



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112236153 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 29

(21) 申请号 201980037390.0

(22) 申请日 2019.04.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112236153 A

(43) 申请公布日 2021.01.15

(30) 优先权数据
62/653021 2018.04.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.04

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/026045 2019.04.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/195714 EN 2019.10.10

(73) 专利权人 阿兹特拉公司
地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 T·M·怀特菲尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 初明明 彭昶

(51) Int.Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2015184134 A1, 2015.12.03
CN 111278447 A, 2020.06.12
US 2013018000 A1, 2013.01.17

审查员 李非儿

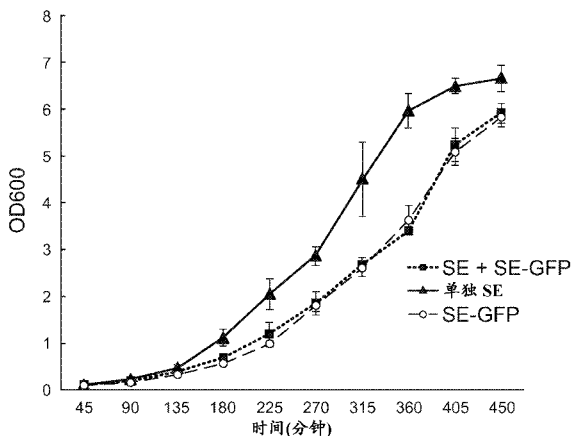
权利要求书1页 说明书27页
序列表14页 附图29页

(54) 发明名称

用重组微生物治疗皮肤疾病的方法和组合物

(57) 摘要

本公开内容提供了用于治疗皮肤疾病的方法和组合物,包括表达治疗上有关的重组融合多肽的经工程改造的微生物。在一个实施方案中,本公开内容提供了用于治疗皮肤疾病(例如特异性皮炎)的方法,包括给有此需要的受试者施用包含活生物治疗产品(LBP)的组合物,所述LBP包含分泌人丝聚合蛋白的表皮葡萄球菌。在进一步的方面,本发明提供了包含本文所述的丝聚合蛋白多肽的药物组合物。还另外,本发明提供了包含本文公开的组合物和使用说明书的试剂盒。



1. 能够分泌丝聚合蛋白融合蛋白的重组微生物,其中所述重组微生物是表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*),其中所述重组微生物包含含有第一编码序列和第二编码序列的表达载体,所述第一编码序列包含能够表达丝聚合蛋白多肽的基因,所述第二编码序列包含能够表达细胞穿透肽的基因,其中所述丝聚合蛋白多肽由SEQ ID NO: 1组成。

2. 根据权利要求1所述的重组微生物,其进一步包含第三编码序列,所述第三编码序列包含能够表达输出信号的基因。

3. 根据权利要求2所述的重组微生物,其中所述第一编码序列、所述第二编码序列和所述第三编码序列的表达是在启动子的控制下。

4. 根据权利要求3所述的重组微生物,其中所述第一编码序列、所述第二编码序列和所述第三编码序列的排列是在框架内。

5. 根据权利要求2所述的重组微生物,其中所述第一编码序列、所述第二编码序列和所述第三编码序列可操作地连接至启动子。

6. 一种生产活生物治疗组合物的方法,所述方法包括:

(a) 用包含以下序列的表达载体转染表皮葡萄球菌细胞:(i) 第一编码序列,其包含能够表达治疗性丝聚合蛋白多肽的基因,其中所述丝聚合蛋白多肽由SEQ ID NO: 1组成,和(ii) 第二编码序列,其包含能够表达细胞穿透肽的基因;和

(b) 使转染的细胞产生包含所述丝聚合蛋白多肽和所述细胞穿透肽的蛋白;和

(c) 得到所述活生物治疗组合物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其进一步包括(iii) 用第三编码序列转染所述细胞,所述第三编码序列包含能够表达输出信号的核酸序列。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述第一编码序列、所述第二编码序列和所述第三编码序列排列在单个质粒中。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述第一编码序列、所述第二编码序列和所述第三编码序列可操作地连接至启动子。

10. 通过根据权利要求6-9中任一项所述的方法得到的组合物。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其包含药学上可接受的载体,其中所述药学上可接受的载体选自水溶液、乳剂、乳膏剂、洗剂、凝胶和软膏剂。

用重组微生物治疗皮肤疾病的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2018年4月5日提交的美国临时专利申请号62/653,021的优先权,其整个内容通过引用结合到本文中,用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 寻常性鱼鳞病(IV)是一种慢性、干燥、鳞状的皮肤疾病,其发病率和流行率估计为1/250^{1,2},这在美国产生130万的患者总群。IV的临床特征通常在大约2月龄出现,并且包括全身干燥和细微、白色至灰色的鳞片,其主要在腹部、胸部和四肢伸肌面上³。一些IV患者还经历少汗和热耐受不良⁴。IV的发病机理长久以来鉴定为表皮透明角质颗粒的大小或数量降低,或者甚至完全缺少⁵⁻⁷。此外,由于遗传因素,IV患者对于特应性皮炎(AD)、哮喘和变态反应的风险增加⁸。

[0005] 寻常性鱼鳞病是由编码丝聚合蛋白的基因的功能丧失性突变引起的常染色体半显性疾病⁹。丝聚合蛋白是衍生自丝聚合蛋白原的基本结构蛋白,所述丝聚合蛋白原在角质层中分解成单体丝聚合蛋白并通过结合角质形成细胞细胞骨架中的角蛋白和其它中间丝蛋白,增强皮肤屏障¹⁰。

[0006] 许多研究已鉴定了IV和特应性皮炎患者中FLG的功能丧失性突变¹¹⁻¹⁴,并且这些突变与角质层中的角蛋白丝紊乱、皮肤屏障缺陷¹⁵和微裂逢有关,导致经皮变应原致敏作用增强¹⁶⁻¹⁹。此外,丝聚合蛋白和其分解产物在皮肤中具有另外的重要功能,包括增加皮肤水分(通过吸湿性氨基酸或“天然保湿因子”)^{20,21},引起产生抗微生物分子(特别是针对金黄色葡萄球菌)²²和维持皮肤中有益的脂质分布^{23,24}和pH²⁴⁻²⁶二者。

[0007] 对于IV的目前治疗选择主要包括局部水蒸发抑制剂(例如,氯化钠、尿素、乳酸、水杨酸)和增湿剂(例如,甘油、丙二醇、右泛醇)⁴。也可处方局部维甲酸类,以试图减慢身体产生皮肤细胞;然而,作为维生素A衍生物,长期使用不是理想的。值得注意的是,许多IV患者经历由于自我意识和社会窘迫导致的生活质量明显降低²⁷⁻²⁹,并且见到对家庭生活、教育/职业生活以及甚至业余/运动活动的负面影响^{28,29}。很明显,IV是未得到满足的巨大需求。

[0008] 各种微生物群落在皮肤上繁殖,并且一个平方厘米可包含高达十亿微生物³⁹。这些各种细菌、真菌、螨类和病毒群落可提供保护免于疾病,并且在皮肤上形成动态但独特的小生境⁴⁰。越来越多的证据与具有皮肤疾病^{39,41},特别是AD^{42,43}的皮肤中的微生物群落改变或生态失调有关。经工程改造的益生菌是一种基于利用皮肤微生物组进行治疗的新颖方案。值得注意的是,经工程改造的益生菌与其它药物递送方法相比具有重要的优点,因为它将在患者的皮肤上建立驻留,并连续地且稳定地原位递送治疗性蛋白。此外,表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, SE)的某些菌株已经表现出对皮肤的重要有益免疫调节作用和抗病原作用,它们与特应性皮炎疾病表型和严重程度有关。此外,由于丝聚合蛋白在皮肤屏障中的作用以及减少经表皮失水和改善皮肤水合作用的能力,丝聚合蛋白(其为从丝聚合蛋白原衍生出的结构蛋白)的递送进一步增强了治疗方案。本发明具有以下惊人的优点:提供了使用遗传工程改造的表皮葡萄球菌重组菌株作为皮肤药物递送系统来治疗皮肤疾病(例如特应性皮炎)的方法和组合物(例如,AZT-01),所述皮肤药物递送系统分泌人

丝聚合蛋白以解决特应性皮炎的病理生理学。一旦应用于皮肤,对皮肤的稳定定居以及随后丝聚合蛋白的原位分泌可以解决该疾病。本发明的益处包括它作为非甾体类治疗选择的安全性,它由于本发明的丝聚合蛋白分泌的益处与表皮葡萄球菌的局部应用的益处的组合而产生的效力,以及它在甚至低应用频率下(不超过每天1次)在治疗上有效的能力。

[0009] 因此,本发明解决了对炎性皮肤病(特别是IV)的有效治疗的长期寻找的需求。本发明还是首次报道的共生皮肤细菌的证明之一,所述共生皮肤细菌可以分泌治疗性蛋白质来治疗皮肤疾病。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开表征了一种对于皮肤疾病,例如寻常性鱼鳞病(IV)的新颖治疗形式,其直接解决了寻常性鱼鳞病的病理生理学和由包含分泌人丝聚合蛋白的表皮葡萄球菌的活生物治疗产品(LBP)组成。本公开的目的是通过基于有益微生物的底盘(chassis)系统以长期稳定递送丝聚合蛋白补充皮肤。尽管本发明利用和优化了细菌的潜在益生菌性质,但疾病纠正是基于直接解决根本的病理生理学的相关蛋白的合理靶向表达。另外,因为对不同微生物物种和菌株的响应在个体之间不同,因此控制治疗性递送的模块设计可能提供与利用天然存在的菌株的当前方法相比显著改进的药代动力学和疾病消退。重要的是,因为某些菌株可分泌抗微生物肽,因此引入表皮葡萄球菌可通过靶向病原体驱动的生态失调,有助于重建皮肤稳态。

[0012] 因此,本发明特别涉及用于治疗皮肤疾病(例如IV)的方法和组合物,其包含能够表达治疗上有关的重组融合多肽(即蛋白、肽或氨基酸)的经工程改造的微生物。

[0013] 在第一方面,本发明表征了能够分泌多肽的重组微生物,其中所述重组微生物包含含有第一编码序列和第二编码序列的表达载体,所述第一编码序列包含能够表达所述多肽的基因,所述第二编码序列包含能够表达细胞穿透肽的基因。在一个有关的实施方案中,所述重组微生物进一步包含含有能够表达输出信号的基因的第三编码序列。在另一个实施方案中,所述第一编码序列、第二编码序列和第三编码序列的表达是在启动子的控制下。在其它实施方案中,所述第一编码序列、第二编码序列和第三编码序列的排列是在框架内。在另一个有关的实施方案中,所述第一编码序列、第二编码序列和第三编码序列可操作地连接至启动子。在一个实施方案中,所述重组微生物是细菌或细菌的组合。在另一个实施方案中,所述多肽是丝聚合蛋白或其变体。在其它实施方案中,所述微生物选自双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)或酒球菌属(*Oenococcus*)或它们的组合。在其它实施方案中,重组微生物是表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,微生物分泌丝聚合蛋白融合蛋白。在进一步的实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白由SEQ ID NO: 1组成。

[0014] 在另一个方面,本发明表征了一种用于生产活生物治疗组合物的方法,所述方法包括:(a)用以下序列转染细胞:(i)第一编码序列,其包含能够表达治疗性多肽的核酸序列,和(ii)第二编码序列,其包含能够表达细胞穿透肽的核酸序列;和(b)使所述转染的细

胞产生治疗性多肽融合蛋白;和(c)得到所述活生物治疗组合物。在一个有关的实施方案中,所述方法还包括:(iii)用第三编码序列转染所述细胞,所述第三编码序列包含能够表达输出信号的核酸序列。在另一个实施方案中,所述第一编码序列、第二编码序列和第三编码序列排列在单个质粒中。在另一个实施方案中,所述第一编码序列、第二编码序列和第三编码序列的排列可操作地连接至启动子。在其它实施方案中,所述细胞选自,其中所述微生物选自双歧杆菌属、短杆菌属、丙酸杆菌属、乳球菌属、链球菌属、葡萄球菌属、乳杆菌属、肠球菌属、片球菌属、明串珠菌属或酒球菌属或它们的组合。在另一个实施方案中,所述细胞是表皮葡萄球菌。在其它实施方案中,所述治疗性多肽融合蛋白是丝聚合蛋白融合蛋白或其变体。在进一步的实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白由SEQ ID NO: 1组成。

[0015] 在另一个方面,本公开表征了包含丝聚合蛋白多肽或其变体的组合物。在一个实施方案中,丝聚合蛋白多肽是融合蛋白。在进一步的实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白由SEQ ID NO: 1组成。

[0016] 在另一个方面,本发明表征了通过本文公开或描述的方法中的任一种得到的组合物。在一个有关的实施方案中,所述组合物包含药学上可接受的载体,其中所述药学上可接受的载体选自水溶液、乳剂、乳膏剂、洗剂、凝胶或软膏剂。

[0017] 在另一个方面,本发明表征了包含重组微生物的活生物治疗组合物,其中所述重组微生物包含(i)第一编码序列,其包含能够表达治疗性多肽的核酸序列;(ii)第二编码序列,其包含能够表达细胞穿透肽的核酸序列;(iii)第三编码序列,其包含能够表达输出信号的核酸序列;和(iiv)启动子,其可操作地连接至所述第一编码序列、所述第二编码序列和所述第三编码序列;其中所述第一编码序列、第二编码序列和第一编码序列能够表达丝聚合蛋白融合蛋白或其变体。在进一步的实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个有关的实施方案中,所述重组微生物是表皮葡萄球菌。在另一个实施方案中,所述输出信号将所述丝聚合蛋白融合产物或其变体输出所述重组微生物。在另一个实施方案中,所述细胞穿透肽促进所述丝聚合蛋白融合产物或其变体进入人角质形成细胞。在另一个实施方案中,所述组合物包含药学上可接受的载体,其中所述药学上可接受的载体选自水溶液、乳剂、乳膏剂、洗剂、凝胶或软膏剂。

[0018] 在另一个方面,本发明表征了一种试剂盒,其包含本文公开或描述的组合物中的任一种和使用说明书。

[0019] 在另一个方面,本发明表征了一种治疗皮肤疾病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用本文公开或描述的组合物中的任一种的组合物。在一个实施方案中,所述皮肤疾病是IV。在另一个实施方案中,所述皮肤疾病是特应性皮炎。

[0020] 附图简述

[0021] 图1是显示在液体培养中生长菌株的表征的图。单独SE (黑色实线,三角形标记)比单独SE-GFP或SE和SE-GFP一起更快生长。

[0022] 图2A-C显示在RHE中菌株的生长的表征。(A) 具有空载体的SE (即,无蛋白产生)。

(B) 在RHE上单独SE-GFP显示在24小时时较慢生长。(C) 当在RHE上按50:50一起混合使,SE空载体胜出SE-GFP。

[0023] 图3A-C显示荧光和反射覆盖图。(A) 在表面上的荧光SE,并描画了角质层中的各个细胞(虚线显示角质化细胞的轮廓作为实例)。(B-C) 在Dermaroller应用,接着局部GFP应用后,在37°C下RHE 3.5小时的荧光和光波长覆盖图,显示细菌已定位到损伤的角质层的裂口中,没有以该水平在表皮中细菌的证据。深度以50 μm (B)和70 μm (C)获得。

[0024] 图4A-C显示纯化GFP的结果。蛋白从225 mL SE培养物(2.7-2.9 OD/mL)纯化并用CellB-Lyse (Sigma)裂解。产生4mL洗脱物并在Ni-NTA柱上在PBS pH 7.4缓冲液中运行和得到0.4 mg。(A) 用从SE纯化的蛋白在SDS-PAGE凝胶上的InVision His-标签染色。泳道(1)裂解物沉淀;(2)澄清的上清液;(3)流通物;(4)洗脱物;(5)浓缩物;(6)标记;(7)澄清的上清液;(8)流通物;(9)洗脱物;和(10)浓缩物。(C) 从SE纯化的GFP。

[0025] 图5A-0显示在RHE中使用5 μg GFP作为报告物,有和没有RMR信号的蛋白的表征。(A-D) 在30分钟(A,C, E, G)或60分钟(B,D,F,H)时,有(C,D)或没有(A,B) RMR信号,局部应用的GFP的双光子图像。图像编译为Z-堆叠,其投射到2D平面上。(E-H) 3D表面分析以检查蛋白渗透到RHE中的深度。(I-N) 使用光(L-N)或荧光(I-K)波长,GFP (K, N)、GFP + RMR (J,M)或媒介物(I,L)的共焦图像。(O) 以50 μg GFP-RMR用Dermaroller微针刺穿的RHE。应用后30分钟获得图像。

[0026] 图6A-E显示人丝聚合蛋白的初步生物信息学分析。(A) 人丝聚合蛋白结构域的同源性。(B) 人丝聚合蛋白结构域的序列比对。(C) 人丝聚合蛋白结构域的疏水性绘图,具有丝聚合蛋白序列的相应图示。(D) 对于人丝聚合蛋白猿猴9-10的实例SAR训练,使用疏水性绘图以除去在hFLG 9-10的N末端的QSGEnSGRnSFLYQVSnHEQSES重复,和(E) 该蛋白的所得序列,其中加入了RMR细胞穿透肽。(F) 丝聚合蛋白结构的概述。(上图) 丝聚合蛋白原和丝聚合蛋白基因结构。大部分丝聚合蛋白由外显子3编码。(下图) 丝聚合蛋白原蛋白结构。

[0027] 图7A-E显示测定开发。(A-C) 使用各种抗体,在来自产生丝聚合蛋白的SE培养物的培养基分离物中的hFLG的蛋白质印迹。(A) Sigma多克隆抗-hFLG抗体。(B) SantaCruz多克隆抗-hFLG抗体。(C) 多克隆抗-hFLG抗体。(D) 对于基于MS的丝聚合蛋白检测的方法开发,提议的工作流程。(E) 来自对于hFLG9-10的质谱的所表达的人丝聚合蛋白的身份。颜色指示序列置信度:深蓝色(非常高的置信度)、浅蓝色(观察到)和红色(未观察到)。

[0028] 图8显示对于丝聚合蛋白活性的Biacore表面等离子体共振(SPR)的概述。

[0029] 图9A-G显示对于丝聚合蛋白分解产物或天然保湿因子(NMF)产生标准曲线的试验性结果。拉曼光谱可检测各个NMF组分(A-D)。质谱(E-G)也是非常灵敏的,在图中定量极限(LOQ)为纳克范围。

[0030] 图10显示工作流程的概述。

[0031] 图11显示16S测序的实验提纲。

[0032] 发明详述

[0033] 除非另外定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。下述参考文献给技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (1994年第2版); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker编,

1988); The Glossary of Genetics, 第5版, R. Rieger等人(编), Springer Verlag (1991);和Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。除非另有说明,否则本文中使用的下述术语具有在下面赋予它们的含义:

[0034] 冠词“a”和“an”在本文中用于表示一个或超过一个(即至少一个)该冠词的语法对象。作为例子,“一个元件”是指一个元件或超过一个元件。

[0035] 术语“包括”在本文中用于表示短语“包括、但不限于”,且与其可互换使用。

[0036] 术语“或”在本文中用于表示术语“和/或”,且与其可互换使用,除非上下文另外清楚地指出。

[0037] 术语“诸如”在本文中用于表示短语“诸如但不限于”,且与其可互换使用。

[0038] 如本文使用的,术语“约”当提及具体描述的数值来使用时,表示该值可从所描述的值变化不超过1%。例如,如本文使用的,表述“约100”包括99和101以及之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0039] 本文中使用的术语“载体”、“载体系统”或“媒介物”表示适合用于递送、含有或“携带”药物活性成分或其它物质的相容物质,所述药物活性成分或其它物质用于在局部应用组合中施用给患者或受试者。在本文中有用的载体应是药学上可接受的。在本文中有用的载体和媒介物包括本领域已知的任何这样的物质,它们是无毒的并且不会以有害方式与包含它的制剂的其它组分相互作用。术语“水性的”表示含有水或在施用于皮肤或粘膜组织后变得含水的制剂。“载体”的其它例子包括水、低级醇、高级醇、多元醇、单糖、二糖、多糖、烃油、脂肪和油、蜡、脂肪酸、硅油、非离子型表面活性剂、离子型表面活性剂、有机硅表面活性剂以及这样的载体的基于水的混合物和基于乳剂的混合物。

[0040] 本文中使用的术语“经工程改造的细菌菌株”或“重组细菌菌株”表示通过将在生物体外部制备的DNA引入细菌菌株中而已经被“遗传修饰”或“工程改造”的细菌菌株。例如,含有新基因或其它核酸序列的质粒向细菌中的引入将允许所述细菌表达那些基因或其它核酸序列。可替换地,可以将含有新基因或其它核酸序列的质粒引入细菌中,然后整合到所述细菌的基因组中,其中所述细菌将表达那些基因或其它核酸序列。

[0041] 如本文使用的,术语“宿主细胞”意指已被外源多核苷酸序列转化或转染,或能够被外源多核苷酸序列转化或转染的细胞。

[0042] 为了本公开的目的,术语“分离的”表示已经从其原始环境(其天然存在的环境)中移出的生物学材料(细胞、核酸或蛋白)。例如,在植物或动物中以天然状态存在的多核苷酸不是分离的,但是与它天然存在的相邻核酸分离的相同多核苷酸被认为是“分离的”。

[0043] “分离的核酸分子”(例如,分离的启动子)是与存在于核酸的天然来源中的其它核酸分子分离的核酸分子。例如,关于基因组DNA,术语“分离的”包括从基因组DNA所天然结合的染色体分离的核酸分子。优选地,“分离的”核酸分子不含有天然地侧接该核酸分子所源自的生物的基因组DNA中的核酸分子的序列。

[0044] 如本文使用的,术语“遗传元件”意指包含编码多肽的区域或调节复制、转录或翻译或对于在宿主细胞中表达多肽是重要的其它过程的多核苷酸区域的多核苷酸,或包含编码多肽的区域和与其可操作连接的调节表达的区域二者的多核苷酸。遗传元件可包含在作为附加体元件(即是说,作为物理上不依赖于宿主细胞基因组的分子)复制的载体中。它们可包含在质粒中。遗传元件也可包含在宿主细胞基因组中;不是以其天然状态,而是以纯化

的DNA形式或在载体中等等,在操作例如分离、克隆和引入宿主细胞中之后。

[0045] 本文中使用的术语“活生物治疗产品”(或LBP)表示含有细菌、酵母和/或其它微生物的候选产品。

[0046] 本文中使用的术语“患者”或“受试者”表示人或动物(在动物的情况下,更典型地是哺乳动物,诸如驯化的哺乳动物,或动物,诸如家禽动物和鱼类以及其它海产食品或淡水食品生物),其将接受本发明的治疗和组合物。

