



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월20일
(11) 등록번호 10-2340006
(24) 등록일자 2021년12월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2015.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7033500
- (22) 출원일자(국제) 2017년04월18일
심사청구일자 2020년04월13일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월19일
- (65) 공개번호 10-2019-0003582
- (43) 공개일자 2019년01월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/028133
- (87) 국제공개번호 WO 2017/184601
국제공개일자 2017년10월26일
- (30) 우선권주장
62/324,762 2016년04월19일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2003047533 A2
WO2006036406 A2

- (73) 특허권자
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리
프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브
헬쓰 앤드 휴먼 서비씨즈
미국, 메릴랜드주, 베데스다, 엠에스 7788, 6701
로클레지 드라이브, 스위트 700, 오피스 오브 테
크놀로지 트랜스퍼, 내셔널 인스티튜츠 오브 헬스
(우편번호: 20892)
- (72) 발명자
마일스 이안 안테니
미국 20892 메릴랜드주 베세즈다 록빌 파이크
9000 빌딩 33 룸 2더블유10에이
다타 산딕 케이
미국 20892 메릴랜드주 베세즈다 록빌 파이크
9000 빌딩 33 룸 2더블유10에이
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 아토피 피부염을 치료하기 위한 그램 음성 중의 용도

(57) 요약

본 명세서는 치료적 유효량의 정제된 생존 그램 음성 박테리아 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 개시한다. 상기 약학 조성물은 국소 투여용으로 제제화된다. 이러한 약학 조성물을 사용하여 아토피 피부염을 치료하는 방법도 개시한다.

(52) CPC특허분류

A61L 15/44 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료를 필요로 하는 대상체의 아토피 피부염 치료를 위한 약학 조성물로서,

아토피 피부염의 치료를 위한 유효량으로 존재하는 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사(*Roseomonas mucosa*) 균주; 및

약학적으로 허용되는 담체

를 포함하며, 상기 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주는 생균이고 기증자 대상체의 피부로부터 단리 또는 증식된 것인 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기증자 대상체가 아토피 피부염을 갖지 않는 것인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 국소 제형으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 크림, 겔, 살브, 폼, 연고 및 액체로 이루어진 군으로부터 선택되는 국소 제형으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 $10^4 \sim 10^{12}$ 콜로니 형성 단위의 양으로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 정제된 것인 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 5종 이하의 로세오모나스 뮤코사 균주를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 3종 이하의 로세오모나스 뮤코사 균주를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체가 수크로스를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 분무에 의해 국소 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 대상체가 성인인 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 대상체가 어린이인 약학 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 대상체가 유아인 약학 조성물.

청구항 14

약학 조성물을 포함하는 제1 용기로서, 상기 약학 조성물은, 치료를 필요로 하는 대상체의 아토피 피부염 치료를 위한 유효량으로 존재하는 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주를 포함하고, 상기 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주는 생균이고 기증자 대상체의 피부로부터 단리 또는 증식된 것인 제1 용기; 및

약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제2 용기를 포함하는, 아토피 피부염 치료용 키트.

청구항 15

제14항에 있어서, 기증자가 아토피 피부염을 갖지 않는 것인 키트.

청구항 16

제14항에 있어서, 제1 용기가 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것인 키트.

청구항 17

제16항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체가 수크로스를 포함하는 것인 키트.

청구항 18

제16항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체가 수크로스인 키트.

청구항 19

제14항에 있어서, 약학 조성물이 동결건조된 것인 키트.

청구항 20

제14항에 있어서, 제2 용기의 약학적으로 허용되는 담체가 크림, 겔, 살브, 폼, 연고, 또는 액체를 포함하는 것인 키트.

청구항 21

제20항에 있어서, 액체가 물인 키트.

청구항 22

제14항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 $10^4 \sim 10^{12}$ 콜로니 형성 단위의 총량으로 상기 약학 조성물 중에 존재하는 것인 키트.

청구항 23

제14항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 5종 이하의 로세오모나스 뮤코사 균주를 포함하는 것인 키트.

청구항 24

제14항에 있어서, 1종 이상의 로세오모나스 뮤코사 균주가 3종 이하의 로세오모나스 뮤코사 균주를 포함하는 것인 키트.

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] [관련 출원에 대한 상호 참조]
- [0002] 본 출원은 2016년 4월 19일에 출원된 미국 가출원 제62/324,762호의 이익을 주장하며, 상기 가출원은 본원에 참고로 인용된다.
- [0003] [발명의 분야]
- [0004] 본 발명은 피부 과학 분야, 특히 아토피 피부염을 치료하기 위한 생존 그램 음성 박테리아의 국소 적용의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 아토피 피부염을 설명하기 위해 자주 사용되는 용어 "습진"은 고대 그리스에서 만들어졌고, 대개 "부글부글 끓어 올라 밖으로 나온다"라는 뜻으로 번역된다. 그러나 현대 과학은 이 질병에 숙주 요인과 환경 요인 둘 다 기여하는 것으로 인식한다. 이 질병의 특징으로는 장벽 기능의 감소, 선천적 면역 활성화의 감소 및 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 감염에 대한 감수성을 들 수 있다. 숙주 요인의 경향은 STAT3, 필라그린 및 AD 유사 표현형과 관련된 다른 유전자에 있어서의 일유전자성 돌연변이에 의해 시사된다(Lyons *et al.*, *Immunology and allergy clinics of North America* **35**, 161-183 (2015); 온라인 발행 Epub Feb (10.1016/j.iac.2014.09.008)). 숙주의 유전적 영향은 국소 스테로이드 또는 칼시뉴린 억제제를 통해 치료적으로 조절될 수 있다(Boguniewicz and Leung, *J Allergy Clin Immunol* **132**, 511-512 e515 (2013); 온라인 발행 (Epub) Aug (10.1016/j.jaci.2013.06.030)). S. 아우레우스는 AD 병인에 기여하며 항생제에 의해 완화될 수 있다(Boguniewicz and Leung, *supra*; Kobayashi *et al.*, *Immunity* **42**, 756-766). 최근의 연구 결과에 따르면, 건강한 대조군과 AD 환자 간에는 피부 미생물이 현저히 다르며, 그 증상은 공생군 다양성의 상실과 관련이 있음이 밝혀졌다(Kong *et al.*, *Genome research* **22**, 850-859 (2012); 온라인 발행 (Epub) May (10.1101/gr.131029.111)). 이러한 미생물 불균형(dysbiosis)을 치료적으로 표적화하고 아토피 피부염을 치료하는 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

- [0006] 건강한 대상체의 피부로부터의 배양 가능한 그램 음성 박테리아(CGN)가 선천적 면역의 활성화, 향상된 장벽 기능 및 S. 아우레우스의 억제와 관련이 있음이 본원에 개시된다. 이 그램 음성 박테리아는 아토피 피부염을 갖는 대상체에서 아토피 피부염을 치료하는 데 사용된다.
- [0007] 일부 실시양태에서, 치료적 유효량의 정제된 생존 그램 음성 박테리아 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물로서, a) 상기 그램 음성 박테리아의 용해물 및/또는 성분은 시험관내 어세이에서 S. 아우레우스의 성장을 억제하고; b) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 각질형성세포를 자극하고; c) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 세포로부터의 사이토카인 발현을 유도하고; d) 상기 그램 음성 박테리아는 대상체의 피부에 투여될 때 비병원성인 것인 약학 조성물이 개시된다. 상기 약학 조성물은 국소 투여용으로 제제화된다.
- [0008] 이러한 약학 조성물을 이용하는 국소 피부염의 치료 방법도 개시된다.
- [0009] 본 발명의 상기 및 다른 특징 및 이점은 첨부된 도면을 참조하여 기술되는 몇몇 실시양태에 대한 후술하는 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1a~1d: CGN 단리물은 건강한 지원자와 AD 환자 간에 존재 및 S. 아우레우스 억제에 있어서 상이하다. (a) HV(n=26) 및 AD(n=17) 대상체로부터의 CGN 단리물 수율을 갖는 개체의 백분율. HV에서, 여러 CGN 단리물을 갖는 개체를 단리물당 총 >100%로 계산하였다. 자세한 내용은 표 1 참조. (b) HV 및 AD 환자로부터 단리된 S. 아우레우스의 8종의 균주를 CGN 상청액 또는 대조군 배지의 존재 하에 성장시켰다. 각 데이터 포인트는 배지 대조군 (HV 단리물 = 9, AD 단리물 = 7)과 비교한 한 CGN 단리물로부터의 상청액의 S. 아우레우스 성장에 대한 영향을 나타낸다. 모양은 참가자의 자가 S. 아우레우스, 또는 HV 또는 AD 환자로부터의 하나의 S. 아우레우스 단리물로서의 S. 아우레우스의 공급원을 나타낸다. * 기호가 있는 데이터 포인트는 후속 인간 챌린지 및 마우스 모델 실험

험을 위해 선택된 하나의 HV 유래 및 하나의 AD 유래 CGN 단리물을 나타낸다. 데이터는 대안적으로 CGN 종에 의해 제시된다. 도 4 참조. (c) 건강한 마우스 귀에, HV 또는 AD 환자의 S. 아우레우스(SAAS9 균주)와 R. 뮤코사(*R. mucosa*)(Rm) 또는 HV의 P. 에어루기노사(*P. aeruginosa*)를 10일 동안 공점종하였다. 12일째, 귀를 균질화하고, CFU에 대한 계열 희석으로 플레이팅하였다. 희석제(CGN 첨가 없음) 대조군 대비 성장 변화율이 도시되어 있다. (d) 패널 c와 동일한 마우스에서 얻은 CGN CFU 수율. 도시된 데이터는 3회 이상의 독립적인 실험의 조합(b) 또는 2회의 독립적인 실험의 대표(c~d)의 대표이고, 평균±sem으로 나타내어진다. SA = S. 아우레우스, HV = 건강한 지원자, AD = 아토피 피부염, CGN = 배양 가능한 그램 음성, Rm = 로세오모나스 뮤코사(*Roseomonas mucosa*), Pa = 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*). 스튜던트 t 검정(b) 또는 본페로니 교정(Bonferroni's correction)으로 ANOVA(C~D)에 의해 결정된 유의성.

도 2a~2d: HV로부터의 CGN은 선천적 면역력과 장벽 기능을 향상시킨다. (a) 식염수 대조군 웰(점선)과 비교한, 건강한 대조군 유래의 R. 뮤코사의 대표적 균주 대 AD 환자로부터 단리된 것에 대한 사이토카인 반응을 보여주는 건강한 대조군에 대한 생체내 인간 수포 챌린지에 대한 사이토카인 분석, N = 7. (b) HV 유래의 R. 뮤코사에 노출된 수포 웰에서의 사이토카인 생산이 동일한 인간 대상체에서의 AD 유래의 R. 뮤코사에 노출된 수포 웰 내의 사이토카인 생산보다 더 적음을 보여주는 패널 a에 제시된 데이터의 페어드 분석(paired analysis). (c) 마우스 귀에, HV 또는 AD 유래의 1e7 CFU R. 뮤코사를 3일 동안 매일 접종하였다. 5일째, GAPDH에 대해 표준화되고 미처리 마우스와 비교한 IL-1β 및 필라그린의 mRNA 존재량을 나타낸다. 마우스 그룹당 N = 4~5. (d) 0일째, 마우스 등을 면도하고 털을 화학적으로 제거하였다. 그 후, HV 또는 AD로부터의 1e7 CFU R. 뮤코사를 매일 적용한 후 TEWL을 측정하였다. 그룹당 N = 4~5 마우스. 도시된 데이터는 7회의 독립적인 실험의 조합(a~b) 또는 2회 이상의 독립적인 실험의 대표(c~d)이며, 평균±sem(c~d) 또는 평균 및 개별 참가자(a~b)로서 나타내어진다. HV = 건강한 지원자, AD = 아토피 피부염, CGN = 배양 가능한 그램 음성, Rm = 로세오모나스 뮤코사, FLG = 필라그린, IL- = 인터루킨, TEWL = 경피 수분 손실도(Trans-epidermal Water Loss). 본페로니 교정으로 ANOVA에 의해 측정된 희석제 대조군(또는 표시된 대로)으로부터의 유의성.

도 3a~3d: HV로부터의 CGN은 AD와 같은 피부염의 MC903 마우스 모델에서 결과를 향상시킨다. (a~b) 마우스의 양쪽 귀에, HV 또는 AD 환자의 R. 뮤코사(Rm) 또는 HV의 S. 에어루기노사(Pa) 또는 S. 아우레우스의 SAAS9 균주를, MC903을 적용하기 전에 2일 동안 접종하였다. 그 후, 박테리아를 MC903과 함께 13일 동안 매일 함께 적용하였다. 14일째의, 각 귀의 귀 두께(a) 및 혈청 총 IgE 수준(b)이 도시된다. 그룹당 N = 4~8 마우스. (c~d) 마우스를 MC903으로 14일 동안 처리하여 AD 유사 피부염을 유도하였다. 13일부터 시작하여, 마우스를 1e6 CFU의 HV 또는 AD 환자의 생 R. 뮤코사(HVCGN 및 ADCGN), 3e6 CFU의 자가 R. 뮤코사로부터의 상청액 중에 재현탁시킨 동일한 HV로부터의 1e6 CFU의 사멸된 R. 뮤코사(데드 믹스), 또는 1e7 CFU의 상기 HV R. 뮤코사로부터의 상청액(Sup)으로 3일 동안 매일 처리하였다. 21일째의 시각적 발적(d) 및 귀 두께(c)가 도시된다. 그룹당 N = 3~5 마우스. 표시된 데이터는 3회의 독립적인 실험의 대표이며, 평균±sem으로 나타내어진다. ANOVA에 의해 결정된 유의성.

도 4: 도 1b로부터의 데이터의 중 분석. HV 및 AD 환자로부터 단리된 S. 아우레우스의 8종의 균주를 CGN 상청액 또는 대조군 배지의 존재 하에 성장시켰다. 각각의 데이터 포인트는 배지 대조군과 비교한 하나의 CGN 단리물로부터의 상청액의 S. 아우레우스 성장에 대한 효과를 나타낸다(HV 단리물 = 9, AD 단리물 = 7). 스튜던트 t-검정에 의해 결정된 R. 뮤코사 단리물 간의 유의성.

도 5a~5c: 흡입 수포 프로토콜. (a) 3D 프린팅된 수포 유도 장치의 이미지. (b) 수포는 흡입 2시간 후에 나타난다. (c) 챌린지 챔버(Challenge Chamber)를 벗긴 수포 부위에 올려 놓고, 각 챌린지 캡의 중앙으로 피펫을 통해 박테리아 단리물을 주입하였다.

도 6a 및 6b: CGN은 사이토카인 및 항미생물 펩티드 반응에 영향을 미친다. 생체내 인간 수포 챌린지에 대한 사이토카인 분석(a) 및 항미생물 펩티드(b)(보충 방법 참조), N = 5. 도시된 데이터는 5회의 독립적인 실험의 조합이며, 평균±sem(b) 또는 평균 및 개별 참여자(a)로서 나타내어진다.

도 7A~7G: CGN은 1차 인간 각질형성세포를 자극한다. 1차 인간 포피 각질형성세포를 밀집될 때까지 배양하였다. 웰당 1e7 CFU의 그램 음성 박테리아를 첨가하였다. 24시간 후, KC로부터 mRNA를 회수하고 PCR로 분석하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 대표이고, 평균±sem으로 나타내어지며, 개별 점들은 상이한 단리물과 함께 배양된 KC를 나타낸다. 스튜던트 t-검정에 의해 결정된 유의성. * = p<0.05, ** = p>0.01.

도 8a~8c: HV-R. 뮤코사에 의해 생성된 지질은 S. 아우레우스의 성장을 억제한다. (a) 도 1b에서 수행된 S. 아우레우스(균주 USA300) 억제제를 평가하기 전에 R. 뮤코사와 P. 에어루기노사로부터의 상청액에 대해 황산암모늄

침전을 수행하였다. (b) S. 아우레우스의 3종의 단리물을 리소포스파티딜콜린(LPC) 또는 카디올리핀(cardiolipin)의 존재 또는 부재 하에 배양하였고, 희석제(0)에 대비하여 도 1b에서와 같이 억제력을 평가하였다. (c) LPC의 존재 또는 부재 하에 인간 포피 각질 세포를 평가하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 대표이며, 평균±sem으로서 나타내어진다. 본페로니 교정으로 ANOVA에 의해 결정된 유의성. * = p < 0.05.

