



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113286602 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(21) 申请号 201980071752.8

(72) 发明人 R·L·伽罗 仲辻晃明

(22) 申请日 2019.09.13

A·O·奥尼尔

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有  
限公司 37101

62/730999 2018.09.13 US

代理人 阎斌斌 刘丹丹

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.28

(51) Int.Cl.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/051156 2019.09.13

A61K 35/741 (2015.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/056359 EN 2020.03.19

A61K 8/99 (2017.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

PTA-125204 2018.08.28

A61P 17/10 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

PTA-125205 2018.08.28

A61P 17/00 (2006.01)

PTA-125203 2018.08.28

A61P 31/02 (2006.01)

PTA-125202 2018.08.28

A61P 27/02 (2006.01)

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

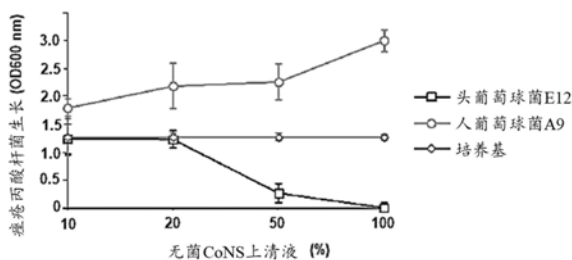
权利要求书2页 说明书24页 附图20页

## (54) 发明名称

用于治疗痤疮的针对痤疮丙酸杆菌的细菌  
疗法

## (57) 摘要

本公开内容涉及治疗皮肤病学疾病和病症  
的组合物和方法,并涉及可用于治疗痤疮的组  
合物。



1. 一种局部益生菌组合物,所述益生菌组合物包含选自以下的微生物、基本上由其组成或由其组成:头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

2. 一种后生元组合物,其包含权利要求1的益生菌组合物的发酵提取物。

3. 一种药物组合物,其包含权利要求1或2的后生元的益生菌和药学上可接受的载体。

4. 一种组合物,其包含一种或多种益生菌细菌菌株和任选的益生元化合物、保护剂、保湿剂、软化剂、研磨剂、盐和/或表面活性剂的增稠局部制剂;

其中所述一种或多种益生菌细菌菌株包含选自头葡萄球菌、表皮葡萄球菌和它们的任意组合的一种或多种细菌菌株;

其中所述组合物被配制成为用于局部治疗皮肤、头皮或粘膜的生态失调病症;和

其中所述组合物抑制痤疮丙酸杆菌的生长。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述一种或多种益生菌细菌菌株选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌和它们的任意组合。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中表皮葡萄球菌的一种或多种益生菌细菌选自表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

7. 根据权利要求5所述的组合物,其中一种或多种益生菌细菌菌株包含头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

8. 根据权利要求5所述的组合物,其中每种益生菌细菌菌株抑制痤疮丙酸杆菌生长。

9. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述一种或多种益生菌细菌菌株以活形式提供。

10. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述一种或多种益生菌细菌菌株以低压冻干或冷冻干燥或喷雾干燥形式提供。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述益生菌细菌可以重构成活形式。

12. 通过向有此需要的受试者的皮肤或粘膜施用有效量的权利要求4-11中的任一项的组合物来治疗人类或其它哺乳动物中的皮肤或粘膜感染、特应性皮炎、银屑病、乳腺炎、痤疮或与皮肤生态失调有关的其它病症的方法。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中局部地应用所述组合物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述组合物被配制为乳膏剂、软膏剂、油膏剂、喷雾剂、粉末、油、增稠制剂或敷剂。

15. 一种治疗与痤疮丙酸杆菌有关的皮肤病学病症的方法,所述方法包括施用有效量的权利要求1、2或4-11中的任一项的组合物或抑制痤疮丙酸杆菌生长、生存力或活性的药物组合物。

16. 权利要求12的方法,其中所述皮肤病学病症选自痤疮、慢性睑缘炎和眼内炎。

17. 权利要求12的方法,其中所述施用是通过局部应用。

18. 一种局部组合物,其由选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3的一种或多种细菌和载体组成。

19. 权利要求18的局部组合物,其中所述载体形成洗剂、酞剂、乳膏剂或软膏剂。

20. 一种组合物,其包含通过培养头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3或它们的任意组合而获得的无细胞发酵提取物。

21. 一种药物组合物,其包含权利要求20的组合物和药学上可接受的载体。

22. 一种用于局部应用的制剂,其包含权利要求20的组合物和药学上可接受的载体。

23. 权利要求20或21的组合物或权利要求22的制剂,其中所述组合物或制剂包含多种苯酚可溶性的调控蛋白肽 (PSM)。

24. 权利要求23的组合物或制剂,其中所述PSM是选自PSM $\beta$ 1、PSM $\beta$ 3、PSM $\beta$ 4、PSM $\beta$ 6和它们的任意组合的PSM。

25. 权利要求24的组合物或制剂,其中所述组合物或制剂包含PSM $\beta$ 1、3、4和6。

26. 权利要求25的制剂,其中所述制剂包含乳膏剂、软膏剂、油膏剂、喷雾剂、粉末、油、增稠制剂或敷剂。

27. 一种治疗与痤疮丙酸杆菌有关的皮肤病学病症的方法,所述方法包括施用有效量的权利要求20-26中的任一项的组合物或制剂或抑制痤疮丙酸杆菌生长、生存力或活性的组合物或制剂。

28. 一种诊断皮肤疾病或病症的方法,所述方法包括测量来自受试者的皮肤的样品中的PSM $\beta$ 的量,其中所述测量确定选自PSM $\beta$ 1、PSM $\beta$ 3、PSM $\beta$ 4、PSM $\beta$ 6和它们的任意组合的PSM的水平并将所述水平与PSM $\beta$ 1、PSM $\beta$ 3、PSM $\beta$ 4、PSM $\beta$ 6和它们的任意组合的正常对照水平进行对比,其中在所述样品中更低的水平指示皮肤疾病或病症。

29. 权利要求28的方法,其中所述皮肤疾病或病症是痤疮丙酸杆菌感染。

## 用于治疗痤疮的针对痤疮丙酸杆菌的细菌疗法

[0001] 关于联邦资助的研究的声明

[0002] 本发明在国立卫生研究院颁布的授权编号AI118816、AR067547、AI117673-02、AR06781和AI052453下在政府支持下完成。政府在本发明中具有某些权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2018年9月13日提交的临时申请系列号62/730,999在美国法典第35篇第119条下的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

[0005] 序列表的通过引用并入

[0006] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子地提交,且特此通过引用以其整体并入。于2019年9月13日创建的所述ASCII副本被命名为00015-354W01\_SL.txt且是12,125,812字节大小。

### 技术领域

[0007] 本公开内容涉及治疗皮肤病学疾病和病症的组合物和方法以及治疗痤疮的组合物和制剂。

[0008] 背景

[0009] 人皮肤具有多种微生物群落,它们构成先天性免疫屏障的重要要素以保护宿主免受病原体侵害。

### 发明内容

[0010] 本公开内容提供了一种局部益生菌 (probiotic) 组合物,所述益生菌组合物包含选自以下的微生物、基本上由其组成或由其组成:头葡萄球菌 (*S. capitis*) N030\_E12、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

[0011] 本公开内容也提供了包含益生菌组合物的发酵提取物的后生元 (postbiotic) 组合物,所述益生菌组合物包含选自以下的微生物、基本上由其组成或由其组成:头葡萄球菌 N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

[0012] 本公开内容也提供了一种药物组合物,其包含本公开内容的后生元的益生菌和药学上可接受的载体。

[0013] 本公开内容也提供了一种治疗与痤疮丙酸杆菌 (*C. acnes*, *P. acnes*) 有关的皮肤病学病症的方法,所述方法包括施用有效量的本公开内容的组合物或药物组合物,其抑制痤疮丙酸杆菌生长、生存力或活性。在一个实施方案中,所述皮肤病学病症选自痤疮、慢性睑缘炎和眼内炎。在另一个或其它实施方案中,所述施用是通过局部应用。

[0014] 本公开内容也提供了一种局部组合物,其由选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3的一种或多种细菌和载体组成。在一个实施方案中,所述局部组合物包含洗剂、酊剂、乳膏剂或软膏剂。

[0015] 本公开内容也提供了一种组合物,其包含获得自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3或它们的任意组合的无细胞发酵提取物。

[0016] 本公开内容提供了CoNS的菌株,其为痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)的有效抑制剂,所述痤疮丙酸杆菌是主要驻留在皮肤的毛囊中的革兰氏阳性厌氧细菌。本公开内容提供了CoNS的14种菌株,它们产生针对痤疮丙酸杆菌的有效抗微生物活性(表1)。这些CoNS菌株从人皮肤筛选并分离,并且来自多种物种,包括表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)、头葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)和路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdinensis*)。这些抗-痤疮丙酸杆菌CoNS菌株可以用于靶向痤疮丙酸杆菌的细菌疗法以治疗具有炎症性痤疮的患者。

[0017] 本公开内容提供了可用于治疗痤疮和痤疮丙酸杆菌感染的方法和组合物。

[0018] 本公开内容提供了一种局部益生菌组合物,所述益生菌组合物包含选自以下的微生物、基本上由其组成或由其组成:头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

[0019] 本公开内容也提供了一种后生元组合物,其包含益生菌组合物的发酵提取物,所述益生菌组合物包含选自以下的微生物、基本上由其组成或由其组成:头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

[0020] 本公开内容也提供了与药学上可接受的载体组合的上述任一种的药物组合物。

[0021] 本公开内容提供了组合物,其包含一种或多种益生菌细菌菌株和任选的益生元(prebiotic)化合物、保护剂、保湿剂、软化剂、研磨剂、盐和/或表面活性剂的增稠局部制剂;其中所述一种或多种益生菌细菌菌株包含选自头葡萄球菌、表皮葡萄球菌和它们的任意组合的一种或多种细菌菌株;其中所述组合物被配制用于局部治疗皮肤、头皮或粘膜的生态失调病症;且其中所述组合物抑制痤疮丙酸杆菌的生长。在一个实施方案中,所述一种或多种益生菌细菌菌株选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌和它们的任意组合。在另一个或其它实施方案中,表皮葡萄球菌的一种或多种益生菌细菌选自表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。在另一个实施方案中,所述一种或多种益生菌细菌菌株包含头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。在另一个实施方案中,每种益生菌细菌菌株抑制痤疮丙酸杆菌生长。在再另一个或其它实施方案中,所述一种或多种益生菌细菌菌株以活形式提供。在另一个实施方案中,所述一种或多种益生菌细菌菌株以低压冻干或冷冻干燥或喷雾干燥形式提供。在另一个实施方案中,所述益生菌细菌可以重构成活形式。

[0022] 本公开内容也提供了一种通过向有此需要的受试者的皮肤或粘膜应用有效量的本文描述的组合物或制剂来治疗人类或其它哺乳动物中的皮肤或粘膜感染、特应性皮炎、银屑病、乳腺炎、痤疮或与皮肤生态失调有关的其它病症的方法。在一个实施方案中,局部地应用所述组合物。在另一个或其它实施方案中,所述组合物被配制为乳膏剂、软膏剂、油膏剂、喷雾剂、粉末、油、增稠制剂或敷剂。

[0023] 本公开内容也提供了一种治疗与痤疮丙酸杆菌有关的皮肤病学病症的方法,所述方法包括施用有效量的如本文中所述的组合物或其药物组合物,所述组合物抑制痤疮丙酸杆菌生长、生存力或活性。在一个实施方案中,所述皮肤病学病症选自痤疮、慢性睑缘炎和眼内炎。在另一个或其它实施方案中,所述施用是通过局部应用。

[0024] 本公开内容也提供了一种局部组合物,其由选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3的一种或多种细菌和载体组成。在一个实施方案中,所述载体形成洗剂、酞剂、乳膏剂或软膏剂。

[0025] 本公开内容也提供了一种组合物,其包含获得自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3或它们的任意组合的培养物的无细胞发酵提取物。本公开内容也提供了一种药物组合物,其包含获得自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3或它们的任意组合的培养物的无细胞发酵提取物和药学上可接受的载体。

[0026] 本公开内容也提供了一种用于局部应用的制剂,其包含获得自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3或它们的任意组合的培养物的无细胞发酵提取物和药学上可接受的载体。在一个实施方案中,所述组合物或制剂包含多种苯酚可溶性的调控蛋白肽(PSM)。在另一个或其它实施方案中,所述PSM是选自PSMB1、PSMB3、PSMB4、PSMB6和它们的任意组合的PSM。在另一个实施方案中,所述组合物或制剂包含PSMB1、3、4和6。在另一个实施方案中,所述制剂包含乳膏剂、软膏剂、油膏剂、喷雾剂、粉末、油、增稠制剂或敷剂。

[0027] 本公开内容提供了一种治疗与痤疮丙酸杆菌有关的皮肤病学病症的方法,所述方法包括施用有效量的本公开内容的组合物或制剂,其抑制痤疮丙酸杆菌生长、生存力或活性。

[0028] 本公开内容也提供了一种诊断皮肤疾病或病症的方法,所述方法包括:测量来自受试者的皮肤的样品中的PSMB的量,其中所述测量确定选自PSMB1、PSMB3、PSMB4、PSMB6和它们的任意组合的PSM的水平,并将所述水平与PSMB1、PSMB3、PSMB4、PSMB6和它们的任意组合的正常对照水平进行对比,其中在所述样品中更低的水平指示皮肤疾病或病症。在一个实施方案中,所述皮肤疾病或病症是痤疮丙酸杆菌感染。

[0029] 在附图和下面的描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。从所述描述和附图以及从权利要求书将明白本发明的其它特征、目的和优点。

## 附图说明

[0030] 图1A-B显示了头葡萄球菌N030\_E12中的预测NRPS簇的结构域体系结构。A.几个基因含有参与抗微生物肽的合成的结构域。AMP-结合结构域提示在酰基载体蛋白(ACP)上游的酰基辅酶A合成酶活性。在许多合成肽抗生素的多结构域酶中发现了凝缩结构域,从而催化缩合反应以在非核糖体肽生物合成中形成肽键。也存在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)-结合结构域,其含有短链脱氢酶/还原酶(SDR)超家族结构域。B.使用Natural Product Domain Seeker(NaPDos)(用于快速检测和分析细菌中的次级代谢物基因的生物信息学工具)的含有凝缩结构域的头葡萄球菌基因针对已知参考基因的序列对比的结果,揭示了与已知抗微生物产物的相似性。

[0031] 图2A-B显示了在表皮葡萄球菌菌株中的预测反式-AT PKS簇的结构域体系结构。A. 聚酮合酶 (PKS) 将简单脂肪酸聚合成各种各样天然产物, 称作聚酮。在PKS酶内的值得注意的结构域包括脱水酶 (DH) 和酮还原酶 (KR)。B. 使用NaPDos的表皮葡萄球菌的含有PKS\_KS的基因针对已知参考基因的序列对比的结果, 揭示了与已知抗微生物产物的相似性。

[0032] 图3显示了多种不同的痤疮丙酸杆菌菌株的无菌上清液中的痤疮丙酸杆菌的生长抑制。在RCM培养基中生长7天的指定的痤疮丙酸杆菌菌株的100%无菌上清液中, 在生长72小时以后通过OD<sub>600</sub>测量的损伤性痤疮相关菌株(痤疮丙酸杆菌25和26)和健康相关菌株(痤疮丙酸杆菌27)的生长。健康相关菌株痤疮丙酸杆菌\_UCSD\_HI12和痤疮丙酸杆菌\_UCSD\_HI30(分别是单一基因座序列类型D1和A5)的上清液是痤疮丙酸杆菌生长的有效抑制剂, 且被选为痤疮生物疗法的有吸引力的候选物(用箭头和框指示)。

[0033] 图4显示了从正常人皮肤分离的24种凝固酶阴性的葡萄球菌菌株对2种痤疮丙酸杆菌菌株(ATCC6919和ATCC29322)的抗微生物活性。通过辐射状扩散测定测量了每个CoNS克隆的抗痤疮丙酸杆菌活性。简而言之, 将每个CoNS克隆的5 $\mu$ l过夜培养物(每个方块中的白色斑点)点在含有指示的痤疮丙酸杆菌菌株的Bullucella液体培养基琼脂平板上。将琼脂平板在厌氧条件下在37 $^{\circ}$ C温育72小时以使痤疮丙酸杆菌生长。黑色区域代表痤疮丙酸杆菌的生长抑制区域(参见箭头)。每个数字代表在表A中列出的CoNS菌株的关键编号。

[0034] 图5A-F显示了功能筛选方法和结果, 以鉴定靶向痤疮丙酸杆菌的抗微生物CoNS物种。(A) 高通量抗微生物功能筛选的示意图, 概述了从两个不同的健康皮肤部位收集和选择CoNS菌株, 以及通过在琼脂上共培养或CoNS在无菌调节上清液中生长来检测针对痤疮丙酸杆菌的抗微生物活性的测定。(B, C) 在CoNS菌株文库的50%无菌过滤上清液中温育24小时后痤疮丙酸杆菌的生长(B), 或在琼脂中与CoNS共培养的痤疮丙酸杆菌的生长(C)。选择了最有效的抗微生物CoNS分离物, 并鉴定为头葡萄球菌E12(红色), 而人葡萄球菌A9(蓝色)针对痤疮丙酸杆菌没有表现出活性。(D) 表显示了通过抗微生物琼脂测定的区域抑制大小(+小, ++中, +++大)来测量的头葡萄球菌E12和人葡萄球菌A9针对几种皮肤共生性和病原性菌株(包括从健康和痤疮皮肤分离的几种痤疮丙酸杆菌菌株)的抑制活性。(E) 在单独培养基或递增浓度的头葡萄球菌E12或人葡萄球菌A9的无菌上清液中温育24小时后痤疮丙酸杆菌C2的生长。(F) 通过铺板至适当选择性琼脂上的存活CFU的数目测量的在用递增浓度的无菌头葡萄球菌E12上清液处理后24h几种葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌物种的存活。

[0035] 图6A-H显示了头葡萄球菌E12抗微生物肽的纯化和鉴定。(A, B) 将60%硫酸铵沉淀的头葡萄球菌E12上清液加载到HLB柱上并用80%乙腈洗脱。将HLB洗脱剂加载到C8筒上并用50%乙腈洗脱。关于针对痤疮丙酸杆菌的活性, 通过琼脂测定(A)和液体培养(B)来测量级分。(C) 头葡萄球菌处理的或未处理的上清液以及SPE流通物和洗脱的级分的总蛋白质含量的银染色。(D) 头葡萄球菌上清液的HPLC纯化鉴别出几个肽峰, 其中单个级分(21)被鉴定为具有抗痤疮丙酸杆菌活性(E)。级分21合并自5个单独HPLC轮次并通过第二步HPLC纯化, 从而产生具有抗痤疮丙酸杆菌活性的两个级分(15和16)(G)。对活性级分15和16进行MS, 包括4个非活性级分作为对照, 并将4种独特的PSMB肽鉴定为抗微生物肽的可能候选物。(H) 来自HPLC纯化的活性级分(15和16)和对照非活性级分(13、14、17和18)的MS检测的前8种肽命中物的结果揭示了与“抗细菌蛋白”对应的肽, 并在以后被证实为PSMB肽。

