 것으로 나타난다면, 대상체의 피부를 제제와 접촉시킴으로써 프로테아제 억제성 공생 박테리아 제제로 처리된다. 또 다른 실시양태에서, 높은 프로테아제 활성을 갖고 박테리아를 포함하는 대상체로부터의 배양 물은 시험관내 제제와 접촉하여 제제에 대한 배양의 감수성 및 프로테아제 억제에 미치는 그의 영향을 결정한다.

[0108] 프로테아제 억제성 공생 박테리아 제제 또는 발효 추출물은 하나 이상의 공지된 세린 프로테아제 억제제와 조합될 수 있다. 본 개시내용의 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 다수의 상업적 및 임상적으로 관련된 세린 프로테아제 억제제가 있다. 예를 들어, 세린 프로테아제 억제제 예컨대, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,786,328, 미국 특허 번호 5,770,568, 또는 미국 특허 번호 5,464,820에 개시된 것들(그의 본 개시내용은 본 명세서에 참조로 포함됨). 예시적인 세린 프로테아제 억제제는 세린 프로테아제 폴리펩티드 또는 그의 기능적 단편에 결합하여 억제하는 항체, 세린 프로테아제 폴리펩티드를 불활성 펩티드로 분해하는 효소, 기질 유사체 등을 포함한다. 세린 프로테아제 발현 억제제는, 예를 들어, 세린 프로테아제 폴리뉴클레오티드(예를 들어, DNA 또는 RNA)의 전사 또는 번역을 감소시키는 안티센스 분자, 리보자임 및 소분자 작용제(예를 들어, 비타민 D 길항제)를 포함한다. 본 개시내용의 한 실시양태는 조직 칼리크레인의 기질 유사체에 관한 것이다. 이들 기질 유사체는 조직 칼리크레인의 위치 388 내지 390에 상응하는 아미노산 서열을 가진 펩티드를 포함한다. 펩티드는 핵산 서열의 클로닝 및 발현과 같은 재조합 공학 기술에 의해 합성적으로, 유전적으로 제조될 수 있거나, 박테리아성, 진균성 또는 세포 추출물과 같은 자연 공급원으로부터 정제될 수 있다. 아미노산의 구조, 화학적, 물리화학적, 명명법 및 분석적 측면은 문헌[Chemistry of the Amino Acids(J. P. Greenstein and M. Winitz editors, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1961, 1984년 재인쇄)]에 기재되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 구체적으로 참조로 포함된다. 펩티드는 자연 발생 아미노산, 비-자연 발생(비-코딩) 아미노산, 합성 제조된 아미노산, 및 그의 조합을 포함하는 변형된 및/또는 비변형된 아미노산으로 구성된다. 자연 발생 아미노산은 글리신(Gly), 알킬 측쇄를 가진 아미노산, 예컨대 글리신(Gly), 알킬 측쇄를 가진 아미노산 예컨대 알라닌(Ala), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 및 프롤린(Pro), 방향족 아미노산 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr) 및 트립토판(Trp), 아미노산 알콜 세린(Ser) 및 트레오닌(Thr), 산성 아미노산 아스파르트산(Asp) 및 글루탐산(Glu), Asp 및 Glu의 아미드, 아스파라긴(Asn) 및 글루타민(Gln), 황-함유 아미노산 시스테인(Cys) 및 메티오닌(Met), 및 염기성 아미노산 히스티딘(His), 리신(Lys), 및 아르기닌(Arg)을 포함한다. 비-자연 발생 아미노산은, 예를 들어, 오르니틴(Orn), 노르류신(Nle), 시트랄린(Cit), 호모-시트랄린(hCit), 데스모신(Des), 및 이소데스모신(Ide)을 포함한다. 변형된 아미노산은 자연 발생 및 비-자연 발생, 및 합성 생성된 아미노산의 유도체 및 유사체를 포함한다. 이러한 아미노산 형태는 예컨대, 예를 들어, 염소(Cl), 브로민(Br), 플루오린(F), 또는 아이오딘(I)으로 하나 이상의 활성 부위의 할로겐화, 탄소 함유 기, 예컨대, 메틸(Me), 에틸(Et), 부틸(Bu), 아미노(NH<sub>2</sub> 또는 NH<sub>3</sub>), 아미디노(Am), 아세토미도메틸(Acm), 또는 페닐(Ph) 기로 알킬화, 또는 인(P), 질소(N), 산소(O) 또는 황(S) 함유 기의 첨가에 의해 화학적으로 변형되었다. 변형은 또한, 예를 들어, 또 다른 아미노산 또는 펩티드, 또는 전구체 화학물질의 수화, 산화, 수소화, 에스테르화, 또는 고리화에 의해 이루어질 수 있다. 예는 아미노산 히드록사메이트 및 데카르복실라제, 단일 아미노산, 폴리아미노산, 및 아미노산 유도체를 포함한다. 구체적 예는 감마 아미노 부티르산(GABA), 히드록시프롤린(Hyp), 2 또는 3 위치에서 변형될 수 있는 아미노아디프산(Aad), o-아미노부티르산(Aab 또는 Abu), 셀레노시스테인(SeCys<sub>2</sub>), tert-부틸글리신(Bug 또는

tert-BuGly), N-카르바밀 아미노산, 아미노산 메틸 에스테르, 아미노-프로피온산(또는 β-알라닌; 13-A1a), 아다만틸글리신(Adg), 아미노카프로산(Acp), N-에틸아스파라긴(Et-Asn), 알로-히드록시리신(aHy1), 알로-이소류신(aIle), 페닐글리신(Phg), 피리딜알라닌(Pal), 티에닐알라닌(Thi), α-Δ-아미노부티르산(Kbu), α-β-디아미노프로피온산(Kpr), 1- 또는 2-나프티틸알라닌(1NaI 또는 2NaI), 오르토폴루오로페닐알라닌(Phe(oF)), N-메틸글리신(MeGly), N-메틸-이소류신(MeIle), N-메틸-발린(MeVal), 2-아미노-헵탄산(Ahe), 2- 또는 3-아미노-이소부티르산(Aib), 2-아미노-피멜산(Dbu), 2-2'-디아미노피멜산(Dpm), 2,3-디아미노프로피온산(Dpr), 및 N-에틸글리신(EtGly)을 포함한다. 화학적으로 생성된 비-코딩된 아미노산은, 예를 들어, 페닐글리신(Ph-Gly), 시클로헥실알라닌(Cha), 시클로헥실글리신(Chg), 및 4-아미노 페닐알라닌(Phe(4NH2) 또는 Aph)을 포함한다. 변형된 아미노산은 또한 전혀 아미노산이 아닌 화학적 구조일 수 있으나, 실제로는 알킬 아민, 당류, 핵산, 지질, 지방산 또는 다른 산과 같은 또 다른 화학적 형태로 분류된다. 펩티드를 포함하는 변형된 또는 비변형된 아미노산 중 임의의 것은 D- 또는 L-입체형태일 수 있거나 하나, 둘 이상의 호변이성질체 또는 공명 형태를 포함할 수 있다.

[0109] 공생 박테리아(예를 들어, S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5 및/또는 S. 와르네리 G2)를 포함하는 본 명세서에 개시된 프로바이오틱 피부 조성물을 포함하는 제약 조성물, 그의 조작된 형태(예를 들어, 약독화 또는 유전자 변형된), 또는 AIP 펩티드 코딩 서열을 포함하는 약독화 미생물은 에멀전, 용액, 현탁액, 크림, 젤, 히드로겔, 연고, 살포제, 드레싱, 엘릭시르, 로션, 현탁액, 팅크, 페이스트, 폼, 필름, 에어로졸, 관개, 스프레이, 좌제, 붕대, 피부 패치를 포함한, 국소 또는 전신 효과를 위한 국소 투여에 적합한 임의의 투여 형태로 제제화될 수 있다. 본 명세서에 개시된 프로바이오틱을 포함하는 국소 제제는 리포솜, 미셀, 마이크로스피어, 나노시스템, 및 그의 혼합물을 또한 포함할 수 있다.

[0110] 한 실시양태에서, 공생 박테리아(예를 들어, S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5 및/또는 S. 와르네리 G2), 그의 조작된 형태(예를 들어, 약독화 또는 유전자 변형된), 또는 본 명세서에 기재된 AIP 펩티드 코딩 서열을 포함하는 약독화 미생물을 포함하는 본 명세서에 개시된 프로바이오틱 피부 조성물을 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 다양한 측면에서, 그의 주요 구성성분이 공생 박테리아(예를 들어, S. 에피더미디스 A11, S. 호미니스 A9, S. 호미니스 C4, S. 호미니스 C5 및/또는 S. 와르네리 G2), 그의 조작된 형태(예를 들어, 약독화 또는 유전자 변형된), 또는 상기 기재된 AIP 펩티드 코딩 서열을 포함하는 약독화 미생물을 포함하는 프로바이오틱 피부 조성물 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 다양한 실시양태에서, 그의 주요 구성성분이 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 또는 추출물 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 다양한 측면에서, 그의 주요 구성성분이 프로바이오틱 공생 피부 박테리아 발효 추출물 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 다양한 측면에서, 그의 주요 구성성분이 글리세롤 및 매트릭스를 포함하는 붕대 또는 드레싱이 제공된다. 한 실시양태에서, 붕대 또는 드레싱은 피부 손상 또는 부상 부위에 적용된다. 또 다른 실시양태에서, 붕대 또는 드레싱은 감염 부위에 적용된다.

[0111] "제약상 허용되는 담체"는 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제(이들이 프로바이오틱 공생 박테리아에 유해하지 않는 한 필요한 경우), 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함하는 것으로 의도된다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 제약 조성물과 양립할 수 없는 한, 치료 조성물 및 치료 방법에서의 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0112] 본 명세서에 개시된 국소 제제에 사용하기에 적합한 제약상 허용되는 담체 및 부형제는 수성 비히클, 수-혼화성 비히클, 비-수성 비히클, 안정화제, 용해도 증강제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 국소 마취제, 현탁화제 및 분산제, 습윤제 또는 유화제, 착화제, 금속이온봉쇄제 또는 킬레이트제, 침투 증강제, 항동해제(cryoprotectant), 동결건조보호제(lyoprotectant), 증점제, 및 불활성 기체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0113] 프로바이오틱을 포함하는 제약 조성물은 연고, 크림, 스프레이 및 젤의 형태로 제제화될 수 있다. 적합한 연고 비히클은 예컨대 라드(lard), 벤조인화 라드(benzoinated lard), 올리브 오일, 면실유, 및 기타 오일, 백색 바셀린을 포함한, 유성 또는 탄화수소 비히클; 유화성 또는 흡수 비히클, 예컨대 친수성 바셀린, 히드록시스테아린 술페이트, 글리세롤 및 무수 라놀린; 수분-제거 가능한(water-removable) 비히클, 예컨대 친수성 연고; 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜을 포함한 수용성 연고 비히클; 세틸 알콜, 글리세릴 모노스테아레이트, 라놀린, 및 스테아르산을 포함한, 에멀전 비히클, 유-중-수(W/O) 에멀전 또는 수-중-유(O/W) 에멀전(문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy] 참조)을 포함한다. 이들 비히클은 피부연화제(emollient)이나 일반적으로 항산화제 및 보존제의 첨가를 필요로 한다.

- [0114] 적합한 크림 베이스는 수-중-유 또는 유-중-수일 수 있다. 크림 비히클은 물로 세척 가능할 수 있고, 오일 상, 유화제, 및 수성 상을 함유한다. 오일 상은 또한 "내부" 상으로 칭해지며, 이는 일반적으로 바셀린 및 지방 알콜 에컨대 세틸 또는 스테아릴 알콜로 구성된다. 수성 상은 통상, 반드시 필요한 것은 아니지만, 부피로 오일 상을 초과하고, 일반적으로 습윤제를 함유한다. 크림 제제의 유화제는 비이온성, 음이온성, 양이온성, 또는 양쪽성 계면활성제일 수 있다.
- [0115] 겔은 반고체, 현탁-형 시스템이다. 단일-상 겔은 액체 담체 전체에 걸쳐 실질적으로 균일한 물질을 함유한다. 적합한 겔화제는 가교된 아크릴산 중합체, 예컨대 카르보머, 카르복시폴리알킬렌, 카르보폴(Carbopol)<sup>™</sup>; 친수성 중합체 예컨대 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 및 폴리비닐알콜; 셀룰로스계 중합체, 예컨대 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 및 메틸셀룰로스; 검, 예컨대 트라가칸트 및 크산탄 검; 소듐 알기네이트를 포함한다. 균일 한 겔을 제조하기 위해, 알콜 또는 글리세린과 같은 분산제를 첨가할 수 있거나, 겔화제를 연화처리(trituration), 기계적 혼합, 및/또는 교반에 의해 분산시킬 수 있다.
- [0116] 또 다른 실시양태에서, 본 명세서에 개시된 화학식 I의 화합물 및/또는 공생 프로바이오틱, 그의 유도체 또는 유사체를 포함하는 제약 조성물은 단독으로 또는 화학 요법제, 항생제(이들이 프로바이오틱 이점을 파괴하지 않는 한), 항진균제, 항-소양제, 진통제, 프로테아제 억제제 및/또는 항바이러스제를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 제제화될 수 있다.
- [0117] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 국소 투여는, 피부(내), 결막, 각막내, 안내, 안, 귀, 경피, 비강, 질, 요도, 호흡기, 및 직장 투여를 포함한다. 이러한 국소 제제는 눈, 피부, 및 점막(예를 들어, 구강, 질, 직장)의 암을 치료 또는 억제하는 데 유용하다. 시장에서의 제제의 예는 국소 로션, 크림, 비누, 와이프 등을 포함한다.
- [0118] 가압 용기, 펌프, 스프레이, 어토마이저(atomizer), 또는 분무기(nebulizer)에서 사용하기 위한 용액 또는 현탁액은 에탄올, 수성 에탄올, 또는 본 명세서에 개시된 활성 성분의 분산, 용해, 또는 연장 방출을 위한 적합한 대안제, 용매로서의 추진제; 및/또는 계면활성제, 예컨대 소르비탄 트리올레이트, 올레산, 또는 올리고락트산을 함유하도록 제제화될 수 있다.
- [0119] 침식성 매트릭스를 형성하는 데 유용한 물질은 키틴, 키토산, 텍스트란, 및 폴루란; 한천 검(gum agar), 아라비아 검, 카라야 검(gum karaya), 로커스트콩(locust bean) 검, 검 트라가칸트, 카라기난, 개티 검(gum ghatti), 구아 검, 크산탄 검, 및 스크레로글루칸(scleroglucan); 전분, 예컨대 텍스트린 및 말토텍스트린; 친수성 콜로이드, 예컨대 펙틴; 포스파티드, 예컨대 레시틴; 알기네이트; 프로필렌 글리콜 알기네이트; 젤라틴; 콜라겐; 및 셀룰로스 화합물, 예컨대 에틸 셀룰로스(EC), 메틸에틸 셀룰로스(MEC), 카르복시메틸 셀룰로스(CMC), CMEC, 히드록시에틸 셀룰로스(HEC), 히드록시프로필 셀룰로스(HPC), 셀룰로스 아세테이트(CA), 셀룰로스 프로피오네이트(CP), 셀룰로스 부티레이트(CB), 셀룰로스 아세테이트 부티레이트(CAB), CAP, CAT, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스(HPMC), HPMCP, HPMCAS, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스 아세테이트 트리멜리테이트(HPMCAT), 및 에틸히드록시에틸셀룰로스(EHEC); 폴리비닐 피롤리돈; 폴리비닐 알콜; 폴리비닐 아세테이트; 글리세롤 지방산 에스테르; 폴리아크릴 아마이드; 폴리아크릴산; 에타크릴산 또는 메타크릴산의 공중합체(유두라지트(EUDRAGIT), 롬 아메리카, 인크(Rohm America, Inc., 뉴저지주 피스카타웨이, N.J.); 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트); 폴리락티드; L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 공중합체; 분해성 락트산-글리콜산 공중합체; 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산; 및 다른 아크릴산 유도체, 예컨대 부틸메타크릴레이트, 메틸메타크릴레이트, 에틸메타크릴레이트, 에틸아크릴레이트, (2-디메틸아미노에틸)메타크릴레이트, 및 (트리메틸아미노에틸)메타크릴레이트 클로라이드의 단독 중합체 및 공중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0120] 또 다른 실시양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물(예를 들어, 프로바이오틱 조성물 또는 화학식 I의 펩티드 또는 화합물을 포함하는 조성물)은 알도스테론, 베클로메타손, 메타메타손, 데옥시코르티코스테론 아세테이트, 플루드로코르티손 아세테이트, 히드로코르티손(코르티솔), 프레드니솔론, 프레드니손, 메틸프레니솔론, 텍사메타손, 및 트리암시놀론을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 하나 이상의 스테로이드 약물과 조합될 수 있다.
- [0121] 또 다른 실시양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물(예를 들어, 프로바이오틱 조성물 또는 화학식 I의 펩티드 또는 화합물을 포함하는 조성물)은 아몰로핀, 암포테리신 B, 아니둘라핀진, 비포나졸, 부테나핀, 부토코나졸, 카스포핀진, 시클로피록스, 클로트리마졸, 이코나졸, 펜티코나졸, 필리핀, 플루코나졸, 이소코나졸,

이트라코나졸, 케토코나졸, 미카편진, 미코나졸, 나프티파인, 나타마이신, 니스타틴, 옥시코나졸, 라부코나졸, 포사코나졸, 리모시딘, 세르타코나졸, 술코나졸, 테르비나핀, 테르코나졸, 티오코나졸, 및 보리코나졸을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 항진균제와 조합될 수 있다.

[0122] 본 명세서에 기재된 치료 용도에서 사용하기 위해, 키트 및 제조 물품이 또한 본 명세서에 기재되어 있다. 이러한 키트는 바이알, 튜브 등과 같은 하나 이상의 용기를 수용하기 위해 구획화된 캐리어, 패키지 또는 용기를 포함할 수 있으며, 용기(들) 각각은 기재된 방법에 사용될 별도의 요소 중 하나를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 여러 가지의 물질로 형성될 수 있다..