도 9: MC903 켈린지 동안 CGN은 마우스 필라그린 반응에 영향을 준다. 도시된 바와 같이 그램 음성 단리물의 접종과 함께 MC903 치료를 받은 마우스. 14일째, 귀에서 mRNA를 회수하여 PCR로 분석하였다. 도시된 데이터는 3회의 독립적인 실험의 대표이고 평균±sem으로 나타내어진다. ANOVA에 의해 계산된 바와 같이 도시된 MC903으로부터의 유의적인 차이. * = p < 0.05.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 건강한 대조군 유래의 공생 유기체는 아토피 피부염 환자로부터 채취한 동일 종과 비교하여 면역 활성화, 장벽 기능 및 항미생물 프로파일의 다르다는 것이 본원에 개시된다. 따라서, 아토피 피부염 환자를 치료하는 생 바이오표 접근법(live-biotherapeutic approach)이 제공된다.
- [0012] 아토피 피부염의 치료에 사용될 수 있는 국소 투여용으로 제제화된 약학 조성물이 본원에 개시된다. 이러한 약학 조성물은 치료적 유효량의 정제된 생존 그램 음성 박테리아 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 여기서 a) 상기 그램 음성 박테리아의 용해물 및/또는 성분은 시험관내 어세이에서 S. 아우레우스의 성장을 억제하고; b) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 각질형성세포를 자극하고; c) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 세포로부터의 사이토카인 발현을 유도하며; d) 상기 그램 음성 박테리아는 대상체의 피부에 투여될 때 비병원성이다. 특정한 비한정적 예에서, 상기 그램 음성 박테리아는 리소포스파티딜콜린을 생성한다.
- [0013] 그램 음성 박테리아는 임의의 종으로부터 유래될 것일 수 있다. 따라서, 특정 예에서, 그램 음성 박테리아가 슈도모나스(*Pseudomonas*)인 경우, 상기 그램 음성 박테리아는 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 루테올라(*Pseudomonas luteola*), 또는 슈도모나스 오르비해비탄스(*Pseudomonas oryzae*)일 수 있다. 다른 예에서, 그램 음성 박테리아가 판토에아(*Pantoea*)인 경우, 상기 그램 음성 박테리아는 판토에아 셉티카(*Pantoea septica*)일 수 있다. 추가적인 예에서, 그램 음성 박테리아가 모락셀라(*Moraxella*)인 경우, 상기 그램 음성 박테리아는 모락셀라 오슬로엔시스(*Moraxella osloensis*)일 수 있다. 추가의 예에서, 그램 음성 박테리아가 로세오모나스(*Roseomonas*)인 경우, 상기 그램 음성 박테리아는 로세오모나스 뮤코사(*Roseomonas mucosa*)일 수 있다. 약학 조성물 중에 포함되는 그램 음성 박테리아는 단일 균주, 단일 종, 또는 단일 속으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 그램 음성 박테리아의 균주, 종 및/또는 속의 조합이 본 발명의 방법에 이용될 수 있다.
- [0014] 용어
- [0015] 분자 생물학의 일반적인 용어 정의는 문헌[Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)]; 문헌[Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)]; 및 문헌[Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 확인할 수 있다.
- [0016] 본 개시의 다양한 실시양태에 대한 검토를 용이하게 하기 위해, 특정 용어에 대한 다음의 설명이 제공된다:
- [0017] **아토피 피부염:** 피부에 영향을 주는 만성 질환. 아토피 피부염의 경우, 피부가 매우 가렵게 된다. 긁기는 발적, 종창, 갈라짐, 맑은 "진물"을 유발하고, 결국 부스럼 딱지 및 인설이 생기게 된다. 대부분의 경우, 악화 기간이 있으며, 이어지는 관해 기간이 있다. 아토피 피부염의 영향을 받는 사람의 수를 정확히 확인하기는 어렵지만, 영유아의 약 20%는 이 질병의 증상을 경험한다. 이들 유아의 약 60%는 성인기에 아토피 피부염의 하나 이상의 증상을 계속 가지고 있다. 따라서, 미국의 1,500만 명이 넘는 사람들이 이 질병의 증상을 앓고 있다. "병변 부위"는 아토피 피부염의 영향을 받는 피부 영역이다. 일반적으로, 병변은 피부 건조(건피증), 발적, 수포, 딱지 또는 임의의 조합을 특징으로 한다. 비병변 부위는 아토피 피부염이나 다른 피부병의 영향을 받지 않는 부위이다.
- [0018] **동물:** 살아있는 다세포 척추 동물, 예를 들어 포유동물과 조류를 포함하는 범주. 포유동물이라는 용어는 인간과 인간이 아닌 포유동물을 포함한다. 유사하게, "대상체"라는 용어는 인간 대상체와 수의학적 대상체를 모두 포함한다.

- [0019] **항생제:** 박테리아, 곰팡이 또는 임의의 다른 미생물을 사멸시키거나 그 증식을 실질적으로 감소시키는 화합물 또는 물질. "항균제"는 박테리아를 사멸시키거나 그 증식을 실질적으로 감소시키는 화합물 또는 물질이다.
- [0020] 항균성 항생제는 일반적으로 작용 메커니즘, 화학 구조 또는 활성 스펙트럼을 기초로 분류된다. 대부분 박테리아 기능이나 증식 과정을 타겟으로 한다. 박테리아 세포벽을 타겟으로 하거나(예를 들어, 페니실린 및 세팔로스포린), 세포막을 타겟으로 하거나(예를 들어, 폴리믹신), 필수 박테리아 효소를 방해하는 것들(예를 들어, 퀴놀론 및 술폰아미드)은 살균제이다. 단백질 합성을 타겟으로 것들(예를 들어, 아미노글리코사이드, 매크로라이드, 및 테트라사이클린)은 일반적으로 정균제이다. 추가 분류는 타겟 특이성을 기초로 한다.
- [0021] "좁은 스펙트럼" 항균성 항생제는 그람 음성 박테리아 또는 그람 양성 박테리아와 같은 특정 유형의 박테리아를 타겟으로 한다. "넓은 스펙트럼의 항생제"는 매우 다양한 종류의 박테리아에 영향을 미친다. 항균제에는 사이클릭 리포펩티드(예컨대, 님포마이신), 글리실사이클린(예컨대, 티게사이클린), 및 옥사졸리디논(예컨대, 리네졸라이드)도 포함된다.
- [0022] 국소 항생제는 피부 또는 눈과 같은 신체 표면에 적용되는 항생제이다. 국소 항생제는 종종 연고 또는 크림으로 제제화되고, 매크로라이드계 항생제(예컨대, 에리스로마이신), 설과 항생제(예컨대, 설과아세트아미드), 사이클릭 펩티드(예컨대, 바시트라신과 폴리믹신), 슈도몬산(예컨대, 뮤피로신), 아미노글리코사이드(예컨대, 네오마이신), 또는 퀴놀론(예컨대, 시프로플록사신 또는 오픈록사신), 니트로이미다졸(예컨대, 메트로니다졸), 또는 약물의 조합(예컨대, 바시트라신/폴리믹신 또는 네오마이신/폴리믹신 B/바시트라신)을 포함한다.
- [0023] **공생:** 유기체는, 동일한 환경에서 살 수 있고, 하나가 다른 하나에 영향을 주지(해를 끼치거나 이익을 주지) 않으면서 서로로부터 이익을 얻을 때 공생한다. 피부 미생물총의 박테리아는 인간과 같은 숙주와 공생하는 것으로 간주된다. 피부 미생물총에 존재하는 공생 박테리아 종의 수는, 예를 들어, 16S 리보솜 RNA를 이용하여, 존재하는 박테리아 종을 식별함으로써 검출할 수 있다.
- [0024] **상피 세포:** 피부와 같이 상피를 형성하는 밀집된 세포. 단순한 편평 상피, 단순한 입방 상피, 단순한 원주 상피, 가성중층 원주 상피, 중층 편평(비각질) 상피, 중층 입방 상피 및 이행 상피를 포함한 여러 유형의 상피가 있다.
- [0025] **그람 음성 박테리아:** 복수의 외부 막, 내부 세포막, 얇은 펩티도글리칸층 및 리포폴리사카라이드(LPS)를 포함하는 외막을 갖는 박테리아. 포린(porin)이 외막에 존재하며, 그람 음성 박테리아는 박테리아 분류를 위한 그램 염색법에 이용되는 크리스탈 바이올렛 염색을 유지하지 않는다. 외막과 세포질 구성원 사이에는 페리플라즈미 채워진 공간이 있다. S층이 직접 외막에 부착된다. 테이코산 또는 리포테이코산은 존재하지 않는다. 대부분의 그람 음성 박테리아는 (전부는 아니지만) 포자를 형성하지 않는다. 예를 들어, 문헌[*HANDBOOK OF ENDOTOXINS*, 1: 187-214, eds. R. Proctor and E. Rietschel, Elsevier, Amsterdam (1984)]에 보고된 것과 같이, 전형적인 그람 음성 박테리아 종은 사람의 패혈증 및 패혈성 쇼크와 가장 일반적으로 연관되어 있는 것들을 포함하나, 이들에 한정되지는 않는다. HSP60(GroEL) 단백질의 보존된 시그너처 인텔(conserved signature indel; CSI)은 그람 음성 박테리아의 모든 전통적인 문(門)을 구별한다(예를 들어, 프로테오박테리아(*Proteobacteria*), 아퀴피케(*Aquificae*), 클라미디아(*Chlamydiae*), 박테로이테테스(*Bacteroidetes*), 클로로비(*Chlorobi*), 시아노박테리아(*Cyanobacteria*), 피브로박테레스(*Fibrobacteres*), 베루코마이크로비아(*Verrucomicrobia*), 플란кто마이세테스(*Planctomycetes*), 스피로헤타(*Spirochetes*), 및 애시도박테리아(*Acidobacteria*)). 그람 음성 박테리아로는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 프로테우스 종(*Proteus species*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 살모넬라(*Salmonella*), 및 로세모노나스 종(*Roseomonas species*)을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. CGN은 피부에서 발견되는 그람 음성 박테리아이다. "성분"은 그람 음성 박테리아에 존재하거나 그로부터 분비되는 임의의 분자를 의미한다. 따라서, 성분은 용해물 또는 상청액에 존재할 수 있다. 특정한 비한정적인 예에서, 이러한 상청액에 포함된 것과 같은 그람 음성 박테리아의 성분은 시험관내 어세이에서 *S. 아우레우스*의 성장을 억제한다.
- [0026] **그람 양성 박테리아:** 박테리아 분류를 위한 그램 염색법에서의 크리스탈 바이올렛 염색을 유지하는 박테리아. 이 박테리아는 그람 음성 종에 대해 기재한 것과 유사하게 미생물 감염의 특징적 증상과 질병 원인을 유도할 수 있는 막 내 LPS 분자에 비해 상대적으로 많은 펩티도글리칸을 특징으로 한다.
- [0027] **이중성:** 별개의 유전적 공급원 또는 종으로부터 유래하는 것. 이중성인 폴리 펩티드는 상이한 세포 또는 조직 유형, 또는 수용자로부터의 상이한 종으로부터 유래되며, 일반적으로 그 폴리펩티드를 발현하지 않는 세포 내로 클로닝된다.

- [0028] **숙주 세포:** 박테리아가 증폭되어 그 DNA가 발현될 수 있는 세포. 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 세포는 인간 세포와 같은 포유동물의 세포일 수 있다. 상기 용어는 또한 대상체 숙주 세포의 임의의 자손을 포함한다. 복제 중에 발생하는 돌연변이가 있을 수 있기 때문에 모든 자손이 어버이 세포와 동일하지 않을 수 있음이 이해되어야 한다. 그러나, 그러한 자손은 "숙주 세포"라는 용어가 사용될 때 포함된다.
- [0029] **마이크로바이옴:** 진핵 생물, 고세균, 박테리아 및 바이러스(박테리아성 바이러스(즉, 파지)를 포함함)를 포함하여, 지속 가능하게, 또한 일시적으로, 인체 내부 및 그 위에 살고 있는 미생물 군집의 유전적 내용물, "유전적 내용물"은 게놈 DNA, RNA, 예컨대 마이크로 RNA 및 리보솜 RNA, 에피게놈, 플라스미드 및 기타 모든 종류의 유전 정보를 포함한다.
- [0030] **면역적격성:** 체액성(B 세포) 면역 결핍, T 세포 결핍 또는 보체 결핍과 같은 면역 결핍이 없는 인간 등의 대상체. 면역적격성 대상체는 박테리아 감염에 대한 면역 반응을 나타낼 수 있다. "면역적격성"은 항원 또는 박테리아에 노출된 후 정상적인 면역 반응을 일으키는 신체의 능력이다.
- [0031] **단리된 또는 정제된:** 박테리아와 같은 세포가 발생하는 환경에서 다른 세포 또는 종으로부터 분리 또는 정제된 그람 음성 박테리아와 같은 "단리된" 또는 "정제된" 세포. 따라서, "단리된"이라는 용어는 단일 세포 클로닝 및 배양과 같은 표준 정제 방법에 의해 정제된 박테리아를 포함한다. 이 용어는 또한 재조합 방법에 의해 제조되거나 천연 공급원으로부터 단리된 박테리아를 포함한다. 단리된(또는 정제된) 그람 음성 박테리아는 일반적으로 그람 양성 박테리아와 같은 다른 박테리아로부터 제거된다. 단리된 그람 음성 박테리아는 단일 속, 종 및/또는 균주의 것일 수 있다. 본원에서 사용된 "실질적으로 정제된"이라는 용어는, 다른 유형의 박테리아(예를 들어, 그람 음성 박테리아)가 고갈되도록, 샘플 중에 실질적으로 농축된 박테리아 속, 종, 균주 또는 1종보다 많은 박테리아 균주(예를 들어, 그람 음성 박테리아)의 혼합물을 의미한다. 샘플은 박테리아 균주 또는 원하는 균주의 혼합물에 대해 실질적으로 정제되거나 농축되어, 샘플이 원하는 박테리아 속, 종 또는 균주(들)를 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상 포함하거나 바람직하지 않은 또는 다른 박테리아 속, 종 또는 균주를 약 30%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 그 이하로 포함하도록 할 수 있다.
- [0032] **질병의 억제 또는 치료:** 아토피 피부염과 같은 질병을 억제하는 것은 질병의 완전한 발달을 억제하는 것을 의미한다. 몇 가지 예에서, 질병을 억제하는 것은 증상을 경감하거나 병변 크기를 줄이는 것을 의미한다. "치료"는 질병의 징후 또는 증상, 예컨대 피부의 발적, 종창, 갈라짐, 투명한 "진물", 그리고 나아가 부스럼 딱지 및 인설을 개선하는 치료적 개입을 의미한다.
- [0033] **인터루킨(IL)-6:** 항염증성 사이토카인과 항염증성 마이오카인 둘 다로서 작용하는 IL. IL-6은 리간드 결합 IL-6R α 사슬(CD126) 및 신호 전달 성분 gp130(CD130이라고도 함)으로 이루어지는 세포 표면 I형 사이토카인 수용체 복합체를 통해 신호를 전달한다. CD130은 백혈병 억제 인자(LIF), 섬모 신경 영양 인자, 온코스타틴 M, IL-11 및 카디오토로핀-1을 포함한 여러 사이토카인에 대한 공통 신호 변환체이며, 대부분의 조직에서 거의 보편적으로 발현된다. 대조적으로, CD126의 발현은 특정 조직에 국한된다. IL-6은 그 수용체와 상호작용함에 따라, 이것은 gp130과 IL-6R 단백질이 복합체를 형성하도록 유도하여 수용체를 활성화시킨다. 예시적인 아미노산 서열은 Uniprot 데이터베이스 등록 번호 P05231(인간) 및 P08505(마우스)에 제공되고, IL-6을 코딩하는 예시적인 mRNA 서열(상응하는 단백질 서열과 함께)은 GENBANK[®] 등록 번호 NM_000600.4(인간)(2016년 1월 5일) 및 NM_031168.2(마우스)(2015년 10월 26일)에 제공되며, 이들 모두 본원에 참조 인용된다.
- [0034] **포유동물:** 이 용어는 인간과 인간이 아닌 포유동물을 포함한다. 유사하게, "대상체"라는 용어는 인간 대상체와 수의학적 대상체를 모두 포함한다.
- [0035] **핵산:** 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중합체이며, 특별히 제한되지 않는 한, 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 핵산과 하이브리드화하는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포함한다.
- [0036] **약제:** 대상체에게 적절히 투여할 경우 원하는 치료적 또는 예방적 효과를 유도할 수 있는 그람 음성 박테리아와 같은 박테리아, 화학적 화합물, 핵산 분자 또는 조성물. 일 실시양태에서, 약제는 그람 음성 박테리아이다.
- [0037] **약학적으로 허용되는 담체:** 본 발명에서 유용한 약학적으로 허용되는 담체는 통상적인 것이다. 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)]은 본 명세서에 개시된 그람 음성 박테리아의 약학적 전달에 적합한 조성물 및 제제를 기술한다.