[0047] 如本文使用的,表述“有此需要的受试者”是指显示特应性皮炎的一种或多种症状或征候,和/或已诊断患有IV的人或非人动物。

[0048] 本文中使用的短语“药学上可接受的”表示这样的活性化合物、材料、一种或多种经工程改造的细菌菌株、组合物、载体和/或剂型:在合理的医学判断范围内,其适用于接触人类和动物的组织,而没有过度的毒性、刺激、变应性反应或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[0049] 如本文使用的,术语“多核苷酸”一般是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可以是未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。因此,例如,本文使用的多核苷酸尤其是指单链和双链DNA、作为单链和双链区域或单链、双链和三链区域的混合物的DNA、单链和双链RNA、和作为单链和双链区域的混合物的RNA、包含DNA和RNA的杂合分子(可以是单链或更通常是双链或三链、或单链和双链区域的混合物)。此外,本文使用的多核苷酸是指包含RNA或DNA或RNA和DNA二者的三链区域。这样的区域中的链可来自相同的分子或来自不同的分子。该区域可包括一个或多个分子的全部,但更通常仅包括一些分子的区域。三重螺旋区域的分子之一通常是寡核苷酸。如本文使用的,术语多核苷酸包括上文所述的DNA或RNA,其包含一个或多个修饰的碱基。因此,具有对于稳定性或对于其它理由而修饰的骨架的DNA或RNA是如该术语在本文所意指的“多核苷酸”。此外,仅指出两个实例,包含不常见的碱基(例如肌苷)或修饰的碱基(例如三苯甲基化碱基)的DNA或RNA是多核苷酸,如该术语在本文中使用的。应理解,已对DNA和RNA进行各种各样的修饰,其用于本领域技术人员已知的许多有用的目的。如本文使用的术语多核苷酸包括多核苷酸的这样的化学、酶学或代谢修饰形式,以及特别是病毒和细胞(包括简单和复杂细胞)特有的DNA和RNA的化学形式。术语多核苷酸还包括短的多核苷酸,其通常称为寡核苷酸。“多核苷酸”和“核酸”在本文中通常可互换使用。

[0050] 本文中使用的术语“多肽”或“蛋白”表示由在链中键合在一起的氨基酸残基组成的生物分子或大分子。本文所用多肽的定义意图涵盖由一个或多个氨基酸残基长链组成的蛋白(通常较高分子量)和几个氨基酸的小肽(通常较低分子量)。在其它实施方案中,单个氨基酸,尽管在技术上不是多肽,但也被认为在本发明的范围内。

[0051] 如本文使用的,术语“预防”是指完全或几乎完全阻止异常皮肤病症(例如IV)免于发生,例如当患者或受试者易患异常皮肤病症或处于感染异常皮肤病症的风险中时。预防也可包括抑制,即防止异常皮肤病症的发展。

[0052] 如本文使用的,“启动子”是指指导结构基因的转录的DNA序列。通常,启动子位于基因的5'区域,邻近结构基因的转录起始位点。如果启动子是诱导型启动子,则转录速率在响应诱导剂时增加。例如,启动子可以组织特异性方式调节,使得它仅在特定组织类型中在转录相关的编码区时有活性。

[0053] 如本文使用的,术语“降低……的风险”是指降低异常皮肤病症(例如IV)发生的可能性或概率,例如当患者或受试者易患异常皮肤病症或处于感染异常皮肤病症的风险中时。

[0054] 如本文使用的,术语“治疗有效量”是指药物活性化合物或化合物的组合的量,或通过一种或多种经工程改造的细菌菌株(例如一种或多种皮肤治疗剂)递送的药物活性化合物的量,当单独或组合施用,以治疗、预防疾病状态或病况、例如异常皮肤病症(例如IV)或降低其风险。该术语还指含有活性化合物或化合物的组合或一种或多种递送药物活性化合物的经工程改造的细菌菌株的药物组合物的量。例如,有效量是指给予接受的患者或受试者的制剂中存在的化合物的量,或通过给予接受的患者或受试者的制剂中存在的一种或多种经工程改造的细菌菌株递送的化合物的量,其足以引发生物学活性,例如用于治疗或预防异常皮肤病症的活性。

[0055] 如本文使用的,术语“治疗”是指提供治疗性干预以治愈或改善异常皮肤病症(例如IV)。

[0056] 组合物

[0057] 本发明提供了用于治疗或预防皮肤疾病的皮肤定居微生物(例如,细菌),其在遗传上被改变以表达重组治疗性多肽(图2)。与用于治疗皮肤疾病的现有技术方法相比,使用遗传工程改造的蛋白产生微生物(例如,细菌)具有多个优点。治疗性蛋白能够治疗导致皮肤病症的缺陷的根本原因。此外,微生物(例如,细菌)能够自我复制,同时保留插入的核酸(例如,基因)以连续产生治疗性蛋白。

[0058] 本发明提供了在遗传上被改变以表达治疗性蛋白(例如,人丝聚合蛋白)的皮肤定居微生物(例如,细菌,例如,表皮葡萄球菌)。与使用丝聚合蛋白补充相比,使用遗传工程改造的丝聚合蛋白产生微生物(例如,细菌)具有多个优点。首先,微生物(例如,细菌)能够自我复制,同时保留插入的丝聚合蛋白核酸序列(例如,基因)。其次,表皮葡萄球菌通常存在于皮肤上,并已经被证实会抑制金黄色葡萄球菌(在特应性皮炎爆发中在皮肤菌群中占主导地位的同属的细菌种)的生长。

[0059] 细菌菌株

[0060] 本发明提供了能够表达重组治疗性蛋白的在遗传上被改变的微生物,例如,细菌。宽范围的微生物适合用于用在本发明中。例子包括、但不限于非病原性的和共生的细菌。适合用于用在本发明中的细菌包括、但不限于双歧杆菌属、短杆菌属、丙酸杆菌属、乳球菌属、链球菌属、葡萄球菌属(例如,表皮葡萄球菌)、乳杆菌属(例如,嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*))、片球菌属、明串珠菌属或酒球菌属。在本发明的某些实施方案中,所述细菌是表皮葡萄球菌。在本发明的优选实施方案中,要使用的表皮葡萄球菌菌株不能产生生物膜。不能产生生物膜的表皮葡萄球菌菌株的一个这样的例子是表皮葡萄球菌菌株ATCC 12228。但是,在本发明的再其它的实施方案中,可以使用在皮肤上发现的其它有关的或类似的物种。

[0061] 治疗性蛋白

[0062] 本发明提供了能够表达重组治疗性蛋白的在遗传上被改变的微生物,例如,细菌。在本发明的优选实施方案中,所述治疗性蛋白包含人丝聚合蛋白。人丝聚合蛋白由编码丝聚合蛋白的人基因(*FLG*)表达。丝聚合蛋白是由分化角质形成细胞产生的蛋白,并具有将角

蛋白丝聚集为细胞骨架的功能,所述细胞骨架与其它组分组合地构成角质化的细胞包膜。*FLG*是位于染色体1q21上的大基因,其产生丝聚合蛋白原,即一种不溶性的多聚蛋白,其被蛋白水解以释放功能性丝聚合蛋白单体(Armengot-Carbo等人, 2014)。本发明的治疗性蛋白(以及即表达该蛋白的基因)可以来自任何哺乳动物。非限制性的例子包括、但不限于小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、马、牛、狗、灵长类动物或人基因序列。在本发明的优选实施方案中,所述治疗性蛋白包含重组融合蛋白,其包含可操作地连接至细胞穿透蛋白(CPP)的丝聚合蛋白。在一个实施方案中,细胞穿透蛋白是RMRRMRRMR。在本发明的其它实施方案中,所述治疗性蛋白包含重组融合蛋白,其包含可操作地连接至输出或分泌信号的丝聚合蛋白,所述输出或分泌信号允许所述重组丝聚合蛋白从微生物(例如,细菌)中输出。在另一个实施方案中,所述治疗性蛋白包含重组融合蛋白,其包含可操作地连接至细胞穿透蛋白(CPP)和输出或分泌信号的丝聚合蛋白。

[0063] 在一个实施方案中,包含可操作地连接至细胞穿透蛋白的丝聚合蛋白的融合蛋白显示于SEQ ID NO. 1。

[0064] SEQ ID NO. 1

[0065]

				1430	1440
				MQ	SGESSGRSR
1450	1460	1470	1480	1490	1500
FLYQVSSHEQ	SESTHGQTAP	STGGRQGSRH	EQARNSSRHS	ASQDGQDTIR	GHPGSSRGGR
1510	1520	1530	1540	1550	1560
QGSYHEQSV	RSGHSGYHHS	HTTPQGRSDA	SHGQSGPRSA	SRQTRNEEQS	GDGSRHSGSR
1570	1580	1590	1600	1610	1620
HHEPSTRAGS	SRHSQVGQGE	SAGSKTSRRQ	GSSVSQDRDS	EGHSEDSERR	SESASRNHYG
1630	1640	1650	1660	1670	1680
SAREQSRHGS	RNPRSHQEDR	ASHGSAESS	RQSGTRHAET	SSGGQAASSQ	EQARSSPGER
1690	1700	1710	1720	1730	1740
HGSRHQQSAD	SSTDSGTGRR	QDSSVVGDSG	NRGSSGSQAS	DSEGHSEESD	TQSVSAHGQA
1750	1760	1770			
GPHQQSHQES	TRGQSGERSG	RSGSFLYQVS	THEQSESRRM	RMRRMRR	

[0066] 在一个实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白由SEQ ID NO: 1组成。

[0067] 在一些方面,治疗性蛋白不由微生物(例如细菌)表达。在一些方面,治疗性蛋白包含丝聚合蛋白多肽或其变体。在一个实施方案中,丝聚合蛋白多肽是融合蛋白。在进一步的实施方案中,丝聚合蛋白多肽包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白由SEQ ID NO: 1组成。

[0068] 分泌信号

[0069] 分泌信号或输出信号是蛋白上的肽序列,其促进蛋白通过分泌途径的输出,这最终导致蛋白从细胞中分泌出来。在本发明中,促进蛋白(诸如包含丝聚合蛋白的蛋白)从微生物(例如,细菌细胞)输出的任何分泌信号被预见到作为分泌信号。

[0070] 细胞穿透肽

[0071] 细胞穿透肽是在体内促进或介导生物分子(例如,蛋白)的递送的肽序列,而无需使用任何受体并且不会引起任何明显的膜损伤。促进进入皮肤角质形成细胞的细胞穿透肽被预见到作为本发明的细胞穿透肽。

[0072] 在一个实施方案中,细胞穿透蛋白是RMRRMRRMRR (SEQ ID NO. 2)。

[0073] 遗传构建体

[0074] 本发明利用标准的分子生物学技术,例如,在(Sambrook等人, 2001)中描述的那些。用于本发明的遗传构建体的一个例子是pAZT,其是基于pJB38(一种等位基因交换大肠杆菌-葡萄球菌穿梭载体),进一步包含在质粒上的其它设计特征以改善功能性(Bose, J.L.等人.*Applied and environmental microbiology*. 2013;79(7):2218-2224)。使用标准的分子生物学技术,通过将编码治疗性蛋白的基因的cDNA插入限制位点来构建质粒(图2)。所述插入物进一步包含由启动子驱动的编码序列。这样的启动子可以是组成型的或诱导型的。诱导型启动子的例子包括被化合物(诸如醇、糖、金属或四环素)或被物理因素(诸如光或高温)活化的那些。

[0075] 人FLG的mRNA序列具有Genebank登记号NM_002016。通过将FLG cDNA的一部分插入pJB38的限制性位点来构建质粒pAZT。所述插入物含有由启动子驱动的核酸编码序列。所述构建体进一步包含编码分泌信号和细胞穿透肽的核酸序列,从而产生重组丝聚合蛋白融合蛋白。

[0076] 重组细菌菌株的应用

[0077] 应该理解,要治疗的皮肤疾病可以是与皮肤有关的任何疾病或障碍。在一个实施方案中,所述障碍选自特异性皮炎、银屑病、痤疮、变应性接触性皮炎、表皮松解性角化过度、脂溢性皮炎、湿疹、干燥皮肤、变态反应、疹、紫外线刺激的皮肤、洗涤剂刺激的皮肤(包括由在洗涤剂中使用的酶和分子以及月桂基硫酸钠引起的刺激)、皮肤变薄(例如老年人和儿童的皮肤)、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、脓疱病、白癫风、脱发和多毛症。在一个具体的实施方案中,所述皮肤疾病是寻常性鱼鳞病(IV)。

[0078] 根据本发明可以施用的蛋白的例子优选地是真核蛋白。这些蛋白包括、但不限于单个氨基酸、小肽和大蛋白。更具体地,编码在本发明中可用作重组治疗性蛋白的蛋白的基因包括、但不限于以下:白介素基因家族的成员,包括、但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14和IL-15及编码其受体拮抗剂的基因。在本发明中也涵盖编码造血生长因子的基因,所述造血生长因子包括、但不限于促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子、干细胞因子、白血病抑制因子和血小板生成素。也涵盖编码神经营养因子的基因,所述神经营养因子包括、但不限于神经生长因子、脑衍生的神经营养因子和睫状神经营养因子。另外,包括编码干扰素的基因,所述干扰素包括、但不限于IFN- α 、IFN- β 和IFN- γ 。在本发明中进一步涵盖编码趋化因子(诸如细胞因子的C-C家族和C-X-C家族)的基因,编码激素(诸如胰岛素原和生长激素)的基因,以及编码溶血栓酶(包括组织型纤溶酶原激活物、链激酶、尿激酶或其它酶诸如胰蛋白酶抑制剂)的基因。本发明还包括编码组织修复因子、生长和调节因子的基因,所述生长和调节因子包括、但不限于制瘤素M、血小板-衍生的生长因子、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、肝细胞生长因子、骨形态形成蛋白、胰岛素-样生长因子、降钙素和转化生长因子 α 和 β 。进一步涵盖的基因包括编码结构蛋白的基因,所述结构蛋白包括丝聚合蛋白、肌动蛋白、胶原蛋白、微纤维蛋白、弹性蛋白或硬蛋白。

[0079] 在具体的实施方案中,所述基因是编码丝聚合蛋白的基因。

[0080] 抗体

[0081] 本公开还提供了针对hFLG的表位的抗体,所述表位在所有子结构域对中是共同的。在某些实施方案中,抗体是鸡IgY。

[0082] 制剂

[0083] 根据本发明使用的制剂可以包含任何药学有效量的遗传工程改造的微生物,例如,细菌,以产生治疗有效量的期望多肽,例如,按重量计至少约0.01%、约0.05%、约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.5%、约2.0%、约3.0%、约4.0%、约5.0%、约6.0%、约7.0%、约8.0%、约9.0%、约10.0%、约11.0%、约12.0%、约13.0%、约14.0%、约15.0%、约16.0%、约17.0%、约18.0%、约19.0%、约20.0%、约25.0%、约30.0%、约35.0%、约40.0%、约45.0%、约50.0%或更多的遗传工程改造的微生物,例如,细菌,其上限是按重量计约90.0%的遗传工程改造的微生物,例如,细菌。

[0084] 在一个替代实施方案中,根据本发明使用的制剂可以包含,例如,按重量计至少约0.01%至约30%、约0.01%至约20%、约0.01%至约5%、约0.1%至约30%、约0.1%至约20%、约0.1%至约15%、约0.1%至约10%、约0.1%至约5%、约0.2%至约5%、约0.3%至约5%、约0.4%至约5%、约0.5%至约5%、约1%至约5%或更多的遗传工程改造的微生物,例如,细菌。

[0085] 在一些方面,根据本发明使用的制剂可包含任何药学有效量的丝聚合蛋白多肽或其变体。在一个实施方案中,丝聚合蛋白多肽是融合蛋白。在进一步的实施方案中,丝聚合蛋白多肽包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0086] 在一些实施方案中,所述制剂是局部制剂。用于用在本发明中的局部制剂可以呈适合施用到身体表面的任何形式,诸如乳膏剂、洗剂、喷雾剂、溶液、凝胶、软膏剂、糊剂、硬膏剂、涂剂、生物粘附剂、混悬剂、乳剂等,和/或可以制备成含有脂质体、胶束和/或微球。这样的制剂可以与闭合的覆盖层组合使用以便在施用到身体表面时和其后将从身体表面蒸发的水分维持在制剂内。所述制剂可以包含活生物治疗组合物,并且可以包含至少一种遗传工程改造的微生物,例如,经工程改造的细菌菌株,其产生重组多肽。该经工程改造的活生物治疗组合物可以将所述多肽直接递送到皮肤用于治疗或预防异常皮肤病症和/或皮肤疾病(例如,炎性皮肤病)。

[0087] 局部制剂包括这样的制剂:其中将任何其它活性成分溶解或分散在本领域已知的皮肤病学媒介物中,例如水性或非水性凝胶、软膏剂、油包水或水包油乳剂。这样的媒介物的组分可以包含水、水性缓冲溶液、非水性溶剂(诸如乙醇、异丙醇、苯甲醇、2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇、丙二醇、丙二醇单月桂酸酯、糖原质或甘油)、油(例如矿物油诸如液状石蜡,天然的或合成的甘油三酯诸如Miglyol™,或硅油诸如聚二甲基硅氧烷)。取决于制剂的性质及其预期用途和施用位点,使用的皮肤病学媒介物可以含有选自以下的一种或多种组分(例如,当制剂为水性凝胶时,除了水之外的组分):增溶剂或溶剂(例如 β -环糊精,诸如羟丙基 β -环糊精,或醇或多元醇诸如乙醇、丙二醇或甘油);增稠剂(例如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲纤维素或卡波姆);胶凝剂(例如聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物);防腐剂(例如苯甲醇、苯扎氯铵、氯己定、氯丁醇、苯甲酸酯、山梨酸钾或EDTA或其盐);和pH缓冲剂(诸如磷酸二氢盐和磷酸氢盐的混合物,或柠檬酸和磷酸氢盐的混合物)。

[0088] 药学上可接受的载体也可以掺入本发明的制剂中,并且可以是本领域常规使用的任何载体。其例子包括水、低级醇、高级醇、多元醇、单糖、二糖、多糖、烃油、脂肪和油、蜡、脂

肪酸、硅油、非离子型表面活性剂、离子型表面活性剂、有机硅表面活性剂以及这样的载体的基于水的混合物和基于乳剂的混合物。术语“药学上可接受的”或“药学上可接受的载体”在本文中用于表示这样的化合物或组合物：其可以掺入药物制剂中，而不引起不希望的生物学效应或不希望的与制剂的其它组分的相互作用。本文中使用的“载体”或“媒介物”表示适合用于掺入局部应用组合物中的载体材料。在本文中有用的载体和媒介物包括本领域已知的任何这样的材料，其为无毒的并且不以有害方式与包含它的制剂的其它组分相互作用。术语“水性的”表示含有水或在施用到皮肤或粘膜组织之后变得含有水的制剂。

[0089] 乳膏剂基质是可水洗的，并且含有油相、乳化剂和水相。油相也被称为“内部”相，通常由矿脂和脂肪醇（诸如鲸蜡基或硬脂醇）构成。尽管非必然地，所述水相经常在体积上超过油相，并且通常含有保湿剂。乳膏制剂中的乳化剂通常是非离子的、阴离子的、阳离子的或两性的表面活性剂。

[0090] 洗剂是要无摩擦地施用到皮肤表面的制品，并且通常是液体或半液体制剂，其中颗粒（包括活性剂）存在于水或醇基质中。洗剂经常是固体的悬浮液，优选地包含水包油型的液体油性乳剂。洗剂是本文中用于治疗大身体区域的优选制剂，因为更流体的组合物容易施用。通常必须将洗剂中的不溶物质精细粉碎。洗剂通常含有助悬剂（以产生更好的分散体）以及可用于将活性剂定位并维持活性剂与皮肤接触的化合物，例如，甲基纤维素、羧甲基-纤维素钠等。溶液是如下制备的均质混合物：将一种或多种化学物质（溶质）溶解在液体中，使得溶解的物质的分子分散在溶剂的分子中。溶液可以含有其它药学上或化妆上可接受的化学物质以缓冲、稳定或保存溶质。用于制备溶液的溶剂的常见实例是乙醇、水、丙二醇或任意其它可接受的媒介物。当然众所周知，凝胶是半固体混悬型系统。单相凝胶含有大体上均匀地分布在载体液体（其通常为水性的，但优选地也含有醇和任选的油）中的有机大分子。优选的有机大分子，即胶凝剂，是交联的丙烯酸聚合物诸如“卡波姆”家族的聚合物，例如，可以在Carbopol商标下商业获得的羧基聚烯烃。也优选的是亲水聚合物诸如聚氧化乙烯、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物和聚乙烯醇；纤维质聚合物诸如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和甲基纤维素；树胶诸如黄蓍胶和黄原胶；海藻酸钠；和明胶。为了制备均匀的凝胶，可以加入分散剂诸如醇或甘油，或可以通过研磨、机械混合或搅拌或其组合来分散胶凝剂。也如本领域众所周知的，软膏剂是通常基于矿脂或其它石油衍生物的半固体制剂。本领域技术人员会明白，要使用的具体软膏基质是将提供许多合乎需要的特征（例如，润肤性等）的软膏基质。正如其它载体或媒介物，软膏基质应当是惰性的、稳定的、无刺激性的和不敏感的。如在Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版 (Easton, PA: Mack Publishing Co., 1995) 中在第1399-1404页所解释的，软膏基质可以分组为4类：油性基质、可乳化基质、乳剂基质和水溶性基质。油性软膏基质包括，例如，植物油、获自动物的脂肪和获自石油的半固体烃类。

[0091] 可乳化软膏基质也被称作可吸收的软膏基质，其含有很少的水或不含有水，且包括例如硫酸羟基三硬脂酸甘油酯、无水羊毛脂和亲水矿脂。

[0092] 乳剂软膏基质是油包水 (W/O) 乳剂或水包油 (O/W) 乳剂，并包括例如鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯、羊毛脂和硬脂酸。优选的水溶性软膏基质从不同分子量的聚乙二醇制备；关于进一步的信息参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy。

