

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-509263

(P2019-509263A)

(43) 公表日 平成31年4月4日(2019.4.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74	A 2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Q 4 B 0 1 8
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P 4 C 0 8 4
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/19 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-540791 (P2018-540791)	(71) 出願人	506115514
(86) (22) 出願日	平成29年2月3日 (2017.2.3)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月18日 (2018.9.18)		ティ オブ カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/016526		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
(87) 国際公開番号	W02017/136738		607-5200, オークランド, フラン
(87) 国際公開日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		クリン ストリート 1111, 12番
(31) 優先権主張番号	62/291,665		フロア
(32) 優先日	平成28年2月5日 (2016.2.5)	(74) 代理人	110002572
(33) 優先権主張国	米国 (US)		特許業務法人平木国際特許事務所
		(72) 発明者	リー, ファイン
			アメリカ合衆国 90077 カリフォル
			ニア州, ロサンゼルス, ロスクーメア ロ
			ード 2113

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚の健康増進用組成物及び健康増進方法

(57) 【要約】

本発明の様々な態様は、ざ瘡などの皮膚状態の予防及び治療のための組成物ならびに方法に関する。本明細書では、対象に皮膚状態の危険性があるか否かの判定方法も提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の皮膚状態の予防または治療方法であって、前記対象の皮膚に、アクネ菌（*Propionibacterium acnes*）の RT1 株、RT2 株、RT3 株、RT6 株、RT8 株、RT16 株、または III 型株を含む組成物を投与することを含む前記方法。

【請求項 2】

前記組成物がアクネ菌（*Propionibacterium acnes*）の RT1 株、RT2 株、または RT6 株を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記組成物がアクネ菌（*Propionibacterium acnes*）の RT3 株、RT8 株、RT16 株、または III 型株を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の RT1 株を含み、前記 RT1 株が HL050PA2 もしくは HL025PA1 であるか、

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の RT2 株を含み、前記 RT2 株が HL001PA1、HL103PA1、もしくは HL106PA1 であるか、または

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の RT6 株を含み、前記 RT6 株が HL042PA3 もしくは HL110PA3 である、

請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の RT3 株を含み、前記 RT3 株が HL025PA2、もしくは HL046PA1 であるか、

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の RT8 株を含み、前記 RT8 株が HL110PA2、もしくは HL053PA2 であるか、

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の RT16 株を含み、前記 RT16 株が HL059PA1 であるか、または

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の III 型株を含み、前記 III 型株が HL201PA1、17A、もしくは 20C である、

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記皮膚状態がざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象が 1 日当たり少なくとも $2\mu\text{g}$ のビタミン B₁₂ を摂取している、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象が、1 日当たり少なくとも $10\mu\text{g}$ のビタミン B₁₂ を摂取している、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記組成物がアクネ菌（*P. acnes*）の RT4 株または RT5 株を実質的に含まない、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象がヒトである、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

アクネ菌（*Propionibacterium acnes*）の RT1 株、RT2 株、RT3 株、RT6 株、RT8 株、RT16 株、または III 型株を含む、皮膚状態の治療用または皮膚の健康維持用の局所組成物。

【請求項 12】

皮膚状態の治療または皮膚の健康維持のための、アクネ菌（*Propionibact*

10

20

30

40

50

erium acnes) の R T 1 株、R T 2 株、または R T 6 株を含む、請求項 1 1 に記載の局所組成物。

【請求項 1 3】

皮膚状態の治療または皮膚の健康維持のための、アクネ菌 (Propionibacterium acnes) の R T 3 株、R T 8 株、R T 1 6 株、または I I I 型株を含む、請求項 1 1 に記載の局所組成物。

【請求項 1 4】

アクネ菌 (P. acnes) の R T 1 株を含み、前記 R T 1 株が H L 0 5 0 P A 2 もしくは H L 0 2 5 P A 1 であるか、

アクネ菌 (P. acnes) の R T 2 株を含み、前記 R T 2 株が H L 0 0 1 P A 1、H L 1 0 3 P A 1、もしくは H L 1 0 6 P A 1 であるか、または 10

アクネ菌 (P. acnes) の R T 6 株を含み、前記 R T 6 株が H L 0 4 2 P A 3 もしくは H L 1 1 0 P A 3 である、

請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

アクネ菌 (P. acnes) の R T 3 株を含み、前記 R T 3 株が H L 0 2 5 P A 2、もしくは H L 0 4 6 P A 1 であるか、

アクネ菌 (P. acnes) の R T 8 株を含み、前記 R T 8 株が H L 1 1 0 P A 2、もしくは H L 0 5 3 P A 2 であるか、

アクネ菌 (P. acnes) の R T 1 6 株を含み、前記 R T 1 6 株が H L 0 5 9 P A 1 であるか、または 20

アクネ菌 (P. acnes) の I I I 型株を含み、前記 I I I 型株が H L 2 0 1 P A 1、1 7 A、もしくは 2 0 C である、

請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

レブリン酸、4, 6-ジオキソヘプタン酸、またはイソニコチン酸ヒドラジドを更に含む、請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

アクネ菌 (P. acnes) の R T 4 株及び R T 5 株を実質的に含まない、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。 30

【請求項 1 8】

対象がビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性の判定方法であって、前記対象から得られたアクネ菌 (P. acnes) を含む細胞懸濁液のポルフィリン濃度を計算することを含む前記方法。

【請求項 1 9】

前記ポルフィリン濃度を計算することが、コプロポルフィリン I I I またはコプロポルフィリン I の濃度を測定することを含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ポルフィリン濃度を計算することが、約 3 8 0 n m ~ 約 4 3 0 n m の波長における吸光度を測定することを含む、請求項 1 8 または 1 9 に記載の方法。 40

【請求項 2 1】

前記計算されたポルフィリン濃度が約 3 μ M よりも高い場合に、前記対象を、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断することを更に含む、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記計算されたポルフィリン濃度が約 2 μ M よりも高い場合に、前記対象を、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断することを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記計算されたポルフィリン濃度が約 2 μ M 未満である場合に、前記対象を、ビタミン 50

B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断することを更に含む、請求項 18～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記ポルフィリン濃度を計算する前に、前記対象から得られた前記アクネ菌（*P. acnes*）を培養することを更に含む、請求項 18～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

対象がビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性の判定方法であって、前記対象から得られたアクネ菌（*P. acnes*）の株を同定することと、前記アクネ菌（*P. acnes*）の株がビタミン B₁₂ に感受性である場合に、前記対象を、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断することを含む前記方法。

10

【請求項 26】

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株が RT4 または RT5 である場合に、前記対象がビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株が RT3 株 HL063PA2、または RT8 株 HL082PA1 である場合に、前記対象がビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断される、請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株が RT2 または RT6 である場合に、前記対象はビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断される、請求項 25～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 29】

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株が II 型または III 型である場合に、前記対象はビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断される、請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記対象がビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断される場合に、前記対象にビタミン B₁₂ を投与することを更に含む、請求項 25～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 31】

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株を同定することが、前記株の 16S rRNA をコードする核酸を配列決定することを含む、請求項 25～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

対象に皮膚状態の危険性があるか否かの判定方法であって、
前記対象から皮膚の試料を得ることと、
任意選択で前記皮膚の試料から細菌 DNA を単離することと、
前記皮膚の試料中の前記細菌 DNA を配列決定することと
を含み、

40

前記細菌 DNA 中に deoR 転写抑制因子が存在しない場合に、前記対象は皮膚状態の危険性があると見なされる、
前記方法。

【請求項 33】

前記皮膚状態がざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

deoR をコードする核酸を含む局所組成物。

【請求項 35】

ベクターを含み、前記ベクターが前記核酸を含む、請求項 34 に記載の組成物。

50

【請求項 36】

前記ベクターがファージであり、前記ファージがアクネ菌（*Propionibacterium acnes*）に対する向性を有する、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

対象の皮膚状態の予防または治療方法であって、前記対象の前記皮膚に、請求項 34 ～ 36 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与することを含む前記方法。

【請求項 38】

前記皮膚状態がざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

対象の皮膚状態の治療方法であって、
前記対象から得られたアクネ菌（*P. acnes*）を含む細胞懸濁液のポルフィリン濃度を計算することと、

前記計算されたポルフィリン濃度が閾値を上回る場合に、前記対象を光線力学療法で治療することと
を含む前記方法。

【請求項 40】

前記ポルフィリン濃度を計算することが、コプロポルフィリン III またはコプロポルフィリン I の濃度を測定することを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記ポルフィリン濃度を計算することが、約 380 nm ～ 約 430 nm の波長における吸光度を測定することを含む、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記計算されたポルフィリン濃度が閾値未満である場合に、前記対象を光線力学療法以外の療法で治療することを更に含む、請求項 39 ～ 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

前記光線力学療法以外の療法が前記対象に抗生物質を投与することを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記閾値が約 1 μ M ～ 約 6 μ M である、請求項 39 ～ 43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 45】

前記閾値が約 2 μ M ～ 約 5 μ M である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記閾値が約 3 μ M ～ 約 4 μ M である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記ポルフィリンの濃度を計算する前に、前記対象から得られた前記アクネ菌（*P. acnes*）を培養することを更に含む、請求項 39 ～ 46 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 48】

対象の皮膚状態の治療方法であって、
前記対象から得られたアクネ菌（*P. acnes*）の株のアイデンティティを判定することと、

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株が高レベルのポルフィリンを産生する場合に、前記対象を光線力学療法で治療することと
を含む前記方法。

【請求項 49】

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株が RT4 または RT5 である場合に、前記対象を光線力学療法で治療することを含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記アクネ菌（*P. acnes*）の株が RT2 または RT6 である場合には、前記対象

10

20

30

40

50

が光線力学療法による治療を受けない、請求項 48 または 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記アクネ菌 (*P. acnes*) の株が III 型である場合には、前記対象が光線力学療法による治療を受けない、請求項 48～50 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 52】

前記アクネ菌 (*P. acnes*) の株が高レベルのポルフィリンを産生しない場合に、前記対象を光線力学療法以外の療法で対象を治療することを含む、請求項 48～51 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

前記光線力学療法以外の療法が前記対象に抗生物質を投与することを含む、請求項 52 に記載の方法。 10

【請求項 54】

前記皮膚状態がざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症である、請求項 39～53 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 55】

対象の皮膚状態の予防または治療方法であって、前記対象の前記皮膚に、deoR をコードする核酸を含むアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株を含む組成物を投与することを含む前記方法。

【請求項 56】

前記核酸が deoR に機能的に連結されたプロモーターを含む、請求項 55 に記載の方法。 20

【請求項 57】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が deoR 転写抑制因子を発現する、請求項 55 または 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT1、RT2、または RT6 である、請求項 55～57 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 59】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT3、RT8、RT16、または III 型である、請求項 55～57 のいずれか 1 項に記載の方法 30

【請求項 60】

前記組成物が、RT4 株または RT5 株などの、アクネ菌 (*P. acnes*) の deoR を発現しない株を実質的に含まない、請求項 55～59 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 61】

前記皮膚状態がざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症である、請求項 55～60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

前記対象が 1 日当たり少なくとも 2 μ g のビタミン B₁₂ を摂取している、請求項 55～61 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 63】

前記対象が、1 日当たり少なくとも 10 μ g のビタミン B₁₂ を摂取している、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記対象がヒトである、請求項 55～63 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 65】

deoR をコードする核酸を含むアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株を含む、皮膚状態の治療用または皮膚の健康維持用の局所組成物。

【請求項 66】

前記核酸が deoR に機能的に連結されたプロモーターを含む、請求項 65 に記載の組 50

成物。

【請求項 67】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が deoR 転写抑制因子を発現する、請求項 65 または 66 に記載の組成物。

【請求項 68】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT1、RT2、または RT6 である、請求項 60～62 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 69】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT3、RT8、RT16、または III 型である、請求項 65～68 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 70】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT1 であり、前記 RT1 株が HL050PA2 もしくは HL025PA1 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT2 であり、前記 RT2 株が HL001PA1、HL103PA1、もしくは HL106PA1 であるか、または

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT6 であり、前記 RT6 株が HL042PA3 もしくは HL110PA3 である、請求項 68 に記載の組成物。

20

【請求項 71】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT3 であり、前記 RT3 株が HL025PA2、もしくは HL046PA1 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT8 であり、前記 RT8 株が HL110PA2、もしくは HL053PA2 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT16 であり、前記 RT16 株が HL059PA1 であるか、または

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が III 型であり、前記 III 型株が HL201PA1、17A、もしくは 20C である、請求項 69 に記載の組成物。

30

【請求項 72】

レブリン酸、4, 6-ジオキソヘプタン酸、またはイソニコチン酸ヒドラジドを更に含む、請求項 65～71 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 73】

RT4 株及び RT5 株などの、アクネ菌 (*P. acnes*) の deoR をコードしない、または deoR を有さない株を実質的に含まない、請求項 65～72 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 74】

前記核酸が、deoR に機能的に連結されたプロモーターを含み、前記プロモーターが天然の deoR プロモーターではない、請求項 65～73 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 75】

前記核酸が組換え核酸である、請求項 65～74 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 76】

対象の皮膚上のポルフィリンの量の低減方法であって、前記対象に、アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の 1 種または複数種の株を含む組成物を投与することを含む前記方法。

【請求項 77】

前記対象がざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症を有する、請求項 76 に記載の方法。

50

【請求項 78】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT1、RT2、RT3、RT6、RT8、RT16、または III 型である、請求項 76 または 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT1 であり、前記 RT1 株が HL050PA2 もしくは HL025PA1 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT2 であり、前記 RT2 株が HL001PA1、HL103PA1、もしくは HL106PA1 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT3 であり、前記 RT3 株が HL025PA2、もしくは HL046PA1 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT6 であり、前記 RT6 株が HL042PA3 もしくは HL110PA3 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT8 であり、前記 RT8 株が HL110PA2、もしくは HL053PA2 であるか、