- [0038] 일반적으로, 담체의 성질은 이용되는 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 비경구용 제제는 통상적으로 비히클로서 물, 생리 식염수, 평형 염 용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등과 같은 약학적으로 및 생리학적으로 허용되는 유체를 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물(예를 들어, 분말, 환제, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 통상적인 무독성 고체 담체는, 예를 들어, 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 마그네슘 스테아레이트를 포함할 수 있다. 투여되는 약학 조성물은, 생물학적으로 중성인 담체 이외에, 소량의 비독성 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 방부제 및 pH 완충제 등, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다. 허용되는 담체는 또한 국소 투여용과 같은 크림 및 연고를 포함한다.
- [0039] **슈도모나스:** 191종의 개시된 종을 포함하는 슈도모나다세아(*Pseudomonadaceae*) 과에 속하는 그램 음성 박테리아, 호기성 감마프로테오박테리아의 속. 이 속의 구성원은 매우 큰 대사 다양성을 나타내고, 그 결과 광범위한 니치(niche)를 콜로니화할 수 있다. 이 속의 구성원은 16S rRNA 분석을 이용하여 확인할 수 있다. 일반적으로, 이 속의 구성원은 하나 이상의 극성 편모를 가지고 있고 양성 옥시다제 및 카탈라제 테스트를 나타내는 막대 모양, 호기성, 비포자 형성 박테리아이다.
- [0040] **로세오모나스:** 프로테오박테리아 문 및 아세토박테라세아 과로 분류된 호기성, 그램 음성, 막대 모양의 박테리아의 속. 특정한 비한정적 예에서, 박테리아는 박테리아 유래의 16S rRNA의 핵산 서열을 평가함으로써 로세오모나스 속에 속하는 것을 확인할 수 있다. 로세오모나스는 종에 따라 플럼프 코카이(plump cocci), 코코바실리(coccobacilli) 또는 단봉(short rod)으로 나타날 수 있다. 대부분의 균주는 맥콩키(MacConkey) 한천에서 자라며, 성장은 25°C, 30°C 및 35°C와 그 중간 온도에서 일어난다. 대부분의 균주는 또한 42°C에서 증식한다. 연분홍색 성장 색소가 생성된다. 구글북으로부터 온라인으로 입수 가능한 문헌[BERGEY'S MANUAL[®] of Systemic Bacteriology, Volume Two, The Proteobacteria, Part 3, Springer Science & Business Media, July 25, 206, pages 88-89] 참조.
- [0041] **치료적 유효량:** 아토피 피부염 치료에 충분한 용량. 일 실시양태에서, 치료적 유효량은 병변 크기를 줄이는 데 충분한 그램 음성 박테리아의 양이다.
- [0042] **국소 적용:** 국소 적용되는 약제는 신체 전체가 아닌 특정 부위에만 적용된다. 특정 예에서, 조성물은 병변과 같은 피부에 적용된다. 예를 들어, 약학 조성물은 약학적 제제로 병변에 적용될 수 있다.
- [0043] **형질도입된:** 형질도입된 세포는 분자 생물학 기술에 의해 핵산 분자가 도입된 세포이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 형질도입이라는 용어는 바이러스 벡터에 의한 형질감염, 플라스미드 벡터에 의한 형질전환, 전기천공, 리포펙션 및 파티클 건 가속에 의한 네이키드 DNA의 도입을 비롯하여 핵산 분자를 세포 내로 도입할 수 있는 모든 기술을 포함한다.
- [0044] **벡터:** 숙주 세포에 도입되어 형질전환된 숙주 세포를 생성하는 핵산 분자. 벡터는, 복제 기점과 같은 숙주 세포에서 복제를 가능하게 하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 하나 이상의 선택 가능한 마커 유전자 및 당업계에 공지된 다른 유전 요소를 포함할 수 있다. 벡터는 그램 음성 박테리아 및 그램 양성 박테리아 세포에서의 발현을 위한 플라스미드를 비롯한 플라스미드 벡터를 포함한다. 예시적인 벡터는 그램 음성 박테리아에서의 발현을 위한 벡터를 포함한다.
- [0045] 달리 설명되지 않는다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시 내용이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 단수의 용어는 문맥에 달리 명시되어 있지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 유사하게, "또는"이라는 단어는 문맥상 달리 명시하지 않는 한 "및"을 포함하도록 의도된다. 또한, 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 주어진 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기 및 모든 분자량 또는 분자량 값은 근사치이며 설명을 위해 제공되는 것으로 이해해야 한다. 여기에 기술된 것과 유사한 또는 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 하기에 기술된다. "포함한다"는 용어는 "포괄한다"를 의미한다. 여기에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참조로 포함된다. 충돌이 있는 경우, 용어의 설명을 포함하여 본 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시에는 단지 예시적인 것이며, 한정을 의도한 것이 아니다.
- [0046] **그램 음성 박테리아**
- [0047] 손상되지 않은 인간 피부 유래의 그램 음성 박테리아 또는 그러한 그램 음성 박테리아로부터 증식된 단리된 또는 실질적으로 정제된 그램 음성 박테리아 및 그램 음성 박테리아의 조합을 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 이러한 그램 음성 박테리아는 아토피 피부염이 있는 대상체에게 투여될 때 건강한 미생물총의 기능을 의미있게 제공하거나 상주 마이크로바이옴에 대한 기능 보강을 촉진할 수 있는 능력을 가지고 있다. 특히, 아토피 피부염

의 증상을 치료, 예방, 지연 또는 감소시키는 조성물이 제공된다.

- [0048] 이러한 조성물은 피부의 병리학적 증상이 없는 건강한 대상체와 같은 아토피 피부염을 갖지 않는 대상체로부터 단리된 그람 음성 박테리아를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 병리학적 상태, 예를 들어 피부 및/또는 임의의 내장 기관의 병리학적 상태를 갖지 않는다. 대상체는 면역적격성일 수 있다. 그람 음성 박테리아는 직접 환자의 피부로부터 단리될 수 있거나 박테리아 배양의 표준 기술을 이용하여 시험관내에서 증식될 수 있다. 그러나, 그람 음성 박테리아는 하기에서 언급하는 다른 공급원으로부터 얻을 수 있다. 그람 음성 박테리아는 프로테오박테리아(*Proteobacteria*), 스피로헤타과(*Spirochaetaceae*), 엔테로박테리알레스(*Enterobacteriales*), 푸소박테리움 폴리몰프뎀(*Fusobacterium polymorphum*), 또는 셀레노마오나달레스(*Selenomonadales*)일 수 있다. 그람 음성 박테리아는 디플로코카이, 코코바실리, 코카이, 또는 바실리일 수 있다.
- [0049] 일부 실시양태에서, 단리된 또는 실질적으로 정제된 생존 그람 음성 박테리아 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 국소 투여용으로 제제화된 조성물로서, a) 상기 그람 음성 박테리아의 용해물 및/또는 성분은 시험관내 어세이에서 S. 아우레우스의 성장을 억제하고; b) 상기 그람 음성 박테리아는 인간 각질형성세포를 자극하고; c) 상기 그람 음성 박테리아는 인간 세포로부터의 사이토카인 발현을 유도하고; d) 상기 그람 음성 박테리아는 면역적격성 대상체의 피부에 투여될 때 비병원성인 것인 조성물이 개시된다. "성분"은 그람 음성 박테리아에 존재하거나 그로부터 분비되는 임의의 분자를 의미한다. 특정한 비한정적인 예에서, 그람 음성 박테리아에 의해 분비되는 분자를 포함하는 상청액은 시험관내 어세이에서 S. 아우레우스의 성장을 억제한다.
- [0050] 본 명세서에서는 건강한 대상체와 같은 아토피 피부염이 없는 대상체의 인간 피부 미생물총 내에서 원래 발견되는 특정 속, 종, 균주 및 균주 또는 종의 조합이 제공된다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 이들 종/균주는 생체의 어세이에서 피부 병원체 복제 속도를 현저하게 감소시킬 수 있다. 이러한 종/균주는 그러한 박테리아 병원체의 성장, 복제 및 질병의 심각성에 영향을 미치는 안전하고 효과적인 수단을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 병원성 박테리아를 배제하는 능력을 갖는 박테리아 조성물이 제공된다.
- [0052] S. 아우레우스와 같은 특정 병원체의 성장 속도를 감소시키는 예시적인 박테리아 조성물이 제시된다. 피부에서 S. 아우레우스를 영구히 감소시킬 수 있는 능력을 갖는 그람 음성 박테리아를, 인간 미생물총 내의 성분에 대한 생태학적 조절 인자(Ecological Control Factor; ECF)를 평가하는 방법을 이용하여 확인할 수 있다. ECF는, 소정의 병원체(예를 들어, S. 아우레우스)에 대한 소정의 공생 균주 또는 균주의 조합의 길항 활성을 시험관내 어세이를 이용하여 평가하여, 다양한 농도의 추가된 공생 균주에서 생태학적 제어 수준을 관찰함으로써 확인한다. 공생 균주 또는 균주의 조합에 대한 ECF는 항생제 평가에 이용되는 오래된 최소 억제 농도(MIC) 평가와 다소 유사하다. ECF는 공생 균주 및 균주의 조합이 피부 병원체에 길항 작용을 할 수 있는 능력의 상대적인 효능을 평가하고 순위를 매길 수 있다. 공생 균주 또는 균주의 조합의 ECF는 시험관내 어세이에서 표적 병원체(예를 들어, S. 아우레우스)의 소정 비율의 억제(예를 들어, 적어도 10%, 20%, 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%)를 매개할 수 있는 조성물의 농도를 평가함으로써 계산될 수 있다.
- [0053] 일부 실시양태에서, 그람 음성 박테리아는 인간 각질형성세포를 자극한다. 그람 음성 박테리아는 생체내 및/또는 시험관내에서 각질형성세포를 자극할 수 있다. 그람 음성 박테리아는, 상피 장벽 기능에 관여하는 면역 매개체 또는 분자의 mRNA의 전사, 예컨대 IL-1 β 를 코딩하는 mRNA, 디펜신 베타 4를 코딩하는 mRNA, Cyp27b1을 코딩하는 mRNA, 비타민 D 수용체를 코딩하는 mRNA, 오클루딘(occludin)을 코딩하는 mRNA, 클라우딘 1(claudin 1)을 코딩하는 mRNA 및/또는 필라그린을 코딩하는 mRNA의 생성을 증가시킴으로써 각질형성세포를 자극한다.
- [0054] 추가의 실시양태에서, 그람 음성 박테리아는 인간 세포로부터 사이토카인 발현을 유도한다. 인간 세포는 섬유아 세포 및 각질형성세포와 같은 피부 세포를 포함하지만, 이들에 한정되지는 않는다. 사이토카인은 인터루킨(IL), 예컨대 IL-6 및 IL-1 β 를 포함하지만, 이들에 한정되지는 않는다.
- [0055] 또 다른 실시양태에서, 그람 음성 박테리아는 리소포스포티딜콜린을 생성한다.
- [0056] 추가의 실시양태에서, 그람 음성 박테리아는 면역적격성 대상체와 같은 대상체의 피부에 투여될 경우 비병원성이다. 일반적으로, 그람 음성 박테리아는 무손상의 인간 피부에 투여될 때 감염을 일으키지 않는다. 따라서, 치료 후에 발병이 관찰되지 않는다.
- [0057] 개시된 조성물에 포함되는 생존 그람 음성 박테리아는 임의의 속에 속하는 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 그람 음성 박테리아는 슈도모나스이다. 추가의 실시양태에서, 그람 음성 박테리아는 판토에아 또는 모락셀라이

다. 다른 실시양태에서, 그램 음성 박테리아는 로세오모나스이다.

[0058] 단지 단일 속 유래의 박테리아가 약학 조성물에 포함될 수 있다. 대안적으로, 속의 조합이 본 발명의 방법에 사용되는 약학 조성물에 포함될 수 있다. 따라서, 조성물은, 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5속의 그램 음성 박테리아를 포함할 수 있다. 하나의 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 로세오모나스를 포함한다. 또 다른 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 슈도모나스를 포함한다. 또 다른 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 로세오모나스 및 생존 슈도모나스를 포함한다.

[0059] 생존 그램 음성 박테리아는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 따라서, 특정 예에서, 그램 음성 박테리아가 슈도모나스인 경우, 그램 음성 박테리아는 슈도모나스 에어루기노사, 슈도모나스 루테올라 또는 슈도모나스 오르비해비탄스일 수 있다. 다른 예에서, 그램 음성 박테리아가 판토에아인 경우, 그램 음성 박테리아는 판토에아 셉티카일 수 있다. 추가적인 예에서, 그램 음성 박테리아가 모락셀라인 경우, 그램 음성 박테리아는 모락셀라 오슬로엔시스일 수 있다. 추가의 예에서, 그램 음성 박테리아가 로세오모나스인 경우, 그램 음성 박테리아는 로세오모나스 에어릴라타(*Roseomonas aerilata*), 로세오모나스 에어로필라(*Roseomonas aerophila*), 로세오모나스 아에스투아리(*Roseomonas aestuarii*), 로세오모나스 알칼리테라(*Roseomonas alkaliterrae*), 로세오모나스 아쿠아틱(*Roseomonas aquatic*), 로세오모나스 서비칼리스(*Roseomonas cervicalis*), 로세오모나스 파우리아(*Roseomonas fauriae*), 로세오모나스 프리기다콰(*Roseomonas frigidaquae*), 로세오모나스 길라디(*Roseomonas gilardii*), 로세오모나스 라쿠스(*Roseomonas lacus*), 로세오모나스 루디푸에리티아(*Roseomonas ludipueritiae*), 로세오모나스 뮤코사(*Roseomonas mucosa*), 로세오모나스 페큐니아(*Roseomonas pecuniae*), 로세오모나스 리조스파에라(*Roseomonas rhizosphaerae*), 로세오모나스 리구일로카이(*Roseomonas riguiloci*), 로세오모나스 로세아(*Roseomonas rosea*), 로세오모나스 솔리(*Roseomonas soli*), 로세오모나스 스타그니(*Roseomonas stagni*), 로세오모나스 테라(*Roseomonas terrae*), 또는 로세오모나스 비나세아(*Roseomonas vinacea*)일 수 있다. 특정한 비한정적인 한 예에서, 그램 음성 박테리아는 로세오모나스 뮤코사이다.

[0060] 단일 종의 그램 음성 박테리아가 약학 조성물에 포함될 수 있다. 대안적으로, 그램 음성 박테리아 종의 조합이 약학 조성물에 포함될 수 있고, 개시된 방법에 사용된다. 따라서, 조성물은 1, 2, 3, 4 또는 5종의 그램 음성 박테리아를 포함할 수 있다. 하나의 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 로세오모나스 뮤코사를 포함한다. 또 다른 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 슈도모나스 에어루기노사를 포함한다. 또 다른 특정한 비한정적인 예에서, 상기 조성물은 생존 로세오모나스 뮤코사와 생존 슈도모나스 에어루기노사를 포함한다.

[0061] 사용되는 상기 생존 그램 음성 박테리아는 단일 균주로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 상기 그램 음성 박테리아는 여러 균주로부터 유래될 수 있다. 단일 균주의 그램 음성 박테리아 또는 그램 음성 박테리아 균주의 조합이 본 발명의 방법에 사용되는 본 발명이 조성물에 포함될 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 1, 2, 3, 4 또는 5종의 그램 음성 박테리아를 포함할 수 있다. 하나의 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 로세오모나스 뮤코사의 단일 균주를 포함한다. 추가의 비한정적인 예에서, 조성물은 2, 3, 4 또는 5 가지 균주의 생존 로세오모나스 뮤코사를 포함한다. 또 다른 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 슈도모나스 에어루기노사의 단일 균주를 포함한다. 추가의 비한정적인 예에서, 조성물은 2, 3, 4 또는 5 가지 균주의 생존 슈도모나스 에어루기노사를 포함한다. 또 다른 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 생존 로세오모나스 뮤코사의 균주 및 생존 슈도모나스 에어루기노사 균주를 포함한다. 다른 특정한 비한정적인 예에서, 조성물은 2, 3, 4 또는 5 가지 균주의 생존 로세오모나스 뮤코사 및 2, 3, 4 또는 5 가지 균주의 생존 슈도모나스 에어루기노사를 포함한다.

[0062] 따라서, 약학 조성물은 두 종류의 그램 음성 박테리아("이원 조합" 또는 "이원 쌍") 또는 2 종류 초과인 그램 음성 박테리아를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 속, 종 및/또는 조작 분류 단위(Operational Taxonomic Unit; OTU), 예컨대 균주에 의해 정의되는 바와 같은 그램 음성 박테리아를 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 또는 적어도 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 적어도 40, 적어도 50 종류 또는 50 종류 초과로 포함할 수 있다. 일반적으로, 속, 종 또는 균주는 개별적으로 또는 조합하여, 하기 특징을 갖는다: a) 상기 그램 음성 박테리아의 용해물 및/또는 성분은 시험관내 어세이에서 S. 아우레우스의 성장을 억제하고; b) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 각질형성세포를 자극하고; c) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 세포로부터의 사이토카인 발현을 유도하고; d) 상기 그램 음성 박테리아는 대상체의 피부에 투여될 때 비병원성이다.

