



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108367029 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680049386.2

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22)申请日 2016.07.01

代理人 张文辉

(30)优先权数据

62/188,343 2015.07.02 US

62/189,105 2015.07.06 US

14/882,284 2015.10.13 US

(51)Int.Cl.

A61K 35/74(2015.01)

A61K 35/744(2015.01)

A61K 35/745(2015.01)

A61K 35/747(2015.01)

A61P 17/10(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/040756 2016.07.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/004557 EN 2017.01.05

(71)申请人 A0生物医学有限责任公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D.R.惠特洛克 S.贾马斯 L.韦斯

权利要求书6页 说明书77页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗痤疮的氨氧化细菌

(57)摘要

提供了用于治疗受试者中的皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮的方法。该方法包括对受试者的表面施用,例如应用,例如局部施用氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂。还提供了包含氨氧化细菌的制剂,用于治疗受试者中的此类皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮。

1. 治疗受试者的皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮的方法,所述方法包括:
对所述受试者的表面施用,例如应用,例如局部施用氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂。
2. 权利要求1的方法,其中施用,例如应用的量和频率足以降低所述受试者的表面上的致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*) 的量或浓度。
3. 权利要求2的方法,其中所述量是氨氧化细菌的治疗有效剂量。
4. 权利要求1的方法,其中所述皮肤病症是痤疮,例如寻常痤疮。
5. 权利要求4的方法,其中施用提供炎性损伤,例如丘疹、脓疱、囊肿/结节的治疗。
6. 权利要求5的方法,其中施用提供非炎性损伤,例如开放性粉刺,闭合性粉刺的治疗。
7. 权利要求5的方法,其中施用提供炎症后色素沉着过度/炎症后红斑 (PIH/PIE) 损伤的治疗或改善。
8. 权利要求5的方法,其中施用提供红斑、水肿、鳞屑、刺痛、烧伤、和瘙痒中一项或多项的治疗或改善。
9. 权利要求5的方法,其中施用提供油性外貌、毛孔外貌、发光、斑点、皮肤色调均匀度、视觉平滑、和触觉平滑中的一项或多项的治疗或改善。
10. 权利要求5的方法,其中施用提供皮脂仪测量的治疗或改善。
11. 权利要求1的方法,其中施用包括用氨氧化细菌预处理所述受试者。
12. 权利要求1的方法,其中局部施用包括在所述皮肤病症发生前的局部施用。
13. 权利要求1的方法,其中局部施用包括对所述受试者局部施用有效剂量的氨氧化细菌。
14. 权利要求13的方法,其中所述有效剂量是约 0.1×10^9 、 0.2×10^9 、 0.3×10^9 、 0.4×10^9 、 0.5×10^9 、 0.6×10^9 、 0.7×10^9 、 0.8×10^9 、 0.9×10^9 、 1.0×10^9 、 1.2×10^9 、 1.4×10^9 、 1.5×10^9 、 1.6×10^9 、 1.8×10^9 、 2.0×10^9 、 2.2×10^9 、 2.4×10^9 、 2.6×10^9 、 2.8×10^9 、 3.0×10^9 、 3.2×10^9 、 3.4×10^9 、 3.6×10^9 、 3.8×10^9 、 4.0×10^9 、 4.2×10^9 、 4.4×10^9 、 4.6×10^9 、 4.8×10^9 、 5.0×10^9 、 5.5×10^9 、 6.0×10^9 、 6.5×10^9 、 7.0×10^9 、 7.5×10^9 、 8.0×10^9 、 8.5×10^9 、 9.0×10^9 、 9.5×10^9 、 10.0×10^9 、 12×10^9 、 14×10^9 、 16×10^9 、 18×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 、 40×10^9 、 50×10^9 CFU。
15. 权利要求1的方法,其中所述皮肤病症在所述受试者的靶部位处,并且包含一种或多种不期望的细菌,例如致病性细菌。
16. 权利要求15的方法,其中所述靶部位包含痤疮丙酸杆菌。
17. 权利要求1的方法,所述方法还包括确定所述受试者是否需要治疗所述皮肤病症,例如确定所述受试者是否需要治疗痤疮,例如寻常痤疮。
18. 权利要求17的方法,其还包括选择需要治疗所述皮肤病症的受试者。
19. 权利要求1的方法,其中所述氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂可以为可以被气雾化、喷雾或雾化的形式,即为雾形式。
20. 权利要求19的方法,其中以气雾剂或雾应用所述氨氧化细菌,例如制剂,例如在水性介质中。
21. 权利要求20的方法,其中所述氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂可以是缓冲溶液,例如水性缓冲溶液中的氨氧化细菌。
22. 权利要求21的方法,其中所述缓冲溶液,例如水性缓冲溶液包含磷酸氢二钠和氯化

镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 。

23. 权利要求21的方法,其中所述缓冲溶液,例如水性缓冲溶液基本上由磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 组成。

24. 权利要求21的方法,其中所述缓冲溶液,例如水性缓冲溶液由磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 组成。

25. 权利要求1的方法,其还包括基于受试者需要降低所述受试者表面上致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的量或浓度,选择所述受试者。

26. 权利要求1的方法,其中自身施用所述氨氧化细菌。

27. 权利要求1的方法,其中将所述氨氧化细菌应用于所述受试者的脸、颈和头皮中的任何一项或多项。

28. 权利要求1的方法,其中所述制剂包含氨、铵盐、和尿素中的至少一种。

29. 权利要求1的方法,其中所述制剂包含受控释放材料,例如缓慢释放材料。

30. 权利要求1的方法,其中所述氨氧化细菌的制剂还包含赋形剂,例如药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂之一。

31. 权利要求30的方法,其中所述赋形剂,例如所述药学上可接受的赋形剂和所述美容上可接受的赋形剂之一是表面活性剂。

32. 权利要求1的方法,其中所述制剂基本上不含其它生物体。

33. 权利要求1的方法,其中所述制剂布置在粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带中。

34. 权利要求1的方法,其中所述制剂作为粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带来提供。

35. 权利要求1的方法,其中所述制剂包含保湿剂、脱臭剂、香味剂、着色剂、驱虫剂、清洁剂或防紫外线剂。

36. 权利要求30的方法,其中所述赋形剂例如所述药学上可接受的赋形剂或所述美容上可接受的赋形剂包括抗粘附剂、粘合剂、涂层剂、崩解剂、填充剂、调味剂、着色剂、润滑剂、助流剂、吸附剂、防腐剂或甜味剂。

37. 权利要求1的方法,其中所述包含氨氧化细菌的制剂包含约 10^8 -约 10^{14} CFU/L氨氧化细菌。

38. 权利要求1的方法,其中所述包含氨氧化细菌的制剂包含约 1×10^9 CFU/mL-约 10×10^9 CFU/mL氨氧化细菌。

39. 权利要求1的方法,其中所述包含氨氧化细菌的制剂包含约50毫克(mg)-约1000mg氨氧化细菌。

40. 权利要求30的方法,其中氨氧化细菌与所述赋形剂,例如所述药学上可接受的赋形剂或所述美容上可接受的赋形剂的质量比在每升约0.1克-约1克的范围内。

41. 权利要求1的方法,其中所述氨氧化细菌选自下组:亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas)、亚硝化球菌属(Nitrosococcus)、亚硝化螺菌属(Nitrosospira)、亚硝化囊菌属(Nitrosocystis)、亚硝化叶菌属(Nitrosolobus)、亚硝化弧菌属(Nitrovibrio)和其组合。