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が RT16 であり、前記 RT16 株が HL059PA1 であるか、または

前記アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の株が III 型であり、前記 III 型株が HL201PA1、17A、もしくは 20C である、請求項 76～78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

前記組成物が局所送達用に製剤化されている、請求項 76～79 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 81】

前記組成物が、アクネ菌 (*P. acnes*) の、deoR をコードしていないまたは deoR を有していない株、ならびに RT4 株及び RT5 株を実質的に含まない、請求項 76～80 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2016年2月5日出願の米国仮特許出願第62/291,665号の優先権を主張し、該出願は、本記載により、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

政府による支援に関する表示

本発明は、国立衛生研究所により付与された助成金第R01GM099530号の下で、政府の支援によりなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) はヒトの皮膚に棲みつく主要な共生細菌である。*Propionibacterium acnes* は皮膚の健康の維持に重要な役割を果たしているが、サルコイドーシス、SAPHO症候群、歯内病変、眼感染症、人工関節感染症、前立腺癌、及び尋常性ざ瘡（一般にはざ瘡と呼ばれる）を含む数種の疾患及び感染症の病因に関与もしている。ざ瘡は、世界中の80%を超える青少年や青年が罹患する最も一般的な皮膚疾患である。この疾患の臨床上的重要性にもかかわらず、ざ瘡の病因は未だ明らかになっていない。*P. acnes* はざ瘡患者と健常者の両方の皮膚の圧倒的多数に存在し、したがって、ざ瘡の病因におけるその役割は十分に解明されていない。

【発明の概要】

【0004】

いくつかの態様において、本発明は、対象の皮膚状態の予防または治療方法であって、上記対象の上記皮膚に、*Propionibacterium acnes*のRT1株、RT2株、RT3株、RT6株、RT8株、RT16株、またはIII型株を含む組成物を投与することを含む上記方法に関する。いくつかの実施形態において、*Propionibacterium acnes*のRT1株、RT2株、RT3株、RT6株、RT8株、RT16株、またはIII型株を含む組成物が、皮膚状態の治療または皮膚の健康維持のための経口送達用に製剤化される。いくつかの実施形態において、上記組成物は2種以上の株を含む。*P. acnes*の株は、HL042PA3、HL050PA2、HL025PA1、HL001PA1、HL103PA1、HL106PA1、HL110PA3、HL025PA2、HL046PA1、HL110PA2、HL053PA2、HL059PA1、HL201PA1、17A、及び20Cから選択されてもよい。上記疾患はざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症であってよい。

10

【0005】

いくつかの態様において、本発明は、*Propionibacterium acnes*のRT2株を含む、皮膚状態の治療用または皮膚の健康維持用の局所組成物に関する。上記株は、例えば、HL001PA1であってよい。HL001PA1は、Belfast MLST₈分類法に基づけばクローナルコンプレックス (clonal complex) 72 (CC72) 株であり、HL001PA1は、Aarhus MLST₉分類法に基づけばクローナルコンプレックス60 (CC60) 株である。

20

【0006】

いくつかの態様において、本発明は、対象がビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性の判定方法であって、上記対象から得られた*P. acnes*のポルフィリン産生を測定することを含む上記判定方法に関する。

【0007】

いくつかの態様において、本発明は、対象がビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性の判定方法であって、上記対象から得られた*P. acnes*の1種または複数種の株を同定することと、上記*P. acnes*の株の1種または複数種がビタミンB₁₂に感受性である場合に、上記対象を、ビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断することを含む上記判定方法に関する。いくつかの態様において、本発明は、対象がビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性の判定方法であって、上記対象から得られた*P. acnes*の1種または複数種の株を同定することと、上記*P. acnes*の株の1種または複数種が高レベルのポルフィリンを産生する場合に、上記対象を、ビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断することを含む上記判定方法に関する。

30

【0008】

いくつかの態様において、本発明は、deoRをコードする核酸を含む局所組成物に関する。他の態様において、本発明は、deoRをコードする核酸を含む経口送達用に製剤化された組成物に関する。

【0009】

いくつかの態様において、本発明は、対象の皮膚状態の治療方法であって、上記対象から得られた*P. acnes*のポルフィリン産生を測定することと、上記ポルフィリン産生が閾値を上回る場合に、上記対象を光線力学療法で治療することを含む上記治療方法に関する。いくつかの実施形態において、本発明は、対象の皮膚状態の治療方法であって、上記対象から得られた*P. acnes*の株のアイデンティティーを判定することと、上記*P. acnes*の株が高レベルのポルフィリンを産生する場合に、上記対象を光線力学療法で治療することを含む上記治療方法に関する。

40

【0010】

いくつかの態様において、本発明は、対象の皮膚状態を治療するための組成物及び方法であって、上記対象に、deoRをコードする核酸を含む*P. acnes*を含む組成物を

50

投与することを含む、上記組成物及び方法に関する。上記組成物は局所送達用に製剤化してもよい。上記組成物は経口送達用に製剤化してもよい。

【0011】

いくつかの態様において、本明細書では、対象の皮膚上のポルフィリンの量の低減方法であって、上記対象に、*Propionibacterium acnes*の1種または複数種の株を含む組成物を投与することによる上記低減方法が提供される。上記対象はざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症を有していてもよい。

【0012】

いくつかの態様において、本明細書では、*Propionibacterium acnes*のRT1株、RT2株、RT3株、RT6株、RT8株、RT16株、またはII型株を含む、皮膚状態の治療または皮膚の健康維持のための経口送達用に製剤化された組成物が提供される。他の態様において、本明細書では、deoRをコードする核酸を含む*Propionibacterium acnes*の株を含む、皮膚状態の治療用または皮膚の健康維持用の組成物（例えば、経口もしくは局所組成物）が提供される。*P. acnes*の株は、HL042PA3、HL050PA2、HL025PA1、HL001PA1、HL103PA1、HL106PA1、HL110PA3、HL025PA2、HL046PA1、HL110PA2、HL053PA2、HL059PA1、HL201PA1、I7A、または20Cから選択されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ざ瘡と関連するIA-2型*P. acnes*株は健康と関連するII型株よりも有意により多くのポルフィリンを産生したことを示す図である。それぞれの棒は、細菌培養密度によって規格化された、それぞれの株によって産生されたポルフィリンを表す。それぞれの実験について少なくとも3回の繰り返しを伴う、少なくとも3回の独立した実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準誤差を表す。

【図2】ビタミンB₁₂の追加によって、ざ瘡と関連するIA-2型株においてポルフィリン産生が有意に増加したが、健康と関連するII型株においては増加がなかったことを示す図である。10 µg/mLのビタミンB₁₂の添加あり（黒棒）または添加なし（白棒）の培地中で*P. acnes*株を培養した。それぞれの棒は、細菌培養密度によって規格化された、それぞれの株によって産生されたポルフィリンを表す。それぞれの実験について少なくとも3回の繰り返しを伴う、少なくとも3回の独立した実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準誤差を表す。

【図3】ビタミンB₁₂の追加によって、ビタミンB₁₂生合成遺伝子*cbiL*の発現が抑制されたことを表す図である。qRT-PCRによって、10 µg/mLのビタミンB₁₂の添加ありまたは添加なしで培養した*P. acnes*株の*cbiL*の発現レベルを定量した。IA-2型株及びII型株ならびにdeoRをコードするRT1株であるHL025PA1を示す。それぞれの棒は、ビタミンB₁₂の添加なしの培養物と比較して、ビタミンB₁₂の追加ありの培養物における*cbiL*の遺伝子発現の倍率変化を表す。それぞれの実験について3回の繰り返しを伴う、3回の独立した実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準偏差を表す。

【図4】5-ALAはポルフィリン産生を増加させ、この増加はざ瘡と関連するIA-2型株において、ビタミンB₁₂の追加によって更に亢進したことを示す図である。基質5-ALA（0.1 mg/mL）あり（灰色棒）もしくはなし（白棒）の、または5-ALA及びビタミンB₁₂（10 µg/mL）の両方を添加した（黒棒）培地中で*P. acnes*株を培養した。ざ瘡と関連するIA-2型株（ $P < 0.0001$ ）及び健康と関連するII型株（ $P < 0.06$ 、HL001PA1を除く）において、5-ALAによってポルフィリン産生が有意に増加した。ざ瘡と関連するIA-2型株においては、5-ALAの存在下でのビタミンB₁₂の追加によって、ポルフィリン産生が更に増加したが、健康と関連するII型株においては増加しなかった。それぞれの棒は、細菌培養密度によって規格化された、それぞれの株によって産生されたポルフィリンを表す。それぞれの実験に

10

20

30

40

50

ついて少なくとも3回の繰り返しを伴う、少なくとも3回の独立した実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準誤差を表す。

【図5】小分子阻害剤が *P. acnes* におけるポルフィリン産生を低減したこと、及びざ瘡と関連する *IA-2* 型株において、ビタミン B_{12} の追加によってその阻害が妨害されたことを示す図である。阻害剤 $LA (0.1 \text{ mg/mL})$ あり（灰色棒）もしくはなし（白棒）の、または LA 及びビタミン $B_{12} (10 \text{ } \mu\text{g/mL})$ の両方を添加した（黒棒）培地中で *P. acnes* 株を培養した。HL001PA1を除く全ての株において、 LA によってポルフィリン生合成が有意に低下した ($P \leq 0.0001$)。ざ瘡と関連する *IA-2* 型株においては、ビタミン B_{12} の追加によって、 LA によるポルフィリン生合成の阻害が妨害されたが、健康と関連する *II* 型株においては妨害がなかった。それぞれの棒は、細菌培養密度によって規格化された、それぞれの株によって産生されたポルフィリンを表す。それぞれの実験について少なくとも3回の繰り返しを伴う、少なくとも3回の独立した実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準誤差を表す。

【図6】健康と関連する株が、ポルフィリン生合成オペロン中に、抑制因子遺伝子である *deoR* をコードし、該オペロン中でこれを発現したことを示す図である。複数の株の *cDNA* 及びゲノム *DNA* (*gDNA*) 試料由来の *deoR* の増幅をゲル画像に示す。16S *rRNA* 遺伝子を陽性対照として用いた。ざ瘡と関連する *IA-2* 型株であり、*deoR* をコードしない HL045PA1 を陰性対照として示す。

【図7】コプロポルフィリンが *P. acnes* によって生産される主要なポルフィリンアイソフォームであったことを示す図である。*P. acnes* によって分泌されるポルフィリンは、モノアイソトピックなコプロポルフィリンアイソフォームに特徴的な質量スペクトル ($[M+H]^+ = 655.3$) を有する。二重に荷電した親イオン ($[M+2H]^+ = 328.2$) も観測された。

【図8】*P. acnes* 株におけるポルフィリン（ヘム）遺伝子クラスタを示す図である。全ての健康と関連する *II* 型株は、ポルフィリン遺伝子クラスタ中に *deoR* 転写抑制因子 (*PPA0299*、緑色) を保有する。各区画の下の数字は、*KPA171202* における遺伝子アノテーションに基づく遺伝子 *ID* を表す。黒い区画中の文字は、ポルフィリン生合成遺伝子であるヘム遺伝子の名称を示す。*PPA0300* 及び *PPA0310* にはヘム遺伝子の名称が割り当てられていなかった。

【図9】*P. acnes* 系統における *deoR* の存在を示す図である。*deoR* をコードする *P. acnes* 株は緑色に着色されており、それぞれ *IC* 型、*IB-3* 型、*II* 型、及び *III* 型が含まれる。更に、*IA-2* 型の *P. acnes* の株 HL025PA1 は *deoR* をコードするが、他の *IA-1* 型、*IA-2* 型、*IB-1* 型、または *IB-2* 型の株は *deoR* 遺伝子をコードしないことが判明した。アスタリスクは実施例の項で試験した株を示す。

【図10】健康と関連する *II* 型株と同様に、HL025PA1 は低レベルのポルフィリンを産生し、ビタミン B_{12} の追加に対して応答がなかったことを示す図である。ビタミン $B_{12} (10 \text{ } \mu\text{g/mL})$ あり（黒棒）またはなし（白棒）の培地中で HL025PA1 を培養した。比較のために、健康と関連する *II* 型株である HL103PA1 及び HL042PA3 を示す。それぞれの棒は、細菌培養密度によって規格化された、それぞれの株によって産生されたポルフィリンを表す。それぞれの実験について3回の繰り返しを伴う、3回の独立した実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準誤差を表す。

【図11】*I* 型の *P. acnes* 株におけるポルフィリン産生を示す図である。*IA-1* 型株及び *IA-2* 型株は、被験株の中で最も高レベルのポルフィリンを産生した。RT8株、RT3株、及びRT16株は *IA-1* 型株及び *IA-2* 型株よりもポルフィリン産生が少ないが、RT2株及びRT6株よりも産生が多かった。それぞれの棒は、細菌培養密度によって規格化された、それぞれの株によって産生されたポルフィリンを表す。それぞれの実験について少なくとも3回の繰り返しを伴う、少なくとも2回の独立した実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準誤差を表す。