[0036] 图7A-D显示了头葡萄球菌E12的全基因组测序, 揭示了PSMB肽的序列和预测特性。

(A) 示意图突出了含有6种编码PSMB肽 (PSMB1-6) 的基因的头葡萄球菌E12遗传簇。(B) 所有6种PSMB肽的多序列比对 (ClustalW), 包括每种肽的预测电荷 (SEQ ID NO:9437、9439、9441、9443、9445、9447)。(C) 在缺少PSMB基因的ATCC头葡萄球菌菌株35661和27840的活共培养或无菌上清液暴露期间针对痤疮丙酸杆菌没有抗微生物活性。(D) PSMB1的代表性螺旋轮图 (Heliquest), 其指示预测的两亲结构。

[0037] 图8A-F显示了PSMB肽和提取物作为寻常痤疮的治疗剂的临床前效力。(A) 在有头葡萄球菌E12提取物存在下或与单独的合成肽PSMB1、PSMB4、PSMB6或所有三种的组合一起培养72h后痤疮丙酸杆菌C2的抑制。(B) 在有头葡萄球菌提取物存在下或与几种不同的抗生素一起培养72h的痤疮丙酸杆菌C2的生长。(C) 用头葡萄球菌E12、表皮葡萄球菌C5、表皮葡萄球菌1457和头葡萄球菌35661上清液处理24h的NHEK的细胞毒性, 以最大LDH释放的百分比表示。(D) 接种 $1 \times 10^7$  CFU的头葡萄球菌E12、表皮葡萄球菌C5、表皮葡萄球菌1457和头葡萄球菌35661保持24h以后在SKH1小鼠的背部皮肤上的红斑的视觉表示。(E) 在用头葡萄球菌E12提取物 (10mg/mL) 或PBS对照处理后24h在离体猪皮肤外植体上的痤疮丙酸杆菌C2的存活CFU的总数。(F) 在用头葡萄球菌E12提取物 (10mg/mL) 或PBS对照处理后24h在SKH1小鼠背部皮肤上的痤疮丙酸杆菌C2的存活CFU的总数。

[0038] 图9A-C显示了头葡萄球菌活性分子的生物性质的表征。(A) 在液体培养物中测量痤疮丙酸杆菌C2的生长, 所述液体培养物含有或不含如下处理的头葡萄球菌E12上清液: 未处理, 在90°C煮沸15分钟, 或通过10kDa或3kDa MWC0柱分离进保留或流通级分中。(B) 在37°C对头葡萄球菌E12和对照人葡萄球菌A9上清液进行木瓜蛋白酶或蛋白水解酶K蛋白水解消化 (200 $\mu$ g/ml) 45min, 并接种到含有痤疮丙酸杆菌的琼脂上以测量抗微生物活性。(C) 在不同饱和量的硫酸铵中对CoNS上清液进行沉淀, 并通过处理后72h痤疮丙酸杆菌C2的生长测量每种沉淀物的抗微生物活性。

[0039] 图10A-B显示了通过头葡萄球菌E12上清液的正丁醇处理提取PSMB肽。(A) 从头葡萄球菌E12的无菌上清液丁醇提取PSMB后, 保留并增强了针对痤疮丙酸杆菌C2的抗微生物活性, 而对于产生硫醚抗生素的人葡萄球菌A9却没有。(B) 在丁醇提取之前和之后头葡萄球菌E12上清液的总蛋白质含量的银染色, 显示了小PSMB肽的富集。

[0040] 图11显示了PSMB与宿主LL-37抗微生物肽没有协同作用。在指定的浓度, 头葡萄球菌E12提取物和人LL-37抗微生物肽针对痤疮丙酸杆菌C2的协同抗微生物活性的评估。

## 具体实施方式

[0041] 如在本文中和在所附权利要求书中所使用的, 单数形式“一个/种 (a)”、“一个/种 (an)”和“该”包括复数指示物, 除非上下文另外清楚地指明。因而, 例如, 对“一种试剂”的提及包括多种这样的试剂, 且对“该微生物”的提及包括对一种或多种微生物以及本领域技术人员已知的其等同物等等的提及。

[0042] 并且, 除非另外说明, 否则“或”的使用是指“和/或”。类似地, “包含 (comprise)”、“包含 (comprises)”、“包含 (comprising)”、“包括 (include)”、“包括 (includes)”和“包括 (including)”是可互换的, 并不旨在进行限制。

[0043] 还应当理解, 在各个实施方案的描述使用术语“包含”的情况下, 本领域技术人员会理解, 在一些具体情况下, 可以可替换地使用语言“基本上由……组成”或“由……组成”

描述一个实施方案。

[0044] 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与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。与本文描述的那些相似或等同的任何方法和试剂可以用于实践所公开的方法和组合物。

[0045] 痤疮丙酸杆菌 (*Cutibacterium acnes*, *C.acnes*; 以前的 *Propionibacterium acnes*; *C.acnes* 和 *P.acnes* 在本文中可互换地使用) 是与皮肤痤疮关联的缓慢生长的、耐氧的厌氧性的、革兰氏阳性细菌; 它也可以引起慢性睑缘炎和眼内炎, 后者尤其是在眼内外科手术之后。尽管痤疮丙酸杆菌是正常皮肤共生细菌菌群的一个成员, 但是当该微生物在毛囊皮脂腺单位中过度生长时, 它在炎症性痤疮的发展中起关键作用。炎症性痤疮是人类皮肤的最常见疾病, 折磨多达80%的个体的一生。

[0046] 如提及的, 当该微生物在毛囊皮脂腺单位中过度生长时, 痤疮丙酸杆菌在炎症性痤疮的发展中起关键作用。炎症性痤疮是人类皮肤的最常见疾病, 折磨多达80%的个体的一生。痤疮具有许多不同的症状, 包括粉刺、丘疹、脓疱、小结节、囊肿和毛囊皮脂腺炎症。在这些中, 痤疮的炎症性损伤是患者严重关注的问题, 因为它们可能导致痤疮瘢痕形成, 从而引起不良的心理影响。该细菌的基因组已被测序, 且一项研究已经表明几种基因可以产生用于降解皮肤的酶和可能具有免疫原性的蛋白(激活免疫系统)。该细菌主要是共生的, 并且是在大多数健康成人皮肤上存在的皮肤菌群的一部分。通常, 在健康的青春期前少年的皮肤上几乎无法检测到这种生物。除了别的以外, 它主要依靠毛囊中皮脂腺分泌的皮脂中的脂肪酸来存活。它也可能在整个胃肠道中发现。

[0047] 痤疮丙酸杆菌存活率的降低与患者中痤疮的临床改善相关。全身性抗生素已被用于治疗痤疮数十年, 并且仍被广泛为痤疮患者开处方。局部抗生素也有帮助, 且氧化剂过氧化苯甲酰 (BPO) 已成为治疗痤疮最常用的局部药物之一。局部药物治疗经常被用作患有轻度至中度痤疮的患者的第一线治疗。但是, 当前的抗生素治疗具有主要缺点。全身性抗生素非特异性地破坏微生物生态系统并促进抗生素抗性。局部抗生素在杀死皮肤表面上的痤疮丙酸杆菌方面非常差。

[0048] 本公开内容证实, 通常存在于皮肤上的凝固酶阴性的葡萄球菌 (CoNS) 物种诸如表皮葡萄球菌和头葡萄球菌通过产生抑制痤疮丙酸杆菌的因子来保护免于痤疮丙酸杆菌。本公开内容因而提供了可以用于治疗痤疮丙酸杆菌感染和/或抑制痤疮丙酸杆菌生长的益生元、益生菌和后生元。

[0049] 本公开内容显示, 例如, 头葡萄球菌E12以足够的量组成性地产生抗微生物肽以杀死痤疮丙酸杆菌。惊人的是, 将0.6X浓度的头葡萄球菌E12上清液与痤疮丙酸杆菌菌株(其与痤疮相关)一起温育导致疾病相关细菌的存活率下降超过4个对数 (log), 并且在24小时后将培养物完全灭菌。另一个有吸引力的特征是, 痤疮丙酸杆菌C2直到20代都没有显示抗性的获得。来自药剂(包括、例如, PSM, 由头葡萄球菌E12产生)的诱导抗性的功效和差能力与这些肽的 $\alpha$ 螺旋两亲结构的作用模式一致。这样的结构在许多抗微生物肽中常见, 并且能够插入细菌膜并使其不稳定。这种直接破坏膜的机制对于在上皮表面上起作用的抗微生物剂而言是理想的。

[0050] 虽然头葡萄球菌基因组含有多达六个编码PSM的基因的簇, 但是通过纯化的活性级分的MS分析容易检测到PSMB1、3、4和6。用合成肽PSMB1、4和6进行的抗微生物测定揭示了

当用所有三种的组合处理细菌时针对痤疮丙酸杆菌的更大活性。同样地,每种PSMB的预期总电荷略有不同,因此可能影响与疏水柱的结合能力以及与细菌膜的相互作用。单独地,合成的PSM肽的效力远低于提取物。预期PSMB2和PSMB5也可能由头葡萄球菌分泌,但在其本身不具有生物学活性但会增加PSMB1、3、4和6的活性的不同级分中洗脱。已在其它葡萄球菌中发现了 $\beta$ 类PSM,且数字通常在2和4之间。但是,它们的确切作用仍然难以捉摸,且与更小的PSM $\alpha$ 不同,它们不被认为参与毒力。金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)含有两种 $\beta$ PSM(PSMB1/2),但均未报告有抗微生物作用。其它研究已经显示,其它合成的PSMB肽在体外针对金黄色葡萄球菌是抑制性的,但对未知针对痤疮丙酸杆菌有活性。因此,采用本筛选方法鉴定出使用单独的遗传筛选方法无法检测到的活性。该组合而不是单独肽的最佳杀死效力和特异性表明,将多种PSM或活生物体本身组合起来的治疗方法可能是最有效的。因此,本公开内容显示,皮肤微生物组是用于发现新的抗微生物剂(其可以针对特定病原体具有显著的选择性)的有价值的资源,并且在对抗皮肤疾病诸如寻常痤疮方面具有价值。

[0051] 术语“接触”表示使皮肤暴露于局部益生元、益生菌和/或后生元组合物,使得该组合物可以杀死或抑制皮肤上的痤疮丙酸杆菌。

[0052] 本文中使用的术语“发酵提取物”是指在培养物中并在适当的发酵条件下发酵益生菌共生皮肤细菌的产物。例如,培养头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3可以产生可用于抑制痤疮丙酸杆菌生长和存活的因子。来自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3的提取物可以应用于皮肤以抑制痤疮丙酸杆菌生长和/或感染和/或治疗寻常痤疮。在一些实施方案中,所述发酵提取物包含选自PSMB-1、-2、-3、-4、-5、-6和它们的任意组合的一种或多种PSM。

[0053] 术语“抑制”或“抑制有效量”表示益生元、益生菌和/或后生元皮肤组合物的量,其包含一种或多种益生菌微生物和/或发酵培养基或提取物和/或发酵副产物(例如,PSMB)和/或合成分子、基本上由其组成或由其组成,它们足以造成例如皮肤上的痤疮丙酸杆菌生长、增殖或存在的抑制。术语“抑制”还包括预防或改善病症(例如,痤疮、疮等)的体征或症状。

[0054] 术语“苯酚可溶性调控蛋白”或“PSM”表示可溶于苯酚并由葡萄球菌属细菌产生的蛋白毒素的家族。PSM的蛋白序列不同。在本公开内容中,鉴定了抑制痤疮丙酸杆菌的生长和生存力的一组PSM。这些PSM在图7B中鉴别(例如,PSMB1-6)。本公开内容的PSM可以使用肽合成仪合成,或使用例如头葡萄球菌E12从培养物的发酵提取物纯化。可替换地,本公开内容提供了本公开内容的PSM的编码序列。这样的编码序列可以用于通过重组分子生物学技术产生PSM。例如,本领域技术人员可以将一种或多种PSM的编码序列插入表达载体中,且然后用该载体转染或转化合适的宿主细胞(例如,细菌细胞),使得重组细菌细胞表达一种或多种PSM。这样的重组细菌细胞可以用在本公开内容的益生菌中,或者可以用于产生后生元(例如,提取物),其适合用于本文所述的治疗痤疮的方法中。

[0055] 本文中使用的术语“后生元”、“后生元组合物”或“局部后生元组合物”或“后生元皮肤组合物”表示来自益生菌生物体的无活力细菌产物或代谢副产物,其包含益生菌共生皮肤细菌发酵提取物和药物载体。在某些实施方案中,所述后生元包含PSMB1、3、4和/或6中的至少2种、至少3种、至少4种。

[0056] 本文中使用的“多核苷酸”表示脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物,其呈单独片段的形式或作为较大遗传构建体的组分(例如,通过将启动子可操作地连接至编码本公开内容的肽的多核苷酸)。许多遗传构建体(例如,质粒和其它表达载体)是本领域已知的,并且可以用于在无细胞系统或原核或真核(例如,酵母、昆虫或哺乳动物)细胞中产生本公开内容的肽。通过考虑遗传密码的简并性,本领域普通技术人员可以容易地合成编码本公开内容的肽的多核苷酸。本公开内容的多核苷酸(在所附序列列表中列出的那些)可以容易地用于常规分子生物学中,包括用于产生探针、引物和表达构建体。

[0057] 本文中使用的“益生元”是刺激本公开内容的表皮葡萄球菌和/或头葡萄球菌生物体的生长和/或活性的化合物或试剂。例如,患有痤疮或痤疮丙酸杆菌感染的受试者可以将益生元施用至例如其皮肤,使得益生元刺激本公开内容的表皮葡萄球菌和/或头葡萄球菌的生长和活性。表皮葡萄球菌和/或头葡萄球菌的受刺激的生长和活性因而产生对痤疮丙酸杆菌感染的抑制作用,由此治疗痤疮。益生元化合物可以包含多糖、水解物、盐、草药提取物或与相关益生菌菌株(例如,头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、路邓葡萄球菌N028\_E7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3)组合使用时足以促进所述菌株的生长的任何其它化合物,诸如小于约40% (w/w) 浓度的酵母水解物,小于约10% (w/w) 浓度的微晶纤维素,和/或小于约10% (w/w) 浓度的蔗糖。可以适合与皮肤细菌一起使用的益生元的其它例子包括菊糖、葡萄糖寡糖、异麦芽酮糖醇寡糖、低聚乳果糖(lactosucrose)、聚葡萄糖、大豆寡糖和木寡糖以及在Gibson,G.R.和Roberfroid,M,(编) Handbook of Prebiotics,CRC press(2008);Roberfroid,M.,J.Nutr.137(3):830S-837(2007)和Slavin,J.Nutrients 5(4):1417-1435(2013)中公开的那些,它们中的每一篇通过引用整体并入本文。

[0058] 本文中使用的术语“益生菌”、“益生菌组合物”或“局部益生菌组合物”或“益生菌皮肤组合物”包含益生菌共生皮肤细菌,减毒的或经工程改造的表达抑制痤疮丙酸杆菌生长或感染的药剂(例如,本文描述的PSMB中的至少两种或更多种)的微生物,以及维持共生皮肤细菌的生存力的药物载体。在一些实施方案中,所述益生菌包含制剂组分的合适的药学上可接受的载体且含有至少50-80%、85%、87%、90%、92%、95%、98%或100%的纯度的本公开内容的益生菌共生细菌。

[0059] 在一些实施方案中,本文描述的益生菌组合物包含益生菌生物体、基本上由其组成或由其组成。在其它实施方案中,所述益生菌生物体是细菌。在其它实施方案中,所述细菌包含正常皮肤菌群的组分。在其它实施方案中,所述细菌包含人葡萄球菌的菌株、基本上由其组成或由其组成。在其它实施方案中,所述细菌包含表皮葡萄球菌的菌株、基本上由其组成或由其组成。在另一个实施方案中,所述细菌包含头葡萄球菌、基本上由其组成或由其组成。在另一个实施方案中,所述细菌包含路邓葡萄球菌、基本上由其组成或由其组成。在其它实施方案中,所述益生菌包含菌株的混合物、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,所述菌株的混合物包含多个人葡萄球菌菌株、基本上由其组成或由其组成。在其它实施方案中,所述菌株的混合物包含多个表皮葡萄球菌菌株、基本上由其组成或由其组成。在其它实施方案中,所述菌株的混合物包含多个头葡萄球菌菌株、基本上由其组成或由其组成。在其它实施方案中,所述菌株的混合物包含多个路邓葡萄球菌菌株和/或一个或多个头葡萄球菌菌株和/或一个或多个路邓葡萄球菌菌株、基本上由其组成或由其组成。在其它

实施方案中,所述菌株的混合物包含一个或多个葡萄球菌菌株和一个或多个表皮葡萄球菌菌株、基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,所述组合物包含除了人葡萄球菌、表皮葡萄球菌、头葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌以外的一个或多个菌株、基本上由其组成或由其组成。在一些其它的实施方案中,所述另外的菌株包含来自葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)或乳球菌属(*Lactococcus*)的一个或多个菌株。具体益生菌制剂可以包含头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、路邓葡萄球菌N028\_E7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3、基本上由其组成或由其组成。这样的制剂通常包含足够的量的细菌细胞从而当应用于受试者的皮肤时提供 $10^3$ - $10^6$ CFU/cm<sup>2</sup>的最终密度。这样的制剂可以包含的浓度为约 $10^4$ 至约 $10^7$ CFU/g,或可替换地,10至约 $10^5$ CFU/g,或可替换地,约 $10^5$ 至约 $10^9$ CFU/g。这样的制剂可以包含人葡萄球菌、表皮葡萄球菌、头葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌的多个菌株,且可以进一步包含乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和/或本领域已知形成正常健康皮肤或粘膜菌群的一部分的其它这样的物种或菌株。在一些实施方案中,人葡萄球菌(例如,表A中所示的菌株-A12、-C2、-D12和/或-G1)占制剂中细菌细胞的100%。在一些其它的实施方案中,人葡萄球菌菌株占给定制剂中的细菌细胞的90-100%、85-95%、70-80%、75-85%、60-70%、65-75%、50-60%、55-65%、40-50%、45-55%、30-40%、35-45%、20-30%、25-35%、10-20%、15-20%、1-10%、5-15%或小于1%,其中菌落形成单位的余量由表皮葡萄球菌、头葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌或乳酸乳球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌和/或本领域已知形成正常健康皮肤或粘膜菌群的一部分的其它这样的菌株提供。在一些实施方案中,表皮葡萄球菌菌株(例如,在表A中所示的-N018-F3、-G6、-C5和/或-N038F6)占制剂中细菌细胞的100%。在一些其它的实施方案中,表皮葡萄球菌占给定制剂中的细菌细胞的90-100%、85-95%、70-80%、75-85%、60-70%、65-75%、50-60%、55-65%、40-50%、45-55%、30-40%、35-45%、20-30%、25-35%、10-20%、15-20%、1-10%、5-15%或小于1%,其中菌落形成单位的余量由人葡萄球菌、头葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌或乳酸乳球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌和/或本领域已知形成正常健康皮肤或粘膜菌群的一部分的其它这样的菌株提供。在一些实施方案中,头葡萄球菌菌株N030-H8占制剂中细菌细胞的100%。在一些其它的实施方案中,头葡萄球菌占给定制剂中的细菌细胞的90-100%、85-95%、70-80%、75-85%、60-70%、65-75%、50-60%、55-65%、40-50%、45-55%、30-40%、35-45%、20-30%、25-35%、10-20%、15-20%、1-10%、5-15%或小于1%,其中菌落形成单位的余量由人葡萄球菌、表皮葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌或乳酸乳球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌和/或本领域已知形成正常健康皮肤或粘膜菌群的一部分的其它这样的菌株提供。