42. 权利要求41的方法,其中所述氨氧化细菌是亚硝化单胞菌(Nitrosomonas

eutropha) (N.eutropha)。

43. 权利要求42的方法,其中所述氨氧化细菌是具有ATCC登录号PTA-121157的亚硝化单胞菌D23。

44. 权利要求1的方法,其中所述制剂包含选自下组的生物体:乳酸杆菌属(Lactobacillus)、链球菌属(Streptococcus)、双歧杆菌属(Bifidobacter)及其组合。

45. 权利要求1的方法,用以递送化妆品产品。

46. 权利要求1的方法,用以递送治疗产品。

47. 权利要求1的方法,其中在容器中提供所述制剂,所述制剂和所述容器具有小于约50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、或2000克的重量。

48. 权利要求1的方法,其中每天约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24次应用所述制剂。

49. 权利要求48的方法,其中每天一次应用所述制剂。

50. 权利要求49的方法,其中每天两次应用所述制剂。

51. 权利要求1的方法,其中将所述制剂应用约1-3、3-5、5-7、7-9、5-10、10-14、12-18、12-21、21-28、28-35、35-42、42-49、49-56、46-63、63-70、70-77、77-84或84-91天。

52. 权利要求51的方法,其中将所述制剂应用约7天。

53. 权利要求51的方法,其中将所述制剂应用约14天。

54. 权利要求51的方法,其中将所述制剂应用约21天。

55. 权利要求51的方法,其中将所述制剂应用约28天。

56. 权利要求1的方法,其还包括从所述皮肤的表面获得样品。

57. 权利要求56的方法,其还包括分离所述样品中的细菌的DNA。

58. 权利要求57的方法,其还包括对所述样品中的细菌的DNA测序。

59. 权利要求58的方法,其中所述细菌是痤疮丙酸杆菌。

60. 权利要求1的方法,其中施用所述氨氧化细菌提供痤疮丙酸杆菌的减少。

61. 权利要求60的方法,其中在约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、或28天后,所述痤疮丙酸杆菌减少,例如痤疮丙酸杆菌浓度降低。

62. 权利要求1的方法,其还包括施用,例如自身施用下列一种或多种:洗发剂、护发素、和清洁剂,例如面部清洁剂。

63. 权利要求62的方法,其中每天1次应用洗发剂、护发素、和面部清洁剂中的任一种或多种。

64. 权利要求62的方法,其中使用的所述洗发剂是293178批次。

65. 权利要求62的方法,其中使用的所述清洁剂是293162批次。

66. 权利要求62的方法,其中在中断所述氨氧化细菌的施用后使用洗发剂、护发素、和肥皂中的至少一种。

67. 权利要求62的方法,其中在中断所述氨氧化细菌制剂后使用洗发剂、护发素、和肥皂中的至少一种。

68. 权利要求1的方法,其中在开始治疗,例如施用所述氨氧化细菌前评估所述受试者。

69. 权利要求1的方法,其中在开始治疗,例如施用所述氨氧化细菌后1、2、3、4、5、6、7、

8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42天；或7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52周；或2、3年、4、或5年评估所述受试者。

70. 权利要求1的方法，其中施用所述制剂提供下列一项或多项：降低损伤的炎性，降低损伤的频率，和降低致病性细菌，例如痤疮丙酸杆菌的存在。

71. 权利要求70的方法，其中施用所述制剂提供损伤炎性的降低。

72. 权利要求71的方法，其中施用所述制剂提供成年人中损伤炎性的降低。

73. 权利要求70的方法，其中施用所述制剂提供损伤频率的降低。

74. 权利要求70的方法，其中施用所述制剂提供降低致病性细菌，例如痤疮丙酸杆菌的存在。

75. 权利要求1的方法，其中施用所述制剂提供受试者对其疾病的情绪评估的改善，如通过Skindex16生活质量调查测量。

76. 权利要求1的方法，其中施用所述制剂提供下列一项或多项的改善：所述受试者中的皮肤状况伤痛、所述受试者中的皮肤状况的持续性/再发生、和所述受试者中的皮肤状况的外观。

77. 权利要求1的方法，其中根据临床分级，施用所述制剂提供下列一项或多项的改善（降低）：视觉和触觉平滑的分级得分和斑点。

78. 权利要求1的方法，其中所述受试者是女性。

79. 权利要求1的方法，其中所述受试者是男性。

80. 权利要求1的方法，其中所述受试者以下列种族性/人种之一表征：亚洲裔、黑人或非洲裔美国人、西班牙裔或拉丁裔、白人、或多种族的。

81. 权利要求1的方法，其中所述受试者表征为具有下列皮肤类型中的至少一种：正常、油性、和混合性皮肤。

82. 权利要求1的方法，其中所述受试者表征为具有下列Fitzpatrick皮肤类型之一：I、II、III、IV、V。

83. 权利要求1的方法，其中所述痤疮类型是青年期痤疮。

84. 权利要求1的方法，其中所述痤疮类型是成年人痤疮。

85. 权利要求1的方法，其中所述受试者的年龄是约12-15、16-18、19-28、或大于28。

86. 权利要求1的方法，其中对受试者施用选自下组的痤疮治疗：局部类视黄醇、壬二酸（azelaic acid）、水杨酸、局部抗微生物剂、口服抗生素、过氧苯甲酰、口服抗雄激素、口服异维甲酸及其组合。