【図12】*P. acnes* *I* 型株は、*II* 型株及び *III* 型株よりも有意により多くの

ポルフィリンを産生することを示す図である。それぞれの棒は、細菌培養密度によって規格化された、それぞれの株によって産生されたポルフィリンを表す。I 型株はビタミン B₁₂ の追加に対して応答し、ポルフィリン産生が増加した。II 型株及び III 型株ではこの応答は認められなかった（データ非表示）。それぞれの実験について少なくとも 4 回の繰り返しを伴う、少なくとも 1 回の実験から得られたデータの平均値を示す。誤差棒は標準誤差を表す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のいくつかの態様は、ビタミン B₁₂ を補給することによって、ざ瘡の発症において重要な一群の炎症促進性代謝産物であるポルフィリンの、P. acnes による産生が増加するという知見に基づいている。ざ瘡と関連する系統及び健康と関連する系統由来の複数の P. acnes 株のポルフィリン産生及び調節を比較した。ざ瘡と関連する株は本質的に、有意により高レベルのポルフィリンを産生し、このポルフィリン産生はビタミン B₁₂ の追加によって更に亢進した。一方、健康と関連する株は低レベルのポルフィリンを産生し、ビタミン B₁₂ に対する反応を示さなかった。小分子物質及び阻害剤を使用して、ポルフィリン生合成を代謝レベルで調節することができる。更に、ポルフィリン生合成の抑制因子の遺伝子 (deoR) は全ての健康と関連する株においてコードされていたが、ざ瘡と関連する株においてはコードされていなかった。この deoR の発現は、健康と関連する株における転写レベルでのポルフィリン産生の更なる調節を示唆している。これらの知見は、P. acnes 株の皮膚の健康及び疾患に対する異なる寄与に関する分子機序を提示しており、ざ瘡の病因におけるビタミン B₁₂ の役割を更に裏付けている。詳細には、ポルフィリン生合成経路は、ざ瘡及びざ瘡に関係する皮膚状態の薬物標的であり、P. acnes の健康と関連する株は、皮膚治療薬におけるプロバイオティクスとして用いることができる可能性がある。

【0015】

本開示はまた、異なるレベルのポルフィリンを産生する P. acnes を有する対象の健康状態には、異なる処置を行った方がよい可能性があることも示唆している。ビタミン B₁₂ によるポルフィリン産生の調節は株特異的であり、このことは、個体の皮膚微生物叢の P. acnes 株組成がビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡の原因となることを示唆している。ざ瘡と関連する株を保有する個体は、当該個体の皮膚細菌の、より多くのポルフィリンを産生する能力に起因する高ビタミン B₁₂ レベルに反応して、ざ瘡を発症する危険性が高い可能性がある。一方、皮膚において健康と関連する株が支配的である個体では、上記細菌によって産生されるポルフィリンが低いレベルであり、ビタミン B₁₂ を補給した場合のざ瘡発症の危険性が低くなる可能性がある。

【0016】

定義

本出願の明細書において、「a」または「an」は単数または複数を意味する場合がある。本出願の特許請求の範囲（複数可）において、単語「comprising（含む）」と関連して用いられる場合、単語「a」または「an」は、1 または 2 以上を意味する場合がある。本明細書では、「別の」は、少なくとも第 2 の～を意味する場合がある。

【0017】

用語「予防する」は当該技術分野において認知されており、局所再発（例えば傷）などの状態、ざ瘡などの疾患、または瘢痕化などの損傷に関連して用いられる場合には、当該技術分野において十分に理解されており、組成物の投与であって、当該組成物の投与を受けていない対象と比較して、対象における医学的状态の症状の頻度を低下させるか、または該症状の発症を遅延させる上記組成物の投与を含む。したがって、ざ瘡の予防は、例えば、統計学的に及び／または臨床的に有意な量で、例えば、未処置の対照集団と比較して、予防的処置を受けている患者の集団における検出可能な傷（例えば、病変）の数を低減すること、及び／または未処置の対照集団に対して、処置を受けている集団における検出可能な傷の出現を遅延させることを含む。

【0018】

用語「予防的処置」及び「治療的処置」は当該技術分野で認知されており、対象に1種または複数種の組成物を投与することを含む。組成物が、望ましくない状態（例えば、組成物を受容する動物の疾患または他の望ましくない状態）の臨床上の発症の前に投与される場合には、その処置は予防的であり（すなわち、該処置は、当該の望ましくない状態の発症から当該の対象を保護する）、当該の望ましくない状態の発症の後に当該組成物が投与される場合には、その処置は治療的である（すなわち、該処置は、既存の望ましくない状態またはその副作用を低減する、改善する、または安定させることを意図している）。

【0019】

用語「対象」とは、ヒトまたは霊長動物、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウサギ、ネコ、またはげっ歯動物などの非ヒト哺乳動物を含む、但しこれらに限定されない哺乳動物をいう。好ましい実施形態において、上記対象はヒトである。

10

【0020】

本主題の治療方法に関する化合物の「治療上の有効量」とは、所望の投与計画の一部として（哺乳動物、好ましくはヒトに対して）投与される場合に、治療を受ける障害または状態に対して臨床的に許容される標準または美容上の目的に従って、例えば、任意の医学的処置に適用可能な妥当な利益／危険比で、症状を緩和し、状態を改善し、または病状の発症を遅延させる、製剤中の上記化合物（複数可）の量をいう。

【0021】

本明細書では、用語「治療する」または「治療」とは、対象の状態を改善または安定化する形態で、状態の症状、臨床徴候、及び根底にある病理を逆転させる、低減する、または阻止することを含む。

20

【0022】

I. 組成物

いくつかの態様において、本発明は、対象の状態を治療または予防するための組成物に関する。いくつかの態様において、本発明は、皮膚の健康を維持するための組成物に関する。本組成物は局所組成物であってもよい。本組成物は経口送達用に製剤化されてもよい。上記状態は皮膚状態であってもよい。上記皮膚状態はざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症であってもよい。

【0023】

組成物は、*Propionibacterium acnes* の株を含んでいてもよい。*P. acnes* の株は、例えば、RT1、RT2、及びRT6から選択されてもよい。いくつかの実施形態において、上記 *P. acnes* の株はRT3、RT8、RT16、またはIII型から選択される。上記株はHL001PA1、HL103PA1、HL042PA3、HL106PA1、HL110PA3、HL050PA2、またはHL025PA1から選択されてもよい。いくつかの実施形態において、上記株はHL025PA2、HL046PA1、HL110PA2、HL053PA2、HL059PA1、HL201PA1、17A、または20Cから選択されてもよい。上記株はRT2であってもよく、上記RT2株はHL001PA1、HL103PA1、またはHL106PA1であってもよい。上記株はRT1であってもよく、上記RT1株はHL050PA2またはHL025PA1であってもよい。上記株はRT6であってもよく、上記RT6株はHL042PA3またはHL110PA3であってもよい。上記株は *P. acnes* のII型株またはIII型株であってもよい。上記株はHL025PA2またはHL046PA1などのRT3株であってもよい。上記株はHL110PA2またはHL053PA2などのRT8であってもよい。上記株はHL059PA1などのRT16株であってもよい。上記株はHL201PA1、17A、または20CなどのIII型株であってもよい。本組成物は経口送達用に製剤化されていてもよい。本組成物は局所組成物であってもよい。本組成物は *P. acnes* の2種以上の株を含んでいてもよい。本組成物は *P. acnes* の少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、または少なくとも7種の株を含んでいてもよい。

30

40

50

【0024】

好ましい実施形態において、本組成物は *P. acnes* の RT4 株を実質的に含まない。好ましい実施形態において、本組成物は *P. acnes* の RT5 株を実質的に含まない。好ましい実施形態において、本組成物は HL045PA1、HL043PA1、HL043PA2、または HL053PA2 を含まない。いくつかの実施形態において、本組成物は *P. acnes* の IA-1 型、IA-2 型、IB-1 型、及び／または IC 型株を実質的に含まない。好ましい実施形態において、本組成物は *P. acnes* の IA-1 型、IA-2 型、及び／または IC 型株を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、本組成物は、*deoR* を発現しない、保有しない、及び／またはコードしない株を実質的に含まない。特定のかかる実施形態において、実質的に含まないとは、本組成物が、本組成物中の有益な株の治療効果を損なう程度には、示された株を含まないことを示す。他のかかる実施形態において、組成物が、ある株を 10% 未満、好ましくは 5% 未満、最も好ましくは 1% 未満しか含まない場合に、該組成物は当該指定された株を実質的に含まない。

10

【0025】

組成物は *deoR* をコードする核酸を含んでいてもよい（すなわち、上記核酸は上記 *deoR* ヌクレオチド配列を含んでいてもよい）。例えば、本組成物はベクターを含んでいてもよく、該ベクターは上記核酸を含んでいてもよい。本組成物は *P. acnes* の株を含み、上記 *P. acnes* の株は上記核酸を含んでいてもよい。上記核酸は DNA または RNA であってよい。

20

【0026】

上記ベクターはファージまたはプラスミドであってよい。上記ベクターはファージであってもよく、上記ファージは、例えば、上記ファージが *P. acnes* 細胞を上記核酸で形質転換することができるような、*Propionibacterium acnes* に対する向性を有してもよい。

【0027】

上記核酸はプロモーターを含んでいてもよく、上記プロモーター及び *deoR* は、例えば、上記核酸を含む細胞が、上記核酸から RNA を転写できるように、機能的に連結されていてもよい。

【0028】

上記核酸は組換え核酸であってもよい。例えば、*deoR* は、天然の *deoR* プロモーター以外のプロモーターに機能的に連結されていてもよい。同様に、*deoR* は、*E. coli* などの異なる種の複製起点を含むベクター、またはバクテリオファージのパッケージングシグナルを含むベクターなどの、*P. acnes* に元々存在しないベクター中に存在してもよい。上記核酸は *P. acnes* ゲノムであってもよく、*deoR* は上記ゲノムにランダムに組み込まれていてもよい。

30

【0029】

組成物は、例えば、*P. acnes* ゲノムである、プラスミドである、もしくは RNA である核酸を含む、*P. acnes* の 1 種または複数種の株を含んでいてもよい。組成物は、*deoR* タンパク質産物（例えば転写抑制因子タンパク質）を含む *P. acnes* の 1 種または複数種の株を含んでいてもよい。例えば、かかる株は *deoR* タンパク質産物を発現してもよい。組成物は、*deoR* 遺伝子をコードするまたは保有する *P. acnes* の 1 種または複数種の株を含んでいてもよい。組成物は、RT1 株、RT2 株、もしくは RT6 株から選択される *P. acnes* の 1 種または複数種の株、及び／または *deoR* をコードする組換え核酸を含む株を含んでいてもよい。組成物は、Belfast MLST₈ 分類法によって決定されるクロナルコンプレックス 72 (CC72) 株を含んでいてもよい。組成物は、Aarhus MLST₉ 分類法によって決定されるクロナルコンプレックス 60 (CC60) 株を含んでいてもよい。組成物は、RT3、RT8、RT16、もしくは III 型から選択される *P. acnes* の 1 種または複数種の株、及び／または *deoR* をコードする組換え核酸を含む株を含んでいてもよい。

40

50

【0030】

組成物は、レブリン酸、4, 6-ジオキソヘプタン酸、及び／またはイソニコチン酸ヒドラジドを更に含んでもよい。

【0031】

本明細書に記載の組成物は、消化管への経口投与に用いてもよい。本発明の組成物（例えば、プロバイオティク組成物）の製剤はまた、孢子発芽及び／または細菌増殖を促進する他のプロバイオティク剤または栄養素を含んでもよい。例示的な物質としては、有益なプロバイオティク細菌の増殖を促進する、ビフィズス菌の増殖を促進する（*bifidogenic*）オリゴサッカライドがある。いくつかの実施形態において、上記プロバイオティク細菌組成物は、治療上有効な用量の（好ましくは適用範囲の広い）抗生物質または抗真菌剤と共に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物は、腸溶性被覆された、時間放出カプセルまたは錠剤中に封入される。

10

【0032】

本組成物は乳製品などの、但しこれに限定されない食品であってもよい。上記乳製品は培養されたまたは培養されていない（例えば乳）乳製品であってもよい。培養された乳製品の非限定的な例としては、ヨーグルト、カッテージチーズ、サワークリーム、ケフィア、バターミルクなどが挙げられる。乳製品は多くの場合、種々の乳特有の成分、例えば、乳清、脱脂粉乳、乳清タンパク質濃縮固形物などを含有する。上記乳製品は、風味、増粘力、栄養、特定の微生物及びカビの増殖制御などの他の特性などの、望ましい品質を得るために、当該技術分野で公知の任意の形態で処理されてもよい。本発明の組成物はまた、公知の抗酸化剤、緩衝剤、及び着色料、香味料、ビタミン、またはミネラルなどの他の薬剤を含んでもよい。

20

【0033】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、当該組成物が投与される対象（複数可）の消化管組織と生理学的に適合する担体（例えば薬学的に許容される担体）と組み合わせられる。担体は、錠剤、カプセル剤または散剤の形態に製剤化するための、固体を基にした液体を含まない物質から構成することができ、または上記担体は、液剤もしくはゲル剤の形態に製剤化するための、液体またはゲルを基にした物質から構成することができる。特定の担体の種類、ならびに最終的な製剤は、一部は選択される投与経路（複数可）に依存する。本発明の治療用組成物はまた、種々の担体及び／または結合剤を含んでもよい。いくつかの実施形態において、上記担体は、総重量1 gの投与量に仕上げるのに十分な量で添加された微結晶セルロース（MCC）である。担体は、錠剤、カプセル剤または散剤の形態に製剤化するための、固体を基にした液体を含まない物質であってもよく、または液剤もしくはゲル剤の形態に製剤化するための、液体またはゲルを基にした物質であってもよく、前記形態は、一部は投与経路に依存する。液体を含まない製剤用の一般的な担体としては、トレハロース、マルトデキストリン、米粉、微結晶セルロース（MCC）、ステアリン酸マグネシウム、イノシトール、FOS、GOS、デキストロース、スクロースなどが挙げられるが、これらに限定はされない。好適な液体またはゲルを基にした担体としては、水及び生理学的塩溶液、尿素、アルコール及び誘導體（例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール）、グリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコールなど）が挙げられるが、これらに限定はされない。水性担体は中性のpH値（すなわちpH7.0）を有することが好ましい。本明細書に記載の組成物を投与するための他の担体または薬剤は、当該技術分野、例えば米国特許第6,461,607号において公知である。

30

40

【0034】

A. ビヒクル、溶媒、及び希釈剤

組成物は、ビヒクル、溶媒、及び／または希釈剤を含んでもよい。本発明の製剤と共に用いるのに適した局所用ビヒクル及びビヒクル成分は、化粧品及び医薬品分野において周知であり、水；アルコール（特に、エタノールなどの皮膚から容易に蒸発することができる低級アルコール）、グリコール（プロピレングリコール、ブチレングリコール、及

