(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109310626 A
(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780038148.6

(22)申请日 2017.04.18

(30)优先权数据
62/324,762 2016.04.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/028133 2017.04.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/184601 EN 2017.10.26

(71)申请人 美利坚合众国,由健康及人类服务部部长代表
地址 美国马里兰州

(72)发明人 伊恩·安瑟尼·迈尔斯
桑迪普·K·达塔

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 贺淑东

(51)Int.Cl.
A61K 9/00(2006.01)
A61K 9/06(2006.01)
A61K 35/74(2015.01)

权利要求书2页 说明书23页 附图16页

(54)发明名称

革兰氏阴性种治疗特应性皮炎的用途

(57)摘要

公开了药物组合物,其包含治疗有效量的纯化的活革兰氏阴性细菌和药学上可接受的载体。所述药物组合物被配制用于局部施用。还公开了使用这些药物组合物治疗特应性皮炎的方法。

CN 109310626 A

1.一种药物组合物,其包含治疗有效量的纯化的活革兰氏阴性细菌和药学上可接受的载体,其中

a)所述革兰氏阴性细菌的裂解物和/或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长;

b)所述革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞;

c)所述革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达;并且

d)当向免疫活性受试者的皮肤施用时,所述革兰氏阴性细菌是非致病性的,

其中所述药物组合物被配制用于局部应用于皮肤。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,还包含所述革兰氏阴性细菌生长所需的营养物。

3.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其被配制成乳膏、凝胶、油膏、泡沫或软膏。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌包括假单胞菌。

5.根据权利要求1-3中任一项所述的药物组合物,其中所述假单胞菌是铜绿假单胞菌。

6.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌包括玫瑰单胞菌。

7.根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述玫瑰单胞菌是粘膜玫瑰单胞菌。

8.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌包括浅黄假单胞菌、栖稻假单胞菌、败血泛菌和奥斯陆莫拉氏菌中的一种或多种。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌来自单一属。

10.根据权利要求1-8中任一项所述的药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌是单一种。

11.根据权利要求4-8中任一项所述的药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌是单一菌株。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌是从健康受试者的皮肤中纯化的或从健康受试者的皮肤中繁殖的。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中所述细胞因子是白细胞介素(IL)-6。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的药物组合物,其中刺激人角质形成细胞包括诱导产生编码IL-1β的mRNA、编码防卫素β4的mRNA、编码Cyp27b1的mRNA和/或编码维生素D受体的mRNA。

15.一种绷带,其包含根据权利要求1-14中任一项所述的药物组合物。

16.一种单位剂量分配器,其包含根据权利要求1-14中任一项所述的药物组合物,用于将预定剂量的所述组合物递送至受试者的皮肤。

17.一种喷雾瓶,其包含根据权利要求1-14中任一项所述的药物组合物。

18.根据权利要求1-14中任一项所述的药物组合物或根据权利要求15所述的绷带或根据权利要求16所述的单位剂量分配器或根据权利要求17所述的喷雾瓶在治疗特应性皮炎或改变患有特应性皮炎的受试者的微生物组中的用途。

19.一种治疗患有特应性皮炎的受试者的方法,其包括:

向所述受试者的皮肤施用治疗有效量的根据权利要求1-14中任一项所述的药物组合

物,从而治疗特应性皮炎。

20.一种改变患有特应性皮炎的受试者的皮肤中微生物群的相对丰度的方法,其包括向所述受试者的皮肤施用治疗有效量的根据权利要求1-14中任一项所述的药物组合物,从而改变所述受试者的皮肤中微生物群的相对丰度。

21.根据权利要求19或20所述的方法,其中所述受试者是人。

22.根据权利要求19-21中任一项所述的方法,其中所述受试者不是免疫受损的。

23.根据权利要求19-22中任一项所述的方法,其中所述受试者的皮肤是完整的。

24.一种用于治疗特应性皮炎的试剂盒,其包含:

a)含有治疗有效量的活革兰氏阴性细菌的内含物,其中

i)所述革兰氏阴性细菌、所述革兰氏阴性细菌的裂解物和/或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长;

ii)所述革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞;

iii)所述革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达;并且

iv)当向所述受试者的皮肤施用时,所述革兰氏阴性细菌是非致病性的;

b)包含药学上可接受的载体的容器;以及

c)关于将药学上可接受的载体中治疗有效量的纯化的活革兰氏阴性细菌局部应用于皮肤的说明书。

革兰氏阴性种治疗特应性皮炎的用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2016年4月19日提交的美国临时申请号62/324,762的权益,该申请通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开内容涉及皮肤病学领域,具体涉及局部应用活革兰氏阴性细菌治疗特应性皮炎的用途。

发明背景

[0003] 通常用于描述特应性皮炎的术语“湿疹”创造于古希腊,大致翻译为“沸出”(to boil out)。然而,现代科学认识到宿主和环境因素两者对这种疾病的贡献。该疾病的标志包括降低的屏障功能、降低的先天免疫激活和对金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)感染的易感性。STAT3、聚丝蛋白和与AD样表型相关的其他基因的单基因突变提示了诱因性宿主因子(Lyons等,Immunology and allergy clinics of North America 35,161-183(2015);2月在线发表Epub(10.1016/j.iac.2014.09.008))。宿主遗传影响可以通过局部类固醇或神经钙蛋白抑制剂进行治疗调节(Boguniewicz和Leung,J Allergy Clin Immunol 132,511-512e515(2013);8月在线发表(Epub)(10.1016/j.jaci.2013.06.030))。金黄色葡萄球菌有助于AD发病机理,并且可以被抗生素减轻(Boguniewicz和Leung,同上;Kobayashi等,Immunity 42,756-766)。最近的研究表明,皮肤微生物组在健康对照与AD患者之间存在显著差异,并且这些症状与共生多样性的丧失有关(Kong等,Genome research 22,850-859(2012);5月在线发表(Epub)(10.1101/gr.131029.111))。仍然需要治疗性地靶向这种生态失调和治疗特应性皮炎的方法。

发明内容

[0004] 本文公开了来自健康受试者皮肤的可培养的革兰氏阴性细菌(CGN)与先天免疫的激活、增强的屏障功能和金黄色葡萄球菌的控制相关。这些革兰氏阴性细菌用于治疗患有这种病况的受试者的特应性皮炎。

[0005] 在一些实施方案中,公开了包含治疗有效量的纯化的活革兰氏阴性细菌和药学上可接受的载体的药物组合物,其中,a)所述革兰氏阴性细菌的裂解物和/或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长;b)所述革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞;c)所述革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达;并且d)当向所述受试者的皮肤施用时,所述革兰氏阴性细菌是非致病性的。所述药物组合物被配制用于局部施用。

[0006] 还公开了使用这些药物组合物治疗局部皮炎的方法。

[0007] 基于以下参考附图对若干实施方案进行的详细描述,本发明的前述和其他特征和优点将变得更加明显。

附图说明

[0008] 图1A-图1D:CGN分离株在健康志愿者与AD患者之间在存在量以及金黄色葡萄球菌抑制方面不同。(A)HV(n＝26)和AD(n＝17)受试者中具有CGN分离株产量的个体的百分比。对具有多个CGN分离株的个体按照分离株进行计数,在HV中总计>100％;详见表1。(B)从HV和AD患者中分离的8株金黄色葡萄球菌在CGN上清液或对照培养基的存在下生长。每个数据点代表与培养基对照相比,来自一个CGN分离株的上清液对金黄色葡萄球菌生长的影响(HV分离株＝9,AD分离株＝7);形状代表金黄色葡萄球菌的来源:参与者的自体金黄色葡萄球菌,或来自HV或AD患者的一个金黄色葡萄球菌分离株。带有*符号的数据点代表为后续人类曝露和小鼠模型实验选择的一个来源于HV的CGN分离株和一个来源于AD的CGN分离株。或者,数据按CGN的种呈现,参见图4。(C)向健康小鼠耳朵共接种来自HV或AD患者的金黄色葡萄球菌(菌株SAAS9)和粘膜玫瑰单胞菌(R.mucosa)(Rm)或来自HV的铜绿假单胞菌10天。将第12天的耳朵均质化,并且针对CFU通过连续稀释进行平板接种。显示了与稀释剂(未添加CGN)对照相比的生长的变化百分比。(D)取自与C图相同的小鼠的CGN CFU产量。示出的数据是三个或更多个独立实验的组合(B)或代表两个独立实验(C-D),并且显示为平均值+sem。SA＝金黄色葡萄球菌,HV＝健康志愿者,AD＝特应性皮炎,CGN＝可培养的革兰氏阴性,Rm＝粘膜玫瑰单胞菌,Pa＝铜绿假单胞菌。通过Student’s t检验(B)或具有Bonferroni校正的ANOVA(C-D)确定显著性。

[0009] 图2A-图2D:来自HV的CGN增强先天免疫和屏障功能。(A)对健康对照的体内人水疱曝露的细胞因子分析,显示了与盐水对照孔(虚线)相比,针对来自健康对照的粘膜玫瑰单胞菌的代表性菌株与从AD患者中分离的粘膜玫瑰单胞菌的代表性菌株的细胞因子应答,N＝7。(B)图A中呈现的数据的配对分析,显示在暴露于HV来源的粘膜玫瑰单胞菌的水疱孔中的细胞因子产量减去同一个人类受试者中暴露于AD来源的粘膜玫瑰单胞菌的水疱孔中的细胞因子产量。(C)每天用来自HV或AD的1e7CFU粘膜玫瑰单胞菌接种小鼠耳朵,持续三天。示出了相对于GAPDH标准化的并与未处理的小鼠相比较的第5天IL-1β和聚丝蛋白的mRNA丰度,每组N＝4-5只小鼠。(D)在第0天剃光小鼠背部并以化学方式除去毛发。随后在每天施用来自HV或AD的1e7CFU粘膜玫瑰单胞菌后测量TEWL,每组N＝4-5只小鼠。显示的数据是7个独立实验的组合(A-B)或代表两个或多个独立实验(C-D),并且显示为平均值+sem(C-D)或平均值和个体参与者(A-B)。HV＝健康志愿者,AD＝特应性皮炎,CGN＝可培养的革兰氏阴性,Rm＝粘膜玫瑰单胞菌,FLG＝聚丝蛋白,IL-＝白细胞介素,TEWL＝经表皮水分丢失。通过具有Bonferroni校正的ANOVA确定与稀释剂对照(或如所指示的)相比的显著性。

[0010] 图3A-图3D:来自HV的CGN在AD样皮炎的MC903小鼠模型中改善了结果。(A-B)在MC903应用之前,每天用来自HV或AD患者的粘膜玫瑰单胞菌(Rm)或来自HV的铜绿假单胞菌(Pa)或金黄色葡萄球菌的SAAS9菌株接种小鼠的两只耳朵,共2天。随后每天将细菌与MC903共同施用,共13天。示出了每只耳朵在第14天的耳朵厚度(A)和血清总IgE水平(B);每组N＝4-8只小鼠。(C-D)用MC903处理小鼠14天以诱发AD样皮炎。从第13天开始,每天用1e6CFU的来自HV或AD患者的活粘膜玫瑰单胞菌(HVCGN和ADCGN)、在来自3e6CFU自体粘膜玫瑰单胞菌的上清液中重悬浮的1e6CFU来自同一HV的杀死的粘膜玫瑰单胞菌(死混合物)或来自1e7CFU的HV粘膜玫瑰单胞菌的上清液(Sup)处理小鼠,共3天。示出了第21天的可视发红(D)和耳朵厚度(C);每组N＝3-5只小鼠。示出的数据代表三个独立实验并显示为平均值+sem。

通过ANOVA确定显著性。

[0011] 图4:来自图1B的数据的种分析。从HV和AD患者中分离的8株金黄色葡萄球菌在CGN上清液或对照培养基的存在下生长。每个数据点代表与培养基对照相比,来自一个CGN分离株的上清液对金黄色葡萄球菌生长的影响(HV分离株=9,AD分离株=7)。通过Student t检验确定粘膜玫瑰单胞菌分离株之间的显著性。

[0012] 图5A-图5C:抽吸水疱方案。(A)3D打印的水疱诱发装置的图像。(B)抽吸后2小时的水疱结果。(C)将曝露室置于裸露的水疱区域上,将细菌分离株通过移液管放入每个曝露帽的中心。

[0013] 图6A-图6B:CGN对细胞因子和抗微生物肽应答的影响。用于体内人水疱曝露的细胞因子分析(A)和抗微生物肽(B)(参见补充方法),N=5。显示的数据是五个独立实验的组合,并显示为平均值+sem(B)或平均值和个体参与者(A)。

[0014] 图7A-图7G:CGN刺激原代人角质形成细胞。将原代人包皮角质形成细胞培养至汇合。每孔添加1e7CFU的革兰氏阴性细菌。24小时后从KC收获mRNA并通过PCR进行分析。数据代表三个独立实验并显示为平均值+sem,各个点代表与不同分离株一起培养的KC。通过Student t检验确定显著性。*=$p<0.05$,**=$p>0.01$。

[0015] 图8A-图8C:由HV-粘膜玫瑰单胞菌产生的脂质抑制金黄色葡萄球菌生长。(A)在评估如图1B中进行的金黄色葡萄球菌(菌株USA300)抑制之前,对来自粘膜玫瑰单胞菌和铜绿假单胞菌的上清液进行硫酸铵沉淀。(B)在存在或不存在溶血磷脂酰胆碱(LPC)或心磷脂的情况下培养三个金黄色葡萄球菌分离株,如图1B中所示与稀释剂(0)相比进行抑制评估。(C)在存在或不存在LPC的情况下培养人包皮角质形成细胞并进行评估。数据代表三个独立实验并显示为平均值±sem。通过具有Bonferroni校正的ANOVA确定显著性。*=$p<0.05$。

[0016] 图9:在MC903曝露期间CGN影响小鼠聚丝蛋白应答。如图所示,小鼠接受MC903处理并且接种革兰氏阴性分离株。在第14天从耳朵收获mRNA并通过PCR进行分析。示出的数据代表三个独立实验并显示为平均值+sem。示出了如通过ANOVA计算的与MC903的显著性差异。*=$p<0.05$。

具体实施方式

[0017] 本文公开了当与取自特应性皮炎患者的相同种相比时,来自健康对照的共生生物体在其免疫激活、屏障功能和抗微生物谱方面不同。因此,提供了治疗特应性皮炎患者的活的生物治疗方法。

[0018] 本文公开了可用于治疗特应性皮炎的配制用于局部施用的药物组合物。这些药物组合物包含治疗有效量的纯化的活革兰氏阴性细菌和药学上可接受的载体,其中,a)该革兰氏阴性细菌的裂解物和/或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长;b)该革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞;c)该革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达;并且d)当向受试者的皮肤施用时,该革兰氏阴性细菌是非致病性的。在一个具体的非限制性实例中,该革兰氏阴性细菌产生溶血磷脂酰胆碱。

[0019] 所述革兰氏阴性细菌可以来自任何种。因此,在某些实例中,如果该革兰氏阴性细菌是假单胞菌属(Pseudomonas),则该革兰氏阴性细菌可以是铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、浅黄假单胞菌(Pseudomonas luteola)或栖稻假单胞菌(Pseudomonas

orbyhabitans)。在其他实例中,如果该革兰氏阴性细菌是泛菌属(Pantoea),则该革兰氏阴性细菌可以是败血泛菌(Pantoea septica)。在另外的实例中,如果该革兰氏阴性细菌是莫拉氏菌属,则该革兰氏阴性细菌可以是奥斯陆莫拉氏菌(Moraxella osloensis)。在进一步的实例中,该革兰氏阴性细菌是玫瑰单胞菌属(Roseomonas),该革兰氏阴性细菌可以是粘膜玫瑰单胞菌(Roseomonas mucosa)。包含在药物组合物中的革兰氏阴性细菌可以来自单一菌株、单一种或单一属。或者,革兰氏阴性细菌的菌株、种和/或属的组合可以在所公开的方法中使用。

术语

[0020] 分子生物学中常见术语的定义可以在Benjamin Lewin,Genes V,Oxford University Press出版,1994(ISBN 0-19-854287-9);Kendrew等(编著),The Encyclopedia of Molecular Biology,Blackwell Science Ltd.出版,1994(ISBN 0-632-02182-9)以及Robert A.Meyers(编著),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)中找到。

[0021] 为了便于审阅本公开内容的各个实施方案,提供了以下对具体术语的解释:

[0022] 特应性皮炎:一种影响皮肤的慢性疾病。在特应性皮炎中,皮肤变得非常痒。挠抓导致发红、肿胀、开裂、“流出”透明的液体,以及最终的结痂和剥落(scaling)。在大多数情况下,在恶化期之后是缓解期。虽然很难确切地知道有多少人受特应性皮炎的影响,但估计有20%的婴儿和幼儿会经历这种疾病的症状。这些婴儿中的大约60%在成年期继续存在特应性皮炎的一种或多种症状。因此,在美国有超过1500万人具有这种疾病的症状。“病变区域”是受特应性皮炎影响的皮肤区域。通常,病变的特征在于皮肤干燥(干燥症)、发红、水疱、结痂或其任意组合。非病变区域不受特应性皮炎或任何其他皮肤病理的影响。

[0023] 动物:活的多细胞脊椎动物生物体,该类别包括例如哺乳动物和禽类。术语哺乳动物包括人和非人哺乳动物。类似地,术语“受试者”包括人类受试者和兽医学受试者。

[0024] 抗生素:杀死细菌、真菌或任何其他微生物或大幅减缓其生长的化合物或物质。“抗细菌剂”是杀死细菌或大幅减缓其生长的化合物或物质。

[0025] 抗细菌抗生素通常根据其作用机理、化学结构或活性谱进行分类。大多数针对细菌功能或生长过程。针对细菌的细胞壁(例如青霉素和头孢菌素)或细胞膜(例如,多粘菌素)或干扰必需细菌酶(例如喹诺酮和磺胺类)的那些是杀细菌的。针对蛋白质合成的那些(例如,氨基糖苷类、大环内酯类和四环素类)通常是抑制细菌的。其他的分类基于其靶标特异性。

[0026] “窄谱”抗细菌抗生素针对特定类型的细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌。“广谱抗生素”会影响许多不同类型的细菌。抗细菌剂还包括环状脂肽(诸如达托霉素)、甘氨酰环素(诸如替加环素)和噁唑烷酮(诸如利奈唑胺)。

[0027] 局部抗生素是应用于身体表面如皮肤或眼睛的抗生素。局部抗生素通常配制成软膏或乳膏,并含有活性剂,诸如大环内酯类抗生素(诸如红霉素)、磺胺类抗生素(诸如磺胺醋酰)、环肽(诸如杆菌肽和多粘菌素)、假单胞菌酸(诸如莫匹罗星)、氨基糖苷(诸如新霉素)或喹诺酮(诸如环丙沙星或氧氟沙星)、硝基咪唑(诸如甲硝唑)或药物组合(诸如杆菌肽/多粘菌素或新霉素/多粘菌素B/杆菌肽)。

[0028] 共生的:当生物体可以生活在同一环境中并且一方受益而不影响(伤害或有益于)另一方时,它们是共生的。皮肤微生物群中的细菌被认为与宿主如人共生。可以检测皮肤微生物群中存在的共生细菌种的数目,例如,使用16S核糖体RNA来鉴定存在的细菌种。

[0029] 上皮细胞:形成上皮的紧密堆积的细胞,如在皮肤中。有几种类型的上皮,包括单层鳞状上皮、单层立方上皮、单层柱状上皮、假复层柱状上皮、复层鳞状(非角化)上皮、复层立方上皮和变移上皮。

[0030] 革兰氏阴性细菌:具有多个外层膜,内细胞膜、薄肽聚糖层和含有脂多糖(LPS)的外膜的那些细菌。孔蛋白存在于外膜中,并且革兰氏阴性细菌不保留在细菌分类的革兰氏染色方法中使用的结晶紫染色剂。在外膜与细胞质成员之间存在充满周质的空间。S层直接附接至外膜。不存在磷壁酸或脂磷壁酸。大多数革兰氏阴性细菌(但不是全部)不形成孢子。典型的革兰氏阴性种包括但不限于那些最常与人类败血症和败血性休克相关的种,例如,如在HANDBOOK OF ENDOTOXINS,1:187-214,R.Proctor和E.Rietschel编著,Elsevier,Amsterdam(1984)中报道的。HSP60(GroEL)蛋白中的保守特征插入缺失(CSI)区分所有传统的革兰氏阴性细菌门(例如,变形菌门(Proteobacteria)、产水菌门(Aquificae)、衣原体门(Chlamydiae)、拟杆菌门(Bacteroidete)、绿菌门(Chlorobi)、蓝细菌(Cyanobacteria)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)、螺旋体门(Spirochetes)以及酸杆菌门(Acidobacteria))。革兰氏阴性细菌包括但不限于大肠杆菌(Escherichia coli)、肺炎克雷伯氏菌(Klebsiella pneumoniae)、变形菌属(Proteus)的种、假单胞菌属、沙门氏菌属和玫瑰单胞菌属。CGN是皮肤中发现的革兰氏阴性细菌。“组分”是指存在于革兰氏阴性细菌中或由革兰氏阴性细菌分泌的任何分子。因此,组分可以存在于裂解物或上清液中。在具体的非限制性实例中,革兰氏阴性细菌的(诸如包含在上清液中的)组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长。

[0031] 革兰氏阳性细菌:在细菌分类的革兰氏染色方法中保留结晶紫染色剂的细菌。这些细菌的特征在于在其膜中肽聚糖相对于LPS分子占优势,其能够诱导疾病病因和微生物感染特征性症状,类似于对革兰氏阴性种所描述的那些。

[0032] 异源的:源自不同的遗传来源或种。异源的多肽来源于不同的细胞或组织类型或来自接受体的不同种,并且克隆到通常不表达该多肽的细胞中。

[0033] 宿主细胞:载体可以在其中繁殖并表达其DNA的细胞。该细胞可以是原核的或真核的。该细胞可以是哺乳动物细胞,诸如人细胞。该术语还包括该宿主细胞的任何后代。应当理解,所有后代可能与亲本细胞不同,因为在复制过程中可能发生突变。然而,当使用术语“宿主细胞”时,包括这样的后代。

[0034] 微生物组:可持续及短暂地处于人体内和人体上的微生物群落(包括真核生物、古菌、细菌和病毒(包括细菌病毒(即噬菌体))的遗传内容物,其中“遗传内容物”包括基因组DNA、诸如微RNA和核糖体RNA的RNA、表观基因组、质粒和所有其他类型的遗传信息。

[0035] 免疫活性的:不具有免疫缺陷如体液(B细胞)免疫缺陷、T细胞缺陷或补体缺陷的受试者,诸如人。免疫活性受试者可以对细菌感染产生免疫应答。“免疫活性”是身体在暴露于抗原或细菌后产生正常免疫应答的能力。

[0036] 分离的或纯化的:“分离的”或“纯化的”细胞,如革兰氏阴性细菌,已经从存在该细胞如细菌的环境中的其他细胞或种中分离或纯化。因此,术语“分离的”包括通过诸如单细

胞克隆和培养等标准纯化方法纯化的细菌。该术语还包括通过重组方法制备的或从天然来源中分离的细菌。分离的(或纯化的)革兰氏阴性细菌通常从其他细菌如革兰氏阳性细菌中移取。分离的革兰氏阴性细菌可以是单一属、种和/或菌株的。如本文所用的术语“基本上纯化的”是指在样品中充分富集以使得其他类型的细菌(例如,革兰氏阳性细菌)耗尽的细菌属、种、菌株或多于一种细菌菌株(例如革兰氏阴性细菌)的混合物。可以针对感兴趣的细菌菌株或菌株混合物对样品进行基本上纯化或富集,以使得该样品有至少约70%、80%、85%、90%、95%、99%或更多的所需细菌属、种、菌株或少于约30%、20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的不希望的或其他细菌属、种或菌株。

[0037] 抑制或治疗疾病:抑制疾病如特应性皮炎是指抑制疾病的完全发展。在几个实例中,抑制疾病是指减轻症状或减小病变大小。“治疗”是指改善疾病的体征或症状如发红、肿胀、开裂、“流出”透明的液体以及最终的皮肤结痂和剥落的治疗性干预。

[0038] 白细胞介素(IL)-6:既充当促炎性细胞因子又充当抗炎性肌细胞因子(myokine)的IL。IL-6通过细胞表面I型细胞因子受体复合物发出信号,该复合物由配体结合IL-6Rα链(CD126)和信号转导组分gp130(也称为CD130)组成。CD130是包括白血病抑制因子(LIF)、睫状神经营养因子、制癌蛋白M、IL-11和心肌营养蛋白-1在内的几种细胞因子的共同信号转导物,并且在大多数组织中几乎普遍表达。相反,CD126的表达局限于某些组织。当IL-6与其受体相互作用时,它会触发gp130和IL-6R蛋白形成复合物,从而激活该受体。示例性氨基酸序列在Uniprot数据库登录号P05231(人)和P08505(小鼠)中提供,而编码IL-6的示例性mRNA序列(连同相应的蛋白质序列)在2016年1月5日的GENBANK®登录号NM_000600.4(人)以及2015年10月26日的NM_031168.2(小鼠)中提供,以上数据都通过引用并入本文。

[0039] 哺乳动物:该术语包括人和非人哺乳动物。类似地,术语“受试者”包括人类受试者和兽医学受试者。

[0040] 核酸:单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,除非另有限制,其包括以与天然存在的核苷酸相似的方式与核酸杂交的天然核苷酸的已知类似物。

[0041] 药剂:当适当地施用于受试者时能够诱导所需的治疗或预防效果的细菌如革兰氏阴性细菌、化学化合物、核酸分子或组合物。在一个实施方案中,药剂是革兰氏阴性细菌。

[0042] 药学上可接受的载体:可用于本发明的药学上可接受的载体是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences,E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,第15版(1975)描述了适用于本文公开的革兰氏阴性细菌的药物递送的组合物和制剂。

[0043] 通常,载体的性质取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射的流体,其包括药学上和生理学上可接受的流体如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为媒介物。对于固体组合物(例如,粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物学中性载体外,待施用的药物组合物还可含有少量无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如,乙酸钠或失水山梨糖醇单月桂酸酯。可接受的载体还包括乳膏和软膏,诸如用于局部施用。

[0044] 假单胞菌属:一种革兰氏阴性、需氧型γ-变形菌属,属于假单胞菌科,含有191个描述的种。该属的成员表现出大量的代谢多样性,因此能够定植(colonize)宽范围的生态

位。可以使用16S rRNA分析确定该属的成员。通常，该属的成员是具有一个或多个极性鞭毛的杆状、需氧、非孢子形成细菌，并且氧化酶和过氧化氢酶检验呈阳性。

[0045] 玫瑰单胞菌属：一种需氧、革兰氏阴性、杆状细菌，属于变形菌门，醋杆菌科(Acetobacteraceae)。在具体的非限制性实例中，通过评估来自细菌的16S rRNA的核酸序列，可以确定细菌属于玫瑰单胞菌属。根据种的不同，玫瑰单胞菌可以表现为丰满的球菌、球杆菌或短杆。大多数菌株在MacConkey琼脂上生长，在25℃、30℃和35℃以及介于两者之间的温度时发生生长。大多数菌株也在42℃生长。产生淡粉红色生长色素，参见BERGEY'S MANUAL®of Systemic Bacteriology，第2卷，The Proteobaceria，第3部分，Springer Science&Business Media，2006年7月25日，第88-89页，可从Google图书在线获得。

[0046] 治疗有效剂量：足以治疗特应性皮炎的剂量。在一个实施方案中，治疗有效剂量是足以减小病变大小的革兰氏阴性细菌的量。

[0047] 局部应用：局部应用的药剂仅应用于特定区域，而不是全身。在特定实例中，将组合物施用于皮肤，诸如病变皮肤。例如，药物组合物可以以药物制剂应用至病变部位。

[0048] 转导的：转导的细胞是已通过分子生物学技术将核酸分子引入其中的细胞。如本文所用，术语转导包括可以将核酸分子引入这样的细胞中的所有技术，包括用病毒载体转染，用质粒载体转化，以及通过电穿孔、脂质转染和粒子枪加速引入裸DNA。

[0049] 载体：引入宿主细胞中的核酸分子，从而产生转化的宿主细胞。载体可包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列，诸如复制起点。载体还可以包括一种或多种选择性标记基因和本领域已知的其他遗传元件。载体包括质粒载体，包括用于在革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌细胞中表达的质粒。示例性载体包括在革兰氏阴性细菌中表达的那些载体。

[0050] 除非另有说明，否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。除非上下文另有明确指示，否则单数术语“一种”、“一个”和“该”包括复数指示物。类似地，除非上下文另有明确指示，否则词语“或”意在包括“和”。还应理解，对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值都是近似的，其提供是为了描述。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可以在本公开的实践或测试中使用，但下文描述了合适的方法和材料。术语“包含”表示“包括”。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用以整体并入本文。如果发生冲突，将以本说明书(包括术语的解释)为准。另外，材料、方法和实施例仅仅是说明性的，而不是限制性的。

革兰氏阴性细菌

[0051] 本发明提供了包含分离的或基本上纯化的革兰氏阴性细菌和来自完整人皮肤或从这样的革兰氏阴性细菌繁殖的革兰氏阴性细菌的组合的药物组合物。当向患有特应性皮炎的受试者施用时，这些革兰氏阴性细菌具有有意义地提供健康微生物群的功能或催化栖息微生物群增多的能力。特别地，提供了治疗、预防、延缓或减轻特应性皮炎症状的组合物。

[0052] 这些组合物可包含从没有特应性皮炎的受试者，例如没有任何皮肤病理状况的健康受试者中分离的革兰氏阴性细菌。在一些实施方案中，该受试者没有任何病理状况，例如，皮肤和/或任何内脏器官的病理状况。该受试者可以是免疫活性的。革兰氏阴性细菌可以直接从受试者的皮肤中分离，或者可以使用用于培养细菌的标准技术在体外繁殖。然而，

革兰氏阴性细菌可以从如下所述的其他来源获得。该革兰氏阴性细菌可以是变形菌门，螺旋体科，肠杆菌目，多态梭杆菌(Fusobacterium polymorphum)或月形单胞菌(Selenomaonadales)。该革兰氏阴性细菌可以是双球菌、球杆菌、球菌或杆菌。

[0053] 在一些实施方案中，公开了被配制用于局部施用的组合物，其包含分离的或基本上纯化的活革兰氏阴性细菌和药学上可接受的载体，其中，a)该革兰氏阴性细菌的裂解物和/或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长；b)该革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞；c)该革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达；并且d)当向免疫活性受试者的皮肤施用时，该革兰氏阴性细菌是非致病性的。“组分”是指存在于革兰氏阴性细菌中或由革兰氏阴性细菌分泌的任何分子。在具体的非限制性实例中，包含由革兰氏阴性细菌分泌的分子的上清液在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长。

[0054] 本文提供了最初在没有特应性皮炎的受试者如健康受试者的人皮肤微生物群中发现的特定属、种、菌株以及菌株或种的组合。

[0055] 在一些实施方案中，这些种/菌株在体外试验中能够显著降低皮肤病原体复制速率。这些种/菌株能够提供安全有效的手段，通过该手段影响这类细菌病原体的生长、复制以及疾病严重程度。在一些实施方案中，提供具有排除致病细菌的能力的细菌组合物。

[0056] 证明了示例性细菌组合物能降低特定病原体如金黄色葡萄球菌的生长速率。可以使用估计人微生物群内成分的生态控制因子(ECF)的方法鉴定具有持久降低皮肤中金黄色葡萄球菌的能力的革兰氏阴性细菌。通过使用体外试验评估给定共生菌株或菌株组合对给定病原体(例如金黄色葡萄球菌)的拮抗活性来确定ECF，从而导致在添加的共生菌株的各种浓度下观察到生态控制水平。共生菌株或菌株组合的ECF在某种程度上类似于在抗生素评估中使用的长期最小抑制浓度(MIC)评估。ECF允许针对共生菌株和菌株组合拮抗皮肤病原体的能力对其相对效力评估和排序。共生菌株或菌株组合的ECF可以通过在体外试验中评估能够介导目标病原体(例如，金黄色葡萄球菌)的给定百分比抑制(例如，至少10％、20％、50％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％)的该组合物的浓度来计算。

[0057] 在一些实施方案中，所述革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞。该革兰氏阴性细菌可在体内和/或体外刺激角质形成细胞。该革兰氏阴性细菌通过增加参与上皮屏障功能的免疫介质或分子的mRNA的转录(诸如编码IL-1β的mRNA、编码防卫素β4的mRNA、编码Cyp27b1的mRNA、编码维生素D受体的mRNA、编码闭合蛋白的mRNA、编码密蛋白1的mRNA和/或编码聚丝蛋白的mRNA的产生)来刺激角质形成细胞。

[0058] 在其他的实施方案中，所述革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达。人细胞包括但不限于皮肤的细胞，诸如成纤维细胞和角质形成细胞。细胞因子包括但不限于白细胞介素(IL)，诸如IL-6和IL-1β。