87. 权利要求86的方法，其中在开始所述氨氧化细菌施用前将所述痤疮治疗施用一段时间。

88. 权利要求86的方法，其中贯穿施用所述氨氧化细菌的时间段继续所述痤疮治疗。

89. 权利要求86的方法，其中在开始氨氧化细菌施用前将所述痤疮治疗施用一段时间，并且在开始所述氨氧化细菌施用前停止。

90. 权利要求86的方法，其中在施用所述氨氧化细菌期间停止所述痤疮治疗。

91. 权利要求86的方法，其中贯穿所述氨氧化细菌的施用继续所述痤疮治疗。

92. 权利要求86的方法,其中在停止氨氧化细菌施用后开始所述痤疮治疗。
93. 权利要求1的方法,其中在所述受试者清洁或淋浴前30、60、90、120、150、180分钟发生施用。
94. 制剂,所述制剂包含如权利要求1-93中任一项所述的氨氧化细菌,用于治疗皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮。
95. 包含氨氧化细菌的制剂,用于治疗皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮。
96. 权利要求95的制剂,其中所述氨氧化细菌在缓冲溶液,例如水性缓冲溶液中。
97. 权利要求96的制剂,其中所述缓冲溶液,例如水性缓冲溶液包含磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 。
98. 权利要求96的制剂,其中所述缓冲溶液,例如水性缓冲溶液基本上由磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 组成。
99. 权利要求96的制剂,其中所述缓冲溶液,例如水性缓冲溶液由磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 组成。
100. 权利要求95的制剂,其中所述制剂包含氨、铵盐、和尿素中的至少一种。
101. 权利要求95的制剂,其中所述制剂包含受控释放材料,例如缓慢释放材料。
102. 权利要求95的制剂,其中所述氨氧化细菌制剂还包含赋形剂,例如药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂之一。
103. 权利要求102的制剂,其中所述赋形剂,例如所述药学上可接受的赋形剂和所述美容上可接受的赋形剂之一是表面活性剂。
104. 权利要求95的制剂,其中所述制剂基本上不含其它生物体。
105. 权利要求95的制剂,其中所述制剂布置在粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带中。
106. 权利要求95的制剂,其中所述制剂作为粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带来提供。
107. 权利要求95的制剂,其中所述制剂包含保湿剂、脱臭剂、香味剂、着色剂、驱虫剂、清洁剂或防紫外线剂。
108. 权利要求102的制剂,其中所述赋形剂例如所述药学上可接受的赋形剂或所述美容上可接受的赋形剂包括抗粘附剂、粘合剂、涂层剂、崩解剂、填充剂、调味剂、着色剂、润滑剂、助流剂、吸附剂、防腐剂或甜味剂。
109. 权利要求95的制剂,其中所述包含氨氧化细菌的制剂包含约 10^8 -约 10^{14} CFU/L氨氧化细菌。
110. 权利要求95的制剂,其中所述包含氨氧化细菌的制剂包含约 1×10^9 CFU/mL-约 10×10^9 CFU/mL氨氧化细菌。
111. 权利要求95的制剂,其中所述包含氨氧化细菌的制剂包含约50毫克(mg)-约1000mg氨氧化细菌。
112. 权利要求102的制剂,其中氨氧化细菌与所述赋形剂,例如所述药学上可接受的赋形剂或所述美容上可接受的赋形剂的质量比在每升约0.1克-约1克的范围内。
113. 权利要求95的制剂,其中所述氨氧化细菌选自下组:亚硝化单胞菌属、亚硝化球菌属、亚硝化螺菌属、亚硝化囊菌属、亚硝化叶菌属、亚硝化弧菌属和其组合。

114. 权利要求113的制剂,其中所述氨氧化细菌是亚硝化单胞菌。

115. 权利要求114的制剂,其中所述氨氧化细菌是具有ATCC登录号PTA-121157的亚硝化单胞菌D23。

116. 权利要求115的制剂,其中所述制剂包含选自下组的生物体:乳酸杆菌属、链球菌属、双歧杆菌属及其组合。

用于治疗痤疮的氨氧化细菌

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2015年4月15日提交的国际专利申请号PCT/US2015/025909的部分继续, 所述国际专利申请号PCT/US2015/025909要求2014年4月15日提交的希腊专利申请号20140100217、2014年5月22日提交的美国临时申请号62/002084、2014年6月16日提交的美国临时申请号62/012811、2014年9月22日提交的美国临时申请号62/053588、和2015年3月13日提交的希腊专利申请号20150100115的优先权, 其内容通过引用完整并入本文。本申请还要求2015年7月2日提交的美国临时申请号62/188343和2015年7月6日提交的美国临时申请号62/189105的优先权。

[0003] 发明背景

[0004] 可以使用有益细菌来抑制致病性细菌的生长。细菌和其它微生物在环境中无处不在。致病性细菌的发现和疾病的病菌理论对于健康和疾病状况具有极大的影响。细菌是所有生物的环境内的一个正常部分。在肠道内, 这些细菌在正常条件下是不会致病的, 并且实际上它们通过使正常的肠内容物较不适于致病生物体存活来促进健康。由多种途径实现疾病预防: 消耗营养物, 留给病原体较少的营养物; 产生不适于病原体存活的条件, 如pH和氧张力; 产生对病原体有毒性的化合物; 病原体被这些微生物作为食物消耗掉; 给病原体留有更小的物理空间; 以及占据特异性结合位点, 给病原体留下更少的可用结合位点。这些有益细菌的存在被视为可有效预防疾病状况。

[0005] 在本领域中需要可以抑制致病性细菌的生长的改良的有益细菌, 例如就治疗皮肤病况, 例如痤疮, 例如寻常痤疮而言。

[0006] 痤疮是最常见的皮肤病和皮肤科医生访问最高的报告原因, 占美国皮肤科医生的患者量的约四分之一。传统上认为痤疮是一种微不足道的“正常”状况, 但是最近在医学上它被重新定义为一种慢性疾病, 即可以显著影响个体生活质量, 具有与由患有癫痫、哮喘、糖尿病或关节炎的患者报告的社交、心理和情绪损害相当的社交、心理和情绪损害的疾病。仅在美国, 痤疮影响大约4000万至5000万人, 20-25%患有中度至重度痤疮。美国十大品牌痤疮治疗剂的销售具有30亿美元收入, 并且包括15亿美元的系统性类视黄醇、7亿美元的口服抗生素、6亿美元的局部抗生素和2.4亿美元的局部用类视黄醇。在全球范围内, 痤疮流行率约为青少年中80%和年轻成年人中50%。尽管在处方药和非处方药方面花费了大量费用, 但痤疮仍然是一个重要的未得到满足的医疗需求领域, 因为治疗效果不大(局部抗生素、局部类视黄醇, 收敛剂) 和/或与严重风险(口服类视黄醇) 相关。除需要安全有效的产品来预防和治疗炎性和非炎症性痤疮损伤之外, 对于靶向过量的皮脂产生的局部治疗也存在实质上未满足的需求和商业机会。

[0007] 表1:

[0008]

痤疮严重性	轻度		中度		重度
	粉刺性黑头/白头	混合型且丘疹/脓疱性	结节性	结节性/聚合性	
一线	局部类视黄醇	局部类视黄醇+ 局部抗微生物剂	口服抗生素 + 局部类视黄醇 +/- 过氧苯甲酰	口服抗生素 + 局部类视黄醇 +/- 过氧苯甲酰	口服异维甲酸 ³
二线/备选 ¹	备选局部类视黄醇或壬二酸 (azelaic acid) 或水杨酸	备选局部类视黄醇; 抗微生物剂+ 备选局部类视黄醇或壬二酸	备选口服抗生素 + 备选局部类视黄醇 +/- 过氧苯甲酰	口服异维甲酸或备选口服抗生素 + 备选局部类视黄醇 +/- 过氧苯甲酰 壬二酸	高剂量口服抗生素 + 局部类视黄醇 + 过氧苯甲酰
用于女性的备选 ^{1,4}	参见一线选项	参见一线选项	口服抗雄激素 ⁵ +	口服抗雄激素 ⁵ +	高剂量口服抗雄激素 + 局

[0009]

			局部类视黄醇 / 壬二酸 +/- 局部抗微生物剂	局部类视黄醇 / 壬二酸 +/- 局部抗微生物剂	局部类视黄醇 +/- 备选局部抗微生物剂
维持疗法:	局部类视黄醇		局部类视黄醇 +/- 过氧苯甲酰		

[0010] 来源:全球数据;从AcneAcademy, 2010改编。

[0011] 1-考虑物理除去粉刺;2-具有小结节(<.5cm);3-在复发的情况下第二过程;4-对

于妊娠;选项是有限的;5-关于进一步信息,参见Gollnick et al.,2003。

[0012] 理想的目标产品可以具有一项或多项以下特性:自身施用(例如每天一次,例如每天两次);无臭、无色且无形;与日光敏感度增加无关;安全、在摄入/吸入时无毒且对皮肤、邻近的粘膜和眼耐受良好;适合于治疗和维持疗法两者,而不存在促进抗生素抗性的风险;局部起作用以(按优先次序):减少损伤的频率(抗生素,抗炎);减少损伤的持续时间(改善愈合);减少损伤的炎症(抗炎);潜在地阻止或减少异常色素沉着和瘢痕形成(改善愈合);加速受损皮肤的愈合(改善的愈合);减少过多皮脂的产生;并减少致病性细菌的存在(抗生素)。