[0123] 예를 들어, 용기(들)는, 본 명세서에 제공된 하나 이상의 조성물(예를 들어, 프로바이오틱 조성물 또는 화학식 I의 펩티드 또는 화합물을 포함하는 조성물)을, 임의로 본 명세서에 개시된 바와 같은 또 다른 작용제와 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 키트는 본 명세서에 기재된 방법에서의 그의 사용에 관한 식별 설명 또는 표지 또는 설명서와 함께 본 명세서에 개시된 조성물을 임의로 포함한다.

[0124] 하기 실시예는 본 발명을 추가로 설명하기 위해 제공되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0125] **실시예**

[0126] **실시예 1**

[0127] **일차 인간 각질형성세포의 배양.** 신생아 NHEK(써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific), 매사추세츠주 월섬)를 1x 에피라이프(EpiLife) 정의된 성장 보충제(써모피셔 사이언티픽), 60 μM CaCl<sub>2</sub>, 및 1x 항생제-항진균제(PSA; 100 U/ml 페니실린, 100 U/ml 스트렙토마이신, 250 ng/ml 암포테리신 B; 써모피셔 사이언티픽)가 보충된 에피라이프 배지(써모피셔 사이언티픽)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 실험을 위해, NHEK를 70% 전면성장물로 성장시킨 후, 박테리아 멸균 여과된 상청액으로 처리하기 전에 고칼슘 에피라이프 배지(2 mM CaCl<sub>2</sub>)에서 48시간 동안 분화시켰다. 이들 인간-유래 시판 세포 제품의 사용은 고지에 입각한 동의를 필요로 하지 않는다. 박테리아 상청액 처리의 경우, 분화된 NHEK를 에피라이프 배지에 대해 5 부피%의 멸균 여과된 박테리아 상청액으로 처리하였다. NHEK는 계대 3 내지 5의 실험에만 사용되었다.

[0128] **박테리아 배양.** 모든 박테리아를 3% 트립신 소이 브로스(TSB; 시그마(Sigma), 미주리주 세인트루이스) 중에서 37°C에서 300 r.p.m으로 진탕시키면서 배양시켰다. S. 아우레우스 균주 뉴먼, USA300, 113, 생거252 및 S. 에피더미디스 균주 ATCC12228 및 ATCC1457을 24시간 동안 정지상으로 성장시킨 후에 원심분리(4,000 r.p.m., 실온 [RT], 10분) 및 상청액의 멸균 여과(0.22 μm) 후에 NHEK에 첨가하였다. 간단히 말하자면, 프로테아제-결핍 균주를 24시간 동안 25 μg/ml 린코마이신 및 5 μg/ml 에리트로마이신을 함유하는 3% TSB에서 배양한 후, 추가 24시간 동안만 3% TSB에서 계대배양하였다. 무린 생 S. 아우레우스 콜로니형성 검정의 경우, 박테리아의 2 x 10<sup>6</sup> 콜로니-형성 단위를 8-mm TSB 한천 디스크에 적용하고 무린의 등 피부에 첨가하기 전에 실온에서 30분 동안 건조시켰다.

[0129] **무린 박테리아 디스크 모델.** 암컷 C57BJ/6L 마우스(8 주령)를 박테리아 피부 콜로니형성의 무린 모델에 사용하였다. 간단히 말하자면, 등 피부 털을 제거하기 위해, 마우스를 면도하고 네어(nair)를 2e3 분 동안 적용한 후, 알콜 와이프로 털을 제거하였다. 24시간의 회복 후, 3 x 8 mm TSB 한천 디스크를 12시간 동안 디스크당 TSB만(비히클 대조군) 또는 S. 아우레우스(USA300)의 2e<sup>6</sup> 개의 콜로니-형성 단위로 무린의 등 피부에 적용하였다. 테가덤(Tegaderm)을 한천 디스크의 상부에 적용하여 제자리에 고정시켰다. 마우스를 안락사시킨 후 분석을 위해 8-mm 전체 피부 펀치 생검을 수집하였다.

[0130] **계내 자이모그래피(in situ zymography).** 무린 피부 절편(10 μm 두께)을 5분 동안 물에서 1% 트윈-20으로 1x 행구었다. 총 프로테아제 활성의 측정을 위해 가슴 챔버에서 37°C에서 4시간 동안 2 μg ml의 BODIPY FL 카제인 총 프로테아제 활성 기질(써모-피셔 사이언티픽)로 절편을 처리하였다. 세린 프로테아제 억제제 AEBSF(50 mM; 시그마)를 BODIPY FL 카제인을 또한 첨가하기 30분 전에 절편에 적용하였다. 슬라이드를 인산염 완충 식염수로 1x 행군 후에 DAPI(써모피셔 사이언티픽) 및 커버 슬라이드가 없는 프로롱 골드 안티페이드 마운팅(ProLong gold antifade mounting) 배지를 적용하였다. 형광 신호를 올림푸스(Olympus) BX51(도쿄, 일본) 형광 현미경을 사용하여 측정하였다

[0131] **프로테아제 활성 검정.** NHEK 컨디셔닝된 배지를 50 ml에서 96-웰 흑색 바닥 플레이트(코닝(Corning), 뉴욕주 코닝)에 첨가한 후, 150 ml의 5 μg ml BODIPY FL 카제인 기질, 2 μg ml의 엘라스틴(엘라스타제-유사 기질; 써

모피서 사이언티픽), 또는 4 µg/ml 젤라틴(MMP 기질; 써모피서 사이언티픽)을 제조업체의 지침에 따라 첨가하였다. 게다가, 200 µM의 펩티드 Boc-Val-Pro-Arg-AMC(트립신 유사 기질; 바캠(BACHEM), 스위스 부벤도르프)를 1x 소화 완충제(써모피서 사이언티픽) 중에서 150 µl로 NHEK 컨디셔닝된 배지에 첨가하였다. 상대 형광 강도를 실온에서 스펙트라맥스(SpectraMAX) 게미니(Gemini) EM 형광계(써모피서 사이언티픽)로 2시간마다 24시간 동안 판독하여 분석하였다. BODIPY FL 카제인 플레이트를 ex: 485 nm 및 em: 530 nm에서 판독하였다. 엘라스틴-유사 및 MMP 기질 플레이트를 ex: 485 nm 및 em: 515 nm에서 판독하였다. 트립신-유사 기질 플레이트를 ex: 354 nm 및 em: 435 nm에서 판독하였다.

[0132] **정량적 실시간 PCR.** 제조업체의 지침에 따라 퓨어링크(Purelink) RNA 단리 칼럼(써모피서 사이언티픽)을 사용하여 NHEK로부터 RNA를 단리하였다. RNA는 나노드롭(Nanodrop) 분광 광도계(써모피서 사이언티픽)를 사용하여 정량화하였고, iScript cDNA 합성 키트(바이오-레드(Bio-Rad), 캘리포니아주 어빈)를 사용하여 500 ng의 RNA를 역전사시켰다. 정량적 실시간 PCR 반응을 유전자-특이적 프라이머 및 태크만(TaqMan) 프로브(써모피서 사이언티픽)를 사용하여 CFX96 실시간 검출 시스템(바이오-레드) 상에서 시행하였다.

[0133] **면역블롯팅.** 세포 용해를 위해, 1x 프로테아제 억제제 콕테일(셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology), 매사추세츠주 덴버스)를 함유하는 냉 1x 방사성-면역침전 분석(RIPA) 완충제(시그마)를 NHEK에 적용한 후 스크래핑하였다. 세포 용해물을 얼음에서 30분 동안 인큐베이션하고 원심분리(13,000 r.p.m., 15분, 4 °C)하여 세포 파편을 제거하였다. 비신코닌산(BCA) 검정(피어스(Pierce), 일리노이주 록포드)으로 단백질 농도를 측정 후 1% b-메르캅토에탄올을 함유하는 4x 랩리(Laemli) 샘플 완충제(바이오-레드)에 40 mg의 샘플을 첨가하고 95°C에서 7분 동안 가열함으로써 샘플을 제조하였다. 샘플을 4-20% 트리스-글리신 프리캐스트(precast) TGX 겔(바이오-레드)에서 시행하고, 트랜스-블롯 터보(trans-blot turbo) 전달 시스템(바이오-레드)을 사용하여 0.22-µm 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막(바이오-레드)으로 옮기고, 0.1% 트윈-20(LI-COR, 네브래스카주 링컨)을 함유하는 1x 오디세이 차단 용액에서 실온에서 1시간 동안 차단하고, 1차 항체로 4 °C에서 밤새 염색하였다. 오디세이(LI-COR) 형광 이차 항체를 3x PBST(0.1% 트윈-20을 가진 인산염 완충 식염수) 세척 후 오비탈 진탕기 상에서 실온에서 1시간 동안 막에 적용하였다. 추가의 3x PBST 세척을 적외선 영상 장치(LI-COR) 상에서 분석하기 전에 적용하였다. 산타 크루즈 바이오테크놀로지즈(Santa Cruz Biotechnologies)(캘리포니아주 산타 크루즈)로부터의 1차 항체, KLK5(H-55), KLK6(H-60), DSG-1(H-290), FLG(H-300), 및 α-튜블린(TU-02)을 1:100 희석으로 사용하였다. 앵캠(Abcam)(영국 케임브리지)으로부터의 KLK13(ab28569) 및 KLK14(ab128957) 항체를 1:1,000 희석으로 사용하였다.

[0134] **KLK 유전자 침묵.** NHEK를 15 nM 또는 45 nM의 특정 KLK 사일런서 선별 siRNA 또는 RNAiMAX(써모피서 사이언티픽) 및 옵티(Opti)MEM 배지(써모피서 사이언티픽)를 사용하는 siRNA 스크램블(-) 대조군(써모피서 사이언티픽)으로 24시간 동안 처리하였다. NHEK를 고칼슘 배지(2 mM CaCl<sub>2</sub>)에서 48시간 동안 분화시킨 후, NHEK 용해물 및 컨디셔닝된 배지의 분석 전에 멸균 여과된 S. 아우레우스(뉴먼) 상청액으로 24시간 처리하였다.

[0135] **통계 분석.** 일원분산분석 및 이원분산분석 둘 다를 P 값 < 0.05가 유의한 통계 분석에 사용하였다. 그래프패드(GraphPad) 프리즘 버전 6.0(그래프패드, 캘리포니아주 라 줄라)을 결과의 통계 분석에 사용하였다.

[0136] **스타필로코커스는 인간 각질형성세포의 프로테아제 활성화에 영향을 미친다.** 인간 피부 상에서 발견된 박테리아의 상이한 균주가 각질형성세포의 프로테아제 활성을 유도할 수 있는지를 평가하기 위해, 정상 인간 표피 각질형성세포(NHEK)의 일차 배양물을 2개의 메티실린-내성 S. 아우레우스 균주(USA300 및 생거252) 및 2개의 메티실린-민감성 S. 아우레우스 균주를 포함한 S. 아우레우스의 4개의 상이한 실험실 단리물로부터 멸균 여과된 배양 상청액으로 처리하였다. 2개의 S. 에피더미디스 단리물(ATCC12228 및 ATCC1457)을 또한 시험하였다. 멸균 박테리아 배양 상청액에 노출된 후 24시간에, 각질형성세포 배양 배지를 트립신-유사, 엘라스타제-유사 또는 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP) 활성화에 대해 선택적인 기질로 프로테아제 활성화에 대해 분석하였다. NHEK 컨디셔닝된 배지는 S. 아우레우스 균주 뉴먼 및 USA300으로 처리한 후 상당히 더 많은 트립신 활성을 함유하였다(도 1a). MMP 및 엘라스타제 활성화 둘 다는 S. 에피더미디스 균주 ATCC12228에 의해 증가되었으며, 한편 S. 아우레우스 균주 USA300 및 생거 252 및 S. 에피더미디스 균주 ATCC1457은 NHEK 컨디셔닝된 배지에서 엘라스타제 활성을 더 적은 정도로 증가시켰다(도 1b 및 c). NHEK 컨디셔닝된 배지에서 관찰된 증가된 프로테아제 활성이 NHEK로부터 유래되고 박테리아 자체에 의해 생성되지 않았음을 확인하기 위해, NHEK의 존재 및 부재 하에 배양 웰에 S. 아우레우스(뉴먼) 상청액을 첨가한 후 트립신 활성을 분석하였다. S. 아우레우스로부터의 동일한 농도의 희석된 상청액을 NHEK 배지 단독에 첨가하였을 때 NHEK의 부재 하에 어떤 효소 활성화도 검출되지 않았다(도 1d).

[0137] **S. 아우레우스는 표피 세린 프로테아제 활성을 증가시킨다.** 특정 S. 아우레우스 균주(뉴먼 및 USA300)에 의해

유도된 트립신 활성의 큰 증가와 이 활성이 S. 아우레우스에 의해 매개되는 질한에서 가질 수 있는 잠재적인 역할 때문에, 박테리아가 NHEK에서의 프로테아제 활성을 어떻게 유도하는 지를 더 잘 이해하기 위해 이 유기체에 대한 실험이 집중되었다. S. 아우레우스에 대한 프로테아제 반응의 동역학을 평가하기 위해, 각질형성세포를 S. 아우레우스(뉴먼)로부터의 멸균 여과된 배양 상청액으로 0, 8, 24 및 48시간 동안 처리한 다음에 NHEK 컨디셔닝된 배지를 프로테아제 분석을 위해 수집하였다. NHEK의 컨디셔닝된 배지에서 총 프로테아제 활성의 측정은 S. 아우레우스 상청액에 노출된 후 총 단백질분해 활성의 시간-의존적 증가를 나타냈다(도 2a). 세린 프로테아제 억제제 아프로티닌의 첨가는 이 활성이 세린 프로테아제에 기인한 것임을 확인해 주었고(도 2b), 이는 도 1a에 나타난 트립신-유사 활성의 증가의 관찰과 일치하였다. S. 아우레우스 USA300 LAC 야생형과 프로테아제-결핍 균주의 비교는 야생형 및 프로테아제-결핍 균주 둘 다 NHEK 컨디셔닝된 배지에서 트립신 활성을 증가시켰으나, 프로테아제-결핍 균주는 야생형 균주와 비교하여 트립신 활성을 유도하는 능력을 상당히 감소시켰다(도 2c). 종합해서, 이들 데이터는 S. 아우레우스가 내인성 NHEK 세린 프로테아제 활성을 증가시킬 수 있고 S. 아우레우스 프로테아제 및 다른 S. 아우레우스 생성물이 이 박테리아가 각질형성세포를 활성화시키는 능력의 한 원인이 됨을 확인해 준다.

[0138] 표피 프로테아제 활성에 대한 S. 아우레우스의 작용을 추가로 입증하기 위해, 생 S. 아우레우스(USA300)를 마우스의 등 피부에 적용하였다. 이어서, 적용 부위의 피부를 생검하고 세린 프로테아제 억제제 4-벤젠술포닐 플루오라이드(AEBSF)의 존재 또는 부재 하에 계내 지모그래피에 의한 총 단백질분해 활성의 분석을 위해 절편화하였다. 한천 디스크 단독으로 처리된 피부와 비교하여 S. 아우레우스로 처리한 후 표피에서 총 표피 프로테아제 활성이 정성적으로 증가하였고, 증가된 형광에 의해 검출된 증가된 활성은 AEBSF에 의한 세린 프로테아제 활성의 억제에 의해 주로 제거되었다. 모낭에서의 배경 자가형광은 어떤 기질 제어도 없음을 포함하여 모든 절편에서 관찰되었다. 이들 관찰은 S. 아우레우스의 존재가 표피에서 프로테아제 활성을 증가시킬 수 있음을 추가로 입증한다.

[0139] S. 아우레우스는 각질형성세포에서 KLK 발현을 증가시킨다. KLK는 트립신-유사 또는 키모트립신-유사 활성을 갖는 표피에서의 풍부한 세린 프로테아제 패밀리아다. S. 아우레우스가 각질형성세포에서 KLK mRNA의 발현을 변화시킬 수 있는지를 결정하기 위해, NHEK를 S. 아우레우스(뉴먼) 상청액으로 24시간 동안 처리하고 KLK1-15의 발현을 정량적 실시간 PCR에 의해 측정하였다. KLK5는 가장 높은 상대 mRNA 존재도를 가졌으며, 한편 KLK6, 13 및 14는 S. 아우레우스에 노출된 후 가장 큰 배수 증가를 일관되게 나타냈다(도 3a-e). 분석된 모든 다른 KLK는 감소된 발현을 나타낸 KLK1을 제외하고 S. 아우레우스에 노출된 후 mRNA 발현에서 미묘한 증가를 나타냈다. KLK2, 3 및 15에 대한 mRNA는 검출되지 않았다.

[0140] 이어서, 세포 용해물 및 NHEK 컨디셔닝된 배지 둘 다를 S. 아우레우스(뉴먼) 상청액 처리 후 KLK 단백질 발현의 변화에 대해 분석하였다. KLK6 및 14에 대한 면역블롯팅은 세포 용해물 및 컨디셔닝된 배지 둘 다에서 S. 아우레우스 상청액 처리 후 이들 KLK 단백질의 증가된 발현을 나타냈으며, 한편 KLK13은 컨디셔닝된 배지에서만 증가하였다. S. 아우레우스 상청액 처리 후 KLK5는 발현에 어떤 변화도 갖지 않았다(도 3f).

[0141] KLK6, 13, 및 14는 증가된 각질형성세포 세린 프로테아제 활성의 한 원인이 된다. KLK6, 13 및 14가 S. 아우레우스 노출 후 NHEK에서의 발현에서 가장 큰 증가를 나타냈기 때문에, 이들 KLK가 관찰된 증가된 세린 프로테아제 활성의 원인이 되는 지를 조사하기 위한 실험을 수행하였다. 작은 간섭 RNA(siRNA)를 사용하여 그의 발현을 선택적으로 침묵시켰다. KLK6 및 KLK13에 대한 siRNA는 S. 아우레우스로 유도된 트립신 활성을 상당히 감소시켰으며, 한편 KLK14는 트립신 활성을 더 적은 정도로 감소시켰다. KLK6, 13 및 14의 삼중 녹다운은 또한 비록 침가 효과가 관찰되지 않았지만 대조군 siRNA로부터 트립신 활성의 상당한 감소를 나타냈다(도 4a). 흥미롭게도, KLK6, 13 및 14의 삼중 녹다운은 KLK13 및 KLK14의 감소된 녹다운 효율을 야기하였으며, 이는 트립신 활성에 대한 부가 효과의 부족을 설명할 수 있다(도 4b-d).