[0059] 在其他实施方案中，所述革兰氏阴性细菌产生溶血磷脂酰胆碱。

[0060] 在进一步的实施方案中，当向受试者如免疫活性受试者的皮肤施用时，所述革兰氏阴性细菌是非致病性的。通常，该革兰氏阴性细菌在向完整的人皮肤施用时不会引起任何感染。因此，在治疗后未观察到发病机理。

[0061] 包含在所公开的组合物中的活革兰氏阴性细菌可以是任何属。在一些实施方案中，该革兰氏阴性细菌是假单胞菌。在另外的实施方案中，该革兰氏阴性细菌是泛菌或莫拉氏菌。在其他实施方案中，该革兰氏阴性细菌是玫瑰单胞菌。

[0062] 来自单一属的细菌可包含在药物组合物中。或者，属的组合可以包含在药物组合物中并且可以在所公开的方法中使用。因此，该组合物可包含，例如，1、2、3、4或5个属的革兰氏阴性细菌。在一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活玫瑰单胞菌。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活假单胞菌。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活玫瑰单胞菌和活假单胞菌。

[0063] 所述活革兰氏阴性细菌可以来自任何种。因此，在某些实例中，如果该革兰氏阴性细菌是假单胞菌属，则该革兰氏阴性细菌可以是铜绿假单胞菌、浅黄假单胞菌或栖稻假单胞菌。在其他实例中，如果该革兰氏阴性细菌是泛菌属，则该革兰氏阴性细菌可以是败血泛菌。在另外的实例中，如果该革兰氏阴性细菌是莫拉氏菌属，则该革兰氏阴性细菌可以是奥斯陆莫拉氏菌。在进一步实例中，该革兰氏阴性细菌是玫瑰单胞菌属，该革兰氏阴性细菌可以是Roseomonas aerilata、Roseomonas aerophila、Roseomonas aestuarii、Roseomonas alkaliterrae、Roseomonas aquatic、Roseomonas cervicalis、Roseomonas fauriae、Roseomonas frigidaquae、Roseomonas gilardii、Roseomonas lacus、Roseomonas ludipueritiae、粘膜玫瑰单胞菌、Roseomonas pecuniae、Roseomonas rhizosphaerae、Roseomonas riguiloci、Roseomonas rosea、Roseomonas soli、Roseomonas stagni、Roseomonas terrae或Roseomonas vinacea。在一个具体的非限制性实例中，该革兰氏阴性细菌是粘膜玫瑰单胞菌。

[0064] 单一种的革兰氏阴性细菌可包含在药物组合物中。或者，革兰氏阴性细菌种的组合可包含在药物组合物中并且在所公开的方法中使用。因此，该组合物可包含1、2、3、4或5个种的革兰氏阴性细菌。在一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活粘膜玫瑰单胞菌。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活铜绿假单胞菌。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活粘膜玫瑰单胞菌和活铜绿假单胞菌。

[0065] 使用的活革兰氏阴性细菌可以来自单一菌株。或者，该革兰氏阴性细菌可来自多个菌株。单一菌株的革兰氏阴性细菌或革兰氏阴性细菌菌株的组合可包含在所公开的组合物中并且在所公开的方法中使用。因此，该组合物可包含1、2、3、4或5个种的革兰氏阴性细菌。在一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活粘膜玫瑰单胞菌的单一菌株。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活粘膜玫瑰单胞菌的2、3、4或5个菌株。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活铜绿假单胞菌的单一菌株。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活铜绿假单胞菌的2、3、4或5个菌株。在另一个具体的非限制性实例中，该组合物包含活粘膜玫瑰单胞菌菌株和活铜绿假单胞菌菌株。在其他具体的非限制性实例中，该组合物包含活粘膜玫瑰单胞菌的2、3、4或5个菌株和活铜绿假单胞菌的2、3、4或5个菌株。

[0066] 因此，药物组合物可包含两种类型的革兰氏阴性细菌(“二元组合”或“二元对”)或两种以上类型的革兰氏阴性细菌。在一些实施方案中，药物组合物可包含至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种或至少21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39种或至少40种、至少50种或多于50种类型的革兰氏阴性细菌，如按照属、种和/或操作分类单位(OTU)如菌株所定义的。通常，单独或组合的属、种或菌株具有以下特征：a)该革兰氏阴性细菌的裂解物和/

或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长;b)该革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞;c)该革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达;并且d)当向受试者的皮肤施用时,该革兰氏阴性细菌是非致病性的。

[0067] 在某些实施方案中,用异源核酸诸如以质粒的形式转化所述革兰氏阴性细菌。表达载体可以编码任何感兴趣的蛋白质。可以用标准技术如电穿孔或磷酸钙介导的转染将外源DNA引入细菌细胞中。

[0068] 在一些实施方案中,异源核酸包含在质粒中。质粒通常包含在位置上和顺序上与其他必需的遗传元件一起定向的多个遗传元件,以使得核酸盒中的核酸可以得到转录并且必要时在转染的细胞中得到翻译。质粒包括作为来源于质粒载体、粘粒或噬菌粒的DNA的核酸,其中可插入一种或多种异源核酸。异源核酸可以编码感兴趣的蛋白质,该蛋白质可以可操作地连接至用于在革兰氏阴性细菌中表达的启动子。

[0069] 质粒通常包含一个或多个独特的限制性位点。另外,质粒可赋予宿主生物体一些明确定义的表型,该表型是可选择的或易于检测的,诸如抗药性。因此,质粒可包含表达盒,其中多肽被编码。表达包括用质粒有效转录插入的基因、核酸序列或核酸盒。

[0070] 在一个实施方案中,当将环状质粒转移到细菌细胞中时,它可以是不同于正常细菌基因组并且对于细菌细胞在非选择性条件下的存活不是必需的自主复制的染色体外DNA分子。如本文所用的术语"持久表达"是指将基因与遗传元件一起引入细胞中,该遗传元件能够使遗传物质在细胞中进行附加型(染色体外)复制和/或维持。这可以导致细胞的明显稳定的转化,而不将新的遗传物质整合到宿主细胞的染色体中。

[0071] 质粒还可以将遗传物质引入所靶向的细胞的染色体中,该遗传物质在染色体中整合并成为该细胞中遗传物质的永久组分。稳定引入后的基因表达可以永久地改变由复制引起的细胞及其后代的特征,导致稳定的转化。

制备用于施用的细菌组合物的方法

[0072] 用于生产细菌组合物的方法可包括与一个或多个混合步骤组合的三个主要处理步骤。这些步骤是:生物体建库(banking)、生物体产生和保存。

[0073] 对于建库,细菌组合物中包含的菌株可以(1)直接从标本(诸如但不限于人皮肤)中分离或从库存中取出,(2)任选地在支持生长的营养琼脂或液体培养基上培养以产生活的生物质,以及(3)是任选地在长期储存中以多个等分试样保存的生物质。

[0074] 所述革兰氏阴性细菌可以从人类受试者的皮肤中分离。通常,该人类受试者没有特应性皮炎或任何其他皮肤状况。因此,该受试者可以是健康的,意味着他们没有任何其他病理状况。该受试者可以是免疫活性的。然而,革兰氏阴性细菌可以从其他来源如商业来源或环境样品中分离,并在本文公开的方法和组合物中使用。如本文所公开的,任何革兰氏阴性细菌都是有用的,条件是:a)该革兰氏阴性细菌的裂解物和/或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长;b)该革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞;c)该革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达;d)当向受试者的皮肤施用时,该革兰氏阴性细菌是非致病性的。该革兰氏阴性细菌随后可以繁殖。

[0075] 在使用培养步骤的实施方案中,琼脂或液体培养基可包含提供必需元素的营养物和支持生长的特定因子。非限制性实例是由0.5g/L右旋糖、0.5g/L酵母提取物、0.5g/L胨蛋白胨、0.5g/L酪蛋白氨基酸、0.3g/L磷酸氢二钾、50mg/L硫酸镁、0.3g/L丙酮酸钠组成的

培养基。多种微生物培养基和变化形式是本领域已知的(例如,R.M.Atlas,Handbook of Microbiological Media(2010)CRC Press)。培养基可以在开始时添加到培养物中,可以在培养期间添加,或者可以间歇地/连续地流过培养物。种/菌株可以单独培养,或作为包含细菌种/菌株的整个集合来培养。作为一个实例,第一菌株可以与第二菌株一起在混合连续培养中以低于任一细胞的最大生长速率的稀释率进行培养,以防止培养物从培养中洗出。

[0076] 将培养物在有利条件下温育足以构建生物质的时间。对于供人类使用的细菌组合物,通常在约32-37℃、与正常的人类生态位相似的值的pH和其他参数下进行。可以主动地控制环境。

[0077] 当培养物已产生足够的生物质时,可以将其保存以供建库。可以将生物体置于保护免受冷冻(诸如通过添加冷冻保护剂)、干燥和/或渗压震扰(诸如通过添加渗透保护剂)影响的化学环境中,将其分配到多个(任选地相同的)容器中以形成均匀的库,然后任选地处理培养物以供保存。容器通常是不可渗透的并且具有确保与环境隔离的封闭物。冷冻保存可以通过在超低温(例如,约-70℃或低于约-70℃)下冷冻液体来完成。干燥保存通过蒸发(在喷雾干燥或冷却干燥的情况下)或通过升华(例如,对于冷冻干燥、喷雾冷冻干燥)从培养物中除去水。去除水可改善细菌组合物在较高温度下的长期储存稳定性。菌株和/或种可以单独培养和保存,或者种/菌株可以混合在一起用于建库。

[0078] 在一个非限制性实例中,为了冷冻保存,可以通过离心收获细菌培养物以从培养基中沉淀细胞,将上清液倾析并用含有15%甘油的新鲜培养液替换。然后将培养物等分到1mL冷冻管中,密封,并置于-80℃或-70℃以保持长期活力。该程序在从冷冻储存中恢复后实现了可接受的活力。

[0079] 可以使用类似于建库的步骤(包括培养基组成和培养条件)进行生物体生产。可以使用大规模操作进行生产,特别是用于临床开发或商业生产。在较大规模上,在最终培养之前可能存在细菌的几次传代培养。在培养结束时,收获培养物以配制成用于施用的剂型。这可以包括浓缩、除去不需要的培养基组分和/或引入化学环境中,该化学环境保持细菌组合物并使其对于经由所选途径施用而言是可接受的。对于一个非限制性实例,可以用由15%蔗糖水溶液组成的保存介质将细菌组合物培养至10^{10}CFU/mL的浓度。

局部制剂和治疗方法

[0080] 提供了包含所公开的分离的或基本上纯化的革兰氏阴性细菌的药物组合物,其中该药物组合物被配制用于局部施用。这些组合物包含药学上可接受的载体,并任选地包含另外的化合物。在一些实施方案中,该药物组合物包含另外的活性和/或非活性材料以产生最终产物,该最终产物可以是单剂量单位或多剂量形式。

[0081] 可以使用本文公开的方法治疗患有特应性皮炎的任何受试者。受试者可以是人。在一些实施方案中,受试者是儿童,诸如11岁、10岁、9岁、8岁、7岁、6岁、5岁、4岁、3岁、2岁或1岁或更小的受试者。受试者可以是婴儿,诸如小于1岁的受试者。在其他实施方案中,受试者是成年人,例如年龄为18岁、大于20岁、25岁、30岁、35岁、40岁、45岁、50岁、55岁或60岁的受试者。受试者可以是年长者,诸如年龄大于65岁、70岁、75岁或80岁的受试者。受试者可以是免疫受损的或可以具有完整的免疫系统(免疫活性的)。

[0082] 在一些实施方案中,所述药物组合物可包含缓冲剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂、压实剂、润滑剂、分散增强剂和/或着色剂中的一种或多种。合适的缓冲剂的非限制性实例包括

柠檬酸钠、碳酸镁、碳酸氢镁、碳酸钙和碳酸氢钙。合适的防腐剂的非限制性实例包括抗氧化剂，诸如α-生育酚和抗坏血酸盐、对羟基苯甲酸酯、氯丁醇和苯酚。合适的粘合剂的非限制性实例包括蔗糖、淀粉、预胶化淀粉、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯基噁唑烷酮、聚乙烯醇、C_{12}-C_{18}脂肪酸醇、聚乙二醇、多元醇、糖类、寡糖及其组合。合适的润滑剂的非限制性实例包括硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、氢化植物油、sterotex、聚氧乙烯单硬脂酸酯、滑石、聚乙二醇、苯甲酸钠、十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸镁和轻质矿物油。如果使用并且当溶解在组合物的水性组分中时，pH缓冲剂可以提供5至7的pH(例如约pH 5.5)。

[0083] 所述药物组合物可包含其他成分，诸如以便维持细菌的生长。在一些实施方案中，该药物组合物可包含营养物。在一些实施方案中，该组合物包含至少一种碳水化合物。“碳水化合物”是指糖或糖的聚合物。术语“糖类”、“多糖”、“碳水化合物”和“寡糖”可互换使用。大多数碳水化合物是具有许多羟基的醛或酮，通常在分子的每个碳原子上有一个羟基。碳水化合物通常具有分子式$C_nH_{2n}O_n$。碳水化合物可以是单糖、二糖、三糖、寡糖或多糖。最基本的碳水化合物是单糖，诸如葡萄糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、核糖、阿拉伯糖、木糖和果糖。二糖是两个连接的单糖。示例性的二糖包括蔗糖、麦芽糖、纤维二糖和乳糖。通常，寡糖包括三至六个单糖单元(例如，棉子糖、水苏糖)，而多糖包括六个或更多个单糖单元。示例性多糖包括淀粉、糖原和纤维素。碳水化合物可包含修饰的糖单元，诸如其中除去羟基的2'-脱氧核糖、其中羟基被氟取代的2'-氟核糖或N-乙酰基葡糖胺——一种含氮形式的葡萄糖(例如，2'-氟代核糖、脱氧核糖和己糖)。碳水化合物可以以许多不同的形式存在，例如，构象异构体、环状形式、非环形式、立体异构体、互变异构体、异头物和异构体。

[0084] 在一些实施方案中，所述组合物包含至少一种脂质。“脂质”包括脂肪、油、甘油三酯、胆固醇、磷脂、任何形式的脂肪酸，包括游离脂肪酸。脂肪、油和脂肪酸可以是饱和的、不饱和的(顺式或反式)或部分不饱和的(顺式或反式)。在一些实施方案中，脂质包含至少一个选自月桂酸(12:0)、肉豆蔻酸(14:0)、棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、十七烷酸(17:0)、十七碳烯酸(17:1)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)、亚麻酸(18:3)、十八碳四烯酸(18:4)、花生酸(20:0)、二十碳烯酸(20:1)、二十碳二烯酸(20:2)、二十碳四烯酸(20:4)、二十碳五烯酸(20:5)(EPA)、二十二烷酸(22:0)、二十二碳烯酸(22:1)、二十二碳五烯酸(22:5)、二十二碳六烯酸(22:6)(DHA)和二十四烷酸(24:0)的脂肪酸。

[0085] 在一些实施方案中，所述组合物包含至少一种补充矿物质或矿物质来源。矿物质的实例包括但不限于：氯化物、钠、钙、铁、铬、铜、碘、锌、镁、锰、钼、磷、钾和硒。任何前述矿物质的合适形式包括可溶性矿物盐、微溶性矿物盐、不溶性矿物盐、螯合矿物质、矿物质络合物、非反应性矿物质如羰基矿物质和还原矿物质，及其组合。

[0086] 在其他的实施方案中，所述组合物包含至少一种补充维生素。所述至少一种维生素可以是脂溶性或水溶性维生素。合适的维生素包括但不限于维生素C、维生素A、维生素E、维生素B12、维生素K、核黄素、烟酸、维生素D、维生素B6、叶酸、吡哆醇、硫胺素、泛酸和生物素。任何前述维生素的合适形式是维生素的盐、维生素的衍生物、与维生素具有相同或相似活性的化合物以及维生素的代谢物。

[0087] 所述组合物中可包含各种其他添加剂。这些添加剂包括但不限于抗氧化剂、收敛剂、香料、防腐剂、润肤剂、颜料、染料、湿润剂、推进剂和防晒剂，以及在药学上或其他方面