50

びグリセロール（グリセリン）など）、脂肪族アルコール（ラノリンなど）などの有機溶媒；水と有機溶媒との（水とアルコールなどの）混合物、及びアルコールとグリセロールなどの有機溶媒の混合物（任意選択で水も含む）；脂肪酸、アシルグリセロール（鉱油などの油、及び天然または合成起源の脂肪を含む）、ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質及びワックスなどの脂質系物質；コラーゲン及びゼラチンなどのタンパク質系物質；シクロメチコン、ジメチコノール、ジメチコン、及びジメチコンコポリオールなどのシリコーン系物質（不揮発性及び揮発性の両方）；ワセリン及びスクアランなどの炭化水素系物質；及び皮膚への投与に適した他のビヒクル及びビヒクル成分、ならびに上記で特定された、さもなければ当該技術分野で公知の局所用ビヒクル成分の混合物などのビヒクル（またはビヒクル成分）が挙げられる。

10

【0035】

一実施形態において、本発明の組成物は水中油型乳剤である。本発明の組成物の製剤化に用いるのに適した液体としては、水、ならびにグリコール（例えば、エチレングリコール、ブチレングリコール、イソプレングリコール、プロピレングリコール）、グリセロール、液体ポリオール、ジメチルスルホキシド、及びイソプロピルアルコールなどの水と混和性の溶媒が挙げられる。1種または複数種の水性ビヒクルが存在してもよい。

【0036】

一実施形態において、メタノール、エタノール、プロパノール、またはブタノールを含まない製剤が望ましい。

【0037】

20

B. 界面活性剤及び乳化剤

組成物は界面活性剤及び／または乳化剤を含んでもよい。多くの局所製剤は、特定の溶媒系中に類似性のない化学物質を分散させるために、界面活性成分（乳化剤及び界面活性剤）を使用する化学的乳剤を含有する。例えば、ほとんどの脂質様（油性または脂肪性）のまたは親油性の成分は、最初に乳化剤と組み合わせられない限り水性溶媒中に均一に分散せず、乳化剤は親油性の内側部分及び親水性の外側部分を含む微視的な水溶性構造（小滴）を形成し、それによって水中油型乳剤を生じる。分子は、水性媒体に可溶であるためには極性であるかまたは荷電していなければならない、それは、同じく極性である水分子と良好に相互作用するようにするためである。同様に、水溶性の極性または荷電した成分を主として脂質系または油系の溶媒に溶解させるためには、一般的に、安定した構造であって、親油性の溶媒に溶解して油中水型乳剤を形成することができるように、該構造の内側に親水性成分を含有し、外側が親油性である上記構造を形成する乳化剤が用いられる。かかる乳剤は、乳剤の小滴内の乳化剤の極性もしくは荷電部分と相互作用することができる塩または他の荷電した成分の添加によって、不安定化される場合があることは周知である。乳剤の不安定化によって、水性成分及び親油性成分が2層に分離し、局所用製品の商品価値が損なわれる可能性がある。

30

【0038】

本発明に用いるのに適した界面活性剤はイオン性または非イオン性であってよい。これらの界面活性剤としては、セチルアルコール、ポリソルベート（ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80）、ステアレスー10（B r i j 76）、ドデシル硫酸ナトリウム（ラウリル硫酸ナトリウム）、ラウリルジメチルアミンオキシド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）、ポリエトキシ化アルコール、ポリオキシエチレンソルビタン、オクトキシノール、N，N－ジメチルドデシルアミン－N－オキシド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（HTAB）、ポリオキシシル10ラウリルエーテル、胆汁酸塩（デオキシコール酸ナトリウムまたはコール酸ナトリウムなど）、ポリオキシシルヒマシ油、ノニルフェノールエトキシラート、シクロデキストリン、レシチン、ジメチコンコポリオール、ラウラミドDEA、コカミドDEA、コカミドMEA、オレイルベタイン、コカミドプロピルベタイン、コカミドプロピルホスファチジルPG－ジモニウムクロリド、リン酸ジセチル（リン酸ジヘキサデシル）、セテアレスー10リン酸（ceteareth-10 phosphate）、メ

40

50

チルベントニウムクロリド、リン酸ジセチル、セテスー10リン酸（セテスー10はセチルアルコールのポリエチレングリコールエーテルであり、 n の平均値は10であり、セテスー10リン酸はセテスー10のリン酸エステル混合物である）、セテスー20、Br i j S 10（ポリエチレングリコールオクタデシルエーテル、平均 M_n 約711）、及びポロキサマー（ポロキサマー188（ $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ 、平均分子量8400）及びポロキサマー407（ $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ 、式中、 a は約101、 b は約56である）を含む、但しこれらに限定はされない）が挙げられるが、これらに限定はされない。かかる界面活性剤の適宜の組み合わせまたは混合物も、本発明に従って用いることができる。

10

【0039】

これらの界面活性剤の多くは、本発明の製剤において乳化剤としての役割を果たすこともできる。

【0040】

本発明の製剤に用いるのに適した他の界面活性剤としては、ベヘントリモニウムメトサルフェートセテアリアルアルコール；乳化用ワックス、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、PEG-40ステアラート、セトステアリアルアルコール（セテアリアルアルコール）、セテアレスー12、セテアレスー20、セテアレスー30、セテアレスアルコール、セテスー20（セテスー20はセチルアルコールのポリエチレングリコールエーテルであり、 n の平均値は20である）、オレイン酸、オレイルアルコール、ステアリン酸グリセリル、ステアリン酸PEG-75、ステアリン酸PEG-100、及びステアリン酸PEG-100、セラミド2、セラミド3、ステアリン酸、コレステロール、ステアレスー2、及びステアレスー20、またはこれらの組み合わせ／混合物などの非イオン性乳化剤、ならびにステアラミドプロピルジメチルアミン及びベヘントリモニウムメトサルフェートなどのカチオン性乳化剤、またはそれらの組み合わせ／混合物が挙げられるが、これらに限定はされない。

20

【0041】

C. 保湿剤、皮膚軟化剤、及び湿潤剤

組成物は、保湿剤、皮膚軟化剤、及び／または湿潤剤を含んでいてもよい。一般的には局所製品の、特に化粧品の、最も重要な側面の1つは製品の審美的品質に対する消費者の認識である。例えば、白色ワセリンは優れた保湿剤及び皮膚保護剤であるが、油っぽく、ベタベタしており、容易に皮膚にすり込めず、衣類を汚すことがあるため、特に顔面には、単独ではほとんど用いられない。消費者は、審美的に上品で、消費者の皮膚における許容できる触感及び出来栄を有する製品を高く評価する。

30

【0042】

本発明の製剤に用いるのに適した保湿剤としては、乳酸及び他のヒドロキシ酸ならびにそれらの塩、グリセロール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、PCAナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、カルボワックス200、カルボワックス400、及びカルボワックス800が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0043】

本発明の製剤に用いるのに適した皮膚軟化剤または湿潤剤としては、パンテノール、パルミチン酸セチル、グリセロール（グリセリン）、PPG-15ステアリアルエーテル、ラノリンアルコール、ラノリン、ラノリン誘導体、コレステロール、ワセリン、ネオペンタン酸イソステアリアル、ステアリン酸オクチル、鉱油、ステアリン酸イソセチル、ミリスチン酸ミリスチル、オクチルドデカノール、パルミチン酸2-エチルヘキシル（パルミチン酸オクチル）、ジメチコン、フェニルトリメチコン、シクロメチコン、安息香酸 C_{12} ～ C_{15} アルキル、ジメチコノール、プロピレングリコール、Theobroma grandiflorum種子バター、セラミド（例えば、セラミド2またはセラミド3）、ヒドロキシプロピルビスパルミタミドMEA、ヒドロキシプロピルビスラウラミドMEA、ヒドロキシプロピルビスイソステラミドMEA、1,3-ビス（N-2-（ヒドロキシエ

40

50

チル) ステアロイルアミノ) - 2 - ヒドロキシプロパン、ビス-ヒドロキシエチルトコフェリルスクシノイルアミドヒドロキシプロパン、尿素、アロエ、アラントイン、グリチルレチン酸、ベニバナ油、オレイルアルコール、オレイン酸、ステアリン酸、ジカプリル酸エステル/ジカプリン酸エステル、セバシン酸ジエチル、イソステアリルアルコール、ペンチレングリコール、イソノナン酸イソノニル、及び 1, 3 - ビス (N - 2 - (ヒドロキシエチル) パルミトイルアミノ) - 2 - ヒドロキシプロパンが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0044】

更に、これらの保湿剤及び皮膚軟化剤のいずれかの適宜の組み合わせ及び混合物を本発明に従って用いてもよい。

【0045】

D. 防腐剤及び抗酸化剤

組成物は、防腐剤及び/または酸化防止剤などの、適用された製剤の安定性または有効性を向上させるのに適した成分を含んでもよい。本発明に用いるのに適した防腐剤としては、イミダゾリジニル尿素及びジアゾリジニル尿素などの尿素；フェノキシエタノール；メチルパラベンナトリウム、メチルパラベン、エチルパラベン、及びプロピルパラベン；ソルビン酸カリウム；安息香酸ナトリウム；ソルビン酸；安息香酸；ホルムアルデヒド；クエン酸；クエン酸ナトリウム；二酸化塩素；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、セトリミド、塩化デカリニウム、塩化セチルピリジニウムなどの第四級アンモニウム化合物；硝酸フェニル水銀、酢酸フェニル水銀、及びチメロサルなどの水銀剤；ピロクトンオラミン；*Vitis vinifera* 種子油；及びアルコール剤、例えば、クロロブタノール、ジクロロベンジルアルコール、フェニルエチルアルコール、及びベンジルアルコールが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0046】

好適な抗酸化剤としては、アスコルビン酸及びそのエステル、重亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソール、トコフェロール、酢酸トコフェロール、アスコルビン酸ナトリウム/アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、没食子酸プロピル、ならびに EDTA (例えば EDTA 二ナトリウム)、クエン酸、及びクエン酸ナトリウムなどのキレート剤が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0047】

特定の実施形態において、上記抗酸化剤または防腐剤はカルバミン酸 (3 - (4 - クロロフェノキシ) - 2 - ヒドロキシプロピル) を含む。

【0048】

特定の実施形態において、本発明の抗酸化剤または防腐剤は、例えば、保湿剤または皮膚軟化剤としても機能する場合がある。

【0049】

更に、これらの防腐剤もしくは抗酸化剤の組み合わせまたは混合物を本発明の製剤に用いてもよい。

【0050】

E. 併用薬

組成物はまた、哺乳動物、特にヒトに局所適用された場合に所望の効果を有する他の任意の薬剤も含有することができる。好適な活性薬剤の種類としては、抗生剤、抗菌剤 (antimicrobial agents)、抗ざ瘡剤、抗菌剤 (antibacterial agents)、抗真菌剤、抗ウイルス剤、ステロイド抗炎症剤、非ステロイド抗炎症剤、麻酔剤、鎮痒剤、抗原虫剤、抗酸化剤、抗ヒスタミン剤、ビタミン、及びホルモンが挙げられるが、これらに限定はされない。これらの活性剤のいずれかの混合物を用いてもよい。更に、これらの薬剤のいずれかの皮膚科学的に許容される塩及びエステルを用いてもよい。

【0051】

抗生物質などの抗菌剤は殺菌性または静菌性であってよく、ヒトの体内の細菌の量を制

10

20

30

40

50

限及び低減することが知られている。レチノイドも毛嚢脂腺単位及び微小面疱中の細菌の量を低減する。光による療法は、光熱加熱、細菌の光化学的不活性化、及び種々の光免疫学的反応によって効果を発現し、臨床上的皮膚の転帰を改善する。一般に、上記の療法は、患者の病原性細菌の量を減少させるように直接作用する。したがって、本発明は、病原性生物の数を低減するという同一の目的を達成する任意のかかる療法が、その後の局所的なプロバイオティックな治療と併用される場合に、病的状態に關与する病原性微生物叢が、健康な皮膚または粘膜中に多く存在する本来の微生物叢、または病的状態を引き起こす種類と同様の生態学的地位を占める、病原性がより低い種によって置換されるという結果に繋がることを提案する。