[0060] 在一些实施方案中,除了人葡萄球菌、表皮葡萄球菌、头葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌以外的细菌占制剂中细菌细胞的约50%或更少。在一些实施方案中,所述细菌占给定制剂内细菌细胞的小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%、小于5%或小于1%。在一些实施方案中,除了人葡萄球菌、表皮葡萄球菌、头葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌以外的细菌可以包含乳酸乳球菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌和/或本领域已知形成正常健康皮肤或粘膜菌群的一部分的其它这样的物种或菌株。在一些实施方案中,

所述制剂可以包含约1%-99%的特定菌株的任何百分比的菌株人葡萄球菌、表皮葡萄球菌、头葡萄球菌和/或路邓葡萄球菌中的2种或4种的组合(例如,约25%人葡萄球菌、25%表皮葡萄球菌、25%头葡萄球菌和25%路邓葡萄球菌)。本文涵盖显示出痤疮丙酸杆菌的阳性抑制的任何2种或更多种(例如,2、3、4种)菌株的任何百分比或比例。在一些实施方案中,所述制剂包含约50%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和约50%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含约40%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和约60%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含约70%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和约30%的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含约30%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和约70%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含约80%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和约20%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含约20%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和约80%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含约90%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和约10%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含大于约90%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和小于约10%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,所述制剂包含小于约10%的上面列出的菌株的头葡萄球菌和大于约90%的上面列出的菌株的表皮葡萄球菌。

[0061] 本文中使用的术语“益生菌共生皮肤细菌”包括皮肤微生物组的微生物。益生菌共生皮肤细菌可以包括抑制痤疮丙酸杆菌生长或感染或杀死痤疮丙酸杆菌的细菌的组合物。在一个实施方案中,益生菌共生皮肤细菌包含一种或多种选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3的细菌。

[0062] 本文中使用的术语“纯化的”和“基本上纯化的”表示微生物或生物剂的培养物或共培养物(例如发酵培养基和提取物,分级分离的发酵培养基,发酵副产物,肽,多肽,基因,多核苷酸等),其基本上不含有在自然环境中发现的与体内产生的试剂天然相关的其它细胞或组分。纯化水平可以在从约50-80%纯度(对于某些微生物或试剂)至100%纯度(对于某些微生物或试剂)之间变化。

[0063] 关于治疗患有因痤疮丙酸杆菌的过度生长或感染导致的疾病或病症的受试者,本文中使用的术语“治疗有效量”是指足以改善疾病或病症的体征或症状的益生元、益生菌和/或后生元皮肤组合物或其提取物的量。例如,可以将治疗有效量测量为足以减少受试者的痤疮症状的量。通常,以使疾病或病症的症状减少至少50%、90%或100%的量治疗受试者。通常,最佳剂量将取决于病症和因素,诸如受试者的重量、细菌的类型、受试者的性别和症状的程度。尽管如此,本领域技术人员可以容易地确定合适的剂量。

[0064] 本文中使用的术语“局部”可以包括在外部以及通过浅层注射(例如,真皮内地和病灶内地)施用至皮肤,使得本文所述的局部益生菌组合物与皮肤和真皮层直接接触。

[0065] 本公开内容提供了全细胞制品,其包含头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3的基本上同质的或基本上纯的制品。这样的制品可以用于制备用于治疗痤疮、炎症和微生物感染的组合物。全细胞制品可以包含头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3。本公开内容也提供了从这样的全细胞衍生出的级分,其包含减少皮肤中的痤疮丙酸杆菌生长或生存力的药剂。

[0066] 第一种细菌组合物(例如,头葡萄球菌)的抑制第二种细菌组合物(例如,痤疮丙酸杆菌)的活性的能力可以如下确定:使例如益生菌或后生元与例如痤疮丙酸杆菌接触,和在接触益生菌或后生元之前和之后测量痤疮丙酸杆菌的生长或生存力。使生物体与本公开内容的局部益生菌组合物接触可以在体外发生,例如,通过将局部益生菌或后生元组合物加入细菌培养物。可替换地,接触可以在体内发生,例如通过使局部益生菌或后生元组合物与患有皮肤疾病或病症的受试者接触。

[0067] 可以以任意数目的方式制备益生菌共生皮肤细菌制品或后生元组合物。在一个实施方案中,通过培养和分离选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合的细菌菌株并将细菌菌株重新悬浮在合适的载体中,制备益生菌共生皮肤细菌制品。在另一个实施方案中,如下制备后生元组合物:在一定条件下培养选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合的共生细菌菌株以获得发酵产物,获得发酵提取物的无细胞制品,和将提取物与合适的载体组合。

[0068] 本领域已知的多种方法中的任一种可以用于将局部益生菌或后生元组合物施用给受试者。例如,本公开内容的益生菌或后生元皮肤组合物或提取物或合成制品可以配制成用于局部施用(例如,作为洗剂、乳膏剂、喷雾剂、凝胶或软膏剂)。这样的局部制剂可用于治疗或抑制皮肤上的微生物、真菌、病毒存在或感染或炎症。制剂的例子包括局部洗剂、乳膏剂、肥皂、擦剂等。

[0069] 在另一个实施方案中,提供了局部益生菌组合物,其包含多种益生菌共生皮肤细菌。当用于治疗痤疮或与增加的痤疮丙酸杆菌水平或活性有关的其它皮肤疾病或病症时,所述组合物包含抑制皮肤上的这样的痤疮丙酸杆菌的一种或多种细菌。在这样的情况下,益生菌共生皮肤细菌是凝固酶阴性的葡萄球菌属。在一个实施方案中,所述益生菌共生皮肤细菌选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3和它们的任意组合。

[0070] 在另一个实施方案中,所述局部益生菌组合物包含后生元共生皮肤细菌发酵提取物,其抑制皮肤上的痤疮丙酸杆菌生长或活性。在各个方面,从其生产提取物的细菌包含头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3。

[0071] 根据另一个实施方案,以上局部组合物可以配制为洗剂、摇振洗剂、乳膏剂、软膏剂、凝胶、泡沫、粉末、固体、糊剂或酊剂。

[0072] 在另一个实施方案中,提供了绷带或敷料,其包含上述的局部益生元、益生菌和/或后生元组合物。在各个实施方案中,提供了绷带或敷料,其主要组分包括基质和抑制皮肤上的痤疮丙酸杆菌的益生菌共生皮肤细菌。在各个实施方案中,提供了绷带或敷料,其主要组分包括基质和抑制皮肤上的痤疮丙酸杆菌的后生元。

[0073] 可以以适合用于局部施用以实现局部或全身效应的任何剂型配制药物组合物,其包含本文中公开的含有共生细菌(例如,头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3)的益生菌皮肤组合物,所述剂型包括乳剂、溶液、混悬液、乳膏剂、凝胶、水凝胶、软膏剂、扑粉、敷料、酊剂、洗剂、混悬液、酊剂、糊剂、泡沫、薄膜、气雾剂、冲洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带、真皮贴剂。包含本文中公开的益生菌的局部

制剂也可以包含脂质体、胶束、微球、纳米系统、及其混合物。

[0074] “药学上可接受的载体”意图包括溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂 and 抗真菌剂 (根据需要,只要它们对益生菌共生细菌无害)、等渗剂和吸收延迟剂、等。这样的介质和试剂用于药学活性物质的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与药物组合物不相容,否则涵盖其在治疗组合物和治疗方法中的用途。还可将补充性活性化合物并入所述组合物中。

[0075] 适合用在本文公开的局部制剂中的药学上可接受的载体和赋形剂包括、但不限于水性媒介物、水可混溶的媒介物、非水性媒介物、稳定剂、促溶剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、助悬剂和分散剂、润湿剂或乳化剂、络合剂、掩蔽剂或螯合剂、穿透促进剂、低温保护剂、冷冻保护剂、增稠剂和惰性气体。

[0076] 包含益生菌的药物组合物可以配制成软膏剂、乳膏剂、喷雾剂和凝胶的形式。合适的软膏剂媒介物包括油性或烃媒介物,包括诸如猪油、苯甲酸酯化的猪油、橄榄油、棉籽油和其它油、白矿脂;可乳化或吸收媒介物,诸如亲水矿脂、硫酸羟基硬脂酸甘油酯、甘油和无水羊毛脂;水可除去的媒介物,诸如亲水软膏剂;水溶性的软膏剂媒介物,包括不同分子量的聚乙二醇;乳剂媒介物,油包水 (W/O) 乳剂或水包油 (O/W) 乳剂,包括鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯、羊毛脂和硬脂酸 (参见,Remington:The Science and Practice of Pharmacy)。这些媒介物是软化剂,但是通常需要添加抗氧化剂和防腐剂。

[0077] 合适的乳膏基质可以是水包油或油包水的。乳膏媒介物可以是可水洗的、并含有油相、乳化剂和水相。所述油相也被称为“内”相,其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,但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可以是非离子的、阴离子的、阳离子的或两性的表面活性剂。

[0078] 凝胶是半固体混悬型系统。单相凝胶含有基本上均匀地分布在液体载体中的物质。合适的胶凝剂包括交联的丙烯酸聚合物,诸如卡波姆、羧基聚烯烃 (carboxypolyalkylenes), Carbopol<sup>RTM</sup>;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、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素和甲基纤维素;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、机械混合和/或搅拌来分散胶凝剂。

[0079] 在另一个实施方案中,本文中公开的包含益生元、益生菌和/或后生元的药物组合物可以单独配制,或与一种或多种另外的治疗剂组合配制,所述另外的治疗剂包括、但不限于化疗剂、抗生素 (只要它们不破坏益生菌益处)、抗真菌剂、抗瘙痒剂、镇痛药、蛋白酶抑制剂和/或抗病毒剂。

[0080] 本文中使用的局部施用包括真皮 (内)、结膜、角膜内、眼内、眼、耳、透皮、鼻、阴道、尿道、呼吸道和直肠施用。这样的局部制剂可用于治疗或抑制眼、皮肤和粘膜 (例如,口腔、阴道、直肠) 的感染。市场上的制剂的例子包括局部洗剂、乳膏剂、肥皂、擦剂等。

[0081] 可以将用于加压容器、泵、喷雾器、雾化器或喷洒器中的溶液或混悬液配制成含有:乙醇,乙醇水溶液,或用于分散、增溶本文公开的活性成分或延长其释放的合适替代剂,作为溶剂的推进剂;和/或表面活性剂,诸如脱水山梨糖醇三油酸酯、油酸或寡乳酸。

[0082] 可用于形成可侵蚀的基质的材料包括、但不限于:几丁质、壳聚糖、葡聚糖和普鲁

兰多糖;琼脂、阿拉伯树胶、刺梧桐树胶、槐豆胶、黄耆树胶、角叉菜胶、印度树胶、瓜尔胶、黄原胶和硬葡聚糖;淀粉,诸如糊精和麦芽糊精;亲水胶体,诸如果胶;磷脂,诸如卵磷脂;海藻酸盐;丙二醇海藻酸酯;明胶;胶原;和纤维索材料,诸如乙基纤维素(EC)、甲基乙基纤维素(MEC)、羧甲基纤维素(CMC)、CMEC、羟乙基纤维素(HEC)、羟丙基纤维素(HPC)、醋酸纤维素(CA)、丙酸纤维素(CP)、丁酸纤维素(CB)、醋酸丁酸纤维素(CAB)、CAP、CAT、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、HPMCP、HPMCAS、羟丙基甲基醋酸纤维素偏苯三甲酸酯(HPMCAT)和乙基羟基乙基纤维素(EHEC);聚乙烯吡咯烷酮;聚乙烯醇;聚乙酸乙烯酯;甘油脂肪酸酯;聚丙烯酰胺;聚丙烯酸;乙基丙烯酸或甲基丙烯酸的共聚物(EUDRAGIT,Rohm America,Inc.,Piscataway,N.J.);聚(2-羟基乙基-甲基丙烯酸酯);聚丙交酯;L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物;可降解的乳酸-羟乙酸共聚物;聚-D-(-)-3-羟基丁酸;和其它丙烯酸衍生物,诸如甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸(2-二甲基氨基乙基)酯和甲基丙烯酸(三甲基氨基乙基)酯氯化物的同聚物和共聚物。

[0083] 如果需要的话,合适的治疗方案可以组合本公开内容的益生元、益生菌和/或后生元组合物与一种或多种另外的治疗剂(例如,TNF的抑制剂、抗生素等)的施用。所述肽、其它治疗剂和/或抗生素可以同时施用,但是也可以依次施用。合适的抗生素包括氨基糖苷类(例如,庆大霉素)、β-内酰胺类(例如,青霉素类和头孢菌素类)、喹诺酮类(例如,环丙沙星)和新生霉素。通常,以杀细菌的量施用抗生素。“杀细菌的量”是足以在接受治疗的受试者中达到杀细菌浓度的量。根据其常规定义,本文中使用的“抗生素”是在稀溶液中抑制微生物生长或杀死微生物的化学物质。该术语还包括本领域已知的合成抗生素(例如,类似物)。

[0084] 本文提供的组合物可以与其它抗菌剂同时使用,所述其它抗菌剂包括磺胺类药物诸如磺胺甲二唑、磺胺异噁唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲二唑、柳氮磺吡啶、磺胺嘧啶银等;喹啉抗菌剂诸如萘啶酸、吡哌酸三水合物、依诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、甲苯磺酸托氟沙星、盐酸环丙沙星、盐酸洛美沙星、司帕沙星、氟罗沙星等;抗结核药诸如异烟肼、乙胺丁醇(盐酸乙胺丁醇)、对氨基水杨酸(对氨基水杨酸钙)、吡嗪酰胺、乙硫异烟胺、丙硫异烟胺、利福平、硫酸链霉素、硫酸卡那霉素、环丝氨酸等;抗耐酸细菌药物(antiacidfast bacterium drugs)诸如氨苯砜、利福平等;抗病毒药诸如碘苷、阿昔洛韦、阿糖腺苷、更昔洛韦等;抗HIV剂诸如齐多夫定、去羟肌苷、扎西他滨、硫酸茆地那韦乙醇化物、利托那韦等;抗螺旋体药;抗生素诸如盐酸四环素、氨苄西林、哌拉西林、庆大霉素、地贝卡星、卡那霉素B、利维霉素、妥布霉素、阿米卡星、新霉素、西梭霉素、四环素、土霉素、罗利环素、多西环素、氨苄西林、哌拉西林、替卡西林、头孢噻吩、头孢匹林、头孢噻啶、头孢克洛、头孢氨苄、头孢沙定、头孢羟氨苄、头孢孟多、cefotoam、头孢呋辛、头孢替安、头孢替安己酯、头孢呋辛酯、头孢地尼、头孢妥仑匹酯、头孢他啶、头孢匹胺、头孢磺啶、头孢甲肟、头孢泊肟酯、头孢匹罗、头孢唑兰、头孢吡肟、头孢磺啶、头孢甲肟、头孢美唑、头孢米诺、头孢西丁、头孢拉宗、拉氧头孢、氟氧头孢、头孢唑林、头孢噻肟、头孢哌酮、头孢唑肟、拉氧头孢、噻烯霉素、磺酰胺菌素、氨基曲南或其盐、灰黄霉素、兰卡杀菌素-组等。

[0085] 在另一个实施方案中,本文提供的组合物(例如,益生元、益生菌和/或后生元组合物)可以与本领域已知的一种或多种甾体类药物组合,所述甾体类药物包括、但不限于,醛固酮、倍氯米松、倍他米松、醋酸脱氧皮质酮、醋酸氟氢可的松、氢化可的松(皮质醇)、泼尼松龙、泼尼松、甲基强的松龙、地塞米松和曲安西龙。

[0086] 在另一个实施方案中,本文提供的组合物(例如,益生元、益生菌和/或后生元组合物)可以与一种或多种抗真菌剂组合,所述抗真菌剂包括、但不限于,阿莫罗芬、两性霉素B、阿尼芬净、联苯苄唑、布替萘芬、布康唑、卡泊芬净、环吡酮、克霉唑、益康唑、芬替康唑、非律平、氟康唑、异康唑、伊曲康唑、酮康唑、米卡芬净、咪康唑、萘替芬、那他霉素、制霉菌素、奥昔康唑、雷夫康唑、泊沙康唑、龟裂杀菌素、舍他康唑、硫康唑、特比萘芬、特康唑、噻康唑和伏立康唑。

[0087] 为了用于本文描述的治疗用途,本文还描述了试剂盒和制成品。这样的试剂盒可以包含载体、包装或容器,其被分隔以容纳一个或多个容器诸如管形瓶、试管等,每个容器包含要在本文描述的方法中使用的分开元件之一。合适的容器包括,例如,瓶子、管形瓶、注射器和试管。所述容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成。

[0088] 例如,容器可以包含一种或多种本文提供的组合物(例如,益生元、益生菌和/或后生元组合物),任选地与本文公开的另一种药剂组合。这样的试剂盒任选地包含本文中公开的组合物以及与其在本文所述方法中的应用有关的鉴别描述或标签或说明书。

[0089] 本公开内容提供了用于杀死痤疮丙酸杆菌和/或抑制痤疮丙酸杆菌的生长的更选择性且更有效的方法。本公开内容提供了皮肤共生细菌的菌株,其产生针对病原性细菌菌株具有选择性、但对皮肤微生物菌群的其它成员没有选择性的抗微生物活性。因此,使用共生细菌菌株的抗微生物疗法将选择性地杀死目标微生物菌株。相对于正常微生物菌群选择性杀死病原性细菌的能力是非常合乎需要的,因为它可以帮助维持体内稳态并形成正常细菌群落。大多数CoNS皮肤共生菌株产生多种抗微生物剂。在该情况下,使用共生细菌菌株的抗微生物疗法会具有低的产生针对抗生素的抗性突变体的风险。因为这里提供的CoNS菌株最初从正常人皮肤分离,它们对宿主是低毒性的。本公开内容可以用作活细菌应用或用作细菌的无菌提取物(例如,发酵提取物)或用作纯化的活性蛋白或用作合成肽。