- [0063] 특정 실시양태에서, 그램 음성 박테리아는 이중성 핵산에 의해, 예컨대 플라스미드의 형태의 이중성 핵산에 의해 형질전환된다. 발현 벡터는 임의의 목적 단백질을 코딩할 수 있다. 외생성 DNA가 전기천공법이나 인산칼슘 매개 형질감염과 같은 표준 기술에 의해 박테리아 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 이중성 핵산은 플라스미드에 포함되어 있다. 플라스미드는 일반적으로, 핵산 카세트 내의 핵산이 전사되어, 필요할 때 형질감염된 세포에서 번역될 수 있도록, 다른 필요한 유전 요소와 함께 적절한 위치에 순차적으로 배향된 다수의 유전 요소를 포함한다. 플라스미드는 하나 이상의 이중성 핵산이 삽입될 수 있는 플라스미드 벡터, 코스미드 또는 파지미드로부터 유래된 DNA인 핵산을 포함한다. 이중성 핵산은 관심 단백질을 코딩할 수 있으며, 이것은 그램 음성 박테리아의 발현을 위한 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0065] 플라스미드는 일반적으로 하나 이상의 고유한 제한 부위를 포함한다. 또한, 플라스미드는 약제 내성과 같은 선별 가능하거나 쉽게 검출되는 몇몇 잘 정의된 표현형을 숙주 생물에 부여할 수 있다. 따라서, 플라스미드는 폴리펩티드가 코딩되는 발현 카세트를 포함할 수 있다. 발현은 삽입된 유전자, 핵산 서열, 또는 플라스미드를 갖는 핵산 카세트의 효율적인 전사를 포함한다.
- [0066] 일 실시양태에서, 원형 플라스미드가 박테리아 세포로 옮겨질 경우, 이것은 정상적인 박테리아 계통과는 별개이며 비선택 조건 하에서의 박테리아 세포 생존에 필수적이지 않은 자율 복제성의 염색체의 DNA 분자일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "지속적 발현"은 세포 내에서의 유전 물질의 에피솜(염색체외) 복제 및/또는 유지를 가능하게 하는 유전 요소와 함께 세포 내로 유전자를 도입하는 것을 말한다. 이것은 새로운 유전 물질을 숙주 세포의 염색체에 통합시키지 않으면서 세포의 명백히 안정한 형질전환을 유도할 수 있다.
- [0067] 플라스미드는 또한 표적 세포의 염색체에 유전 물질을 도입할 수 있으며, 그곳에서 통합되어 그 세포 내의 유전 물질의 영구적 성분이 된다. 안정한 도입 후 유전자 발현은 그 세포와 복제에 의해 발생하는 그 자손의 특성을 영구적으로 변형시켜 안정한 형질전환을 유도할 수 있다.
- [0068] *투여용 박테리아 조성물의 제조 방법*
- [0069] 박테리아 조성물의 제조 방법은 하나 이상의 혼합 단계와 조합된 3개의 주요 공정 단계를 포함할 수 있다. 그 단계들은 유기체 बैं킹, 유기체 생산 및 보존이다.
- [0070] बैं킹을 위해, 박테리아 조성물에 포함되는 균주를 (1) 인간 피부를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는 검체로부터 직접 단리하거나 बैं킹된 스톱으로부터 채취할 수 있고, (2) 경우에 따라 생존성 바이오매스를 생성하기 위해 성장을 지지하는 영양 한천 또는 브로쓰에서 배양하고, (3) 장기 보관 시 그 바이오매스를 경우에 따라 여러 개의 분액으로 나눠 보존한다.
- [0071] 그램 음성 박테리아는 인간 대상체의 피부로부터 단리할 수 있다. 일반적으로, 인간 대상체는 아토피 피부염 또는 임의의 다른 피부 병태를 갖지 않는다. 따라서, 대상체는 건강할 수 있으며, 이는 임의의 다른 병리학적 상태가 없음을 의미한다. 대상체는 면역적격성일 수 있다. 그러나, 그램 음성 박테리아는 상업적 공급원 또는 환경 시료와 같은 다른 공급원으로부터 단리되어, 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 임의의 그램 음성 박테리아는, a) 그램 음성 박테리아의 용해물 및/또는 성분이 시험관내 어세이에서 S. 아우레우스의 성장을 억제하고; b) 그램 음성 박테리아가 인간 각질형성세포를 자극하고; c) 그램 음성 박테리아가 인간 세포로부터의 사이토카인 발현을 유도하고; d) 상기 그램 음성 박테리아가 대상체의 피부에 투여될 때 비병원성이라면 유용하다. 그 후, 그램 음성 박테리아를 증식시킬 수 있다.
- [0072] 배양 단계를 이용하는 실시양태에서, 한천 또는 브로쓰는 성장을 가능하게 하는 필수 원소 및 특정 인자를 제공하는 영양분을 함유할 수 있다. 비한정적인 예는 0.5 g/L의 텍스트로스, 0.5 g/L의 효모 추출물 0.5 g/L의 프로테오스 펩톤, 0.5 g/L의 카사미노산, 0.3 g/L의 디포타슘 포스페이트, 50 mg/L의 황산마그네슘, 0.3 g/L의 피루브산나트륨으로 이루어지는 배지이다. 다양한 미생물용 배지 및 변형예가 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, R. M. Atlas, Handbook of Microbiological Media(2010) CRC Press). 배지는 초기에 배양물에 첨가하거나, 배양 중에 첨가할 수 있거나, 간헐적으로/연속적으로 배양물을 통해 흘러 보낼 수 있다. 종/균주는 단독으로, 또는 박테리아 종/균주를 포함하는 전체 집합체로서 배양될 수 있다. 일례로서, 배양물이 배양으로부터 씻겨 나가는 것을 방지하기 위해 세포의 최대 성장률보다 낮은 희석률로, 혼합 연속 배양으로 제1 균주를 제2 균주와 함께 배양할 수 있다.
- [0073] 배양물은 바이오매스를 구축하기에 충분한 시간 동안 유리한 조건 하에 인큐베이션한다. 인체 사용을 위한 박테리아 조성물에 있어서, 이것은 종종 정상적인 인간 니치와 유사한 값을 갖는 약 32~37°C, pH, 및 기타 파라미터

이다. 환경은 적극적으로 제어할 수 있다.

[0074] 배양물이 충분한 바이오매스를 생성하면, बैं킹을 위해 보존할 수 있다. 유기체를 (예컨대, 동결 방지제 첨가에 의해) 동결을 방지하는 화학적 환경에 넣고, 건조 및/또는 삼투압 충격(예컨대, 삼투 방지제를 첨가함으로써)을 가하고, 복수의(경우에 따라 동일한) 용기에 분배하여 균일한 बैं크를 만들고, 그 후 경우에 따라, 보존을 위해 배양물을 처리한다. 용기는 일반적으로 비투과성이며 환경으로부터의 격리를 보장하는 덮개가 있다. 동결 보존은 액체를 극저온(예를 들어, 약 -70°C 또는 그 아래)에서 동결시킴으로서 행할 수 있다. 건조 보존은 증발에 의해(분무 건조 또는 냉각 건조의 경우) 또는 승화에 의해(예를 들어, 동결 건조, 분무 동결 건조의 경우) 배양물로부터 물을 제거한다. 물을 제거하면 고온에서의 장기 박테리아 조성물 저장 안정성이 향상된다. 균주 및/또는 종은 개별적으로 배양되고 보존될 수 있거나 종/균주는 बैं킹을 위해 함께 혼합될 수 있다.

[0075] 비한정적인 한 예에서, 동결 보존을 위해, 박테리아 배양물을, 배양 배지로부터 세포를 펠릿화하기 위해 원심분리함으로써 회수하고, 상청액을 경사 분리하고, 15% 글리세롤을 함유하는 새로운 배양 브로스로 교환할 수 있다. 그 후, 배양물을 1 mL 동결튜브에 나누어 넣고 밀봉하여 장기 생존력 유지를 위해 -80°C 또는 -70°C에 둔다. 이 절차는 냉동 보관으로부터 복구할 때 허용 가능한 생존력을 달성한다.

[0076] 유기체 생산은 배지 조성과 배양 조건을 포함하여 बैं킹과 유사한 단계들을 이용하여 수행될 수 있다. 생산은 특히 임상 개발 또는 상업적 생산을 위해 대규모 공정을 사용하여 수행될 수 있다. 더 큰 규모에서는, 최종 배양 전에, 몇 차례 박테리아의 계대 배양을 할 수 있다. 배양 종료 시, 배양물을 투여용 제형으로 제제화하기 위해 회수한다. 이것은 농축, 바람직하지 않은 배지 성분의 제거, 및/또는 박테리아 조성물을 보존하고 선택된 경로를 통한 투여가 허용되도록 하는 화학적 환경으로의 도입을 포함할 수 있다. 하나의 비한정적인 예를 들면, 박테리아 조성물을 15% 수크로스 수용액으로 이루어지는 보존 매체와 함께 10¹⁰ CFU/mL의 농도까지 배양할 수 있다.

[0077] 국소 제제 및 치료 방법

[0078] 개시된 단리된 또는 실질적으로 정제된 그람 음성 박테리아를 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 상기 약학 조성물은 국소 투여용으로 제제화된다. 이러한 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 경우에 따라 추가의 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 단일 투여 단위 또는 다중 투여 포맷일 수 있는 최종 제품을 제조하기 위해 추가의 활성 및/또는 비활성 물질을 포함한다.

[0079] 아토피 피부염을 갖는 임의의 대상체를 본원에 개시된 방법을 이용하여 치료할 수 있다. 대상체는 인간일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 어린이, 예컨대 11세, 10세, 9세, 8세, 7세, 6세, 5세, 4세, 3세, 2세 또는 1세 또는 그 미만의 대상체이다. 대상체는 1세 미만의 대상체와 같은 유아일 수 있다. 다른 실시양태에서, 대상체는 18세, 또는 20세, 25세, 30세, 35세, 40세, 45세, 50세, 55세 또는 60세를 넘는 대상체와 같은 성인이다. 대상체는 65세, 70세, 75세 또는 80세를 넘는 대상체인 고령자일 수 있다. 대상체는 면역저하 상태이거나 면역계가 정상 상태(면역적격성)일 수 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 완충제, 방부제, 안정제, 결합제, 압축제, 윤활제, 분산 증강제 및/또는 착색제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 적합한 완충제의 비한정적인 예는 시트르산나트륨, 탄산마그네슘, 중탄산마그네슘, 탄산칼슘 및 중탄산칼슘을 포함한다. 적합한 방부제의 비한정적인 예는 알파-토코페롤 및 아스코르베이트, 파라벤, 클로로부탄올 및 페놀과 같은 항산화제를 포함한다. 적합한 결합제의 비한정적인 예는 수크로스, 전분, 전호화 전분, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐옥사졸리돈, 폴리비닐알코올, C₁₂-C₁₈ 지방산 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리올, 당류, 올리고당류 및 이들의 조합을 포함한다. 적합한 윤활제의 비한정적인 예는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산아연, 수소화 식물성 오일, 스테로텍스, 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트, 탈크, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 소듐 라우릴 설페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트 및 경질 미네랄 오일을 포함한다. pH 완충제(들)는, 사용된다면, 조성물의 수성 성분에 용해될 때, 5~7의 범위의 pH(예를 들어, 약 pH 5.5)를 제공할 수 있다.

[0081] 약학 조성물은 박테리아의 성장을 지속시키기 위한 것과 같은 다른 성분들을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 영양분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 탄수화물을 포함한다. "탄수화물"은 당 또는 당의 중합체를 지칭한다. 용어 "당류", "다당류", "탄수화물" 및 "올리고당류"는 서로 바꿔 사용할 수 있다. 대부분의 탄수화물은, 일반적으로 분자의 각 탄소 원자에 하나씩 존재하는 많은 하이드록시기들을 갖는 알데히드 또는 케톤이다. 탄수화물은 일반적으로 분자식 C_nH_{2n}O_n을 갖는다. 탄수화물은 단당류, 이당

류, 삼당류, 올리고당류 또는 다당류일 수 있다. 가장 기본적인 탄수화물은 글루코스, 수크로스, 갈락토스, 만노스, 리보스, 아라비노스, 크실로스 및 프룩토스와 같은 단당류이다. 이당류는 두 개의 연결된 단당류이다. 예시적인 이당류는 수크로스, 말토스, 셀로바이오스 및 락토스를 포함한다. 전형적으로, 올리고당류는 3~6개의 단당류 단위(예를 들어, 라피노스, 스타키오스)를 포함하고, 다당류는 6개 이상의 단당류 단위를 포함한다. 예시적인 다당류는 전분, 글리코젠 및 셀룰로스를 포함한다. 탄수화물은 변형된 당류 단위, 예컨대 하이드록실기가 제거된 2'-데옥시리보스, 하이드록실기가 불소로 치환된 2'-플루오로리보스 또는 N-아세틸글루코사민, 질소 함유 형태의 글루코스(예를 들어, 2'-플루오로리보스, 데옥시리보스 및 헥소스)를 포함할 수 있다. 탄수화물은 많은 다양한 형태, 예를 들면, 형태이성체, 고리형, 비고리형, 입체이성체, 호변이성체, 아노머 및 이성체로 존재할 수 있다.

[0082] 일부 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 지질을 포함한다. "지질"은 지방, 오일, 트리글리세라이드, 콜레스테롤, 인지질, 유리 지방산을 포함한 임의의 형태의 지방산을 포함한다. 지방, 오일 및 지방산은 포화, 불포화(시스 또는 트랜스) 또는 부분 불포화(시스 또는 트랜스)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지질은 라우르산(12:0), 미리스트산(14:0), 팔미트산(16:0), 팔미톨산(16:1), 마르가르산(17:0), 헵타데센산(17:1), 스테아르산(18:0), 올레산(18:1), 리놀레산(18:2), 리놀렌산(18:3), 옥타데카테트라엔산(18:4), 아라키드산(20:1), 에이코센산(20:1), 에이코사디엔산(20:2), 에이코사테트라엔산(20:4), 에이코사펜타엔산(20:5)(EPA), 도코산(22:0), 도코센산(22:1), 도코사펜타엔산(22:5), 도코사헥사엔산(22:6)(DHA) 및 테트라코산(24:0)으로부터 선택되는 1종 이상의 지방산을 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 보충 무기물 또는 무기물원을 포함한다. 무기물의 예로는 염화물, 나트륨, 칼슘, 철, 크롬, 구리, 요오드, 아연, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 인, 칼륨 및 셀레늄을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 전술한 무기물의 적합한 형태는 가용성 무기염, 약용해성 무기염, 불용성 무기염, 킬레이트화된 무기물, 무기물 착물, 환원된 무기물, 및 카보닐 무기물 등의 비반응성 무기물, 및 이들의 조합을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0084] 추가적인 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 보충 비타민을 포함한다. 상기 1종 이상의 비타민은 지용성 또는 수용성 비타민일 수 있다. 적합한 비타민은 비타민 C, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 B12, 비타민 K, 리보플라빈, 니아신, 비타민 D, 비타민 B6, 엽산, 피리독신, 티아민, 판토텐산 및 바이오틴을 포함하지만 이들에 한정되지는 않는다. 전술한 임의의 적합한 형태는 비타민의 염, 비타민의 유도체, 비타민과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 화합물, 및 비타민의 대사산물이다.

[0085] 다양한 다른 첨가제가 조성물에 포함될 수 있다. 이들은 항산화제, 수렴제, 향료, 방부제, 연화제, 안료, 염료, 보습제, 추진제 및 선스크린제뿐만 아니라, 그 존재가 약학적으로 또는 달리 바람직할 수 있는 다른 부류의 물질들도 포함한다. 임의적인 첨가제의 비한정적인 예는 다음과 같다: 소르베이트와 같은 방부제; 이소프로판올 및 프로필렌 글리콜과 같은 용매; 멘톨 및 에탄올과 같은 수렴제; 폴리 알킬렌 메틸 글루코사이드와 같은 연화제; 글리세린과 같은 보습제; 글리세롤 스테아레이트, PEG-100 스테아레이트, 폴리글리세릴-3 하이드록시라우릴 에테르 및 폴리소르베이트 60과 같은 유화제; 소르비톨, 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 다른 폴리하이드록시 알코올; 옥틸 메톡실 신나메이트(Parsol MCX로서 시판됨) 및 부틸 메톡시 벤조일메탄(Parsol 1789라는 상표명으로 입수 가능)과 같은 선스크린제; 아스코르브산(비타민 C), α-토코페롤(비타민 E), β-토코페롤, γ-토코페롤, δ-토코페롤, ε-토코페롤, ζ-토코페롤, ζ'-토코페롤, η-토코페롤 및 레티놀(비타민 A)과 같은 항산화제; 필수 오일, 세라마이드, 필수 지방산, 미네랄 오일, 식물성 오일(예를 들어, 대두유, 팜유, 시어 버터의 액체 분획, 해바라기유), 동물성 오일(예를 들어, 피하이드로스쿠알렌), 합성 오일, 실리콘 오일 또는 왁스(예를 들어, 사이클로메티콘 및 디메티콘), 불소화 오일(일반적으로 퍼플루오로폴리에테르), 지방 알코올(예를 들어, 세틸 알코올) 및 왁스(예를 들어, 밀랍, 카르나우바 왁스 및 파라핀 왁스); 피부 감각 조절제; 및 증점제 및 구조 형성제, 예컨대 팽윤 점토 및 가교 결합된 카복시폴리아킬렌.

[0086] 다른 첨가제는 피부(특히, 각질층의 피부의 상층)를 컨디셔닝하고, 수분 함량의 감소를 늦추고/늦추거나 피부를 보호하여 부드럽게 유지시키는 물질을 포함한다. 이러한 컨디셔너 및 보습제는 예로서 피롤리딘 카복실산 및 아미노산; 2, 4,4'-트리클로로-2-하이드록시 디페닐 에테르(트리클로산) 및 벤조산과 같은 유기 항미생물제를 포함한다. 추가의 첨가제는 항염증제, 예컨대 아세틸살리실산 및 글리시레틴산; 항지루제, 예컨대 레티노산; 혈관 확장제, 예컨대 니코틴산; 멜라닌 형성 억제제, 예컨대 코지산; 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0087] 다른 실시양태에서, 조성물은 알파 하이드록시산, 알파 케토산, 중합체 하이드록시산, 보습제, 콜라겐, 해양 추출물 및 항산화제, 예컨대 아스코르브산(비타민 C) 및/또는 α-토코페롤(비타민 E)을 포함할 수 있다. 선스크린

제가 포함될 수도 있다. 추가로, 효소, 허브, 식물 추출물, 선(glandular) 또는 동물 추출물과 같은 성분을 조성물에 첨가할 수 있다. 이들 다양한 첨가제의 양은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 양이고, 예를 들어, 국소 제제의 총 중량의 약 0.01%~약 20% 범위이다.

[0088] 조성물은 또한 저장 시 부패를 방지하는, 즉, 효모 및 곰팡이와 같은 미생물의 성장을 억제하는 항미생물제를 포함할 수 있다. 적합한 항미생물제는 전형적으로 p-하이드록시 벤조산의 메틸 및 프로필 에스테르(즉, 메틸 및 프로필 파라벤), 나트륨 벤조에이트, 소르브산, 이미드우레아 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0089] 조성물은 또한 투여되는 화학적 실체 또는 조성물의 다른 성분들로부터 기인하는 피부 자극 또는 피부 손상의 가능성을 최소화하거나 없애기 위한 자극 완화 첨가제를 함유할 수 있다. 적합한 자극 완화 첨가제는, 예를 들면 α-토코페롤; 모노아민 옥시다제 억제제, 특히 2-페닐-1-에탄올과 같은 페닐 알코올; 글리세린; 살리실레이트; 아스코르베이트; 모넨신과 같은 이오노포어; 양친매성 아민; 염화암모늄; N-아세틸시스테인; 캡사이신; 및 클로로퀸을 포함한다. 자극 완화 첨가제는, 존재한다면, 자극 또는 피부 손상을 완화시키는 데 효과적인 농도로 조성물에 혼입될 수 있으며, 일반적으로 제제의 약 20 중량% 이하, 보다 전형적으로 약 5 중량% 이하를 차지한다.