[0142] S. 아우레우스는 KLK의 유도에 의해 데스모글레인-1 및 FLG의 분해를 촉진한다. 데스모글레인-1(DSG-1) 및 FLG는 표피 피부 장벽 완전성을 조절하는 데 둘 다 중요하다. 면역블롯팅은 NHEK가 S. 아우레우스(뉴먼) 상청액에 노출되면 전장 DSG-1(160 kDa)의 절단을 촉진하고 DSG-1 절단은 KLK6, 13 또는 14의 siRNA 침묵에 의해 차단됨을 나타냈다(도 5a). 면역 블롯에서 >250 kDa 밴드로 표시되는, NHEK에서 프로필라그린(Pro-FLG)의 S. 아우레우스-매개 절단은 또한 KLK6 및 KLK13의 siRNA 침묵에 의해 부분적으로 차단되었다(도 5b). 밀도계측 분석은 DSG-1 또는 Pro-FLG 절단을 방지하기 위한 KLK6, 13 및 14 녹다운 능력을 추가로 설명한다(도 5c). 전반적으로, 이들 관찰은 KLK6, 13 및 14의 유도에 의해 각질형성세포 단백질분해 활성을 증가시키는 S. 아우레우스의 능력이 정상적인 표피 장벽을 유지하는 데 필수적인 분자의 소화를 야기할 수 있음을 입증한다.

[0143] 실시예 2

[0144] **박테리아 제조.** 이 연구에서 사용된 모든 박테리아는 표 A에 열거되어 있다. 모든 스태필로코커스 균주(*S. 아우레우스*, *S. 에피더미디스*, *S. 호미니스*, *S. 와르네리*, *S. 캐피티스*, 및 *에스 러그두넨시스*)는 검정법에 따라 4mL 또는 400  $\mu$ L 부피에서 37°C 인큐베이터에서 250RPM에서 24시간 동안 3% 트립신 소이 브로쓰(TSB)에서 정지 상으로 성장시켰다. 하기 농도: 5  $\mu$ g/mL Erm, 25  $\mu$ g/mL Lcm, 및 10  $\mu$ g/mL Cm에서 표 S1에 표시된 항생제 선택으로 특정 균주를 성장시켰다. 인간 각질형성세포 또는 무린 피부 상의 박테리아 상청액의 처리를 위해, 24시간 배양된 박테리아를 펠렛화한 후(15분, 4,000RPM, RT), 상청액(0.22  $\mu$ m)을 여과-멸균하였다. *S. 호미니스* C5 및 *S. 에피더미디스* RP62A 균주를 이용한 무린 및 인간 각질형성세포 실험의 경우, 박테리아 멸균-여과된 상청액을 3kDa 크기 배제 칼럼(아미콘(Amicon) 울트라(Ultra)-15 원심분리 필터, 밀리포어(Millipore))으로 여과하여 <3kDa 분획을 수집하고 동결 건조기를 사용하고 추가로 10x 농축시키고 처리 전에 분자 등급 H<sub>2</sub>O에 재현탁시켰다. *S. 호미니스* C5 상청액을 몇몇 기술로 생화학적으로 추가로 시험하였다. 실온에서 1시간 동안 황산암모늄 침전(80%)에 이어서 원심분리(30분, 4,000RPM, RT) 및 H<sub>2</sub>O에서 침전물(펠렛)의 재현탁을 사용하여 작은 펩티드를 단리하였다. 더욱이, *S. 호미니스* C5 상청액을 2M NaOH로 1시간 동안 pH11로 상승시킨 후 2M HCl을 사용하여 *S. 아우레우스 agr* 리porter 균주에 첨가하기 전에 pH 1-14 스트립을 사용하여 상청액 pH를 대략 6.5의 출발 pH로 되돌렸다.

표 1

[0145]

박테리아 및 플라스미드
박테리아
균주명
<i>S. 에피더미디스</i> RP62A WT( <i>agr</i> 유형 I)
<i>S. 에피더미디스</i> RP62A $\Delta$ AIP(#47)
<i>S. 에피더미디스</i> ATCC1457( <i>agr</i> 유형 II)
<i>S. 에피더미디스</i> 8247( <i>agr</i> 유형 III)
<i>S. 에피더미디스</i> A9
<i>S. 에피더미디스</i> A11
<i>S. 아우레우스</i> USA300 LAC WT
<i>S. 아우레우스</i> USA300 $\Delta$ psm $\alpha$
<i>S. 아우레우스</i> USA300 $\Delta$ psm $\beta$
<i>S. 아우레우스</i> USA300 LAC WT(AH1263)
<i>S. 아우레우스</i> USA300 LAC $\Delta$ 프로테아제(AH1919), Erm <sup>R</sup> , Lcm <sup>R</sup>
<i>S. 아우레우스</i> USA300 LAC <i>agr</i> 유형 I pAmi P3-Lux(AH2759), Cm <sup>R</sup>
<i>S. 아우레우스</i> USA300 LAC <i>agr</i> 유형 I P3-YFP(AH1677), Cm <sup>R</sup>
<i>S. 아우레우스</i> 502a <i>agr</i> 유형 II P3-YFP(AH430), Cm <sup>R</sup>
<i>S. 아우레우스</i> MW2 <i>agr</i> 유형 III P3-YFP(AH1747), Cm <sup>R</sup>
<i>S. 아우레우스</i> MN TG <i>agr</i> 유형 IV P3-YFP(AH1872), Cm <sup>R</sup>
<i>S. 호미니스</i> C4
<i>S. 호미니스</i> C5
<i>S. 호미니스</i> A9
<i>S. 와르네리</i> G25
<i>S. 캐피티스</i> H8
<i>S. 러그두넨시스</i> E7
DC10B-CC10
플라스미드
균주명
pMAD( <i>E. 콜라이</i> 에서의 Amp <sup>R</sup> , 스태필로코커스에서의 Erm <sup>R</sup> )
pMAD:: $\Delta$ AIP

[0146] **정상 인간 각질형성세포 배양물.** 정상 신생아 인간 표피 각질형성세포(NHEK; 써모 피셔 사이언티픽)를 1x 에피

라이프 정의된 성장 보충제(EDGS; 썬모 피셔 사이언티픽) 및 1x 항생제-항진균제(PSA; 100 U/mL 페니실린, 100 U/mL 스트렙토마이신, 250 ng/mL 암포테리신 B; 썬모 피셔 사이언티픽)가 보충된 60  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>(썬모 피셔 사이언티픽)를 함유하는 에피라이프 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. NHEK는 3-5 계대 사이의 실험에만 사용되었다. 실험을 위해, NHEK를 70% 전면생장물로 성장시킨 후, 고칼슘 에피라이프 배지(2 mM CaCl<sub>2</sub>)에서 48시간 동안 분화시켜 표피의 상층을 시뮬레이션하였다. 박테리아 상청액 처리의 경우, 분화된 NHEK를 에피라이프 배지에 대해 5 부피%의 멸균-여과된 박테리아 상청액으로 24시간 동안 처리하였다. 합성 PSM 처리와 유사하게, 5-50  $\mu$ g/mL의 펩티드를 DMSO 중에서 24시간 동안 NHEK에 첨가하였다.

[0147] **S. 아우레우스 피부표면(epicutaneous) 마우스 모델.** 8 주령의 성별 및 연령이 매칭된 수컷 또는 암컷 C57BL/6(잭슨(Jackson)) 마우스를 도먼 범례에 특정된 바와 같이 모든 실험(n=3-6)에 사용하였다. 모든 동물 실험은 기관 동물 관리 및 사용위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되었다. 마우스 털을 면도하고 네어를 2 내지 3분 동안 적용한 후 알콜 와이프로 즉시 제거하였다. 박테리아의 적용 전에 피부 장벽을 체모로부터 48시간 동안 회복시켰다. 3% TSB 중의 S. 아우레우스(1e7 CFU)를 1.5 cm<sup>2</sup>의 멸균 거즈 조각 상에 100  $\mu$ L 부피로 48-72 시간 동안 무린 피부에 적용하였다. 치료 지속시간 동안에 유지하기 위해 테가덤을 거즈 상부에 적용하여 제자리에 고정시켰다. S. 아우레우스 agr 억제 실험의 경우, 생 S. 호미니스 C5(10:1) 또는 10x 농축된 <3kDa 멸균-여과된 공생 박테리아 상청액(1:1)을 거즈 상에 적용 직전 3%TSB 중의 S. 아우레우스와 합하였다.

[0148] **합성 펩티드-가용성 모듈린 제조.** 모든 합성 펩티드-가용성 모듈린(PSM)을 라이프테인(LifeTein)(뉴저지주 힐스버러)에 의해 제조하였다. 펩티드는 N-말단 포르밀화(f)로 95% 순도로 제조되었다. PSM 서열은 다음과 같았다:

[0149] PSM  $\alpha$  1: f-MGI IAGI IKVIKSLIEQFTGK(서열번호:5),

[0150] PSM  $\alpha$  2: f-MGI IAGI IKFIKGLIEKFTGK(서열번호:6),

[0151] PSM  $\alpha$  3: f-MEFVAKLFKFFKDLLGKFLGNN(서열번호:7),

[0152] PSM  $\alpha$  4: f-MAIVGTI IKI IKAI IDIFAK(서열번호:8),

[0153] PSM  $\beta$  2: f-MTGLAEAIANTVQAAQHQHDSVKLGTSIVDIVANGVLLGKLGFG(서열번호:9).

[0154] 펩티드를 DMSO에 재현탁시키고 실험을 위해 DMSO에서 재구성하기 전에 -80°C에 보관된 500 mg의 분말 스톡(powdered stock)으로 스피드백(speedvac)에 의해 농축시켰다.

[0155] **RNA 단리 및 정량적 실시간 PCR.** 모든 RNA는 제조업체의 지침(썬모 피셔 사이언티픽)에 따라 퓨어링크 RNA 단리 키트를 사용하여 단리하였다. NHEK의 경우, 350  $\mu$ L RNA 용해 완충제(1%  $\beta$ -메르캅토에탄올 함유)를 세포에 직접 첨가하였다. 마우스 조직의 경우, 0.5 cm<sup>2</sup>의 전체 두께 피부는 중간에 얼음 위에 5분 이내에 750  $\mu$ L의 RNA 용해 완충제에서 비드 비트(bead beat)(2x 30 초, 2.0 mm 지르코니아 비드)하였다. 이어서 조직을 원심분리(10분, 13,000 RPM, 4°C)한 후, 70% EtOH에 350  $\mu$ L의 투명 용해물을 첨가하고 칼럼에 기반하여 RNA를 단리하였다. S. 아우레우스 RNA 단리를 위해, 1x10<sup>9</sup> CFU 박테리아를 10분 동안 2:1 비의 RNA프로텍(protect)(쿼아젠)과 함께 인큐베이션한 후에 원심분리(10분, 13,000 RPM, RT)하고, 750  $\mu$ L의 RNA 용해 완충제에 재현탁시키고, 용해 매트릭스 B 튜브 및 패스트프렙(Fastprep)-24(MP 비오메디칼즈(Biomedicals))를 사용하여 비딩 비팅(2x 1 분 6.5 속도)하였다. 이어서 샘플을 다시 원심분리하고, 상기와 같이 350  $\mu$ L의 투명 용해물을 70% EtOH에 첨가하였다. RNA 단리 후, 샘플을 나노드립(썬모피셔 사이언티픽)으로 정량화하고, 500 ng의 RNA를 iScript cDNA 합성 키트(바이오-래드)를 사용하여 역전사시켰다. qPCR 반응을 CFX96 실시간 검출 시스템(바이오-래드) 상에서 시행하였다. 포유동물 세포의 경우, 유전자-특이적 프라이머 및 태크만 프로브(썬모 피셔 사이언티픽)를 하우스키퍼 유전자로서 GAPDH와 함께 사용하였다.

[0156] **RP62A 적격(Competent) 세포의 생성 및 형질전환.** 전기-적격(Electro-competent) RP62A 세포를 제조하였다. 간단히 말하자면, S. 에피더미디스 RP62A의 밤새 배양물을 예열된 뇌 심장 주입(Brain Heart Infusion)(BHI) 브로쓰에서 0.5의 OD<sub>600nm</sub>으로 희석하고, 진탕시키면서 37°C에서 추가의 30분 동안 인큐베이션고, 원심분리관으로 옮긴 다음에 10분 동안 얼음 위에서 칠링하였다. 세포를 원심분리(10분, 4000RPM, 4°C)에 의해 수확하고, 1 부피, 1/10 부피 및 이어서 1/25 부피의 냉 오토클레이브 수(cold autoclaved water)로 연속적으로 세척한 후, 각각의 세척 후 4°C에서 재펠렛화(re-pelleting)하였다. 최종 세척 후, 세포를 1/200 부피의 냉 10% 멸균 글리세롤에 재현탁시키고 -80°C에서 보관하기 위해 50  $\mu$ L에서 튜브 내로 분취하였다. S. 에피더미디스 RP62A의 형

질전환이 수행되었다. 간단히 말하자면, 냉동된 적격 세포를 얼음 위에서 5분 동안 해동시킨 다음에 실온에서 5분 동안 해동시켰다. 해동된 세포를 잠시 원심분리하고(1분, 5000 g, RT), 펠렛을 500 mM 수크로스가 보충된 50  $\mu$ L의 10% 글리세롤에 재현탁시켰다. DNA를 첨가한 후, 세포를 1 mm 큐벳으로 옮기고 1.1 msec의 시간 상수로 2.1 kV에서 마이크로펄서(Micropulser)(바이오-라드) 상에서 펄스를 가하였다. 전기천공 직후, 세포를 500 mM 수크로스가 보충된 1 mL의 BHI 브로쓰에 재현탁시키고, 30°C에서 1시간 동안 진탕시킨 다음에 30°C에서 10  $\mu$ g/mL의 클로람페니콜(Cm)로 BHI 한천에 플레이팅하였다.

[0157] **S. 에피더미디스 RP62A AIP의 대립유전자 대체.** 대립유전자 대체 플라스미드 pMAD(50)는 S. 에피더미디스 RP62A에서 agrD의 AIP 코딩 서열의 프레임 내(in-frame) 결실을 선택적으로 생성하는 데 사용되었다. 간단히 말하자면, RP62A의 AIP 서열의 상류 및 하류 대략 1000 bp 단편을 PCR에 의해 증폭시키고 오버랩 연장 또는 'SOEing'에 의한 유전자 스플라이싱에 의해 연결시켰다. 재봉된(sewn) 단편 및 pMAD 벡터를 BamHI 및 SalI로 소화시키고, T4 DNA 리가제(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))에 의해 함께 라이게이션한 후 S. 에피더미디스 클로날 복합체 10 플라스미드 인공 변형 E. 콜라이 균주 DC10B-CC10을 화학적으로 형질전환시키는 데 사용하였다. 형질전환체를 37°C에서 100  $\mu$ g/mL Amp 및 30  $\mu$ g/mL Cm으로 LB 상에 플레이팅하였다. 제한 다이제스트(restriction digest) 및 서열분석에 의해 올바른 형질전환체를 검증하였다. 확인된 구조물은 pMAD::  $\Delta$  AIP로 주석이 달렸다. 이어서 전기-적격 RP62A를 DC10B-CC10로부터 유래된 ~5  $\mu$ g의 pMAD::  $\Delta$  AIP로 형질전환한 다음에 10  $\mu$ g/mL Cm 및 50  $\mu$ L의 40 mg/mL 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴- $\beta$ -D-갈락토피라노시드(X-Gal)로 BHI 한천 상에 30°C에서 플레이팅하였다. 단일 청색 콜로니를 선택하고 30°C에서 밤새 10  $\mu$ g/mL Cm으로 BHI 중에서 성장시켰다. 이어서 밤새 배양물을 항생제 없이 1:100로(최종 부피 100 mL의 경우) 신선하고 예열된 BHI에 희석하고 43°C에서 24시간 동안 배양하였다. 43°C에서의 희석 및 성장을 추가 시간 동안 반복하여, 43°C에서 10  $\mu$ g/mL Cm 및 50  $\mu$ L의 40 mg/mL X-Gal이 보충된 BHI 한천 상에서 성장한 담청색 콜로니를 선택함으로써 단일 교차 사건(crossover event)을 촉진하였다. 담청색 콜로니를 선택하고 30°C에서 밤새 항생제 없이 BHI에서 인큐베이션하여 이중 교차 사건을 촉진하였다. 이 밤새 희석액을 50  $\mu$ L의 40 mg/mL X-Gal이 보충된 BHI 한천 상에 플레이팅하고 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 백색 콜로니를 선택하고 10  $\mu$ g/mL Cm 또는 50  $\mu$ L의 40 mg/mL X-Gal이 보충된 BHI 한천 상에 패치하였다. Cm의 존재 하에 성장하지 못하고 X-Gal의 존재 하에 백색으로 남아 있는 콜로니를 선택하고 서열분석에 의해 AIP 코딩 서열의 결실을 스크리닝하였다. 확인된 돌연변이체 균주는 S. 에피더미디스 RP62A  $\Delta$  AIP로서 주석이 달렸다.

[0158] **RNA 서열분석.** RNA는 라이브러리 준비 및 서열분석을 위해 캘리포니아 대학교 샌디에이고(University of California, San Diego)(UCSD) 계놈 핵심 시설에 제출되었다. TruSeq mRNA 라이브러리 준비 키트(Library Prep Kit)(일루미나(Illumina))를 라이브러리 준비에 사용한 후 HiSeq 2500 서열분석기(일루미나) 상에서 고처리량 서열분석을 수행하였다. 파르텍 플로우(Partek Flow) 및 파르텍 게노믹스 스위트(Partek Genomics Suite) 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 PANTHER 분류 시스템을 사용하여 유전자 온톨로지 분석을 수행하였다(<http://pantherdb.org>).

[0159] **조직학.** 전체 두께 무린 피부(0.5 cm<sup>2</sup>)를 수집하고, 파라포름알데히드(4%)에 고정시키고, PBS로 세척한 후에 30% 및 10% 수크로스로 밤새 인큐베이션한 후에 드라이아이스로 OCT 마운팅 배지에서 조직을 동결시켰다. 저온 유지장치(Cryostat) 커팅 절편(10 mm)을 슈퍼프로스트 플러스(Superfrost Plus) 유리 슬라이드(피셔 사이언티픽(Fisher Scientific)) 상에 마운팅하고 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 절편을 75% 내지 100%의 EtOH 구배에서 5분 간격 동안 인큐베이션한 후에 크실렌 인큐베이션 및 파라마운트 및 유리 슬라이드로 마운팅하였다. 올림푸스 BX51(일본 도쿄) 형광 현미경으로 200x 확대하여 사진을 촬영하였다.