可能希望其存在的其他类别的材料。可选的添加剂的非限制性实例如下：诸如山梨酸盐的防腐剂；诸如异丙醇和丙二醇的溶剂；诸如薄荷醇和乙醇的收敛剂；诸如聚亚烷基甲基葡萄糖苷的润肤剂；诸如甘油的湿润剂；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醇酯60的乳化剂；山梨糖醇和诸如聚乙二醇的其他多羟基醇；诸如辛基甲氧基肉桂酸酯(可以商品名Parsol MCX购得)和丁基甲氧基苯甲酰基甲烷(可以商标名Parsol 1789购得)的防晒剂；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、ζι-生育酚、Zˆ-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、乳木果油的液体部分、葵花油)、动物油(例如全氢鲨烯)、合成油、硅油或蜡(例如，环甲硅油和二甲硅油)、氟化油(通常是全氟聚醚)、脂肪醇(例如鲸蜡醇)和蜡(例如蜂蜡、巴西棕榈蜡和石蜡)；皮肤感觉调节剂；以及增稠剂和结构剂(structurant)，诸如膨胀粘土和交联的羧基聚亚烷基。

[0088] 其他添加剂包括调理皮肤(特别是角质层中皮肤的上层)并通过延迟其含水量的减少和/或保护皮肤来保持其柔软的材料。举例来说，这类调理剂和保湿剂包括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。其他添加剂包括抗炎剂，诸如乙酰水杨酸和甘草次酸；抗脂溢剂，诸如视黄酸；血管扩张剂，诸如烟酸；黑素生成抑制剂，诸如曲酸；及其混合物。

[0089] 在其他实施方案中，所述组合物可包含α羟基酸、α酮酸、聚合羟基酸、保湿剂、胶原、海洋生物提取物和抗氧化剂，诸如抗坏血酸(维生素C)和/或α-生育酚(维生素E)。也可包含防晒剂。另外，可以将诸如酶、草药、植物提取物、腺体提取物或动物提取物的组分添加到组合物中。这些各种添加剂的量是化妆品领域中常规使用的量，并且范围例如为局部制剂总重量的约0.01％至约20％。

[0090] 所述组合物还可包含抗微生物剂，以防止储存时变质，即抑制诸如酵母和霉菌等微生物的生长。合适的抗微生物剂通常选自对羟基苯甲酸的甲酯和丙酯(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、咪脲及其组合。

[0091] 所述组合物还可包含减轻刺激的添加剂，以最小化或消除由待施用的化学实体或该组合物的其他组分引起的皮肤刺激或皮肤损伤的可能性。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，特别是苯基醇，诸如2-苯基-1-乙醇；甘油；水杨酸盐；抗坏血酸盐；诸如莫能菌素的离子载体；两亲性胺；氯化铵；N-乙酰半胱氨酸；辣椒素；以及氯喹。如果存在的话，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，通常代表不超过制剂的约20wt.％，更通常不超过约5wt.％。

[0092] 在某些实施方案中可以掺入本发明制剂中并因此与活性剂一起局部应用的其他合适的药理学活性剂包括但不限于以下药剂：改善或根除色素沉着或非色素沉着老年斑、角化病和皱纹的药剂；局部麻醉药和镇痛药；皮质类固醇；类视黄醇；和激素。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、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、生育酚乙酸酯、吡啶硫酮锌、苯海拉明、普莫卡因、利多卡因、普鲁卡因、克罗米通、氢醌及其单甲基醚和苄基醚、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

酸氯倍他索、米诺地尔、双嘧达莫、二苯乙内酰脲、过氧化苯甲酰、5-氟脲嘧啶、他克莫司，和局部类固醇，诸如阿氯米松、安西奈德、倍他米松、氯倍他索、地奈德、地塞米松(dexoximetasone)、二氟拉松、醋酸氟轻松(flucinonide)、氟氢缩松、乌倍他索、哈西奈德、氢化可的松和/或曲安西龙。

[0093] 尽管考虑了局部制剂，诸如配制用于皮肤递送的乳膏和油膏，但递送系统可包括定时释放、延迟释放或持续释放递送系统。这样的系统可以避免组合物的反复施用，增加了受试者和医师的便利性。许多类型的释放递送系统是可以获得的，并且是本领域普通技术人员已知的。具体实例包括但不限于：(a)侵蚀系统，诸如美国专利号4,452,775、4,667,014、4,748,034、5,239,660及6,218,371所描述的那些，以及(b)扩散系统，其中活性组分以受控速率从聚合物渗透，诸如美国专利号3,832,253及3,854,480中所描述的那些。

[0094] 所述递送系统可包括胶原蛋白、纤维蛋白或膜提取物，诸如基膜提取物，例如其中组合物被配制用于向皮肤施用。合适的基膜提取物包括生物活性可聚合提取物，其含有重量份约60%-85%的层粘连蛋白、5%-30%的IV型胶原、1%-10%的巢蛋白、1%-10%的硫酸类肝素蛋白多糖以及1%-5%的触觉蛋白(参见美国专利号4,829,000，其通过引用并入本文，其公开了BME组合物以及制备这些组合物的方法)。BME可以在培养时支持各种细胞类型(包括上皮细胞)的正常生长和分化。基膜提取物是本领域公知的并且是可商购的。

[0095] 为了治疗皮肤，可以将治疗有效量的组合物局部施用于患病区域。本文公开的药理学组合物有助于使用至少革兰氏阴性细菌来治疗特应性皮炎。这样的组合物可以适合于将活性成分递送至任何合适的受试者，诸如但不限于人类受试者，并且可以以本身已知的方式(例如通过常规混合、溶解、制粒、乳化、封装、包埋或冻干过程)制备。药理学组合物可以使用一种或多种药理学(例如，生理学或药学上)可接受的载体以及可选的助剂以常规方式配制，该助剂有助于将活性化合物加工成如上所述可以在药学上使用的制品。

[0096] 组合物可包含单一(单位)剂量的革兰氏阴性细菌。示例性的量是10^5-10^{12}菌落形成单位(cfu)，诸如10^6-10^{10}cfu，例如，10^5-10^7cfu，例如10^6cfu。在一些实施方案中，革兰氏阴性细菌的合适的剂量可以在10^4cfu至10^{12}cfu，例如，10^4cfu至10^{10}cfu、10^4cfu至10^8cfu、10^6cfu至10^{12}cfu、10^6cfu至10^{10}cfu或10^6至10^8cfu的范围内。在其他实施方案中，该组合物可包含至少约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%(重量)的细菌。在其他实施方案中，该组合物可包含至少约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%(重量)的革兰氏阴性细菌。

[0097] 所述组合物可以应用于皮肤，诸如在病变区域和病变区域附近，或应用于整个皮肤区域(非病变区域)以防止形成病变。该组合物可用于减小病变大小。该组合物可以每天应用。该组合物可以每天应用1、2、3、4或5次。该组合物可以每隔一天应用或每周应用1、2、3、4、5、6或7次。该组合物可以每周应用。在一个具体的非限制性实例中，每周向皮肤应用

10^6cfu 2次或3次。可以将组合物配制成用于施用的单位剂量。

[0098] 制备局部药物组合物如乳膏、软膏、洗剂、喷雾剂和无菌水溶液或悬浮液的方法是本领域公知的。制备局部药物组合物的合适的方法描述于例如PCT公开号WO 95/10999、PCT公开号WO2012150269、美国专利号6,974,585以及PCT公开号WO 2006/048747中，所有这些文献均通过引用并入本文。该组合物可包含水性载体，并作为喷雾剂应用于皮肤。

[0099] 任选地，组合物可包含药学上可接受的粘度增强剂和/或成膜剂。粘度增强剂提高了制剂的粘度，从而抑制其向应用部位之外的扩散。Balsam Fir(Oregon)是与革兰氏阴性细菌一起使用的药学上可接受的粘度增强剂的实例。

[0100] 在干燥时，成膜剂会在应用部位上形成保护膜。该膜抑制活性成分的去除并使其与所治疗的部位保持接触。适用于本发明的成膜剂的一个实例是Flexible Collodion，USP。如在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版(Easton,PA:Mack Publishing Co.,1995),第1530页中所描述的，火棉胶是含有火棉(一种硝酸纤维素)的乙醚/乙醇溶液，其蒸发后留下火棉膜。成膜剂可以另外作为载体。干燥形成膜的溶液有时被称为涂料。如药物制剂领域公知的，乳膏是水包油或油包水型的粘性液体或半固体乳液。

[0101] 乳膏基质是可水洗的，并且含有油相、乳化剂和水相。油相，也称为“内”相，通常由矿脂和脂肪醇如鲸蜡醇或硬脂醇组成。水相通常(但不是必须)在体积上超过油相，且通常包含湿润剂。乳膏制剂中的乳化剂通常是非离子、阴离子、阳离子或两性表面活性剂。

[0102] 洗剂是将要应用于皮肤表面而没有摩擦的制剂，并且通常是液体或半液体制剂，其中在水或醇基质中存在包括活性剂的颗粒。洗剂通常是固体的悬浮液，并且优选地包括水包油型液体油性乳液。由于易于应用更具流动性的组合物，洗剂可用于治疗大的身体区域。通常有必要将洗剂中的不溶物质粉碎。

[0103] 洗剂通常含有用来产生更好的分散体的悬浮剂，以及可用于定位活性剂并保持其与皮肤接触的化合物，例如甲基纤维素、羧甲基纤维素钠等。

[0104] 溶液是通过将一种或多种化学物质(溶质)溶解在液体中以使得溶解的物质的分子分散在溶剂的分子中而制成的均匀混合物。溶液可含有其他药学上或化妆品上可接受的化学物质以缓冲、稳定或保存该溶质。用于制备局部溶液的溶剂的常见实例是乙醇、水、丙二醇或任何其他可接受的媒介物。这些可以以任何方式应用，诸如将它们喷洒在皮肤上、将它们涂在皮肤上或用该溶液润湿绷带。

[0105] 凝胶是半固体悬浮型体系。单相凝胶含有基本均匀分布在整个载体液体中的有机大分子，该载体液体通常是水性的，但也优选地含有醇，且任选地含有油。一些使用的“有机大分子”，特别是胶凝剂，是交联的丙烯酸聚合物，诸如“卡波姆”家族的聚合物，例如，可以以商品名CARBOPOL®商购获得的羧基聚亚烷基。还可以使用亲水性聚合物，诸如聚环氧乙烷、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物和聚乙烯醇；纤维素聚合物，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；藻酸钠；和明胶。为了制备均匀的凝胶，可以添加分散剂如醇或甘油，或者可以通过研磨、机械混合或搅拌或其组合分散胶凝剂。这些凝胶用于本文公开的方法中。

[0106] 软膏也可在所公开的方法中使用。软膏是通常基于矿脂或其他石油衍生物的半固体制品。如本领域技术人员所理解的，待使用的特定软膏基质是提供诸如润肤性(emolliency)等许多所需特征的软膏基质。软膏基质通常是惰性的、稳定的、无刺激性的和

非致敏性的。软膏基质分为四类:油性基质;可乳化的基质;乳液基质;和水溶性基质(参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版(Easton,PA:Mack Publishing Co.,1995),第1399-1404页)。油性软膏基质包括例如植物油、从动物获得的脂肪和从石油获得的半固体烃。可乳化的软膏基质,也称为吸收性软膏基质,不含或几乎不含水,并且包括例如羟基硬脂精硫酸盐、无水羊毛脂和亲水性矿脂。乳液软膏基质是油包水(W/O)乳液或水包油(O/W)乳液,并且包括例如乙酰醇、单硬脂酸甘油酯、羊毛脂和硬脂酸。水溶性软膏基质由不同分子量的聚乙二醇制备。

[0107] 糊剂是半固体剂型,其中活性剂悬浮在合适的基质中,并且也是有用的。根据基质的性质,糊剂分为脂肪糊或由单相水性凝胶制成的糊。脂肪糊剂中的基质通常是矿脂或亲水性矿脂等。由单相水性凝胶制成的糊剂通常含有羧甲基纤维素等作为基质。

[0108] 局部组合物可以是适合应用于体表的任何形式,诸如乳膏、洗剂、喷雾剂、溶液、凝胶、软膏、糊剂、膏剂、涂料、生物粘合剂、绷带、喷雾、悬浮液等,并且/或者可以制备成包含脂质体、胶束和/或微球。局部组合物可以与闭合的覆盖层组合使用,以使得在向体表应用时及之后,从体表蒸发的水分保持在制剂内。

[0109] 可以在受影响的表面上涂抹乳膏、洗剂、凝胶、软膏、糊剂等。溶液可以以相同的方式应用,但更常见的是用滴管、拭子、喷雾器等应用,并且小心地应用于受影响的区域。该组合物可以直接应用于目标位置,例如在局部制剂如软膏中,或作为敷料或绷带的一部分。该组合物可以配制成单位剂量,用于通过任何施用装置向皮肤施用。单位剂量可以是活性剂在载体中的贮库,该载体例如是能够粘附到皮肤上保持所需的一段时间(诸如至少一天或更长时间)的粘合载体。

[0110] 所述药物组合物用于治疗特应性皮炎。因此,在一些实施方案中,局部应用导致病变尺寸减小、病变数目减少和/或症状减轻。这些药物组合物的应用可以减少被治疗受试者皮肤中的金黄色葡萄球菌。如通过经表皮水分丢失所测量的,药物组合物的应用可以提供增强的皮肤屏障功能。

[0111] 特应性皮炎作为突然发作而发生,并且可以有缓解期。局部应用可以减少复发,从而使得特应性皮炎的额外事件的数目、强度或频率降低。局部应用可以延长缓解时间,例如事件之间的时间长度。在一些实施方案中,在应用后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周不会发生特应性皮炎的额外事件。在另外的实施方案中,在局部应用后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月不会发生特应性皮炎的额外事件。

[0112] 所述方法可以包括测量受试者皮肤的微生物群。具体地,可以进行诊断试验以确定受试者皮肤中的细菌类群是否在治疗后改变。因此,在一些实施方案中,确定在患有特应性皮炎的受试者的皮肤中细菌门、细菌纲、细菌目、细菌科、细菌属和/或细菌种是否改变。在一个实施方案中,确定在治疗后受试者皮肤中金黄色葡萄球菌的量是否被改变。

[0113] 这样的用于鉴定样品中的微生物群的方法可以包括提供样品,诸如皮肤样品,以及检测该样品中的至少一种微生物群。该方法的一个实施方案可包括制备包含样品中存在的至少一种微生物群的分子身份(identity)指示物的核酸样品,并且检测该分子身份指示物。例如,该方法可涉及通过制备DNA样品来制备至少一种核酸样品。分子身份指示物可以是多态性多核苷酸,例如rRNA基因(例如,16S rRNA基因)。可通过测定多态性多核苷酸如16S rRNA基因的核苷酸序列或其部分或子序列来检测分子身份指示物。用于检测分子身份

指示物的其他实施方案还可包括用选择性引物进行的PCR、用选择性引物进行的定量PCR、DNA-DNA杂交、RNA-DNA杂交、原位杂交及其组合。例如，可以通过与特异性探针杂交来检测多态性多核苷酸。在这样的实例中，特异性探针与多态性靶核酸如16S rRNA基因杂交。任选地，该核酸可以与至少一个阵列杂交，该阵列包含多个特异性探针，例如各自识别细菌的多个特异性探针。检测分子身份指示物也可以使用与多态性靶蛋白(例如鉴定微生物群的多态性靶蛋白)结合的蛋白质探针(诸如抗体)来完成(参见美国专利号9,173,910，其通过引用并入本文)。

[0114] 可以在来自受试者的样品中测量一种或多种细菌如金黄色葡萄球菌的相对丰度。如本文所用，术语“相对丰度”是指生物体相对于限定位置或群落中的其他生物体的共性或稀有性。例如，相对丰度可以通过一般测量特定生物体的存在量并与样品中生物体的总存在量进行比较来确定。

[0115] 可以直接或间接测量细菌的相对丰度。直接测量可包括基于培养的方法。间接测量可包括比较与整个样品相关的生物体或一组生物体特异性的分子身份指示物如核糖体RNA(rRNA)基因序列的广泛程度。

[0116] 在一个实施方案中，可以通过测量来自个体的样品中一种或多种特定细菌的比例来计算个体受试者的皮肤内微生物群(诸如金黄色葡萄球菌和/或任何类型的革兰氏阴性细菌)的相对丰度，以获得受试者的微生物群概况。相对丰度可以从样品中存在的细菌的总丰度得出。如本文所用，“总丰度”通常是指样品中的总细菌。因此，“微生物群概况”是指受试者中或来自受试者的皮肤样品中一种或多种微生物群的相对丰度的表示，诸如图。

试剂盒

[0117] 所公开的治疗有效量的纯化的活革兰氏阴性细菌可以作为试剂盒的组分提供。纯化的活革兰氏阴性细菌可以在生长培养基中、以冻干形式或作为冷冻细胞提供。因此，该试剂盒可包括包含治疗有效量的纯化的活革兰氏阴性细菌的容器，其中，i)该革兰氏阴性细菌的裂解物和/或组分在体外试验中抑制金黄色葡萄球菌的生长；ii)该革兰氏阴性细菌刺激人角质形成细胞；iii)该革兰氏阴性细菌诱导人细胞的细胞因子表达；并且iv)当向受试者的皮肤施用时，该革兰氏阴性细菌是非致病性的。