[0090] 특정 양태에서 본 발명의 제제에 혼입될 수 있고 따라서 활성제와 함께 국소 적용될 수 있는 추가의 적합한 약리학적 활성제는 다음을 포함하나 이들에 한정되지는 않는다: 색소 침착 또는 비색소 침착 노화 점, 각화증 및 주름을 개선하거나 없애는 작용제; 국소 마취 및 진통제; 코르티코스테로이드; 레티노이드; 및 호르몬. 국소용의 약리학적 활성제의 몇 가지 예로는 아시클로버, 암포테리신, 클로르헥시딘, 클로트리마졸, 케토코나졸, 에코나졸, 미코나졸, 메트로니다졸, 미노사이클린, 페니토인, 파라-아미노 벤조산 에스테르, 옥틸 메톡시신나메이트, 옥틸 살리실레이트, 옥시벤존, 디옥시벤존, 토코페롤, 토코페릴 아세테이트, 아연 피리피온, 디페닐하이드라민, 프라모신, 리도케인, 프로케인, 크로타미톤, 하이드로퀴논 및 이것의 모노메틸 및 벤질 에테르, 나프록센, 이부프로펜, 크로몰린, 레티놀, 레티닐 팔미테이트, 레티닐 아세테이트, 콜타르, 그리세로폴빈, 에스트라디올, 하이드로코티손, 하이드로코티손 21-아세테이트, 하이드로코티손 17-발러레이트, 하이드로코티손 17-부티레이트, 프로게스테론, 베타메타손 발러레이트, 베타메타손 디프로피오네이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 플루오시노나이드, 클로베타솔 프로피오네이트, 미녹시딜, 디피리다몰, 디페닐히단토인, 벤조일 퍼옥시드, 5-플루오로 우라실, 타크롤리무스 및 국소 스테로이드, 에컨대 알클로메타손, 암시노나이드, 베타메타손, 클로베타솔, 데소나이드, 텍스옥시메타손, 디플로라손, 플루시노나이드, 플루란드레놀라이드, 할로베타솔, 할시노나이드, 하이드로코티손 및/또는 트리암시놀론이 포함된다.

[0091] 피내 전달용으로 제제화된 크림 및 살브와 같은 국소 제형이 고려되지만, 전달 시스템은 한시 방출, 지연 방출 또는 지속 방출 전달 시스템을 포함할 수 있다. 이러한 시스템은 조성물의 반복 투여를 피할 수 있고, 환자 및 의사에게 높은 편의를 제공한다. 많은 유형의 방출 전달 시스템이 이용 가능하고 당업자에게 공지되어있다. 구체적인 예로는 (a) 미국 특허 제4,452,775호; 제4,667,014호; 제4,748,034호; 제5,239,660호 및 제6,218,371호에 기재된 것과 같은 침식 시스템; 및 (b) 활성 성분이 미국 특허 제3,832,253호 및 제3,854,480호에 기재된 것과 같은 중합체로부터 제어된 속도로 침투하는 확산 시스템을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0092] 전달 시스템은 콜라겐, 피브린, 또는 막 추출물, 예컨대 기저막 추출물을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 조성물은 피부에 투여하기 위해 제제화된다. 적절한 기저막 추출물은 중량부로 약 60~85 중량%의 라미닌, 5~30%의 콜라겐 IV, 1~10%의 니도젠, 1~10%의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 및 1~5%의 엔탁틴을 함유하는 생물학적 활성 중합성 추출물을 포함한다(BME 조성물 및 이 조성물을 제조하는 방법을 개시하는 미국 특허 제 4,829,000호(본원에 참고로 포함됨)를 참조). BME는 배양될 때 상피 세포를 포함한 다양한 세포 유형의 정상적인 성장과 분화를 지원할 수 있다. 기저막 추출물은 당업계에 잘 알려져 있으며 시판되고 있다.

[0093] 피부 치료를 위해, 치료적 유효량의 조성물을 환부에 국소 투여할 수 있다. 본원에 개시된 약리학적 조성물은 아토피 피부염의 치료를 위한 적어도 그램 음성 박테리아의 사용을 용이하게 한다. 이러한 조성물은 인간 대상체를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 대상체에게 유효 성분을 전달하기에 적합할 수 있으며, 그 자체로 공지된 방식으로, 예를 들어, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 유화, 캡슐화, 포집 또는 동결건조 공정을 이용하여 제조될 수 있다. 약리학적 조성물은 1종 이상의 약리학적(예를 들어, 생리학적으로 또는 약학적으로) 허용되는 담체뿐만 아니라 상기 기재된 바와 같이 약학적으로 사용될 수 있는 조제물료의 활성 화합물의 가공을 용이하게 하는 선택적인 보조제를 사용하여 통상적인 방식으로 제제화될 수 있다.

[0094] 조성물은 그램 음성 박테리아의 단일(단위) 용량을 함유할 수 있다. 예시적인 양은 $10^5 \sim 10^{12}$ 콜로니 형성 단위

(cfu), 예컨대 $10^6 \sim 10^{10}$, 예를 들어 $10^5 \sim 10^7$ cfu, 예를 들어 10^6 cfu이다. 일부 실시양태에서, 그램 음성 박테리아의 적절한 용량은 $10^4 \sim 10^{12}$ cfu의 범위 내, 예를 들어, $10^4 \sim 10^{10}$, $10^4 \sim 10^8$, $10^6 \sim 10^{12}$, $10^6 \sim 10^{10}$, 또는 $10^6 \sim 10^8$ cfu 중 하나이다. 다른 실시양태에서, 조성물은 중량 기준으로 적어도 약 0.01%, 약 0.05%, 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 약 1.0%, 약 1.5%, 약 2.0%, 약 3.0%, 약 4.0%, 약 5.0%, 약 6.0%, 약 7.0%, 약 8.0%, 약 9.0%, 약 10.0%, 약 11.0%, 약 12.0%, 약 13.0%, 약 14.0%, 약 15.0%, 약 16.0%, 약 17.0%, 약 18.0%, 약 20.0%, 약 25.0%, 약 30.0%, 약 35.0%, 약 40.0%, 약 45.0%, 약 50.0%의 박테리아를 함유할 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물은 중량 기준으로 적어도 약 0.01%~약 30%, 약 0.01%~약 20%, 약 0.01%~약 5%, 약 0.1%~약 30%, 약 0.1%~약 20%, 약 0.1%~약 15%, 약 0.1%~약 10%, 약 0.1%~약 5%, 약 0.2%~약 5%, 약 0.3%~약 5%, 약 0.4%~약 5%, 약 0.5%~약 5%, 약 1%~10 약 5%의 그램 음성 박테리아를 함유할 수 있다.

[0095] 상기 조성물은 병변이 형성되는 것을 방지하기 위해 병변 부위 및 병변 부위 주변 또는 손상되지 않은 피부 부위(비병변 부위)와 같은 피부에 적용될 수 있다. 상기 조성물은 병변 크기를 감소시키는 데 사용될 수 있다. 상기 조성물은 매일 적용할 수 있다. 상기 조성물은 하루에 1회, 2회, 3회, 4회 또는 5회 적용할 수 있다. 상기 조성물은 격일로, 또는 1주일에 2회, 3회, 4회, 5회, 6회 또는 7회 적용할 수 있다. 상기 조성물은 매주 적용할 수 있다. 특정한 비한정적인 일 실시양태에서, 10^6 cfu가 주당 2회 또는 3회 피부에 적용된다. 상기 조성물은 투여를 위한 단위 용량으로서 제제화될 수 있다.

[0096] 크림, 연고, 로션, 스프레이제 및 멸균 수용액 또는 현탁액과 같은 국소용 약학 조성물을 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 국소용 약학 조성물을 제조하는 적합한 방법은, 예를 들면, PCT 공개 번호 WO 95/10999, PCT 공개 번호 WO 2012/150269, 미국 특허 제6,974,585호, 및 PCT 공개 번호 WO 2006/048747에 기재되어 있으며, 이들 모두 본원에 참조에 의해 포함된다. 상기 조성물은 수성 담체를 포함할 수 있으며, 피부에 스프레이제로 적용될 수 있다.

[0097] 경우에 따라, 조성물은 약학적으로 허용되는 점도 증강제 및/또는 막 형성제를 포함할 수 있다. 점도 증강제는 제제의 점도를 증가시켜, 적용 부위를 넘어 확산되는 것을 억제한다. 발삼 피(Balsam Fir)(오레곤)가 그램 음성 박테리아와 함께 사용하기 위한 약학적으로 허용되는 점도 증강제의 일례이다.

[0098] 막 형성제는 건조되면 적용 부위 위에 보호막을 형성한다. 이 막은 활성 성분의 제거를 억제하고 처리된 부위와의 접촉 상태를 유지한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 막 형성제의 예는 플렉시블 콜로디온(Flexible Collodion), USP이다. 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, PA: Mack Publishing Co., 1995), p. 1530]에 기재된 바와 같이, 콜로디온은 증발되어 피복실린막을 남기는 피복실린(니트로셀룰로스)을 함유하는 에틸 에테르/에탄올 용액이다. 막 형성제는 추가적으로 담체로서도 작용할 수 있다. 건조되어 막을 형성하는 용액을 종종 도료라고도 한다. 약학 제제 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이 크림은 점성 액체 또는 수중유형 또는 유중수형 반고체 에멀션이다.

[0099] 크림 베이스는 물로 씻을 수 있고, 오일상, 유화제 및 수성상을 포함한다. "내부" 상이라고도 하는 오일상은 일반적으로 페트롤라툼, 및 세틸 또는 스테아릴 알코올과 같은 지방 알코올로 구성된다. 수성상은 통상적으로, 반드시 아니지만, 그 부피가 오일상을 초과하고, 일반적으로 보습제를 함유한다. 크림 제형의 유화제는 일반적으로 비이온성, 음이온성, 양이온성 또는 양쪽성 계면활성제이다.

[0100] 로션은 마찰 없이 피부 표면에 적용할 수 있는 조제물이며, 일반적으로, 활성제를 포함한 입자가 물 또는 알코올 베이스 중에 존재하는 액체 또는 반액체 조제물이다. 로션은 일반적으로 고체의 현탁액이고, 바람직하게는 수중유형의 액체 유성 에멀션을 포함한다. 로션은, 보다 유동적인 조성물이 바르기 쉽기 때문에, 면적이 큰 신체 부위를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로 로션 중의 불용성 물질은 미세하게 분할되어야 할 필요가 있다.

[0101] 로션은, 전형적으로, 보다 우수한 분산액을 제조하기 위해 현탁화제뿐만 아니라, 피부와 접촉된 상태로 활성제를 국제화시키고 유지하는 데 유용한 화합물, 예를 들어 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸-셀룰로스 등을 함유한다.

[0102] 용액은 1종 이상의 화학 물질(용질)을 액체에 용해시켜 용해된 물질의 분자가 용매의 분자들 사이에 분산되도록 하여 제조된 균질한 혼합물이다. 용액은 용질을 완충시키거나, 안정화하거나, 보존하기 위한 다른 약학적 또는 미용학적으로 허용되는 화학 물질을 함유할 수 있다. 국소 용액의 제조에 사용되는 용매의 일반적인 예로는 에

탄올, 물, 프로필렌 글리콜 또는 임의의 다른 허용되는 비히클이 있다. 이들은 피부에 분무하거나, 피부에 도포하거나, 붕대를 그 용액으로 적시는 것과 같은 임의의 방법으로 적용할 수 있다.

- [0103] 겔은 반고체의 현탁형 시스템이다. 단일상 겔은 담체 액체 전체에 실질적으로 균일하게 분포된 유기 거대분자를 함유하며, 이것은 일반적으로 수성이지만, 또한 바람직하게는 알코올 및 경우에 따라 오일을 함유한다. 특히 겔 화제로서 사용되는 몇몇 "유기 거대분자"는 가교 결합된 아크릴산 중합체, 예컨대 중합체의 "카보머" 계열, 예를 들어, CARBOPOL[®] 과 같이 상업적으로 입수할 수 있는 카복시폴리아크릴렌이다. 또한, 친수성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 옥시드, 폴리옥시에틸렌-폴리 옥시프로필렌 공중합체 및 폴리비닐 알코올; 셀룰로오스 중합체, 예컨대 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 및 메틸 셀룰로스; 검, 예컨대 트래거캔스 및 잔탄 검; 알긴산나트륨; 및 젤라틴이 유용하다. 균일한 겔을 제조하기 위해, 알코올 또는 글리세린과 같은 분산제를 첨가하거나, 분쇄, 기계적 혼합 또는 교반 또는 이들의 조합에 의해 겔화제를 분산시킬 수 있다. 이들 겔은 본 명세서에 개시된 방법에 사용된다.
- [0104] 연고도 또한 개시된 방법에 이용될 수 있다. 연고는 일반적으로 페트롤라툼 또는 다른 석유 유도체를 베이스로 하는 반고체 조제물이다. 당업자가 인식하는 바와 같이, 사용되는 특정 연고 베이스는 다수의 바람직한 특징, 예를 들어, 연화성 등을 제공하는 것이다. 연고 베이스는 일반적으로 비활성, 안정성, 비자극성 및 비감작성이다. 연고 베이스는 4개 부류로 분류된다: 유성 베이스; 유화성 베이스; 에멀션 베이스; 및 수용성 베이스(참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, PA: Mack Publishing Co., 1995), p. 1399-1404). 유성 연고 베이스는, 예를 들어, 식물성 오일, 동물로부터 얻은 지방 및 석유로부터 얻은 반고체 탄화수소를 포함한다. 흡수성 연고 베이스로도 알려진 유화성 연고 베이스는 물을 거의 또는 전혀 함유하지 않고, 예를 들어 하이드록시스테아린 설페이트, 무수 라놀린 및 친수성 페트롤라툼을 포함한다. 에멀션 연고 베이스는 유중수형(W/O) 에멀션 또는 수중유형(O/W) 에멀션이며, 예를 들어, 아세틸 알코올, 글리세릴 모노 스테아레이트, 라놀린 및 스테아르산을 포함한다. 수용성 연고 베이스는 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜로부터 제조된다.
- [0105] 페이스트는 활성제가 적절한 베이스 중에 현탁되어 있는 반고체 제형으로서 또한 유용하다. 베이스의 성질에 따라, 페이스트는 지방 페이스트 또는 단일상 수성 겔로 제조된 페이스트로 나뉜다. 지방 페이스트 내의 베이스는 일반적으로 페트롤라툼 또는 친수성 페트롤라툼 등이다. 단일상 수성 겔로 제조된 페이스트는 일반적으로 카복시메틸 셀룰로스 등을 베이스로서 혼입한다.
- [0106] 국소 조성물은 크림, 로션, 스프레이제, 용액, 겔, 연고, 페이스트, 플라스터, 페인트, 바이오접착제, 붕대, 스프레이, 현탁액 등과 같은 신체 표면의 적용에 적합한 임의의 형태일 수 있고/있거나, 리포솜, 마이셀 및/또는 마이크로스피어를 함유하도록 제조될 수 있다. 국소 조성물은, 신체 표면에 적용될 때와 그 후 신체 표면으로부터 증발하는 수분이 제제 내에서 유지될 수 있도록 폐쇄성 표면층과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0107] 환부 표면에 크림, 로션, 겔, 연고, 페이스트 등을 적용할 수 있다. 용액도 동일한 방식으로 적용될 수 있지만, 더 일반적으로 드로퍼(dropper), 면봉, 스프레이어 등을 사용하여 적용되며, 환부에 조심스럽게 도포된다. 상기 조성물은, 예를 들어, 연고와 같은 국소 조제물로, 대상 위치에 직접, 또는 드레싱 또는 붕대의 일부로서 적용될 수 있다. 조성물은 피부 투여용의 임의의 디바이스에 의한 투여를 위해 단위 투여량으로 제제화될 수 있다. 단위 투여량은 담체, 예를 들어, 적어도 하루 또는 그 이상과 같은 원하는 기간 동안 피부에 부착할 수 있는 접착성 담체 중의 활성제의 저장소일 수 있다.
- [0108] 약학 조성물은 아토피 피부염의 치료에 사용된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 국소 적용은 병변 크기를 감소시키고/시키거나, 병변의 수를 감소시키고/시키거나, 증상을 감소시킨다. 이러한 약학 조성물의 적용은 치료되는 대상체의 피부에서 S. 아우레우스를 감소시킬 수 있다. 약학 조성물의 적용은 경피 수분 손실도로 측정되는 바와 같이 피부의 장벽 기능을 향상시킬 수 있다.
- [0109] 아토피 피부염은 갑작스러운 악화(flare-up)로 발생하고 관해 기간이 있을 수 있다. 국소 적용은 재발을 줄일 수 있어, 아토피 피부염의 추가 사건의 회수, 강도 또는 빈도를 감소시킨다. 국소 적용은 관해 기간, 예컨대 사건 간 시간의 길이를 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 아토피 피부염의 추가 사건은 적용 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12주 동안 발생하지 않을 것이다. 추가의 실시양태에서, 아토피 피부염의 추가 사건은 국소 적용 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 동안 발생하지 않을 것이다.
- [0110] 이 방법은 대상체 피부의 미생물총을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 대상체의 피부에서의 박테리아의 분류군이 치료 후 변경되는지를 확인하기 위해 진단 어세이를 수행할 수 있다. 따라서, 일부

실시양태에서, 박테리아 문, 박테리아 강, 박테리아 목, 박테리아 과, 박테리아 속 및/또는 박테리아 종이 아토피 피부염을 갖는 대상체의 피부에서 바뀌는지를 확인한다. 일 실시양태에서, 치료 후 대상체 피부에서 S. 아우레우스의 양이 변화되는지를 확인한다.