[0160] **시토카인 수준 결정.** NHEK로부터의 컨디셔닝된 배지 (25  $\mu$ L)를 사용하여 다양한 시토카인의 단백질 농도를 정량화하였다. 3개의 인간 시토카인(IL-6, IL-8, TNF  $\alpha$ )에 대한 자기 비드-기반 밀리플렉스(Magnetic bead-based milliplex) 검정 키트(밀리포어)를 매그픽스(Magpix) 200(루미넥스(Luminex)) 시스템에 대한 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 인간 IL-1 $\alpha$  및 IL-36  $\alpha$ 를 ELISA(R&D 시스템즈(Systems))에 의해 정량화하였다.

[0161] **박테리아 CFU의 정량화.** S. 아우레우스 콜로니-형성 단위(CFU)를 37°C 인큐베이터에서 24시간 동안 텔루라이트를 가진 3% 난황 에멀전을 함유하는 베어드-파커 한천(Baird-parker agar)(BD) 플레이트 상에 10<sup>-1</sup> 내지 10<sup>-5</sup>의 연속 희석액(10  $\mu$ L)을 플레이팅해 내어 정량화하고 CFC를 계수하였다. 모든 스타필로코커스 균주에 대한 박테리아 CFU를 또한 분광 광도계를 사용하고 PBS에서 또한 1:20으로 희석된 세포의 OD600nm를 측정하여 근사치를 구하였다.

[0162] **경피 수분 손실 측정.** 표피 피부 장벽에 대한 손상을 결정하기 위해, 48-72 시간 동안 S. 아우레우스로 처리된

뮌린 피부의 경피 수분 손실(TEWL)을 테와미터(TEWAMETER) TM300(C & K)을 사용하여 측정하였다.

[0163] **트립신 활성 분석.** NHEK 컨디셔닝된 배지를 50  $\mu$ L에서 96-웰 흑색 바닥 플레이트(코닝)에 첨가한 후, 150  $\mu$ L의 펩티드 Boc-Val-Pro-Arg-AMC(트립신-유사 기질; 바켄)를 1x 소화 완충제(10 mM Tris-HCl pH 7.8) 중에서 200  $\mu$ M의 최종 농도로 첨가하고 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 상대 형광 강도(ex:354 nm, em:435 nm)를 스펙트라맥스 게미니 EM 형광계(써모피셔 사이언티픽)로 분석하였다. 뮌린 피부 트립신 활성 분석을 위해, 0.5cm<sup>2</sup> 전체 두께 피부를 1 mL의 1M 아세트산에서 비드-비팅(2.0 mm 지르코니아 비드, 각각 후 5분으로 2x 30초)한 후에 4°C에서 밤새 회전시켰다. 샘플을 원심분리(10분, 13,000 RPM, 4°C)하고, 새로운 미세원심분리관에 첨가한 후에 스피드백을 사용하여 모든 잔류 아세트산을 제거하여 단백질을 농축하였다. 단백질을 분자 등급의 물(500  $\mu$ L)에 재현탁시키고 4°C에서 밤새 회전시킨 후 또 다른 원심분리를 수행하였다. 투명 단백질 용해물을 새로운 튜브에 첨가하고, 단백질 농도를 결정하기 위해 BCA(바이오-래드) 분석을 사용하였다. 마지막으로, 10  $\mu$ g의 총 단백질을 96 웰 플레이트에 첨가한 후 상기와 같은 트립신 기질로 분석하였다.

[0164] **S. 아우레우스 agr 활성.** S. 아우레우스 USA300 LAC agr 유형 I P3-YFP(AH1677) 또는 S. 아우레우스 USA300 LAC agr 유형 I pAmi P3-Lux(AH2759) 리포터 균주를 사용하여 S. 아우레우스 agr 활성을 검출하였다. 시험관 내 실험을 위해, 1e6 CFU의 S. 아우레우스 USA300 LAC agr 유형 I P3-YFP를 300  $\mu$ L의 3%TSB에 100  $\mu$ L의 멸균-여과된 공생 상청액(25 부피%)과 함께 첨가하고, (250RPM) 24시간 37°C에서 진탕시켰다. 이어서 박테리아를 PBS(최종 200  $\mu$ L)에서 1:20으로 희석하고 상기한 바와 같은 형광계를 사용하여 YFP(ex: 495 nm, em: 530 nm)를 검출하고 분광 광도계에서 OD<sub>600nm</sub> 판독을 사용하여 박테리아 밀도를 결정하였다. 뮌린 실험을 위해, S. 아우레우스 USA300 LAC agr 유형 I pAmi P3-Lux 활성을 IVIS 기계를 사용하여 결정하고 라이브이미징(LiveImaging) 소프트웨어(퍼킨엘머(PerkinElmer))를 사용하여 방출된 광자(p/sec/cm<sup>2</sup>/sr)를 측정하여 2분 노출 후 발광 강도를 평가하였다..

[0165] **게놈 서열분석 및 어셈블링.** 디엔이지 울트라클린 마이크로바이알 키트(퀴아젠)를 사용하여 S. 호미니스 C5 게놈 DNA를 단리하였다. 라이브러리는 MiSeq 플랫폼(일루미나 인크. 캘리포니아주 샌디에이고)을 사용하여 2 사이클 동안 서열분석되어, 2x 250 bp 쌍형성-말단 판독을 생성하였다. 어댑터를 cutadapt(버전 1.9.1)를 사용하여 제거하였다(<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>). 디폴트 파라미터를 가진 트림 갈로어(버전 1.9.1)([https://www.biinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.biinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/))를 사용하여 품질이 낮은 서열(품질 점수 <30)을 제거할 수 있다. 인간 게놈에 대한 서열 맵핑은 인간 참조 게놈 hg19(UCSC 게놈 브라우저(Genome Browser)) 및 하기 파라미터(-D 20 -R 3 -N 1 -L 20 --매우 민감한-로컬)를 가진 보우티2 프로그램(버전 2.2.8)(51)을 사용하여 품질이 트리밍된 데이터셋으로부터 제거하였다. 필터링된 판독 값은 33-127 범위의 k-mer 길이를 가진 SPAdes(버전 3.8.0)(52)를 사용하여 새로 어셈블리하였다. 게놈은 디폴트 파라미터를 가진 서브시스템 기술(RAST)을 사용하여 미생물 게놈의 신속한 주석으로 주석을 달았다. 주석이 달린 CDS로부터의 아미노산 서열(코딩 DNA 서열)은 유니프로트(Uniprot) 데이터베이스(2017년 10월에 다운로드)로부터 수득된 박테리아 agr 단백질에 정렬시켰다. 어셈블리된 게놈으로부터의 Agr 유전자는 하기 3 가지 기준에 따라 식별되었다:(i) 서열 동일성 > 60%, (ii) e-값 < e100; 및 (iii) agr 유전자자리 조직화, 4개의 유전자의 오픈론, agrBDCA.

[0166] **마이크로바이옴 데이터 및 게놈 비교 분석.** 아토피성 피부염 피부에 대한 공개적으로 이용 가능한 샷건(shotgun) 메타게놈 데이터(metagenomic data)를 분석하였다. S. 아우레우스 및 S. 에피더미디스 균주의 상대적 존재도를 공개된 보충 자료([\[www.\]sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/9/397/eaal4651/DC1](http://www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/9/397/eaal4651/DC1))로부터 직접 입수하였다. agrD 특성 분석은 발적 AD 피부 상에 7개의 별개의 신체 부위에 대한 정보 및 객관적 SCORAD에 기초한 AD 증증도의 차이를 가진 8명의 환자(AD01, AD02, AD03, AD04, AD05, AD08, AD09, and AD11)로 제한되었다. 평가된 61 S. 에피더미디스 균주는 agrD 유전자 영역 내에서 알려진 agr 유형 I-III 서열과 아미노산 서열 비교를 통해 agr 유형 I, II 또는 III으로 분류되었다.

[0167] **정량화 및 통계 분석.** 비모수적 만-윌트니 검정을 AD를 가진 환자 메타게놈 데이터의 통계적 유의성 분석에 사용되었다. 다양한 도면 설명에 표시된 바와 같이 통계 분석을 위한 일원분산분석 또는 양방향 분산 분석. 모든 통계 분석은 그래프패드 프리즘 버전 6.0(그래프패드, 캘리포니아주 라 줄라)을 사용하여 수행되었다. 모든 데이터는  $\pm$  평균의 표준 오차(SEM)로 제시되며 P-값  $\leq$  0.05은 유의한 것으로 간주된다.

[0168] **S. 아우레우스에 의해 생성된 PSM  $\alpha$  및 프로테아제는 표피 장벽 손상을 유도한다.** 인간 피부의 주요 기능은 외부 환경에 대한 물리적 장벽을 확립하는 것이다. 페놀 용해성 모듈린(PSM)과 같은 S. 아우레우스에 의해 생성된 특정 독소는 상피 염증을 촉진할 수 있으며 AD에서 질환을 유발하는 열쇠가 될 것으로 제시되었다(19-22).

따라서, 피부 표면상의 S. 아우레우스가 어떻게 표피 장벽을 가로 질러 염증 활성화에 영향을 미칠 수 있는지 이해하기 위해, PSM $\alpha$  또는 PSM $\beta$  오페론에서의 표적화된 결실을 갖는 S. 아우레우스 USA300 LAC 균주에 노출되었을 때 단백질분해 활성을 발현하는 그의 능력에 대해 정상 인간 표피 각질형성세포(NHEK)를 평가하였다. PSM $\alpha$  생성은 트립신-유사 세린 프로테아제 활성의 유도 및 칼리크레인 6(KLK6)의 증가된 mRNA 수준에 필요하였다(도 14A-B). S. 아우레우스에서 PSM $\alpha$  및 PSM $\beta$  오페론은 PSM $\alpha$ 1-4 및 PSM $\beta$ 1-2를 포함한 별개의 펩티드를 함유한다. 따라서, 합성 PSM $\alpha$ 1-4 및 PSM $\beta$ 2 펩티드를 NHEK 상에서 시험하였고(도 14C) 모든 PSM $\alpha$  펩티드가 트립신 활성을 자극할 수 있으며 한편 PSM $\beta$ 2는 그렇지 않을 것이라는 것을 발견하였다. NHEK에서 가장 강한 PSM $\alpha$  트립신 활성 유도인자를 선택하여 그것이 용량 및 시간 의존적 방식 둘 다로 NHEK에서 트립신 활성 및 KLK6 mRNA 발현을 자극할 수 있음을 추가로 나타냈다(도 18). 더욱이, PSM $\alpha$ 3에 노출된 NHEK의 RNA-Seq에 의한 전사 프로파일링은 이 독소가 다수의 프로테아제(KLK, MMP), 물리적 장벽의 구성요소(필라그린, 테스모글레인-1, 로리크린, 케라틴), 항미생물성 펩티드, 및 시토카인을 포함한 피부 장벽과 관련된 유전자의 발현에 광범위한 영향을 미친다는 것을 나타냈다(도 14D-E, 도 18).

[0169] 생체내 표피 장벽 상에서 PSM $\alpha$  오페론의 역할을 검증하기 위해, 마우스를 동일한 수의 S. 아우레우스 USA300 LAC 야생형 또는 PSM $\alpha$  돌연변이체 균주로 피부 표면 상에서 72시간 동안 콜로니형성시켰다. 야생형 S. 아우레우스는 홍반, 스케일링 및 표피 비후를 유발하였으며, 한편 PSM $\alpha$ 의 부재 하에 박테리아 존재도의 어떤 변화도 관찰되지 않았다(도 14F). 증가된 표피 두께에도 불구하고, 피부 장벽 손상을 평가하기 위해 널리 확립된 방법인 경피 수분 손실(TEWL)의 증가가 야생형 S. 아우레우스에 노출된 후 관찰되었으나 PSM $\alpha$ 가 없을 때는 관찰되지 않았다(도 14G). 그러나, 생체내에서 완전히 분화된 표피의 피부 장벽 파괴는 S. 아우레우스 프로테아제 발현에 또한 의존적이었다. 아우레오리신, V8, 스타포파인 A/B, 및 Sp1A-F를 포함한 10 가지 주요 분비 프로테아제가 없는 S. 아우레우스 USA300 LAC 돌연변이체 균주를 사용하여, 손상의 가시적 증거 및 증가된 TEWL이 S. 아우레우스 프로테아제 결핍 방식으로 완전히 무손상 PSM $\alpha$  발현에도 불구하고 감소되었다(도 14F, H). PSM $\alpha$  또는 박테리아 프로테아제의 발현과 연관되는 것으로 관찰된 총 및 조직학적 변화와 일치하여, 각질형성세포 트립신 활성, Klk6 전사물 발현 및 시토카인 I16, I117a 및 I117f의 증가가 야생형 S. 아우레우스에 노출된 마우스에서만 측정되었으나 PSM $\alpha$  또는 프로테아제 결핍 균주에서는 아니었다(도 19). 더욱이, 피부 장벽 및 피부의 염증 환경의 변화에도 불구하고, S. 아우레우스 존재도는 이들 조건 하에 피부 표면 상에서 변하지 않았다(도 14I-J). 종합하면, 이들 데이터는 S. 아우레우스로부터의 PSM $\alpha$  및 프로테아제 활성의 생성이 표피 장벽의 손상을 결과하고 S. 아우레우스가 염증을 촉진하기 위해 이 장벽 손상이 필요하다는 것을 시사한다.(도 14I-J).

[0170] **S. 에피더미디스 자가-유도 펩티드는 S. 아우레우스 agr 활성을 억제한다.** 흥미롭게도, S. 아우레우스 PSM $\alpha$  펩티드 및 분비된 프로테아제 둘 다 agr 퀴럼 감지 시스템의 조절 하에 있다. S. 아우레우스 임상적 단리물은 더욱이 4개의 별개의 agr 유형을 가지며 여기서 agr 유형 I이 AD 대상체에서 가장 두드러진 것으로 밝혀졌다. 비록 AD에서 S. 아우레우스 피부 콜로니형성이 증가하긴 하지만, 풍부한 인간 피부 공생 유기체 S. 에피더미디스를 포함한 코아굴라제-음성 스타필로코커스(CoNS) 균주와 같은 다른 박테리아 종이 또한 존재하여, 이들 박테리아가 어떻게 신호전달하는지 이해하는 것이 필수적이 되도록 한다. S. 에피더미디스 agr 유형 I lab 단리물은 크로스토크(crosstalk) 메커니즘을 통해 S. 아우레우스 agr 유형 I-III 시스템을 억제하나 유형 IV는 아닌 자가유도 펩티드(AIP)를 생성하는 것으로 나타났으며, 한편 다른 S. 에피더미디스 agr 유형 II 및 III은 S. 아우레우스 agr 활성화에 미치는 그의 영향에 대해서는 거의 공지되어 있지 않다. S. 에피더미디스 agr 활성화가 S. 아우레우스 agr 시스템에 영향을 미칠 수 있는지 탐구하기 위해 agr 유형 I, II 또는 III을 가진 S. 에피더미디스 균주로부터의 컨디셔닝된 배양 상청액을 S. 아우레우스 USA300 LAC agr 유형 I 리포터 균주에 첨가하였다. 이 실험은 S. 에피더미디스 agr I이 S. 아우레우스 agr 활성화의 유일한 강력한 억제제이며 한편 S. 에피더미디스 agr 유형 II 및 III은 거의 효과가 없음을 확인해 주었다(도 15A). agrD 유전자 영역 내에 S. 에피더미디스 agr 유형 I AIP의 표적화된 결실은 S. 아우레우스 agr 활성을 억제하는 S. 에피더미디스의 능력을 폐지하였다(도 15B-C). S. 아우레우스 PSM $\alpha$  유도된 NHEK 트립신 활성은 표피 장벽 손상의 구성요소이므로, S. 에피더미디스 agr 유형 I 야생형 또는 AIP 녹아웃 균주를 이들이 이 결과에 영향을 줄 수 있는지 결정하기 위해 시험하였다. S. 아우레우스가 야생형 S. 에피더미디스 agr 유형 I 상청액의 존재 하에 배양되었지만 이 AIP가 없는 S. 에피더미디스에 의해 배양되지 않았을 때 S. 아우레우스 유도된 NHEK 트립신 활성이 억제되는 것으로 관찰되었다(도 15D). 전반적으로, 이들 실험은 NHEK 장벽 손상을 유도하는 S. 아우레우스 능력이 S. 에피더미디스 agr 유형 I AIP 발현에 의해 영향을 받을 수 있음을 확립하였다.

[0171] **AD 피부에 대한 S. 에피더미디스 agr 유형 I의 상대 존재도의 결핍.** S. 에피더미디스의 실험실 균주가 인간 각질형성세포의 기능에 미치는 S. 아우레우스의 영향에 영향을 줄 가능성을 확립하였으므로, 임상 환경에서 이들 박테리아의 존재도를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 7개의 신체 부위로부터 수집된 상이한 중증도의 AD를

가진 8명의 대상체의 피부 마이크로바이옴으로부터 이용 가능한 메타게놈 데이터(객관적 SCORAD에 기초)를 agr 유형에 기초하여 S. 에피더미디스 상대 존재도에 대해 분석하였다. 서열 정렬은 AD 환자에서 agr 유형 IIII에 기초하여 S. 에피더미디스 게놈을 확인하였고, AD 피부 상에서 가장 빈번한 S. 에피더미디스 agr 유형은 agr 유형 I의 것임을 결정하였다(도 15E). S. 에피더미디스 agr I과 S. 아우레우스의 비교는 S. 에피더미디스 agr 유형 I이 증가된 질량 중증도를 가진 AD 대상체에서 상대적으로 덜 풍부하다는 것을 나타냈다(도 15F-G). 이들 관찰은 AD 피부 마이크로바이옴에서 S. 에피더미디스 agr 유형 I의 존재를 확인해 주었고 임상 질환과의 연관 가능성을 시사한다.