[0013] 发明概述

[0014] 本公开提供了治疗受试者的皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮的方法,所述方法包括:对所述受试者的表面施用,例如应用,例如局部施用氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂。

[0015] 在一些实施方案中,施用,例如应用的量和频率足以降低所述受试者的表面上的致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)的量或浓度。在一些情况中,量是氨氧化细菌的治疗有效剂量。在一些情况中,皮肤病症是痤疮,例如寻常痤疮。

[0016] 在一些实施方案中,施用提供炎性损伤,例如丘疹、脓疱、囊肿/结节的治疗。在一些实施方案中,施用提供非炎性损伤,例如开放性粉刺,闭合性粉刺的治疗。在一些实施方案中,施用提供炎症后色素沉着过度/炎症后红斑(PIH/PIE)损伤的治疗或改善。在一些实施方案中,施用提供红斑、水肿、鳞屑、刺痛、烧伤、和瘙痒中一项或多项的治疗或改善。在一些实施方案中,施用提供油性外貌、毛孔外貌、发光、斑点、皮肤色调均匀度、视觉平滑、和触觉平滑中的一项或多项的治疗或改善。在一些实施方案中,施用提供皮脂仪测量的治疗或改善。

[0017] 在一些实施方案中,施用包括用氨氧化细菌预处理所述受试者。在一些实施方案中,局部施用包括在所述皮肤病症发生前的局部施用。在一些实施方案中,局部施用包括对所述受试者局部施用有效剂量的氨氧化细菌。在一些情况中,所述有效剂量是约 0.1×10^9 、 0.2×10^9 、 0.3×10^9 、 0.4×10^9 、 0.5×10^9 、 0.6×10^9 、 0.7×10^9 、 0.8×10^9 、 0.9×10^9 、 1.0×10^9 、 1.2×10^9 、 1.4×10^9 、 1.5×10^9 、 1.6×10^9 、 1.8×10^9 、 2.0×10^9 、 2.2×10^9 、 2.4×10^9 、 2.6×10^9 、 2.8×10^9 、 3.0×10^9 、 3.2×10^9 、 3.4×10^9 、 3.6×10^9 、 3.8×10^9 、 4.0×10^9 、 4.2×10^9 、 4.4×10^9 、 4.6×10^9 、 4.8×10^9 、 5.0×10^9 、 5.5×10^9 、 6.0×10^9 、 6.5×10^9 、 7.0×10^9 、 7.5×10^9 、 8.0×10^9 、 8.5×10^9 、 9.0×10^9 、 9.5×10^9 、 10.0×10^9 、 12×10^9 、 14×10^9 、 16×10^9 、 18×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 、 40×10^9 、 50×10^9 CFU。

[0018] 在一些实施方案中,皮肤病症在受试者的靶部位处,并且包含一种或多种不期望的细菌,例如致病性细菌。在一些情况中,靶部位包含痤疮丙酸杆菌。

[0019] 在一些实施方案中,方法还包括确定所述受试者是否需要治疗所述皮肤病症,例如确定所述受试者是否需要治疗痤疮,例如寻常痤疮。方法还包括确定所述受试者是否需要治疗所述皮肤病症,例如确定所述受试者是否需要治疗痤疮,例如寻常痤疮。在一些实施方案中,方法还包括选择需要治疗所述皮肤病症的受试者。

[0020] 在一些实施方案中,氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂可以为可能被气雾化、喷雾或雾化的形式,即为雾形式。在一些实施方案中,以气雾剂或雾应用所述氨氧化

细菌,例如制剂,例如在水性介质中。在一些实施方案中,氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂可以是缓冲溶液,例如水性缓冲溶液中的氨氧化细菌。在一些情况中,所述缓冲溶液,例如水性缓冲溶液包含磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 。在一些情况中,缓冲溶液,例如水性缓冲溶液基本上由磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 组成。在一些情况中,缓冲溶液,例如水性缓冲溶液由磷酸氢二钠和氯化镁,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 组成。

[0021] 在一些实施方案中,方法还包括基于受试者需要降低所述受试者表面上致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的量或浓度,选择所述受试者。在一些实施方案中,自身施用所述氨氧化细菌。

[0022] 在一些实施方案中,将氨氧化细菌应用于所述受试者的脸、颈和头皮中的任何一项或多项。

[0023] 在一些实施方案中,制剂包含氨、铵盐、和尿素中的至少一种。在一些情况中,制剂包含受控释放材料,例如缓慢释放材料。在一些情况中,氨氧化细菌制剂还包含赋形剂,例如药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂之一。在一些情况中,赋形剂,例如所述药学上可接受的赋形剂和所述美容上可接受的赋形剂之一是表面活性剂。在一些情况中,制剂基本上不含其它生物体。在一些情况中,制剂布置在粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带中。在一些情况中,制剂作为粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带来提供。在一些情况中,制剂包含保湿剂、脱臭剂、香味剂、着色剂、驱虫剂、清洁剂或防紫外线剂。在一些情况中,赋形剂例如所述药学上可接受的赋形剂或所述美容上可接受的赋形剂包括抗粘附剂、粘合剂、涂层剂、崩解剂、填充剂、调味剂、着色剂、润滑剂、助流剂、吸附剂、防腐剂或甜味剂。

[0024] 在一些情况中,包含氨氧化细菌的制剂包含约 10^8 -约 10^{14} CFU/L。在一些情况中,包含氨氧化细菌的制剂包含约 10^8 -约 10^{14} CFU/mL。在一些情况中,制剂包含约 1×10^9 CFU/L-约 10×10^9 CFU/L。在一些情况中,制剂包含约 1×10^9 CFU/mL-约 10×10^9 CFU/mL。

[0025] 在一些实施方案中,包含氨氧化细菌的制剂包含约50毫克(mg)-约1000mg氨氧化细菌。在一些情况中,氨氧化细菌与所述赋形剂,例如所述药学上可接受的赋形剂或所述美容上可接受的赋形剂的质量比在每升约0.1克-约1克的范围内。

[0026] 在一些实施方案中,氨氧化细菌选自下组:亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas)、亚硝化球菌属(Nitrosococcus)、亚硝化螺菌属(Nitrosospira)、亚硝化囊菌属(Nitrosocystis)、亚硝化叶菌属(Nitrosolobus)、亚硝化弧菌属(Nitrovibrio)和其组合。在一些情况中,氨氧化细菌是真养亚硝化单胞菌(Nitrosomonas eutropha, N.eutropha)。在一些情况中,氨氧化细菌是具有ATCC登录号PTA-121157的真养亚硝化单胞菌D23。

[0027] 在一些实施方案中,制剂包含选自下组的生物体:乳酸杆菌属(Lactobacillus)、链球菌属(Streptococcus)、双歧杆菌属(Bifidobacter)及其组合。

[0028] 在一些实施方案中,提供方法以递送化妆品产品。在一些实施方案中,提供方法以递送治疗产品。

[0029] 在一些实施方案中,在容器中提供所述制剂,所述制剂和所述容器具有小于约50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、或2000克的重量。