[0111] 샘플 중의 미생물총을 확인하는 방법은 샘플, 예를 들어, 피부 샘플을 제공하는 단계 및 상기 샘플 중의 1종 이상의 미생물총을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 이 방법의 일 실시양태는 샘플 중에 존재하는 1종 이상의 미생물총으로부터의 아이덴티티의 분자 지표를 포함하는 핵산 샘플을 준비하는 단계 및 상기 아이덴티티의 분자 지표를 검출하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 상기 방법은 DNA 샘플을 준비함으로써 하나 이상의 핵산 샘플을 제조하는 단계를 포함할 수 있다. 아이덴티티의 분자 지표는 rRNA 유전자(예를 들어, 16S rRNA 유전자)와 같은 다형성 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 아이덴티티의 분자 지표는 16S rRNA 유전자 또는 그의 일부 또는 부분서열과 같은 다형성 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 결정함으로써 검출될 수 있다. 아이덴티티의 분자 지표를 검출하기 위한 추가의 실시양태는 또한 선택적 프라이머를 이용한 PCR, 선택적 프라이머를 이용한 정량적 PCR, DNA-DNA 하이브리드화, RNA-DNA 하이브리드화, 인 시츄 하이브리드화 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다형성 폴리뉴클레오티드는 특정 프로브에 대한 하이브리드화에 의해 검출될 수 있다. 이러한 예에서, 특정 프로브는 16S rRNA 유전자와 같은 다형성 표적 핵산에 하이브리드화한다. 경우에 따라, 핵산은 복수의 특정 프로브, 예를 들어, 각각 박테리아를 식별하는 복수의 특정 프로브를 포함하는 하나 이상의 어레이에 하이브리드화될 수 있다. 아이덴티티의 분자 지표를 검출하는 것은 다형성 표적 단백질, 예를 들어 미생물총을 식별하는 다형성 표적 단백질에 결합하는 단백질 프로브(항체 등)를 사용하여 행해질 수 있다(참조에 의해 본 명세서에 통합된 미국 특허 제9,173,910호 참조).

[0112] 대상체로부터 채취한 샘플 중에서 S. 아우레우스와 같은 1종 이상의 박테리아의 상대적 존재량을 측정할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "상대적 존재량(relative abundance)"은 정해진 위치 또는 군집 내에서 어떤 유기체의 다른 유기체에 대한 공통성 또는 희귀성을 의미한다. 예를 들어, 상대적 존재량은 일반적으로 샘플 중의 유기체의 총 존재량과 비교하여 특정 유기체의 존재량을 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0113] 박테리아의 상대적 존재량은 직접적으로 또는 간접적으로 측정할 수 있다. 직접적 측정은 배양에 기반한 방법을 포함할 수 있다. 간접적 측정은, 전체 샘플과 관련하여 유기체 또는 유기체의 군에 특이적인 리보솜 RNA(rRNA) 유전자 서열과 같은 아이덴티티의 분자 지표의 출현율을 비교하는 것을 포함할 수 있다.

[0114] 일 실시양태에서, 개개의 대상체의 피부 내에서의 미생물총, 예를 들어, S. 아우레우스 및/또는 임의의 유형의 그램 음성 박테리아의 상대적 존재량은, 개체로부터 채취한 샘플 중의 1종 이상의 특정 박테리아의 비를 측정하여, 대상체의 미생물총 프로파일을 얻음으로써 계산할 수 있다. 상대적 존재량은 샘플 중에 존재하는 박테리아의 총 존재량으로부터 도출될 수 있다. 본원에 사용된 "총 존재량(total abundance)"은 일반적으로 샘플 중의 총 박테리아를 의미한다. 따라서, "미생물총 프로파일"은 대상체 또는 대상체로부터 얻은 피부 샘플 중의 하나 이상의 미생물총의 상대적 존재량을, 예컨대 그래프로 나타낸 것을 지칭한다.

[0115] **키트**

[0116] 개시된 치료적 유효량의 정제된 생존 그램 음성 박테리아는 키트의 성분으로서 제공될 수 있다. 정제된 생존 그램 음성 박테리아는 성장 배지 중에, 동결 건조된 형태로, 또는 동결된 세포로서 제공될 수 있다. 따라서, 상기 키트는 치료적 유효량의 정제된 생존 그램 음성 박테리아를 포함하는 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 i) 상기 그램 음성 박테리아의 용해물 및/또는 성분은 시험관내 어세이에서 S. 아우레우스의 성장을 억제하고; ii) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 각질형성세포를 자극하고; iii) 상기 그램 음성 박테리아는 인간 세포로부터의 사이토카인 발현을 유도하고; iv) 상기 그램 음성 박테리아는 대상체의 피부에 투여될 때 비병원성이다.

[0117] 일부 실시양태에서, 상기 키트는, (임의의 형태의) 그램 음성 박테리아를 포함하는 하나의 용기 및 그램 음성 박테리아를 현탁시키기 위한 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 하나의 용기와 같은, 약학 조성물을 제조하는 데 필요한 구성 요소를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는, 예를 들어, 완충된 식염수 용액 또는 수크로스 용액일 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 키트는 그램 음성 박테리아를 함유하는 용기 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제2 용기와, 약학적으로 허용되는 담체를 측정하기 위한 시린지와 같은 디바이스를 포함할 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 또 다른 실시양태에서, 상기 키트는 약학적으로 허용되는 담체에 현탁될 때의 그램 음성 박테리아의 국소 적용을 위한 스프레이 노즐 또는 붓대와 같은 디바이스를 포함할 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0118] 경우에 따라, 그러한 키트는 포장, 설명서 및 다양한 다른 시약, 예컨대 추가의 완충제 또는 다른 치료 성분을

포함하는 추가의 구성 요소를 포함한다. 상기 키트는 용기 및 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는, 예를 들어, 병, 바이알, 튜브 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 상기 용기는 전형적으로 아토피 피부염의 치료에 효과적인 그램 음성 박테리아를 포함하는 조성물을 수용한다. 몇몇 실시양태에서, 용기는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 아토피 피부염과 같은 특정 병태를 치료하는 데 사용됨을 표시한다.

[0119] 라벨 또는 패키지 삽입물은 일반적으로 사용 설명서를 추가로 포함한다. 패키지 삽입물은 일반적으로 적응증, 용법, 투여량, 투여 방식, 상기 치료용 제품의 사용에 대한 금기 및/또는 경고에 관한 정보를 포함하는 치료용 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 포함한다. 일부 비한정적인 예에서, 상기 설명서는 그램 음성 박테리아를 함유하는 바이알에 첨가하기 위한 약학적으로 허용되는 담체의 양에 대한 정보, 약학적으로 허용되는 담체 중에 그램 음성 박테리아를 현탁시키는 것에 관한 설명서, 및 피부에의 국소 적용을 위한 설명서를 포함한다. 적용은 피부에 분무하는 것, 피부에 면봉으로 묻히는 것, 또는 피부에 적용하기 위한 붕대 위에 현탁액을 주입하는 것일 수 있다.

[0120] 설명 자료는 전자 형태(예를 들어, 컴퓨터 디스켓 또는 콤팩트 디스크)로 쓰여진 것일 수도 있고 시각적인 것일 수도 있다(예를 들어, 비디오 파일). 키트에는 피부 적용을 위한 스프레이 팁, 붕대, 또는 면봉과 같이 키트가 설계된 특정 용도를 용이하게 하기 위한 추가 구성 요소가 포함될 수도 있다. 키트는 추가로 특정 방법의 실시를 위해 통상적으로 사용되는 완충제 및 다른 시약을 추가로 포함할 수 있다. 키트 및 적절한 내용물은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0121] 본 발명은 다음의 비한정적인 실시예에 의해 예시된다.

[0122] **실시예**

[0123] 인간의 피부에서 수집한 다양한 공생 그램 음성(CGN) 박테리아에 노출된 후 면역학적 결과가 다른지를 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 이 연구를 위해, 건강한 대조군과 아토피 피부염(AD) 환자로부터 CGN 박테리아를 채취하였다. 다양한 세포 및 배양 기반 모델을 사용하여, 그들의 면역원성을 평가하였다. CGN의 대표 균주를 선발하였고, 그 영향을 AD의 MC903 마우스 모델에서 평가하였다. AD 환자에게서가 아닌 건강한 인간 지원자에게서 채취한 CGN 박테리아는 장벽 기능, 선천적 면역 활성화 및 S. 아우레우스 억제와 관련이 있었음이 확인되었다. 건강한 대조군으로부터의 CGN으로 AD를 치료할 때, 마우스 모델에서 결과가 개선되었다.

[0124] **실시예 1**

[0125] **재료 및 방법**

[0126] **그램 음성 박테리아 수집 및 확인:** 멸균 인산염 완충 식염수(PBS; Corning Cellgro, Corning, 뉴욕주)에 습윤시킨 2개의 FloqSwab(Copan, Brescia, 이탈리아)을 15~30초 동안 격렬히 환자의 피부(전주와)에 문질렀다. 한 면봉을 그램 양성 박테리아와 진균의 성장을 억제하기 위한 반코마이신(300 µg/mL)과 암포테리신 B(5 µg/mL, Sigma-Aldrich, 미주리주 세인트 루이스)가 함유된 2 mL의 멸균된 헵크스 평형 염 용액(HBSS; Sigma-Aldrich)을 포함한 15 mL 원추형 튜브(Corning Life, Corning, 뉴욕주)에 넣었다. 나머지 면봉을 유사한 농도의 반코마이신과 암포테리신 B를 함유하는 R2A(Reasoner's 2A) 브로쓰(Teknova, 캘리포니아주 홀리스터) 2 mL가 들어있는 15 mL 원추형 튜브에 넣었다. 그 후, 면봉이 남겨진 튜브를 32°C에서 48~72시간 동안 일정한 속도로 셰이킹하면서 인큐베이션한 후, 각 튜브로부터의 100 µL를 R2A 한천 플레이트(Remel, 캔자스주 르넥사) 상에 플레이트링하였다. 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화-비행 시간(MALDI-TOF) 분석을 이용한 질량 분석으로 종을 식별하기 위해 콜로니를 취하였다. BioTyper(v3.1, Bruker Daltonics Inc., 매사추세츠주 빌러리카)를 사용한 MALDI-TOF MS를 위한 박테리아 단백질 추출은 NIH 임상 센터 미생물 실험실에서 이전에 개시된 방법(Lau et al., *Journal of clinical microbiology* **52**, 2804-2812 (2014); 온라인 발행 Epub Aug (10.1128/JCM.00694-14)), 장비 설정 및 교정(Lau et al., *Journal of clinical microbiology* **51**, 828-834 (2013); 온라인 발행 (Epub) Mar (10.1128/JCM.02852-12); Youn et al., *Journal of clinical microbiology*, (2015); 온라인 발행 (Epub) Sep 2 (10.1128/JCM.01643-15))에 의해 수행하였다. BioTyper 식별은 NIH가 개발한 여러 데이터베이스에 의해 제공되는 추가 질량 스펙트럼에 의해 보충되었다(Lau et al., 2014, *supra*; Stevenson et al., *Journal of clinical microbiology* **48**, 3482-3486 (2010); 온라인 발행 (Epub) Oct (10.1128/JCM.00687-09; Myles et al., *Nature immunology* **14**, 804-811 (2013); 온라인 발행 (Epub) Aug (10.1038/ni.2637)). 도 1에 기록된 건강한 대조군 R. 뮤코사 균주 10종은 MALDI-TOF 분석에 의해 확인된 다른 R. 뮤코사 단리물에서 관찰되었던 특유

의 콜로니 형태, UV 광 반응성 및 그램 염색 특성만을 기초로 하여 확인하였다. 후속 연구에 사용된 모든 R. 류코사 단리물은 MALDI-TOF 분석에 의해 검증되었다. 본 연구의 모든 참가자들에 대해 서면 동의서를 얻었다.

[0127] *시험관내 스타필로코커스 아우레우스 억제 어세이*: 그램 음성 단리물을 R2A 5 mL에서 위와 같이 8~10일 동안 배양하였다. 박테리아를 5000g로 12분 동안 펠릿화하였다. 상청액을 회수하고 냉동시킨 뒤 동결건조시켰다 (Labconco FreeZone 2.5, 미주리주 캔자스 시티). 동결건조된 생성물 및 박테리아가 없는 동시에 인큐베이션 및 동결건조된 R2A의 대조군을 트립신 처리 대두 브로쓰(tryptic soy broth; TSB) 1 mL에 현탁시켰다. 5 mL TSB에서 밤새 성장시킨 S. 아우레우스 균주의 배양물을 새로운 배지에 1:100으로 희석한 후, 새로 희석된 배양액 100 mL을 CGN 상청액 또는 동결건조된 R2A 대조군을 함유한 TSB 100 mL과 혼합하였다. 샘플을 일정한 교반 하에 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션했다. 계열 희석을 수행하고 플레이팅하였고; 다음 날, 콜로니를 카운팅하여, 카운팅 가능한 모든 플레이트에 대해 평균을 구하였다. S. 아우레우스 성장에 미치는 영향 퍼센트는 CGN-상청액 노출 배양물에서의 CFU의 수를 R2A에만 노출된 배양물에서의 CFU의 수로 나누어 계산하였다.

[0128] *수포 유도 및 박테리아 켈린지*: 8웰 흡입 챔버를 디자인하고(Ammnra Creations, 캘리포니아주 새너제이), 청동에 3D 프린팅하였다(Shapeways, 뉴욕주 뉴욕). 이것을 참가자의 에탄올로 살균한 팔딱면 위에 놓고, 마이크로덤 연마 장치(Kendal Diamond HB-SF02)를 사용하여 30 mmHg의 흡입 하에 2시간 동안 두었다. 장치를 제거한 후, 생성된 표피 수포 외피를 외과적으로 제거하였다. 8개의 켈린지 챔버를 디자인하고(Ammnra Creations), 청동에 3D 프린팅하였다(Shapeways)(도 4c). 매칭되는 8개의 웰 템플릿(Ammnra Creations)을 사용하여 10 mm 펀치 생검(Acu-Punch, Acu-derm, 플로리다주 포트 로더데일)을 하나의 4"x4" 듀오덤(Duoderm) 드레싱(ConvaTec; 뉴저지주 브릿지워터)으로 절단하였다. 켈린지 챔버의 가장자리를 더마본드(Dermabond) 접착제(Ethicon, 뉴저지주 소머빌)로 닦은 후, 벗겨진 수포 위에 올려 놓았다. 각 웰에 멸균 식염수(Corning Life) 1 mL 또는 멸균 식염수 중에 현탁된 2e7 CFU의 방사선 조사된 박테리아를 충전하였다. 다음 날 아침, 피펫(Eppendorf; 뉴욕주 하퍼지)으로 수포액을 제거하였다. 수집된 샘플을 350g로 7분 동안 원심분리하고, 상청액을 분리하여, 배치(batch) 분석을 위해 동결시켰다.

[0129] *사이토카인 및 항미생물 펩티드 검출*: 닌크 맥시옵(Nunc Maxisorp) 플레이트에 인간 reg3감마의 표준 물질(Sino Biologicals, 중국 베이징) 또는 수포액 샘플(0.9% NaCl에 희석된 100-12.5%)을 밤새 코팅하였다. 다음 날, 웰을 PBS로 5X 세척하고, PBS 중 3% BSA에서 1시간 동안 블로킹하였다. 웰을 PBS로 1회 세척하였다. 다클론 단백질 A 정제 토끼 항-마우스 reg3감마(13.2 mg/ml, 피츠버그 대학교의 J. Kolls로부터 제공받음)를 1% BSA/PBS에 1:1000의 희석률로 첨가하고 RT에서 90분동안 인큐베이션하였다. 항-토끼 HRP(Santa Cruz, 텍사스주 달라스)와 TMB 기질(Ebioscience, 캘리포니아주 샌 디에고)을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 5~10분 동안 인큐베이션 하였다. 2 N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지시키고, 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. 시판되는 ELISA 키트로 LL-37(Hycult; 펜실베이니아주 플라이마우스 미팅) 및 인간 베타-디펜신 3(PeproTech; 뉴저지주 로키 힐)를 측정하였다. 사이토카인 수치는 제조사 지침에 따라 Bio-Plex(BIO-Rad, 캘리포니아주 허큘리스)에 의해 측정되었다.

[0130] *각질형성세포 배양*: 1차 포피 각질형성세포(KC) 배양물을 수집하고, 이전에 기술된 바와 같이 자극하였다(Myles et al., *Nature immunology* **14**, 804-811 (2013); 온라인 발행 EpubAug (10.1038/ni.2637)). 1e7 CFU의 살아있는 공생 그램 음성 박테리아를 KC 배양 배지에 첨가하였다. PCR 분석을 위해 24시간 후 mRNA를 $\Delta \Delta CT$ 방법으로 추출하였다.

[0131] *마우스*: BALB/c 마우스를 타코닉 팜스(Taconic Farms)(뉴욕주 허드슨)에서 구입하였다. 마우스는 8~14주령까지 사용되었다. 실험은 암컷과 수컷 마우스에서 모두 수행되었지만, 나이와 성별은 각 실험 내에서 일치시켰다.

[0132] *경피 수분 손실도(Trans-Epidermal Water Loss; TEWL) 측정*: 마우스를 면도하고, 털을 화학적으로 제거하였다(Nair). 다음 날부터 매일, 약 1e7 CFU의 살아있는 박테리아를 누드 부위에 접종하였다. 접종 직전에, TEWL은 제조사 지침에 따라 VapoMeter(Delfin, 커네티컷주 그리니치)로 매일 측정되었다.

[0133] *MC903 및 귀 접종*: AD의 MC903 마우스 모델은 이전에 기재된 바와 같이 수행되었다(Wang et al., *The Journal of allergy and clinical immunology* **135**, 781-791 e783 (2015); 온라인 발행 (Epub) Mar (10.1016/j.jaci.2014.09.015)). 예방 연구를 위해, 1e7 CFU의 그램 음성 박테리아를 멸균 PBS에 현탁시키고 마우스의 귀에 10 mL의 부피로 점적하였다. 접종은 MC903보다 2일 전에 시작되었으며, MC903 노출 동안 계속되었다. MC903을 먼저 놓고, 박테리아 단리물을 놓기 전에 2~5분 동안 에탄올을 증발시켰다. 귀 두께는 14일째 측정하였다. mRNA 단리 및 PCR은 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다(Myles et al., 2013, supra). S. 아우레우스를 이용하는 공접종 실험을 위해, 그램 음성 단리물의 접종 직전에, 1e6 CFU의 S. 아우레우스의 SAAS9 균주

를 귀에 점적하였다. 치료 연구는 14일 동안 매일 MC903에 마우스를 노출시키고 13~15일에 1e7 CFU의 그램 음성 박테리아 접종함으로써 수행되었다. 21일째, 귀 두께를 측정하고 사진을 촬영하였다.