[0093] 糊剂是半固体剂型，其中活性剂悬浮在合适的基质中。取决于基质的性质，糊剂分

为脂肪糊剂或从单相水性凝胶制成的那些。脂肪糊剂中的基质通常是矿脂或亲水矿脂等。从单相水性凝胶制成的糊剂通常掺入羧甲基纤维素等作为基质。

[0094] 增强剂是亲脂性共增强剂,通常被称作“塑化”增强剂,即具有在约150-1000范围内的分子量、小于约1重量%、优选地小于约0.5重量%和最优选地小于约0.2重量%的水溶性的增强剂。塑化增强剂的Hildebrand溶解度参数 δ 是在约2.5至约10的范围内,优选地在约5至约10的范围内。优选的亲脂增强剂是脂肪酸酯、脂肪醇和脂肪醚。具体的和最优选的脂肪酸酯的实例包括月桂酸甲酯、油酸乙酯、丙二醇单月桂酸酯、丙烯甘油二月桂酸酯(propylene glycerol dilaurate)、甘油单月桂酸酯、甘油单油酸酯、正癸酸异丙酯和肉豆蔻酸辛基十二烷基酯。脂肪醇包括例如硬脂醇和油醇,而脂肪醚包括这样的化合物:其中二醇或三醇优选 C_2-C_4 烷二醇或三醇被一个或两个脂肪醚取代基取代。额外的渗透增强剂是局部药物递送领域的普通技术人员已知的,和/或在相关文本和文献中描述。参见,例如,Percutaneous Penetration Enhancers, Smith等人编(CRC Press, 1995)(通过引用整体并入本文)。

[0095] 除上文鉴定的那些之外,在本发明的组合中可以包括各种其它添加剂。这些包括、但不限于抗氧化剂、收敛剂、香料、防腐剂、软化剂、颜料、染料、保湿剂、推进剂和遮光剂,以及其存在可为药学上或在其它方面需要的其它种类的材料。任选的用于包含在本发明的制剂中的添加剂的典型例子如下:防腐剂诸如山梨酸酯;溶剂诸如异丙醇和丙二醇;收敛剂诸如薄荷醇和乙醇;软化剂诸如聚亚烷基甲基葡萄糖苷;保湿剂诸如甘油;乳化剂诸如硬脂酸甘油酯、PEG-100硬脂酸酯、聚甘油基-3羟基月桂基醚,和聚山梨酯60;山梨醇和其它多羟基醇诸如聚乙二醇;遮光剂诸如辛基甲氧基肉桂酸酯(作为Parsol MCX市售可得)和丁基甲氧基苯甲酰基甲烷(在商业名称Parsol 1789下可得);抗氧化剂诸如抗坏血酸(维生素C)、 α -生育酚(维生素E)、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚、 ϵ -生育酚、 ζ_1 -生育酚、 Z^A -生育酚、 η -生育酚和视黄醇(维生素A);精油、神经酰胺、必需脂肪酸、矿物油、植物油(例如,大豆油、棕榈油、牛油树脂的液体级分、葵花籽油)、动物油(例如,全氢角鲨烯)、合成的油、硅油或蜡(例如,环甲硅油和聚二甲基硅氧烷)、氟代油(通常全氟聚醚)、脂肪醇(例如,鲸蜡醇)和蜡类(例如,蜂蜡、巴西棕榈蜡和石蜡);皮肤感觉修饰剂;和增稠剂和结构化剂诸如膨胀粘土和可在Carbopol商标下市售获得的交联羧基聚烯烃。其它添加剂包括有益剂诸如调理皮肤(具体地,角质层中皮肤的上层)和通过延缓其含水量降低来保持其柔软和/或保护皮肤的那些材料。这样的调理剂和保湿剂包括,例如,吡咯烷羧酸和氨基酸;有机抗微生物剂诸如2,4,4'-三氯-2-羟基二苯醚(三氯生)和苯甲酸;抗炎剂诸如乙酰基水杨酸和甘草次酸;抗脂溢剂诸如视黄酸;血管扩张剂诸如烟酸;黑色素生成抑制剂诸如曲酸;及其混合物。进一步的其它活性剂包括,例如, α 羟基酸、 α 酮酸、聚合羟基酸、保湿剂、胶原、海洋提取物和抗氧化剂诸如抗坏血酸(维生素C)、 α -生育酚(维生素E)、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚、 ϵ -生育酚、 ζ_1 -生育酚、 ζ_2 -生育酚、 η -生育酚和视黄醇(维生素A)和/或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或其它衍生物。一种优选的生育酚化合物是 α -生育酚。额外的试剂包括能够改善皮肤组织中的氧供应的那些,如例如在Gross等人, WO 94/00098和Gross等人, WO 94/00109(均转让给Lancaster Group AG,通过引用整体并入本文)中所描述的。还可以包括遮光剂和紫外吸收化合物。这样的遮光剂和紫外吸收化合物的非限制性例子包括氨基苯甲酸(PABA)、阿伏苯宗、西诺沙酯、二羟苯宗、胡莫柳酯、薄荷醇邻氨基苯甲酸酯、奥克立林、辛基

甲氧基肉桂酸酯、水杨酸辛酯、羟苯甲酮、帕地马酯O、苯基苯并咪唑磺酸、舒利苯酮、二氧化钛、水杨酸三乙醇胺、氧化锌、恩索利唑、meradiraate、奥西诺酯、奥替柳酯和奥克立林。参见标题21第1章子章节D第352部分“Sunscreen drug products for over-the-counter human use”，其以其整体并入本文。其它实施方案可以包括多种非致癌的、非刺激性的愈合材料，其促进用本发明的制剂治疗。这样的愈合材料可以包括营养物、矿物质、维生素、电解质、酶、草药、植物提取物、腺或动物提取物或可以加入制剂中以促进皮肤病症愈合的安全治疗剂。

[0096] 本发明涵盖与在化妆品领域常规使用的那些等效的量的这些各种添加剂，且范围为例如局部制剂的总重量的约0.01%至约20%。

[0097] 本发明的制剂还可以包括常规添加剂诸如遮光剂、芳香剂、着色剂、稳定剂、表面活性剂等。在某些实施方案中，还可以加入其它试剂，诸如抗微生物剂，以防止在储存时变质，即抑制微生物诸如酵母和霉菌的生长。

[0098] 用于本发明的合适抗微生物剂包括、但不限于选自以下的那些：对羟基苯甲酸的甲基和丙基酯（即对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯）、苯甲酸钠、山梨酸、咪脲和它们的组合。在其它实施方案中，还可以加入其它试剂，诸如阻遏物和诱导物，即，抑制（即葡萄糖）或诱导（即木糖）目标多肽的产生。只要与制剂的功能相容并且不干扰制剂的功能，就可使用这样的添加剂。

[0099] 所述制剂还可以含有减轻刺激的添加剂以最小化或消除由要施用的化学实体或组合物的其它组分引起的皮肤刺激或皮肤损伤的可能性。

[0100] 合适的减轻刺激的添加剂包括，例如： α -生育酚；单胺氧化酶抑制剂，别是苯基醇诸如2-苯基-1-乙醇；甘油；水杨酸盐；抗坏血酸；离子载体诸如莫能星；两亲胺；氯化铵；N-乙酰半胱氨酸；辣椒辣素；和氯喹。若存在，减轻刺激的添加剂可以以有效减轻刺激或皮肤损伤的浓度掺入组合物中，通常占制剂的不超过约20重量%，更通常不超过约5重量%。在某些实施方案中可以掺入本制剂中并因此与活性剂一起局部施用的其它合适的药理学活性剂包括但不限于以下：改善或根除色素沉着的或非色素沉着的老年斑、角化病和皱纹的试剂；抗微生物剂；抗细菌剂；止痒剂和抗干燥剂；抗炎剂；局部麻醉剂和镇痛剂；皮质类固醇；维A酸类；维生素；激素；和抗代谢药。局部药理学活性剂的一些实例包括阿昔洛韦、两性霉素、氯己定、克霉唑、酮康唑、益康唑、咪康唑、甲硝唑、米诺环素、制霉菌素、新霉素、卡那霉素、苯妥英、对氨基苯甲酸酯、甲氧基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯、羟苯甲酮、二羟苯宗、生育酚、醋酸生育酚、二硫化硒、巯氧吡啶锌、苯海拉明、普莫卡因、利多卡因、普鲁卡因、红霉素、四环素、克林霉素、克罗米通、氢醌和它的单甲基和苄基醚、萘普生、布洛芬、色甘酸、视黄醇、棕榈酸视黄酯、乙酸视黄酯、煤焦油、灰黄霉素、雌二醇、氢化可的松、氢化可的松21-乙酸酯、氢化可的松17-戊酸酯、氢化可的松17-丁酸酯、黄体酮、戊酸倍他米松、二丙酸倍他米松、曲安奈德、醋酸氟轻松、丙酸氯倍他素、米诺地尔、双嘧达莫、二苯基乙内酰脲、过氧苯甲酰和5-氟尿嘧啶。可以将乳膏剂、洗剂、凝胶、软膏剂、糊剂等铺展在受影响的表面上并轻轻揉搓。溶液可以以相同的方式施用，但更通常将会用滴管、拭子等施用并小心地施用到受影响的区域。

[0101] 施用方案将取决于许多可容易地确定的因素，诸如病症的严重程度和它对初次治疗的应答性，但是通常不会涉及每天超过一次施用。普通技术人员可以容易地确定要施用

的制剂的最适量、施用方法和重复率。一般而言,考虑将会在每周一次或两次直到每天一次的范围内施用本发明的制剂。

[0102] 方法

[0103] 治疗方法

[0104] 本发明提供了用于治疗皮肤疾病的方法,其中所述方法包括给需要这种治疗的受试者施用遗传工程改造的微生物,例如,遗传工程改造的细菌,其能够表达本发明的重组治疗性融合蛋白,由此治疗所述受试者。在一些方面,本发明提供了用于治疗皮肤疾病的方法,其中所述方法包括给需要这种治疗的受试者施用包含本文所述的丝聚合蛋白多肽的药物组合物。在一些实施方案中,丝聚合蛋白多肽是融合蛋白。在进一步的实施方案中,丝聚合蛋白多肽包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0105] 在一个实施方案中,所述疾病是特应性皮炎。

[0106] 在一个实施方案中,所述疾病是寻常性鱼鳞病(IV)。IV的临床特征通常在大约2月龄出现,并且包括全身干燥和细微、白色至灰色的鳞片,其主要在腹部、胸部和四肢伸肌面上。IV一般由从双亲之一或二者继承的遗传突变引起。寻常性鱼鳞病(有时称为鱼鳞病或鱼皮病)的鳞片可在出生时存在,但通常在儿童早期期间首次出现。在一个实施方案中,待治疗的受试者是儿童。有时其它皮肤疾病,例如过敏性皮肤病症湿疹与寻常性鱼鳞病关联。

[0107] 在又一个优选的实施方案中,重组治疗性融合蛋白包含丝聚合蛋白。在其它实施方案中,重组治疗性融合蛋白包含可操作连接至细胞穿透肽的丝聚合蛋白。在一个实施方案中,丝聚合蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO. 1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0108] 在另外的实施方案中,重组治疗性融合蛋白可操作连接至输出信号。

[0109] 试剂盒

[0110] 本发明还提供了试剂盒。在一个方面,本发明的试剂盒包含(a)本发明的组合物和(b)其使用说明书。在另一个方面,本发明的试剂盒包含(a)本发明的活生物治疗组合物中的任一种和(b)其使用说明书。本发明的组合物如上所述。在某些实施方案中,本发明的组合物是如上所述的经工程改造的能够表达治疗上有关的重组融合多肽的微生物。在优选的实施方案中,所述组合物包含经工程改造的细菌(例如,表皮葡萄球菌),其能够表达包含丝聚合蛋白的重组融合多肽。

[0111] 以下实施例进一步说明本发明,所述实施例不应解释为进一步限制。在本申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图明确地通过引用整体并入本文。

实施例

[0112] 以下实施例进一步描述和证明了在本发明范围内的实施方案。实施例仅为了说明的目的而给出,不应解释为本发明的限制,因为其许多变化在不脱离本发明的精神和范围的情况下是可能的。

[0113] 实施例1. 转化的细菌在液体培养基中的生长特征的定量和比较

[0114] 重要的是获得转化的表皮葡萄球菌(SE)与野生型SE竞争的能力的基本了解。为了

了解转化的细菌的生长特征和重组的蛋白生产细菌的生长动力学,使用在液体培养基中的标准生长方法。为了确定在SE-sGFP、SE-ch1 (空载体对照,抵抗氯霉素(chl))和野生型SE之间的生长差异,各菌株分别在100 mL培养物中各自生长6小时。每45分钟(大约为SE的倍增时间),获得1 mL样品和在600 nm测量以获得细菌总浓度的测量结果。在所有样品中比较光密度以了解生长特征。

[0115] 结果显示在图1。如图1所示,相对于SE,蛋白产生仅略微减少了SE-GFP的竞争性生长,如通过CFU测量所测定的。预期减少的生长归因于在蛋白生产SE中增加的代谢需求。

[0116] 实施例2. 在重建的人表皮(RHE)上SE-GFP和对照菌株的生长定量

[0117] 为了表征施加细菌到皮肤的可行性,测定了外部施加的细菌在体外皮肤模型上的生长动力学。该模型提供了在人皮肤上这些细菌将遇到的生态竞争的初步估计。在不含抗生素和抗真菌剂的培养基(按需要补充有氯霉素)中建立并维持RHE培养。悬浮在50%甘油中的SE-sGFP用吸液管施加到RHE的中心3mm直径。具有SE-ch1和SE-WT细菌的对照RHE也与实验组并排施加。在预定的时间点,取出组织插入物,均质化和通过40 μ m过滤器以允许收集细菌流通物。旋下细菌悬液,重悬浮于培养基中,连续稀释和铺板,以测定细菌的CFU。将所有测量结果标准化至通过在施加后15分钟存在的CFU测定的细菌最大回收率。

[0118] 结果显示于图2。如图2所示,当分别施加在RHE上时,SE-GFP比具有空载体的SE生长更慢。尽管对照SE的生长到24小时达到稳定水平,但SE-GFP细菌到48小时达到稳定水平,并且最终计数低 $\sim \frac{1}{2}$ log。当一起加入以模拟在人皮肤上的竞争时,具有单独载体的SE更快生长和略微胜出蛋白生产SE,具有至少一个log的CFU差异(图2)。这些结果与上文那些结果组合导致得出结论,蛋白生产SE当在临床环境中定居皮肤时可能具有轻微劣势,潜在地需要另外的遗传修饰以促进生长和竞争。然而,如实施例3所示,这些细菌完全能够定居皮肤模型。

[0119] 实施例3. SE-GFP和对照菌株在RHE上的生长的定性表征

[0120] 本实验的目的是使用RHE和Vivascope加入关于SE-GFP定居的空间和时间信息。将SE-GFP施加到RHE,持续3.5小时,并以激光功率使用4.75 μ m步距和线性增加,在2 mm x 2 mm宽和100 μ m深的三个标准化区域中以反射和荧光模式将样品成像。超声凝胶(Parker Laboratories)用于保持在物镜和玻璃样品板之间的折射率。重要的是,为了模拟AD患者中的受损皮肤的超微结构,RHE用Derma Microneedle装置有意刺穿,以确定在受损皮肤存在时细菌的定位。结果显示以 10^8 CFU施加和生长3.5小时的细菌以达到70 μ m的深度位于穿孔中(箭头,图3B和图3C)。这表明局部施加的细菌能够归集(hone)到受损皮肤的区域。

[0121] 来自这些实验的结果显示,修饰的细菌归集到角质层的表面和深沟并在实验过程中保持恒定存在。这些实验还显示,SE归集到皮肤屏障缺陷,并且这表明我们的细菌将更深地定居到受损的皮肤中,如我们在AD患者中所预期的(图3A-C)。

[0122] 实施例4. 使用体外模型系统将细菌分泌的sGFP递送至皮肤的表征

[0123] 分离由SE产生的sGFP

[0124] 从225 mL SE培养物(2.7-2.9 OD/mL)纯化蛋白并用CellB-Lyse (Sigma)裂解。产生4 mL洗脱物,和在BPS缓冲液pH 7.4中用500 mM咪唑从Ni-NTA柱运行,得到0.4 mg/225 mL SE。纯化的sGFP的SDS-PAGE凝胶显示于图4。

[0125] 表征大批纯化的sGFP和sGFP+RMR至RHE的递送和表征来自SE-GFP报告物和对照菌

株的渗透sGFP蛋白的细胞隔室和深度

[0126] 检查纯化的sGFP和sGFP+RMR的定位以回答三个重要问题:(1) sGFP+RMR渗透角质层吗;(2) 如果这样,它可在多深处检出;以及(3) 渗透动力学如何。

[0127] 将5.0 μg 的GFP +/- RMR施加到RHE。双光子显微术和共焦成像用于检查30分钟和60分钟的效果,以检查渗透和动力学。重要的是,检查由于RMR渗透入细胞的作用导致的GFP的细胞内定位,以及由于RMR在促进皮肤渗透中的作用导致的GFP的经皮定位。

[0128] 这些实验的结果显示,没有RMR的GFP没有有效地渗透RHE (图5A, B, E, F)。然而,与没有RMR信号的GFP (图5E, F, K)相比,相同量的GFP-RMR更深地递送到组织中(图5G, H, J),支持了RMR对于经皮渗透的效率和必要性。另外,与没有该标签的GFP (图5 A, B)相比,发现具有RMR的GFP在角质形成细胞中积聚的证据(图5C, D),支持了细胞内渗透。总之,这些结果表明,RMR促进我们的蛋白的经皮递送,对于通过用产生丝聚合蛋白的SE处理更深地递送丝聚合蛋白到IV患者的皮肤中,这是高度相关的。检查用Dermaroller破坏角质层后GFP的深度和定位,并且发现GFP优先定位和渗透到裂口的区域中(图50)。

[0129] 实施例5. 从表皮葡萄球菌产生人丝聚合蛋白的分析方法开发和优化

[0130] 开发了用于丝聚合蛋白定量的分析方法,以及合理选择最佳丝聚合蛋白寡聚物和序列的结构-活性方法,以向前进展到临床前和后续的临床开发中。

[0131] 合理设计丝聚合蛋白序列

[0132] 使用基于在两端侧连提议的接头区的所谓的含结构域序列的丝聚合蛋白分子作为起点。hFLG包含12个重复单元并且通过细胞内蛋白酶处理以释放各个单元。丝聚合蛋白结构的概述在图6E中提供。对于研究人丝聚合蛋白结构域的同源性和序列身份的生物信息学分析,参见图6A, B。这些单元内的序列是高度同源的。已经提议各单元在“接头区”裂解。这些接头区之间的区段是各个单元,每个单元含有一对子结构域。这些单元的空间取向或形貌图尚未解析,这是因为所述分子不是高度结构组构的。基于Kyte-Doolittle亲水性评分,接头区被定义为在hFLG蛋白中最亲水的氨基酸区段(图6C, D)。

[0133] 为了试图研究hFLG的SAR,重组产生包含通过其接头区侧连的子结构域9和10的整个单元。为了鉴定负责角蛋白结合活性的最小蛋白区段,因此产生了具有N末端的系统性删除区域的蛋白。还检查了接头区的作用。为了解决该问题,制备其中接头区在序列内位于中央的蛋白。RMR肽序列显示于图6E,图6E基于GFP通过RMR递送的之前表征(图5A-N)。如下所述,使用基于结构-活性关系(SAR)的方法来选择已经鉴定的可能序列的最佳丝聚合蛋白序列。

[0134] 实施例6. 由SE分泌的丝聚合蛋白的鉴定和定量

[0135] 对于分泌丝聚合蛋白的SE菌株的随后临床前和临床开发重要的是,开发鉴定和定量由SE分泌的丝聚合蛋白的方法。

[0136] hFLG的抗体开发和免疫反应性检测

[0137] 开发针对hFLG的表位的抗体(RL-012-001B,鸡IgY),所述表位在所有子结构域对中共有的。这是必需的,因为市售可得的丝聚合蛋白抗体显示显著的非特异性结合。对于从产生丝聚合蛋白的SE和其培养基的细胞裂解物分离的丝聚合蛋白,该IgY抗体在蛋白质印迹上显示清晰条带(图7D)。IgY能够识别产生的几个不同对的hFLG子单元(图7 B-D)。

[0138] 质谱(MS)

[0139] 20 ng的人丝聚合蛋白区段9-10的初步LC-DDA- (Data Dependent Acquisition) MS/MS分析显示于图7E。这鉴定了在监测丝聚合蛋白产生、分泌和递送时可遵循的肽序列。

[0140] 将蛋白样品重悬浮于50 mM碳酸氢铵缓冲液中并通过在37°C孵育过夜用胰蛋白酶消化。然后将样品酸化以停止胰蛋白酶活性,然后使用C18旋转柱脱盐,其洗脱物然后在真空离心下干燥并重悬浮于0.1%甲酸中。得到的胰蛋白酶消化物使用nanoACQUITY UPLC系统通过反相LC-DDA-MS/MS分析,所述系统连接至配备有纳米电喷射源的Orbitrap-Fusion Tribrid质谱仪。在注入后,肽被加载到捕获柱中,然后用C18柱分离。

[0141] 用在Top Speed数据依赖性模式下操作的质谱仪进行LC-DDA-MS/MS分析,最大总循环时间为3秒。在MS1全扫描期间,前体离子在四极质量分析器中分离,用最大注射时间60 ms、自动增益控制(AGC)目标值 4×10^5 和Orbitrap分辨率120,000以 m/z 200记录。在300-1500 m/z 的范围内获得全扫描,接着最强离子的MS2。离子用1.6 Th窗口反复分离,用最大注射时间110 ms,AGC目标 1×10^5 注入,然后用28的较高能量碰撞离解(HCD)破碎。MS/MS谱然后在分辨率60,000以 m/z 200记录。具有单电荷或未分配电荷状态的离子从破碎中排除。

[0142] 该测定的可靠性和稳健性对于包含分泌丝聚合蛋白的SE的任何最终LBP的生物化学、制造和控制是特别重要的。MS分析方法的资格使用以下度量:(1) 特异性;(2) 灵敏性(检测极限(LOD)和定量极限(LOQ));和(3) 线性度。这使用纯化hFLG的参考标准并在一定范围的浓度下运行多种样品实现。如图7E所示,特定的肽是可检测的,并且如果需要的话,这些中的数种可作为参考标准合成制备。