[0090] 本公开内容提供了几种凝固酶阴性的葡萄球菌(CoNS)菌株以及两种痤疮丙酸杆菌(*Cutibacterium acnes*, *C. acnes*)菌株,它们是痤疮相关的痤疮丙酸杆菌菌株的有效拮抗剂。

[0091] 表A提供了具有抗痤疮丙酸杆菌活性的多种凝固酶阴性的葡萄球菌(CoNS)菌株:

[0092] 表A:

关键 编号#	物种	菌株/克隆ID	抗痤疮丙酸杆菌活性 (ATCC6919)*	抗痤疮丙酸杆菌活性 (ATCC29322)*
1	表皮葡萄球菌	NIAMS009-G7	++	++
2	表皮葡萄球菌	NIAMS018-F3	+++	+++
3	沃氏葡萄球菌	NIAMS025-G2	+	+
4	表皮葡萄球菌	NIAMS028-H4	-	-
5	表皮葡萄球菌	NIAMS028-C12	-	-
6	路邓葡萄球菌	NIAMS028-E7	+	+++
7	头葡萄球菌	NIAMS030-H8	+++	+++
8	表皮葡萄球菌	NIAMS034-C1	-	-
9	表皮葡萄球菌	AMT1-A9	-	+
10	人葡萄球菌	AMT2-A12	-	-
[0093] 11	人葡萄球菌	AMT3-A12	+++	+++
12	人葡萄球菌	AMT4-C2	+++	++
13	人葡萄球菌	AMT4-D12	+++	++
14	人葡萄球菌	AMT4-G1	+++	++
15	表皮葡萄球菌	AMT5-G6	+++	+++
16	表皮葡萄球菌	AMT5-C5	+++	+++
17	表皮葡萄球菌	S.epiA11	-	-
18	人葡萄球菌	S.homC2	+++	++
19	表皮葡萄球菌	NIAMS037-H2	-	-
20	表皮葡萄球菌	NIAMS037-A9	-	-
21	表皮葡萄球菌	NIAMS038-A10	-	-
22	表皮葡萄球菌	NIAMS038-F6	+++	+++
23	人葡萄球菌	S.homA9	++	-
24	表皮葡萄球菌	S.epi1457	-	-

[0094] 表A中的#17(表皮葡萄球菌A11)已经作为登录号PT0-125202保藏在ATCC;表A中的#23(人葡萄球菌A9)已经作为登录号PTA-125203保藏在ATCC;表A中的#24用作不产生抗微生物活性的阴性对照菌株。关于针对两种痤疮丙酸杆菌菌株的抗微生物活性的功效,参见,图4。

[0095] 本公开内容举例说明了来自皮肤的4种CoNS菌株:头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3。包含来自前述菌株中的每种菌株的所有检测的开放读码框的序列列表伴随本公开内容,并且出于所有目的并入本文。因此,使用各种探针和测序技术以及本文提供的序列列表可以鉴定本公开内容的菌株(例如,头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3)。例如,通过确定分离的头葡萄球菌菌株是否表达由SEQ ID NO:1-2377标识的核酸序列中的一种或多种或是否产生PSMB1、3、4和6(参见,例如,SEQ ID NO:9437、9441、9443和9447),可以鉴定菌株头葡萄球菌N030\_E12。类似地,通过确定分离的表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3菌株是否表达分别由SEQ ID NO:2378-4765(表皮葡萄球菌C5)、4766-7145(表皮葡萄球菌G7)或7146-9435(表皮葡萄球菌F3)标识的核酸序列中的一种或多种,可以鉴定菌株表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3。

[0096] 这些菌株是生物疗法的有吸引力的候选物,因为它们针对从健康和痤疮皮肤分离出的多种不同痤疮丙酸杆菌菌株类型表现出广泛的抗细菌活性,但针对其它革兰氏阳性皮肤共生菌和革兰氏阴性菌的效力较弱(表1)。另外,还描述了两种痤疮丙酸杆菌菌株:痤疮

丙酸杆菌\_UCSD\_HI12和痤疮丙酸杆菌\_UCSD\_HI30,它们通过辐射状扩散测定(表2)和在液体培养中(图3)表现出不同痤疮丙酸杆菌菌株的有效抑制。选择的CoNS或痤疮丙酸杆菌菌株向皮肤的应用/接触靶向和消除痤疮丙酸杆菌(痤疮的病原体),而不靶向和消除可能在健康中起到有益作用的其它皮肤驻留的细菌。

[0097] 表1:通过辐射状扩散测定对多种不同的细菌物种的CoNS拮抗作用的结果。通过辐射状扩散的杀死/抑制的区域:+小,++中,+++大

[0098]

	应用的排序顺序	1	2	3	4
序列类型	细菌属、种和菌株名称	头葡萄球菌 N030_E12	表皮葡萄球菌 AMT5_C5	表皮葡萄球菌 N009_G7	表皮葡萄球菌 N018_F3
N/A	金黄色葡萄球菌 Newman		+++	++	+++
N/A	金黄色葡萄球菌 USA300		+++	++	+++
N/A	金黄色葡萄球菌 113	+++	+++	+++	+++
N/A	A 群链球菌 NZ131				
N/A	B 群链球菌 DK23				
N/A	人葡萄球菌 27844	+	+	+	
N/A	路邓葡萄球菌	+			
N/A	沃氏葡萄球菌				
N/A	表皮葡萄球菌 12228	+			
N/A	大肠杆菌 RS218				
N/A	铜绿假单胞菌 PA01				
N/A	铜绿假单胞菌 PA4				

[0099]

N/A	鼠伤寒沙门氏菌 14028				
N/A	鲍氏不动杆菌 AB5075				
序列类型	痤疮丙酸杆菌菌株和起源部位	头葡萄球菌 N030_E12	表皮葡萄球菌 AMT5_C5	表皮葡萄球菌 N009_G7	表皮葡萄球菌 N018_F3
K1	痤疮丙酸杆菌 HL042PA3 健康	+++	++	++	+++
K2	痤疮丙酸杆菌 CRA7 健康	+++			
K1	痤疮丙酸杆菌 NIKH1 健康	++	+	+	+
A2	痤疮丙酸杆菌 LNGA1 健康	+++	++	++	++
H1	痤疮丙酸杆菌 TRUF3 健康	+++			
H1	痤疮丙酸杆菌 A15 非病变 PA07	+++	++	+	++
C2	痤疮丙酸杆菌 AI15 非病变 PA03	++	+++	+++	+++
E3	痤疮丙酸杆菌 AI09 非病变 PA01	+++	+++	+++	++
E3	痤疮丙酸杆菌 AI09 非病变 PA04	+++	++	++	++
F4	痤疮丙酸杆菌病变 104.1	+++	+	+	+
C2	痤疮丙酸杆菌 AI01 病变 PA22	+++	++	++	+++
A1	痤疮丙酸杆菌 AI15 病变 PA10	+++	++	++	++
C2	痤疮丙酸杆菌 AI01 病变 PA23	+++	++	+	+

[0100] 表2:还发现了从健康个体 (HI) 的皮肤分离的几种不同的痤疮丙酸杆菌菌株抑制来自健康和痤疮影响的皮肤的不同痤疮丙酸杆菌菌株的生长。两种不同的痤疮丙酸杆菌菌株痤疮丙酸杆菌\_UCSD\_HI12和痤疮丙酸杆菌\_UCSD\_HI30产生了针对几种痤疮丙酸杆菌菌株的有效抑制产物。通过在琼脂中辐射状扩散 (表2) 和液体培养 (图3) 测量,发现两种菌株的活培养物和无菌上清液抑制痤疮丙酸杆菌的生长。

[0101]

痤疮丙酸杆菌菌株	SLST	起源	C.a1	C.a2	C.a3	C.a4	C.a6	痤疮丙酸杆菌 UCSD_HI12	C.a8	C.a9	C.a10	C.a11	痤疮丙酸杆菌 UCSD_HI30	C.a12	C.a13	(对照) 头葡萄球菌 N030_E12
C.a30	A1	健康														+++
C.a31	A1	健康														+++
C.a32	H1	痤疮											++			+++
C.a33	H1	痤疮											++			+++
C.a34	K1	健康						+								+++
C.a35	K1	健康														++
C.a36	K2	健康													+	++
C.a37	K2	健康						+++					+			++
C.a38	C2	痤疮						+++					+			++
C.a39	C2	痤疮	+										+			++
C.a40	C1	痤疮											+			+++
C.a41	C1	痤疮											++			+++
C.a42	D1	健康														+++
C.a43	D1	痤疮											++			+++
C.a44	F4	痤疮						+								+++
C.a45	F1	健康											+			++
金黄色葡萄球菌	113	N/A														+++
头葡萄球菌	E12	N/A														+++

[0102] 在本公开内容中包括的四种葡萄球菌菌株已测序并发现含有几个编码预测的非核糖体肽合成酶 (NRPS) 和/或聚酮合酶 (PKS) 的生物合成基因簇。这些是主要的多模块酶复合物,其合成次级代谢物诸如抗微生物肽、抗生素和铁载体。NRPS簇的每个模块激活不同的氨基或羧酸,随后它们依次缩合以合成直链或环状天然产物(参见,图1)。图1突出显示了通过antiSMASH(一种综合资源,其允许对细菌基因组中的次级代谢物生物合成基因簇进行全基因组鉴定、注解和分析)鉴定的头葡萄球菌N030\_E12中的这样的NRPS簇。头葡萄球菌NRPS簇含有几个基因,所述基因具有可能参与抗微生物肽(诸如短杆菌肽和短杆菌酪肽)的合成的特异性特征结构域。图2突出显示了通过antiSMASH鉴定的表皮葡萄球菌菌株AMT5\_C5、N009\_G7和N018\_F3中的反式-AT聚酮合酶 (PKS) 簇。PKS机制包含三个必不可少的结构域:酰基转移酶(AT)、酰基载体蛋白(ACP)和酮合酶(KS)。例如,由芽孢杆菌属物种产生的一些聚酮化合物包括地非西丁和macrolactin。因此,存在于所有三种表皮葡萄球菌物种内的该PKS簇可能是新型抗微生物肽的来源。

[0103] 在一个实施方案中,公开内容提供了用于局部递送的益生菌组合物,其包含本公开内容的CoNS共生皮肤细菌(例如,头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3)。在另一个实施方案中,所述局部组合物仅含有选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3的1、2、3或4种菌株。在另一个实施方案中,本公开内容的局部益生菌组合物可以包含选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3和前述的任意组合的共生皮肤细菌或由其组成,其中所述共生皮肤细菌相对于受试者的皮肤上发现的其它细菌物种是基本上纯的(例如,80%、85%、87%、90%、92%、95%、98%或100%纯的)。

[0104] 在一些实施方案中,所述组合物包含乳膏剂、软膏剂、油混悬液或油膏剂,其中如上所述的益生菌细菌(例如,头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、路邓葡萄球菌N028\_E7和/或表皮葡萄球菌N018\_F3)并入湿润剂或乳剂中,诸如在下面和在Nakatsuji, T. 等人(2016), Nature Medicine中描述的那些。在一些实施方案中,所述组合物包含贴剂或敷剂,其中所述细菌与合适的赋形剂组合且并入编织物、凝胶基质或聚合物片层内。用于局部施用的合适的赋形剂和载体是本领域已知的,且包括增稠剂、乳化剂、脂肪酸、多糖、多元醇和聚合物和共聚物,包括、但不限于,海藻酸盐、微晶纤维素、聚乳酸、聚乳酸-共聚-羟乙酸、矿脂和本领域已知的许多其它物质。

[0105] 在一些实施方案中,所述组合物包含细菌培养基、经调节的细菌培养基和/或细菌培养物。在一些实施方案中,所述组合物包含细菌培养基的滤液或上清液。在一些实施方案中,所述组合物包含低压冻干的培养基。在一些实施方案中,所述组合物包含从细菌培养基的滤液或上清液生产的低压冻干的调节培养基。

[0106] 在一些实施方案中,如本文所述的方法包括支持受试者的皮肤的健康。在其它实施方案中,所述方法包括提供皮肤生态失调和由此衍生出的病症(例如,痤疮)的治疗。在一些实施方案中,所述方法包括提供皮肤的细菌感染(例如,痤疮丙酸杆菌感染或过度生长)的治疗。在一些实施方案中,所述治疗包括以下步骤:鉴定具有皮肤生态失调、细菌感染、痤疮的受试者;和向需要治疗的病症的部位施用如本文所公开的益生菌组合物。给定制剂(软膏剂、凝胶、贴剂等)的适当施用模式的确定,可以由治疗皮肤感染的本领域普通技术人员

完成。在一些其它的实施方案中,以规则的时间间隔重复应用益生菌组合物。在一些实施方案中,每3天重复应用益生菌组合物。在一些实施方案中,每2天重复应用益生菌组合物。在一些实施方案中,每2天重复应用益生菌组合物。在一些实施方案中,每天重复应用益生菌组合物。在一些实施方案中,每天超过一次重复应用益生菌组合物。在一些实施方案中,每周重复应用益生菌组合物。在一些实施方案中,仅应用一次益生菌组合物。

[0107] 在一些实施方案中,所述方法包括提供痤疮丙酸杆菌感染的治疗。在一些其它的实施方案中,所述方法包括以下步骤:诊断痤疮丙酸杆菌感染;和向感染部位应用如本文所公开的益生菌和/或益生元组合物,其中这样的组合物能够如下杀死或抑制痤疮丙酸杆菌的生长:通过抗微生物化合物的产生,通过竞争皮肤或粘膜生物群内的资源,或通过其它方式。给定制剂(软膏剂、凝胶、贴剂等)的适当施用模式的确定,可以由治疗皮肤感染的本领域普通技术人员完成。在一些其它的实施方案中,以规则的时间间隔(例如,每天、每2天、每3天、每周等)重复应用益生菌组合物。本领域普通技术人员显而易见,在其它实施方案中,可以应用类似的或相同的步骤来提供痤疮丙酸杆菌的治疗。在一些实施方案中,所述方法包括提供具有未知的或未表征的病原体的感染的治疗。在一些实施方案中,所述方法包括提供慢性皮肤病况的治疗。

[0108] 可以从人皮肤分离本公开内容的共生细菌,并使用本文所述的方法进行鉴定。例如,本公开内容提供了通过使用例如泡沫尖端拭子擦拭人皮肤表面来获得、鉴定和培养本文描述的共生细菌的方法。将拭子放入胰蛋白酶大豆液体培养基中。将液体培养基稀释至补充有3%蛋黄的甘露醇盐琼脂平板(MSA)上。收集没有晕轮的代表凝固酶阴性的葡萄球菌(CoNS)菌株的粉红色菌落,并在胰蛋白酶大豆液体培养基(TSB)中生长。然后可以如图4中所述测定菌株(也参见,图5A)。通过DNA分离和测序或通过PCR、DNA印迹或RNA印迹,可以进一步表征具有痤疮丙酸杆菌的强抑制的菌株。另外,还可以测量苯酚可溶性调控蛋白的表达概况的测量值。在一些实施方案中,表达PSMB1、3、4和6(例如,SEQ ID NO:9437、9441、9443和9447)的生物可以被鉴定为头葡萄球菌。在SEQ ID NO:9449、9451和9453中提供了来自表皮葡萄球菌的PSMB $\beta$ 。

[0109] 可以使用任何数量的商购可得的试剂盒(例如,DNeasy UltraClean Microbial Kit,Qiagen)分离gDNA。可以使用各种序列平台对gDNA测序(例如,MiSeq;Illumina Inc., San Diego,CA,进行2个循环,其可以产生2x 250bp配对末端读出)。使用cutadapt(参见,例如,环球网cutadapt.readthedocs.io/en/stable/)除去接头。可以使用Trim Galore(参见,例如,环球网bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\_galore/)用默认参数除去低质量序列。使用Bowtie2程序(2.28版)(I)用参数(-D 20-R 3-N 1-L 20-very-sensitive-local)和人参考基因组hg19,从质量修整的数据集除去映射至人基因组的序列。使用SPAdes(3.8.0版)从头组装过滤的读出值,k-聚体长度范围为33-127。使用子系统技术(RASY)用默认参数,用微生物基因组的快速注解来注解基因组。可以将预测的氨基酸序列和/或核酸序列与本文所附的序列列表进行对比以鉴定头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3。

[0110] 本公开内容也提供了包含至少2种、至少3种、至少4种、至少5种或至少6种PSMB $\beta$ 的组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含至少4种PSMB $\beta$ 。在其它的实施方案中,所述组合物包含至少5种PSMB $\beta$ 。在前述实施方案中的任一个中,所述PSMB $\beta$ 选自PSMB1、2、3、4、5和6。在

某些实施方案中,所述组合物至少包含PSMB1、3、4和6。

[0111] 本公开内容也提供了包含至少2种PSMB的用于局部施用的制剂。在一些实施方案中,所述制剂包含至少3种PSMB。在其它的实施方案中,所述制剂包含至少4种PSMB。在前述实施方案中的任一个中,所述PSMB选自从头葡萄球菌E12产生和/或其序列与在SEQ ID NO: 9437、9439、9441、9443、9445、9447中的每一个中所示的PSM具有至少85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的PSMB1、2、3、4、5和6。在某些实施方案中,所述制剂至少包含PSMB1、3、4和6。在一些实施方案中,所述制剂至少包含PSMB1、3、4和6中的3种以及本公开内容的益生菌、益生元或后生元。

[0112] 本公开内容也提供了一种诊断皮肤生态失调和/或痤疮丙酸杆菌感染风险的方法。所述方法包括从受试者的皮肤得到生物样品和确定所述样品中共生细菌的相对丰度,其中所述丰度包括确定至少头葡萄球菌和表皮葡萄球菌的存在的丰度。更具体地,所述确定可以测量选自头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7和表皮葡萄球菌N018\_F3的至少1-4(例如,1、2、3或4)种细菌的丰度。如果头葡萄球菌或表皮葡萄球菌(例如,头葡萄球菌N030\_E12、表皮葡萄球菌AMT5\_C5、表皮葡萄球菌N009\_G7、表皮葡萄球菌N018\_F3)的水平或丰度低于小于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%、0.1%的阈值,那么受试者处于具有痤疮丙酸杆菌感染的风险中。