[0172] **다양한 스타필로코커스 아우레우스 종 및 균주는 S. 아우레우스 agr 활성을 억제한다.** S. 아우레우스와 피부 마이크로바이옴의 다른 구성원 사이의 퀴럼 감지 상호작용의 생리학적 중요성을 추가로 확립하기 위해, CoNS의 상이한 AD 임상적 단리물을 S. 아우레우스 USA300 LAC agr 유형 I 퀴럼 감지 활성을 억제하는 그의 배양 상청액의 능력에 대해 시험하였다. S. 에피더미디스, S. 호미니스, 에스 와르네리 및 에스 캐피티스를 포함한 다양한 종은 S. 아우레우스의 agr 활성에 대해 강력한 억제 활성을 나타냈다(도 16A). S. 에피더미디스의 실험실 단리물과 유사하게, CoNS 균주는 성장물을 억제하지 않으면서 S. 아우레우스 agr 활성을 억제하였다(도 316S). 또한, S. 호미니스 균주 C5의 agrD AIP 코딩 영역의 게놈 서열분석은 S. 에피더미디스 agr 유형 I 코딩 영역의 서열과 유사하고 S. 호미니스 C5(도 16B; 서열번호: 4)에 대한 예측된 옥토머 AIP 서열을 가진 AIP 코딩 영역에서의 신규한 AIP 서열을 밝혀냈다. 활성 S. 호미니스 C5 상청액의 생화학적 기술은 S. 아우레우스 agr 활성의 억제가 80% 황산암모늄(펩티드)로 침전될 수 있는 <3kDa(작은 크기), pH 11 민감성(티 오락톤 고리) 인자에 의존한다는 것을 나타냈다(도 16C).

[0173] 다음으로, S. 아우레우스를 S. 호미니스 C5 멸균-여과된 상청액의 존재 하에 배양하고, 후속 배양 상청액을 도 14에서와 같이 NHEK에 적용하였다. S. 에피더미디스 agr 유형 I과 유사하게, S. 호미니스 C5는 NHEK에서 S. 아우레우스 유도된 트립신 활성, KLK6 전사물 생성, 및 IL-6 단백질 발현을 억제하였다(도 16D-F). 더욱이, S. 호미니스 C5는 agr 유형 II 및 III를 포함하지만 IV는 아닌 agr 유형 I의 가장 일반적인 임상적 단리물을 제외하고 다수의 S. 아우레우스 agr 시스템을 억제할 수 있을 것이다(도 17S). 이 발견은 S. 에피더미디스 agr 유형 I 시스템에서 관찰된 것과 일치한다. 전반적으로, 이들 관찰은 S. 에피더미디스 이외에 CoNS 종의 임상적 단리물이 퀴럼 감지를 사용하여 각질형성세포에 대한 S. 아우레우스 손상을 억제할 수 있음을 시사한다.

[0174] **임상적 CoNS 단리물은 AD를 촉진하는 S. 아우레우스 agr 활성 그의 활성을 억제한다.** 생체내에서 CoNS와 S. 아우레우스 사이의 퀴럼 감지 상호작용의 생리학적 관련성을 확립하기 위해, S. 아우레우스 USA300 LAC agr 유형 I P3-Lux 프로모터(발광) 균주를 사용하여 IVIS에 의해 S. 아우레우스 agr 활성을 평가하였다. 등 피부 상에 S. 아우레우스는 풍부한 agr 활성을 나타냈으나 생 S. 호미니스 C5의 존재 하에 경우는 S. 아우레우스 agr 활성이 억제되었다(도 17A-B). 더욱이, S. 호미니스 C5는 S. 아우레우스 존재도를 변경시키지 않으면서(도 17D) S. 아우레우스 유도된 피부 홍반 및 스케일링으로부터 또한 보호하였다(도 17C). 이 표현형은 염증, 장벽 파괴, 및 표피 프로테아제 활성 및 K1k6 발현에 대한 개선된 증거와 연관이 있었다(도 17E-H). 더욱이, S. 아우레우스가 <3kDa 농축된 S. 호미니스 C5 상청액의 존재 하에 무린의 등 피부에 적용될 때, S. 아우레우스 존재도의 변화 없이 장벽 손상 및 염증의 유사한 감소가 관찰되었다.(도 22). 이들 데이터는 피부 CoNS 미생물 공동체가 종간 퀴럼 감지 활성에 의해 상피 장벽 항상성을 촉진하는 신규한 AIP를 함유할 가능성이 있음을 나타낸다.

[0175] 본 발명의 다수의 실시양태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 본 개시내용의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 다른 실시양태는 하기 청구범위의 범위 내에 있다.

[0176]

[0177] 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)

[0178] 수탁번호 : PTA125202

[0179] 수탁일자 : 2018828

[0180] 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)

[0181] 수탁번호 : PTA125203

[0182] 수탁일자 : 2018828

[0183] 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)

[0184] 수탁번호 : PTA125204

[0185] 수탁일자 : 2018828

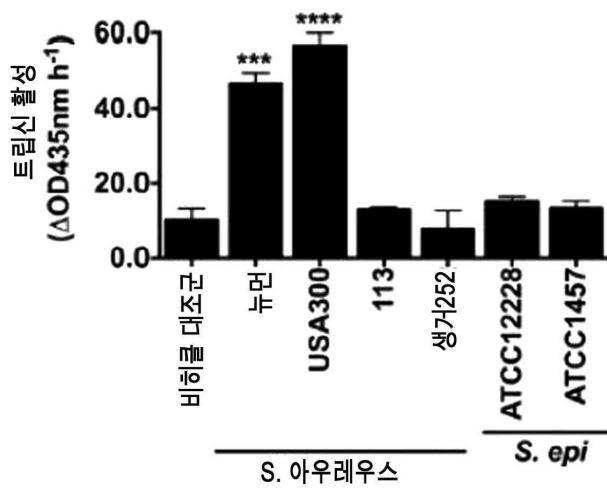
[0186] 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)