[0143] 实施例7. 测量丝聚合蛋白活性的角蛋白结合测定

[0144] 角蛋白结合测定用于测量丝聚合蛋白活性。这将通过表面等离子体共振(SPR)方法(Biacore GE Healthcare)评估,以将不同的丝聚合蛋白区段基于其细胞角蛋白相互作用分级。这将测量结合亲和力、特异性、浓度和动力学(kinetics)以检查丝聚合蛋白-细胞角蛋白结合动力学(dynamics)。由该方法产生的预期度量包括 K_{on} 、 K_{off} 和 K_d 。不同的人细胞角蛋白将以已知与hFLG相互作用的细胞角蛋白1和10开始进行评价。该测定用我们当前的丝聚合蛋白9-10构建体开发,并用于测量附加丝聚合蛋白序列以指导SAR分析。该测定工作流程显示于图8。

[0145] 实施例8. 通过结构-活性关系(SAR)优化人丝聚合蛋白

[0146] 基于上述和图6所示的方法,测试剩余的11种丝聚合蛋白结构域并产生身份和活性的矩阵,如上述方法(即蛋白质印迹、MS和表面等离子体共振(SPR)蛋白-蛋白相互作用测定)所概述的。蛋白序列和体外活性的相关性将指导作为潜在的治疗剂产生的蛋白的选择。

[0147] 实施例9. 进行人丝聚合蛋白从表皮葡萄球菌递送至人皮肤模型的分析方法开发和优化

[0148] 对于随后药代动力学(PK)的表征重要的是,开发用于丝聚合蛋白的检测和分布的测定。这包括使用检测完整和分解产物的MS(如上所述),以及免疫荧光和免疫组织化学,表征从产生丝聚合蛋白的SE在人皮肤模型(重建人表皮)以及小鼠皮肤中的丝聚合蛋白分布。丝聚合蛋白分解产物的测量还将补充丝聚合蛋白活性的表征,即丝聚合蛋白的内在化和处理。另外,开发测定以检测丝聚合蛋白分解产物,包括拉曼光谱。

[0149] Flg-/-重建人表皮(RHE)

[0150] 丝聚合蛋白KO重建人表皮, 商标为EpiDerm, 购自MatTek (Ashland, MA)。表皮模型来自单一供体的新生儿包皮或成人乳房皮肤的正常人表皮角质形成细胞(NHEK) 构建。该模型作为9mm直径组织样品提供, 其已在暴露于空气-液体界面的Millicell CM (Millipore) 上生长。表皮包括基底、棘突和颗粒分化的总共8-12个层以及角质层的10-15个层。在组织学、代谢和遗传方面, 表皮特别符合人皮肤。模型维持形态学达到三周。在角质形成细胞中的丝聚合蛋白敲减通过丝聚合蛋白的基于shRNA慢病毒的敲减实现。对于该目的, 估计需要96个RHE样品。

[0151] 小鼠模型

[0152] 使用野生型BALB/c和*flg*^{-/-}小鼠二者。BALB/c小鼠购自Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, 和*flg*^{-/-}通过来自Riken Laboratory (Nagasaki, Japan)的Azitra获得。对于该目的, 估计需要22只BALB/c和22只*flg*^{-/-}。

[0153] 免疫荧光和免疫组织化学

[0154] 为了了解和表征由SE分泌的丝聚合蛋白的吸收和生物分布, 免疫荧光(IF) 显微术和免疫组织化学(IHC) 用于可视化丝聚合蛋白从产生丝聚合蛋白的SE的定位和分布。为此, 使用*flg*^{-/-}重建人表皮(RHE)。简言之, 将 10^6 - 10^8 个菌落形成单位(CFU) 的范围的产生丝聚合蛋白的SE施加到RHE和小鼠皮肤, 并在没有抗生素时孵育24小时。在24、48和72小时一式三份将样品固定用于IF和IHC分析, 和对于这些分析, 未处理的RHE和小鼠样品用作阴性对照。

[0155] 对于IF, 样品用70%乙醇、50 mM甘氨酸固定1小时。免疫荧光染色通过我们开发的抗-丝聚合蛋白第一抗体(RL-012-001B) 以1:200孵育2小时, 接着在Hoechst Stain Solution (Sigma) 存在下用大鼠抗-山羊罗丹明第二抗体(Jackson Laboratory) 以1:200稀释度孵育进行。在Gel/Mount (Biomed) 中将载玻片安装盖玻片。

[0156] 对于IHC, 将样品在10%福尔马林中固定和石蜡包埋。将石蜡切片脱蜡和用95%乙醇洗涤, 接着甲醇过氧化氢洗涤。然后该切片使用啮齿动物Decloaker溶液(Biocare Medical, RD913) 和Biocare decloaking室, 用热诱导的表位修复(HIER) 程序处理。在Tris pH 7.4中洗涤后, 切片在大鼠血清和FcBlock (24G2) 的存在下孵育, 接着通过在封闭溶液中稀释的兔抗-表皮葡萄球菌孵育。样品在Tris中洗涤, 然后用山羊抗-兔IgG-Texas Red抗体(Invitrogen, T2767) 孵育。组织然后用HOECSHT复染色, 并使用Leica DM IRBE荧光显微镜成像。

[0157] 拉曼光谱

[0158] 拉曼光谱是鉴定丝聚合蛋白的NMF分解产物的已知方法⁶²。在最终分化期间, 丝聚合蛋白原被快速去磷酸化和裂解以得到功能性丝聚合蛋白单体, 其结合和装配角蛋白中间丝^{63,64}。去亚胺化丝聚合蛋白单体的裂解通过数种蛋白酶催化, 包括半胱天冬酶14⁶⁵、钙蛋白酶1和博来霉素水解酶⁶⁶。丝聚合蛋白然后分解成天然保湿因子(NMF), 特别是尿刊酸(UA)、焦谷氨酸(PGA) 和瓜氨酸(CIT)⁶²。

[0159] 拉曼光谱用于鉴定在*flg*^{-/-} RHE模型和小鼠皮肤中的丝聚合蛋白分解产物。拉曼效应由由于光子与分子的无弹性碰撞导致的光子能量位移组成。拉曼光谱显示作为入射光和散射光之间的频率差异的函数的散射强度; 该差异被称为“拉曼位移”。已开发初始的拉曼光谱方法来鉴定丝聚合蛋白的分解产物NMF。可直接观察皮肤(RHE), 无需组织破坏的样

品制备。此时,市售标准样品已用于测试该方法,和其结果提供在图9A-D中。

[0160] 当优化时,拉曼光谱能够检测微摩尔浓度。使用表面增强拉曼光谱,纳摩尔检测水平是可能的,其中合适材料(金或银)的纳米颗粒可置于皮肤样品上。这些颗粒经历表面等离子体共振,因此显著增加拉曼分析的灵敏度。这用于鉴定从局部施加到RHE的产生丝聚合蛋白的SE的丝聚合蛋白分解。 10^8 个菌落形成单位(CFU)的产生丝聚合蛋白的SE将施加到RHE和在没有抗生素下孵育24小时。在各个时间点收集样品和使用拉曼光谱分析以鉴定NMF分解产物。

[0161] 质谱

[0162] 为了评估和表征丝聚合蛋白的代谢,使用质谱。NMF分子尿刊酸(UA)、焦谷氨酸(PGA)和瓜氨酸(CIT)的市售标准的检测使用与AB Sciex API4000 QTrap偶联的Agilent HP1200质谱仪进行。UA、PGA和CIT的标准购自Sigma-Aldrich和用Agilent Eclipse XDB C18柱(3.5 μ , 2.1x100mm)分离,注入质谱仪和通过MRM(多重反应监测器)和次级离子质谱(SIMS)检测。SIMS的灵敏度显示是MRM的约10倍。对于UA、PCA和CIT的定量极限(LOQ)分别是0.5、1和0.25 ng/mL,和标准曲线显示相关系数0.99。当在RHE实验中测试NMF从FLG的产生时,将HE组织样品均质化和用高氯酸/乙腈提取,并注入所得溶液。这些结果的标准曲线提供在图9E-G中。这些初步数据表明,CIT可能仅仅使用MS而不是拉曼光谱被检出。

[0163] 这些参数用于测量从局部施加到RHE的产生丝聚合蛋白的SE的丝聚合蛋白分解。将 10^8 CFU的产生丝聚合蛋白的SE施加到RHE和在没有抗生素下孵育24小时。在各个时间点收集样品和使用MS分析以检测NMF分解产物。该测定还使用上述方法,使用(1)特异性和灵敏性;(2)准确性和精密密度;(3)测定极限而具有资格。其结果报告在两个模型中丝聚合蛋白的初始代谢和分布。

[0164] 实施例10. 在小鼠中评价候选的分泌丝聚合蛋白的SE的定居动力学和活性

[0165] 使用遗传IV小鼠模型(*Flg*^{-/-})以及野生型小鼠在体内评估产生FLG的SE的定居动力学。

[0166] 小鼠模型

[0167] 为了研究该方法的适用性,使用遗传模型小鼠系统。丝聚合蛋白敲除小鼠(*Flg*^{-/-})。*Flg*^{-/-}小鼠是丝聚合蛋白缺陷的和显示干燥的鳞状皮肤¹⁹。尽管天然保湿因子(其是丝聚合蛋白降解产物)的水平显著下降,但是角质层(SC)水合和TEWL在*Flg*^{-/-}小鼠中是正常的。抗原更有效地渗透*Flg*^{-/-} SC,从而导致在半抗原诱导的接触性超敏反应中增强的应答以及更高的抗-卵白蛋白(OVA) IgG(1)和IgE血清水平。*Flg*^{-/-}小鼠通过材料传输协议得自RIKEN BioResource Research Center (RIKEN BRC, Tsukuba, Ibaraki, 日本)。野生型小鼠(BALB/c)也将用于该实验中。

[0168] 研究设计

[0169] 来自图6E的设计的丝聚合蛋白序列在SE中用于*Flg*^{-/-}和BALB/c小鼠。将使用每种小鼠类型五组进行该研究4周。将小鼠分配到以下治疗组中:局部媒介物对照(50%甘油,50%灭菌的BHI培养基)、局部野生型SE(1.0×10^8 CFU/cm²在50%甘油中)和三种剂量的分泌丝聚合蛋白的SE构建体(*SE*^{FLG})(10^6 、 10^7 和 10^8 CFU/cm²在50%甘油中)。每天将每种溶液在每只小鼠的相同耳朵和尾巴上施用持续7天,并在第7、14、30和60天评估小鼠的微生物组分析以评估定居动力学,并在第7和14天评估显微术和组织学以评估皮肤中的定位和宏观变化

(例如,任何不利事件诸如炎症的迹象)等。每种小鼠类型每个组使用12只小鼠。研究设计的概述显示于图10。

[0170] 实施例11. 在施用分泌丝聚合蛋白的SE后的定居动力学和持续性

[0171] 为了了解添加SE对微生物负载、微生物多样性和皮肤微生物组的稳定性的影响,使用16S rRNA测序以测量微生物群落的变化。在基线(第0天)、第7、14、30和60天,从小鼠尾部皮肤使用絮状拭子收集皮肤微生物组样品。使用由The Jackson Laboratory for Genomic Medicine的0h Laboratory开发的皮肤特异性定制方案提取DNA。为了测量微生物负载,利用使用16S rRNA V1-V3引物的qPCR,如之前所述。为了检查微生物群落动力学,扩增V1-V3和在Illumina MiSeq平台上使用2x300bp读数化学测序。序列分析至属水平,如之前所述⁴⁰,并且以97%类似性定义操作分类单位(OTU)。区别葡萄球菌物种的定制计算工具用于追踪施加的SE的相对丰度[0h等人, Genome Research 2013]⁶⁷ (图6)。

[0172] 使用生态学度量和群落结构分析测量生态失调。首先,生态失调使用Shannon多样性指数(其是考虑的微生物群落的生态学度量)作为多样性的函数评估,并在施用之前和之后进行比较。另外,比较处理之前和之后的局部微生物组的群落结构。生态失调测量为从(1) 基线微生物组的%总体偏差,和(2) 从我们的对照中的平均群落结构的偏差。使用统计学,例如比较群落结构的Yue-Clayton指数。最后,在每物种水平上分析微生物组趋势。

[0173] 因为没有预期表皮葡萄球菌导致内源细菌群的消除,因此追踪经过处理的每物种的纵向动力学,以鉴定在50,000读数/样品的靶向测序深度下物种是否从群落丢失。

[0174] 16S测序的实验概况显示于图11。

[0175] 组织学和安全性分析

[0176] 组织学用于检查SE定位以及探查安全性和监测任何炎症迹象的评估。每个组的切离耳朵在4%多聚甲醛中固定16 h和在石蜡中包埋。然后,6 μm 切片用苏木精(Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)和伊红(Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) (H&E)染色。通过显微镜(100X, 200X)观察真皮中的淋巴细胞浸润和棘细胞层水肿。

[0177] 统计学分析

[0178] 如果数据是正态分布,对于初步结果宏观临床疾病评分的组间差异使用双侧student t-检验评估。如果不是(例如,微生物组数据),使用非参数等效检验,例如Wilcoxon-秩和检验。跨组差异用ANOVA或非参数等效检验(Kruskal-Wallis)评价。使用相同的技术来评估TEWL和表皮增厚。最后,顺序变量差异使用卡方检验评价。如果需要,使用假发现率校正所有P值,用于多重比较。

[0179] 对于微生物组分析,样品间的群落变异使用定量的基于分类学的Yue-Clayton距离计算。使用 β 多样性度量(例如,Yue-Clayton theta (θ)指数),一种测量两个样品之间的类似性的度量,其说明共用物种和它们的丰度。时间系列内各样品之间的成对比较将产生用于小鼠内纵向变异的基线。对于各组相继样品,计算 θ 指数。相继 θ 和基线 θ 之间的比率然后用作通量评分以代替随时间的不稳定性。这允许基于滑动窗口而不是随时间的差异聚集比较(其可能是纵向数据中的混淆者)来评分稳定性。研究对于时间系列数据的动力学系统模型,例如通用Lotka-Volterra非线性微分方程^{63,64}、时间依赖性通用相加模型⁶⁵或非参数方法,例如Gaussian Process Dynamical Models⁶⁶。对于各个物种,使用模型例如Augmented Dickey-Fuller检验⁶⁷来测试物种的自我平衡。这确定哪些物种有助于随时间的

变异,因为选择微生物可说明大部分时间变异是可能的。

[0180] 统计学分析

[0181] 除非另外指明,否则一式三份进行实验,并且报告平均值和标准偏差。对于组间比较,使用双侧t检验或方差分析。如果数据不是正态分布,这些用非参数等效检验(Wilcoxon-秩和检验和Kruskal-Wallis检验)替换。

[0182] 安全性和“杀死开关”

[0183] 几乎所有用于临床应用的重组微生物的一个关键要求是防止不希望引入其它个体或环境的能力。为了确保经工程改造的菌株的安全性,在一个实施方案中,本发明使用了营养缺陷型菌株,其需要补充关键氨基酸(D-alanine)或某些代谢基因(*AlaR*)才能存活,并且同时替代对抗生素抗性株进行选择的需要,后者在商业上不可行。在另一个实施方案中,本发明集成了“杀死开关”,其基于在双木糖-核糖开关启动子的诱导后的CRISPR/Cas9自我切割。在另一个实施方案中,本发明提供了细胞计数器,其在限定的分裂次数后重组出AZT基因座,尽管该方法需要重新施用媒介物。为了确保本发明的经工程改造的表皮葡萄球菌的安全性,使用基于CRISPR/Cas9的杀死开关,其是木糖诱导的并且被茶碱核糖开关双重调节。该方案的基础是,Cas9在给定靶向指导的情况下在染色体裂解方面极为有效,并且由于葡萄球菌缺乏规范的非同源末端连接修复途径,基因组裂解在没有同源重组模板存在下导致死亡。基于CRISPR的系统的应用还赋予了极大的特异性,因为比较基因组学可以用于设计本发明的经工程改造的表皮葡萄球菌菌株所特有的指导,使得如果通过水平基因转移将其传播至其它微生物,则所述构建体是无活性的。最后,在一个实施方案中,本发明提供了一种构建体,其被设计成表达多个CRISPR间隔物以同时靶向多个基因组区域以确保切割并通过回复变异使存活最小化。

[0184] 等同方案

[0185] 本领域技术人员会认识到或仅仅使用常规实验就能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案意图由随附权利要求涵盖。

[0186] 参考文献

[0187] 1. Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. *British medical journal*. 1966;1(5493):947-950.

[0188] 2. Hernandez-Martin A, Gonzalez-Sarmiento R, De Unamuno P. X-linked ichthyosis: an update. *The British journal of dermatology*. 1999;141(4):617-627.

[0189] 3. Marukian NV, Choate KA. Recent advances in understanding ichthyosis pathogenesis. *F1000Research*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-1497.

[0190] 4. Oji V, Traupe H. Ichthyosis: clinical manifestations and practical treatment options. *American journal of clinical dermatology*. 2009;10(6):351-364.

[0191] 5. Sybert VP, Dale BA, Holbrook KA. Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *The Journal of investigative dermatology*.

1985;84(3):191-194.

[0192] 6. Nirunsuksiri W, Presland RB, Brumbaugh SG, Dale BA, Fleckman P. Decreased Profilaggrin Expression in Ichthyosis Vulgaris Is a Result of Selectively Impaired Posttranscriptional Control. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(2):871-876.

[0193] 7. Feinsein A, Ackerman AB, Ziprkowski L. Histology of autosomal dominant ichthyosis vulgaris and X-linked ichthyosis. *Archives of dermatology*. 1970;101(5):524-527.

[0194] 8. Osawa R, Akiyama M, Shimizu H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2011;60(1):1-9.

[0195] 9. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A等人 Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature genetics*. 2006;38(3):337-342.

[0196] 10. Manabe M, Sanchez M, Sun TT, Dale BA. Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation; research in biological diversity*. 1991;48(1):43-50.

[0197] 11. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A等人 Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics*. 2006;38(4):441-446.

[0198] 12. Weidinger S, Illig T, Baurecht H等人 Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(1):214-219.

[0199] 13. Marenholz I, Nickel R, Ruschendorf F等人 Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(4):866-871.

[0200] 14. Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR等人 Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nature genetics*. 2007;39(5):650-654.

[0201] 15. Gruber R, Elias PM, Crumrine D等人 Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *The American journal of pathology*. 2011;178(5):2252-2263.

[0202] 16. Man MQ, Hatano Y, Lee SH等人 Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus

multiple oxazolone challenges. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(1):79-86.

[0203] 17. Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A等人 A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nature genetics*. 2009;41(5):602-608.

[0204] 18. Oyoshi MK, Murphy GF, Geha RS. Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3):485-493, 493.e481.

[0205] 19. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A等人 Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(6):1538-1546.e1536.

[0206] 20. Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: filaggrin. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(3 Pt 2):751-762.

[0207] 21. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(4):328-340.

[0208] 22. Miajlovic H, Fallon PG, Irvine AD, Foster TJ. Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(6):1184-1190.e1183.

[0209] 23. Vavrova K, Henkes D, Struver K等人 Filaggrin deficiency leads to impaired lipid profile and altered acidification pathways in a 3D skin construct. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(3):746-753.

[0210] 24. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M等人 Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy*. 2010;65(7):911-918.

[0211] 25. Sakai T, Hatano Y, Zhang W, Fujiwara S. Defective maintenance of pH of stratum corneum is correlated with preferential emergence and exacerbation of atopic-dermatitis-like dermatitis in flaky-tail mice. *Journal of dermatological science*. 2014;74(3):222-228.

[0212] 26. Bandier J, Johansen JD, Petersen LJ, Carlsen BC. Skin pH, atopic dermatitis, and filaggrin mutations. *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug*. 2014;25(3):127-129.

[0213] 27. Ganemo A, Sjoden PO, Johansson E, Vahlquist A, Lindberg M. Health-related quality of life among patients with ichthyosis. *European journal of dermatology : EJD*. 2004;14(1):61-66.

[0214] 28. Ganemo A. Quality of life in Swedish children with congenital ichthyosis. *Dermatology reports*. 2010;2(1):e7.

- [0215] 29. Dreyfus I, Pauwels C, Bourrat E等人 Burden of inherited ichthyosis: a French national survey. *Acta dermato-venereologica*. 2015;95(3):326-328.
- [0216] 30. Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*. 2014;346(6212):954-959.
- [0217] 31. Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(6):353-366.
- [0218] 32. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-214.
- [0219] 33. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J等人 Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(10):3698-3703.
- [0220] 34. Salzman NH, Hung K, Haribhai D等人 Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol*. 2010;11(1):76-82.
- [0221] 35. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011;474(7351):327-336.
- [0222] 36. Ravel J, Gajer P, Abdo Z等人 Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4680-4687.
- [0223] 37. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(4):244-253.
- [0224] 38. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F等人 Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(7):3047-3052.
- [0225] 39. Weyrich LS, Dixit S, Farrer AG, Cooper AJ, Cooper AJ. The skin microbiome: Associations between altered microbial communities and disease. *The Australasian journal of dermatology*. 2015.
- [0226] 40. Oh J, Byrd AL, Deming C, Conlan S, Kong HH, Segre JA. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*. 2014;514(7520):59-64.
- [0227] 41. Oh J, Freeman AF, Park M等人 The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome research*. 2013;23(12):2103-2114.
- [0228] 42. Grice EA. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2014;33(2):98-103.

- [0229] 43. Powers CE, McShane DB, Gilligan PH, Burkhart CN, Morrell DS. Microbiome and pediatric atopic dermatitis. *The Journal of dermatology*. 2015.
- [0230] 44. Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM等人 Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol*. 2010;130(1):192-200.
- [0231] 45. Cogen AL, Yamasaki K, Muto J等人 *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PloS one*. 2010;5(1):e8557.
- [0232] 46. Monk IR, Shah IM, Xu M, Tan MW, Foster TJ. Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio*. 2012;3(2).
- [0233] 47. Wei W, Cao Z, Zhu YL等人 Conserved genes in a path from commensalism to pathogenicity: comparative phylogenetic profiles of *Staphylococcus epidermidis* RP62A and ATCC12228. *BMC genomics*. 2006;7:112.
- [0234] 48. Bose JL, Fey PD, Bayles KW. Genetic tools to enhance the study of gene function and regulation in *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology*. 2013;79(7):2218-2224.
- [0235] 49. Sipsashvili Z, Nguyen NT, Bezchinsky MY, Marinkovich MP, Lane AT, Khavari PA. Long-term type VII collagen restoration to human epidermolysis bullosa skin tissue. *Hum Gene Ther*. 2010;21(10):1299-1310.
- [0236] 50. Johnson LN, Cashman SM, Read SP, Kumar-Singh R. Cell penetrating peptide POD mediates delivery of recombinant proteins to retina, cornea and skin. *Vision Res*. 2010;50(7):686-697.
- [0237] 51. Hou YW, Chan MH, Hsu HR等人 Transdermal delivery of proteins mediated by non-covalently associated arginine-rich intracellular delivery peptides. *Exp Dermatol*. 2007;16(12):999-1006.
- [0238] 52. Aufenvenne K, Larcher F, Hausser I等人 Topical enzyme-replacement therapy restores transglutaminase 1 activity and corrects architecture of transglutaminase-1-deficient skin grafts. *Am J Hum Genet*. 2013;93(4):620-630.
- [0239] 53. Park J, Ryu J, Jin LH等人 9-polylysine protein transduction domain: enhanced penetration efficiency of superoxide dismutase into mammalian cells and skin. *Mol Cells*. 2002;13(2):202-208.
- [0240] 54. Lim JM, Chang MY, Park SG等人 Penetration enhancement in mouse skin and lipolysis in adipocytes by TAT-GKH, a new cosmetic ingredient. *J Cosmet Sci*. 2003;54(5):483-491.
- [0241] 55. Schutze-Redelmeier MP, Kong S, Bally MB, Dutz JP. Antennapedia

transduction sequence promotes anti tumour immunity to epicutaneously administered CTL epitopes. *Vaccine*. 2004;22(15-16):1985-1991.