[0030] 在一些实施方案中,每天约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24次应用所述制剂。在一些情况中,每天一次应用所述制剂。在一些情况中,每天两次应用所述制剂。

[0031] 在一些实施方案中,将所述制剂应用约1-3、3-5、5-7、7-9、5-10、10-14、12-18、12-21、21-28、28-35、35-42、42-49、49-56、46-63、63-70、70-77、77-84或84-91天。在一些情况中,将所述制剂应用约7天。在一些情况中,将所述制剂应用约14天。在一些情况中,将所述制剂应用约21天。在一些情况中,将所述制剂应用约28天。

[0032] 在一些实施方案中,方法还包括从所述皮肤的表面获得样品。在一些情况中,方法还包括分离所述样品中的细菌的DNA。在一些情况中,方法还包括对所述样品中的细菌的DNA测序。在一些情况中,细菌是痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)。

[0033] 在一些实施方案中,施用所述氨氧化细菌提供痤疮丙酸杆菌的减少。在一些情况中,在约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、或28天后,所述痤疮丙酸杆菌减少,例如痤疮丙酸杆菌浓度降低。

[0034] 在一些实施方案中,方法还包括施用,例如自身施用下列一种或多种:洗发剂、护发素、和清洁剂,例如面部清洁剂。在某些情况中,每天1次应用洗发剂、护发素、和面部清洁剂中的任一种或多种。在某些情况中,使用的所述洗发剂是293178批次。在某些情况中,使用的所述清洁剂是293162批次。在某些情况中,在中断氨氧化细菌施用后使用洗发剂、护发素、和肥皂中的至少一种。在某些情况中,在中断氨氧化细菌制剂后使用洗发剂、护发素、和肥皂中的至少一种。

[0035] 在一些实施方案中,在开始治疗,例如施用所述氨氧化细菌前评估所述受试者。在一些实施方案中,在开始治疗,例如施用所述氨氧化细菌后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42天;或7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52周;或2、3年、4、或5年评估所述受试者。

[0036] 在一些实施方案中,施用氨氧化细菌,例如氨氧化细菌的制剂提供下列一项或多项:降低损伤的炎性,降低损伤的频率,并且降低致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的存在。在一些情况中,施用所述制剂提供损伤炎性的降低。在一些情况中,施用所述制剂提供成年人中损伤炎性的降低。在一些情况中,施用所述制剂提供损伤频率的降低。在一些情况中,施用所述制剂提供降低致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的存在。在一些情况中,施用所述制剂提供受试者对其疾病的情绪评估的改善,如通过Skindex16生活质量调查测量。在一些情况中,施用所述制剂提供下列一项或多项的改善:所述受试者中的皮肤状况伤痛、所述受试者中的皮肤状况的持续性/再发生、和所述受试者中的皮肤状况的外观(appearance of skin condition)。在一些情况中,根据临床分级,施用所述制剂提供下列一项或多项的改善(降低):视觉和触觉平滑的分级得分和斑点。

[0037] 在一些实施方案中,受试者是女性。在其它实施方案中,受试者是男性。在一些情况中,受试者以下列种族性/人种之一表征:亚洲裔、黑人或非洲裔美国人、西班牙裔或拉丁裔、白人、或多种族的。在一些情况中,受试者表征为具有下列皮肤类型中的至少一种:正常、油性、和混合性皮肤。在一些情况中,受试者表征为具有下列Fitzpatrick皮肤类型之

一：I、II、III、IV、V。在一些情况中，痤疮表征为青年期痤疮。在一些情况中，痤疮表征为成年人痤疮。在一些情况中，受试者的年龄是约12-15、16-18、19-28、或大于28岁。

[0038] 在一些实施方案中，对受试者施用选自下组的痤疮治疗：局部类视黄醇、壬二酸、水杨酸、局部抗微生物剂、口服抗生素、过氧苯甲酰、口服抗雄激素、口服异维甲酸及其组合。在一些实施方案中，在开始所述氨氧化细菌施用前将所述痤疮治疗施用一段时间。在一些实施方案中，贯穿施用所述氨氧化细菌的时间段继续所述痤疮治疗。在一些实施方案中，在开始氨氧化细菌施用前将所述痤疮治疗施用一段时间，并且在开始所述氨氧化细菌施用前停止。在一些实施方案中，在施用所述氨氧化细菌期间停止所述痤疮治疗。在一些实施方案中，贯穿所述氨氧化细菌的施用继续所述痤疮治疗。在一些实施方案中，在停止氨氧化细菌施用后开始所述痤疮治疗。

[0039] 在一些实施方案中，在所述受试者清洁或淋浴前30、60、90、120、150、180分钟发生施用。

[0040] 在一些实施方案中，提供了制剂，所述制剂包含如上文和本公开的任何部分中所述的氨氧化细菌，用于治疗皮肤状况，例如痤疮，例如寻常痤疮。

[0041] 本公开涵盖任何一种或多种前述方面和/或实施方案的所有组合，以及与详细描述和实施例中阐述的任何一个或多个实施方案的组合。

[0042] 附图简述

[0043] 图1显示了在第4周时使用氨氧化细菌(AO+喷雾)的IGA改善。相对于AO+喷雾和安慰剂中改善的报告和恶化的报告绘制均值变化(%)。

[0044] 图2A显示了在第4周时使用氨氧化细菌(AO+喷雾)的皮肤状况持续性的改善。相对于AO+喷雾和安慰剂中改善的报告和恶化的报告绘制均值变化(%)。

[0045] 图2B显示了在第4周时使用氨氧化细菌(AO+喷雾)的皮肤状况的外观的改善。相对于AO+喷雾和安慰剂中改善的报告和恶化的报告绘制均值变化(%)。

[0046] 图3A显示了在第2、4和6周时使用氨氧化细菌(AO+喷雾)的皮肤状况持续性的改善。对于AO+喷雾和安慰剂，相对于周绘制从基线的百分比改善(%)。

[0047] 图3B显示了在第2、4和6周时使用氨氧化细菌(AO+喷雾)的皮肤状况外观的改善。对于AO+喷雾和安慰剂，相对于周绘制从基线的百分比改善(%)。

[0048] 图4显示了炎性损伤的降低。对于氨氧化细菌(AO+喷雾)和安慰剂，对所有测试受试者和成年人测试受试者绘制了均值变化(%)。

[0049] 发明详述

[0050] 本公开提供了治疗皮肤状况，例如痤疮，例如寻常痤疮的方法。方法包括对受试者施用氨氧化细菌，例如包含氨氧化细菌的制剂。

[0051] 涵盖包含氨氧化细菌、基本上由氨氧化细菌组成、由氨氧化细菌组成的制剂、组合物和配制剂，例如包括非天然产物、天然产物和增强的天然产物以用于治疗皮肤状况，例如痤疮，例如寻常痤疮。涵盖包含氨氧化细菌的用于治疗皮肤状况，例如寻常痤疮，例如痤疮的组合物，例如包含氨氧化细菌的制剂。

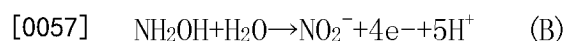
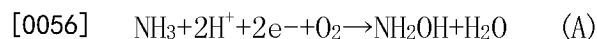
[0052] 亚硝化单胞菌属的氨氧化细菌(AOB)是革兰氏阴性专性自养菌，其具有只从作为能量来源的氨产生亚硝酸盐和一氧化氮的独特能力。它们在土壤和水环境中均广泛存在并且是环境硝化过程的重要组分。由于人类皮肤上的亚硝酸盐和一氧化氮作为若干生理功能