[0187] 수탁번호 : PTA125205

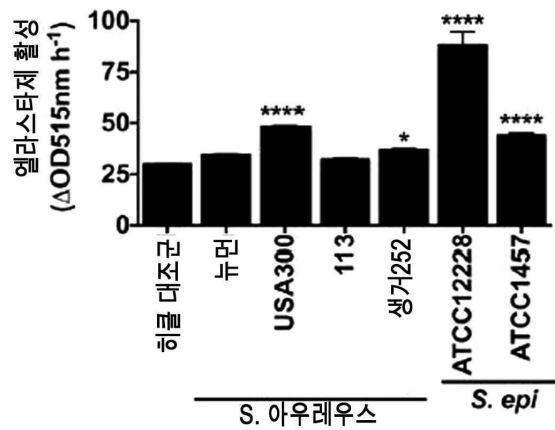
[0188] 수탁일자 : 2018828

도면

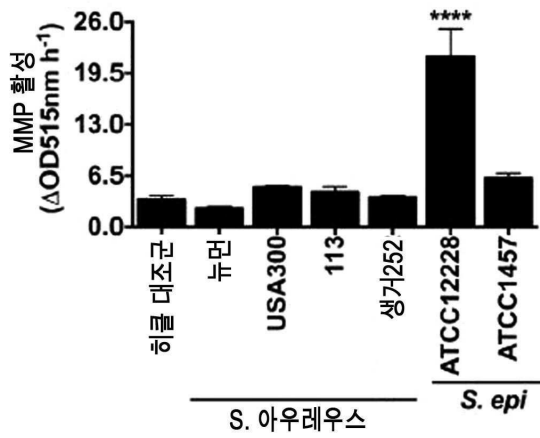
도면1a



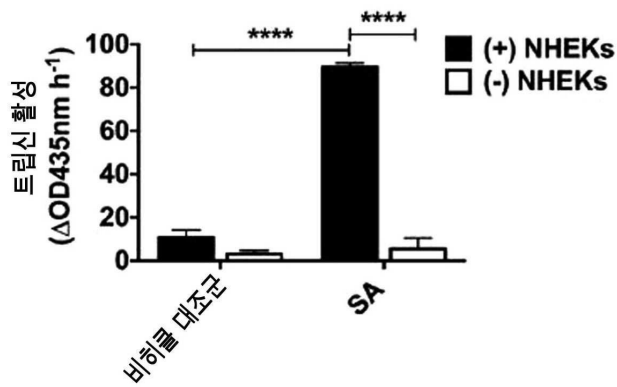
도면1b



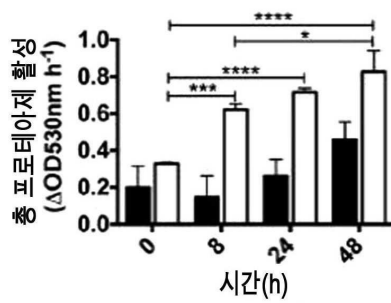
도면1c



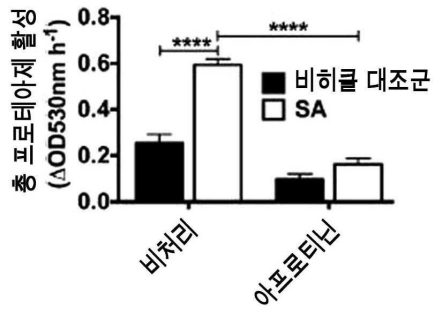
도면1d



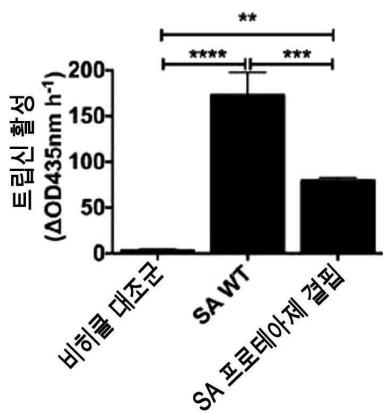
도면2a



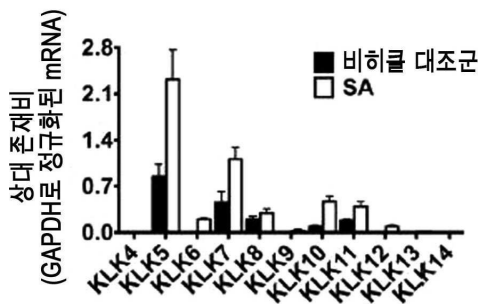
도면2b



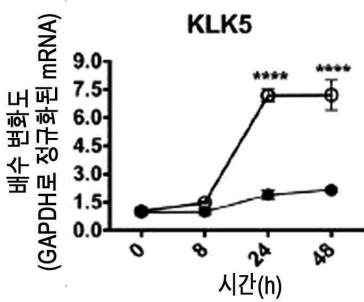
도면2c



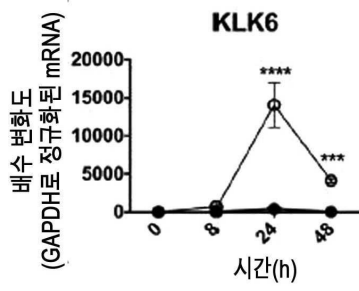
도면3a



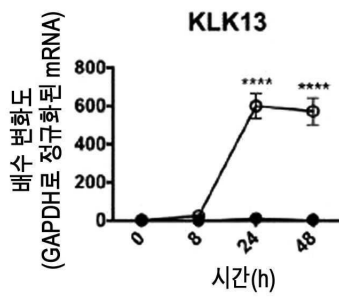
도면3b



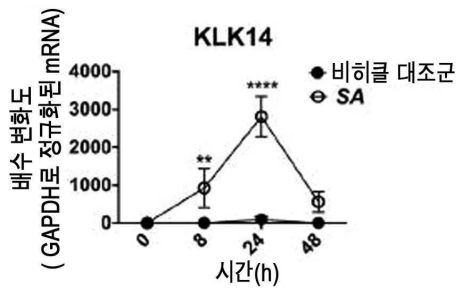
도면3c



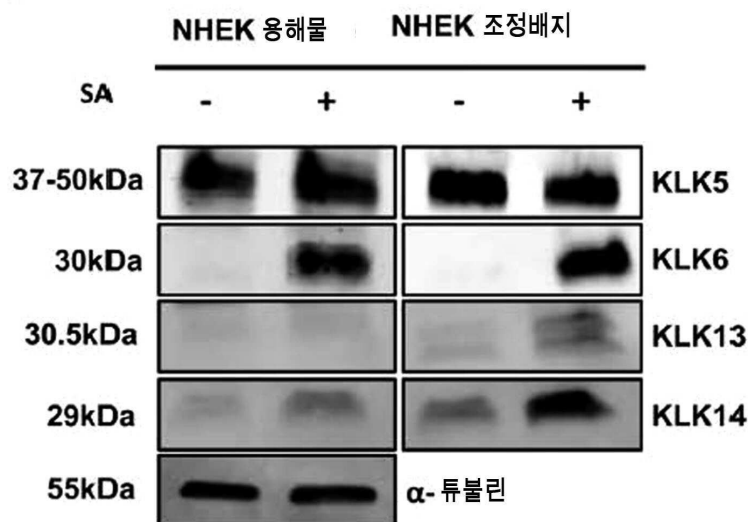
도면3d



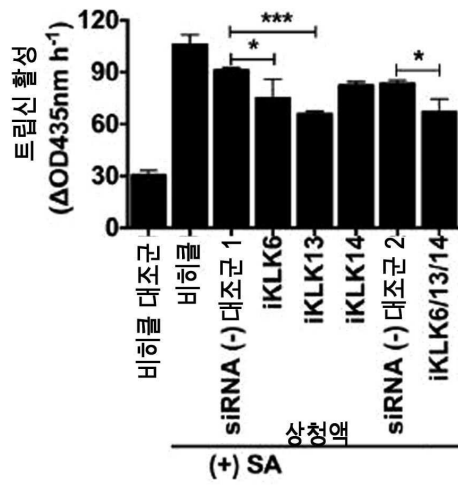
도면3e



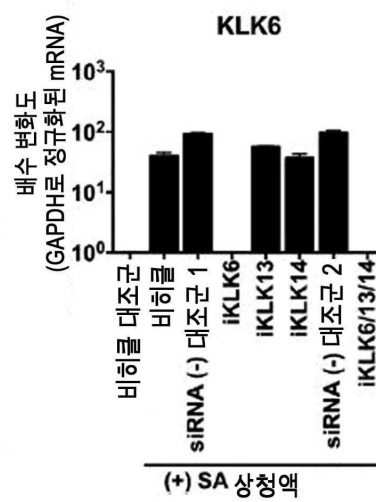
도면3f



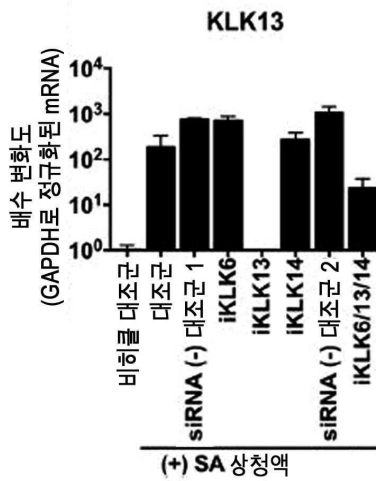
도면4a



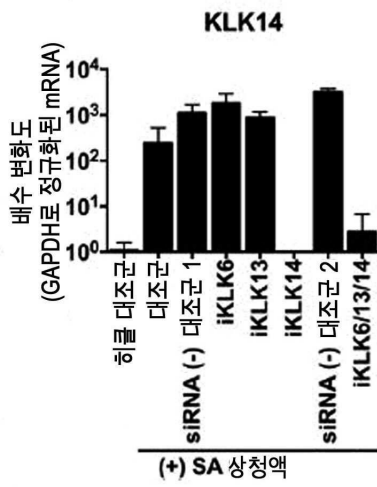
도면4b



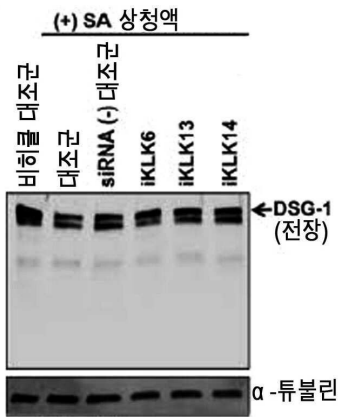
도면4c



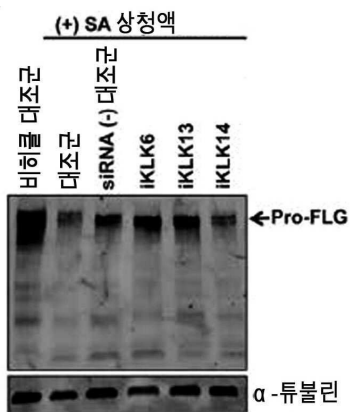
도면4d



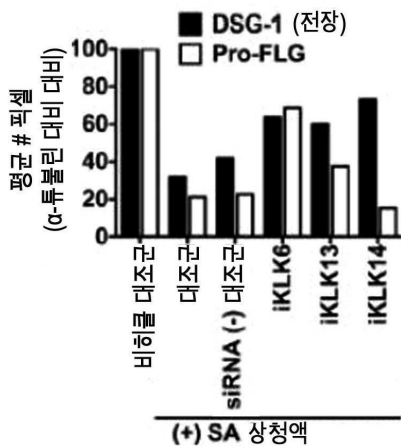
도면5a



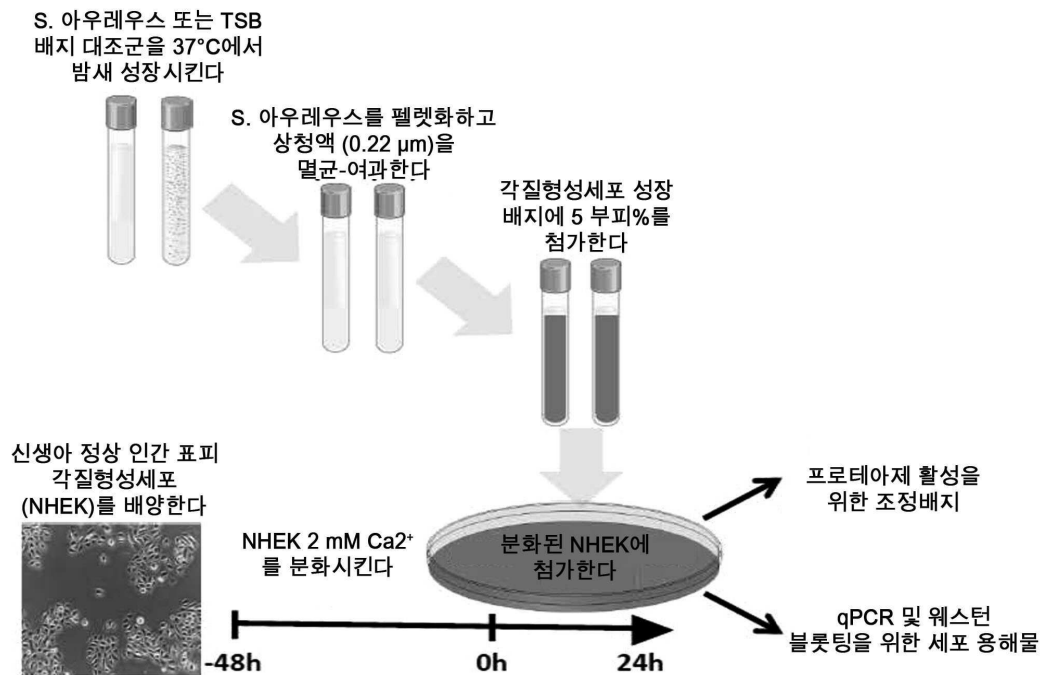
도면5b



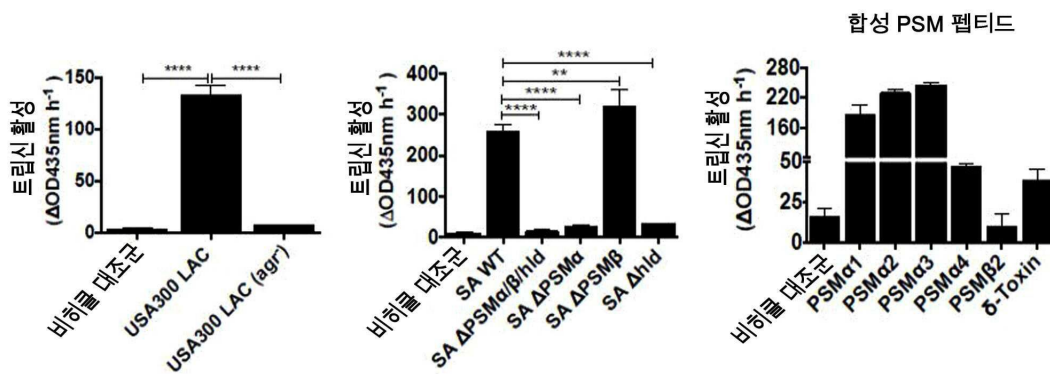
도면5c



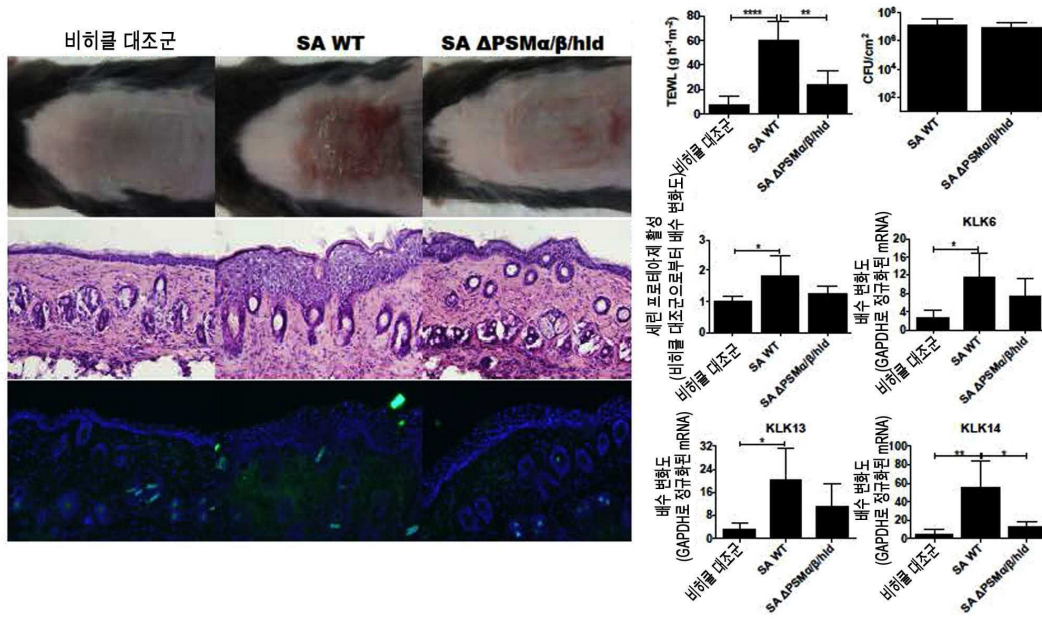
도면6



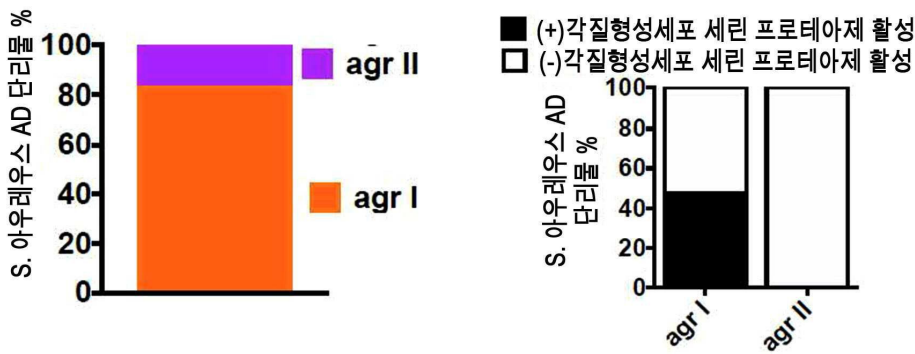
도면7



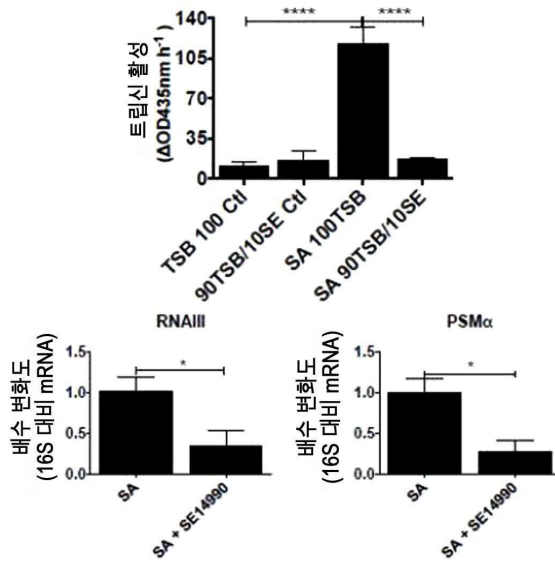
도면8



도면9

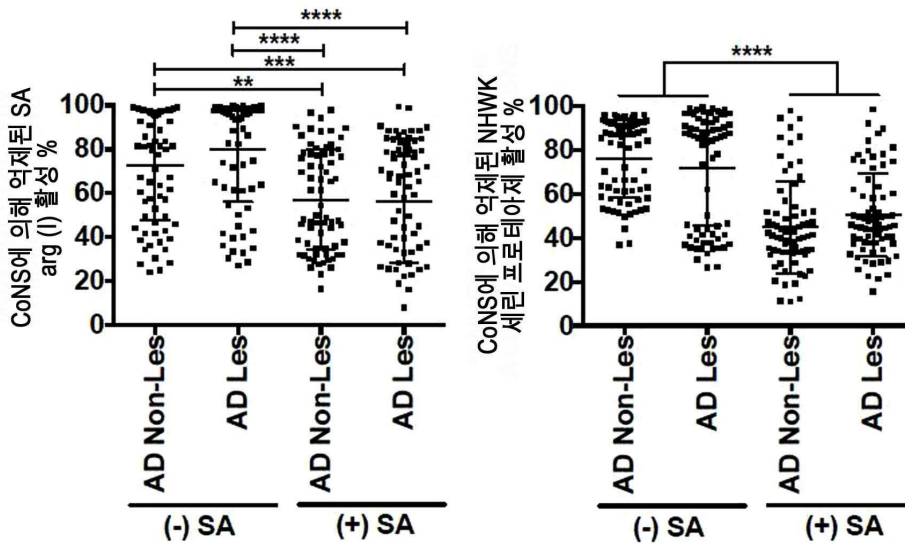


도면10



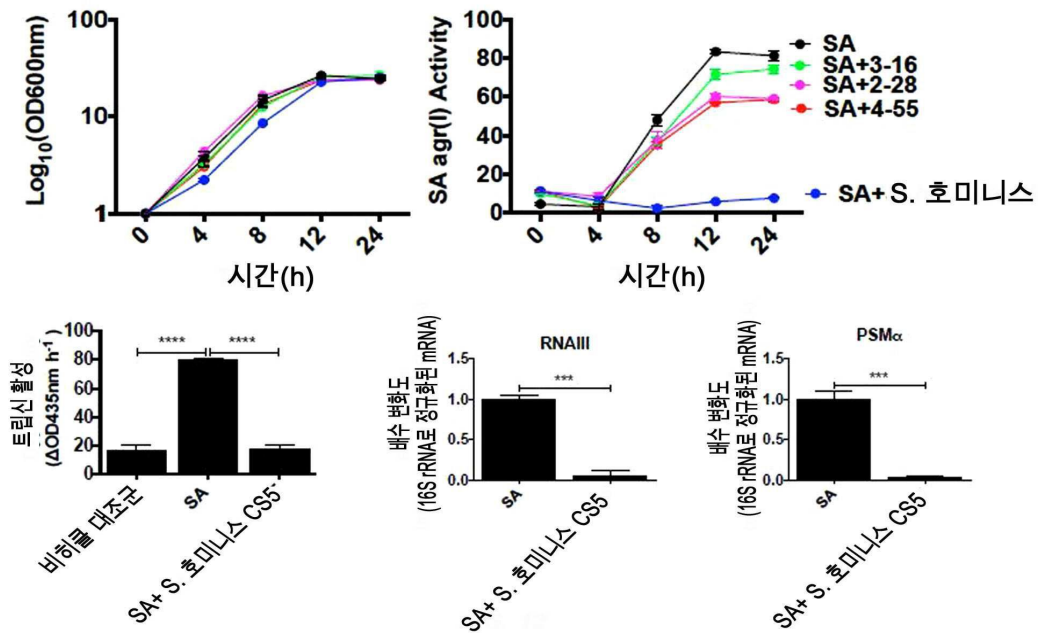
1. S. 아우레우스를 밤새 +/- 10% 멸균-여과된 ATCC 14990 조정배지에서 성장시킨다
2. S. 아우레우스를 펠렛화하고 상청액을 멸균-여과한다
3. 5 부피%를 각질형성세포에 24 시간 동안 첨가한 후에 분석한다

도면11

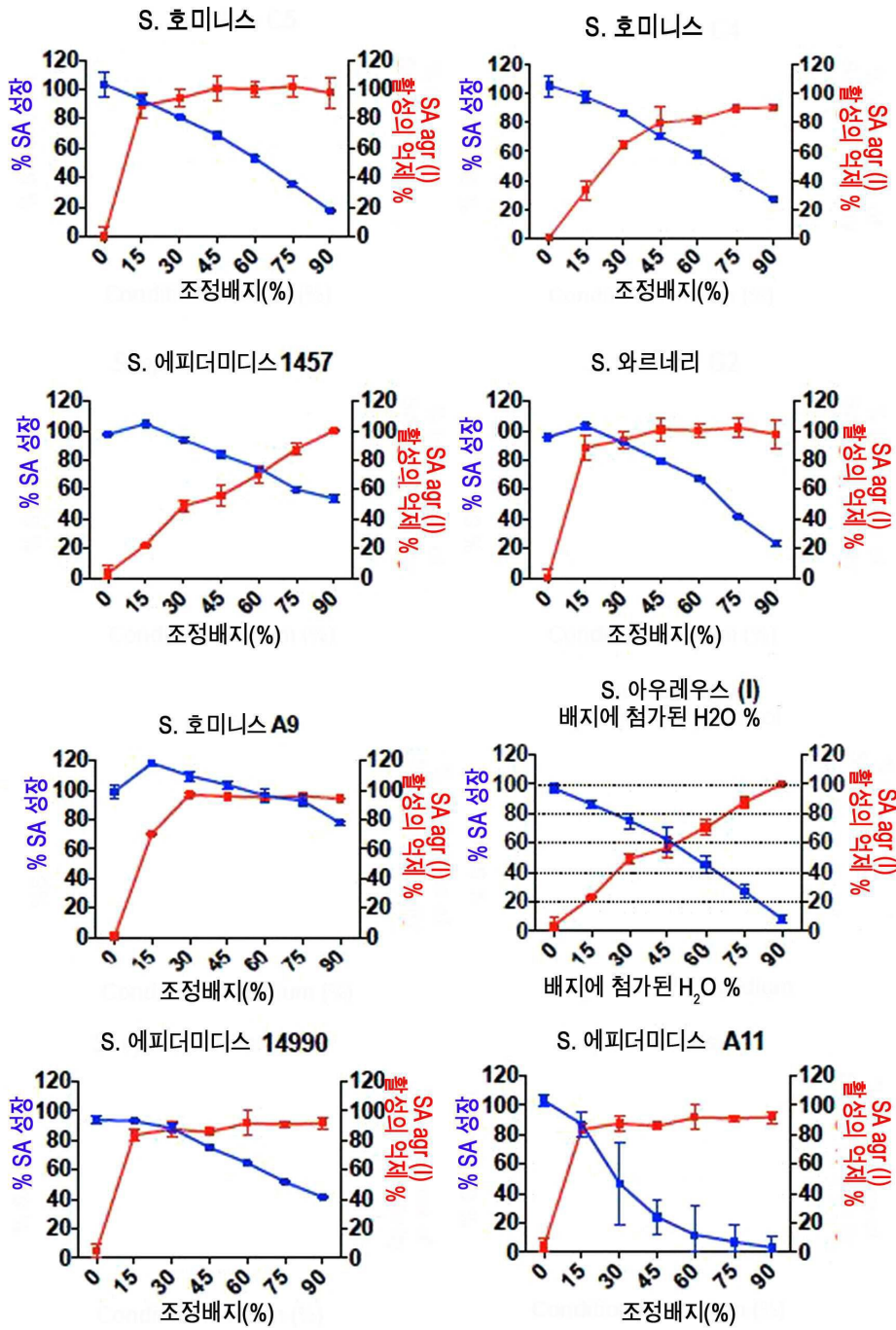


\* 조건당 4명의 환자 및 군당 72 CoNS  
 \* 24시간 동안 50% CoNS 멸균-여과된 상청액의 첨가와 함께 사용된 YFP P3 agr I S. 아우레우스 리포터 균주