[0113] 在另一个实施方案中,在确定受试者是否具有痤疮丙酸杆菌感染或处于具有痤疮丙酸杆菌感染的风险中时,可以确定由头葡萄球菌E12产生的一种或多种PSMB在来自受试者的样品中的存在。例如,可以从受试者的皮肤得到样品,用正丁醇萃取,并如本文中所述测量PSMB的存在。PSMB1、3、4和6在样品中的存在指示降低的感染风险。相反,无或低水平(低于正常平均对照的水平)指示受试者具有痤疮丙酸杆菌感染或处于具有痤疮丙酸杆菌感染的风险中。“正常”或“平均对照”水平是这样的PSMB(例如,PSMB1、3、4和/或6)水平:其为在不具有痤疮丙酸杆菌感染的受试者群体中的总PSMB的平均水平或每种PSMB类型(例如,PSMB1、3、4或6)的平均水平。在一个实施方案中,可以确定在提取物样品中存在的每种PSMB的序列,且然后与在SEQ ID NO:9437、9439、9441、9443、9445、9447中所示的序列进行对比,以确定哪种类型的PSMB存在。

[0114] 在另一个实施方案中,所述诊断和/或预后的方法可以用于确定受试者是否需要如本文中所述的益生元、益生菌或后生元疗法。

[0115] 下述实施例是示例性的且无意限制要求保护的发明,而是举例说明本公开内容的方法或组合物。

[0116] 实施例

[0117] 人受试者和样品拭子收集. 根据加利福尼亚大学圣地亚哥分校(UCSD)(University of California, San Diego, UCSD) IRB(项目编号140144)批准的方案进行涉及人类受试者的所有实验。用从上臂和面部采集的拭子,对12名健康成人进行拭子样品收集。将拭子在3%胰蛋白酶大豆液体培养基(TSB)中温育,短暂涡旋,并铺板至含有蛋黄的甘露醇盐琼脂(MAY)平板上进行葡萄球菌物种的选择性生长。根据甘露醇代谢和蛋黄反应,将金黄色葡萄球菌与CoNS区分开。通过擦拭10名痤疮患者的病变和非病变面部皮肤部位以及来自6名健康志愿者的面部皮肤,获得痤疮丙酸杆菌临床分离物。将拭子在补强的梭状芽胞杆菌培养基(RCM)中温育,涡旋,并铺板至补充了维生素K、血红素和5%绵羊血液的布鲁杆

菌血琼脂平板上,并在37°C温育5天。

[0118] 筛选来自皮肤衍生的CoNS的抗微生物活性.从MAY平板随机挑选24个单独分离的CoNS菌落(它们从每个皮肤部位选择),并转移到深96孔板中的TSB(1mL)中。每个平板含有先前表征的CoNS菌株,其包括表皮葡萄球菌ATCC1457(未能证明其针对其它葡萄球菌具有抗微生物活性)(阴性对照)以及人葡萄球菌A9(其先前被证明产生杀死金黄色葡萄球菌的硫醚抗生素)(阳性对照)。将CoNS平板用无菌Aeraseal膜(sigma)密封,并在37°C在250rpm摇动下培养过夜。通过测量OD<sub>600</sub>评价细菌生长,仅将生长至高密度(OD<sub>600</sub>>6.0)的CoNS用于后续分析。为了测量分泌的上清液中的抗微生物活性,收获来自过夜培养物的CoNS上清液并无菌过滤。为了测量来自活的生长的CoNS的抗微生物活性,将来自过夜培养物的细菌通过离心进行沉淀,然后弃去上清液,并将细菌重新悬浮在新鲜TSB中。

[0119] 质谱法.将感兴趣的级分的一部分(<1μg)在真空下干燥,并重新悬浮于5μL含5%甲酸的5%乙腈中。接下来,在具有线内Easy-nLC 1000(Thermo Fisher Scientific)的Orbitrap Fusion(Thermo Fisher Scientific)质谱仪上通过85分钟的数据采集,对每个样品的1/5进行单独的LC-MS实验。将拉出(home-pulled)并填充的30cm柱分别用0.5cm、0.5cm和30cm的5μm C4、3μm C18和1.8μm C18三重填充,并加热至60°C用作分析柱。首先在500巴下加载肽,然后在70分钟内进行范围为6-25%乙腈的色谱梯度,然后5-分钟梯度至100%乙腈,将其保持10分钟。通过经由连接分析柱和Easy-nLC系统的不锈钢T-连接部施加2000V,进行电喷射电离。每个样品之后进行两次洗涤,从3-100%乙腈的梯度开始经历15分钟,再用100%乙腈洗涤另外10分钟。对于具有2-6之间的电荷状态的肽,扫描375-1500的m/z范围。质心(Centroided)数据用于峰的定量。以数据依赖性的阳离子模式运行采集。使用Sequest算法与反向数据库方案(用于将肽和蛋白错误发现率控制至1%)一起在Proteome Discoverer 2.1版中针对头葡萄球菌的uniprot参照数据库(Uniprot proteome UP000042965,访问时间为10/01/2018)搜索原始波谱。在搜索中未指定酶,且最小肽长度设置为6个氨基酸。搜索参数包括50ppm的前体质量容差和0.6Da的片段质量容差以及修饰的可变氧化。

[0120] 体外抗微生物测定.对于最初的CoNS抗微生物筛选,使用金黄色葡萄球菌113或痤疮丙酸杆菌HL110PA3(健康相关,SLST K1)或痤疮丙酸杆菌HL096PA1(痤疮相关,SLST C2)进行辐射状扩散琼脂测定。对于辐射状扩散琼脂测定,将熔化的TSB或RCM琼脂(12mL)与金黄色葡萄球菌或痤疮丙酸杆菌( $1 \times 10^6$  CFU)混合,并倒入10cm见方的方形培养皿中。当琼脂固化时,将细菌的10μl等分试样接种到单个栅格上。将平板在37°C摇动下温育过夜(用于金黄色葡萄球菌)或在2.5L anaeroPack(thermo Scientific)中在37°C温育3天(对于痤疮丙酸杆菌),以允许细菌的可见生长。抗细菌活性由围绕菌落的琼脂内清晰的抑制区域指示。记录抑制区域的大小作为抗微生物活性的量度(+轻微,++中度,或+++有效)。为了液体培养测定,收获来自CoNS的过夜培养物的调节上清液,并无菌过滤(0.22μm)。在96孔圆底平板中将50%的调节上清液与含有 $1 \times 10^5$  CFU/mL的金黄色葡萄球菌或痤疮丙酸杆菌的50%新鲜TSB或RCM混合。将金黄色葡萄球菌平板在37°C摇动下温育过夜,并将痤疮丙酸杆菌平板在37°C在厌氧室内静置温育。通过OD<sub>600</sub>测量细菌生长,并将阳性抗微生物菌株鉴定为将细菌生长抑制至阴性对照菌株所测得的生长的小于50%(I<sub>50</sub>)的菌株。通过计数TSB平板(金黄色葡萄球菌)或布鲁杆菌属血琼脂平板(痤疮丙酸杆菌)上的CFU数目,测量细菌存活率。在用

细菌上清液或提取物处理后的选定时间,通过在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中系列稀释并铺板至适当的琼脂培养基上,确定CFU的数目。将细菌存活率测量为每毫升的CFU总数。

[0121] 由CoNS菌株产生的抗微生物剂的纯化.将来自选择的抗细菌头葡萄球菌E12菌株(包括阳性对照抗微生物人葡萄球菌A9菌株)的过夜培养物的调节培养基首先通过0.22 $\mu$ m Millipore过滤器过滤灭菌。初步表征包括处理无菌细菌上清液以在100 $^{\circ}$ C煮沸15分钟或与200 $\mu$ g/mL的蛋白水解酶木瓜蛋白酶和蛋白水解酶K一起在37 $^{\circ}$ C温育60分钟。通过辐射状扩散测定测量抗微生物活性。关于抗微生物分子的大小排阻,将20mL调节培养基加载到3、10和30kDa分子量截止值(MWCO)柱(Pierce)上并在4000x g离心15分钟。将流通级分放到一边,并将保留的级分在PBS中洗涤2次,并用20mL TSB重新悬浮。评价两个级分的抗微生物活性。为了沉淀活性分子,将硫酸铵加入无菌上清液(30-80%饱和)在室温在恒定旋转下1小时,然后以4000x g离心45分钟。将所得的沉淀用H<sub>2</sub>O洗涤3次并在H<sub>2</sub>O中重构。通过在琼脂和液体培养物中的金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌生长,确定抗微生物活性。

[0122] 上清液的固相提取(SPE)和HPLC纯化.将已保留在10kDa MWCO柱上并沉淀在60% AS中的头葡萄球菌E12无菌上清液应用于Oasis HLB筒(Waters)上。将筒用在H<sub>2</sub>O中的20%乙腈洗涤,并用在H<sub>2</sub>O中的80%乙腈洗脱。将洗脱的级分低压冻干并在H<sub>2</sub>O中重构。然后将80%级分加载到C8Sep-Pak筒(Waters)上,用20%乙腈洗涤,并用50%乙腈洗脱。将级分低压冻干,在H<sub>2</sub>O中重构,且然后评价抗微生物活性,并根据生产商的说明书通过银染色(Pierce)显影。将1mg头葡萄球菌E12丁醇提取物上样进CapCel Pak C8(5 $\mu$ m, 300 $\text{\AA}$ , 4.6 $\times$ 250mm)(Shiseido Co.),以0.8mL/min使用在0.1%(v/v)TFA中的10%至60%乙腈的线性梯度,进行第一步HPLC纯化。将级分低压冻干,然后重新悬浮在H<sub>2</sub>O中,并通过液体培养测定评估抗微生物活性。将每个单一抗微生物级分合并在一起用于第二步HPLC,进行最多五次连续纯化。对于第二次纯化,采用25%至50%乙腈的线性梯度。

[0123] 抗微生物CoNS在猪皮和小鼠上的移植.所有涉及活体动物工作的实验均根据加利福尼亚大学圣地亚哥分校动物护理和使用委员会指南的批准。新鲜冷冻的猪皮片材获得自Loretta Tomlin Animal Technologies(Livermore,CA)并用外科手术刷用3%氯二甲酚消毒。将皮片材切成2.5cm $\times$ 2.5cm,并用另外的无菌PBS冲洗20次。将1 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU痤疮丙酸杆菌(ATCC6919)在猪皮肤上皮内攻击1小时,并应用100 $\mu$ l头葡萄球菌E12提取物(10mg/mL)或PBS对照24小时。通过擦拭收获活细菌以测量痤疮丙酸杆菌存活。对于小鼠实验,将无毛SKH1小鼠的背部用酒精拭子擦拭并将1 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU痤疮丙酸杆菌接种到无菌纱布垫上,将其放置在背部皮肤上并用tegaderm膜固定24小时。除去含痤疮丙酸杆菌的纱布垫,并将100 $\mu$ l头葡萄球菌E12提取物(10mg/mL)或PBS对照接种到新鲜纱布垫上,并放回相同的背部皮肤部位上,并用tegaderm膜固定另外24小时。在接种后48小时,擦拭皮肤以测量痤疮丙酸杆菌的存活CFU。

[0124] 从人皮肤细菌筛选抗微生物活性鉴定出针对痤疮丙酸杆菌具有有效和选择性活性的头葡萄球菌菌株.从健康志愿者的前臂和面部的皮肤拭子收集了288种CoNS分离物的文库。如下进行对抗痤疮丙酸杆菌活性的无偏倚分析:与痤疮丙酸杆菌一起在琼脂上生长的含有CoNS分离物的活体共培养物,并在添加经无菌过滤的50%v/v调节CoNS上清液后测量痤疮丙酸杆菌的生长(图5A)。功能筛选的结果揭示,在液体测定和琼脂共培养中,共有13种针对痤疮丙酸杆菌的生长具有活性的分离物(图5B、C)。对从具有抗微生物活性的CoNS分

离物中提取的DNA进行了16S测序,并鉴定了几种不同的物种,包括表皮葡萄球菌和人葡萄球菌,它们被认为是人类皮肤的频繁定居者。最有效的分离物被鉴定为头葡萄球菌(头葡萄球菌菌株E12),并用于进一步表征。在鉴定的13种抗微生物菌株中,所有菌株都从前臂分离。没有发现面部分离物抑制痤疮丙酸杆菌的生长。令人感兴趣的是,针对金黄色葡萄球菌有活性的产生硫醚抗生素的人葡萄球菌A9菌株针对痤疮丙酸杆菌是无效的,这说明了源自皮肤的混合细菌群落的抗微生物剂的选择性性质。

[0125] 接下来,通过琼脂测定测试了头葡萄球菌E12的抑制几种不同的CoNS共生物种和常见皮肤病原体的生长的选择性。虽然人葡萄球菌A9有效地抑制了金黄色葡萄球菌和GAS的生长,但头葡萄球菌E12仅表现出针对CoNS的弱活性,并且针对其它皮肤病原体是无效的(图5D)。引人注目的是,头葡萄球菌E12针对广泛范围的痤疮丙酸杆菌菌株(包括从痤疮患者的病变皮肤或非病变皮肤分离的菌株)表现出有效活性。来自头葡萄球菌E12的未浓缩培养基无菌上清液的50%稀释物足以抑制痤疮丙酸杆菌生长,因此验证了来自功能筛选的发现,并表明在正常生长条件下,该头葡萄球菌菌株可以产生足够的抗微生物活性以竞争得过痤疮丙酸杆菌(图5E)。为了研究抗微生物上清液是否具有杀细菌作用,在用递增浓度的头葡萄球菌E12处理24小时后,计数存活的痤疮丙酸杆菌菌落的数量。与来自功能筛选的结果一致,除了仅在最高10倍浓度下的人葡萄球菌菌株27844之外,头葡萄球菌上清液通常不对其它CoNS物种具有杀细菌作用。但是,头葡萄球菌E12上清液针对痤疮丙酸杆菌有杀细菌作用,显示在暴露于0.6X(60%)上清液期间痤疮丙酸杆菌的6个对数减少和在最高浓度下培养物的完全灭菌(图5F)。

[0126] PSMB抗微生物肽的纯化和鉴定.对抗微生物因子的性质的初步检查揭示它对热处理具有抗性,但对蛋白水解敏感,提示蛋白性分子(补充图1A、B)。此外,在与60-80%硫酸铵(AS)一起温育期间,抗微生物因子从上清液中沉淀出来,并通过离心浓缩(图9C)。接下来,使用固相萃取对浓缩的AS沉淀物进行样品制备。首先将样品加载到亲水亲油平衡的(HLB)柱上,并发现抗-痤疮丙酸杆菌分子洗脱在80%乙腈中,这在接种到痤疮丙酸杆菌琼脂上以后72h(图6A)或在液体培养物中用痤疮丙酸杆菌(图6B)确定。随后将活性洗脱物加载到疏水C8筒上,并将抗-痤疮丙酸杆菌分子在50%乙腈处洗脱(图6A、B)。级分的总蛋白染色揭示大致4-5kDa大小的高度富集的条带,在随后的洗脱步骤期间可见更大的纯度(图5C)。反相高效液相色谱法(HPLC)揭示了几个峰,其中单一级分(级分21)被发现抑制液体培养物中痤疮丙酸杆菌的生长(图5D)。为了确保最高纯度,然后将活性级分从四个单独的HPLC轮次合并在一起,并进行第二步HPLC纯化。这次,看到了几个小峰(图6F),并且发现两个级分(级分15和16)抑制液体培养物中痤疮丙酸杆菌的生长(图6G)。活性级分(15、16)和对照非活性级分(13、14、17、18)的质谱法(MS)分析揭示了四种候选肽,被称作“抗菌蛋白”,各自为5kDa大小(图6H)。肽序列的BLAST搜索将这些鉴定为属于在多个葡萄球菌物种内存在的苯酚可溶性调控蛋白的β类家族(PSMB)。

[0127] 尽管通过MS检测到4种不同的PSMB肽,但头葡萄球菌E12基因组的分析揭示了多达6个编码PSMB的基因,它们被包含在操纵子-样结构内(图7A)。所有6个编码PSMB的基因都密切相关,其中氨基酸序列同一性范围为56%至91%,且预测电荷范围为-1至+1(图7B)。进一步的分析发现,这些基因在头葡萄球菌35661和27844的ATCC菌株的基因组中不存在,并且实际上没有检测到来自这些实验室菌株的针对痤疮丙酸杆菌的抗微生物活性(图7C)。α螺

旋轮图 (Heliquest) 还预测了这些肽对于每种PSM $\beta$ 将形成 $\alpha$ -螺旋两亲样结构,其中在肽的长轴的相对侧上具有分开的疏水面和亲水面。这种两亲结构在许多充分表征的抗微生物肽中是常见的(图7D)。

[0128] PSM $\beta$ 抑制痤疮丙酸杆菌的皮肤定殖.用正丁醇提取头葡萄球菌E12调节上清液,这是富集PSM肽的操作。这导致富集了所有PSM $\beta$ 肽的相对纯的提取物,并保留了针对痤疮丙酸杆菌的活性(图10)。为了确认PSM $\beta$ 肽作为抗-痤疮丙酸杆菌分子具有活性并鉴定哪种肽具有最佳活性,分别合成了PSM $\beta$ 1和6(来自纯化的活性级分的最丰富的分子)(15和16,图6H)以及不太丰富的PSM $\beta$ 4。所有三种PSM均被显示在体外具有抗微生物活性(图8A)。PSM $\beta$ 1和6都在62 $\mu$ g/ml有效抑制痤疮丙酸杆菌的生长,而PSM $\beta$ 4不太有效,在125 $\mu$ g/ml抑制。令人感兴趣的是,所有三种肽的组合表现出针对痤疮丙酸杆菌的最佳活性,在31 $\mu$ g/ml抑制生长。但是,与相同浓度的丁醇提取物(其在8 $\mu$ g/ml抑制)相比,它的抑制作用不那么强。这种差异可能是由于在提取物内发现的另外第四种PSM $\beta$ 肽(PSM $\beta$ 3)的存在。已显示了几种细菌抗微生物剂与人抗微生物剂诸如防卫素和LL37协同作用。但是,痤疮丙酸杆菌向含有或没有LL-37肽的头葡萄球菌提取物的暴露不会导致增强的杀伤活性(图11)。鉴于与合成产生的PSM $\beta$ 肽相比含PSM $\beta$ 的提取物具有更大的功效和相对纯度,因此该提取物被用于随后的实验中以在体外和体内实验中确定头葡萄球菌E12的效力和功效。