(如血管舒张、皮肤炎症和伤口愈合)的重要组分的作用,这些细菌对于健康的皮肤状况和免疫病理性皮肤状况都可以具有有益性质。这些细菌可以在人类中安全使用,因为它们生长缓慢,无法在有机碳源上生长,可以对皂类和抗生素敏感,并且从未与动物或人类中的任何疾病或感染有关。

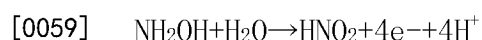
[0053] 氨氧化细菌是遍在的革兰氏阴性专性化能自养型细菌,具有仅从氨转化成亚硝酸盐产生能量的独特能力。

[0054] 在一些实施方案中,氨氧化细菌催化以下反应。

[0055] 在中性pH,从中性pH条件周围的铵产生的氨是初始反应的底物。如下在分别由氨加单氧酶(Amo)和羟胺氧化还原酶(Hao)催化的两步中发生氨至亚硝酸盐的转化:



[0058] 在一些情况中,如下报告反应B,以指示在低pH的亚硝酸(HNO_2)形成:



[0060] 在某些实施方案中,在本公开的全文中, NH_4^+ 和 NH_3 可以可互换使用。

[0061] 本公开提供了氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂,其可以:

[0062] • 降低损伤炎症(例如在成年人中)

[0063] • 降低损伤的频率;并且

[0064] • 降低致病性细菌的存在。

[0065] 氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂还可以:

[0066] • 降低损伤的持续时间;

[0067] • 防止或降低异常色素沉着和瘢痕形成

[0068] • 缩短受损皮肤的愈合期;并且

[0069] • 降低过多皮脂的生成(例如皮脂腺的油性分泌)。

[0070] 本公开提供了包含氨氧化细菌的制剂,用于治疗皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮,其中制剂可以是下列一种或多种:自身施用(例如每天1-2次);无臭、无色且无形,与日光敏感度增加无关,安全、无毒且对皮肤(邻近的粘膜和眼)耐受良好,适合于12岁下的儿童,并且适合于治疗和维持疗法两者而无促进抗生素抗性的风险。

[0071] 氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌,例如称为“D23”,又称为“B244”或“A0B D23-100”的真养亚硝化单胞菌可以具有几种上述特性。

[0072] 1. 定义

[0073] 氨氧化细菌是指能够以一定速率,例如实质速率,例如预定速率将氨或铵氧化为亚硝酸盐的细菌。速率(例如预定速率)可以指铵离子(NH_4^+) (例如,约200mM)以至少50、75、125或150微摩尔 NO_2^- /分钟,例如约100-150、75-175、75-125、100-125、125-150或125-175微摩尔/分钟,例如约125微摩尔 NO_2^- /分钟的速率转化为亚硝酸盐(NO_2^-)。在实施方案中,速率(例如预定速率)可以指对于连续培养(例如具有约0.5的OD),铵离子(NH_4^+) (例如,约200mM)以至少50、75、125或150微摩尔 NO_2^- /分钟/ml,例如约100-150、75-175、75-125、100-125、125-150或125-175微摩尔/分钟/ml,例如约125微摩尔 NO_2^- /分钟/ml的速率转化为亚硝酸盐(NO_2^-)。

[0074] 氨氧化细菌的实例包括真养亚硝化单胞菌菌株,例如D23和C91,以及亚硝化单胞

菌属、亚硝化球菌属、亚硝化螺菌属、亚硝化囊菌属、亚硝化叶菌属和亚硝化弧菌属中的其它细菌。D23真养亚硝化单胞菌菌株是指被命名为AOB D23-100的菌株,其在2014年4月8日保藏于美国组织培养物保藏中心(ATCC)(10801 University Blvd.,Manassas,VA,USA),登录号为PTA-121157。登录号PTA-121157的核酸序列(例如基因组序列)在此通过引用整体并入。在某些实施方案中,真养亚硝化单胞菌是2015年4月15日提交的PCT申请号PCT/US2015/025909(其通过引用完整并入本文)中描述的菌株。贯穿本公开,“AOB D23-100”也可以称为D23或B244。

[0075] 2015年4月15日提交的PCT申请号PCT/US2015/025909中公开的每个核酸序列和氨基酸序列通过引用完整并入本文。2015年4月15日提交的PCT申请号PCT/US2015/025909中公开的任何氨氧化细菌通过引用完整并入本文。

[0076] 优化的真养亚硝化单胞菌当该术语在本文中使用时是指具有优化的生长速率;优化的 NH_4^+ 氧化速率;或优化的 NH_4^+ 抗性的真养亚硝化单胞菌。在一个实施方案中,它与天然存在的真养亚硝化单胞菌的差异在于至少一个核苷酸,例如选自氨单加氧酶、羟胺氧化还原酶、细胞色素c₅₅₄或细胞色素c_{m552}的基因中的核苷酸。差异可以例如通过真养亚硝化单胞菌的自发产生的突变的选择、诱发型突变或定向基因工程而产生。在一个实施方案中,它与天然存在的亚硝化单胞菌的差异在于其具有在自然中不一起存在的一群等位基因。这些差异可以提供下列中的一个或多个:治疗或预防皮肤病症、治疗或预防与低亚硝酸盐水平有关的疾病或状况、治疗或预防体臭、进行治疗以向受试者供应一氧化氮以及进行治疗以抑制微生物生长。

[0077] 如本文中所用,“纯性”是指包含生物体的组合物基本上不含其它生物体。例如,氨氧化细菌的纯性培养物是基本上不含除氨氧化细菌以外的生物体的培养物。例如,真养亚硝化单胞菌的纯性培养物是基本上不含除真养亚硝化单胞菌以外的生物体的培养物。在一些实施方案中,“基本上不含”表示不能被用于检测其它生物体的方法(例如,平板接种培养物并检查菌落形态,或针对保守基因如16S RNA的PCR)检测到。纯性组合物可以包含不是生物体的元素,例如,它可以包含营养物或赋形剂。本文所讨论的氨氧化细菌的任何实施方案、制剂、组合物或配制剂可以包含任选纯性的氨氧化细菌、基本上由任选纯性的氨氧化细菌组成或由任选纯性的氨氧化细菌组成。

[0078] 在本公开的全文中,配制剂可以指组合物或制剂。

[0079] 如本文中所使用,“自养生物”例如自养细菌是能够通过使用无机材料作为营养源以及使用光合作用或化学合成作为能量来源进行自营养的任何生物体。自养细菌可以从二氧化碳和衍生自其它来源的ATP、使氨氧化成亚硝酸盐、使硫化氢氧化和使 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 合成有机化合物。本公开的自养细菌无法引起感染。

[0080] 如本文中所使用,“组合”施用意指在受试者罹患病症的过程中将两种(或更多种)不同的治疗递送给受试者,例如,在受试者已被诊断为患有所述病症之后以及在所述病症已经被治愈或消除之前递送所述两种或更多种治疗。在一些实施方案中,一种治疗的递送在第二治疗的递送开始时仍然在发生,从而存在重叠。这有时在本文中被称作“同时”或“伴随”或“共同递送”。在其它实施方案中,一种治疗的递送在开始另一种治疗的递送之前结束。这有时在本文中被称作“连续”或“顺序递送”。在任一种情况的实施方案中,治疗都因为组合施用而更有效。例如,第二治疗是更有效的,例如,相比于如果在缺少第一治疗的情况