[0242] 56. Lopes LB, Brophy CM, Furnish E等人 Comparative study of the skin penetration of protein transduction domains and a conjugated peptide. *Pharm Res*. 2005;22(5):750-757.

[0243] 57. Nodake Y, Matsumoto S, Miura R等人 Pilot study on novel skin care method by augmentation with *Staphylococcus epidermidis*, an autologous skin microbe - A blinded randomized clinical trial. *Journal of dermatological science*. 2015;79(2):119-126.

[0244] 58. Naik S, Bouladoux N, Linehan JL等人 Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature*. 2015;520(7545):104-108.

[0245] 59. Li D, Lei H, Li Z, Li H, Wang Y, Lai Y. A novel lipopeptide from skin commensal activates TLR2/CD36-p38 MAPK signaling to increase antibacterial defense against bacterial infection. *PloS one*. 2013;8(3):e58288.

[0246] 60. Lai Y, Cogen AL, Radek KA等人 Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J Invest Dermatol*. 2010;130(9):2211-2221.

[0247] 61. Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C等人 Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*. 2012;337(6098):1115-1119.

[0248] 62. Gonzalez FJ, Valdes-Rodriguez R, Ramirez-Elias MG, Castillo-Martinez C, Saavedra-Alanis VM, Moncada B. Noninvasive detection of filaggrin gene mutations using Raman spectroscopy. *Biomedical optics express*. 2011;2(12):3363-3366.

[0249] 63. Harding CR, Aho S, Bosko CA. Filaggrin - revisited. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013;35(5):412-423.

[0250] 64. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 9):1285-1294.

[0251] 65. Denecker G, Hoste E, Gilbert B等人 Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nature cell biology*. 2007;9(6):666-674.

[0252] 66. Kamata Y, Taniguchi A, Yamamoto M等人 Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(19):12829-12836.

[0253] 67. Oh J, Freeman AF, Program NCS等人 The altered landscape of the

human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome research*. 2013;23(12):2103-2114.

序列表

<110> AZITRA INC

<120> 用重组微生物治疗皮肤疾病的方法和组合物

<130> 129062-00820

<140> PCT/US2019/026045

<141> 2019-04-05

<150> 62/653, 021

<151> 2018-04-05

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 359

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 1

[0001]

```

Met Gln Ser Gly Glu Ser Ser Gly Arg Ser Arg Ser Phe Leu Tyr Gln
1           5           10           15
Val Ser Ser His Glu Gln Ser Glu Ser Thr His Gly Gln Thr Ala Pro
           20           25           30
Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Ser Arg His Glu Gln Ala Arg Asn Ser
35           40           45
Ser Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His
50           55           60
Pro Gly Ser Ser Arg Gly Gly Arg Gln Gly Ser Tyr His Glu Gln Ser
65           70           75           80
Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Tyr His His Ser His Thr Thr Pro
           85           90           95
Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly Gln Ser Gly Pro Arg Ser Ala
           100          105          110
Ser Arg Gln Thr Arg Asn Glu Glu Gln Ser Gly Asp Gly Ser Arg His
           115          120          125
Ser Gly Ser Arg His His Glu Pro Ser Thr Arg Ala Gly Ser Ser Arg
           130          135          140
His Ser Gln Val Gly Gln Gly Glu Ser Ala Gly Ser Lys Thr Ser Arg
145           150          155          160
Arg Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Arg Asp Ser Glu Gly His Ser
           165          170          175
Glu Asp Ser Glu Arg Arg Ser Glu Ser Ala Ser Arg Asn His Tyr Gly
           180          185          190
Ser Ala Arg Glu Gln Ser Arg His Gly Ser Arg Asn Pro Arg Ser His
           195          200          205
Gln Glu Asp Arg Ala Ser His Gly His Ser Ala Glu Ser Ser Arg Gln
           210          215          220

```


[0003]

Xaa His Glu Gln Ser Glu Ser
 20
 <210> 4
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Glu Arg Ser Arg Ser Ser Asp Gly Lys Ser Ser Ser Gln Val Asn Arg
 1 5 10 15
 Ser Arg His Glu Asn Thr Ser Gln Val Pro Leu Gln Glu Ser Arg Thr
 20 25 30
 Arg Lys Arg Arg Gly Ser Arg Val Ser Gln Asp Arg Asp Ser Glu Gly
 35 40 45
 His Ser Glu Asp Ser Glu Arg His Ser Gly Ser Ala Ser Arg Asn His
 50 55 60
 His Gly Ser Ala Trp Glu Gln Ser Arg Asp Gly Ser Arg His Pro Arg
 65 70 75 80
 Ser His Asp Glu Asp Arg Ala Ser His Gly His Ser Ala Asp Ser Ser
 85 90 95
 Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Ala Glu Thr Ser Ser Arg Gly Gln Thr
 100 105 110
 Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Pro Gly Glu Arg His Gly
 115 120 125
 Ser Gly His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Ala Thr Gly
 130 135 140
 Arg Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Ser Asp Arg Gly His Arg Gly Ser
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His
 165 170
 <210> 5
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 5
 Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser His His His Glu Ala Ser Ser Trp
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Leu Val Gly Gln Gly Gln Ser Ser Gly
 20 25 30
 Pro Arg Thr Ser Arg Pro Arg Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp
 35 40 45
 Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Arg Ser Gly Ser Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Ser Arg Asp Gly Ser Arg
 65 70 75 80
 His Pro Arg Ser His His Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala
 85 90 95

Glu Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr His His Ala Glu Asn Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser
 130 135 140
 Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly His
 145 150 155 160
 Arg Gly Ser Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His
 165 170
 <210> 6
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 6
 Asp Gly Ser Arg His Ser Trp Ser His His His Glu Ala Ser Thr Gln
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Ser Gly Gln Gly Gln Ser Ala Gly
 20 25 30
 Pro Arg Thr Ser Arg Asn Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp
 35 40 45
 Ser Gln Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn His Arg Gly Ser Ala Gln Glu Gln Ser Arg Asp Gly Ser Arg
 65 70 75 80
 His Pro Thr Ser His His Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala
 85 90 95
 Glu Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr His His Ala Glu Asn Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser
 130 135 140
 Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly His
 145 150 155 160
 Arg Gly Ser Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His
 165 170
 <210> 7
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 7
 Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Pro Ser Thr Arg
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Glu Ser Ala Gly
 20 25 30

[0004]

Ser Lys Thr Ser Arg Arg Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Arg Asp
 35 40 45
 Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Arg Ser Glu Ser Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn His Tyr Gly Ser Ala Arg Glu Gln Ser Arg His Gly Ser Arg
 65 70 75 80
 Asn Pro Arg Ser His Gln Glu Asp Arg Ala Ser His Gly His Ser Ala
 85 90 95
 Glu Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Ala Glu Thr Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gln Ala Ala Ser Ser Gln Glu Gln Ala Arg Ser Ser Pro His Glu
 115 120 125
 Arg His Gly Ser Arg His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Thr Asp Ser
 130 135 140
 Gly Thr Gly Arg Arg Gln Asp Ser Ser Val Val Gly Asp Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Arg Gly Ser Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His
 165 170

<210> 8

<211> 174

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

[0005]

Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ala Ser Trp
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Glu Gln Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Arg Thr Ser Arg His Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp
 35 40 45
 Ser Glu Arg His Ser Asp Asp Ser Glu Arg Leu Ser Gly Ser Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn His His Gly Ser Ser Arg Glu Gln Ser Arg Asp Gly Ser Arg
 65 70 75 80
 His Pro Gly Phe His Gln Glu Asp Arg Ala Ser His Gly His Ser Ala
 85 90 95
 Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr His His Thr Glu Ser Ser Ser His
 100 105 110
 Gly Gln Ala Val Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Pro Gly Glu
 115 120 125
 Arg His Gly Ser Arg His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser
 130 135 140
 Gly Ile Gly His Arg Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly His
 145 150 155 160
 Arg Gly Ser Ser Gly Ser Gln Val Thr Asn Ser Glu Gly His
 165 170

<210> 9

<211> 174
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 9
 Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser Ser His
 1 5 10 15
 Ala Asp Ile Ser Arg His Ser Gln Ala Gly Gln Gly Gln Ser Glu Gly
 20 25 30
 Ser Arg Thr Ser Arg Arg Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp
 35 40 45
 Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn His Arg Gly Ser Ala Gln Glu Gln Ser Arg His Gly Ser Arg
 65 70 75 80
 His Pro Arg Ser His His Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala
 85 90 95
 Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Pro His Ala Glu Thr Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Pro Gly Glu
 115 120 125
 Arg His Gly Ser Arg His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser
 130 135 140
 Gly Ile Pro Arg Arg Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly His
 145 150 155 160
 Trp Gly Ser Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His
 165 170
 <210> 10
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 10
 Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser Thr His
 1 5 10 15
 Ala Asp Ile Ser Arg His Ser Gln Ala Val Gln Gly Gln Ser Glu Gly
 20 25 30
 Ser Arg Arg Ser Arg Arg Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp
 35 40 45
 Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Leu Arg Asp Gly Ser Arg
 65 70 75 80
 His Pro Arg Ser His Gln Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala
 85 90 95
 Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Thr Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala Gly Glu

[0006]

	115		120		125
	Arg His Gly Ser His His	Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser			
	130		135		140
	Gly Ile Gly His Gly Gln	Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly His			
	145		150		160
	Arg Gly Tyr Ser Gly Ser	Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His			
		165		170	
<210>	11				
<211>	174				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	11				
	Asp Ser Ser Arg His Ser	Val Ser Arg His His Glu Ala Ser Thr His			
	1		5		10
	Ala Asp Ile Ser Arg His	Ser Gln Ala Val Gln Gly Gln Ser Glu Gly			
		20		25	
	Ser Arg Arg Ser Arg Arg	Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp			
		35		40	
	Ser Glu Gly His Ser Glu	Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser Ala Ser			
		50		55	
	Arg Asn His Arg Gly Ser	Val Gln Glu Gln Ser Arg His Gly His Arg			
		65		70	
[0007]	His Pro Arg Ser His His	Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala			
		85		90	
	Asp Arg Ser Arg Gln Ser	Gly Thr Arg His Ala Glu Thr Ser Ser Gly			
		100		105	
	Gly Gln Ala Ala Ser Ser	His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Pro Gly Glu			
		115		120	
	Arg His Gly Ser Arg His	Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser			
		130		135	
	Gly Ile Pro Arg Gly Gln	Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Arg His			
		145		150	
	Trp Gly Ser Ser Gly Ser	Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His			
		165		170	
<210>	12				
<211>	174				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	12				
	Asp Gly Ser Arg His Ser	Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser Ser Arg			
	1		5		10
	Ala Asp Ser Ser Gly His	Ser Gln Val Gly Gln Gly Gln Ser Glu Gly			
		20		25	
	Pro Arg Thr Ser Arg Asn	Trp Gly Ser Ser Phe Ser Gln Asp Ser Asp			
		35		40	
	Ser Gln Gly His Ser Glu	Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser Ala Ser			

```

      50              55              60
Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Leu Arg Asp Gly Ser Arg
65              70              75              80
His Pro Arg Ser His Gln Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala
      85              90              95
Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Thr Ser Ser Gly
      100             105             110
Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala Gly Glu
      115             120             125
Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser
      130             135             140
Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly His
145             150             155             160
Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His
      165             170

<210> 13
<211> 175
<212> PRT
<213> 智人
<400> 13
Asp Gly Thr Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser Ser Gln
1              5              10              15
Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Gln Ser Ser Gly
[0008]      20              25              30
Pro Arg Thr Ser Arg Asn Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp
      35              40              45
Ser Gln Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser Ala Ser
      50              55              60
Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Ser Arg Asp Gly Ser Arg
65              70              75              80
His Pro Arg Ser His His Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala
      85              90              95
Asp Ser Ser Arg Lys Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Asn Ser Ser Ser
      100             105             110
Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala Gly Glu
      115             120             125
Arg His Gly Ser Arg His Gln Leu Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His
      130             135             140
Ser Gly Thr Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly
145             150             155             160
His Arg Gly Ser Ser Gly Ser Gln Ala Thr Asp Ser Glu Gly His
      165             170             175

<210> 14
<211> 175
<212> PRT
<213> 智人

```

<400> 14
 Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Gln Ser Ser Gly
 20 25 30
 Pro Arg Thr Ser Arg Asn Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Ser Asp
 35 40 45
 Ser Gln Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn His Leu Gly Ser Ala Trp Glu Gln Ser Arg Asp Gly Ser Arg
 65 70 75 80
 His Pro Gly Ser His His Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala
 85 90 95
 Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Glu Ser Ser Ser Arg
 100 105 110
 Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg His Gly Ser His His Gln Leu Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His
 130 135 140
 Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser Gly
 145 150 155 160
 His Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His
 165 170 175

[0009]

<210> 15
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 15
 Met Gln Ser Gly Glu Ser Ser Gly Arg Ser Arg Ser Phe Leu Tyr Gln
 1 5 10 15
 Val Ser Ser His Glu Gln Ser Glu Ser Thr His Gly Gln Thr Ala Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Ser Arg His Glu Gln Ala Arg Asn Ser
 35 40 45
 Ser Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His
 50 55 60
 Pro Gly Ser Ser Arg Gly Gly Arg Gln Gly Ser Tyr His Glu Gln Ser
 65 70 75 80
 Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Tyr His His Ser His Thr Thr Pro
 85 90 95
 Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly Gln Ser Gly Pro Arg Ser Ala
 100 105 110
 Ser Arg Gln Thr Arg Asn Glu Glu Gln Ser Gly Asp Gly Ser Arg His
 115 120 125

Ser Gly Ser Arg His His Glu Pro Ser Thr Arg Ala Gly Ser Ser Arg
 130 135 140
 His Ser Gln Val Gly Gln Gly Glu Ser Ala Gly Ser Lys Thr Ser Arg
 145 150 155 160
 Arg Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Arg Asp Ser Glu Gly His Ser
 165 170 175
 Glu Asp Ser Glu Arg Arg Ser Glu Ser Ala Ser Arg Asn His Tyr Gly
 180 185 190
 Ser Ala Arg Glu Gln Ser Arg His Gly Ser Arg Asn Pro Arg Ser His
 195 200 205
 Gln Glu Asp Arg Ala Ser His Gly His Ser Ala Glu Ser Ser Arg Gln
 210 215 220
 Ser Gly Thr Arg His Ala Glu Thr Ser Ser Gly Gly Gln Ala Ala Ser
 225 230 235 240
 Ser Gln Glu Gly Ala Arg Ser Ser Pro Gly Glu Arg His Gly Ser Arg
 245 250 255
 His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Thr Asp Ser Gly Thr Gly Arg Arg
 260 265 270
 Gln Asp Ser Ser Val Val Gly Asp Ser Gly Asn Arg Gly Ser Ser Gly
 275 280 285
 Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His Ser Glu Glu Ser Asp Thr Gln
 290 295 300
 Ser Val Ser Ala His Gly Gln Ala Gly Pro His Gln Gln Ser His Gln
 305 310 315 320
 Glu Ser Thr Arg Gly Gln Ser Gly Glu Arg Ser Gly Arg Ser Gly Ser
 325 330 335
 Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr His Glu Gln Ser Glu Ser Arg Met Arg
 340 345 350
 Arg Met Arg Arg Met Arg Arg
 355
 <210> 16
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 16
 Met Gln Ser Gly Glu Ser Ser Gly Arg Ser Arg Ser Phe Leu Tyr Gln
 1 5 10 15
 Val Ser Ser His Glu Gln Ser Glu Ser Thr His Gly Gln Thr Ala Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Ser Arg His Glu Gln Ala Arg Asn Ser
 35 40 45
 Ser Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His
 50 55 60
 Pro Gly Ser Ser Arg Gly Gly Arg Gln Gly Ser Tyr His Glu Gln Ser

65		70		75		80
Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Tyr His His Ser His Thr Thr Pro						
		85		90		95
Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly Gln Ser Gly Pro Arg Ser Ala						
		100		105		110
Ser Arg Gln Thr Arg Asn Glu Glu Gln Ser Gly Asp Gly Ser Arg His						
		115		120		125
Ser Gly Ser Arg His His Glu Pro Ser Thr Arg Ala Gly Ser Ser Arg						
		130		135		140
His Ser Gln Val Gly Gln Gly Glu Ser Ala Gly Ser Lys Thr Ser Arg						
145		150		155		160
Arg Gln Gly Ser Ser Val Ser Gln Asp Arg Asp Ser Glu Gly His Ser						
		165		170		175
Glu Asp Ser Glu Arg Arg Ser Glu Ser Ala Ser Arg Asn His Tyr Gly						
		180		185		190
Ser Ala Arg Glu Gln Ser Arg His Gly Ser Arg Asn Pro Arg Ser His						
		195		200		205
Gln Glu Asp Arg Ala Ser His Gly His Ser Ala Glu Ser Ser Arg Gln						
		210		215		220
Ser Gly Thr Arg His Ala Glu Thr Ser Ser Gly Gly Gln Ala Ala Ser						
225		230		235		240
Ser Gln Glu Gln Ala Arg Ser Ser Pro Gly Glu Arg His Gly Ser Arg						
		245		250		255
His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Thr Asp Ser Gly Thr Gly Arg Arg						
		260		265		270
Gln Asp Ser Ser Val Val Gly Asp Ser Gly Asn Arg Gly Ser Ser Gly						
		275		280		285
Ser Gln Ala Ser Asp Ser Glu Gly His Ser Glu Glu Ser Asp Thr Gln						
		290		295		300
Ser Val Ser Ala His Gly Gln Ala Gly Pro His Gln Gln Ser His Gln						
305		310		315		320
Glu Ser Thr Arg Gly Gln Ser Gly Glu Arg Ser Gly Arg Ser Gly Ser						
		325		330		335
Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr His Glu Gln Arg Met Arg Arg Met Arg						
		340		345		350
Arg Met Arg Arg						
		355				

[0011]

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知的描述: 16S 序列
 <400> 17
 gaagtgcggt tcaacaccct ccg
 <210> 18

	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 18	
	gatacagaga tgcac	15
	<210> 19	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 19	
	gatacagtga tgcac	15
	<210> 20	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 20	
[0012]	gatacagtag atgca	15
	<210> 21	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 21	
	taccagattt acata	15
	<210> 22	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 22	
	taccagatta catac	15
	<210> 23	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 23	

	caggtaggat aata	14
	<210> 24	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 24	
	caggtaggat aatta	15
	<210> 25	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 25	
	caggtaggat aaata	15
	<210> 26	
	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
[0013]	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 26	
	caggtaggaa ata	13
	<210> 27	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 27	
	gattacagat taca	14
	<210> 28	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: 16S 序列	
	<400> 28	
	gattacagat ttaca	15
	<210> 29	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	