[0134] **혈청 총 IgE 분석:** MC903 치료 14일째에 혈청을 수집하였다. 시판되는 키트(Bethyl Laboratories, 텍사스주 몽고메리)를 사용하여, 이전에 기재된 바와 같이 총 IgE 항체를 측정하였다(Myles, *Nutrition journal* **13**, 61 (2014)10.1186/1475-2891-13-61)).

[0135] **통계:** 프리즘(Prism) 소프트웨어(GraphPad, 캘리포니아주 샌 디에이고)로, 여러 샘플의 비교를 위해 양측 언페어드 t-검정 또는 ANOVA를 이용하여 평균을 비교하였다. NS = 유의하지 않음, * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001, **** = p<0.0001.

[0136] **연구 승인:** 모든 동물 실험은 동물 관리 및 사용 위원회(Office of Animal Care and Use)의 승인된 절차에 따라서 수행하였다. 모든 인간 시료 채취 및 처리는 IRB가 승인한 임상 시험에 따라 수행되었으며, 모든 대상체는 샘플 수집에 대한 완전한 동의를 하였다. 모든 참여자는 연구 프로토콜에 대한 서면 동의서를 제공하였고, 혈액 수집 전에 기관 생명윤리위원회(institutional review board; IRB)의 동의를 얻었다.

[0137] **실시예 2**

[0138] **피부 공생 그램 음성 미생물총은 건강한 대조군과 AD 환자 간에 다르다.**

[0139] 유전체 기반의 마이크로바이옴 확인은 AD 환자와 건강한 대조군 간의 그램 음성 피부 바이옴에 있어서의 현저한 차이를 밝혔다(4). 배지, 항생제 및 온도의 적절한 선택을 통한 그램 음성 피부 플로라(flora)를 배양하는 방법은 CGN 종의 기능적 특성화와 비교를 가능하게 하였다. 17명의 AD 환자 피부에 존재하는 배양 가능한 박테리아에서 26명의 건강한 지원자와 비교할 때 유의적인 차이가 확인되었다(도 1a; 표 1).

표 1

표 1: 대조군과 환자의 인구통계특성

인구통계특성	대조군	환자	유의성
수	26	17	--
나이			
평균(범위)	32.5 (8-65)	18.5 (8-51)	**
성별 (%)			
남성	50	70	NS
여성	50	30	
인종 (%)			
백인	39	47	NS
흑인	15	18	
라틴계	0	0	
아시아인	31	24	
기타/혼혈	15	11	
SCORAD (범위)	0 (0)	19.7 (1-56)	****

도 1에 포함된 참여자들의 나이, 성별, 인종 및 SCORAD. 스튜던트 t 검정(나이, SCORAD) 또는 카이 제곱(성별, 인종)에 의해 결정된 유의성. ** = p < 0.01, **** = p < 0.001, NS = 유의성 없음.

[0140]

[0141] 건강한 지원자(HV)에서 확인된 주요 그램 음성 종은 로세오모나스 뮤코사였다. AD 환자의 약 절반은, DNA 기반 분석과 일치하여, 배양 가능한 그램 음성 박테리아를 갖지 않았다(Kong et al., *Genome research* **22**, 850-859 (2012); 온라인 발행 EpubMay (10.1101/gr.131029.111)).

[0142] 실시예 3

[0143] 건강한 지원자로부터의 CGN은 S. 아우레우스의 성장을 억제한다.

[0144] S. 아우레우스의 과증식 및 그에 의한 감염은 AD의 면역 불균형 및 불량한 장벽 기능에 기여하기도 하고 그 결과이기도 하다. S. 아우레우스는 알레르기 비만 세포(*Schlievert et al., J Allergy Clin Immunol* **125**, 39-49 (2010); 온라인 발행 (EpubJan) (10.1016/j.jaci.2009.10.039); *Nakamura et al., Nature* **503**, 397-401 (2013); 온라인 발행 (Epub) Nov 21 (10.1038/nature12655)) 및 T 세포(*Brauweiler et al., The Journal of investigative dermatology* **134**, 2114-2121 (2014); 온라인 발행 (Epub) Aug (10.1038/jid.2014.43))를 직접 활성화시킬 수 있다. 항생제 치료는 S. 아우레우스 부담을 줄이고 증상을 호전시킬 수 있지만, 근본적인 병리를 정상화하지는 못한다(*Boguniewicz and Leung, J Allergy Clin Immunol* **132**, 511-512 e515 (2013); 온라인 발행 (Epub) Aug (10.1016/j.jaci.2013.06.030)). S. 아우레우스 성장에 대한 CGN 균주의 영향을 평가하기 위해, S. 아우레우스의 여러 단리물을 CGN의 배양물로부터 얻은 상청액의 존재 하에 성장시켰다. 평균적으로, HV-CGN의 상청액은 S. 아우레우스를 거의 50%까지 억제하였다(도 1b; 도 4). 대조적으로, AD-CGN은 더 가변적인 효과를 나타내었으며, 대부분의 균주는 억제하지 못하였다(도 1b; 도 4). 억제성 CGN 상청액으로부터의 S. 아우레우스를 새로운 배지에 재접종하면 정상적인 성장을 허용하였는데, 이는 살균 작용보다는 정균 작용임을 시사한다. 이러한 시험관내 분석과 일치하여, 마우스 귀에 CGN과 S. 아우레우스를 함께 접종하자 또한 S. 아우레우스 수율이 감소하였다(도 1c). 이 억제는 지질 리소포스파티딜콜린(LPC) 생산과 관련이 있었으며, 상업적으로 구입한 LPC를 사용하여 재현하였으며(도 8b), 이는 본 발명자들의 박테리아의 고유한 특징이 잠재적인 임상적 이익과 관련이 있음을 나타낸다.

[0145] 실시예 4

[0146] 건강한 지원자로부터의 CGN은 인간의 선천적 면역을 유도한다.

[0147] 이러한 박테리아에 대한 생체내 인간 피부 면역 반응성을 측정하기 위해, 이전에 기재된 것과 유사하게(*Follin and Dahlgren, Methods in molecular biology* **412**, 333-346 (2007)10.1007/978-1-59745-467-4_22), 건강한 지원자의 팔뚝에 흡입 수포를 유도하고(도 5a), 표피 수포 외피를 제거하였다(도 5b). 켈린지 챔버(도 5c)를 사용하여, 상이한 S. 아우레우스 억제(도 1b)를 기초로 선택된 HV 유래 또는 AD 유래의 R. 뮤코사의 치사적으로 방사선 조사된 균주에 피부 수포 베이스를 노출시켰다.

[0148] 자극 20~24시간 후, IL-6에 대한 수포 사이토카인 수준(도 2a~2b)은, AD 환자로부터 얻은 것에 비해, HV R. 뮤코사에 반응하여 현저하게 더 높았다(도 2a~2b). 전통적인 Th(T 헬퍼) 사이토카인, 예컨대 인터루킨(IL)-17, 인터페론 감마(IFN γ), 또는 IL-4 수준에는 차이가 없었고(도 2a), 다른 많은 사이토카인(도 6a), 항미생물 펩티드(도 6b)의 수준에도 유의적인 차이가 없었다. 그러나, 적응성 T 세포 사이토카인은 또한 추후 시점에 측정되어야 한다. 시험관내에서의 생 CGN의 여러 단리물에 의한 인간 포피 유래의 1차 각질형성세포(KC)의 감염은 KC 선천적 면역 마커에 대한 상이한 단리물의 다양한 효과를 보여주었지만, AD-CGN과 비교하여, HV-CGN은 디펜신 β 4A(도 7A), 및 업스트림 조절인자(*Miller et al., Dermatologic therapy* **23**, 13-22 (2010); 온라인 발행 (Epub) Jan-Feb (10.1111/j.1529-8019.2009.01287.x); *Schauber and Gallo, Experimental dermatology* **17**, 633-639 (2008); 온라인 발행 (Epub) Aug (10.1111/j.1600-0625.2008.00768.x)), CYP27b1(비타민 D 전환 효소, 도 7B), 비타민 D 수용체(VDR)(도 7C), 및 항미생물 펩티드 카텔리시딘(도 7D)의 mRNA 존재량을 증대시켰다. IL-1 β 또는 IL-6(도 7E~7F)의 전사체 수준에는 차이가 없었다. CD14, IL-8, 종양 괴사 인자 알파(TNF α), 톨 유사 수용체(TLR) 2, TLR3, TLR4, TLR9, 또는 흥전 간질 림포포이에틴(TSLP) mRNA의 존재량도 차이가 없었고, S. 아우레우스를 억제하고 KC를 활성화시키는 단리물의 능력 간에도 명백한 상관관계가 없었다.

[0149] 실시예 5

[0150] 건강한 지원자로부터의 CGN은 마우스의 장벽 기능을 보존한다.

[0151] AD의 장벽 기능 상실은 경피 수분 손실(TEWL)로 인해 건조하고 가려운 피부(*Boguniewicz et al., J Allergy Clin Immunol* **125**, 4-13; quiz 14-15 (2010); 온라인 발행 (Epub) Jan (10.1016/j.jaci.2009.11.027)) 및 항원에 대한 피부 감각화(*Pyun, Allergy, asthma & immunology research* **7**, 101-105 (2015); 온라인 발행 (Epub) Mar (10.4168/aair.2015.7.2.101))를 유발한다. 일부 환자의 경우, 이 장벽 결함은 밀착 연결 단백질 필라그린의 기능 장애와 관련이 있다(*Bantz et al., Journal of clinical & cellular immunology* **5**, (2014); 온라인 발행 (Epub) Apr (10.4172/2155-9899.1000202)). 인간 수포 연구에 사용되는 HV-CGN의 대표적인 단리물을 건강한 마우스 귀에 국소 적용하면, 귀의 홍반 또는 두께에 눈에 띄는 변화 없이 AD-CGN에 비해 필라그린의 전사체 수

준이 향상되었다(도 2c). AD-CGN의 적용은 TEWL을 증가시킨 반면, HV-CGN은 영향을 주지 않았다(도 2d). 종합하면, 이러한 데이터는, 건강 상태와 관련된 CGN의 균주는 비타민 D의 활성화, 선천적 면역의 자극 및 장벽 기능의 보존과 관련하여 잠재적으로 유익한 면역 결과를 유도한다는 것을 시사한다.

[0152] 실시예 6

[0153] 건강한 지원자로부터의 CGN은 AD의 마우스 모델의 결과를 개선한다.

[0154] 비타민 D 유사체인 MC903은 마우스 귀에 바르면 AD와 유사한 피부염을 유발한다(22). HV 유래의 R. 뮤코사 단리물의 동시 적용은 귀 두께로 측정할 때 MC903 유발성 피부염의 발병을 예방하였다(도 3a). 대조적으로, AD 유래의 R. 뮤코사 단리물은, KC 활성화(도 7) 및 S. 아우레우스 억제(도 1b)에 대해서는 영향을 미침에도 불구하고 HV 유래의 P. 에어루기노사가 그랬던 것처럼(도 3a) 질병의 발병을 막지는 못하였다. AD 유래의 R. 뮤코사의 적용은 혈청 IgE 유도를 증가시킨 반면, HV 유래의 R. 뮤코사는 유의적인 영향을 나타내지 않았다(도 3b). 건강한 마우스 귀의 접촉과 일치하여, 필라그린의 전사체 수준은 AD 유래의 R. 뮤코사에 노출된 MC903 처리된 마우스에서 유의하게 더 낮았다(도 9).

[0155] CGN의 치료 잠재성을 테스트하기 위해, MC903으로 AD 유사 피부염을 유도한 다음, 3일 동안 매일 CGN을 접종하였다. HV-R. 뮤코사를 이용한 치료는 귀 두께의 감소와 눈에 띄는 발적과 관련이 있었다(도 3c~3d). 생 바이오표본이 필요한지 또는 표면 및 분비 인자만으로도 유사한 결과를 얻을 수 있는지 평가하기 위해, 그 상층액 중에 현탁된 치사적으로 방사선 조사된 HV-CGN을 동등한 CFU 농도로 적용하였다. 이 '데드 믹스(dead mix)'도, 상층액만도 어떠한 이익을 제공하지 못하였고, 각각 귀 두께를 증가시켰다(도 3c~3d).

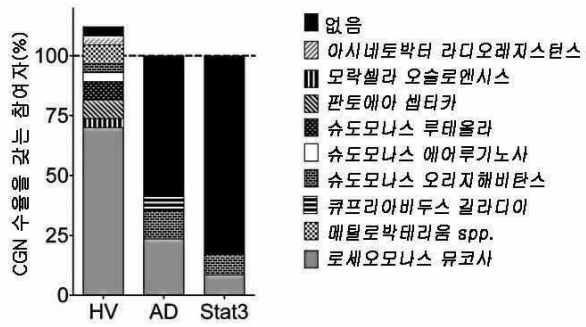
[0156] 전 유전체 연관성 분석(Barnes *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* **125**, 16-29 e11-11; quiz 30-11 (2010); 온라인 발행 (Epub) Jan (10.1016/j.jaci.2009.11.008)) 및 S. 아우레우스 특성 규명은 AD의 병인을 밝혀내었지만, 많은 인과성 토대가 수수께끼로 남아 있다. 숙주 반응과 S. 아우레우스 콜로니화를 타겟으로 하는 현재의 치료적 접근법은 AD 증상을 현저하게 개선할 수 있지만, 성공적일지라도, 이러한 처치는 치유성이 아니며, 환자와 그 가족에게 상당한 감정적 고통을 유발할 수 있다(24). 본 명세서에 개시된 연구는, AD에서 보고된 미생물 불균형이 단순히 연관된 발견이 아니라, 병리학에 기여할 수 있음을 입증한다. 건강한 대조군으로부터 단리된 R. 뮤코사의 균주는 AD의 많은 특징에 영향을 미쳐서, 장벽 기능을 개선하고, 선천적 면역 활성화를 향상시키고, S. 아우레우스 성장을 제한할 수 있었다. 다른 그램 음성 박테리아도 비슷한 효과를 제공할 수 있다.

[0157] 그램 음성 V. 필리포르미스(*V. filiformis*)를 피부 크립에 첨가하면, AD 치료에 이익을 제공할 수 있다 (Gueniche *et al.*, *The British journal of dermatology* **159**, 1357-1363 (2008); 온라인 발행 (Epub) Dec (10.1111/j.1365-2133.2008.08836.x). 그러나, 사멸된 R. 뮤코사의 효능 부족은, 살아있는 공생균이 없는 단리된 분비된 및/또는 표면 생성물의 사용이 이익을 제공할 수 없다는 것을 시사한다. 이론에 구속되지 않는 않지만, 숙주-공생균의 활발한 상호작용이 R. 뮤코사의 임상적 유용성에 요구될 수 있고, 콜로니화의 잠재성이 제한된 제적용과 더 생리학적인 약물동태학적 특성이라는 장점을 제공한다.

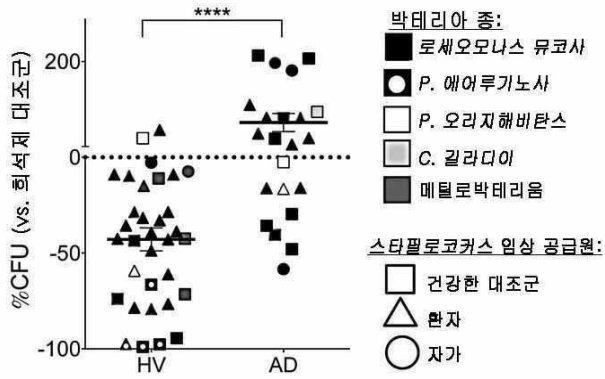
[0158] 본 발명의 원리가 적용될 수 있는 다수의 가능한 실시양태를 고려할 때, 예시된 실시양태들은 본 발명의 예일 뿐이며 본 발명의 범위를 제한하려는 것으로 간주되어서는 안 된다. 오히려, 본 발명의 범위는 하기의 청구범위에 의해 정의된다. 따라서, 본 출원인은 이러한 청구범위의 범위와 정신에서 나오는 모든 것들을 우리의 발명으로 주장한다.