[0118] 在一些实施方案中，所述试剂盒可包括产生药物组合物所需的组件，诸如包含革兰氏阴性细菌(以任何形式)的一个容器和包含用于悬浮其革兰氏阴性细菌的药学上可接受的载体的一个容器。该药学上可接受的载体可以是例如缓冲盐水溶液或蔗糖溶液。在其他实施方案中，该试剂盒可包括含有革兰氏阴性细菌的容器，和包含药学上可接受的载体的第二容器，以及用于测量药学上可接受的载体的装置，例如但不限于注射器。在另一个实施方案中，该试剂盒可以包括一旦将革兰氏阴性细菌悬浮在药学上可接受的载体中就将其局部应用的装置，诸如但不限于喷雾喷嘴或绷带。

[0119] 任选地，这样的试剂盒包括其他组件，包括包装、说明书和各种其他试剂，如另外的缓冲剂或其他治疗成分。该试剂盒可包括容器和在容器上的或与容器相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、管等。容器可以由多种材料如玻璃或塑料形成。容器通常容纳包含有效治疗特应性皮炎的革兰氏阴性细菌的组合物。在若干实施方案中，容器可具有无菌进入口(例如，容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装插页表明该组合物用于治疗特定病况，如特应性皮炎。

[0120] 标签或包装插页通常还包括使用说明书。包装插页通常包括在治疗产品的商业包装中惯常包含的说明书，其包含关于这些治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或与其使用相关的警告的信息。在一些非限制性实施方案中，说明书包括关于添加到含有革兰氏阴性细菌的小瓶中的药学上可接受的载体的量的信息、关于将革兰氏阴性细菌悬浮在药学上可接受的载体中的说明以及关于向皮肤局部应用的说明。该应用可以是喷射在皮肤上、在皮肤上擦拭或将悬浮液加至绷带上以向皮肤施用。

[0121] 说明材料可以以电子形式(诸如计算机磁盘或光盘)写成，或者可以是视觉的(诸如视频文件)。试剂盒还可以包括额外的组件，以促进该试剂盒的设计所针对的特定应用，诸如用于皮肤应用的喷雾尖端、绷带或拭子。试剂盒可另外包括缓冲液和常规用于实施特定方法的其他试剂。试剂盒和适当的内含物是本领域技术人员公知的。

[0122] 通过以下非限制性实施例说明本发明。

实施例

[0123] 进行研究以评价在暴露于从人皮肤收集的不同共生革兰氏阴性(CGN)细菌后免疫学结果是否不同。对于这些研究，从健康对照和特应性皮炎(AD)患者中收集CGN细菌。使用各种细胞模型和基于培养的模型，评价了它们的免疫原性。选择代表性的CGN菌株，并且在AD的MC903小鼠模型中评价它们的影响。发现取自健康人类志愿者的CGN细菌与增强的屏障功能、先天免疫激活和金黄色葡萄球菌的控制相关，而来自AD患者的CGN细菌则不然。用来自健康对照的CGN治疗AD在小鼠模型中改善了结果。

实施例1

材料与方法

[0124] 革兰氏阴性细菌的收集和鉴定：用在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS;Corning Cellgro,Corning,NY)中润湿的两个FloqSwabs(Copan,Brescia,Italy)在受试者的皮肤上(在肘窝处)剧烈刮擦15-30秒。将一个拭子放入15mL锥形管(Corning Life,Corning,NY)中，其中具有含有万古霉素(300ug/mL)和两性霉素B(5ug/mL;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)以抑制革兰氏阳性细菌和真菌生长的2mL无菌Hank's平衡盐溶液(HBSS;Sigma-Aldrich)。将剩余的拭子放入含有2mL R2A(Reasoner的2A)液体培养基(Teknova,Hollister,CA)的15mL锥形管中，该液体培养基含有相似浓度的万古霉素和两性霉素B。随后将其中拭子保留在原处的管在32℃恒定摇动下温育48-72小时，之后将每管100μL涂布到R2A琼脂平板(Remel,Lenexa,KS)上。随后采集菌落，以使用基质辅助激光解吸/电离-飞行时间(MALDI-TOF)分析通过质谱法进行种鉴定。使用BioTyper(v3.1,Bruker Daltonics Inc.,Billerica,MA)针对MALDI-TOF MS的细菌蛋白质提取由NIH临床中心微生物学实验室使用先前描述的方法(Lau等,Journal of clinical microbiology 52,2804-2812(2014);8月在线发表Epub(10.1128/JCM.00694-14))、仪器设置和校准(Lau等,Journal of clinical microbiology 51,828-834(2013);3月在线发表(Epub)(10.1128/JCM.02852-12);Youn等,Journal of clinical microbiology,(2015);9月2日在线发表(Epub)(10.1128/JCM.01643-15))进行。由几个NIH开发的数据库(Lau等,2014,同上;Stevenson等,Journal of clinical microbiology 48,3482-3486(2010);10月在线发表(Epub)(10.1128/JCM.00687-09);Myles等,Nature immunology 14,804-811(2013);8月在线发表(Epub)(10.1038/ni.2637))提供的额外质谱图补充BioTyper鉴定。图1中报告的十个健康

对照粘膜玫瑰单胞菌菌株仅基于在通过MALDI-TOF分析鉴定的其他粘膜玫瑰单胞菌分离株中观察到的独特菌落形态、UV光反应性和革兰氏染色特征来鉴定。用于后续研究的所有粘膜玫瑰单胞菌分离株通过MALDI-TOF分析来验证。获得了本研究中所有参与者的书面知情同意书。

[0125] 体外金黄色葡萄球菌抑制试验:如上所述,将革兰氏阴性分离株在5mL R2A中培养8-10天。将细菌在5000g下沉淀12分钟。收获上清液,冷冻,然后冻干(Labconco FreeZone 2.5,Kansas City,MO)。将冻干产物和不含细菌的同时温育并冻干的R2A对照悬浮于1mL胰蛋白酶大豆液体培养基(TSB)中。将在5mL TSB中生长的金黄色葡萄球菌菌株的过夜培养物以1:100稀释到新鲜培养基中,随后将100mcL新稀释的培养物与100mcL含有CGN上清液的TSB或冻干的R2A对照合并。将样品在37℃恒定搅拌下温育3小时。进行系列稀释并平板接种;第二天对菌落进行计数,并对所有可计数的平板取平均值。通过将暴露于CGN上清液的培养物中的CFU数除以仅暴露于R2A的培养物中的CFU数来计算对金黄色葡萄球菌生长的影响百分比。

[0126] 水疱诱导和细菌曝露:设计了一个八孔抽吸室(Ammnra Creations;San Jose,CA),并且以青铜(Shapeways;New York,NY)3D打印。将其置于参与者的经乙醇消毒的掌侧前臂上,并使用microderm磨蚀装置(Kendal Diamond HB-SF02)置于30mmHg的抽吸下2小时。在移除装置后,通过外科手术移除所得的表皮水疱顶。设计了八个曝露室(Ammnra Creations)并且以青铜(Shapeways)3D打印(图4C)。使用匹配的八孔模板(Ammnra Creations),将10mm钻取活检物(Acu-Punch,Acu-derm;Fort Lauderdale,FL)切成一个4”x4”Duoderm敷料(ConvaTec;Bridgewater,NJ)。曝露室的边缘用Dermabond粘合剂(Ethicon;Somerville,NJ)刷涂,然后放在裸露的水疱上。向每个孔填充1mL无菌盐水(Corning Life)或悬浮于无菌盐水中的2e7CFU经辐照的细菌。第二天早晨经由移液管(Eppendorf;Hauppauge,NY)移取水疱液。将收集的样品以350g离心7分钟,移出上清液,并冷冻用于分批分析。

[0127] 细胞因子和抗微生物肽检测:将人reg3γ标准物(Sino Biologicals;中国北京)或水疱液样品(在0.9%NaCl中稀释的100%-12.5%)在Nunc Maxisorp板上包被过夜。第二天,用PBS洗涤孔5次,并在含3%BSA的PBS中封闭1小时。用PBS洗涤孔一次。以在1%BSA/PBS中的1:1000稀释度添加蛋白A纯化的兔抗小鼠reg3γ多克隆抗体(13.2mg/ml;由匹兹堡大学的J.Kolls惠赠),并且在室温下温育90分钟。添加抗兔HRP(Santa Cruz;Dallas,TX)和TMB底物(Ebioscience;San Diego,CA),将板在室温下温育5-10分钟。添加2N H_2SO_4以终止反应;在450nm处读板。通过商购的ELISA试剂盒测定LL-37(Hycult;Plymouth Meeting,PA)和人β-防卫素3(PeproTech;Rocky Hill,NJ)。根据制造商的说明,通过Bio-Plex(BIO-Rad;Hercules,CA)测定细胞因子水平。

[0128] 角质形成细胞培养:收集原代包皮角质形成细胞(KC)培养物并如前所述进行刺激(Myles等,Nature immunology 14,804-811(2013);8月在线发表Epub(10.1038/ni.2637))。将1e7CFU活共生革兰氏阴性细菌添加至KC培养基中。24小时后提取mRNA,以通过△△CT法进行PCR分析。

[0129] 小鼠:BALB/c小鼠购自Taconic Farms(Hudson,NY)。小鼠在8至14周龄之间时使用。用雄性和雌性小鼠进行实验,但在每个实验中匹配年龄和性别。

[0130] 经表皮水分丢失(TEWL)测量:将小鼠剃毛并以化学方式去除毛发(Nair)。从第二天开始,每天将大约1e7CFU的活细菌放置在裸区域上。在临接种之前,根据制造商的说明,每天通过VapoMeter(Delfin;Greenwich,CT)测量TEWL。

[0131] MC903和耳朵接种:如前所述创建AD的MC903小鼠模型(Wang等,The Journal of allergy and clinical immunology 135,781-791 e783(2015);3月在线发表(Epub)(10.1016/j.jaci.2014.09.015))。对于预防研究,将1e7CFU的革兰氏阴性细菌悬浮于无菌PBS中,并且以10mcL体积滴在小鼠耳朵上。在MC903之前两天开始接种,并且在整个MC903暴露期间继续接种。首先放置MC903,让乙醇蒸发2-5分钟,然后放置细菌分离株。在第14天测量耳朵厚度。如前所述进行mRNA分离和PCR(Myles等,2013,同上)。对于使用金黄色葡萄球菌的共接种的实验,在临接种革兰氏阴性分离株之前,将1e6CFU的金黄色葡萄球菌SAAS9菌株滴在耳朵上。通过每天将小鼠暴露于MC903持续14天并且在第13-15天接种1e7CFU的革兰氏阴性细菌进行治疗研究。在第21天测量耳朵厚度并拍摄照片。

[0132] 血清总IgE分析:在MC903治疗的第14天收集血清。如前所述(Myles,Nutrition journal 13,61(2014)10.1186/1475-2891-13-61)使用商业试剂盒(Bethyl Laboratories,Montgomery,TX)测定总IgE。

[0133] 统计:用Prism软件(GraphPad,San Diego,CA),使用双尾非配对t检验或用于多样品比较的ANOVA比较平均值。NS=不显著,*=$p<0.05$,**=$p<0.01$,***=$p<0.001$,****=$p<0.0001$。

[0134] 研究批准:所有动物实验均在动物保护和使用程序办公室的批准下进行。所有人类样品收集和处理均在IRB批准的临床试验中进行,并且所有受试者均完全同意样品收集。所有参与者都书面同意该研究方案,并在采血前获得了机构审查委员会(IRB)的同意。

实施例2

在健康对照与AD患者之间存在差异的皮肤共生革兰氏阴性微生物群

[0135] 基于遗传学的微生物组鉴定揭示了AD患者与健康对照之间革兰氏阴性皮肤生物群系的显著差异(4)。通过适当选择培养基、抗生素和温度来培养革兰氏阴性皮肤菌群的方法允许对CGN种进行功能表征和比较。与26名健康志愿者相比,在17名AD患者的皮肤上存在的可培养细菌中发现了显著差异(图1A;表1)。

[0136] 表1:对照和患者的人口统计资料

人口统计资料	对照	患者	显著性
数目	26	17	--
年龄			
平均值（范围）	32.5 (8-65)	18.5 (8-51)	**
性别（%）			
男性	50	70	NS
女性	50	30	
种族（%）			
白种人	39	47	NS
黑种人	15	18	
拉丁美洲人	0	0	
亚洲人	31	24	
其他/混血	15	11	
SCORAD（范围）	0 (0)	19.7 (1-56)	****

[0137] 图1中包括参与者的年龄、性别、种族和SCORAD。通过Student's t检验(年龄、SCORAD)或卡方分析(性别、种族)确定显著性。**＝p<0.01,****＝p<0.001,NS＝不显著。

[0138] 在健康志愿者(HV)中鉴定的主要革兰氏阴性种是粘膜玫瑰单胞菌。大约一半的AD患者没有任何可培养的革兰氏阴性细菌，这与基于DNA的分析一致(Kong等,Genome research 22,850-859(2012);5月在线发表Epub(10.1101/gr.131029.111))。

实施例3

来自健康志愿者的CGN抑制金黄色葡萄球菌的生长

[0139] 金黄色葡萄球菌的过度生长和感染既是AD的免疫失衡和不良屏障功能的贡献者，也是其结果。金黄色葡萄球菌可以直接激活变应性肥大细胞(Schlievert等,J Allergy Clin Immunol 125,39-49(2010);1月在线发表(Epub)(10.1016/j.jaci.2009.10.039);Nakamura等,Nature 503,397-401(2013);11月21日在线发表(Epub)(10.1038/nature12655))和T细胞(Brauweiler等,The Journal of investigative dermatology 134,2114-2121(2014);8月在线发表(Epub)(10.1038/jid.2014.43))。用抗生素治疗可以减少金黄色葡萄球菌负荷并改善症状，但不会使潜在的病理学正常化(Boguniewicz和Leung,J Allergy Clin Immunol 132,511-512e515(2013);8月在线发表(Epub)(10.1016/j.jaci.2013.06.030))。为了评估CGN菌株对金黄色葡萄球菌生长的影响，在来自CGN培养物的上清液的存在下培养多个金黄色葡萄球菌分离株。平均而言，来自HV-CGN的上清液抑制金黄色葡萄球菌几乎达50％(图1B;图4)。相反，AD-CGN具有更可变的效应，大多数菌株不能抑制(图1B;图4)。将金黄色葡萄球菌从抑制性CGN上清液再接种到新鲜培养基中允许正常生长，提示抑菌活性而不是杀菌活性。与该体外分析一致，CGN和金黄色葡萄球菌在小鼠

耳朵上的共接种也降低了金黄色葡萄球菌的产量(图1C)。这种抑制与脂质溶血磷脂酰胆碱(LPC)的产生相关,并且使用商购的LPC重现(图8B),表明我们的细菌的独特特征与潜在的临床益处相关。

实施例4

来自健康志愿者的CGN诱导人类的先天免疫

[0140] 为了测量对这些细菌的体内人皮肤免疫反应性,在健康志愿者的前臂上诱发抽吸水疱(图5A),并且与先前描述的(Follin和Dahlgren,Methods in molecular biology 412,333-346(2007)10.1007/978-1-59745-467-4_22)类似地移除表皮水疱顶(图5B)。使用曝露室(图5C)将皮肤水疱基质暴露于经致死辐照的源自HV的或源自AD的粘膜玫瑰单胞菌分离株,其基于它们对金黄色葡萄球菌的不同抑制来选择(图1B)。

[0141] 在刺激20-24小时后,IL-6的水疱细胞因子水平(图2A-图2B)响应于HV粘膜玫瑰单胞菌而显著高于响应于来自AD患者的粘膜玫瑰单胞菌(图2A-图2B)。传统的Th(T辅助)细胞因子如白细胞介素(IL)-17、干扰素γ(IFNγ)或IL-4(图2A)的水平没有差异,许多其他细胞因子(图6A)或抗微生物肽(图6B)的水平也没有显著差异;然而,也应在稍后的时间点测量适应性T细胞细胞因子。在体外用多种活CGN分离株感染源自人包皮的原代角质形成细胞(KC)显示出不同分离株对KC先天免疫标志物的影响不同,但与AD-CGN相比,HV-CGN增强了防卫素β4A(图7A)和上游调节剂(Miller等,Dermatologic therapy 23,13-22(2010);1-2月在线发表(Epub)(10.1111/j.1529-8019.2009.01287.x);Schauber和Gallo,Experimental dermatology 17,633-639(2008);8月在线发表(Epub)(10.1111/j.1600-0625.2008.00768.x))CYP27b1(维生素D转化酶;图7B)、维生素D受体(VDR)(图7C)以及抗微生物肽抗菌肽(图7D)的mRNA丰度。IL-1β或IL-6的转录水平没有差异(图7E-图7F)。CD14、IL-8、肿瘤坏死因子α(TNFα)、Toll样受体(TLR)2、TLR3、TLR4、TLR9或胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)mRNA丰度也没有差异,并且在分离物抑制金黄色葡萄球菌与激活KC的能力之间无明显相关性。