[0129] 接下来,将头葡萄球菌E12提取物与通常用于痤疮治疗的几种抗生素进行对比。该提取物比红霉素、克林霉素和四环素(痤疮治疗常用的处方抗生素)针对痤疮丙酸杆菌更有效(图8B)。此外,在用提取物治疗多达20代的过程中,关于痤疮丙酸杆菌没有记录到MIC( $\leq$ 16 $\mu$ g/mL)的增加,表明相对不能促进抗性。此外,如通过乳酸脱氢酶(LDH)释放所测量的,原代人角质形成细胞(NHEK)向提取物的暴露不产生来自这些表皮细胞的显著细胞毒性应答(图8C)。同样地,暴露于不同CoNS菌株24小时的小鼠背部皮肤显示,头葡萄球菌E12不诱导可观察的红斑或损伤(图8D)。最后,在证实了该共生皮肤细菌被表皮较好地耐受的预期结果之后,将痤疮丙酸杆菌皮内地施用以定殖离体猪皮肤或活SKH1小鼠的背部皮肤,且然后应用来自头葡萄球菌E12的提取物。在两种模型中,单次治疗导致痤疮丙酸杆菌CFU的显著降低(图8E、F)。总体而言,这些结果表明,来自头葡萄球菌E12的PSM $\beta$ 具有杀死痤疮丙酸杆菌的能力,并说明了利用人类皮肤中天然存在的微生物事件用于开发治疗剂的潜力。

[0130] 已经描述了本公开内容的许多实施方案。尽管如此,应该理解,在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,可以做出各种修改。因此,其它实施方案在下述权利要求的范围内。

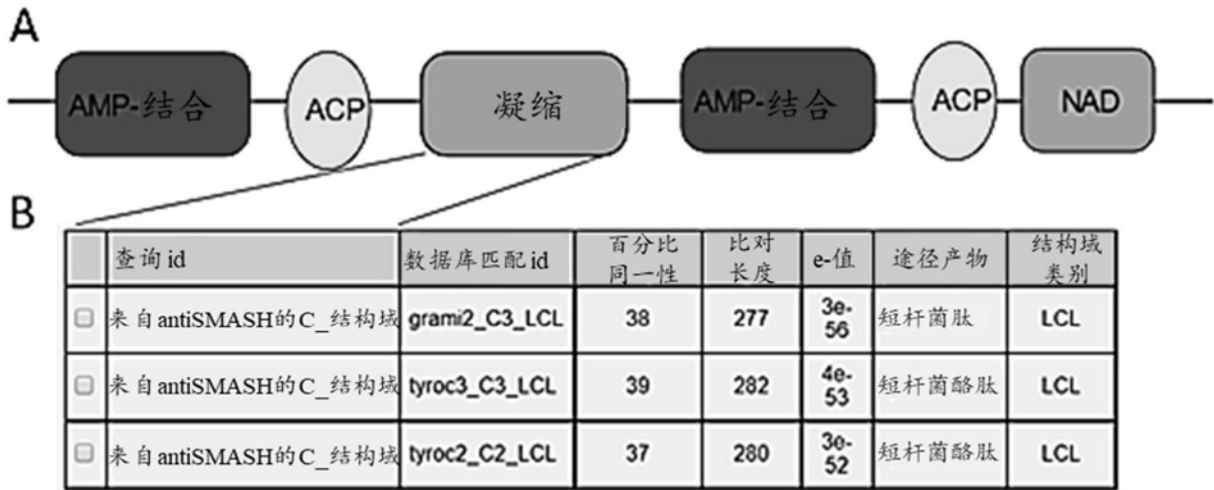


图1A-B

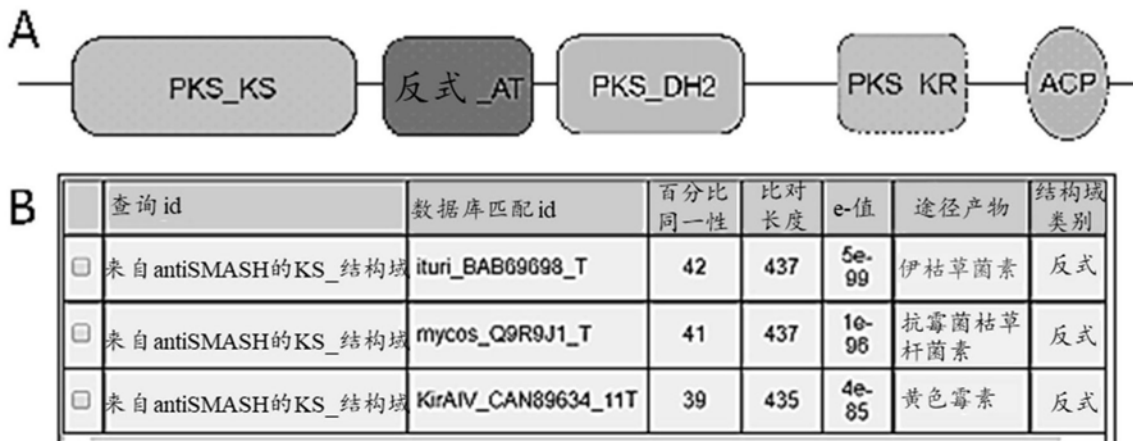


图2A-B

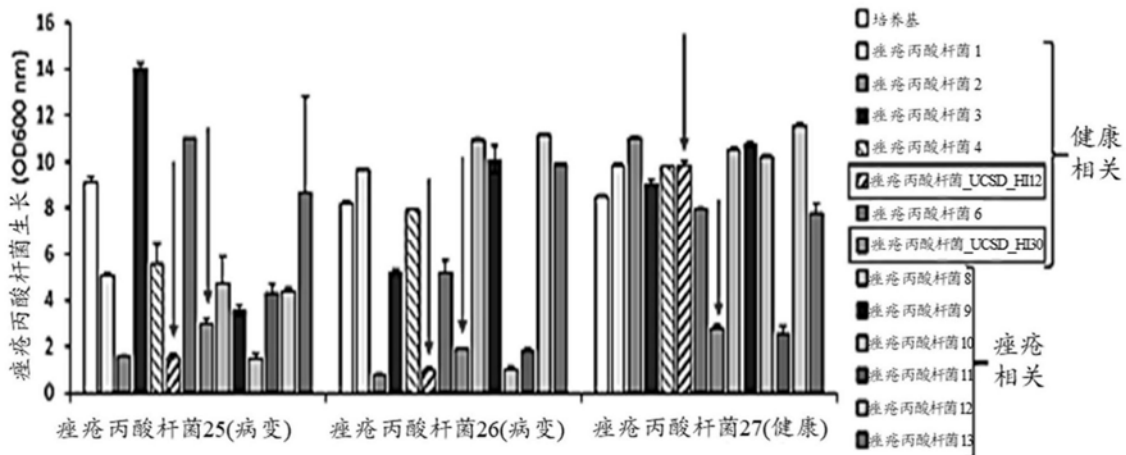


图3

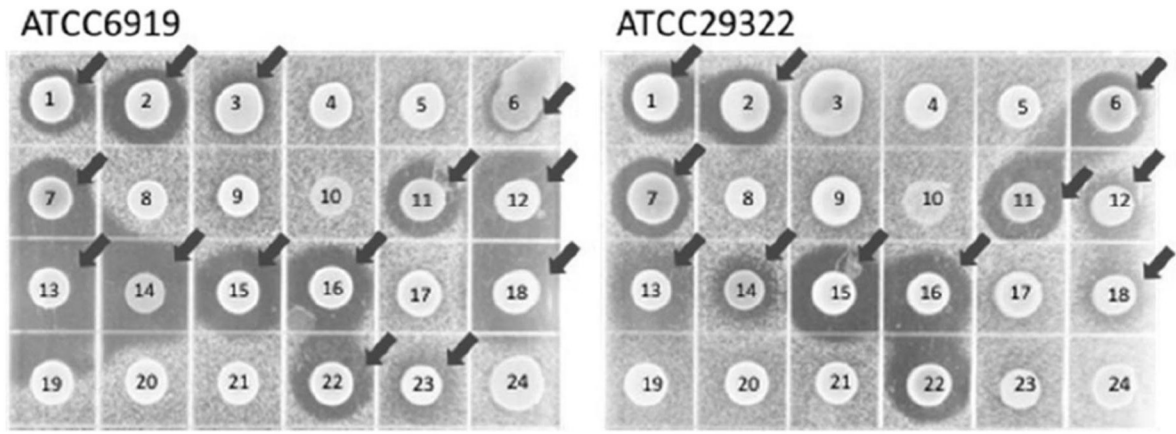


图4

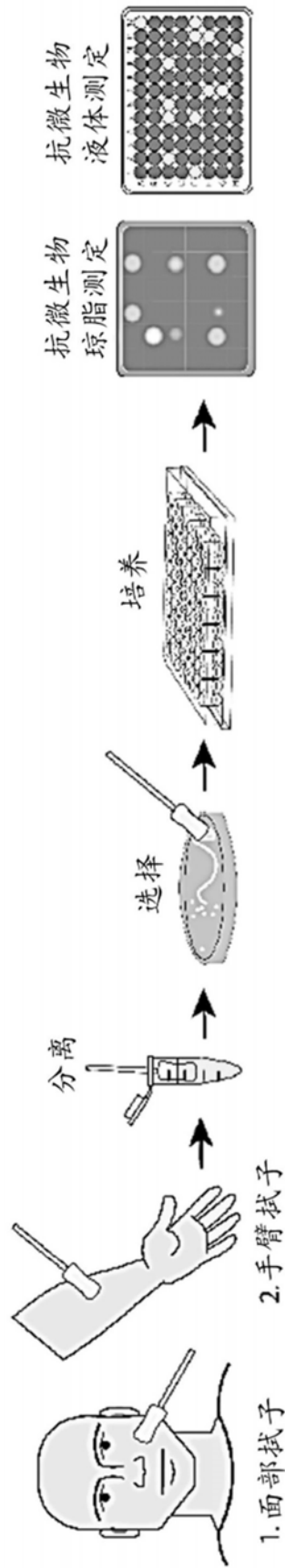


图5A

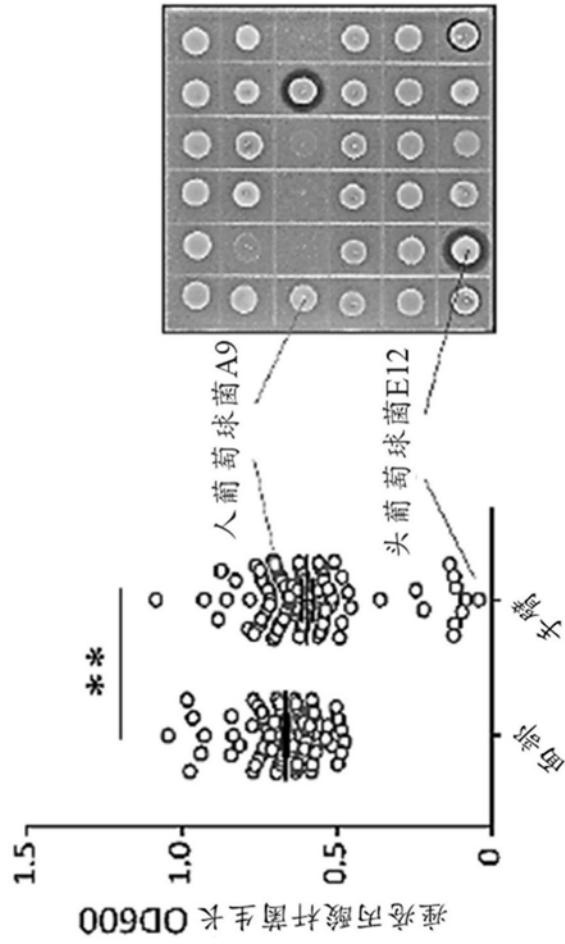


图 5B

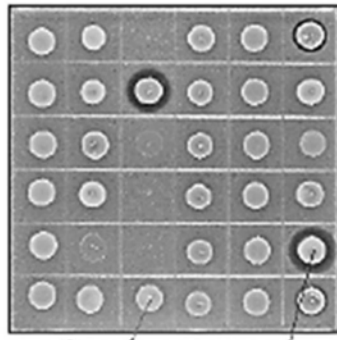


图 5C

菌株	皮肤病原体 和共生 的物种	头葡萄球菌 N030_E12	人葡萄 球菌 A9	SLS 类型	痤疮丙酸杆菌分离物 和起源部位	头葡萄球菌 N030_E12	人葡萄 球菌 A9
Newman	金黄色葡萄球菌		+++	K1	痤疮丙酸杆菌健康	+++	人葡萄 球菌 A9
USA300	金黄色葡萄球菌		+++	K2	痤疮丙酸杆菌健康	+++	
NZ131	A 群链球菌		+++	K1	痤疮丙酸杆菌健康	++	+
DK23	B 群链球菌		+++	A2	痤疮丙酸杆菌健康	+++	
27844	人葡萄球菌	+		H1	痤疮丙酸杆菌健康	+++	
UCSD1	路邓葡萄球菌	+		H1	痤疮丙酸杆菌非病变	+++	
UCSD1	沃氏葡萄球菌			C2	痤疮丙酸杆菌非病变	++	
12228	表皮葡萄球菌	+		E3	痤疮丙酸杆菌非病变	+++	
RS218	大肠杆菌			E3	痤疮丙酸杆菌非病变	+++	
PA01	铜绿假单胞菌			F4	痤疮丙酸杆菌病变	+++	
PA4	铜绿假单胞菌			C2	痤疮丙酸杆菌病变	+++	
14028	鼠伤寒沙门菌			A1	痤疮丙酸杆菌病变	+++	
AB5075	鲍氏不动杆菌			C2	痤疮丙酸杆菌病变	+++	