	<223> 未知的描述: 16S 序列	
[0014]	<400> 29	
	gattacagaa ttaca	15

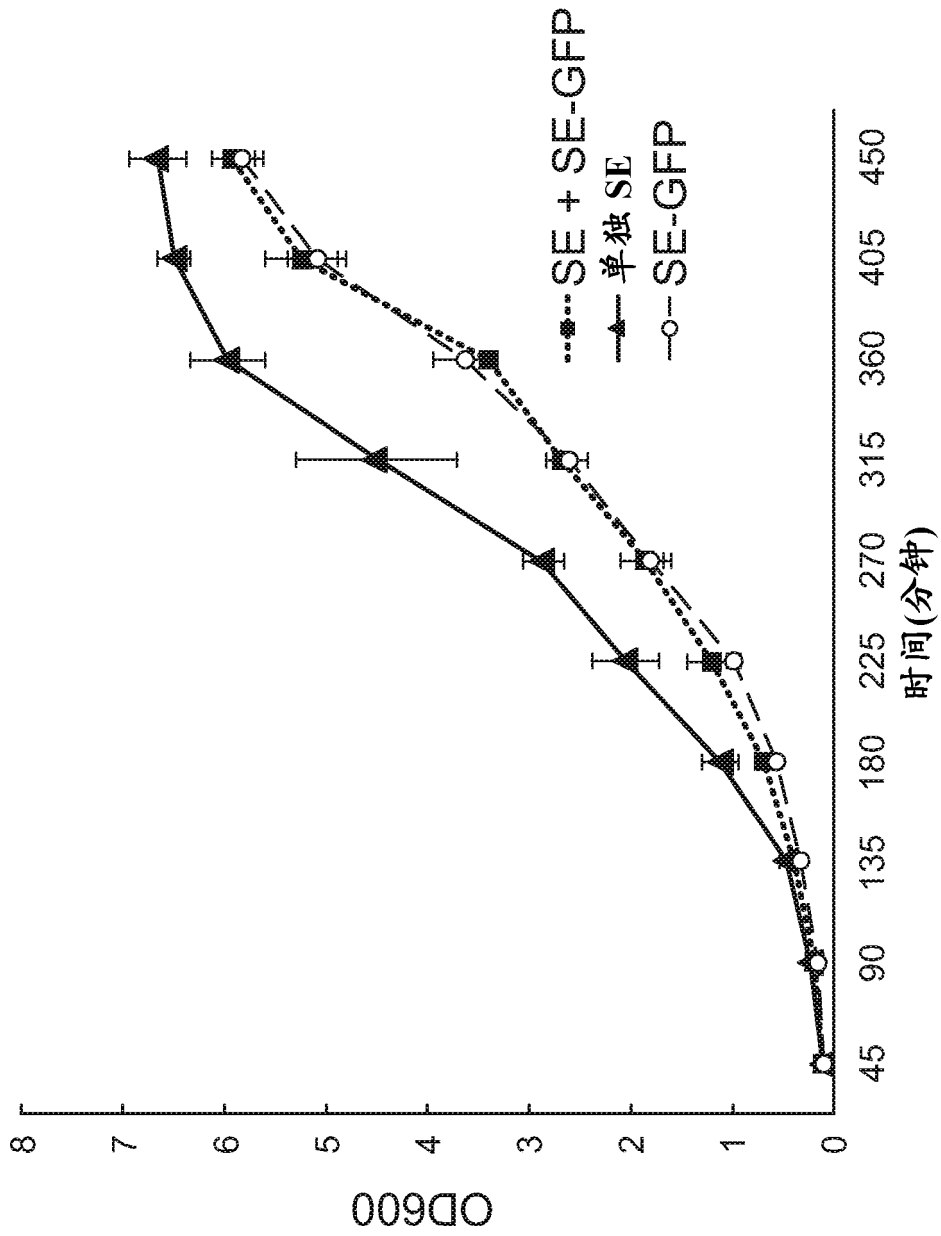


图 1

单独 SE 空载体

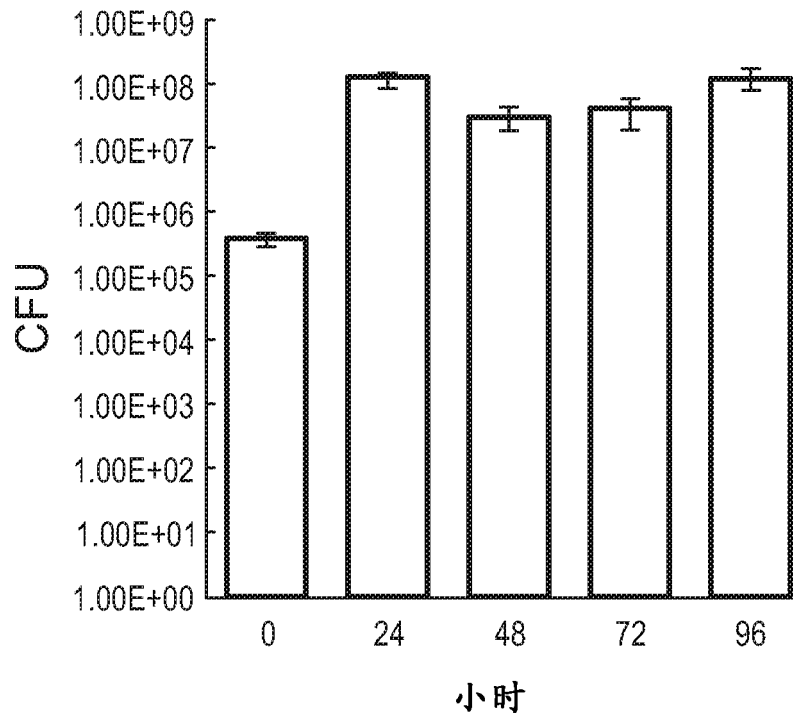


图 2A

单独 SE-GFP

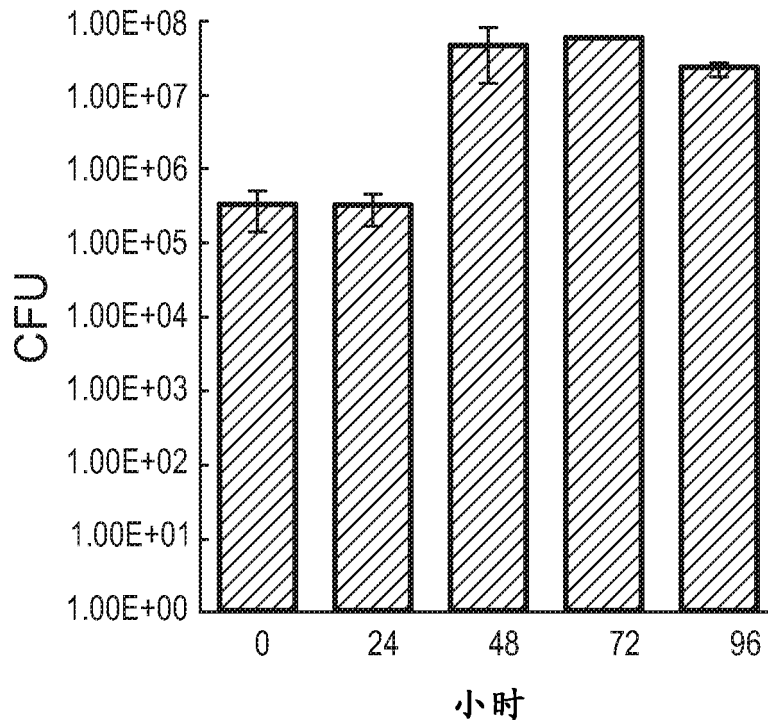


图 2B

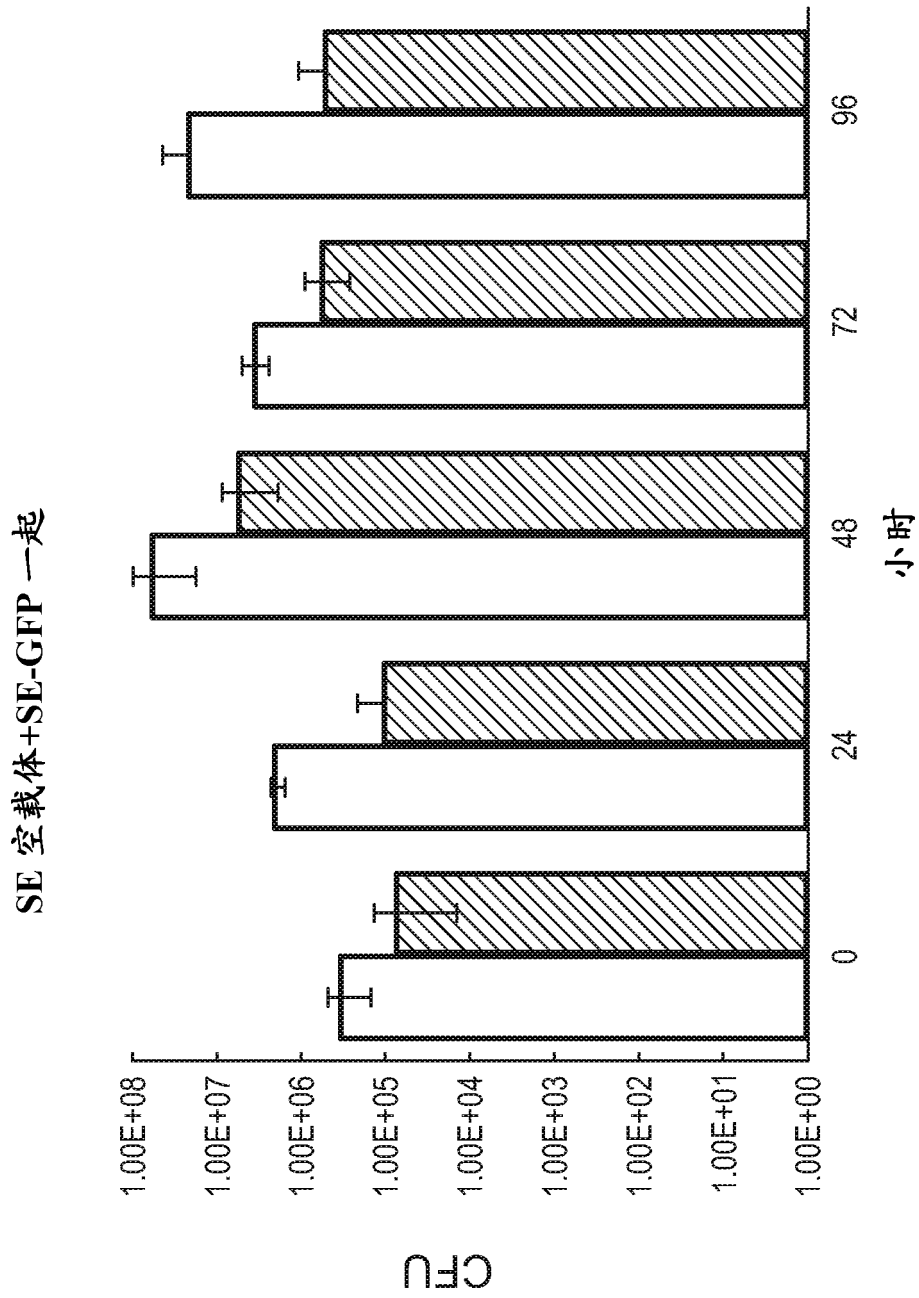


图 2C

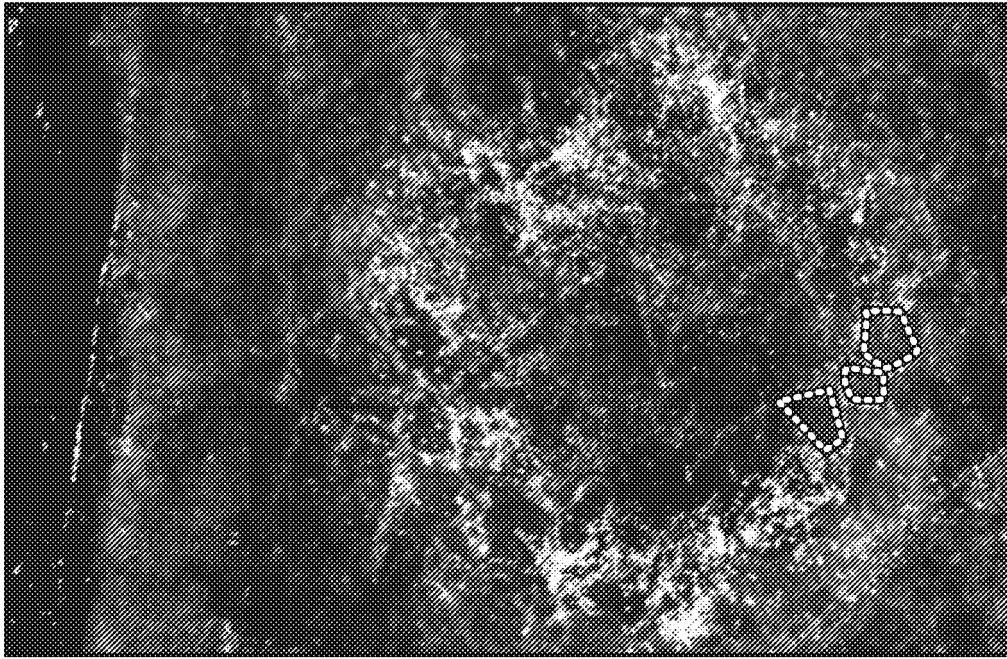


图 3A

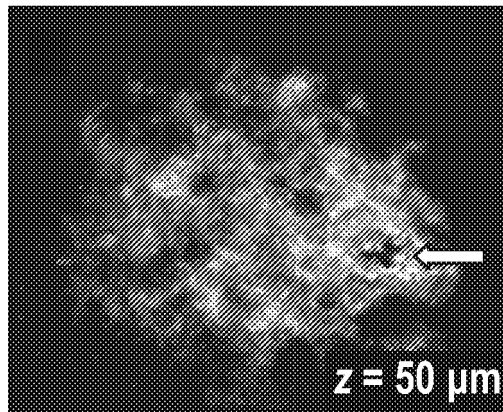


图 3B

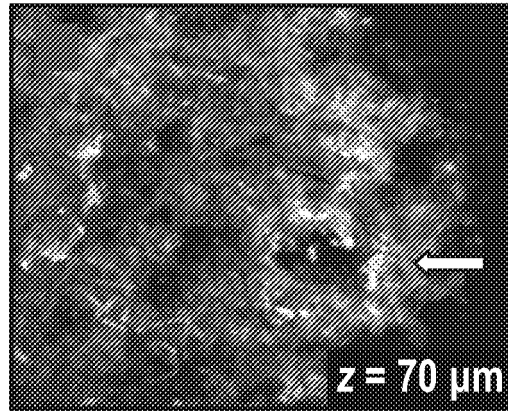


图 3C

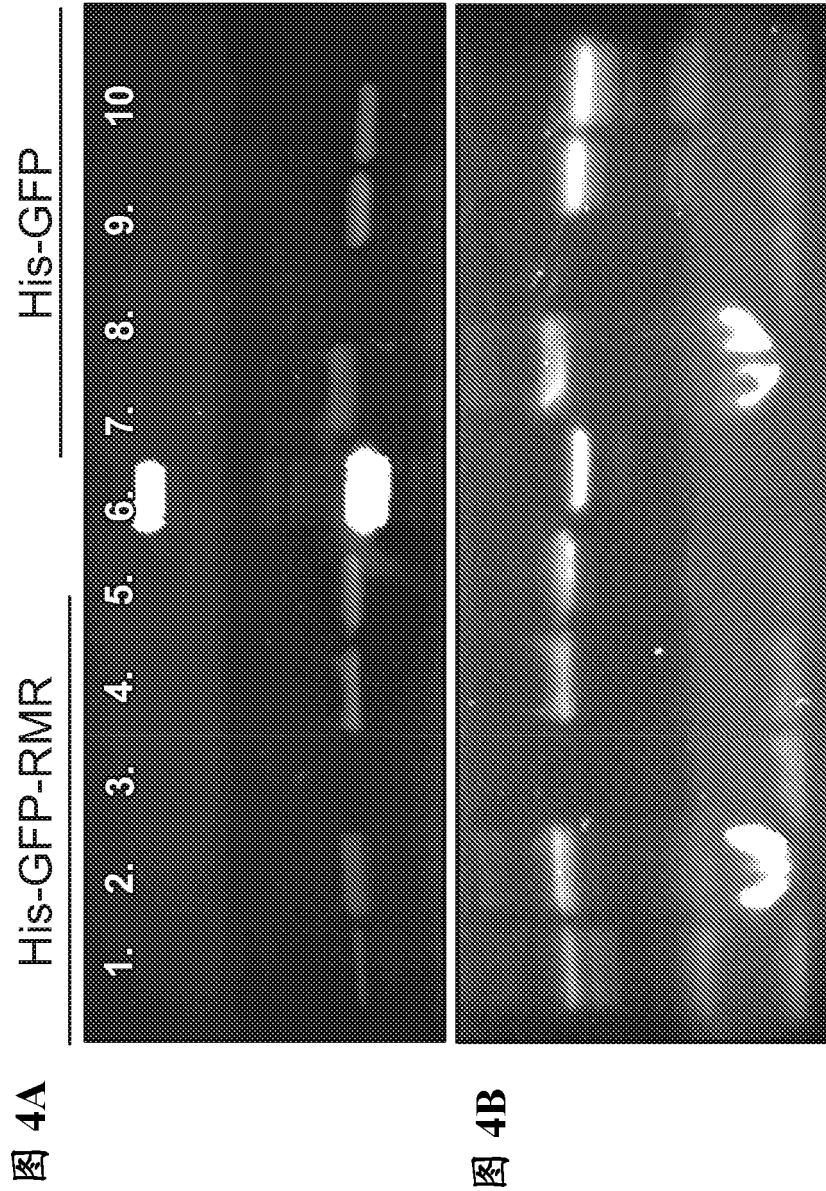


图 4A

图 4B

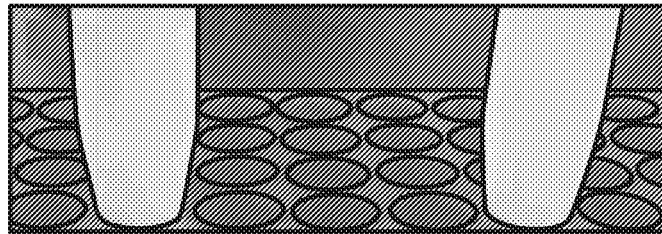


图 4C

图 5A

图 5B

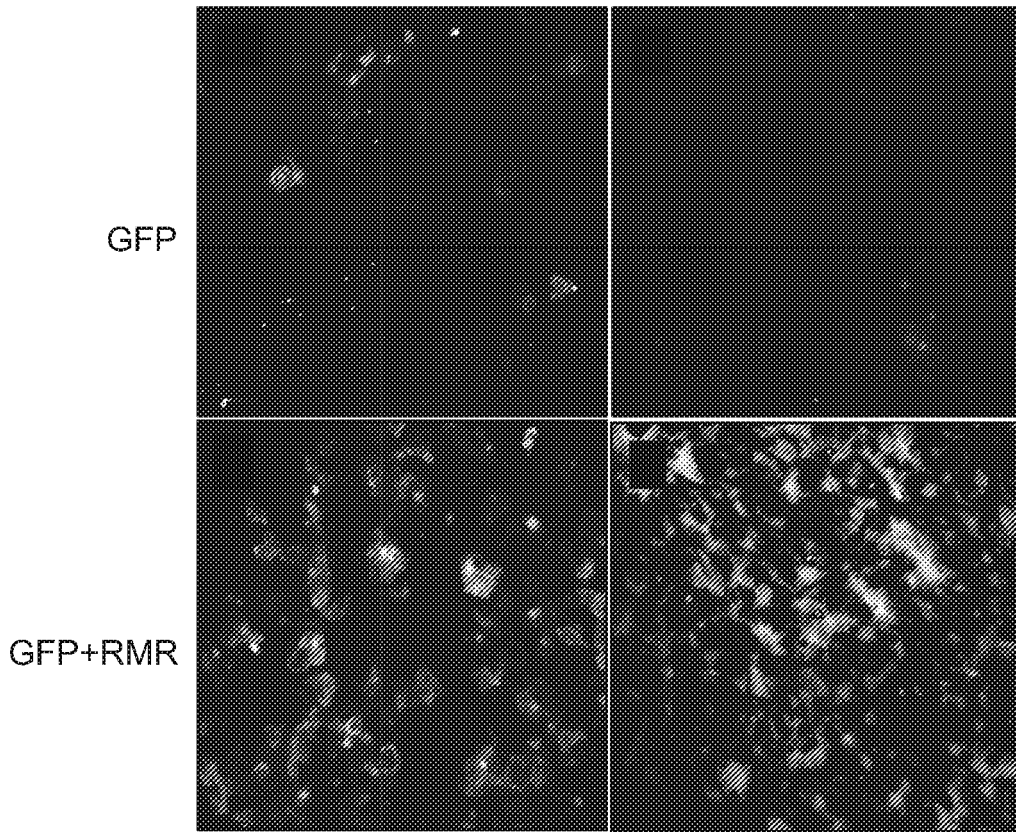


图 5C

图 5D

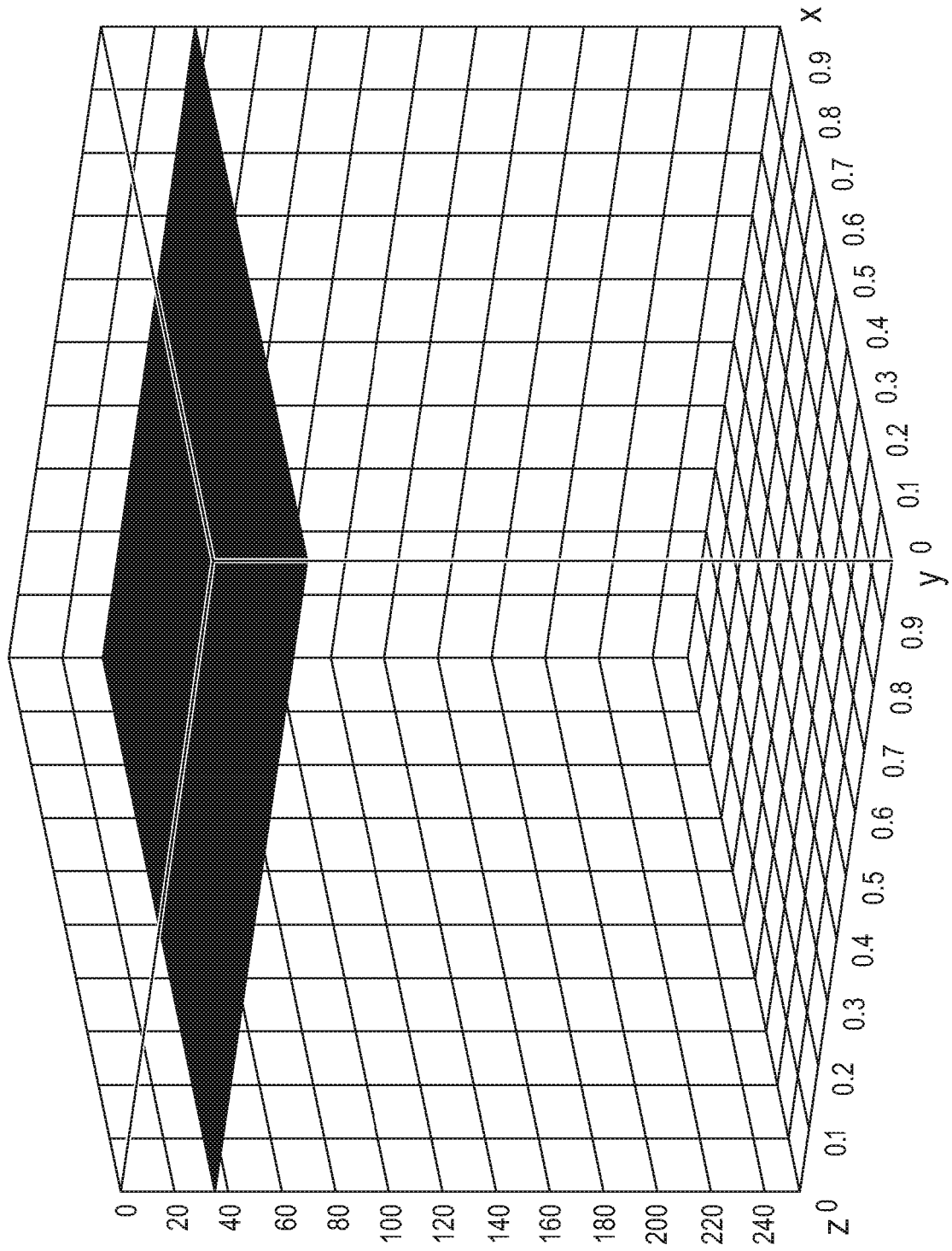


图 5E

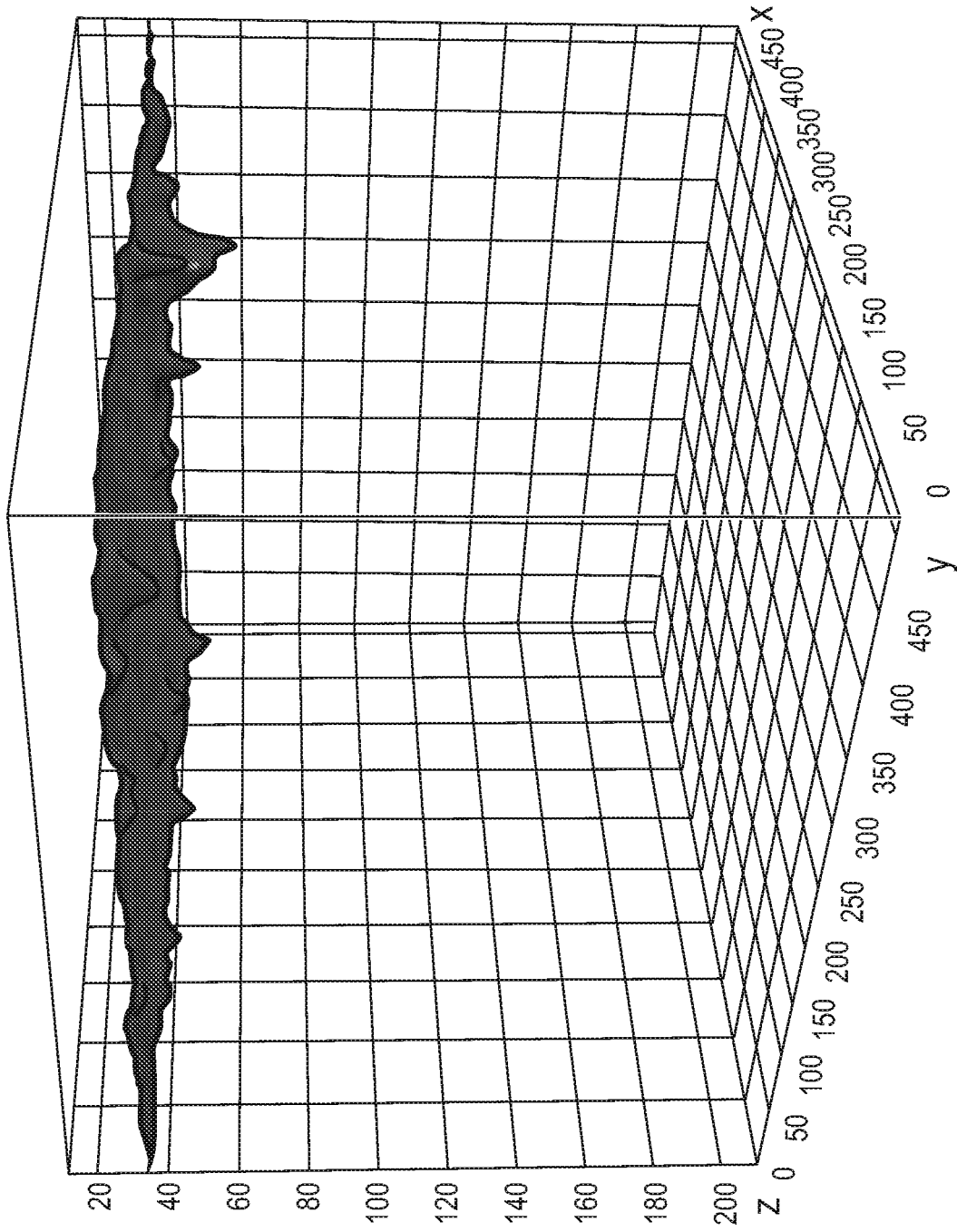


图 5F

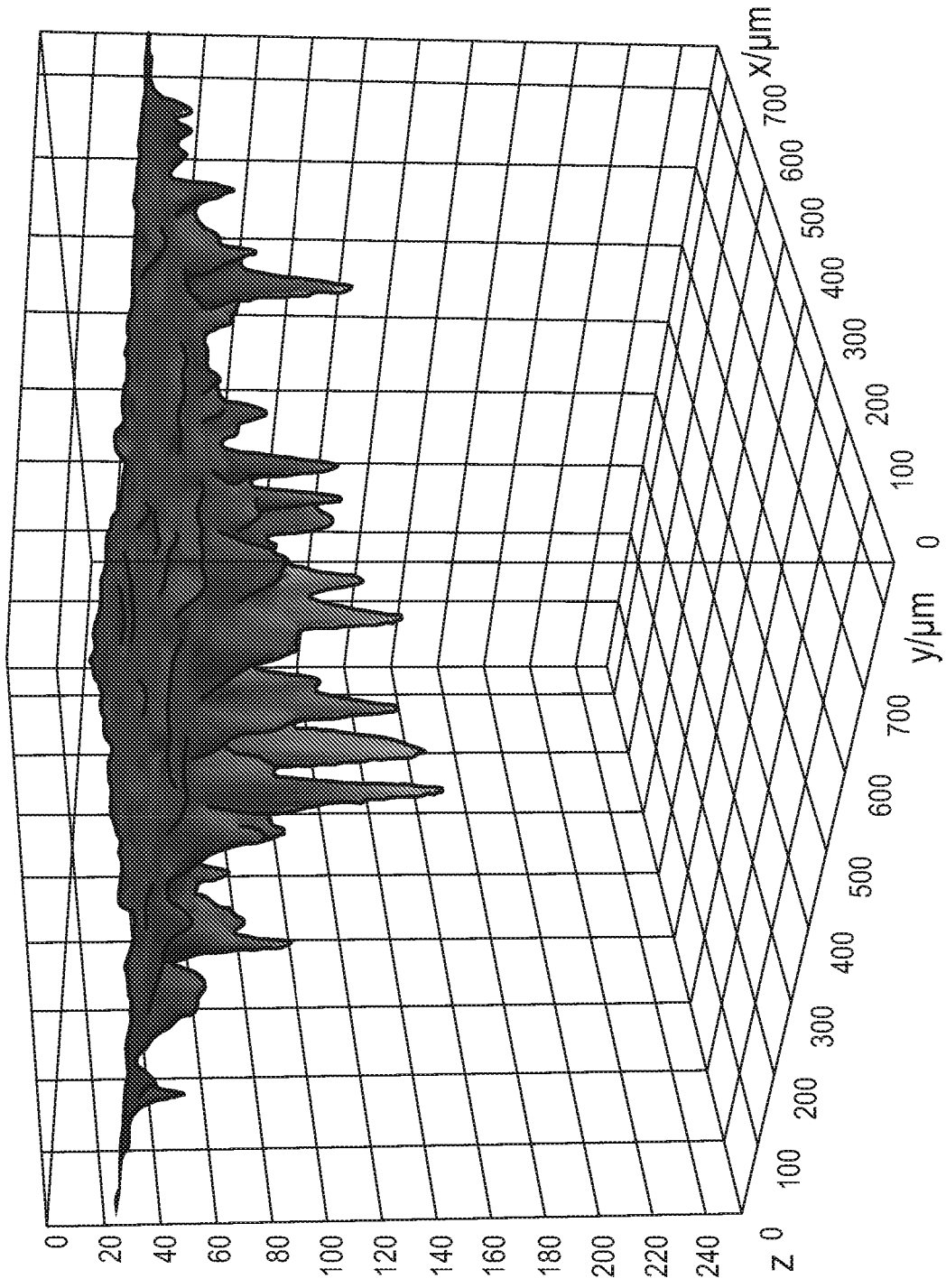


图 5G

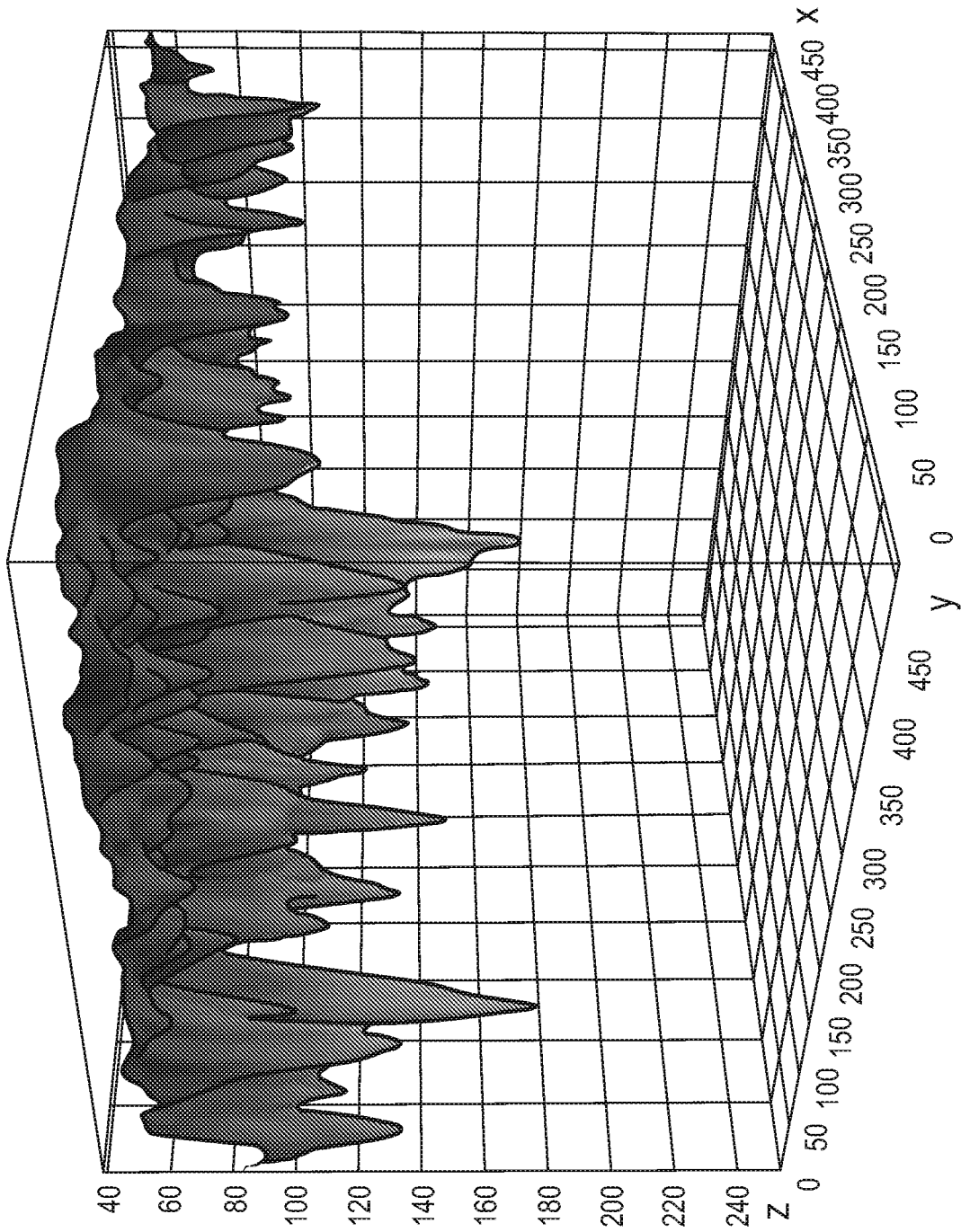


图 5H

图 5K

GFP

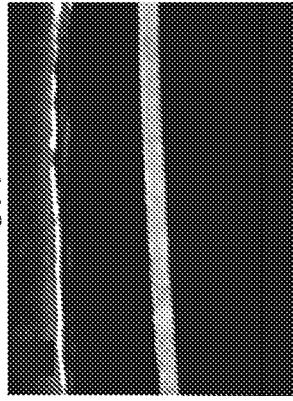


图 5J

GFP+RMR

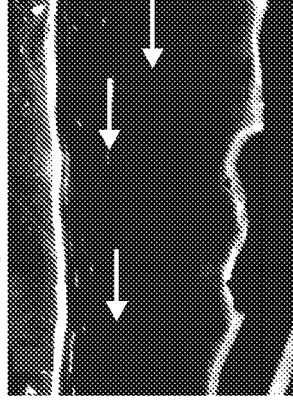


图 5I

媒介物