实施例5

来自健康志愿者的CGN在小鼠中保持了屏障功能

[0142] AD中屏障功能的丧失导致由于经表皮水分丢失(TEWL)(Boguniewicz等,J Allergy Clin Immunol 125,4-13;quiz 14-15(2010);1月在线发表(Epub)(10.1016/j.jaci.2009.11.027))和对抗原的皮肤致敏(Pyun,Allergy,asthma&immunology research 7,101-105(2015);3月在线发表(Epub)(10.4168/aair.2015.7.2.101))而引起的皮肤干燥、发痒。对于一部分患者,该屏障缺陷与紧密连接蛋白聚丝蛋白的功能障碍有关(Bantz等,Journal of clinical&cellular immunology 5,(2014);4月在线发表(Epub)(10.4172/2155-9899.1000202))。向健康小鼠耳朵局部应用在人水疱研究中使用的HV-CGN的代表性分离株与AD-CGN分离株相比增强了聚丝蛋白的转录物水平(图2C),而耳朵红斑或厚度没有任何明显变化。AD-CGN的应用增加了TEWL,而HV-CGN没有效果(图2D)。总之,这些数据提示,与健康状态相关的CGN菌株诱导与维生素D激活、先天免疫刺激和屏障功能保持相关的潜在有益免疫结果。

实施例6

来自健康志愿者的CGN在AD小鼠模型中改善了结果

[0143] MC903是一种维生素D类似物，当应用于小鼠耳朵时会诱发AD样皮炎(22)。如通过耳朵厚度所测量的，同时应用HV来源的粘膜玫瑰单胞菌分离株针对MC903诱发的皮炎的发作提供保护(图3A)。相比之下，AD来源的粘膜玫瑰单胞菌分离株未能像HV来源的铜绿假单胞菌那样针对疾病发作提供保护(图3A)，尽管后者影响KC激活(图7)和金黄色葡萄球菌抑制(图1B)。应用AD来源的粘膜玫瑰单胞菌增强了血清IgE诱导，而HV来源的粘膜玫瑰单胞菌显示无显著影响(图3B)。与健康小鼠耳朵接种一致，在暴露于AD来源的粘膜玫瑰单胞菌的经MC903处理的小鼠中，聚丝蛋白的转录物水平显著降低(图9)。

[0144] 为了测试CGN的治疗潜力，用MC903诱发AD样皮炎，然后每天用CGN接种耳朵，共三天。采用HV-粘膜玫瑰单胞菌的治疗与耳朵厚度和可见发红的减小有关(图3C-图3D)。为了评估活生物治疗剂是否必要，或者单独的表面和分泌因子是否可以提供类似的结果，我们应用了悬浮在其上清液中的等效CFU浓度的经致死辐照的HV-CGN。这种“死混合物”和单独的上清液都没有提供任何益处，并且各自增加了耳朵厚度(图3C-图3D)。

[0145] 虽然全基因组连锁研究(Barnes等，J Allergy Clin Immunol 125,16-29e11-11;quiz 30-11(2010)；1月在线发表(Epub)(10.1016/j.jaci.2009.11.008))和金黄色葡萄球菌表征已经阐明了AD的发病机理，但许多因果基础仍不清楚。目前针对宿主反应和金黄色葡萄球菌定植的治疗方法可显著改善AD症状，但即使成功，这些治疗也不是治愈性的，并且对患者及其家庭造成显著的情感损失(24)。本文公开的研究证明，在AD中报道的生态失调不仅仅是相关的发现，而可能是病理学的贡献者。从健康对照中分离的粘膜玫瑰单胞菌菌株能够影响AD的许多标志，从而改善屏障功能、增强先天激活以及限制金黄色葡萄球菌生长。其他革兰氏阴性细菌可以提供类似的效果。

[0146] 向皮肤乳膏中添加革兰氏阴性线性透明颤菌(V.filiformis)裂解物可以在AD治疗中提供益处(Gueniche等，The British journal of dermatology 159,1357-1363(2008)；12月在线发表(Epub)(10.1111/j.1365-2133.2008.08836.x))。然而，杀死的粘膜玫瑰单胞菌的功效缺乏提示，使用没有活共生物的经分离的分泌和/或表面产物可能无法提供益处。不受理论束缚，宿主-共生体的动态相互作用可能是粘膜玫瑰单胞菌的临床应用所必需的，并且定植的潜力提供了有限的重复应用和更多的生理学药代动力学的优点。

[0147] 鉴于可以应用本发明原理的许多可能的实施方案，应该认识到，所示的实施方案仅是本发明的示例，不应该被认为是对本发明范围的限制。相反，本发明的范围由以下权利要求限定。因此，我们请求保护所有属于这些权利要求的范围和精神内的发明。

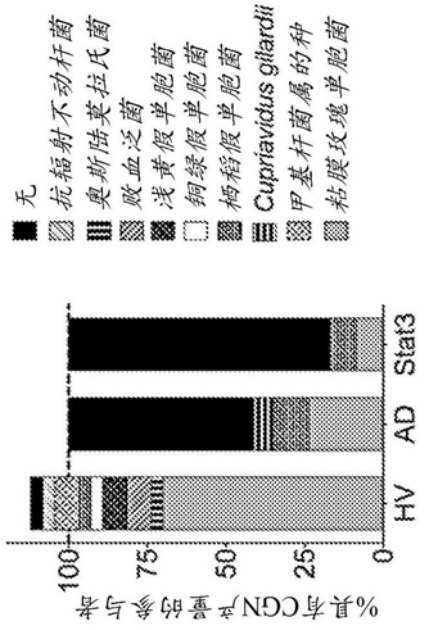

无
抗辐射不动杆菌
奥斯陆莫拉氏菌
欧血泛菌
浅黄假单胞菌
铜绿假单胞菌
栖稻假单胞菌
Cupriavidus gilardii
甲基杆菌属的种
粘膜玫瑰单胞菌
%具有CGN产生的参与者
100
75
50
25
0
HV
AD
Stat3

图1A

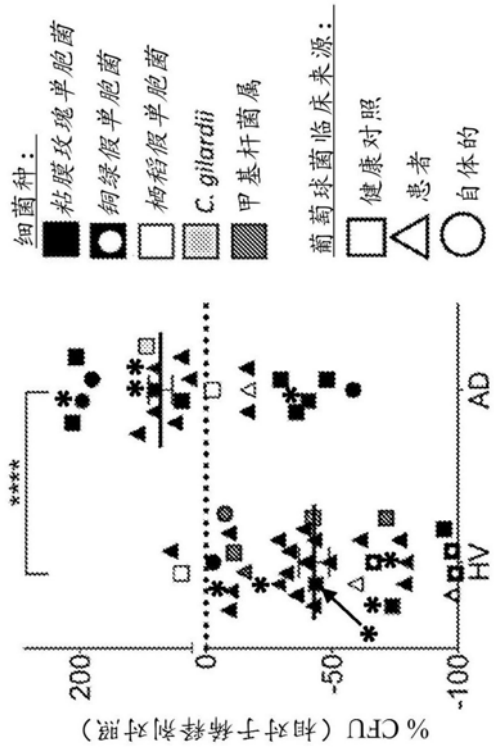

细菌种：
粘膜玫瑰单胞菌
铜绿假单胞菌
栖稻假单胞菌
C. gilardii
甲基杆菌属
葡萄球菌临床来源：
健康对照
患者
自体的
****
200
0
-50
-100
HV
AD
% CFU（相对于稀释剂对照）

图1B

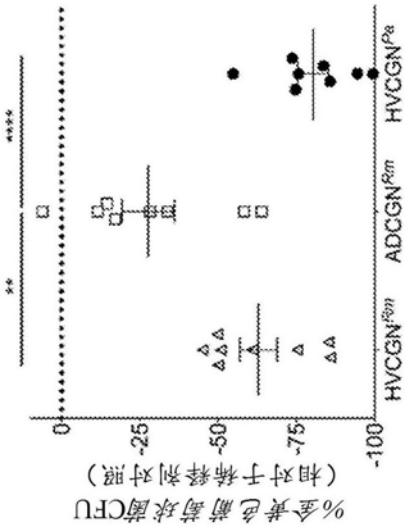

%金黄色葡萄球菌CFU
（相对于稀释剂对照）
0
-25
-50
-75
-100
**
****
HVCGN^Fc(m)
ADCGN^R(m)
HVCGN^Fc

图1C

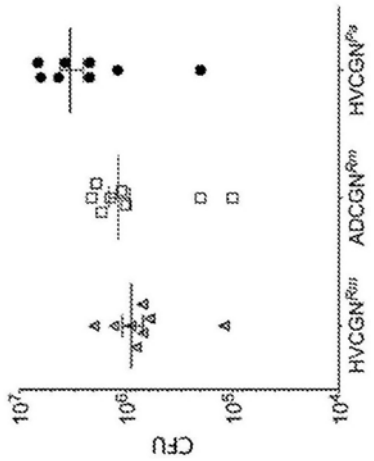

CFU
10^7
10^6
10^5
10^4
HVCGN^Fc(m)
ADCGN^R(m)
HVCGN^Fc

图1D

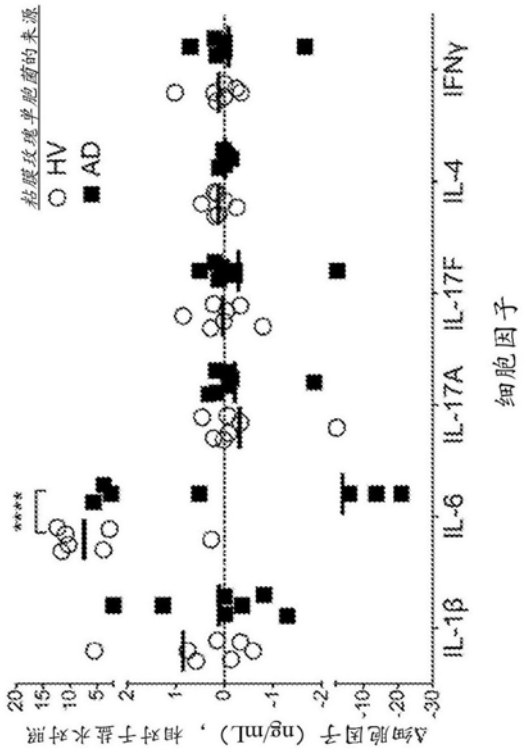

粘膜或皮肤单细胞的来源
HV
AD
****
Δ细胞因子（ng/mL），相对于盐水对照
20
15
10
5
2
1
0
-1
-2
-10
-20
-30
IL-1β
IL-6
IL-17A
IL-17F
IL-4
IFNγ
细胞因子

图2A

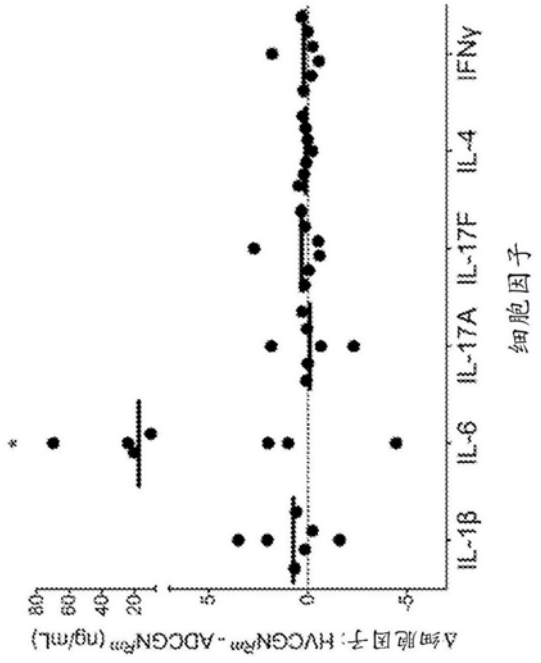

*
Δ细胞因子：HVCGN^Rm - ADCGN^Rm (ng/mL)
80
60
40
20
5
0
-5
IL-1β
IL-6
IL-17A
IL-17F
IL-4
IFNγ
细胞因子

图2B

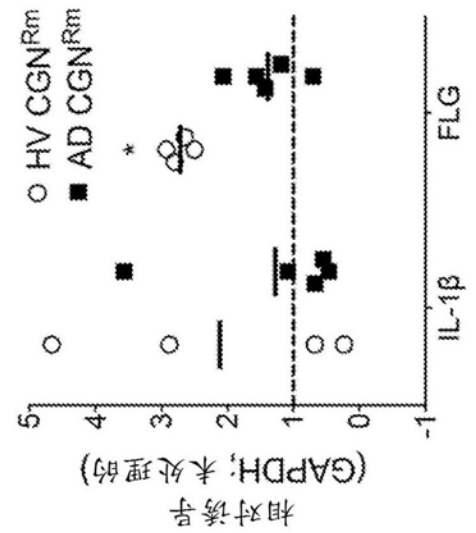

HV CGNRm
AD CGNRm
IL-1β
FLG
相对诱导
(GAPDH; 未处理的)

图2C

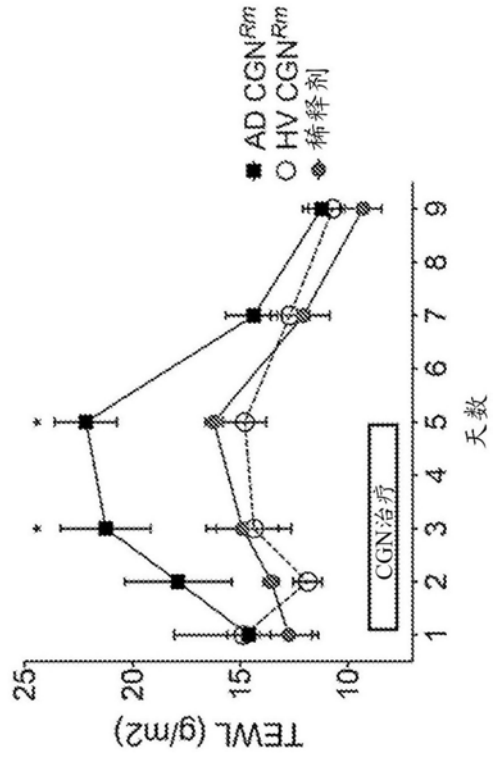

AD CGNRm
HV CGNRm
稀释剂
CGN治疗
天数
TEWL (g/m2)