도면

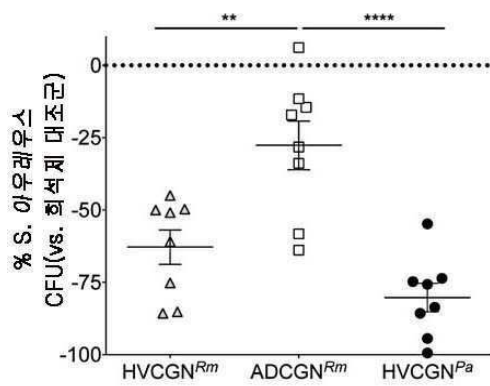
도면1a



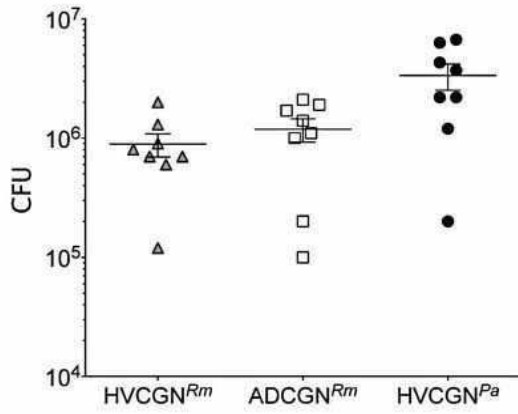
도면1b



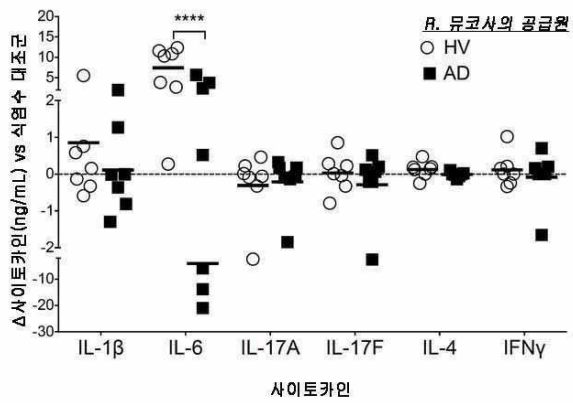
도면1c



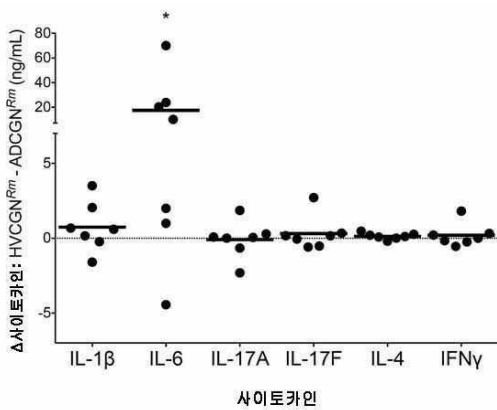
도면1d



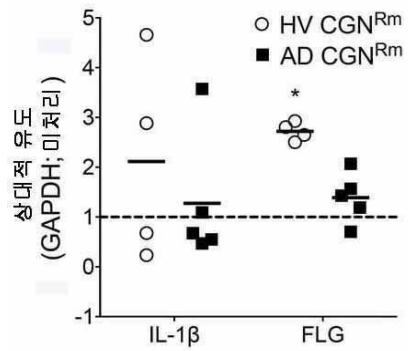
도면2a



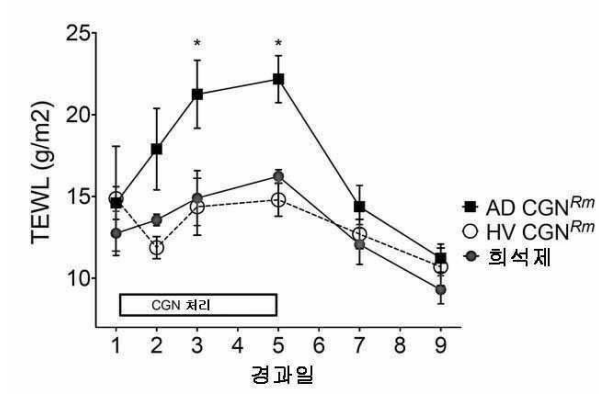
도면2b



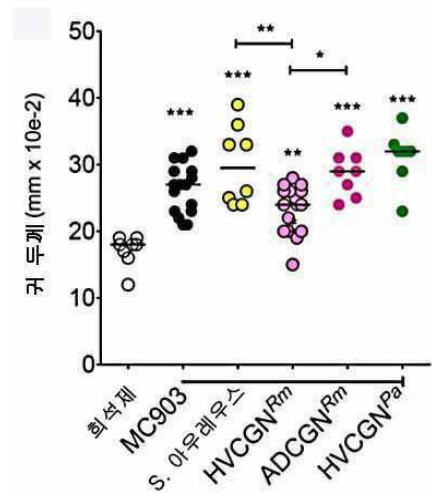
도면2c



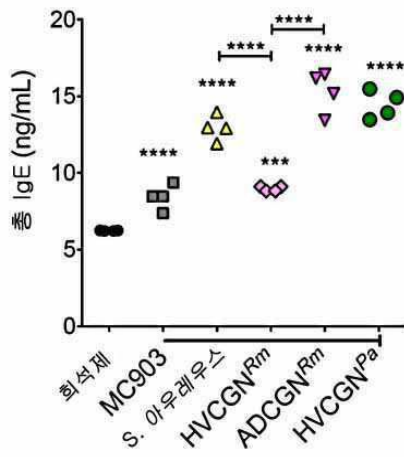
도면2d



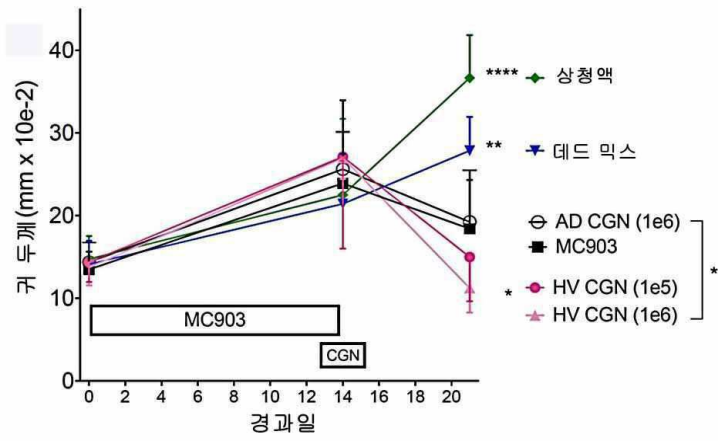
도면3a



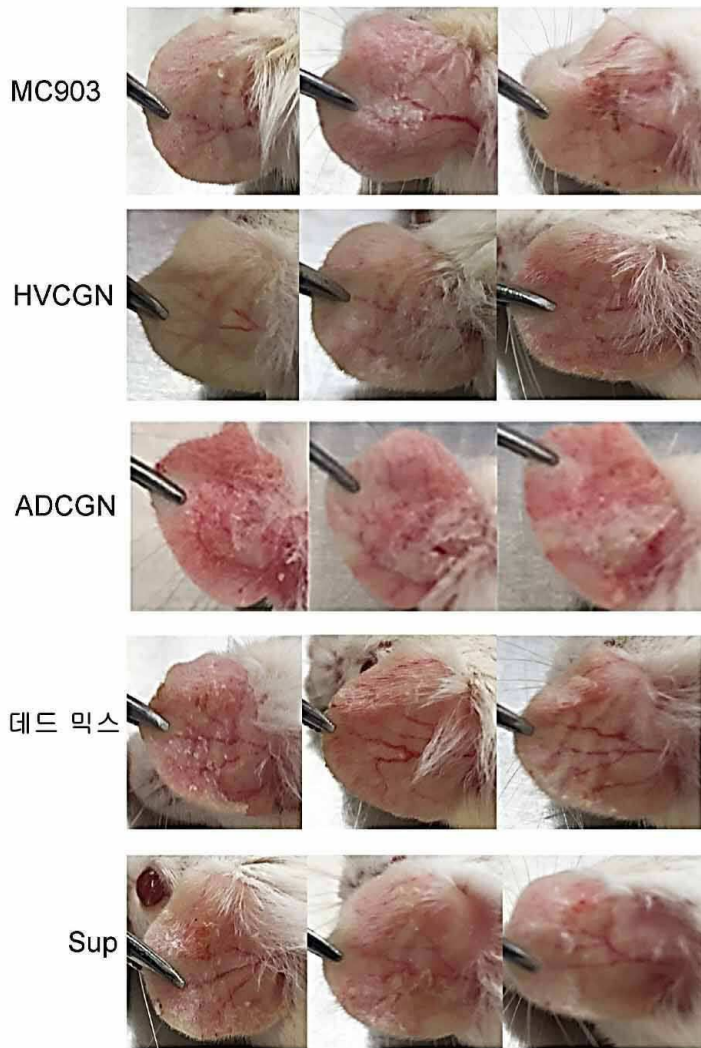
도면3b



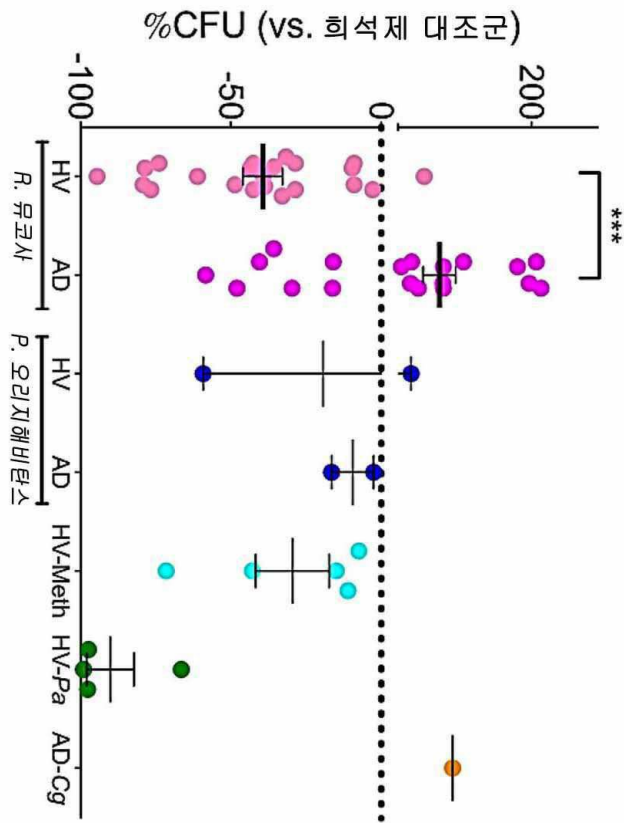
도면3c



도면3d



도면4



도면5a



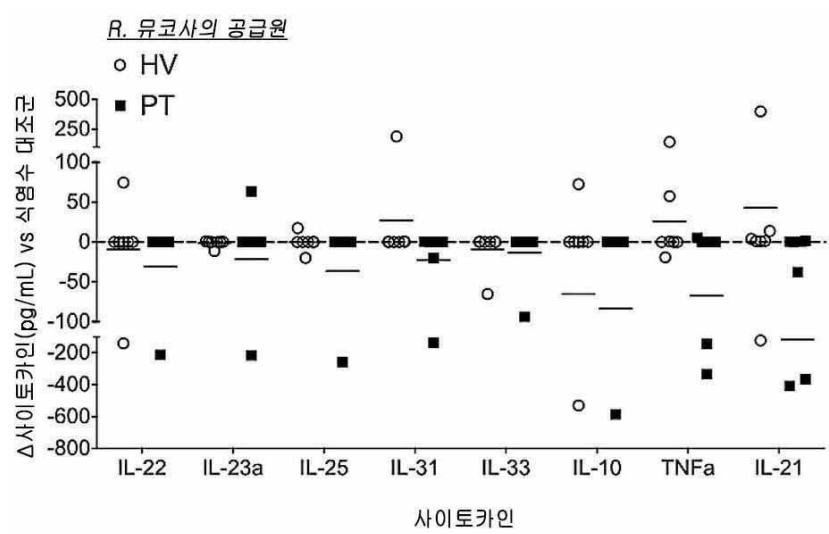
도면5b



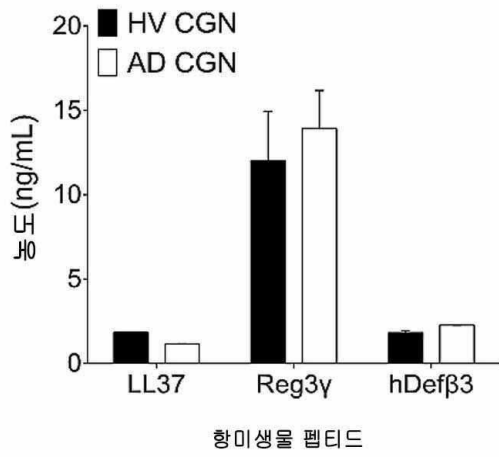
도면5c



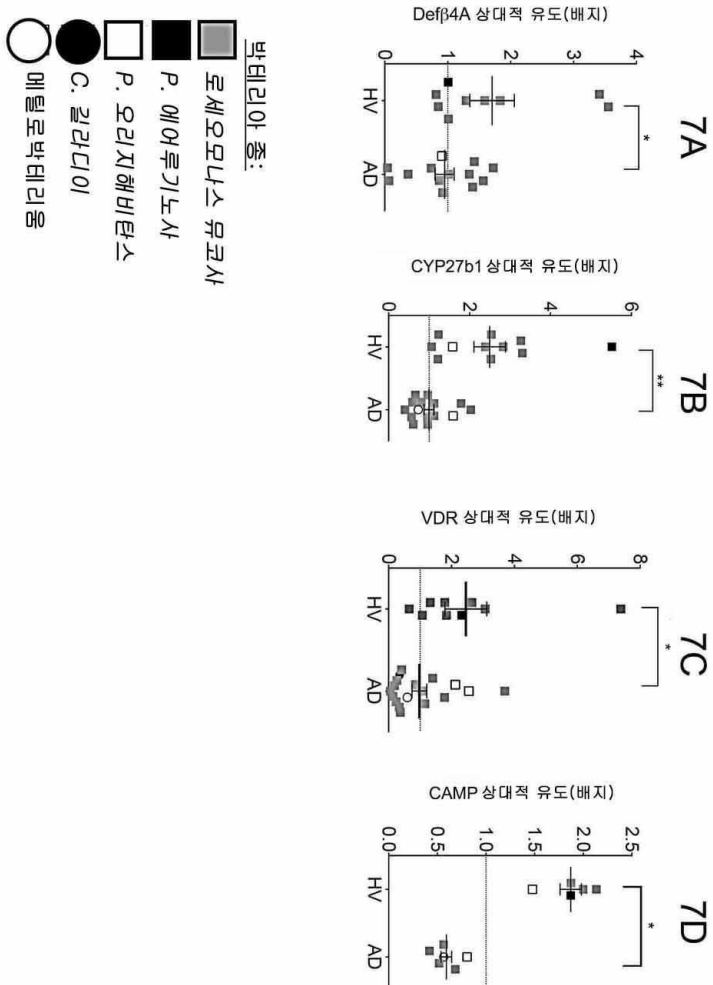
도면6a



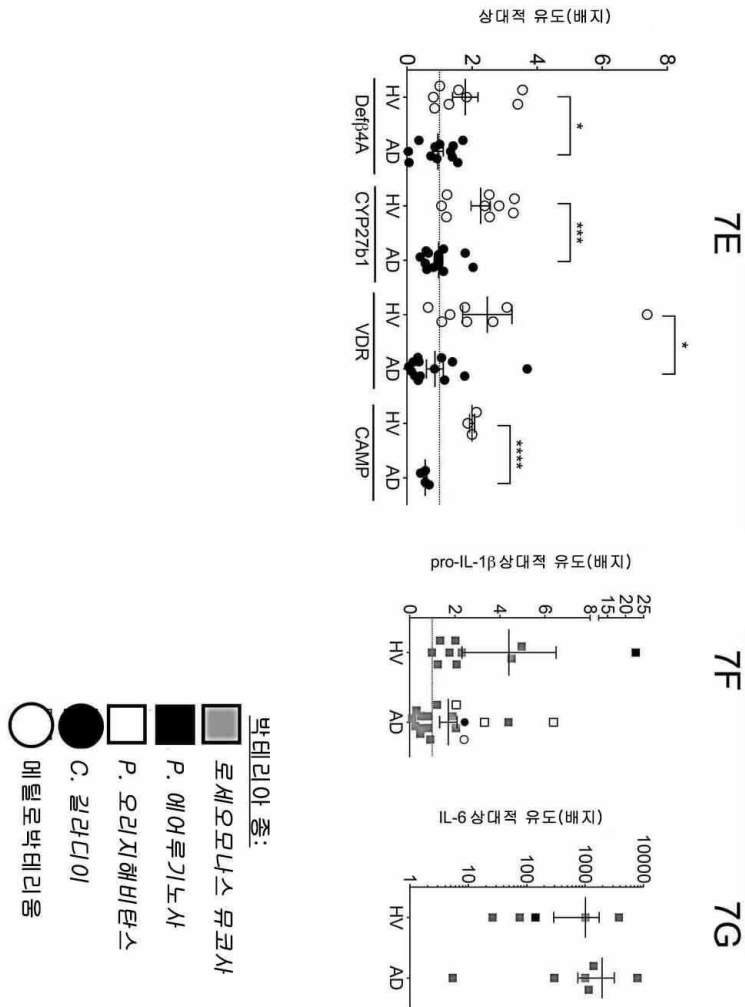
도면6b



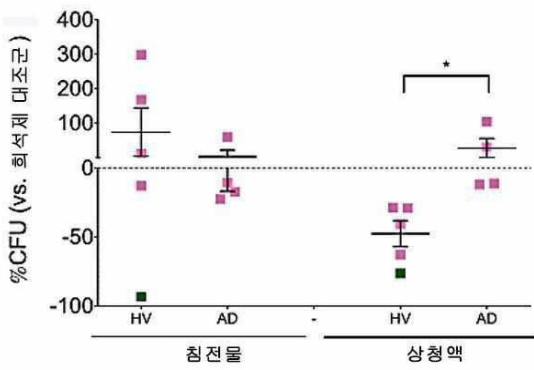
도면7a



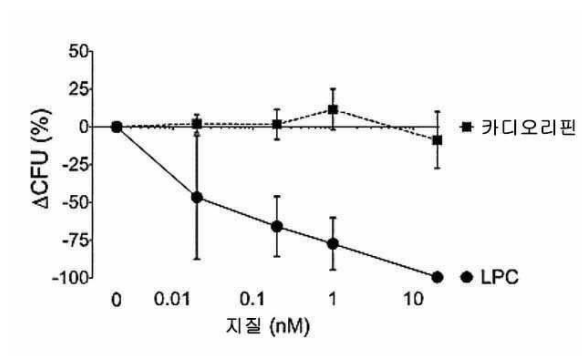
도면7b



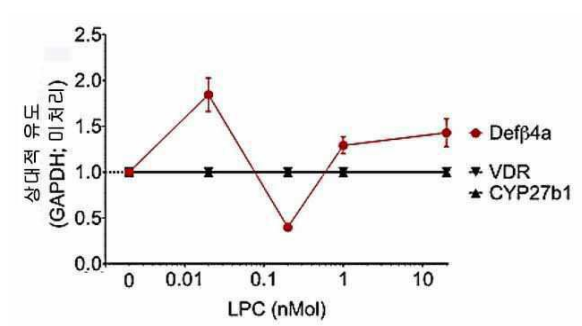
도면8a



도면8b



도면8c



도면9