【0052】

好適な抗菌性化合物としては、カプレオマイシン I A、カプレオマイシン I B、カプレオマイシン II A 及びカプレオマイシン I I B を含むカプレオマイシン；カルボマイシン A を含むカルボマイシン；カルモナム；セファクロル、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セファゾリン、セフブペラゾン、セフカペンピボキシル、セフクリジン、セフジニル、セフジトレン、*cefime*、セフェタメト、セフメノキシム、セフメタゾール、セフミノックス、セフォジジム、セフォニシド、セフォペラゾン、セフォラニド、セフォタキシム、セフォテタン、セフォチアム、セフォキシチン、セフピミゾール、セフピラミド、セフピロム、セフプロジル、セフロキサジン、セフスロジン、セフタジジム、セフテラム、セフテゾール、セフチブテン、セフチオファー、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフロキシム、セフゾナム、セファレキシン、*cephalogycin*、セファロリジン、セファロスポリン C、セファロチン、セファピリン、セファマイシン C などのセファマイシン、セファラジン、クロルテトラサイクリン；クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロメトシリン、クロモサイクリン、クロキサシリン、シクラシリン、ダノフロキサシン、デメクロサイクリン、デストマイシン A、ジクロキサシリン、ジリスロマイシン、ドキシサイクリン、エピシリン、エリスロマイシン A、エタンブトール、フェンベニシリン、フロモキシセフ、フロルフエニコール、フロキサシリン、フルメキン、ホルチミシン A、ホルチミシン B、ホスホマイシン、フラルタドン、フシジン酸、ゲンタマイシン、グリコニアジド、グアメシクリン、ヘタシリン、イダルビシン、イミペネム、イセパマイシン、ジョサマイシン、カナマイシン、ロイコマイシン A 1 などのロイコマイシン、リンコマイシン、ロメフロキサシン、ロラカルベフ、リメサイクリン、メロベネム、メタンピシリン、メタサイクリン、メチシリン、メズロシリン、ミクロノマイシン、ミデカマイシン A 1 などのミデカマイシン、ミオカマイシン、ミノサイクリン、マイトマイシン C などのマイトマイシン、モキサラクタム、ムピロシン、ナフシリン、ネチルミシン、*norcardian A* などの *norcardian*、オレアンドマイシン、オキシテトラサイクリン、パニペネム、パズフロキサシン、ペナメシリン、ペニシリン G、ペニシリン N 及びペニシリン O などのペニシリン、ペニル酸、*pentylpenicillin* (ペンチルペニシリン)、ペプロマイシン、フェネチシリン、ピパサイクリン、ピペラシリン、ピルリマイシン、ピバンピシリン、ピバセファレキシン、ポルフィロマイシン、*propiallin* (プロピアリン)、キナシリン、リボスタマイシン、リファブチン、リファミド、リファンピン、リファマイシン S V、リファペンチン、リファキシミン、リチベネム、ロキタマイシン、ロリテトラサイクリン、ロサラミシン、ロキシスロマイシン、サンサイクリン、シソマイシン、スパルフロキサシン、スペクチノマイシン、ストレプトゾシン、スルベニシリン、スルタミシリン、タランピシリン、テイコプラニン、テモシリン、テトラサイクリン、チオストレプトン、チアムリン、チカルシリン、チゲモナム、チルミコシン、トブラマイシン、トロスペクトマイシン、トロバフロキサシン、タイロシン、及びバンコマイシン、ならびにそれらの類似体、誘導体、薬学的に許容される塩、エステル、プロドラッグ、及び保護された形態が挙げられる。

【0053】

好適な抗真菌性化合物としては、ケトコナゾール、ミコナゾール、フルコナゾール、クロトリマゾール、ウンデシレン酸、セルタコナゾール、テルビナフィン、ブテナフィン、

クリオキノール、ハロプロジン、ナイスタチン、ナフチフィン、トルナフテート、シクロピロックス、アンホテリシンB、またはチャノキ油ならびにそれらの類似体、誘導體、薬学的に許容される塩、エステル、プロドラッグ、及び保護された形態が挙げられる。

【0054】

好適な抗ウイルス剤としては、アシクロビル、アジドウリジン、アニソマイシン、アマンタジン、プロモビニルデオキシウリジン、クロロビニルデオキシウリジン、シタラビン、デラビルジン、ジダノシン、デオキシノジリマイシン、ジデオキシシチジン、ジデオキシイノシン、ジデオキシヌクレオシド、デスシクロビル、デオキシアシクロビル、エファビレンツ、エンビロキシム、フィアシタビン、フォスカルネット、フィアルリジン、フルオロチミジン、フロクスウリジン、ガンシクロビル、ヒペリシン、イドクスリジン、インターフェロン、インターロイキン、イセチオン酸塩、ネビラピン、ペンタミジン、リバビリン、リマンタジン、スタブジン、サルグラモスチム、スラミン、トリコサンチン、トリプロモチミジン、トリクロロチミジン、トリフルオロチミジン、ホスホモノギ酸三ナトリウム (trisodium phosphomonoformate)、ビダラビン、ジドブジン、ザルシタビン及び3-アジド-3-デオキシチミジンならびにそれらの類似体、誘導體、薬学的に許容される塩、エステル、プロドラッグ、及び保護された形態が挙げられる。

【0055】

他の好適な抗ウイルス剤としては、2', 3'-ジデオキシアデノシン (ddA)、2', 3'-ジデオキシグアノシン (ddG)、2', 3'-ジデオキシシチジン (ddC)、2', 3'-ジデオキシチミジン (ddT)、2', 3'-ジデオキシ-ジデオキシチミジン (d4T)、2'-デオキシ-3'-チア-シトシン (3TCまたはラミブジン)、2', 3'-ジデオキシ-2'-フルオロアデノシン、2', 3'-ジデオキシ-2'-フルオロイノシン、2', 3'-ジデオキシ-2'-フルオロチミジン、2', 3'-ジデオキシ-2'-フルオロシトシン、2', 3'-ジデオキシ-2', 3'-ジデオキシ-2'-フルオロチミジン (Fd4T)、2', 3'-ジデオキシ-2'-ベーターフルオロアデノシン (F-ddA)、2', 3'-ジデオキシ-2'-ベーターフルオロイノシン (F-ddI)、及び2', 3'-ジデオキシ-2'-ベーターフロロシトシン (F-ddC) が挙げられる。いくつかの実施形態において、上記抗ウイルス剤は、ホスホモノギ酸三ナトリウム、ガンシクロビル、トリフルオロチミジン、アシクロビル、3'-アジド-3'-チミジン (AZT)、ジデオキシイノシン (ddI)、及びイドクスリジンならびにそれらの類似体、誘導體、薬学的に許容される塩、エステル、プロドラッグ、及び保護された形態が挙げられる。

【0056】

F. 緩衝塩

組成物は緩衝剤または塩を含んでいてもよい。好適な緩衝塩は当該技術分野において周知である。好適な緩衝塩の例としては、クエン酸ナトリウム、クエン酸、一塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、三塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸カリウム、二塩基性リン酸カリウム、及び三塩基性リン酸カリウムが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0057】

G. 粘度調整剤

組成物は粘度調整剤を含んでいてもよい。本発明の製剤に用いるのに適した粘度調節剤 (すなわち、増ちょう剤及び低粘ちょう化剤または粘度調整剤) としては、ヒドロキシエチルセルロース、キサントガム、及びスクレロチウムガムなどの保護コロイドまたは非イオン性ガム、ならびにケイ酸アルミニウムマグネシウム、シリカ、微結晶ワックス、ミツロウ、パラフィン、及びパルミチン酸セチルが挙げられるが、これらに限定はされない。更に、これらの粘度調節剤の適宜の組合せまたは混合物を、本発明に従って利用してもよい。

【0058】

H. 更なる構成成分

本発明の乳剤中に配合するのに適した更なる構成成分としては、皮膚保護剤、吸着剤、鎮痛剤、皮膚軟化剤、保湿剤、徐放性材料、可溶化剤、皮膚浸透剤、皮膚無痛化剤、消臭剤、発汗抑制剤、日焼け防止剤、サンレスタンニング剤、ビタミン、ヘアコンディショニング剤、抗刺激剤、老化防止剤、研磨剤、吸収剤、固結防止剤、帯電防止剤、収斂剤（例えば、ウィッチヘーゼル、アルコール、及びカモミールエキスなどのハーブエキス）、結合剤／賦形剤、緩衝剤、キレート剤、膜形成剤、コンディショニング剤、不透明化剤、脂質、免疫調節剤、及びpH調節剤（例えば、クエン酸、水酸化ナトリウム、及びリン酸ナトリウム）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0059】

例えば、健康な皮膚に通常存在する脂質（またはそれらの機能的等価物）を本発明の乳剤に配合してもよい。特定の実施形態において、上記脂質は、セラミド、コレステロール、及び遊離脂肪酸からなる群より選択される。脂質の例としては、セラミド1、セラミド2、セラミド3、セラミド4、セラミド5、セラミド6、ヒドロキシプロピルビスパルミタミドMEA、及びヒドロキシプロピルビスラウラミドMEA、ならびにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0060】

真皮－表皮接合部のタンパク質構造と相互作用するペプチドの例としては、パルミトイルジペプチド－5ジアミノブチロイルヒドロキシルトレオニン及びパルミトイルジペプチド－6ジアミノヒドロキシブチラートが挙げられる。

【0061】

皮膚無痛化剤の例としては、藻類エキス、ヨモギエキス、グリチルレチン酸ステアリル、ビスアボロール、アラントイン、アロエ、アボカド油、緑茶エキス、ホップエキス、カモミールエキス、コロイドオートミール、カラミン、キュウリエキス、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0062】

特定の実施形態において、本組成物は、ベルガモットまたはベルガモット油を含む。ベルガモット油は天然のスキントナー且つ解毒剤である。特定の実施形態において、ベルガモット油は皮膚の早期老化を防止し、油性皮膚状態及びざ瘡に優れた効果を有する場合がある。

【0063】

ビタミンの例としては、ビタミンA、D、E、K、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。ビタミン類似体、例えば、ビタミンD類似体カルシポトリエンまたはカルシポトリオールも企図される。

【0064】

特定の実施形態において、上記ビタミンはアスコルビン酸テトラヘキシルデシルとして存在してもよい。この化合物は抗酸化活性を示し、脂質の過酸化を阻害する。特定の実施形態において、これを用いると、UV曝露の有害な影響を軽減することができる。研究により、上記化合物はコラーゲン産生を刺激すると共に、メラニン生成（色素の産生）を阻害することによって皮膚を清澄化且つ明るくし、それにより均一な皮膚の色調を増進することが明らかになっている。

【0065】

日焼け防止剤の例としては、p-アミノ安息香酸、アボベンゾン、シノキサート、ジオキシベンゾン、ホモサート、アントラニル酸メンチル、オクトクリレン、メトキシケイ皮酸オクチル、サリチル酸オクチル、オキシベンゾン、パディメートO、フェニルベンゾイミダゾールスルホン酸、スリソベンゾン、二酸化チタン、トロラミンサリチル酸、酸化亜鉛、4-メチルベンジリデンカンファー、メチレンビス-ベンゾトリアゾリルテトラメチルブチルフェノール、ビス-エチルヘキシルオキシフェノールメトキシフェニルトリアジン、テレフタリリデンジカンフェールスルホン酸、ドロメトリゾールトリシロキサン、フェニルジベンゾイミダゾールテトラスルホン酸二ナトリウム、ジエチルアミノヒドロキシ

10

20

30

40

50

ベンゾイル安息香酸ヘキシル、オクチルトリアゾン、ジエチルヘキシルブタミドトリアゾン、ポリシリコーン-15、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0066】

本発明の製剤には、適宜の香料及び色素を用いてもよい。局所用製品に用いるのに適した香料及び色素の例は当該技術分野で公知である。

【0067】

好適な免疫調節剤としては、テトラクロロデカオキシド、デオキシコール酸、タクロリムス、ピメクロリムス、及びベータグルカンが挙げられるが、これらに限定はされない。

10

【0068】

特定の実施形態において、パルミトイルーリシルーバリルーリシンビストリフルオロアセタートが添加される。このペプチドはヒト線維芽細胞におけるコラーゲン合成を刺激する。

【0069】

多くの場合、組成物の1種の構成成分がいくつかの機能を果たしてもよい。一実施形態において、本発明は、潤滑剤、皮膚軟化剤、または皮膚浸透剤として作用し得る構成成分に関する。一実施形態において、上記多機能性成分は、ステアリン酸イソセチル、イソステアリン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、またはミリスチン酸イソプロピルである。

20

【0070】

II. 対象の状態の予防または治療方法

いくつかの態様において、本発明は、対象の状態の予防または治療方法であって、上記対象に組成物を投与することを含む上記方法に関する。上記状態は皮膚状態であってよい。上記組成物は、本明細書に記載の任意の組成物であってよい。投与は局所投与を含んでもよい。投与は経口投与を含んでもよい。例えば、本方法は、上記対象に、*Propionibacterium acnes*のRT1株、RT2株、及び／またはRT6株を含む組成物を投与することを含んでもよい。他の実施形態において、本方法は、上記対象に、*Propionibacterium acnes*のRT3株、RT8株、RT16株、またはIII型株を含む、本明細書に開示の組成物を投与することを含んでもよい。いくつかの実施形態において、本方法は、*deOR*を発現する、コードする、または保有する株を投与することを含んでもよい。

30

【0071】

いくつかの実施形態において、上記皮膚状態はざ瘡、皮膚老化、酒さ、または晩発性皮膚ポルフィリン症である。

【0072】

上記対象は1日当たり少なくとも2 μ gのビタミンB₁₂、例えば、1日当たり少なくとも3 μ g、4 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g、9 μ g、または少なくとも10 μ gのビタミンB₁₂を摂取していてもよい。対象は1日当たり約2 μ g～約10mgのビタミンB₁₂、例えば1日当たり約2 μ g～約1mgのビタミンB₁₂、1日当たり約3 μ g～約1mg、約4 μ g～約1mg、約5 μ g～約1mg、約6 μ g～約1mg、約7 μ g～約1mg、約8 μ g～約1mg、約9 μ g～約1mg、または約10 μ g～約1mgのビタミンB₁₂を摂取していてもよい。

40

【0073】

いくつかの態様において、本発明は、対象がビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性の判定方法に関する。上記方法は、上記対象から得られた*P. acnes*を含む細胞懸濁液のポルフィリン濃度を計算することを含んでもよい。上記方法は、対象から得られた*P. acnes*株を同定することを含んでもよい。上記方法は、上記対象から得られた、特定のリボタイプに属する、*deOR*をコードする遺伝子を含む、または他の点でざ瘡もしくは健康な皮膚と関連する*P. acnes*の割合を特定することを含んでもよい。

50

もよい。

【0074】

ポルフィリン濃度の計算は、例えば、対象から得られた *P. acnes* の細胞懸濁液中のコプロポルフィリン III またはコプロポルフィリン I の濃度を測定することを含んでもよい。ポルフィリン濃度の計算は、約 380 nm～約 430 nm、例えば約 400 nm、約 405 nm、または約 410 nm の波長の光の吸光度を測定することを含んでもよい。ポルフィリン濃度の計算は、例えば、ポルフィリン濃度の測定値を正規化するために、細胞懸濁液密度を測定することを含んでもよい。細胞懸濁液密度の測定は、約 580 nm～約 620 nm の波長、例えば、約 590 nm、約 595 nm、約 600 nm、または約 605 nm の波長における、細胞懸濁液を通過する光の透過度を測定することを含んでもよい。上記方法は、例えばポルフィリン濃度の計算の前に、対象から得られた *P. acnes* を培養することを含んでもよく、または含まなくてもよい。