图2D

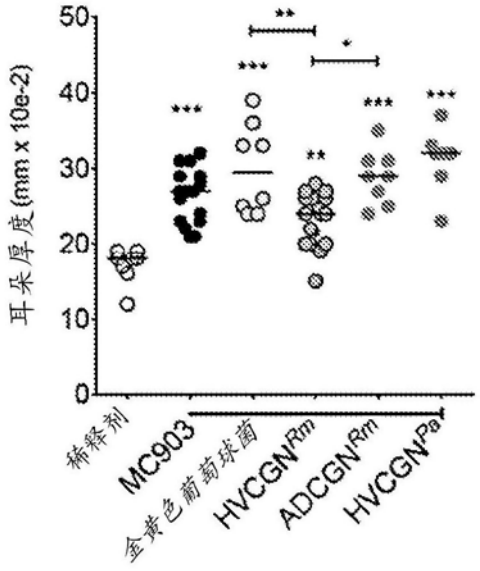

耳朵厚度(mm x 10e-2)
50
40
30
20
10
0
稀释剂
MC903
金黄色葡萄球菌
HVCGN^Rm
ADCGN^Rm
HVCGN^Pa

图3A

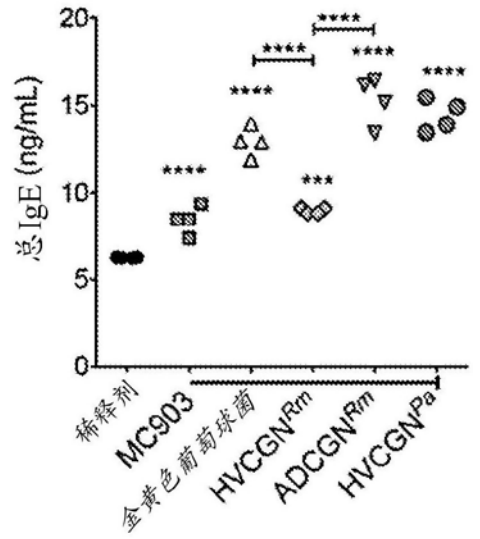

总IgE (ng/mL)
20
15
10
5
0
稀释剂
MC903
金黄色葡萄球菌
HVCGN^Rm
ADCGN^Rm
HVCGN^Pa

图3B

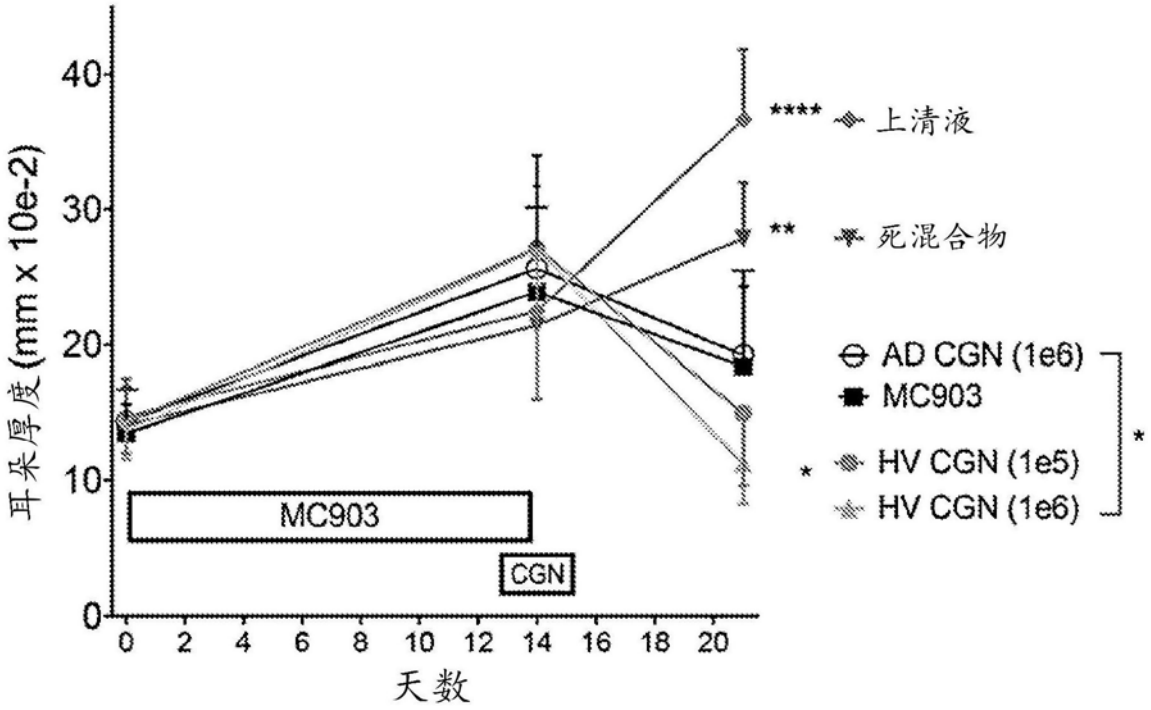

耳朵厚度 (mm x 10e-2)
40
30
20
10
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
天数
MC903
CGN
****
**
*
*
上清液
死混合物
AD CGN (1e6)
MC903
HV CGN (1e5)
HV CGN (1e6)

图3C

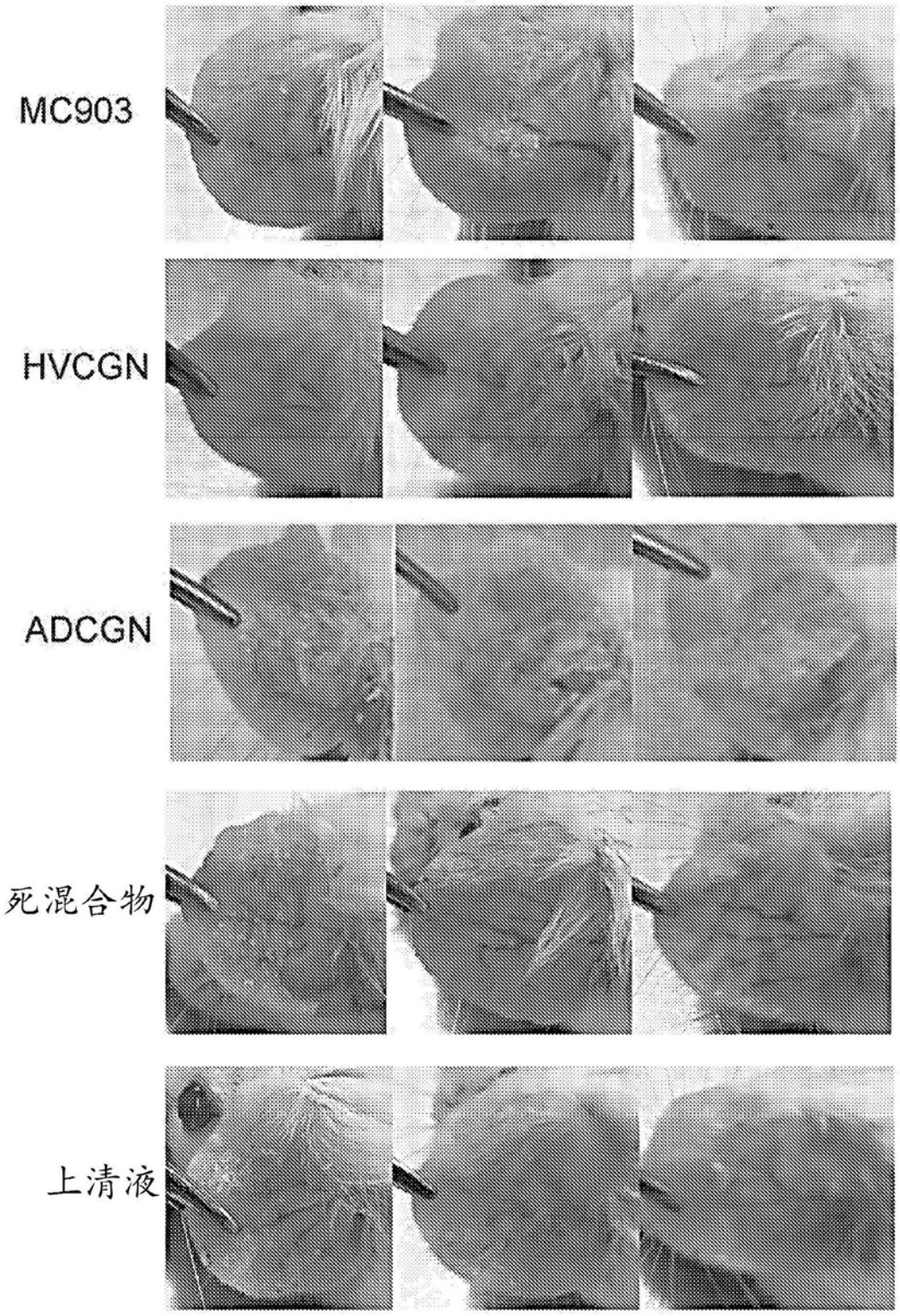


图3D

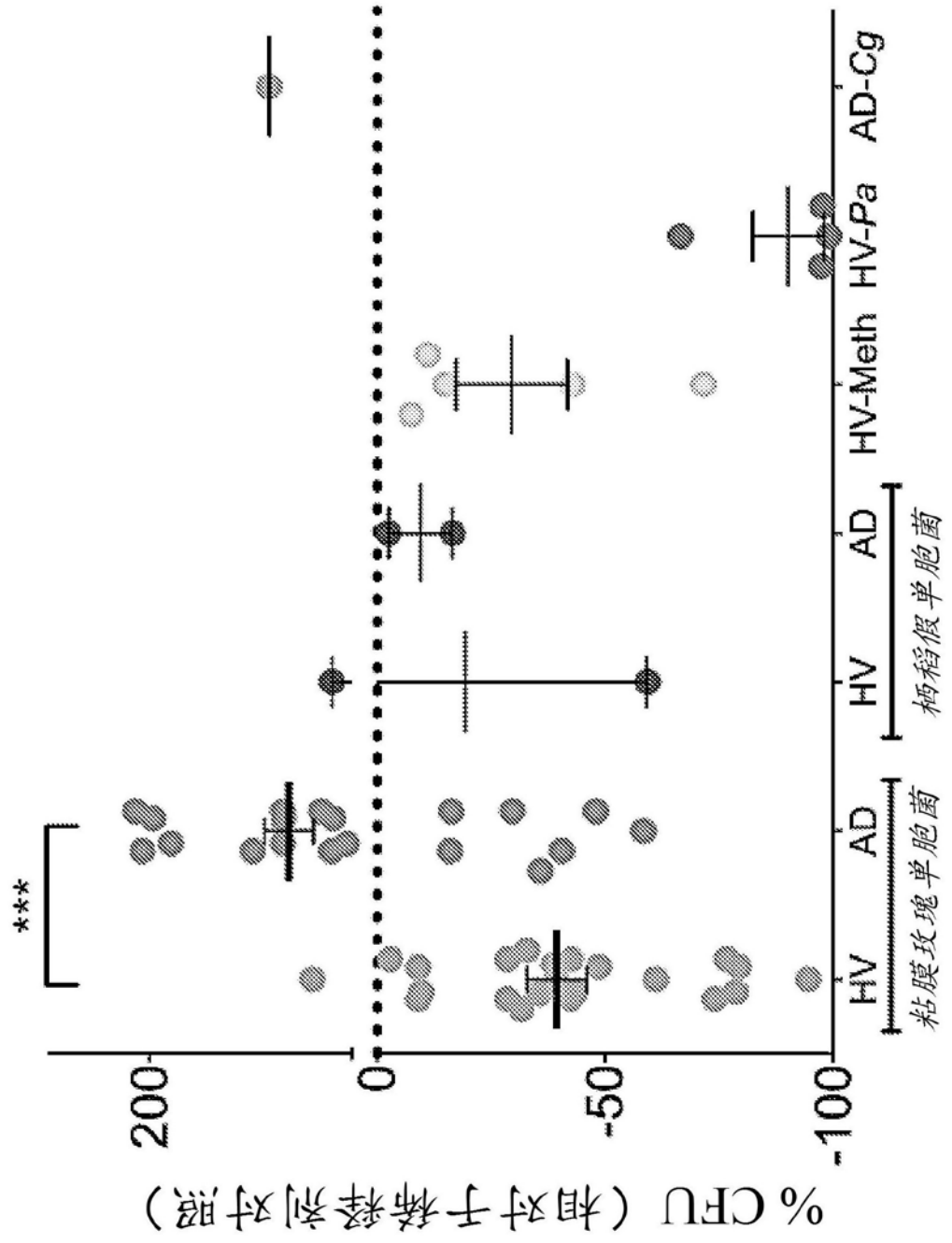

% CFU（相对于稀释剂对照）
200
0
-50
-100
***
HV
AD
粘膜玫瑰单胞菌
HV
AD
柄稍假单胞菌
HV-Meth
HV-Pa
AD-Cg

图4

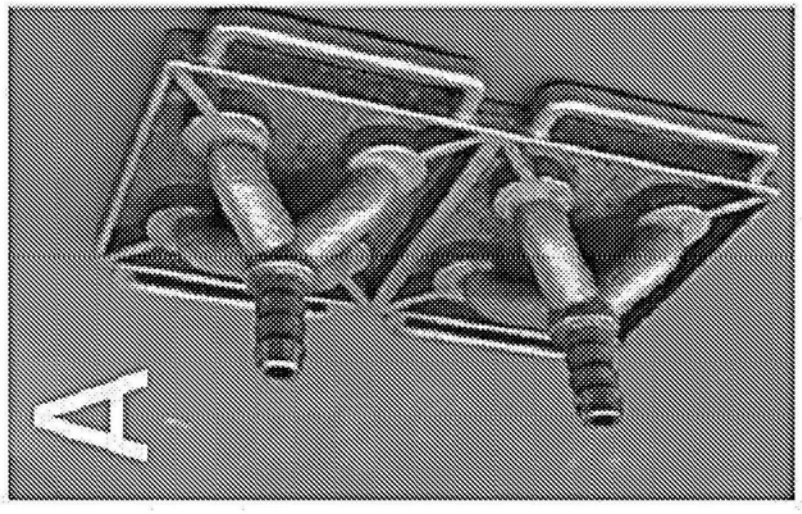


图5A

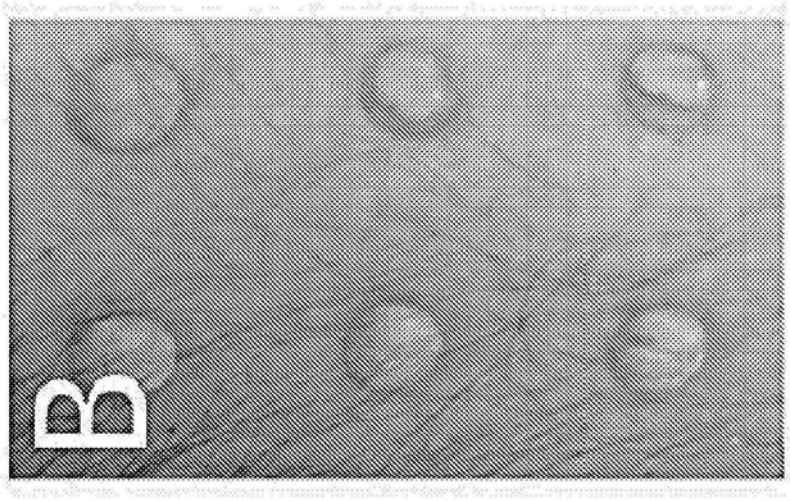


图5B

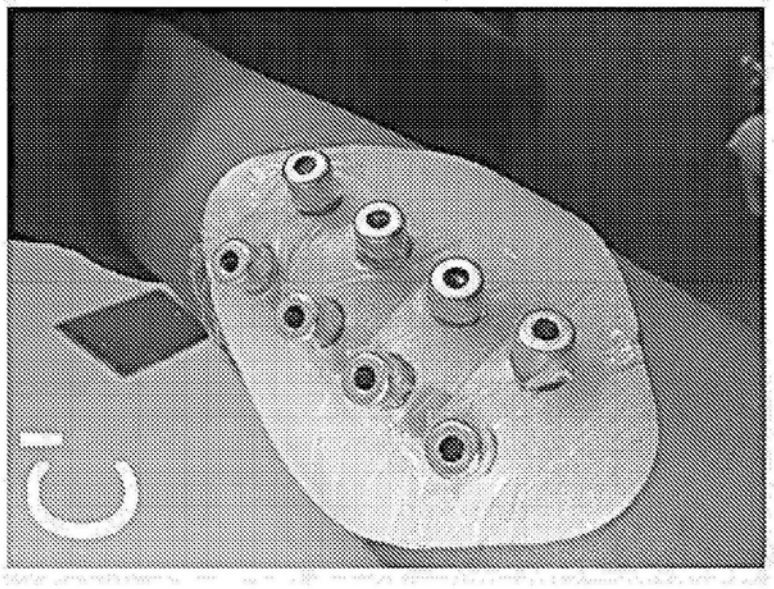

C1

图5C

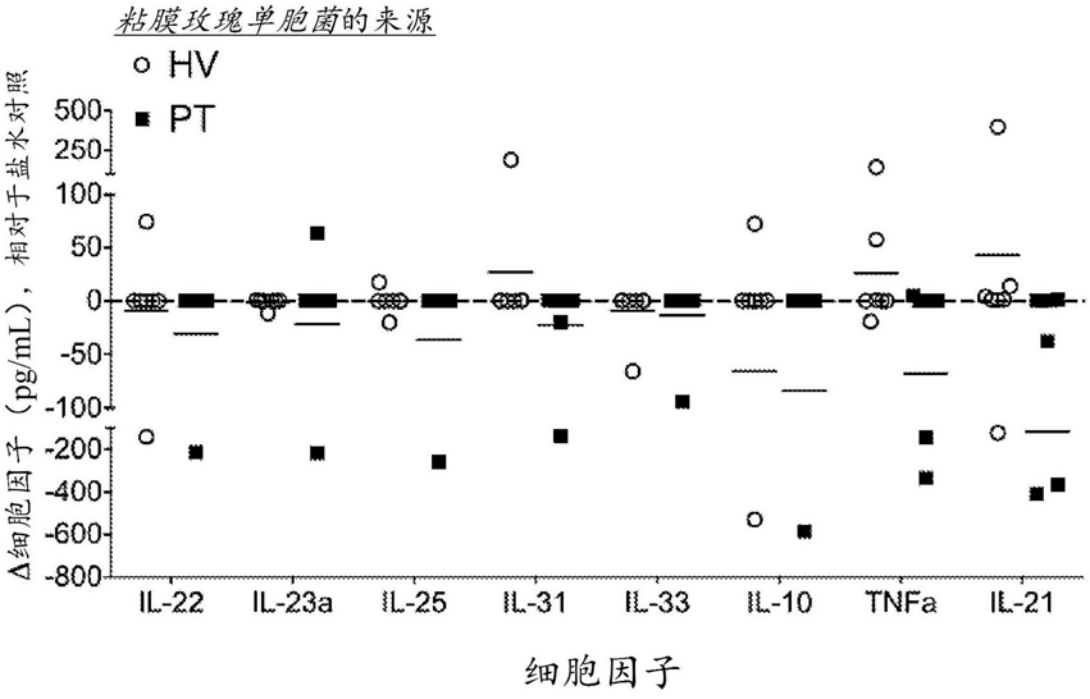

粘膜玫瑰单胞菌的来源
HV
PT
Δ细胞因子（pg/mL），相对于盐水对照
500
250
100
50
0
-50
-100
-200
-400
-600
-800
IL-22
IL-23a
IL-25
IL-31
IL-33
IL-10
TNFa
IL-21
细胞因子