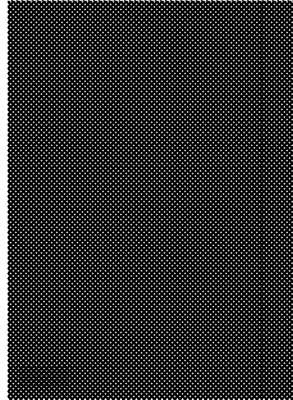


图 5N

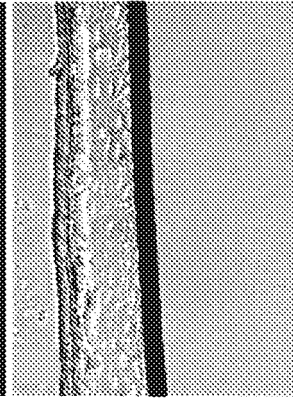
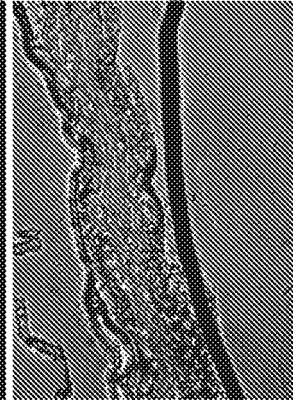


图 5M



图 5L



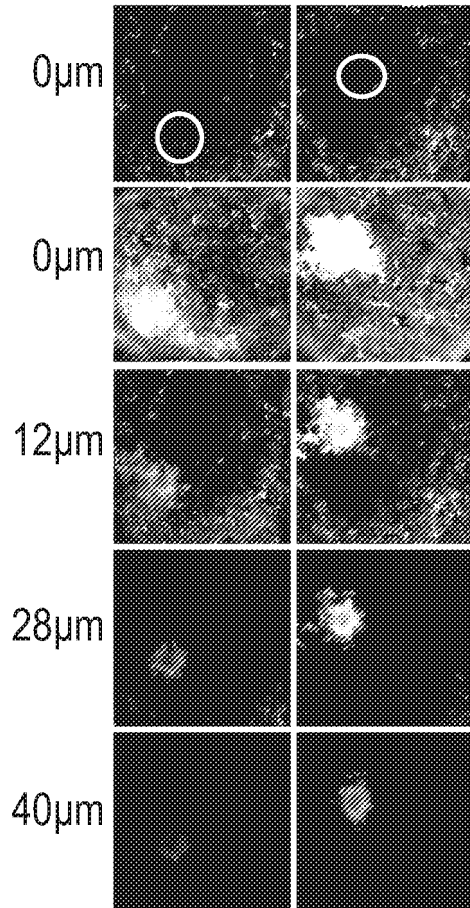


图 50

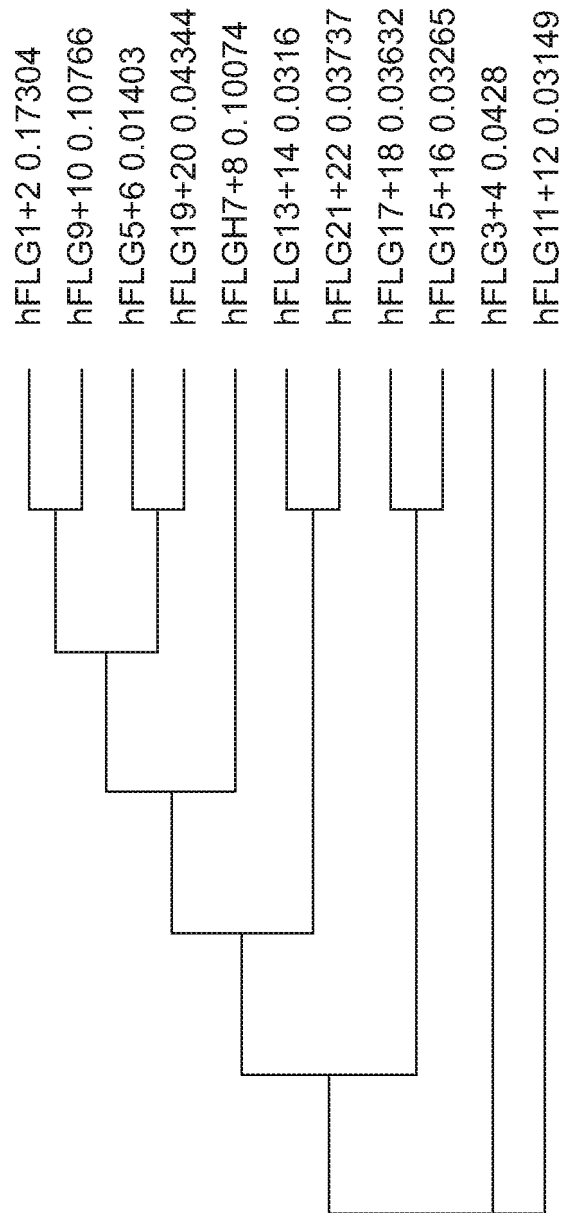


图 6A

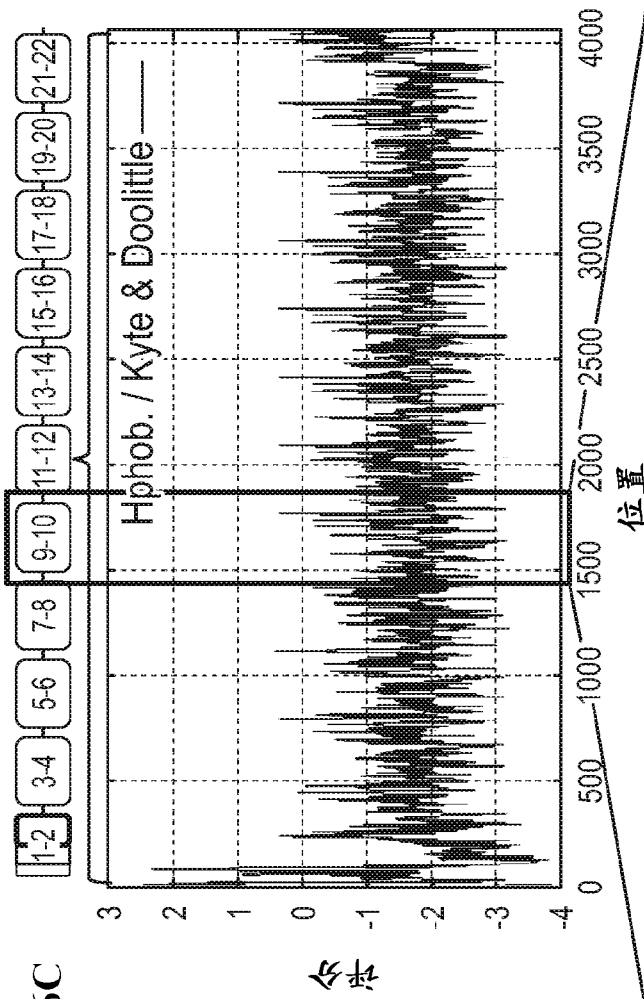


图 6C

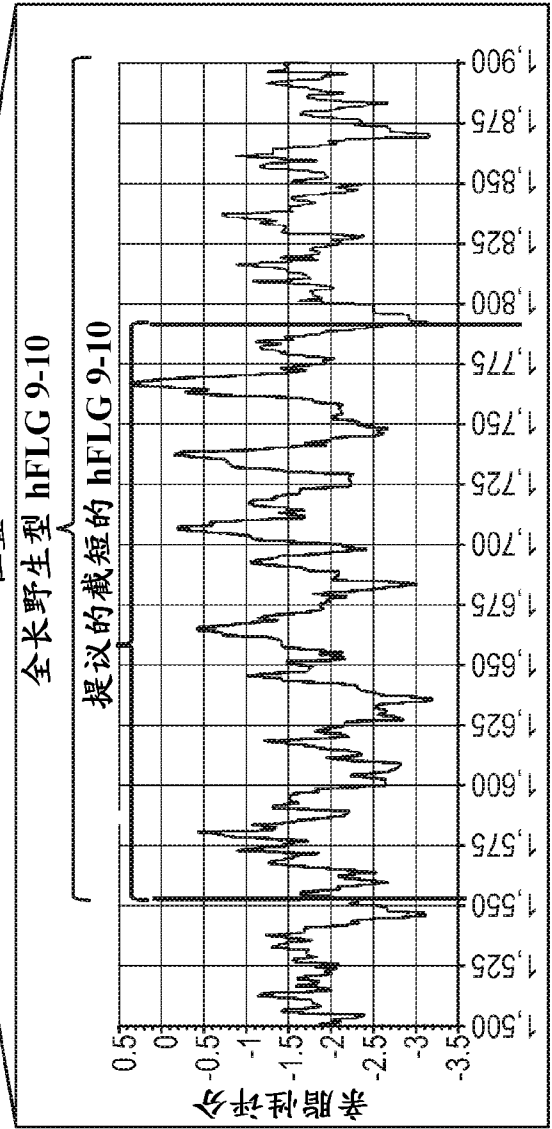


图 6D

1450	1460	1470	1480	1490	1440
FLYQVSSHEQ	SE THGQTAP	STGGRQGSRH	EQARNSSRHS	ASQDGQDTIR	MQ SGESSGRSRS
1510	1520	1530	1540	1550	1500
QGSYHEQSD	RSGHSGYHHS	HTTPQGRSDA	SHGQSGPRSA	SRQTRNEEQS	GHPGSSRGGR
1570	1580	1590	1600	1610	1560
HHEPSTRAGS	SRHSQVGQGE	SAGSKTSRRQ	GSSVSQDRDS	EGHSEDSERR	GDGSRHSGSR
1630	1640	1650	1660	1670	1620
SAREQSRHGS	RNPRSHQEDR	ASHGSHAESS	RQSGTRHAET	SSGGQAASSQ	SESASRNHYG
1690	1700	1710	1720	1730	1680
HGSRHQQSAD	SSTDSGTGRR	QDSSVVGDSG	NRGSSGSQAS	DSEGHSEESD	EGARSSPGER
1750	1760	1770			1740
GPHQOSHQES	TRGQSGERSG	RS GSFLYQVS	THEQSES RMR	RMRRMRR	TQSVSAHGQA