10

【0075】

方法は、対象から得られた *P. acnes* の懸濁液のポルフィリン濃度が約 2 μ M より高い、例えば約 3 μ M より高い場合に、当該対象を、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断することを含んでもよい。方法は、対象から得られた *P. acnes* の懸濁液のポルフィリン濃度が約 2 μ M 未満である場合に、当該対象を、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断することを含んでもよい。

【0076】

上記方法は、上記対象から得られた *P. acnes* の株を同定することと、上記 *P. acnes* の株がビタミン B₁₂ に感受性である場合に、上記対象を、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断することを含んでもよい。例えば、上記 *P. acnes* の株が RT4 または RT5 である場合に、上記対象は、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断されてもよい。上記 *P. acnes* の株が RT3 株の HL063PA2 または RT8 株の HL082PA1 である場合に、上記対象は、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断されてもよい。上記 *P. acnes* の株が RT1 株の HL005PA2 または HL083PA1 である場合に、上記対象は、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高いと診断されてもよい。

20

【0077】

上記方法は、上記の対象から得られた *P. acnes* の株を同定することと、上記 *P. acnes* の株がビタミン B₁₂ に感受性でない場合は、上記対象を、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断することを含んでもよい。例えば、上記 *P. acnes* の株が RT2 または RT6 である場合に、対象はビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断されてもよい。同様に、上記 *P. acnes* の株が RT2 または RT6 である場合に、対象は、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高くないと診断されてもよい。上記 *P. acnes* の株が RT3（すなわち、HL063PA2 ではない RT3 株）、RT8（すなわち、HL082PA1 もしくは HL053PA2 ではない RT8 株）、または RT16 である場合に、対象は、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高くないと診断されてもよい。上記 *P. acnes* の株が II 型及び III 型である場合に、上記対象は、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が高くないと診断されてもよい。いくつかの実施形態において、上記対象が *P. acnes* の 1 種または複数種の株を有するが、*P. acnes* の株の大部分が RT2、RT6、RT3（すなわち、HL063PA2 ではない RT3 株）、RT8（すなわち、HL082PA1 または HL053PA2 でない RT8 株）、RT16、または III 型である場合に、上記対象は、ビタミン B₁₂ 誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断されてもよい。

30

40

【0078】

P. acnes の株を同定することは、上記の *P. acnes* の株の核酸を配列決定することを含んでもよい。例えば、*P. acnes* の株を同定することは、当該の株の 16S rRNA をコードするヌクレオチド配列を配列決定することを含んでもよく、または *P. acnes* の株を同定することは、当該の株のポルフィリン生合成遺伝子オ

50

ペロンの全てもしくは一部をコードするヌクレオチド配列を配列決定することを含んでいてもよい。

【0079】

方法は、対象のビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性が高い場合に、上記対象を光線力学療法で治療することを含んでいてもよい。方法は、対象のビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性が低い場合に、光線力学療法以外の治療法（例えば、局所または経口抗生物質などの抗生物質による）で上記対象を治療することを含んでいてもよい。

【0080】

方法は、対象がビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性が高くないと診断される場合に、上記対象にビタミンB₁₂を投与することを含んでいてもよい。方法は、対象がビタミンB₁₂誘発性ざ瘡を発症する危険性が低いと診断される場合に、上記対象にビタミンB₁₂を投与することを含んでいてもよい。

【0081】

いくつかの態様において、本発明は、対象の皮膚状態の治療方法であって、上記対象を光線力学療法で治療することを含む方法に関する。例えば、上記方法は、対象のP. acnes株がRT4株またはRT5株のいずれかである場合に、上記対象を光線力学療法で治療することを含んでいてもよい。同様に、上記方法は、対象から得られたP. acnesの細胞懸濁液のポルフィリン濃度が閾値を超える、例えば、約1 μM、約2 μM、約3 μM、約4 μM、約5 μM、または約6 μMを超える場合に、上記対象を光線力学療法で治療することを含んでいてもよい。

【0082】

方法は、対象のP. acnes株がRT4株またはRT5株のいずれでもない場合に、上記対象を光線力学療法以外の治療法で治療することを含んでいてもよい。同様に、上記方法は、対象から得られたP. acnesの細胞懸濁液のポルフィリン濃度が閾値よりも低い、例えば、約1 μM、約2 μM、約3 μM、約4 μM、約5 μM、または約6 μM未満の場合に、上記対象を光線力学療法以外の治療法で治療することを含んでいてもよい。上記方法は、上記P. acnesの株がRT2またはRT6である場合に、対象を光線力学療法で治療しないことを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、上記P. acnesの株がIII型である場合に、上記対象は光線力学療法による治療を受けない。

【0083】

本方法は、例えば、本明細書に記載の対象から得られたP. acnesを含む細胞懸濁液のポルフィリン濃度を測定する前に、上記P. acnesを培養するかまたは培養せずに、上記ポルフィリン濃度を計算することを含んでいてもよい。

【0084】

いくつかの態様において、本方法は、対象に、1種または複数種のPropionibacterium acnesの株を含む本明細書に開示の組成物（例えば、本明細書に開示の経口または局所組成物）を投与することによって、上記対象の皮膚上のポルフィリンの量を低減することを含んでいてもよい。

【0085】

本方法は対象に皮膚状態の危険性があるか否かを判定することを含み、上記方法は、上記対象から皮膚試料を得、任意選択で上記皮膚試料から細菌DNAを単離し、上記皮膚試料中の上記細菌DNAを配列決定し、deOR転写抑制因子が、発現されないか、低レベルで発現されるか、または当該細菌DNA中に存在しない場合に、上記対象は皮膚状態の危険性があると見なされる。

【0086】

ここまで本発明を概説してきたが、以下の実施例を参照することによって、本発明がより容易に理解されることとなろう。但し、以下の実施例は、単に本発明の特定の態様及び実施形態の例証を目的として記載されるものであり、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0087】

物質及び方法

P. acnes 株及び培養物。この検討で用いた P. acnes 株 (表 1) は、Fitz-Gibbon et al. (J Invest Dermatol 133:2152-2160 (2013)) に記載のとおり、ざ瘡患者及び健康な個体の顔の皮膚から単離した。簡単に説明すると、それぞれの株を、ざ瘡患者または健康な個体の鼻の複数の毛嚢から採取した内容物から単離した。ざ瘡患者の試料採取した皮膚部位には視認可能なざ瘡病変がある場合とない場合とがあり、したがって、上記株は必ずしも病的状態または健康な状態に対応するとは限らない。4 種の RT4 及び RT5 P. acnes 株、HL053PA1、HL045PA1、HL043PA1、及び HL043PA2 を、16 S メタゲノム研究 (J Invest Dermatol 133:2152-2160 (2013)) に基づいて疾患と関連するとされた IA-2 型株を代表して選択した。上記 RT4 株及び RT5 株のほとんどに共通して、これらの株は、それらの 16 S 及び 23 S rRNA 遺伝子において突然変異を有しており、該突然変異は抗生物質耐性を付与する。3 種の RT2 株及び RT6 株、HL001PA1、HL103PA1、及び HL042PA3 を、健康な皮膚と関連するとされた II 型株を代表して選択した。本知見を確認するために、更に 3 種の II 型株、HL110PA3、HL106PA1、及び HL050PA2 も試験した。これら 10 種の株のゲノム配列は既報である (Fitz-Gibbon, J Invest Dermatol 133:2152-2160 (2013) ; Tomida, MBio 4:e000003-000013 (2013))。各実験について、5 mL の補強クロストリジウム培地 (reinforced clostridial broth) に、培養液 mL 当たり 5×10^5 個の P. acnes 細胞を播種した。培養物を遮光ボックス中、37℃で嫌氣的に定常期まで増殖させた。0 日目に培養物に、ビタミン B₁₂ (10 µg/mL)、5-ALA (0.1 mg/mL)、及び / または LA (0.1 mg/mL) を追加した。対照として、追加なしでの P. acnes 株の培養も行った。3 回の繰り返しを伴う、1 回のみの実験で試験した HL110PA3 株、HL106PA1 株、及び HL050PA2 株を除いて、それぞれの株について、実験当たり少なくとも 3 回の繰り返しを伴う、3~5 回の独立した実験を行った。

10

20

【表 1】

表1 P. acnes株

				クローナルコンプレックス (Belfast MLST ₈ に よる配列型) ^d	クローナルコンプレックス (Aarhus MLST ₉ に よる配列型) ^e	
系統 ^a	系統群 ^b	株	リボタイプ ^c			
ざ瘡と 関連	IA-2	IA ₁	HL053PA1	RT4	CC3 (ST3)	CC3 (ST3)
			HL045PA1	RT4	CC3 (ST17)	CC3 (ST3)
			HL043PA1	RT5	CC3 (ST3)	CC3 (ST58)
			HL043PA2	RT5	CC3 (ST3)	CC3 (ST58)
健康と 関連	II	II	HL001PA1	RT2	CC72 (ST30)	CC60 (ST60)
			HL103PA1	RT2	CC6 (ST25)	CC60 (ST60)
			HL042PA3	RT6	CC6 (ST7)	CC60 (ST73)
deoRを有するI型		IA ₁	HL025PA1	RT1	CC4 (ST4)	CC28 (ST27)

^{a, c} Fitz-Gibbon et al. (J Invest Dermatol 133:2152-2160(2013))に記載のとおり

^{b, d} McDowell et al. (J Clin Microbiol 43:326-334(2005))に記載のとおり

^e Lomholt and Kilian(PloS One 5:312277(2010))に記載のとおり

【0088】

細胞外ポリフィリンの抽出、同定、及び定量。各株について、Kang et al. (Sci Transl Med 7:293ra103(2015))に記載の方法を用いてポリフィリンを抽出した。簡単に説明すると、500 μLの細菌培養物を酢酸エチル及び酢酸(4:1、v/v)中で抽出し、1.5 MのHClで可溶化した。Tecan Genios Spectrophotometer M1000 (Tecan US Inc, Morrisville, NC)を用いて、200 μLの可溶相の405 nmにおける吸光度を測定した。吸光度を濃度に換算するための検量線を、既知の濃度のコプロポリフィリンIII標準溶液(C654-3, Frontier Sci)を用いて作成した。Wollenberg et al. (MBio 5:e01286-01214(2014))に記載の定量法を用いて、P. acnes株KPA171202においてポリフィリンレベルを測定した。206 pmol/mgであった測定値は220 pmol/mgのWollenberg et al. による報告値と一致している。このことは、上記方法が以前の研究と同等であることを示している。定常期において培養物からポリフィリンを抽出した。対数期中期(mid-log phase)の培養物の結果は、定常期における培養物において見られたものと整合する傾向を示した。細菌の培養密度をOD₅₉₅によって測定し、ポリフィリンレベルを規格化した。質量分析実験については、抽出したポリフィリンをAgilent 6460トリプル四重極LC/MSシステムに直接注入し、陰イオンモードでそれぞれの株のm/zを同定した。

【0089】

ポリフィリン産生の比較のための統計的解析。各培養条件下でそれぞれの株によって産生されたポリフィリンの平均の量を、それぞれの実験について少なくとも3回の繰り返しを伴う、少なくとも3回の独立した実験からのデータに基づいて計算した。試行の効果を考慮に入れるための試行による、ランダム切片を伴う線形混合効果モデルにおいて、株、群(ざ瘡関連対健康関連)、及び培養条件(処置あり対処置なし)間のポリフィリンレベ

ルを見積もった。群間の特定の比較のためのP値は、Tukey法を用いて補正した。全ての統計的解析はRソフトウェア（バージョン3.1.3）を用いて行った。

【0090】

deoR転写抑制因子の同定。82種の*P. acnes*ゲノム（Tomida、Mbio 4:e00003-00013（2013））由来のポルフィリン遺伝子クラスタの配列を、多重配列アラインメントソフトウェア（ClustalW2）を用いてアラインした。上記deoR転写抑制因子（PPA0299）は、全ての健康と関連するII型株及び少数のI型株に存在するゲノム外エレメントとして同定された。

【0091】

RNA抽出及びcDNA合成。cbiL遺伝子及びdeoR遺伝子の発現分析のために、細胞をビーズベティングにより溶解した。全RNAを標準的なフェノールクロホルム法を用いて抽出し、RNeasyキット（Qiagen）を用いて精製した。Turbid DNA-freeキット（Life Technologies）を用いてDNAを除去した。ゲル電気泳動法を用いてRNAの品質を評価した。SuperScript II First-Strand Synthesis SuperMix（Life Technologies）を用いて一本鎖相補的DNA（cDNA）を合成した。

【0092】

cbiL遺伝子発現の分析。LightCycler 480（Roche）上でLightCycler 480 High Resolution Melting Master Mix（Roche）を使用し、以下のプライマー、すなわち、cbiL-順方向、5'-GCGCGAGGCAAGACGTGATCC-3'、及びcbiL-逆方向、5'-GACACCGGACCTCTCCCGCA-3'を用いてqRT-PCRを行った。以下のqRT-PCRプロトコルを用いた。すなわち、95℃での5分間の初期変性、続いて95℃で10秒間、62℃で30秒間、及び72℃で30秒間を50サイクルであった。ビタミンB₁₂を追加した培養物と追加していない培養物との間のcbiL遺伝子発現の倍率変化（fold change）を計算した。各試料におけるcbiLの遺伝子発現レベルを、16SrRNA転写レベルに対して正規化した。LightCycler 480ソフトウェアバージョン1.5（Roche）を用いて融解曲線の解析を行い、増幅産物の特異性を該産物の融解温度に基づいて検証した。全ての反応を3回の繰り返しで実施した。