图6A

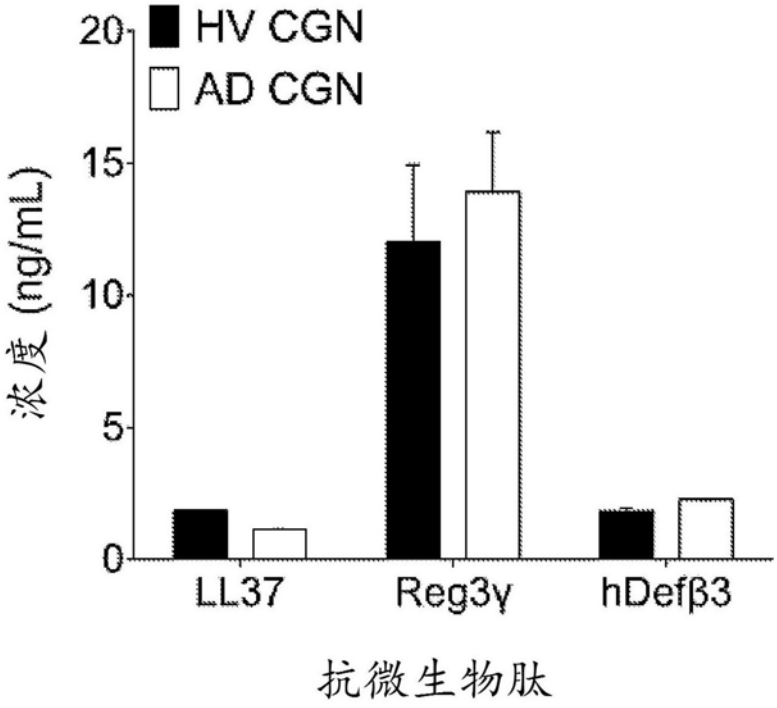


图6B

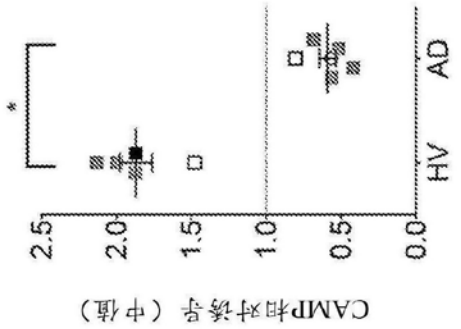


图 7D

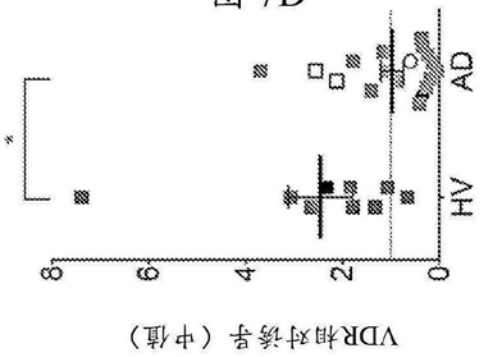


图 7C

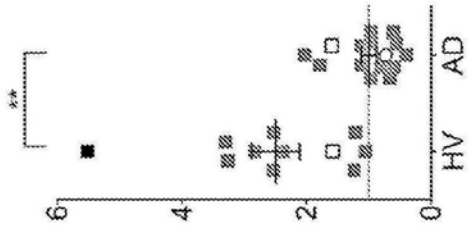
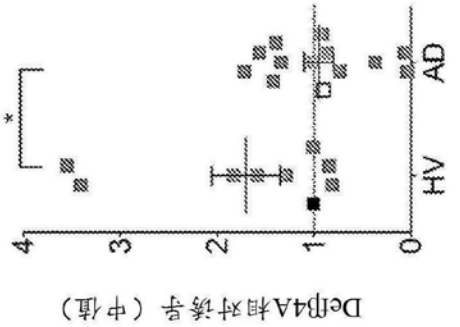


图 7B



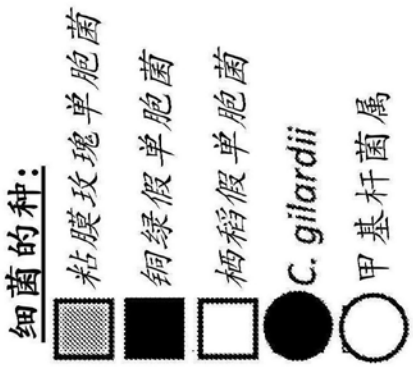


图 7A

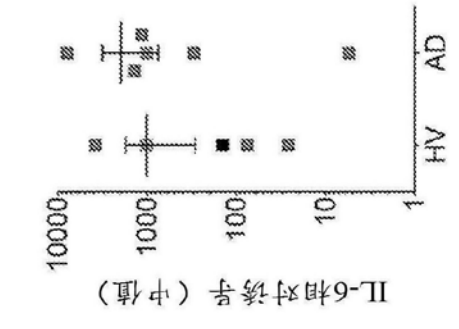

IL-6相对诱导（中值）
10000
1000
100
10
1
HV
AD

图 7G

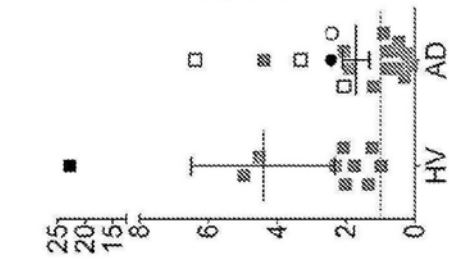

Pro-IL-1β相对诱导（中值）
25
20
15
8
6
4
2
0
HV
AD

图 7F

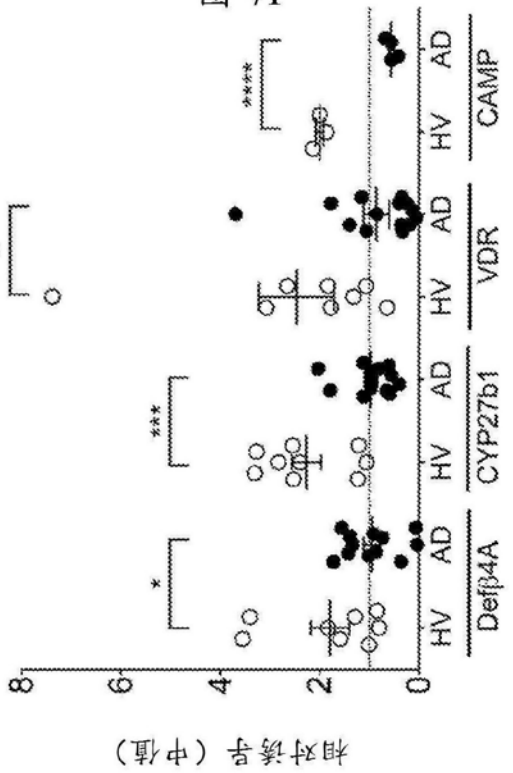
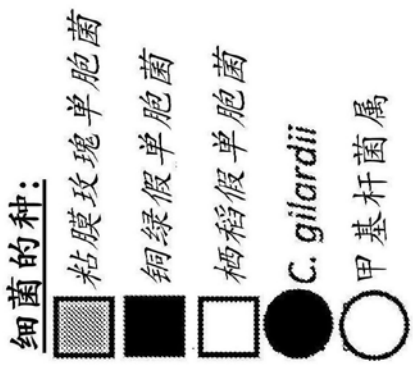

相对诱导（中值）
8
6
4
2
0
HV AD HV AD HV AD HV AD
Defβ4A
CYP27b1
VDR
CAMP
*
***
****

图 7E


细菌的种：
粘膜玫瑰单胞菌
铜绿假单胞菌
栖稍假单胞菌
C. gilardii
甲基杆菌属

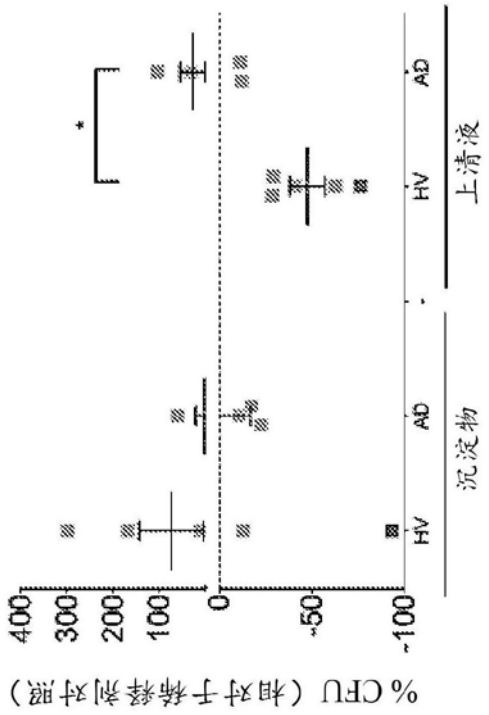

% CFU（相对于稀释剂对照）
400
300
200
100
0
-50
-100
HV
AD
HV
AD
沉淀物
上清液
*

图8A

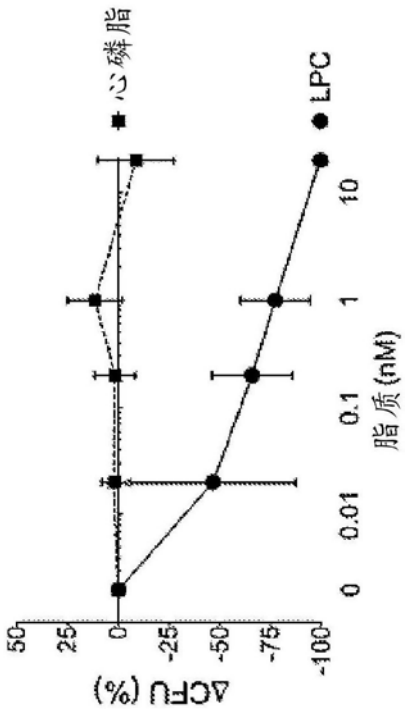

心磷脂
LPC
ΔCFU (%)
50
25
0
-25
-50
-75
-100
0
0.01
0.1
1
10
脂质(nM)

图8B

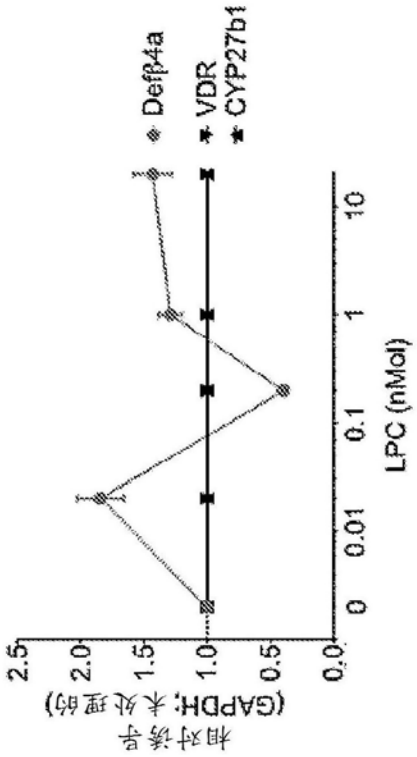

Defβ4a
VDR
CYP27b1
相对诱导
(GAPDH; 未处理的)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
0.01
0.1
1
10
LPC (nMol)

图8C

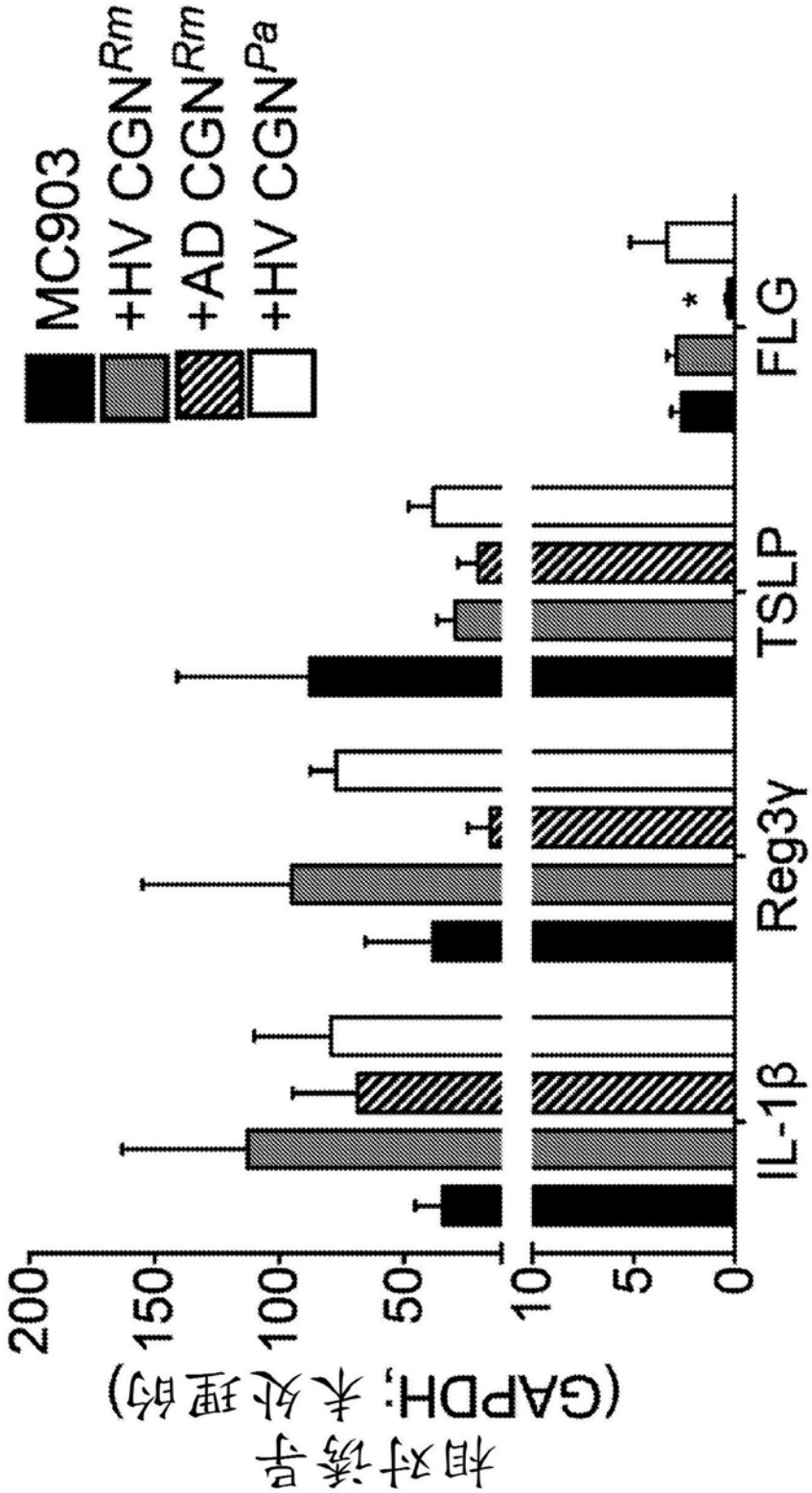

MC903
+HV CGN^Rm
+AD CGN^Rm
+HV CGN^Pa
相对诱导
(GAPDH；未处理的)
200
150
100
50
10
5
0
IL-1β
Reg3γ
TSLP
FLG
*

图9