图5D

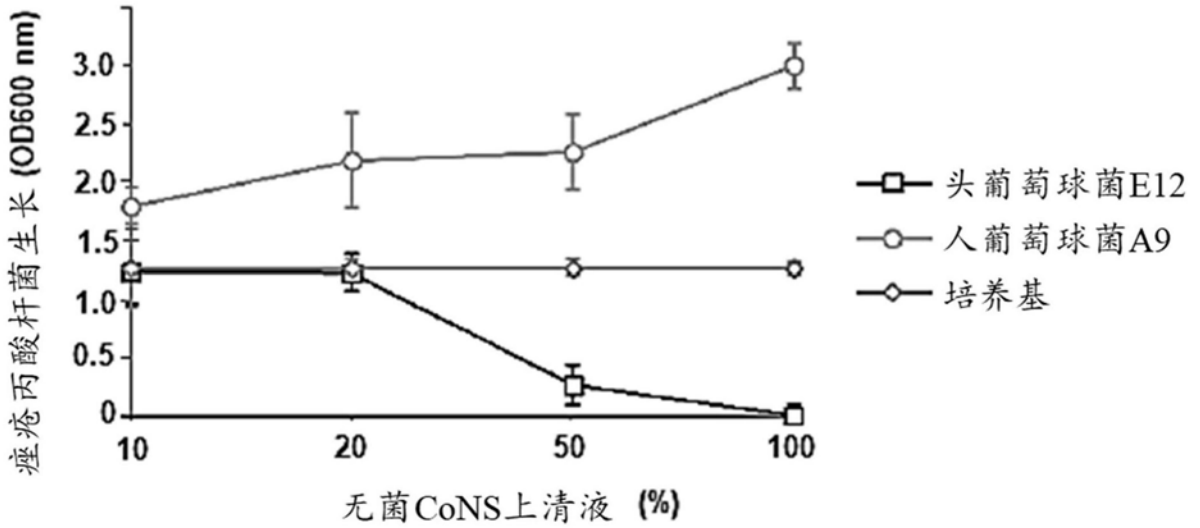


图5E

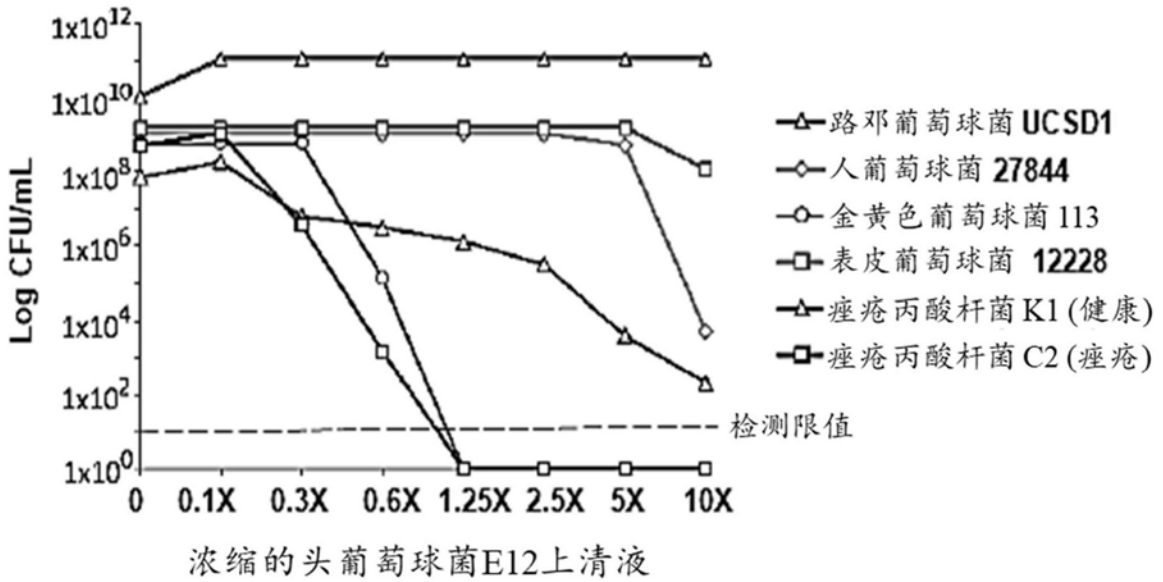


图5F

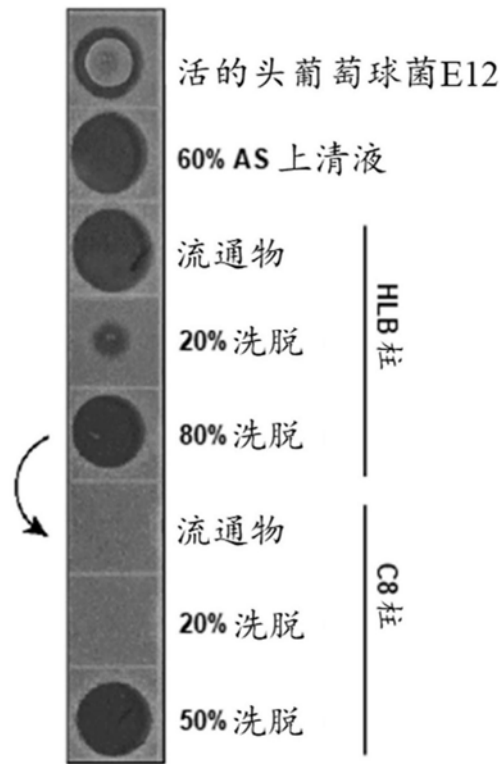


图6A

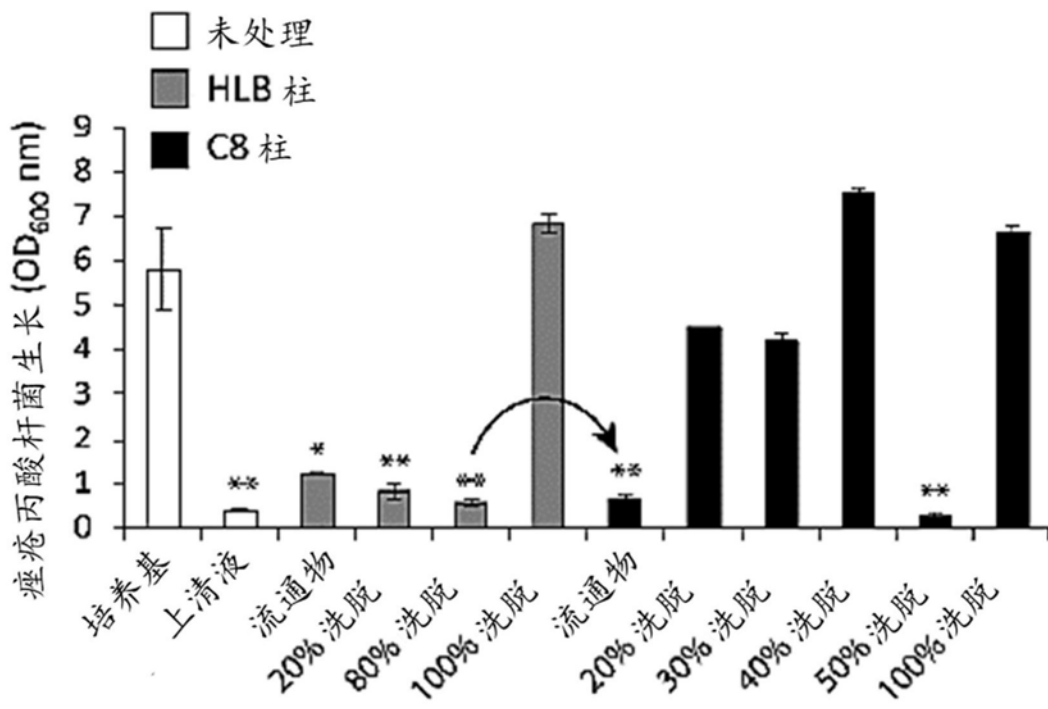


图6B

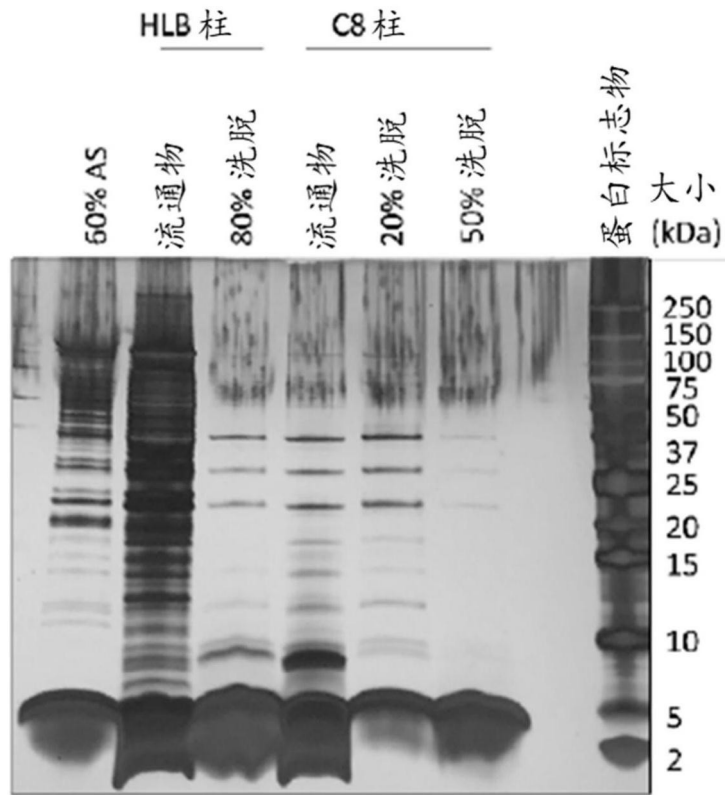


图6C

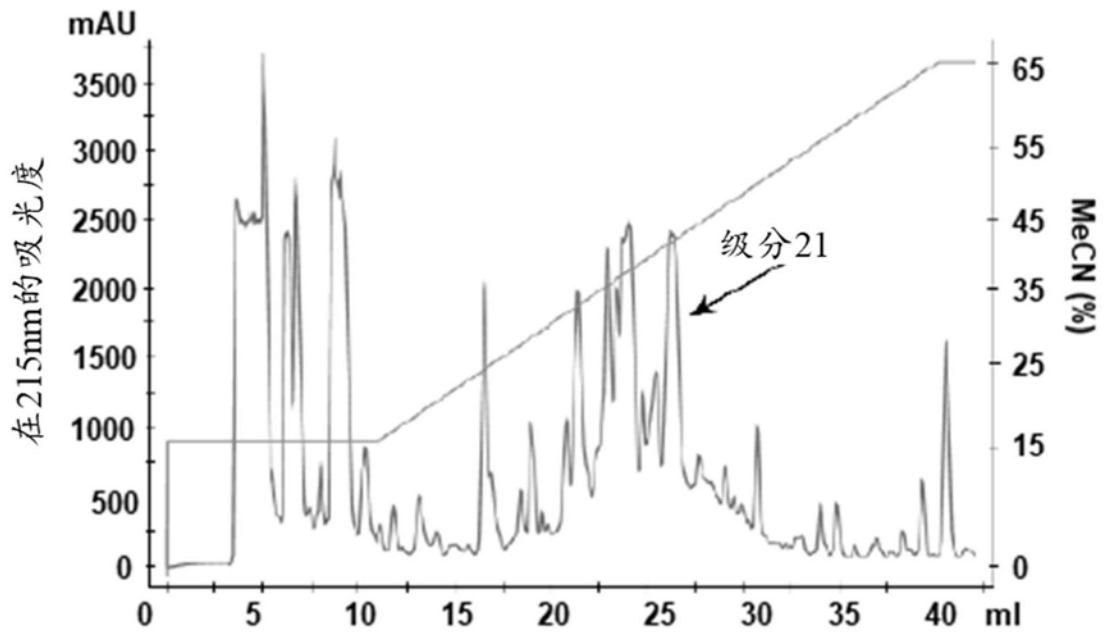


图6D

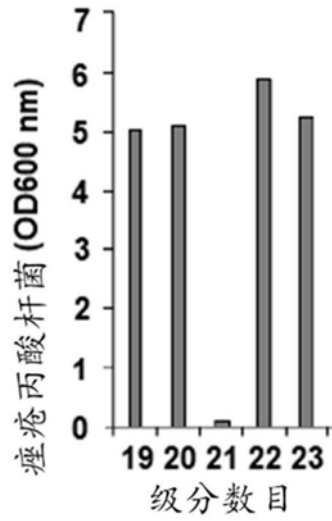


图6E

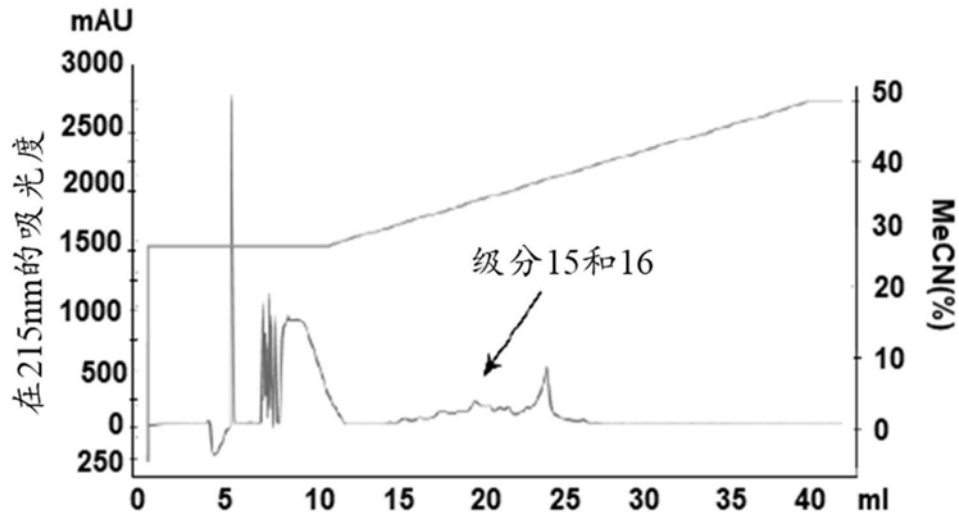


图6F

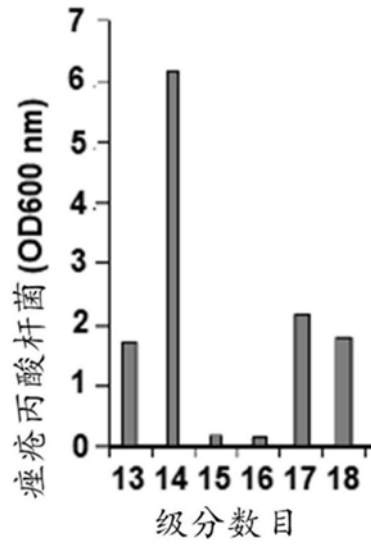


图6G

登录号	蛋白描述	覆盖率	肽	大小	级分 13	级分 14	级分 15	级分 16	级分 17	级分 18	评分
A0A0S4MC59	抗细菌蛋白 3 同系物 (PSM $\beta$ 6)	100	9	5		3.50E+ 06	1.60E+ 07	3.70E+ 06	2.00E+ 06	3.10E+ 06	33
A0A0U1EEI2	未表征的蛋白	87	5	3					9.80E+ 06	2.70E+ 06	24
A0A0S4MAE4	抗细菌蛋白 1 同系物 (PSM $\beta$ 4)	80	5	5		1.90E+ 07	2.50E+ 07	7.50E+ 05		1.60E+ 06	48
A0A0S4M5TD	抗细菌蛋白 1 同系物 (PSM $\beta$ 3)	82	6	5		7.00E+ 06	1.00E+ 06				23
A0A0U1E2B3	未表征的蛋白	34	3	7					2.40E+ 06	8.60E+ 05	10
A0A0S4MFS8	抗细菌蛋白 2 (PSM $\beta$ 1)	50	3	5			3.70E+ 06	3.60E+ 06	1.20E+ 06		5
A0A0S4MEM2	免疫优势的抗原 B	11	2	20	1.60E+ 07	2.00E+ 06	5.80E+ 06	3.70E+ 06		1.80E+ 05	26
A0A0U1E7C6	延伸因子 G	2	1	76	3.90E+ 06	6.40E+ 05					5

图6H

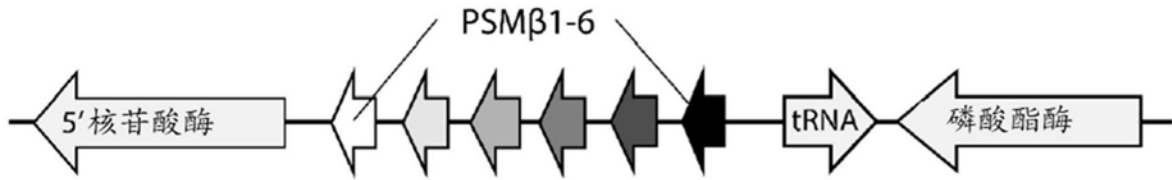


图7A

	10	20	30	40	
PSMβ1:	MTKLAEAIANTVKAGQDHDWAKLGTS	IVGIAENGI	IGLLGKVFGF		+1
PSMβ2:	MTKLAEAIANTVKAGQDHDWAKLGTS	IVGIAENGI	IGALS	KIFGG	+1
PSMβ3:	MQKLAEAIANTVKAGQDHDWAKLGTS	IVGIAENGI	INAITKIFGG		+1
PSMβ4:	MTKLAEAIANAVKAGQDQDWAKLGTS	IVGIAENGI	SLLGKVFGF		0
PSMβ5:	MQKLAEAIANTVKAGQDHDWTKLGTS	IVDIVENGV	SALTKVFGG		0
PSMβ6:	MEKLFDAIRNTVDAGINQDWT	KLGTS	IVDIVDNGVKVISKFIGA		-1
	* ** .** * .*	** .:***.***** *	.:***:	. * .*	