【0093】

deoR遺伝子発現の分析。C1000 Thermal Cycler（BioRad）を用いて、数種の*P. acnes*株のcDNA及びゲノムDNAからdeoRを増幅した。PCRにおいて以下のプライマー、すなわち、deoR-順方向、5'-CTGGCACGAGAAAGGAACA-3'、及びdeoR-逆方向、5'-GAATCGAGCAGAACTAGGTCA-3'を用いた。以下のPCRプロトコルを用いた。すなわち、95℃での5分間の初期変性、続いて95℃で10秒間、62℃で30秒間、72℃で30秒間を35サイクル、続いて72℃で5分間を1サイクルであった。増幅されたdeoR産物を2%のアガロースゲル上で可視化した。16SrRNAの増幅を陽性対照として含めた。ざ瘡と関連する株HL045PA1をdeoR発現の陰性対照として用いた。

【0094】

結果

ざ瘡と関連する*P. acnes*株は健康と関連する株よりも有意により多くのポルフィリンを産生した。異なる*P. acnes*株が同一のポルフィリン種を産生するか否かを調べるために、質量分析を用いて、複数の*P. acnes*株によって分泌されたポルフィリンの種類をキャラクタライズした。4種のざ瘡と関連するIA-2型株、HL053PA1（RT4）、HL045PA1（RT4）、HL043PA1（RT5）、及びHL043PA2（RT5）、ならびに3種の健康と関連するII型株、HL001PA1（RT2）、HL103PA1（RT2）、及びHL042PA3（RT6）を試験した（表

10

20

30

40

50

1)。これらの *P. acnes* 株によって産生されたポルフィリン種に差異は認められなかった。全ての菌株によって産生された主要なポルフィリン異性体はコプロポルフィリン III であった ($[M+H]^+ = 655.3$)。少量のコプロポルフィリン I も検出された。ポルフィリンレベルは以下の方法で測定する。細菌細胞を採取し、ポルフィリンを抽出する。ポルフィリンの濃度を分光光度法によって測定し、光学密度 (これも分光光度法によって測定) に対して正規化する。従って、ポルフィリンレベルは細菌単位当たりで測定される。

【0095】

P. acnes 株が異なる量のポルフィリンを産生するか否かを判定するために、7 種の *P. acnes* 株において分泌されたポルフィリンを定量した (図 1)。ざ瘡と関連する IA-2 型株によって産生された平均のポルフィリンレベルは $6.5 \mu M$ ($5.6 \sim 8.8 \mu M$) であり、健康と関連する II 型株によって産生された平均のポルフィリンレベル、 $1.1 \mu M$ ($0 \sim 2.1 \mu M$) よりも有意に大きかった ($p < 0.0001$ (図 1))。RT2 株 HL001PA1 は全ての実験において検出可能なポルフィリンを産生しなかったことは注目に値する。この株は Belfast MLST 8 分類法に基づくクロナルコンプレックス 72 (CC72) に属し (表 1)、該株は健康な皮膚から単離された。

【0096】

ビタミン B_{12} の追加によって、ざ瘡と関連する株ではポルフィリン産生が有意に増加したが、健康と関連する株では増加しなかった。ビタミン B_{12} が *P. acnes* のポルフィリン産生を株特異的な形態で調節するか否かを調べるために、異なる *P. acnes* 株によって産生されたポルフィリンのレベルを、ビタミン B_{12} の追加のあり／なしで比較した。試験した全てのざ瘡と関連する IA-2 型株において、ビタミン B_{12} の追加によってポルフィリン産生が増加し (平均ポルフィリンレベルが $6.5 \mu M$ から $9.2 \mu M$ に増加)、試験した 4 種の株の 3 種において統計学的有意性があった ($P \leq 0.02$) (図 2)。対照的に、健康と関連する II 型株においては、ビタミン B_{12} の追加によるポルフィリン産生に対する有意な影響はなかった (平均ポルフィリンレベルは $1.1 \mu M$ のまま、 $P \geq 0.77$)。HL001PA1 におけるポルフィリンレベルは検出不可のままであった。これらの結果を確認するために、更に 3 種の II 型株、HL110PA3 (RT6)、HL106PA1 (RT2)、及び HL050PA2 (RT1) において、ビタミン B_{12} の添加あり／なしでポルフィリン産生を測定した。これらの株は同様に低レベルのポルフィリン ($1.4 \pm 1.2 \mu M$) しか産生せず、その産生レベルはビタミン B_{12} の追加によって有意な影響を受けなかった。このデータは、ビタミン B_{12} は、ざ瘡と関連する IA-2 型株においてはポルフィリン産生を調節するが、健康と関連する II 型株においては調節せず、皮膚微生物叢の *P. acnes* 株の組成と、個体のある部分集合においてビタミン B_{12} がざ瘡を誘発するという知見との間の分子的な繋がりを示していることを示唆する。

【0097】

ビタミン B_{12} の追加によってビタミン B_{12} 生合成遺伝子発現が抑制された。ビタミン B_{12} が、*P. acnes* におけるビタミン B_{12} 自体の生合成の抑制を介してポルフィリン産生に影響を及ぼすか否かを判定するために、qRT-PCR を実施して、ビタミン B_{12} 生合成経路における遺伝子である *cbiL* の発現レベルを測定した。*cbiL* 遺伝子は、ビタミン B_{12} 生合成経路におけるコリン環形成に関与する 1 つの重要な酵素であるプレコリン-2 C20-メチルトランスフェラーゼをコードする。*P. acnes* 培養物にビタミン B_{12} を添加することによって、ざ瘡と関連する IA-2 型株において 0.74、健康と関連する II 型株で 0.24 の平均倍率変化で、*cbiL* 遺伝子発現の下方制御が生じた (図 3)。上記 *cbiL* 遺伝子発現の下方制御は、ビタミン B_{12} の追加がビタミン B_{12} 生合成経路を抑制し、それがポルフィリン産生の増加に繋がることの以前の知見と整合する。II 型株におけるポルフィリン産生がビタミン B_{12} の追加の影響を受けなかったとの知見にもかかわらず、IA-2 型と II 型株との両方において *cbi*

Lの発現が下方制御された。このことは、健康と関連する I I 型株におけるポルフィリン産生の阻害に、更なる機序が関与していることを示唆している。

【0098】

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) の添加によりポルフィリン産生が増加し、これはビタミン B₁₂ によって更に亢進した。P. *acnes* におけるポルフィリン及びビタミン B₁₂ の生合成経路は、同一の初期酵素ステップ及び共通の前駆体であり、律速酵素のポルホビリノーゲン合成酵素の基質である 5-ALA を共有する。5-ALA の利用能を増加させることによってポルフィリン産生が促進され得るか否かを調べるために、P. *acnes* 株のポルフィリン産生レベルを、上記基質の添加のあり／なしで比較した。更に、ポルフィリン産生に対するビタミン B₁₂ の効果を、5-ALA との組み合わせで評価した。基質単独での添加では、ポルフィリン産生は、未処理の対照と比較して、ざ瘡と関連する I A-2 型株において平均 2.2 倍 ($P < 0.0001$)、健康と関連する I I 型株において 3.4 倍 ($P \leq 0.06$ 、HL001PA1 を除く) で有意に増加した (図 4)。HL001PA1 は、5-ALA を添加しても一貫して検出可能なポルフィリンを産生しなかった。ビタミン B₁₂ との組み合わせにおける 5-ALA の添加によって、ざ瘡と関連する I A-2 型株においてポルフィリン産生が更に亢進し (基質のみと比較して 2.7 倍増加)、試験した 4 種の株の 3 種において統計学的有意性があった ($P \leq 0.04$) が、健康と関連する I I 型株においては亢進しなかった ($P \geq 0.94$)。このことは、健康と関連する I I 型株はそれらのポルフィリン産生においてビタミン B₁₂ に応答しないとの上記知見 (図 2) と整合する。このデータは、基質の代謝流入が P. *acnes* におけるポルフィリン産生に影響を及ぼすことを示唆している。上記のビタミン B₁₂ の追加によるポルフィリン産生の調節はざ瘡と関連する I A-2 型株に特異的であるが、健康と関連する I I 型株には特異的ではない。

【0099】

小分子阻害剤によって P. *acnes* におけるポルフィリン産生が減少し、その阻害はビタミン B₁₂ の追加によって妨害された。ポルフィリン産生が代謝レベルで調節され得ることを更に実証するために、小分子阻害剤であるレブリン酸 (LA) の効果を、P. *acnes* 株におけるポルフィリン生合成に対して評価した。更に、ポルフィリン産生に対するビタミン B₁₂ の追加の影響を LA との組み合わせで評価した。LA は 5-ALA の類似体であり、P. *aeruginosa* において、ポルホビリノーゲン合成酵素の酵素活性を阻害し、ポルフィリン及びビタミン B₁₂ 生合成経路への代謝流入を遮断することが明らかになっている。0.1 mg/mL ~ 1.0 mg/mL の範囲の濃度の LA を評価したところ、0.1 mg/mL の LA が細菌の増殖に有意に影響を与えなかったことから、この濃度とすることでポルフィリン産生の測定を実験的に妥当なものとした。LA (0.1 mg/mL) によって、HL001PA1 を除く全ての株でポルフィリン産生が有意に低下し、未処理の培養物と比較して平均 30% の低下が見られた ($P \leq 0.0001$) (図 5)。しかし、ざ瘡と関連する I A-2 型株においては、10 µg/mL のビタミン B₁₂ と組み合わせで追加した場合、ポルフィリンの有意な減少はなかった。ビタミン B₁₂ を追加すると、ざ瘡と関連する I A-2 型株では特異的に LA によるポルフィリン生合成の阻害が妨害されたが、健康と関連する I I 型株では妨害がなかった。このことは上記の本発明者らの知見 (図 2 及び図 4) と整合しており、更に、ビタミン B₁₂ がざ瘡と関連する I A-2 型株においてポルフィリン産生を調節する、及びポルフィリン産生が代謝レベルで調節され得るとの結論を裏付けている。このデータはまた、LA が P. *acnes* におけるポルフィリン生合成の有効な阻害剤であること、及び上記ポルフィリン生合成経路が、新規なざ瘡の治療のための潜在的な治療上の標的となり得ることを示唆している。

【0100】

健康と関連する株はポルフィリン生合成抑制因子遺伝子 *deoR* を有する。ざ瘡と関連する P. *acnes* 株と健康と関連する P. *acnes* 株とによって産生されるポルフィリンのレベルが異なることを説明することができる、可能性のある分子機序を特定するた

めに、本検討で試験した株を含む82種のP. acnes株のポルフィリン生合成遺伝子オペロン（ヘム）を比較した。全ての健康と関連するII型株及び少数のI型株（主としてIB-3株及びIC株）は、ポルフィリン生合成オペロン中に、deoR転写抑制因子としてアノテートされる更なる遺伝子を有する（図8及び9）。上記deoR遺伝子はポルフィリン生合成遺伝子クラスターの13bp上流に位置する。この遺伝子は、全てのざ瘡と関連するIA-2型株には存在しない。deoRが機能的であるか否かを判定するために遺伝子発現分析を実施し、3種の健康と関連するII型株のうちの2種、HL001PA1及びHL042PA3において発現がなされ、HL103PA1においては発現されないことを見出した（図6）。複数の他の種におけるdeoR様抑制因子のキャラクターゼーションによって、糖ホスホトランスフェラーゼの活性、ダプトマイシンの産生、及び脂肪酸のベータ酸化などの細胞過程の調節におけるそれらの役割が明らかになった。上記のdeoRがゲノム中でポルフィリン生合成遺伝子に極めて近接していること及び健康と関連するII型株にdeoRが存在し且つ発現することは、deoRがポルフィリン生合成における転写抑制因子として機能する可能性があることを示唆している。このことは、部分的には、健康と関連するII型株によって産生されるポルフィリンが低レベルであること、及び該株の健康な皮膚との関連を説明することができる。

10

【0101】

ざ瘡と関連するIA-2型株及び健康と関連するII型株は異なるP. acnesの系統に属する。健康と関連するII型株によって産生されるポルフィリンのレベルが低いことが、可能性として、deoRによる抑制に起因するのであって、他の系統の違いに起因するのではないことを更に調べるために、I型のP. acnes株、HL025PA1によって産生されるポルフィリンのレベルを調べた。HL025PA1はI型内の別個の系統を表し、系統学的にはII型株よりもIA-2型株により類似している（図9）。HL025PA1は、ほとんどの他のI型株とは異なり、そのポルフィリン生合成オペロン中にdeoRをコードし、該オペロン中でこれを発現する（図6）。HL025PA1は、健康と関連するII型株と同様であり（ $2.7 \mu\text{M}$ 、 $P=0.31$ ）、ざ瘡と関連するIA-2型株よりも有意に低い（ $P=0.0006$ ）レベルでポルフィリンを産生した（図10）。ビタミンB₁₂を追加した場合、健康と関連するII型株において観測された傾向と一致して、HL025PA1においては、HL025PA1自体の転写抑制が生じた（図3）一方で、ポルフィリン産生はビタミンB₁₂の追加による影響を受けなかった（図10）。この知見は、ポルフィリンの生合成におけるdeoRの阻害的な役割を更に裏付け、II型株の健康との関連を潜在的には説明できる可能性がある。

20

30

【0102】

参照による援用

本明細書に引用した全ての科学論文、特許、及び公開された特許出願は、本記載により、参照により援用される。

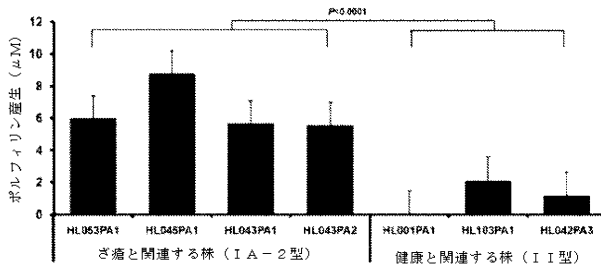
【0103】

均等物

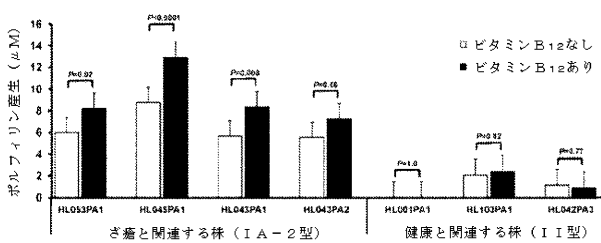
当業者であれば、本明細書に記載された発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を、認識するかまたは慣用的な実験のみを用いて確認することができよう。かかる均等物は、添付の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