下施用第二治疗将观察到的情况,利用更少的第二治疗观察到同等的效果,或第二治疗在更大程度上减少症状,或者对于第一治疗将观察到类似的情况。在一些实施方案中,递送使得症状或与病症相关的其它参数的减少比在递送一种治疗而缺少另一种治疗的情况下将会观察到的减少更大。两种治疗的作用可以部分相加、全部相加或比相加更大(即,协同)。所述递送可以使得递送的第一治疗的作用在递送第二治疗时仍然是可检测的。在一些实施方案中,可以在诊断具有病症的患者前递送一种或多种治疗。

[0081] 完全欧洲亚硝化单胞菌培养基是指描述于Ensign等人,“In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper.” J Bacteriol.1993年4月;175 (7):1971-80中的欧洲亚硝化单胞菌生长培养基。

[0082] “培养”是指将一定量的所需细菌放置在促进其生长(即,促进细胞分裂)的条件下的过程。所述条件可以涉及特定培养基、设定温度的范围和/或搅拌速率。可以在液体培养基中或在平板例如琼脂平板上培养细菌。

[0083] 如本文中所使用,术语“分离的”是指从其原始或天然环境(例如,如果它是天然存在的,则为天然环境)中移出的物质。例如,存在于活动物中的天然存在的多核苷酸或多肽是未分离的,但通过人类干预与天然系统中的一些或全部共存物质分离的相同的多核苷酸或多肽是分离的。此类多核苷酸可以是载体的一部分和/或此类多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分,且它们仍然是分离的,因为这种载体或组合物不是其所处的自然环境的一部分。

[0084] 术语“核酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“多核苷酸序列”和“多核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸的聚合物形式,例如脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。多核苷酸可以是单链的或双链的,并且如果是单链的,那么它可以是编码链或非编码(反义)链。多核苷酸可以包括修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和其核苷酸类似物。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后被进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。核酸可以是重组多核苷酸或源自基因组、cDNA、半合成或合成的多核苷酸,其不存在于自然中或者以非天然配置连接至另一个多核苷酸。

[0085] 如本文中所用,术语“优化的生长速率”是指下列中的一个或多个:当如本文的实施例2中所述在分批条件下培养时,倍增时间小于约4、5、6、7、8、9或10小时;当如本文的实施例2中所述在恒化器条件下生长时,倍增时间小于约16、18、20、22、24或26小时;或在约1天或2天内从约0.15的OD₆₀₀生长到至少约0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8的OD₆₀₀。在一个实施方案中,优化的生长速率是倍增时间比天然存在的真养亚硝化单胞菌的倍增时间短至少10%、20%、30%、40%或50%的生长速率。

[0086] 如本文中所用,“优化的NH₄⁺氧化速率”是指NH₃或NH₄⁺转化为NO₂⁻的速率为至少约50、75、125或150微摩尔/分钟。例如,所述速率可以为至少约50、75、125或150微摩尔/分钟的NH₄⁺(例如,约200mM)转化为NO₂⁻。在一个实施方案中,优化的NH₄⁺氧化速率是其中NH₃或NH₄⁺转化为NO₂⁻的速率比在天然存在的真养亚硝化单胞菌中所见的速率快至少10%、20%、30%、40%或50%。

[0087] 关于本文的氨基酸序列(例如,由真养亚硝化单胞菌D23表达的蛋白质)的“百分比(%)氨基酸序列同一性”的定义为:在比对序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守性替代视为序列同一性的部分时,候选序列中与参照序列(其

可以是天然存在的真养亚硝化单胞菌序列或真养亚硝化单胞菌D23序列)中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了测定百分比氨基酸序列同一性的目的而进行的比对可以在本领域技术人员的手段内的多种方式来实现,例如使用可公开获得的计算机软件如BLAST、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以决定用于测量比对的适当参数,包括在被比较序列的全长内实现最大比对所需要的任何算法。例如,WU-BLAST-2软件可以用于确定氨基酸序列同一性(Altschul等人,Methods in Enzymology 266,460-480 (1996);<http://blast.wustl.edu/blast/README.html>)。WU-BLAST-2使用数个搜索参数,其中大多数被设置为默认值。可调参数设置有以下值:重叠跨度=1;重叠分数=0.125;世界阈值(T)=1。HSP分数(S)和HSP S2参数是动态值并且由程序自身根据具体序列的组成来确定,然而,可以视情况调整最小值。

[0088] 氨基酸替代可以是将一个氨基酸替换为具有相似的结构和/或化学性质的另一个氨基酸的结果,诸如用丝氨酸替换亮氨酸,即保守性氨基酸替换。典型的但非限制性的保守性替代是脂族氨基酸Ala、Val、Leu和Ile之间的互相替换;含羟基的残基Ser和Thr的互换;酸性残基Asp和Glu的互换;含酰胺的残基Asn和Gln的互换;碱性残基Lys和Arg的互换;芳族残基Phe和Tyr的互换;以及小型氨基酸Ala、Ser、Thr、Met和Gly的互换。另外的保守性替代包括将一个氨基酸替换为具有类似的空间或立体构型的另一个氨基酸,例如,Asn和Asp的互换或Gln和Glu的互换。氨基酸替代还可以是将一个氨基酸替换为具有不同的结构和/或化学性质的另一个氨基酸的结果,即非保守性氨基酸替换。插入或缺失可以任选地在1至5个氨基酸的范围内。允许的变化可以通过对序列中的氨基酸系统地进行插入、缺失或替代并测试所得变体在体内或者体外分析中对于例如尿素或氨的代谢的活性来确定。

[0089] 关于本文的核酸序列(例如,真养亚硝化单胞菌D23基因组及其部分)的“百分比(%)序列同一性”的定义为:在比对序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,候选序列中与参照序列(其可以是天然存在的真养亚硝化单胞菌序列或真养亚硝化单胞菌D23序列)中的核苷酸相同的核苷酸的百分比。为了测定百分比核苷酸序列同一性的目的而进行的比对可以在本领域技术人员的手段内的多种方式来实现,例如使用可公开获得的计算机软件如BLAST。本领域技术人员可以决定用于测量比对的适当参数,包括在被比较序列的全长内实现最大比对所需要的任何算法。

[0090] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”(如果为单链)在本文中可互换地用于指氨基酸聚合物。该聚合物可以是直链或支链,其可以包含修饰的氨基酸,并且其可以间杂有非氨基酸。该术语还包括已被修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作,诸如与标记组分缀合。该多肽可以从天然来源中分离,可以通过重组技术从真核或原核宿主产生,或者可以是合成程序的产物。

[0091] 如本文中所使用,“优化的 NH_4^+ 抗性”是指能够在大于50、75、100、125、150、175、200、225、250、275或300mM NH_3 或 NH_4^+ 的条件下生长至少约24或48小时。在一个实施方案中,优化的 NH_4^+ 抗性是指能够在选定浓度的 NH_3 或 NH_4^+ 下比天然存在的真养亚硝化单胞菌生长快至少10%、20%、30%、40%或50%,或生长时间长至少10%、20%、30%、40%或50%。