图 6E

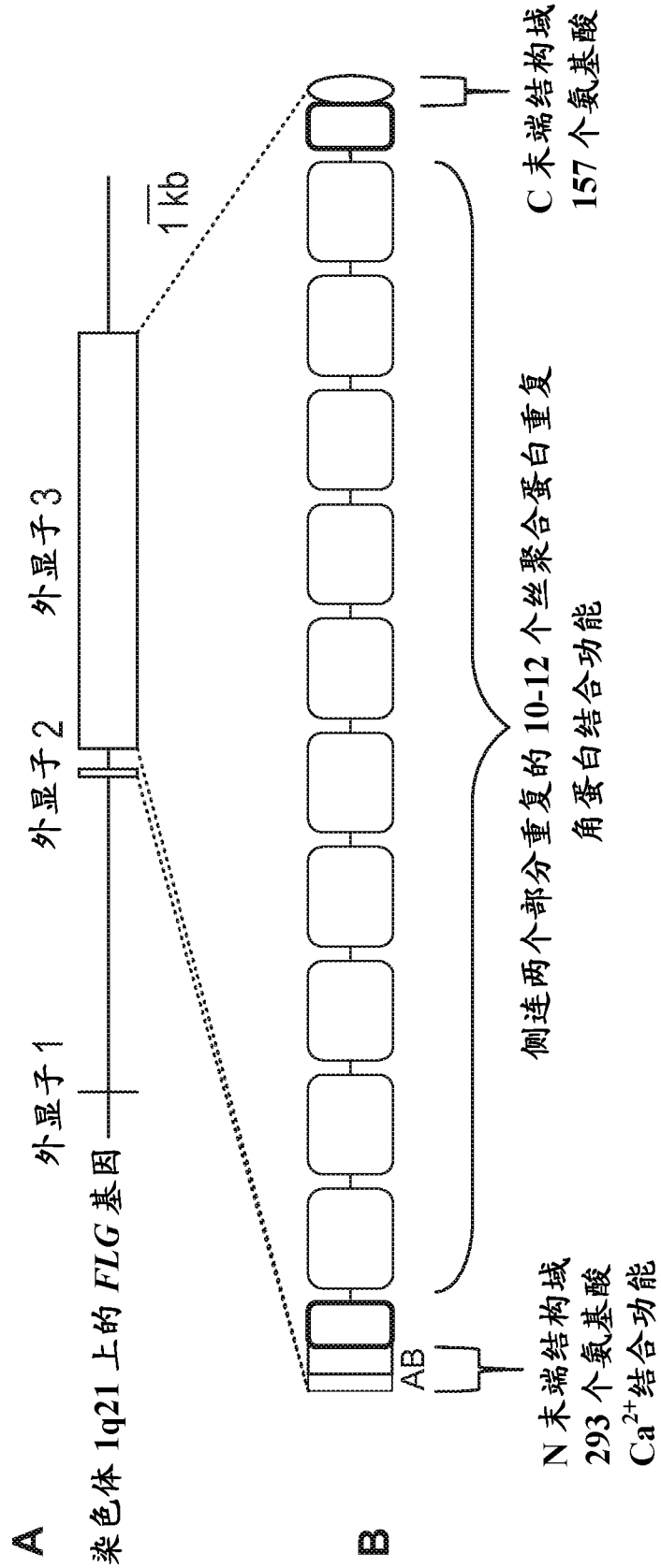


图 6F

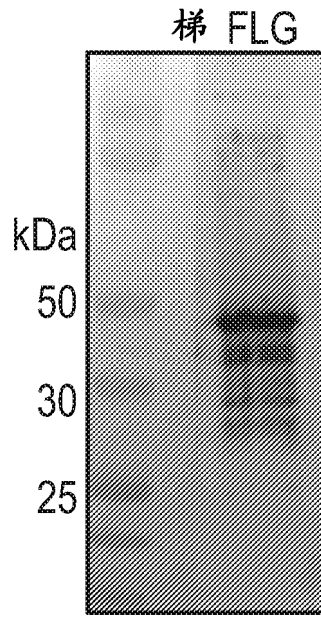


图 7A

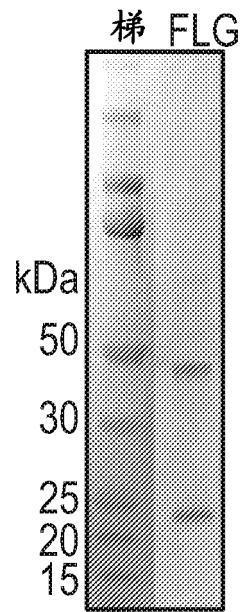


图 7B

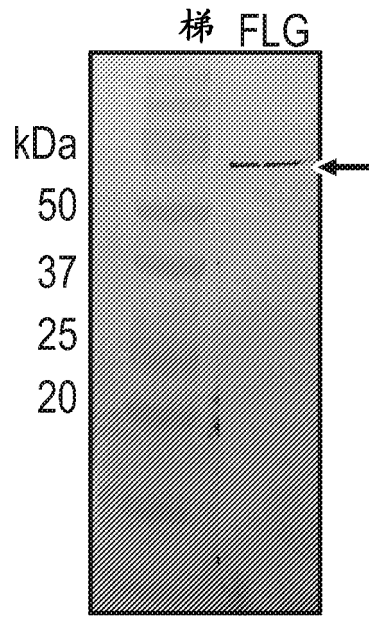


图 7C

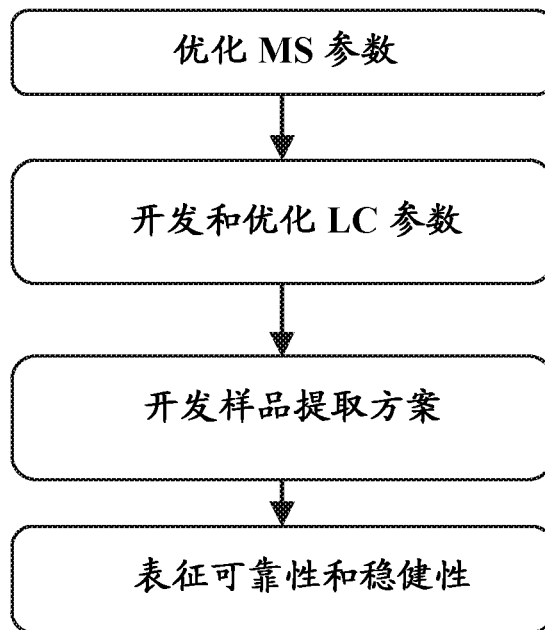


图 7D

MQSGESSGRSRSFLYQVSSHEQSESTHGQTAPSTGGRRQGSRHEQARNSSRRHSASQDGGQDTIRGHP
 GSSRGGRRQGSYHEQSVDRSGHSGYHSHHTTPOGRSDASHGQSGPERSASRQTRNEEQSGDGSRRHSC
 SRHHEPSTRAGSSRRHSQVQGESAGSKTSRRQGSVSDRDSECHSEDSERSEASRNHYGSAR
 EOSRHGSRNPRSHQEDRASHGHSAESSROSGTRHAETSSGGOAASSOEOARSSEGERHGSRRHOOS
 ADSSDTSGTGRRODSSVVGDGNGRGSSSGQASDSEGHSESDTQSVSAHGQAGPHQOSHQESTRG
 QGERSGRSGSFLYQVSTHEQRMRRMRR

图 7E

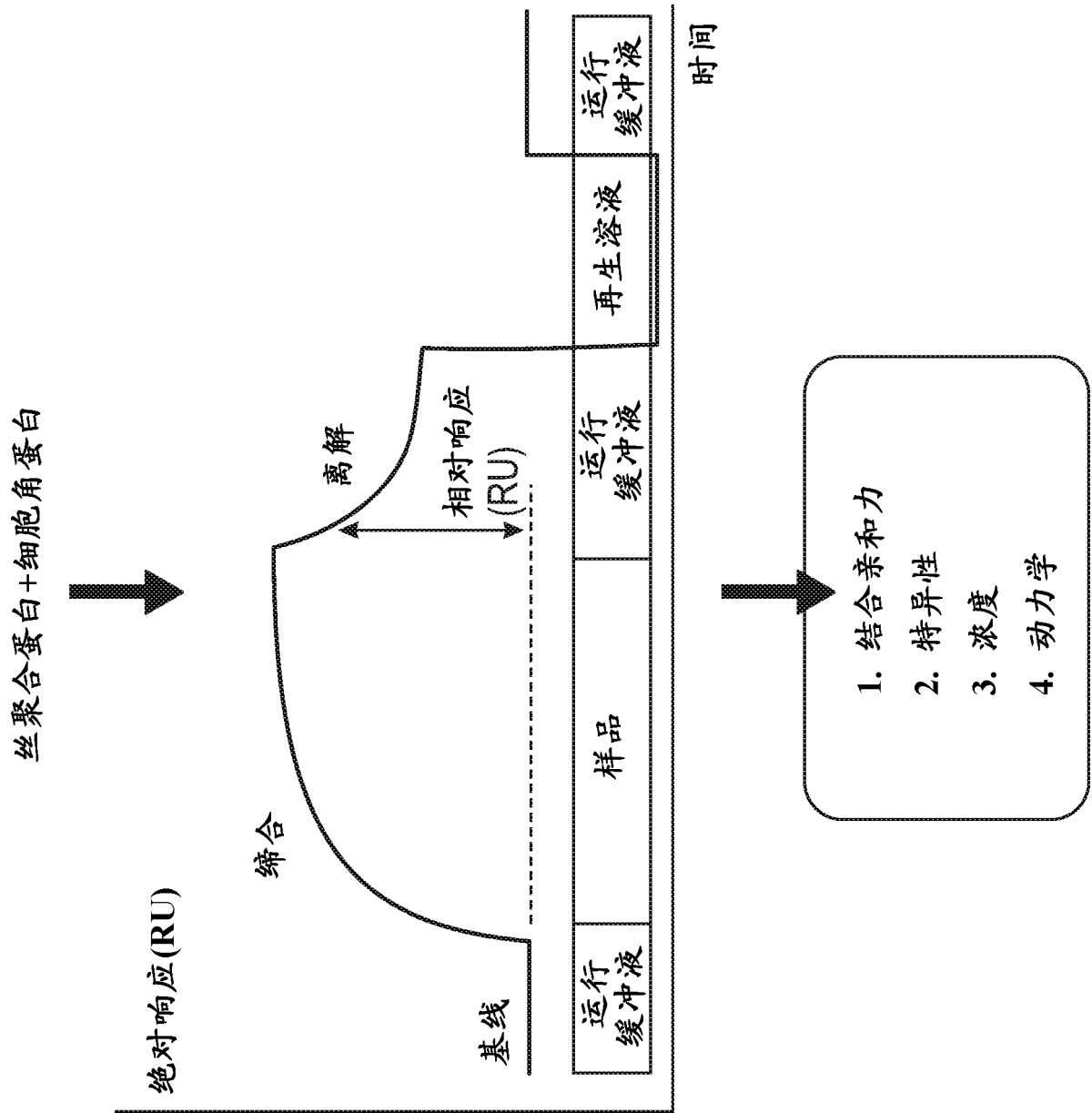


图 8

尿刊酸

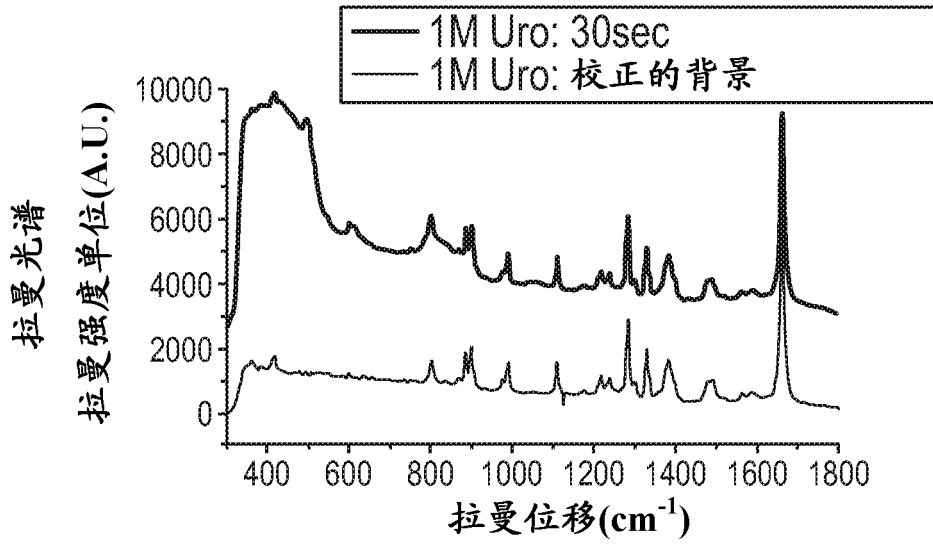


图 9A

焦谷氨酸

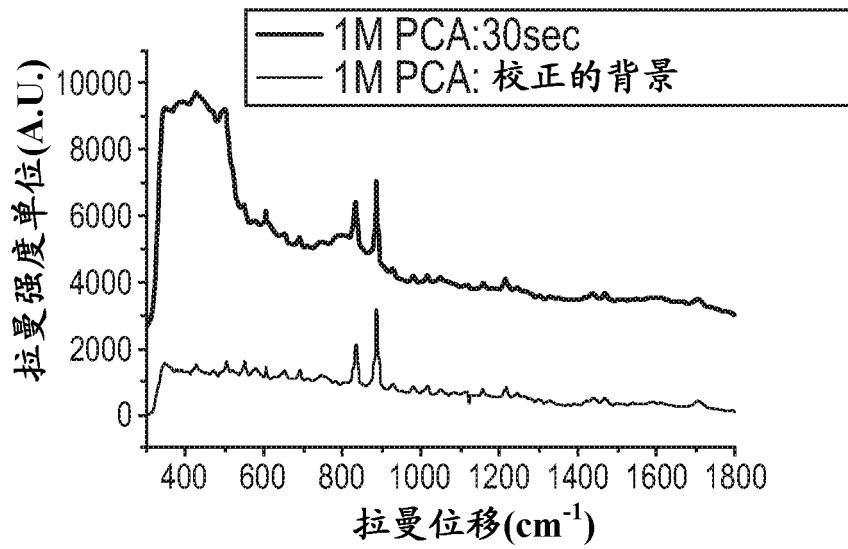


图 9B

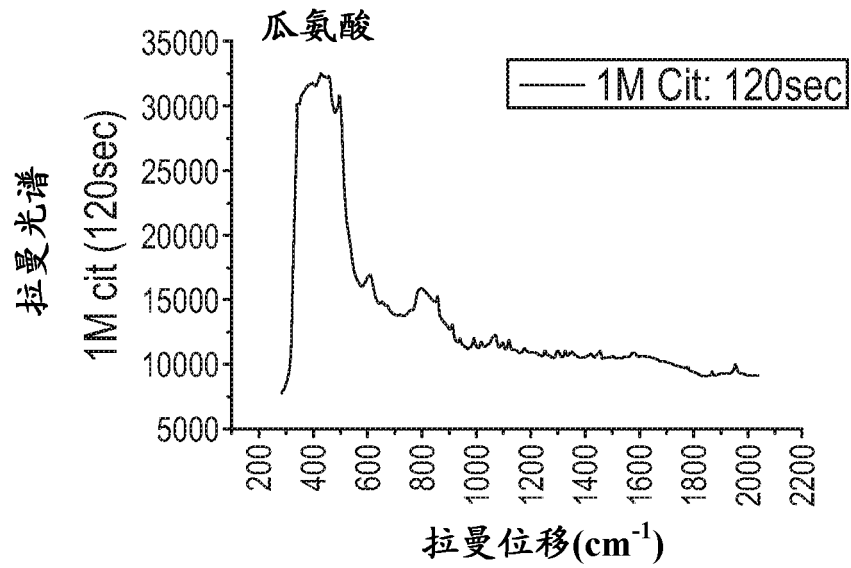


图 9C

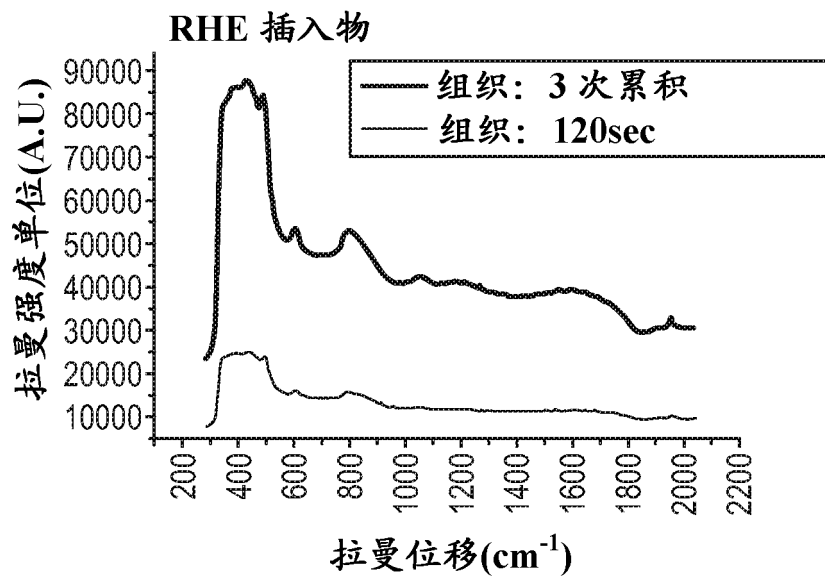
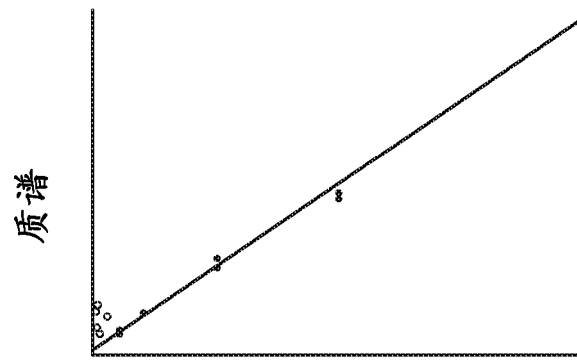
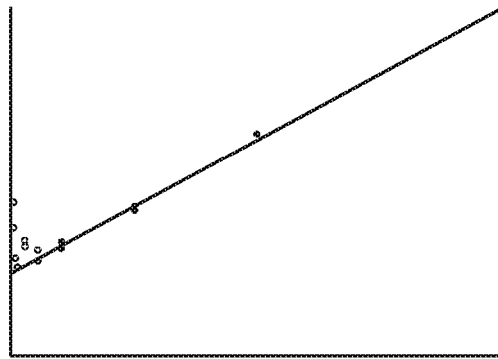


图 9D



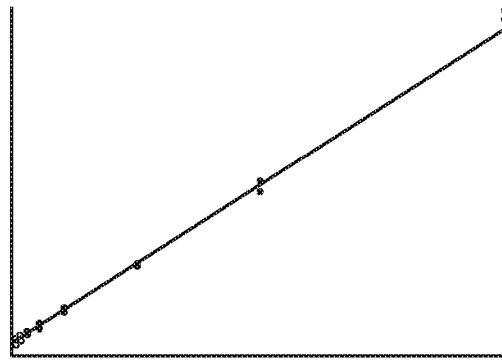
尿酸
测试的范围: 0.01-10 ng/ml
LOQ: 0.5 ng/ml

图 9E



焦谷氨酸
测试的范围: 0.01-10 ng/ml
LOQ: 1 ng/ml

图 9F



瓜氨酸

测试的范围: 0.01-10 ng/ml

LOQ: 0.25 ng/ml

图 9G

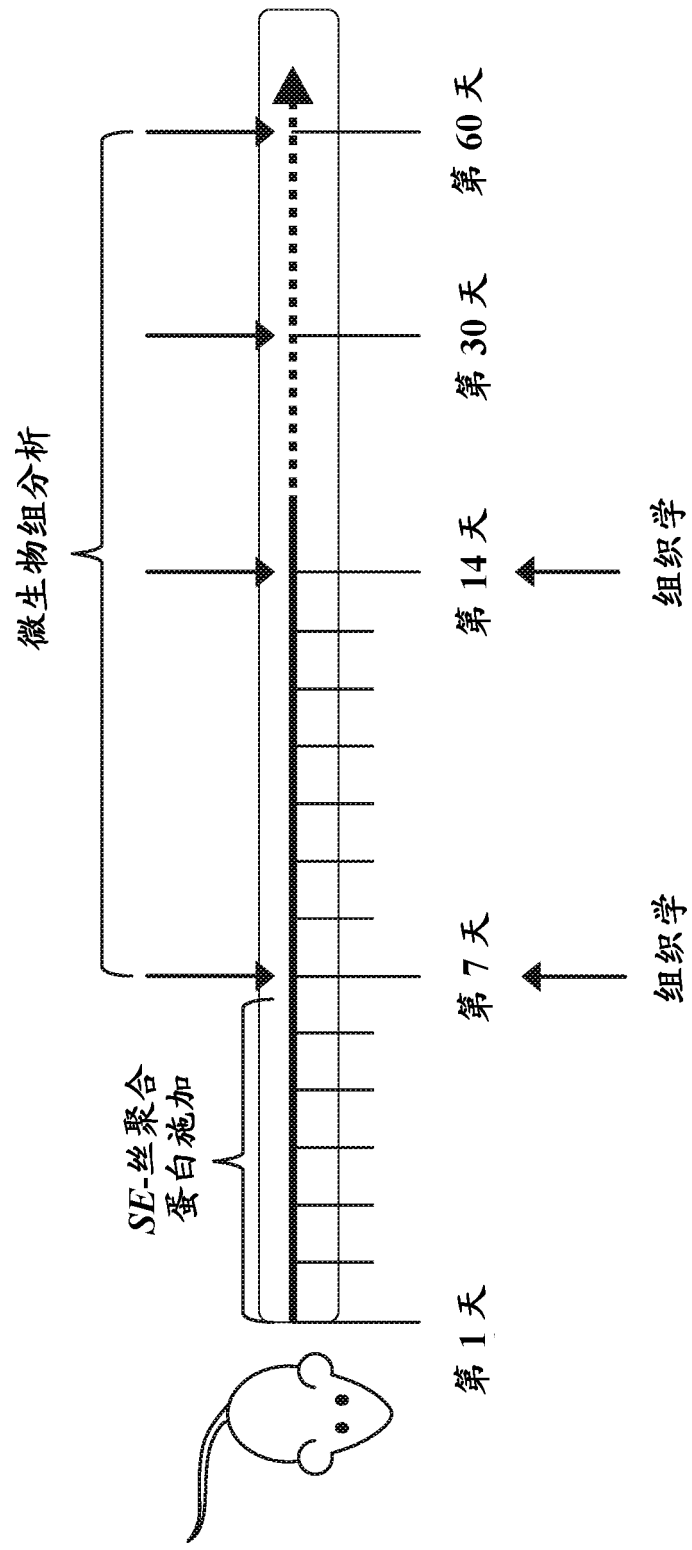


图 10