40

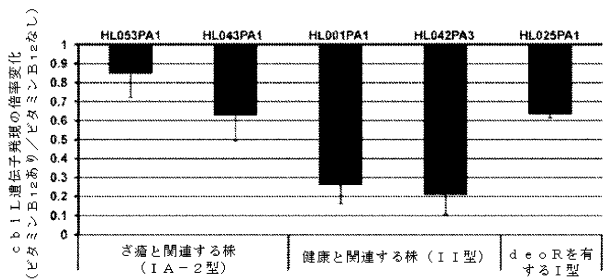
【図 1】



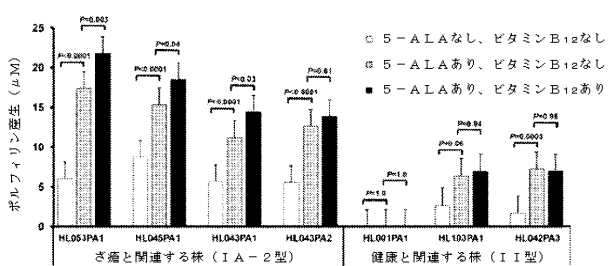
【図 2】



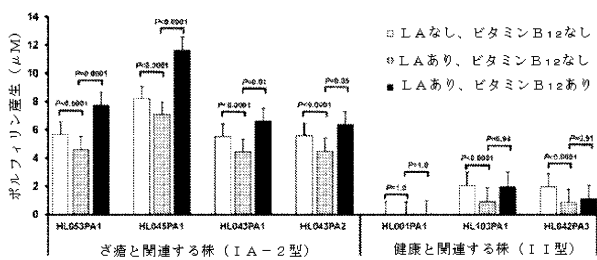
【図 3】



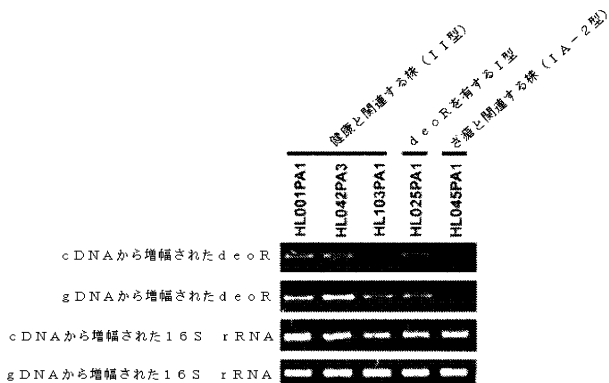
【図 4】



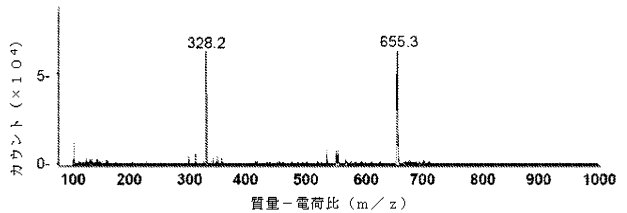
【図 5】



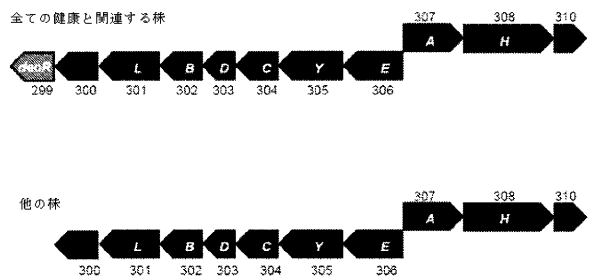
【図 6】



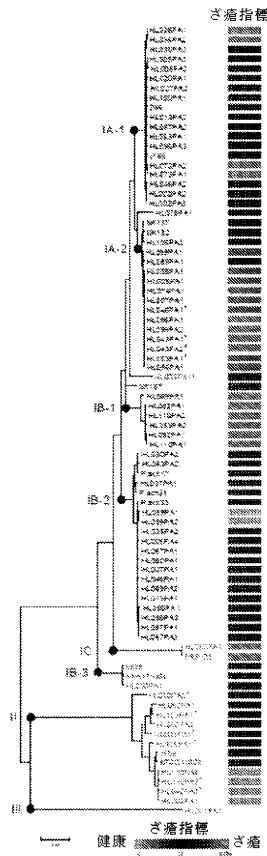
【図 7】



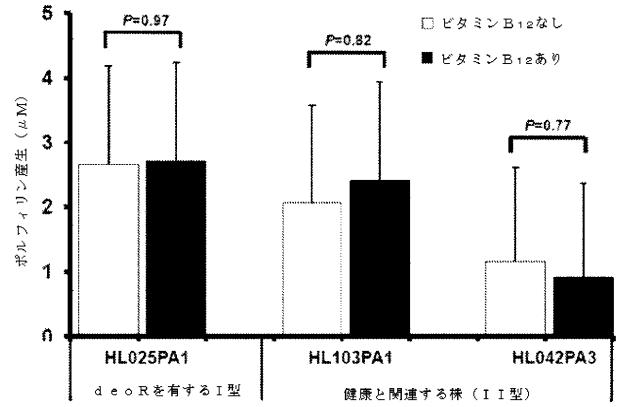
【図 8】



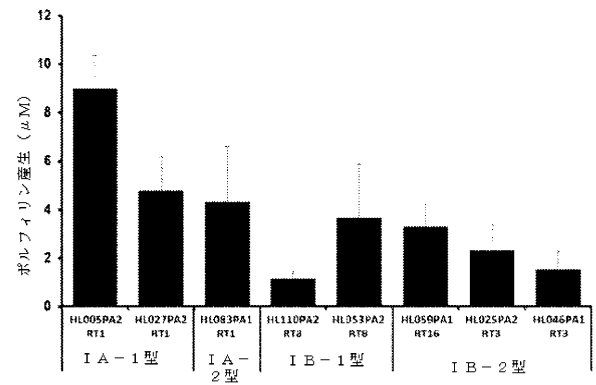
【図 9】



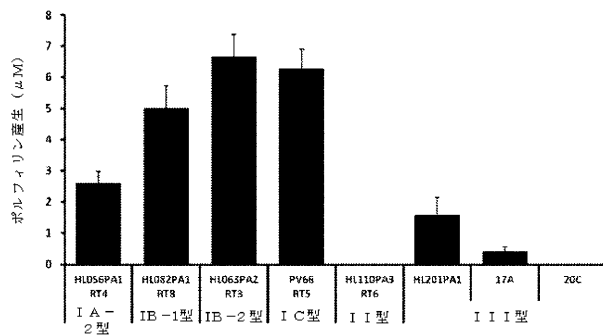
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【配列表】

2019509263000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/016526

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 32,33,39-54
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 32, 33 and 39-54 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☒ Claims Nos.: 8,22,43,45,46,53,63,70,71
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 8, 22, 43, 45, 46, 53, 63, 70, and 71 are not clear because they refer to multiple dependent claims respectively, which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 7,9,10,17,21,23,24,28-31,42,44,47,51,52,54,58-62,64,68,69,72-75,79-81
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See the extra page.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-17

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/016526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 8/60(2006.01)i, A61K 8/36(2006.01)i, A61K 8/67(2006.01)i, A61Q 17/00(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 8/60; A61K 38/00; A61P 17/00; C12N 7/00; C12Q 1/68; A61K 47/00; A61K 31/198; C12N 1/20; A61K 8/36; A61K 8/67; A61Q 17/00; A61Q 19/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Propionibacterium acnes, RT1, RT2, RT3, RT6, RT8, RT16, Type III		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015-171899 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 November 2015 See page 3, line 30 - page 4, line 10; examples 1-3; claims 21, 30 and 34.	1-6, 11-16
X	US 2015-0086581 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 26 March 2015 See paragraph [0285]; claims 17 and 30-31.	1, 2, 4, 6, 11, 12, 14
A	US 2003-0147930 A1 (JUN, HONG-KI et al.) 07 August 2003 See abstract; paragraph [0028].	1-6, 11-16
A	FITZ-GIBSON, SOREL et al., 'Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne', Journal of Investigative Dermatology, 28 February 2013(online), Vol. 133, pp. 2152-2160 See abstract; 'discussion' section; tables 1 and 2.	1-6, 11-16
A	US 5981473 A (BAREFOOT, SUSAN F. et al.) 09 November 1999 See column 3, lines 41-50; claim 7.	1-6, 11-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 June 2017 (26.06.2017)		Date of mailing of the international search report 26 June 2017 (26.06.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/016526

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	JOHNSON, TREMYLLA et al., 'Strain-level differences in porphyrin production and regulation in <i>Propionibacterium acnes</i> elucidate disease associations', mSphere, 10 February 2016, Vol. 1, Issue 1, Article No. e00023-15 (internal pp. 1-12) See page 2, lines 17-19; page 9, lines 3-23; table 1.	1,2,4,6,11,12,14 ,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2017/016526

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015-171899 A1	12/11/2015	EP 3139939 A1 US 2017-0065647 A1	15/03/2017 09/03/2017
US 2015-0086581 A1	26/03/2015	AU 2013-235340 A1 CA 2867621 A1 CN 104364394 A EP 2825676 A1 EP 2825676 A4 HK 1207402 A1 JP 2015-512255 A US 2017-0058328 A1 WO 2013-142378 A1 WO 2013-142378 A9	16/10/2014 26/09/2013 18/02/2015 21/01/2015 30/09/2015 29/01/2016 27/04/2015 02/03/2017 26/09/2013 23/01/2014
US 2003-0147930 A1	07/08/2003	JP 2003-226641 A KR 10-0512098 B1 KR 10-2003-0047717 A US 2006-0241182 A1	12/08/2003 05/09/2005 18/06/2003 26/10/2006
US 5981473 A	09/11/1999	CA 2310218 A1 EP 1060745 A2 EP 1060745 A3 US 6221847 B1	27/11/2000 20/12/2000 22/01/2003 24/04/2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/016526

Continued to Box No. III

-Invention 1(claims 1-17) relates to a method(claims 1-10) and a composition(claims 11-17) for treating a skin condition by using an RT1, RT2, RT3, RT6, RT8, RT16, or a Type III strain of *Propionibacterium acnes*.

-Invention 2(claims 18-31 and 76-81) relates to a method for determining the risk that a subject will develop vitamin B12-induced acne, comprising calculating the porphyrin concentration of a cell suspension comprising *P. acnes* obtained from the subject(claims 18-24) or diagnosing the subject with an elevated risk of developing vitamin B12-induced acne if a strain of *P. acnes* is sensitive to vitamin B12(claims 25-31), and a method for reducing the amount of porphyrins on the skin of the subject(claims 76-81).

-Invention 3(claims 32-38 and 55-75) relates to a method for determining a skin condition, comprising considering that a subject is at risk of a skin disease if *deoR* transcriptional repressor is not present in bacterial DNA in a skin sample(claims 32 and 33), a composition(claims 34-36 and 65-75) and a method for treating a skin condition(claims 37, 38 and 55-64) by using a nucleic acid encoding *deoR*.

The only common technical feature between the claimed inventions is *Propionibacterium acnes*.

However, this common feature is already disclosed in the following prior art documents: US 2015-0086581 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 26 March 2015 and WO 2015-171899 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 November 2015. The common technical feature is not considered to contribute over the prior as a whole. Thus, there is no technical relationship left over the prior art among the claimed inventions, leaving the claims without a single general inventive concept.

Therefore, the present application does not meet the requirements of unity of invention (PCT Rules 13.1 and 13.2).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/4409 (2006.01)	A 6 1 K 31/19	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/714 (2006.01)	A 6 1 K 31/4409	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 31/714	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 2 3 L 33/135 (2016.01)	A 6 1 P 31/04	
	A 2 3 L 33/135	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72)発明者 ジョンソン, トレマイラ
アメリカ合衆国 9 0 0 6 6 カリフォルニア州, ロサンゼルス, イングルウッド ブールバード
3 9 2 7, アパートメント 2 0 2

(72)発明者 カン, デジ
アメリカ合衆国 9 1 8 0 1 カリフォルニア州, アルハンブラ, エス. シエラ ビスタ アベニ
ュー 7 1 1, アパートメント エム

(72)発明者 バーナード, エマ
アメリカ合衆国 9 0 0 6 6 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ソウテル ブールバード 3 1
7 0, アパートメント 3 0 1

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB09 CB21 DA13 DA14 DA80 FA13 FB02
4B018 MD08 MD09 MD18 MD23 MD85 ME14
4C084 AA11 AA13 AA17 MA02 MA16 MA22 MA28 MA35 MA37 MA43
MA52 MA63 NA05 NA14 ZA891 ZA892 ZB351 ZB352 ZC411 ZC412
ZC751 ZC752
4C086 AA01 AA02 BC17 DA39 MA01 MA02 MA03 MA04 MA16 MA22
MA28 MA35 MA37 MA43 MA52 MA63 NA05 NA14 ZA89 ZB35
ZC41 ZC75
4C087 AA01 AA02 BC74 BC83 CA09 CA12 MA02 MA16 MA22 MA28
MA35 MA37 MA43 MA52 MA63 NA05 NA14 ZA89 ZB35 ZC41
ZC75
4C206 AA01 AA02 DA09 MA01 MA02 MA03 MA04 MA36 MA42 MA48
MA55 MA57 MA63 MA72 MA83 NA05 NA14 ZA89 ZB35 ZC41
ZC75