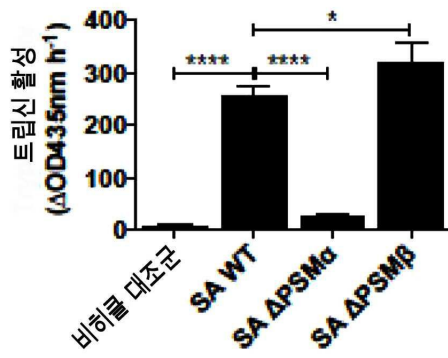
도면12



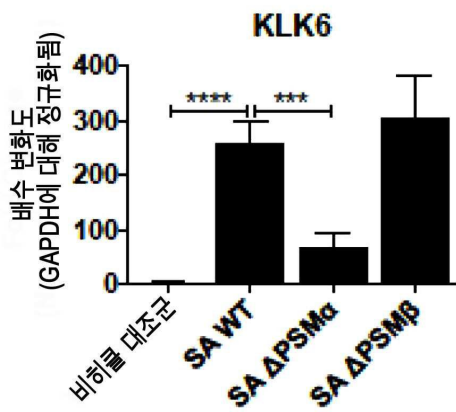
도면13



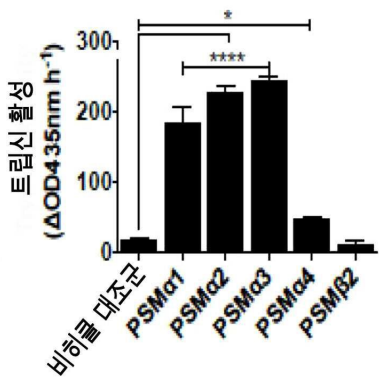
도면14a



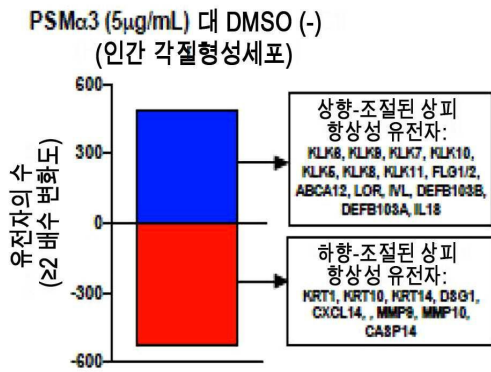
도면14b



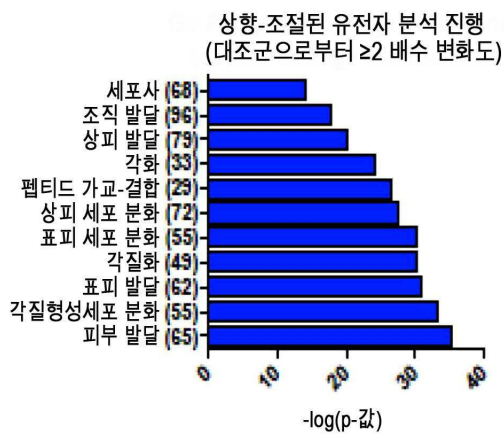
도면14c



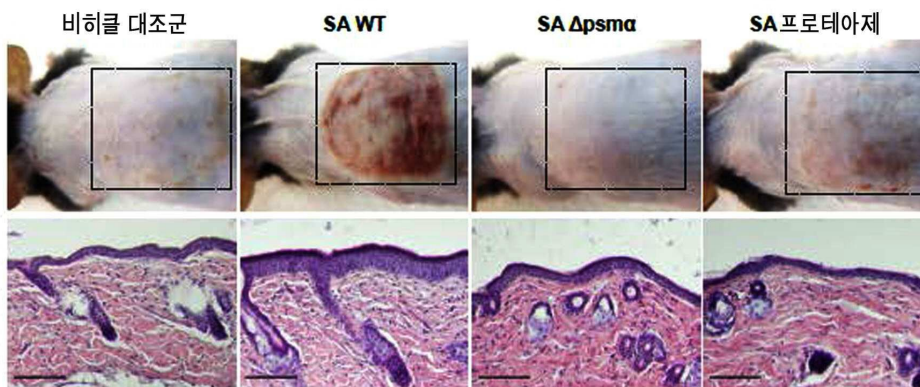
도면14d



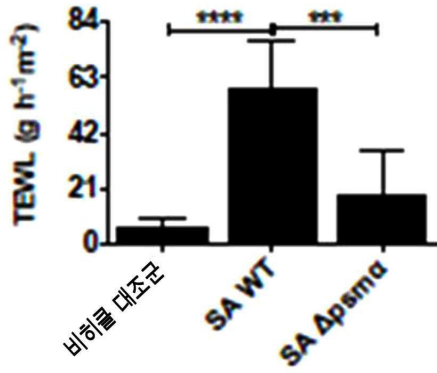
도면14e



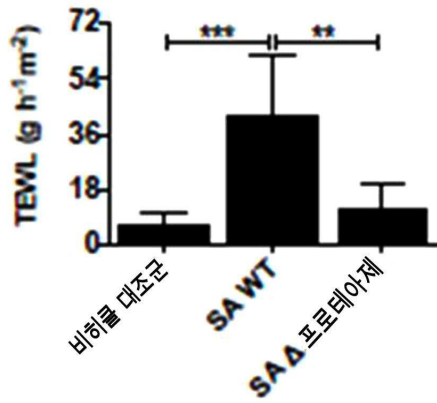
도면14f



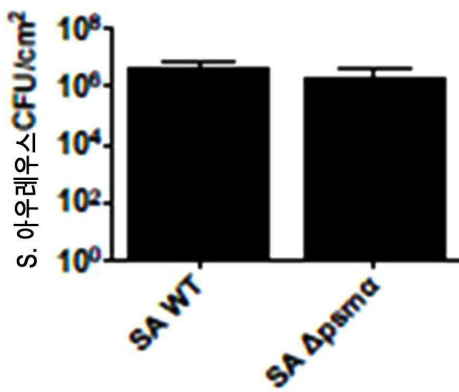
도면14g



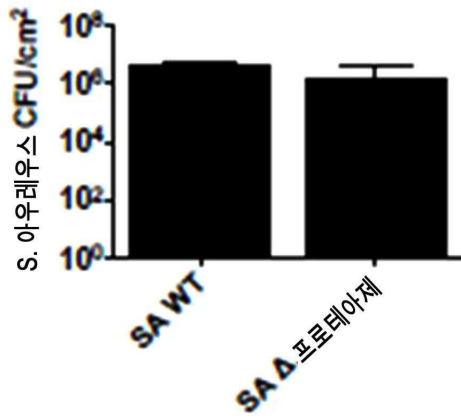
도면14h



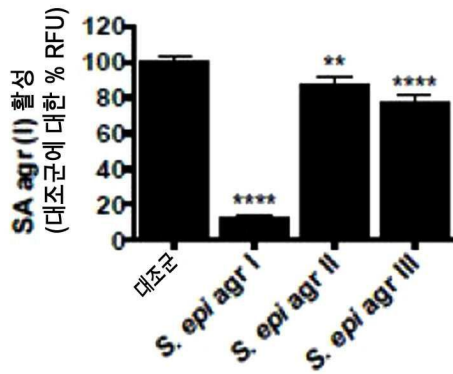
도면14i



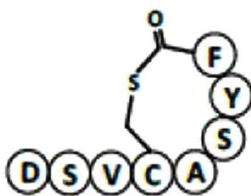
도면14j



도면15a

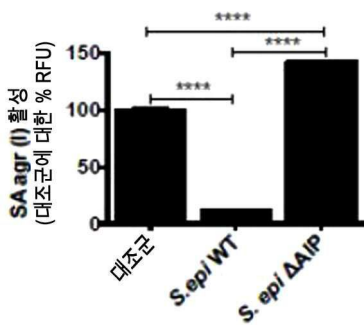


도면15b

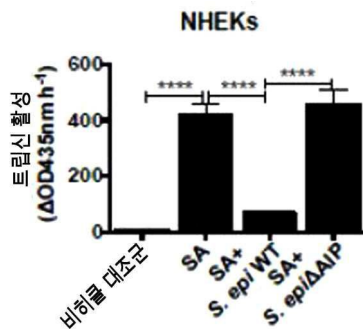


S. 에피더미디스  
agr 유형 I AIP

도면15c



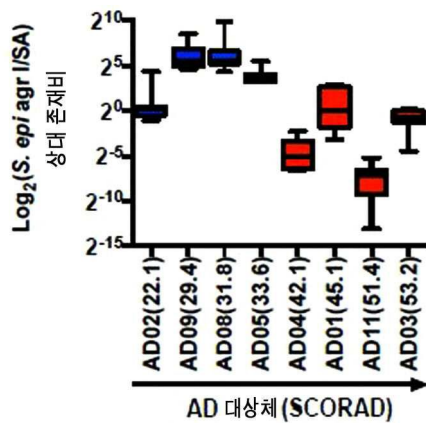
도면15d



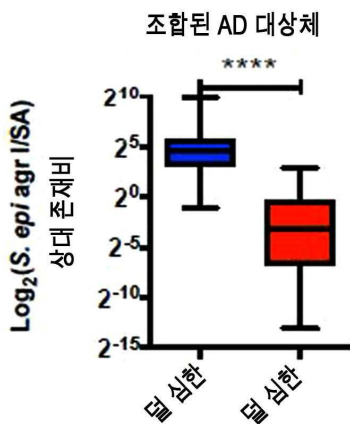
도면15e

S. epi agr 유형
(AD 피부 상의 #S. epi 개체)
S. epi agr I (32)
S. epi agr II (15)
S. epi agr III (13)

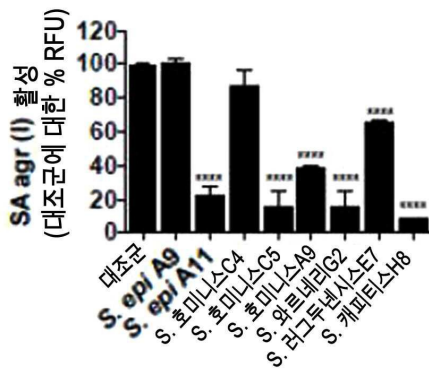
도면15f



도면15g

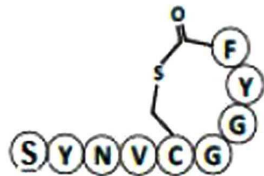


도면16a



도면16b

예측된 AIP 구조

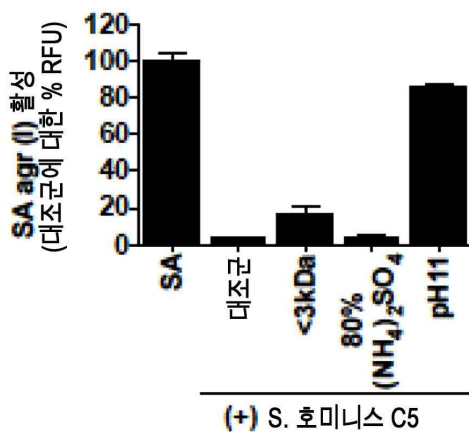


S. 호미니스 C5 (활성)  
(활성)

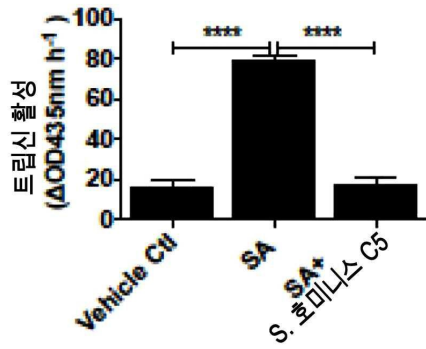
Strains	N-말단	AIP 코딩 영역	C-말단
S. epi agr 유형 I	MEIIPNLPKIPFTTILEP <b>IG</b>	TVAGDSV <b>C</b> ASTP	DEPEV <b>P</b> ELTKLYE
S. epi agr 유형 II	MNLLGGLLLRIPSNPMAV <b>IG</b>	NASKY <b>N</b> PCSNYL	DEPQV <b>P</b> ELTKLDE
S. epi agr 유형 III	MNLLGGLLLRIPSNPMAV <b>IG</b>	NASKY <b>N</b> PCASTL	DEPQV <b>P</b> ELTKLDE
S. hominis C5 (Active)	MEPITDLPIKLPSSLILETV <b>G</b>	TLAS <b>T</b> NVCGGTP	DEPEV <b>P</b> KELTDLNR