图7B

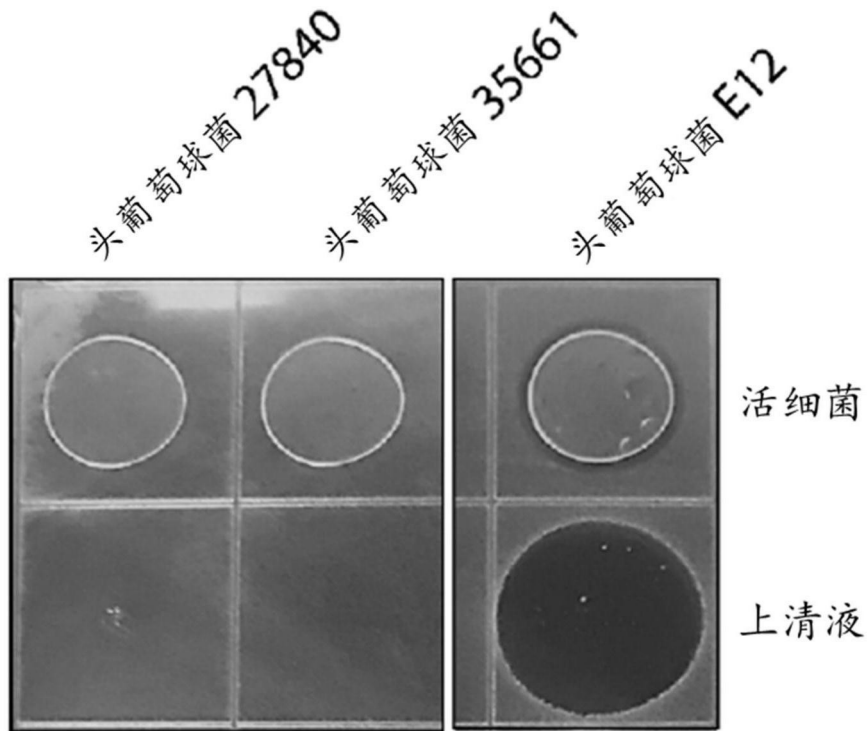


图7C

### PSM $\beta$ 1 (aa 1-44)

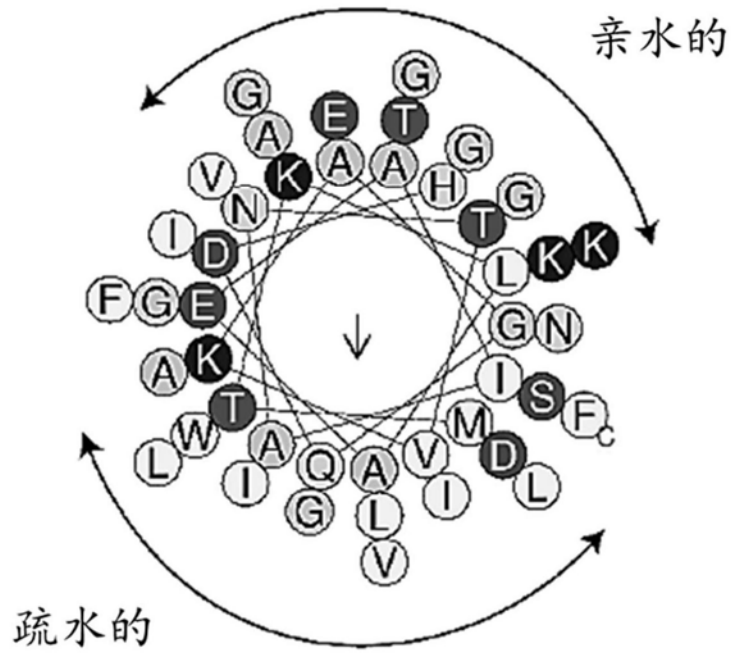


图7D

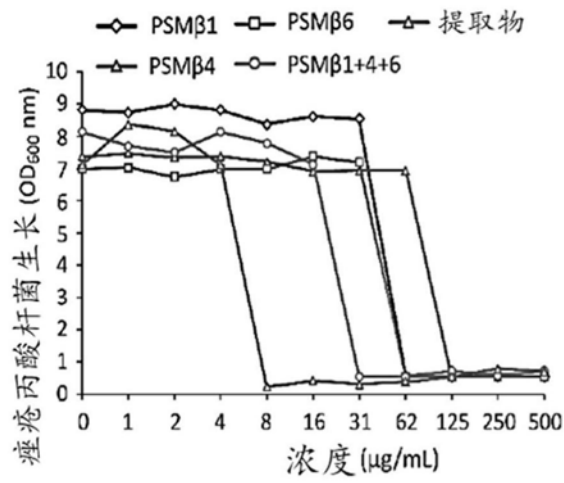


图8A

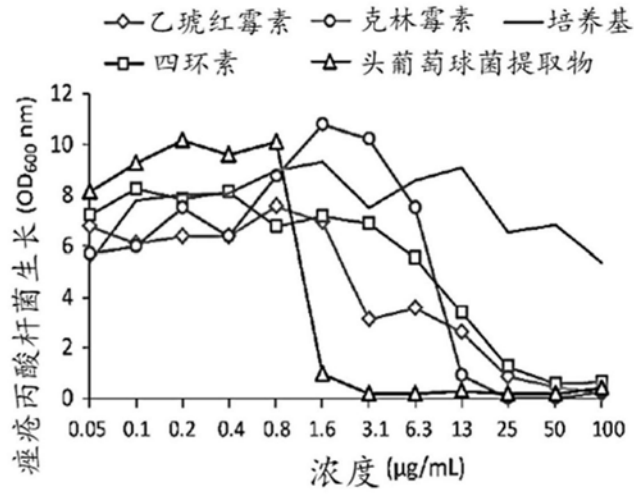


图8B

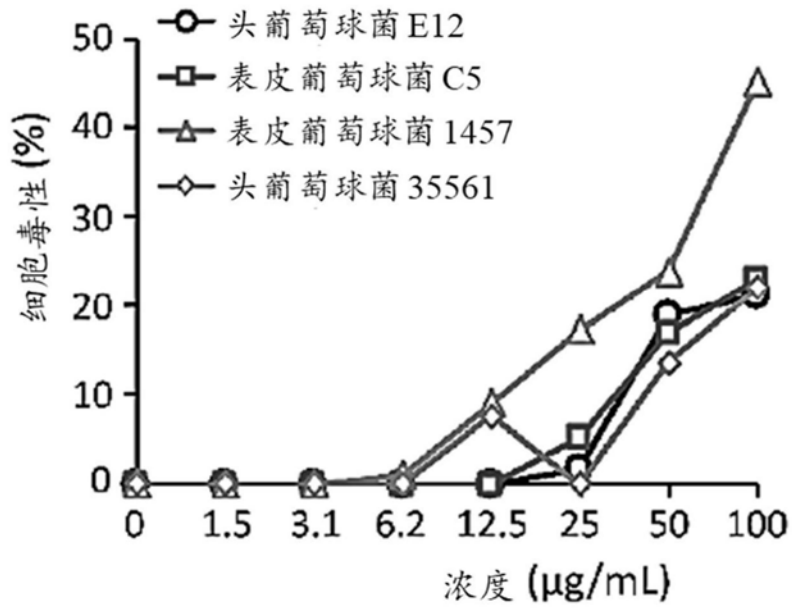


图8C

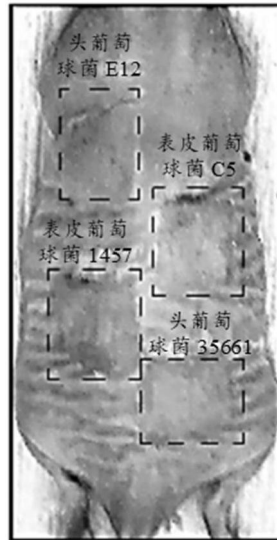


图8D

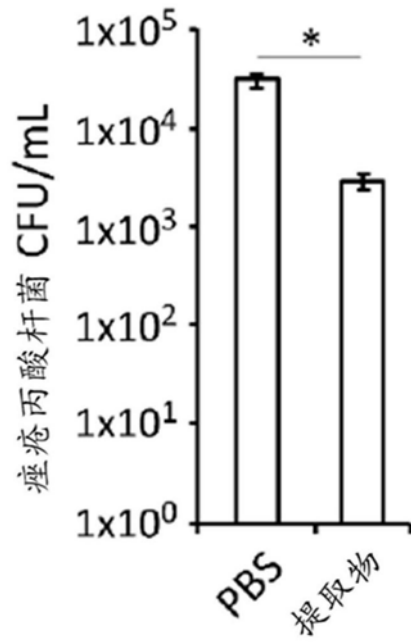


图8E

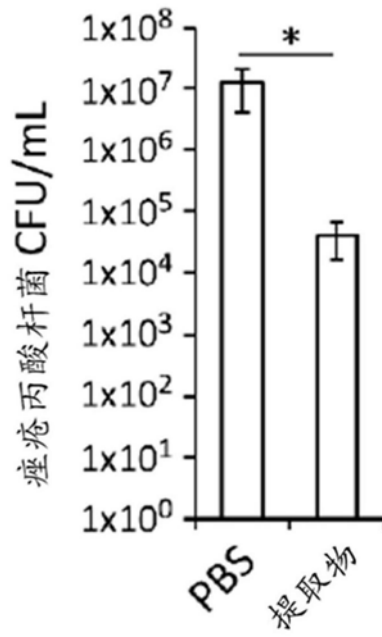


图8F

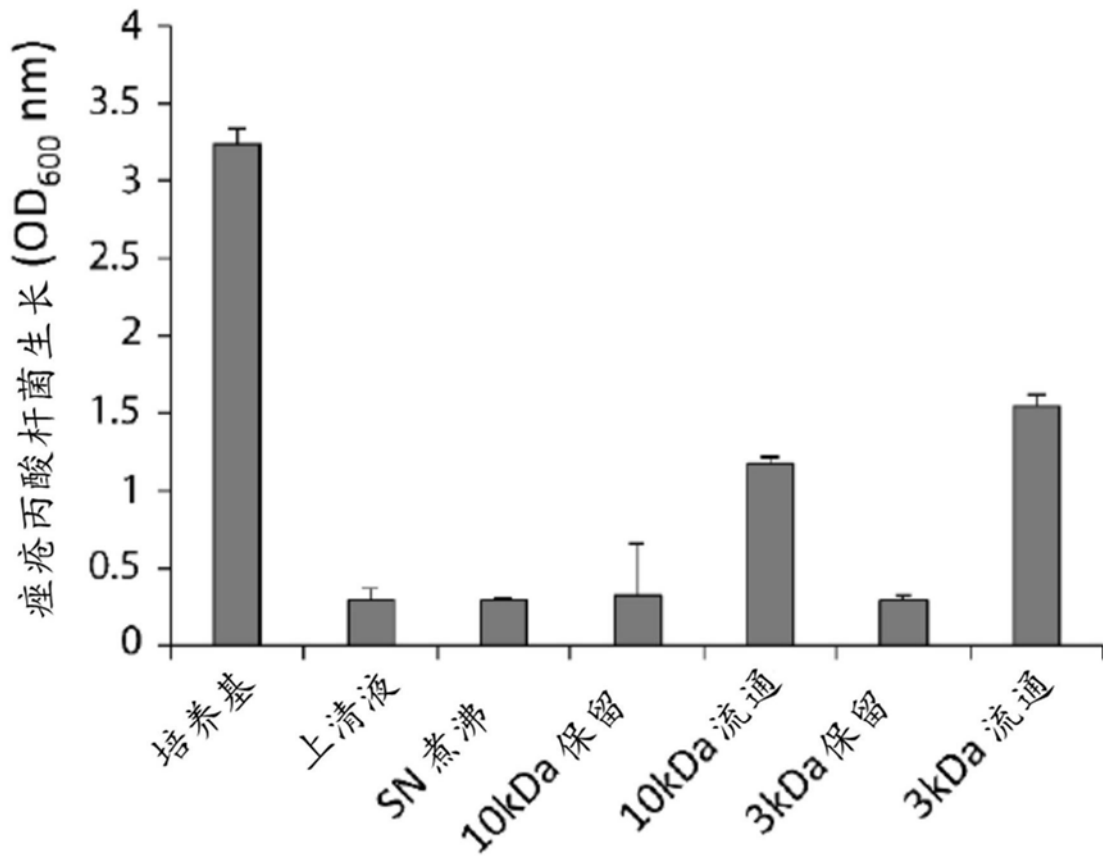


图9A

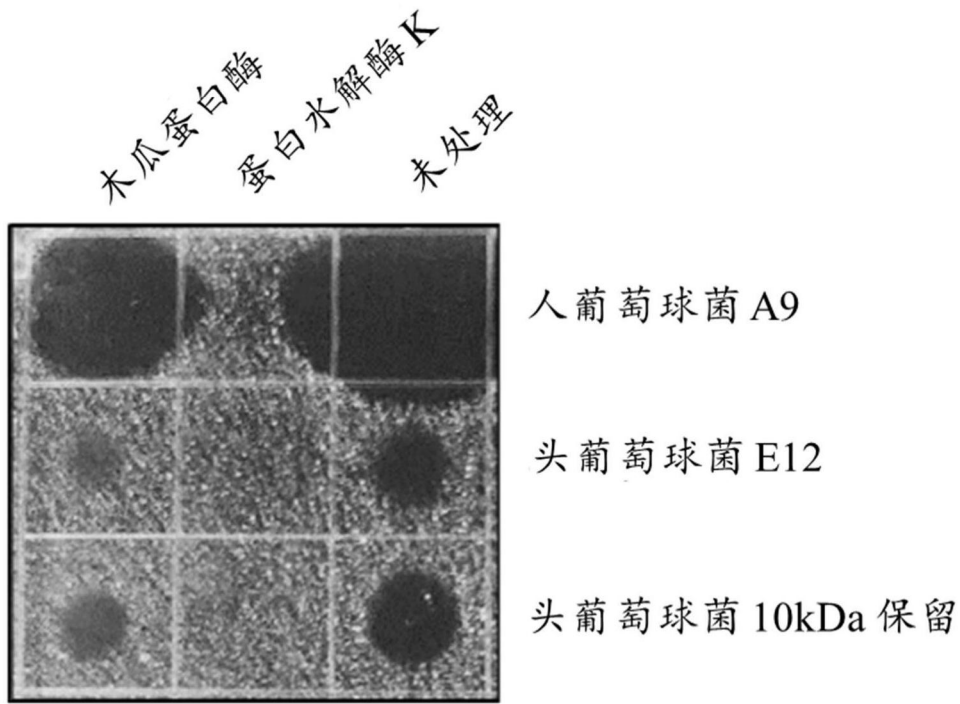


图9B

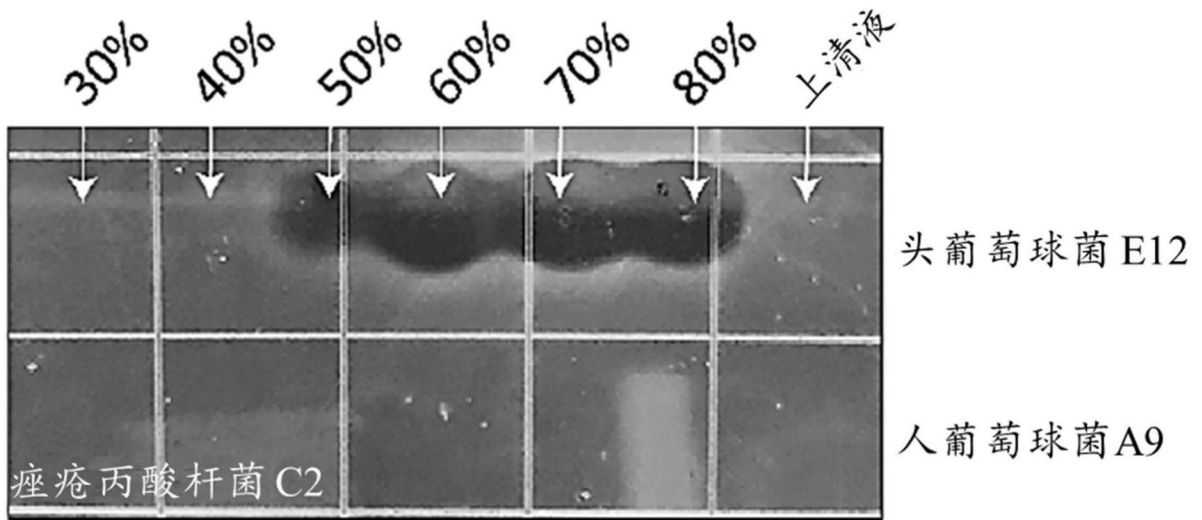


图9C

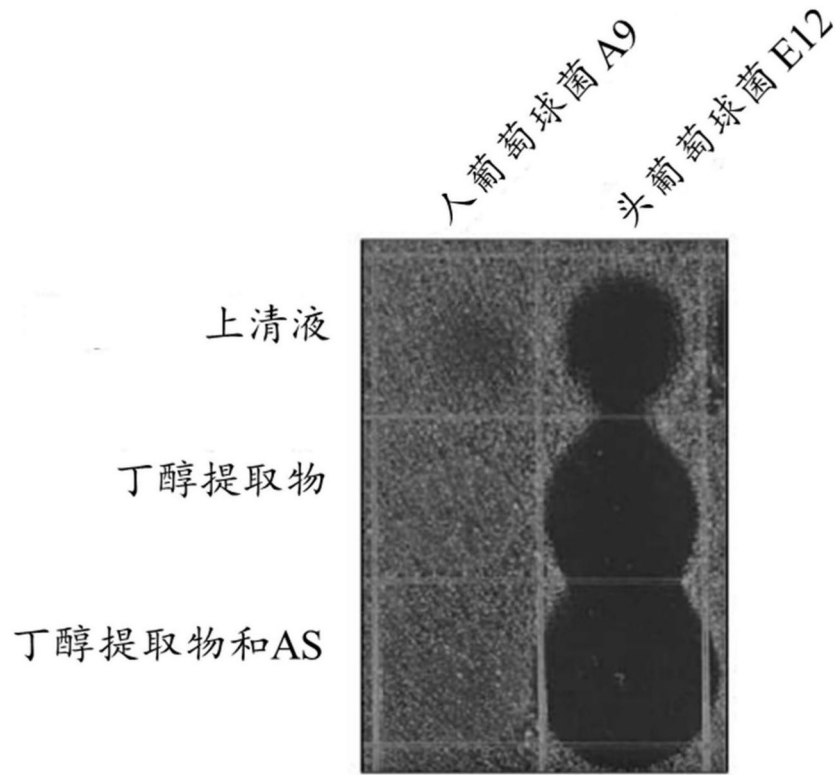


图10A

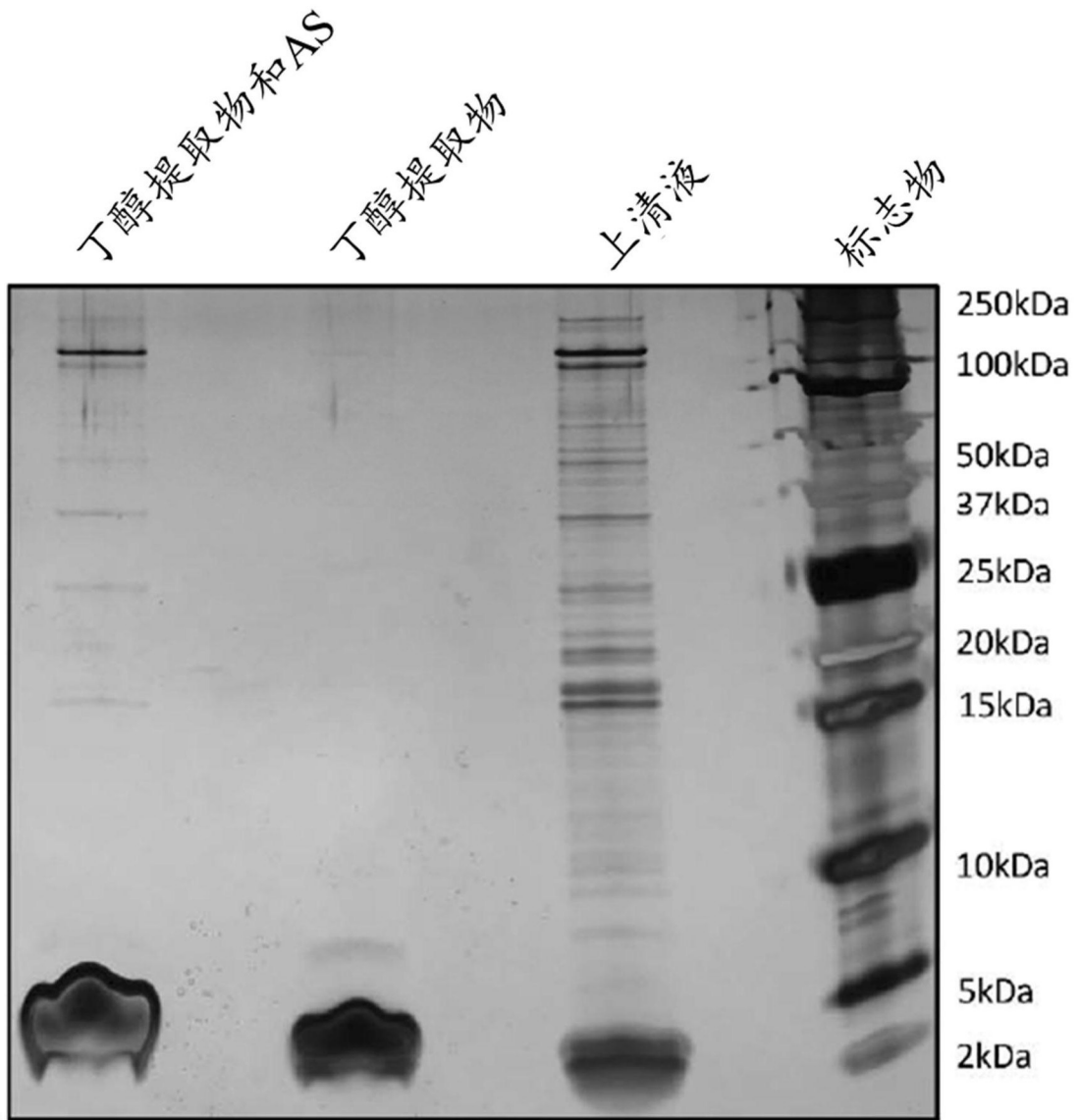


图10B

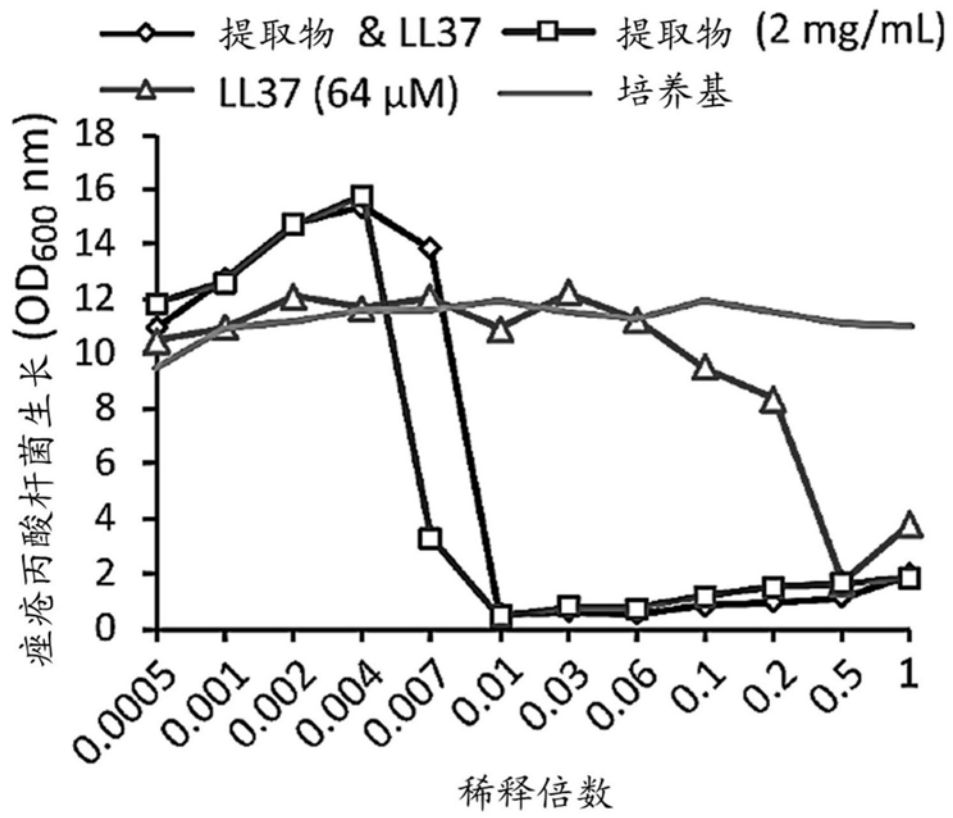


图11