\* agrD 서열에서 보존된 영역  
\*공지된 AIP 구조

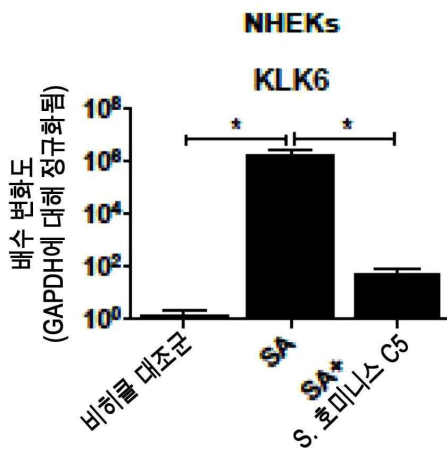
도면16c



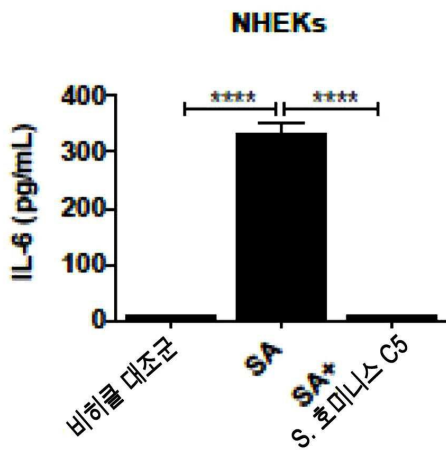
도면16d



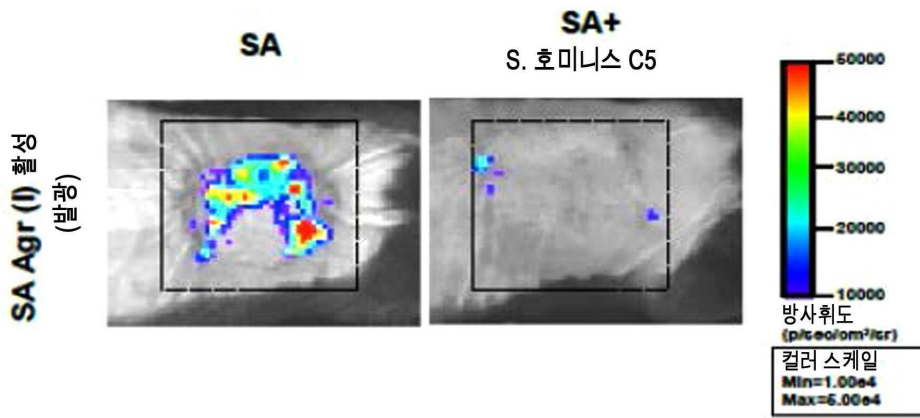
도면16e



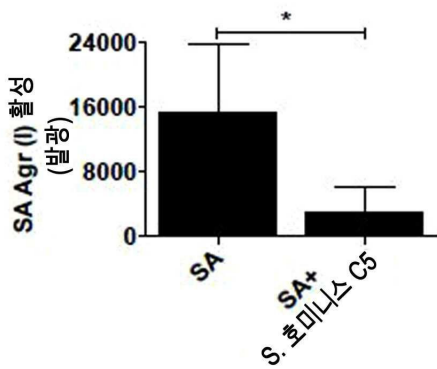
도면16f



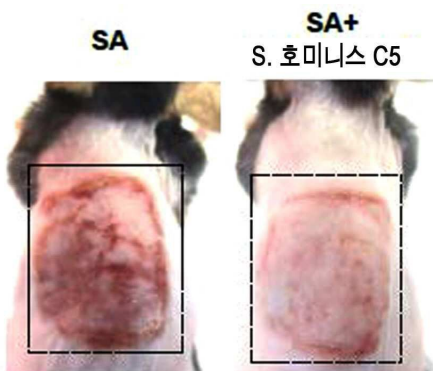
도면17a



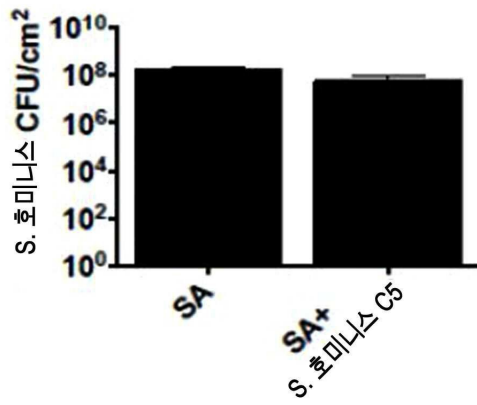
도면17b



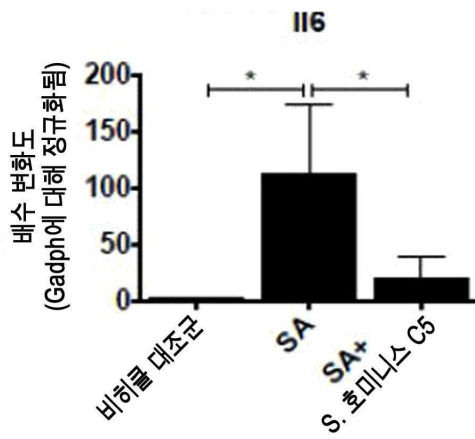
도면17c



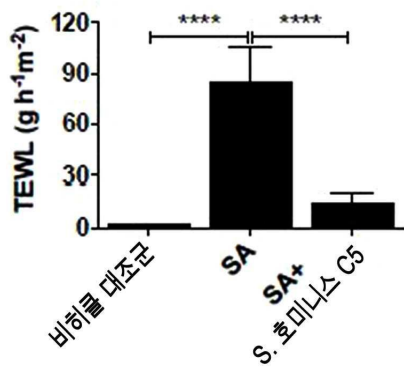
도면17d



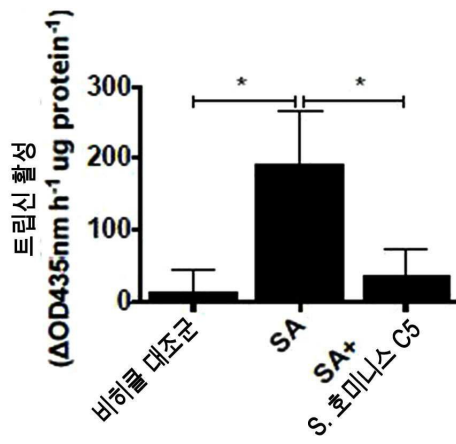
도면17e



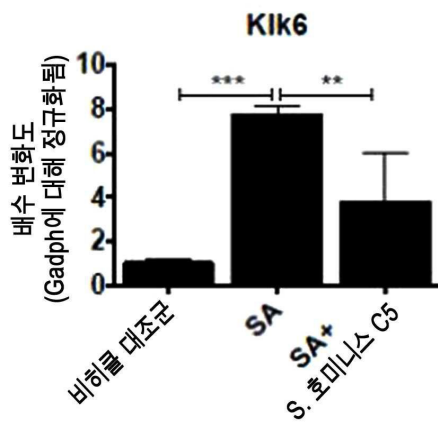
도면17f



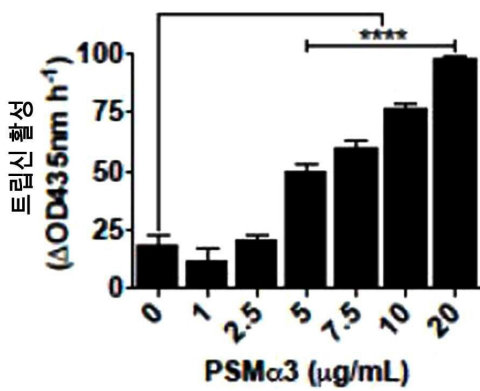
도면17g



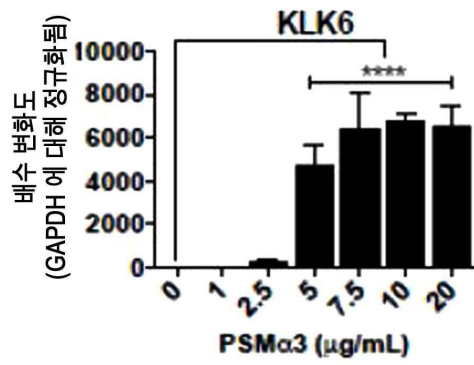
도면17h



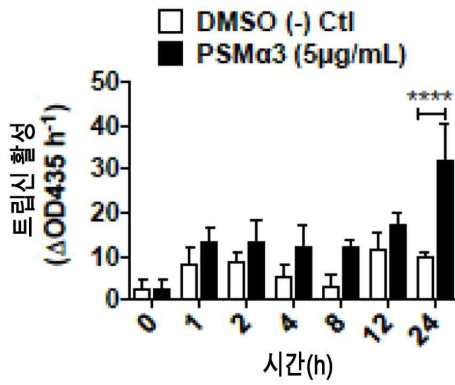
도면18a



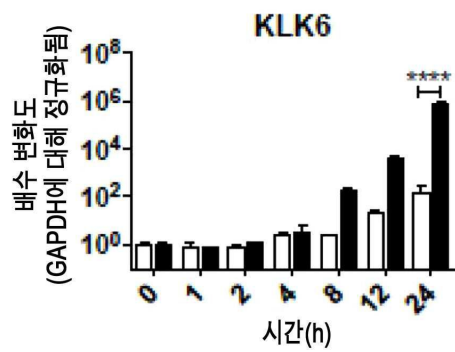
도면18b



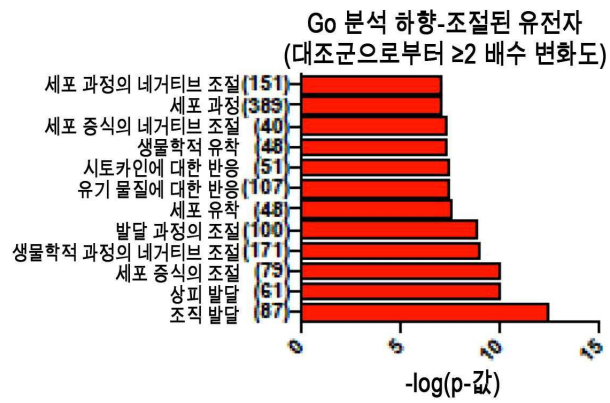
도면18c



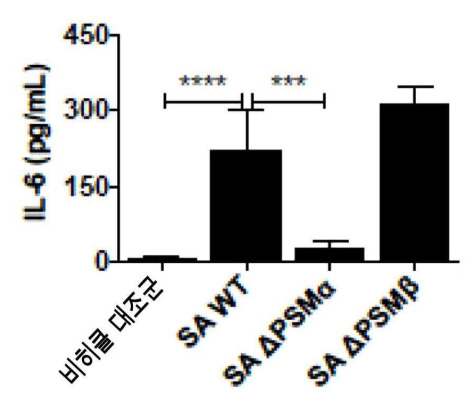
도면18d



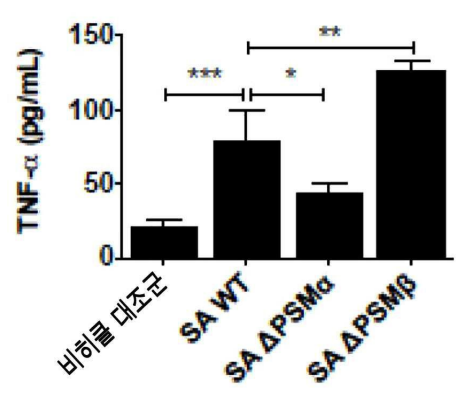
도면18e



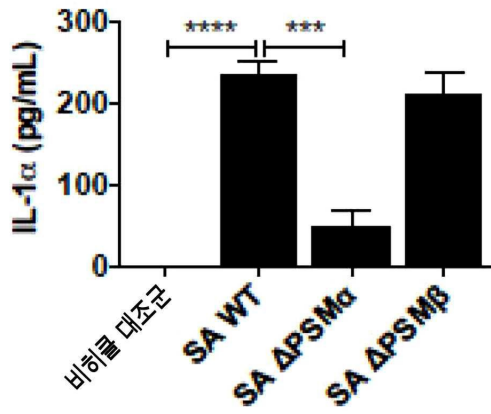
도면18f



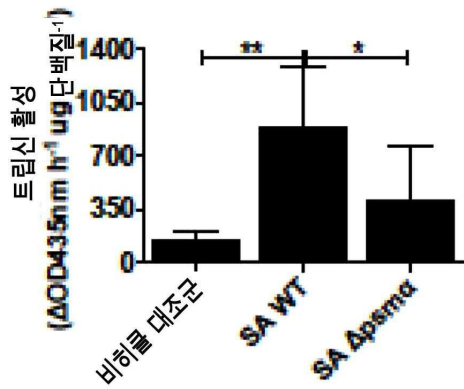
도면18g



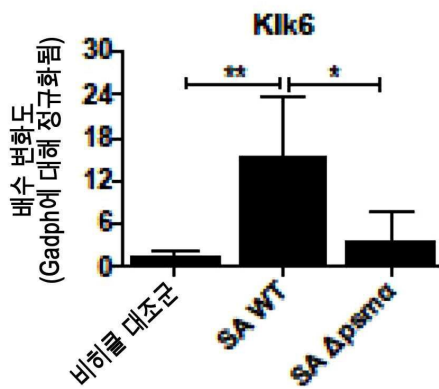
도면18h



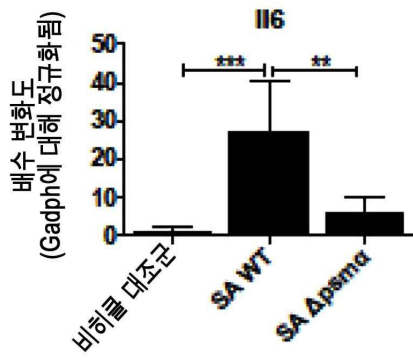
도면19a



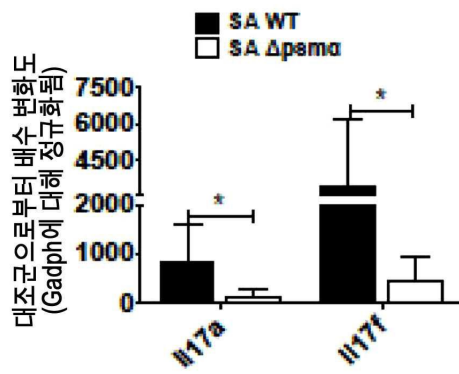
도면19b



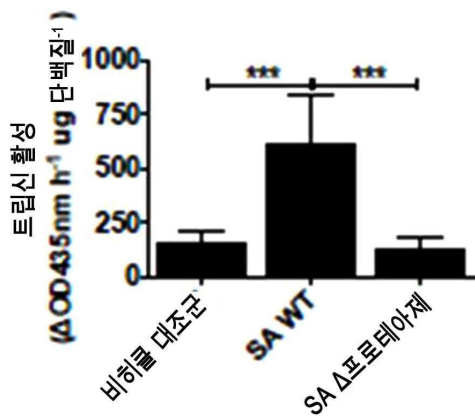
도면19c



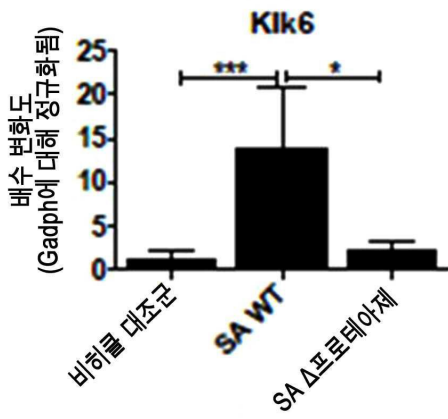
도면19d



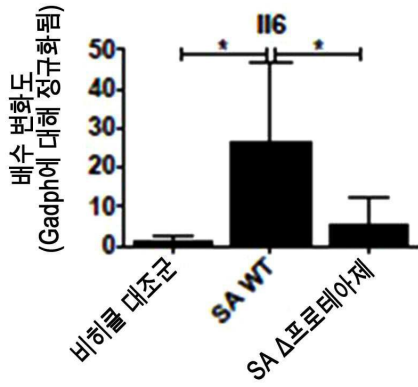
도면19e



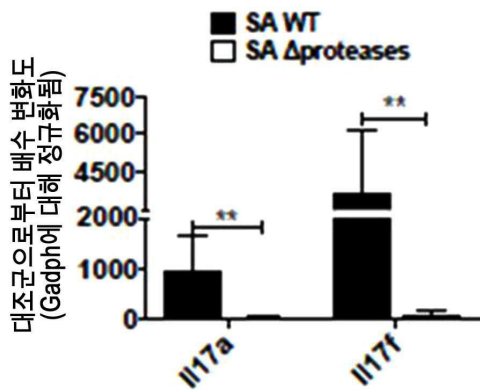
도면19f



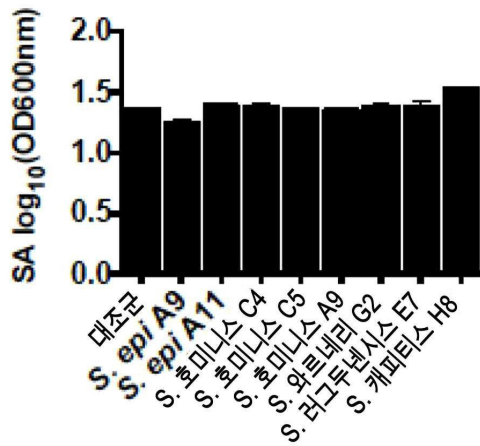
도면19g



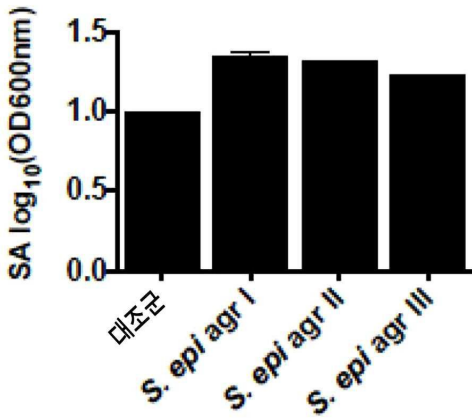
도면19h



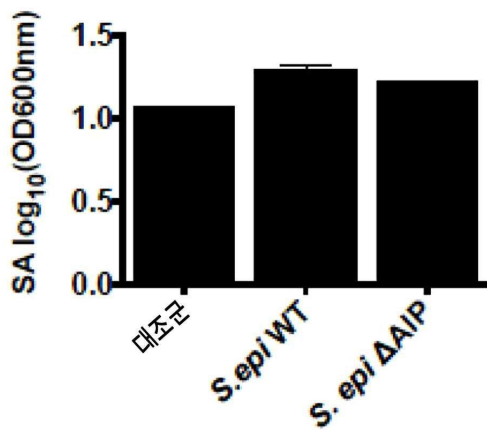
도면20a



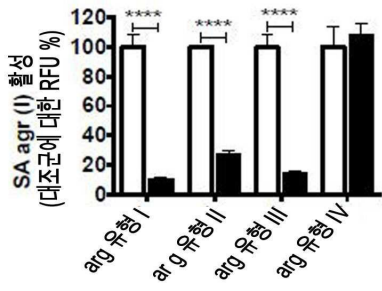
도면20b



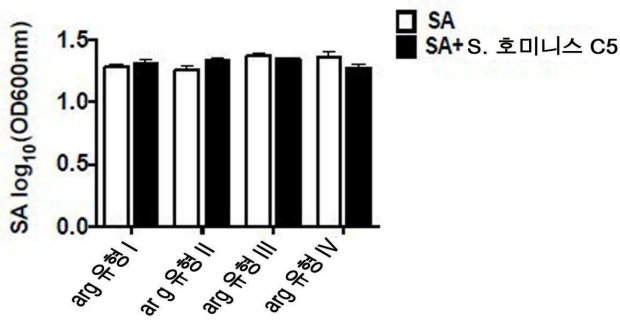
도면20c



도면21a



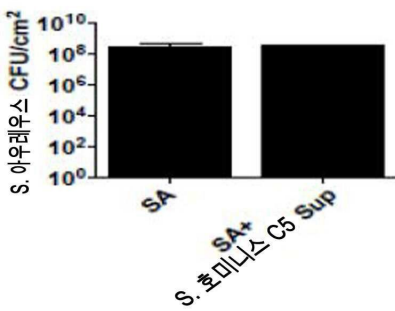
도면21b



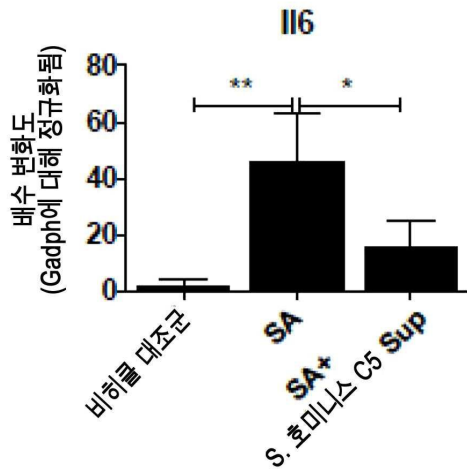
도면22a



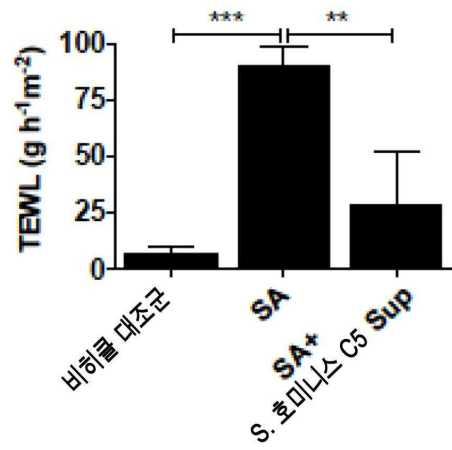
도면22b



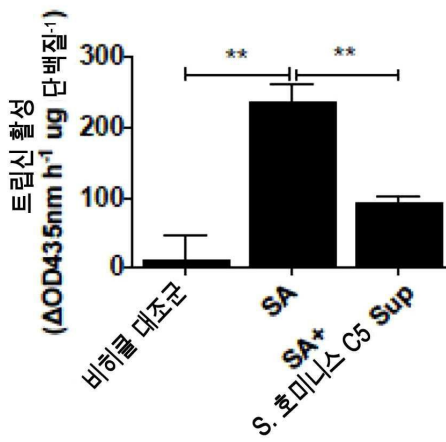
도면22c



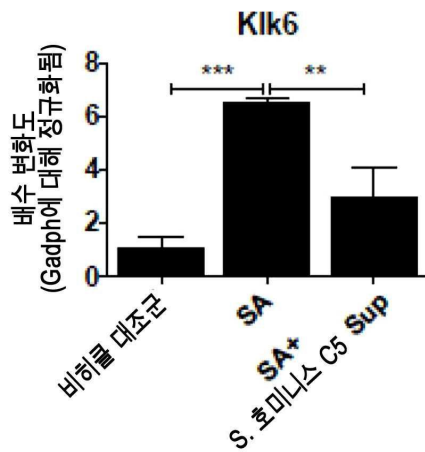
도면22d



도면22e



도면22f



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Regents of the University of California

<120> MOLECULAR BACTERIOTHERAPY TO CONTROL SKIN ENZYMATIC ACTIVITY

<130> 00015-332W01

<140> Not yet assigned

<141> 2018-08-31

<150> US 62/553,025

<151> 2017-08-31

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 141

<212> DNA

<213> Staphylococcus hominis

<220><221> CDS

<222> (1)..(141)

<400> 1

atg aca ttt att aca gat tta ttc att aaa cta ttc tca tta atc tta 48

Met Thr Phe Ile Thr Asp Leu Phe Ile Lys Leu Phe Ser Leu Ile Leu

1 5 10 15

gaa act gtt ggt aca ctt gct tca tat aat gta tgt ggt ggt tat ttc 96

Glu Thr Val Gly Thr Leu Ala Ser Tyr Asn Val Cys Gly Gly Tyr Phe  
 20 25 30  
 gat gaa cct gaa gtt cct aaa gaa tta act gat ctt aat aga taa 141  
 Asp Glu Pro Glu Val Pro Lys Glu Leu Thr Asp Leu Asn Arg

35 40 45  
 <210> 2  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus hominis  
 <400> 2

Met Thr Phe Ile Thr Asp Leu Phe Ile Lys Leu Phe Ser Leu Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Val Gly Thr Leu Ala Ser Tyr Asn Val Cys Gly Gly Tyr Phe  
 20 25 30  
 Asp Glu Pro Glu Val Pro Lys Glu Leu Thr Asp Leu Asn Arg  
 35 40 45

<210> 3  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Coding fragment from S. hominis  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(27)  
 <400> 3

tca tat aat gta tgt ggt ggt tat ttc 27  
 Ser Tyr Asn Val Cys Gly Gly Tyr Phe

1 5  
 <210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 4

Ser Tyr Asn Val Cys Gly Gly Tyr Phe

1 5

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenol Soluble Modulin alpha-1

<400> 5

Met Gly Ile Ile Ala Gly Ile Ile Lys Val Ile Lys Ser Leu Ile Glu

1 5 10 15

Gln Phe Thr Gly Lys

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenol Soluble Modulin alpha-2

<400> 6

Met Gly Ile Ile Ala Gly Ile Ile Lys Phe Ile Lys Gly Leu Ile Glu

1 5 10 15

Lys Phe Thr Gly Lys

20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenol Soluble Modulin alpha-3

<400> 7

Met Glu Phe Val Ala Lys Leu Phe Lys Phe Phe Lys Asp Leu Leu Gly

1 5 10 15

Lys Phe Leu Gly Asn Asn

20

<210> 8

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Phenol Soluble Modulin alpha-4

<400> 8  
 Met Ala Ile Val Gly Thr Ile Ile Lys Ile Ile Lys Ala Ile Ile Asp  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Phe Ala Lys  
                   20

<210> 9  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Phenol Soluble Modulin beta-2

<400> 9  
 Met Thr Gly Leu Ala Glu Ala Ile Ala Asn Thr Val Gln Ala Ala Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Gln His Asp Ser Val Lys Leu Gly Thr Ser Ile Val Asp Ile Val Ala  
                   20                    25                    30

Asn Gly Val Gly Leu Leu Gly Lys Leu Phe Gly Phe  
                   35                    40

<210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> AIP consensus sequence  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is S, K, V, G or T  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Y, Q, A, or I  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is N, S, T, or D  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa is V, P, M, or T  
 <220><221>  
 > MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa is G, S, A, N, or T  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa is G, N, T, or L  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Y or F  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Y, F or L  
 <400> 10  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5  
 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> AIP peptide from *S. epidermidis* strain A11  
 <400> 11  
 Lys Tyr Asn Pro Cys Ser Asn Tyr Leu  
 1 5  
 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> AIP peptide from *S. hominis* strains A9 and C4

<400> 12

Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Thr Tyr Phe

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIP peptide from *S. hominis*

<400> 13

Ser Gln Thr Val Cys Ser Gly Tyr Phe

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIP peptide from *S. hominis* and *S. capitis*

<400> 14

Gly Ala Asn Pro Cys Ala Leu Tyr Tyr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIP peptide from *S. hominis*

<400> 15

Thr Ile Asn Thr Cys Gly Gly Tyr Phe

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIP peptide from *S. lugdunensis*

<400> 16

Val Gln Asp Met Cys Asn Gly Tyr Phe

1                    5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIP peptide from *S. warneri* strain G2

<400> 17

Gly Tyr Ser Pro Cys Thr Asn Phe Phe

1                    5