[0092] 如本文中针对核酸或蛋白质序列之间的比较所使用,“相似的”意指具有同源性。相似的基因或蛋白质可以包括例如替代(如保守性替代或非保守性替代)、插入(例如,至少1、2、3、4、5、10、15、20、25、30个氨基酸和例如最多2、3、4、5、10、15、20、25、30或50个氨基酸

的插入,或它们的任何正性组合,或所述数目的编码所述氨基酸所需要的核苷酸的插入)或缺失(例如,至少1、2、3、4、5、10、15、20、25、30个氨基酸和例如最多2、3、4、5、10、15、20、25、30或50个氨基酸的缺失,或它们的任何正性组合,或所述数目的编码所述氨基酸所需要的核苷酸的缺失),或它们的任何组合。替代、插入和缺失中的每一个可以定位在所述蛋白质或基因的N末端、C末端或中心区域。在实施方案中,保守性替代是不改变替代位置处的电荷和/或极性和/或近似大小和/或几何结构的替代。

[0093] 如本文中所用,“受试者”可以包括动物、哺乳动物、人、非人动物、家畜动物或伴侣动物。术语“受试者”意图包括人和非人动物,例如脊椎动物、大型动物和灵长类。在某些实施方案中,受试者是哺乳动物受试者,并且在具体的实施方式中,受试者是人受试者。尽管已经清楚预见人的应用,但是在此也设想了例如非人动物的兽医应用。本公开的术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如非哺乳动物(例如鸟,例如鸡;两栖类;爬行类)和哺乳动物,如非人类灵长类动物,驯化的和农业上有用的动物,例如绵羊、狗、猫、牛、猪、大鼠等。

[0094] 如本文中所用,“转基因”意指包含DNA的一个或多个外源性部分。外源性DNA衍生自另一个生物体,例如,另一种细菌、噬菌体、动物或植物。

[0095] 如本文中所用,“疾病或状况的治疗”是指与类似的但未经治疗的患者相比,降低所述疾病或状况的至少一种症状的严重程度或频率。治疗还可以指与类似的但未经治疗的患者相比,阻止、减缓或逆转疾病或状况的进展。治疗可以包括解决疾病和/或一种或多种症状的根本原因。

[0096] 如本文中所使用,“治疗有效量”是指足以防止疾病或病症的推进或引起疾病或病症的消退,或能够缓解疾病或病症的症状,或能够实现所需结果的剂量。治疗有效剂量可以被测量为例如细菌的数量或活菌的数量(例如,以CFU计)或细菌的质量(例如,以毫克、克或千克计),或细菌的体积(例如,以 mm^3 计)。

[0097] 如本文中所使用,术语“活力”是指自养细菌(例如,氨氧化细菌)以预定速率将氨、铵或尿素氧化为亚硝酸盐的能力。在一些实施方案中,实质速率是指铵离子(NH_4^+) (例如,以约200mM)以至少50、75、125或150微摩尔 NO_2^- /分钟,例如约100-150、75-175、75-125、100-125、125-150或125-175微摩尔/分钟,例如约125微摩尔 NO_2^- /分钟的速率转化为亚硝酸盐(NO_2^-)。

[0098] 如本文中所提及的“生长培养基”或“A0B培养基”包括本文的表2或表3中的下列组分。

[0099] 表2.

[0100]

	重量/体积 (在约1.5 L中)	终浓度 (在约1.5 L中)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MW 132.14)	4.95 g	50 mM NH_4^+
KH_2PO_4 (MW 136.1)	0.616 g	3.0 mM
1 M MgSO_4	1.137 ml	0.76 mM
1 M CaCl_2	0.3 ml	0.2 mM
30 mM FeCl_3 / 50mM EDTA	0.5 ml	10 μM / 16.7 μM
50 mM CuSO_4	30 μl	1.0 μM

将1400 ml ddH₂O添加到烧瓶。高温灭菌。在室温贮存。

在高温灭菌后添加:

磷酸盐缓冲液	100 ml	32 mM KH_2PO_4 / 2.7 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
5% Na_2CO_3	12 ml	0.04%

[0101] 表3.

[0102]

分批培养基	补料溶液
重量/体积(1L)	重量/体积(1L)
(终浓度)	(终浓度)

[0103]

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MW 132.14)	3.3 g	13.2 g
	(50 mM NH_4^+)	(200 mM NH_4^+)

KH_2PO_4 (MW 136.1)	1.23 g	0.41 g
	(9.0 mM)	(3.0 mM)

1 M MgSO_4	0.758 ml	0.758 ml
	(0.76 mM)	(0.76 mM)

1 M CaCl_2	0.2 ml	0.2 ml
	(0.2 mM)	(0.2 mM)

30 mM FeCl_3 / 50mM EDTA	0.333 ml	0.333 ml
	(10 μM / 16.7 μM)	(10 μM /16.7 μM)

50 mM CuSO_4	20 μl	20 μl
	(1.0 μM)	(1.0 μM)

dd H_2O	1000 ml	1000 ml
-------------------------	---------	---------

[0104] 对每种溶液高温灭菌并且在室温贮存。

[0105] 在一些实施方案中,与本公开最相关的状态是生长(例如,最大生长)的状态,其特征为至少约7.6的pH、氨、微量矿物质、氧和二氧化碳。另一种状态可以由约7.4或更小的pH表征以及由二氧化碳的缺乏表征。在低二氧化碳条件下,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)继续将氨氧化成亚硝酸盐并产生ATP,但缺乏二氧化碳,例如,缺乏足够的二氧化碳来固定和生成蛋白质,其相反生成被其用作能量储存介质的多磷酸盐。这可以允许氨氧化细菌保持在“储存状态”下一段时间,例如预定的时间段,例如,至少1、2、3、4、5、6、7天;1、2、3、4周;1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月;1、2、3、4或5年。在一些实施方案中,氨氧化细菌可以保持在储存状态下至少保持约6个月至约1年。

[0106] 如本文中所用,“生长状态”是指在可以具有至少约7.6的pH的状态下或环境(例如介质,例如培养基,例如生长培养基)中的自养细菌(例如,氨氧化细菌)。氨、铵离子和尿素

中的至少一种的水平可以在约1微摩尔浓度和1000毫摩尔浓度之间。微量物质的水平在约0.01微摩尔浓度的铁和200微摩尔浓度的铁之间。氧的水平在约5%和100%氧饱和度(例如,培养基的氧饱和度)之间。二氧化碳的水平在约20ppm和10%饱和度(例如,培养基的饱和度)之间。在某些方面,氨、铵离子和尿素中的至少一种的水平可以在约10微摩尔浓度和100毫摩尔浓度之间。微量物质的水平在约0.1微摩尔浓度的铁和20微摩尔浓度的铁之间。氧的水平在约5%和100%氧饱和度之间。二氧化碳的水平在约200ppm和5%饱和度(例如,培养基的饱和度)之间。

[0107] 如本文中所用,“多磷酸盐负载状态”是指在可以具有约7.4或更小的pH的状态下或环境(例如介质,例如培养基,例如生长培养基)中的自养细菌(例如,氨氧化细菌)。氨、铵离子和尿素中的至少一种的水平在约1微摩尔浓度和2000毫摩尔浓度之间。微量物质的水平在0.01微摩尔浓度的铁和200微摩尔浓度的铁之间。氧的水平在约0%和100%O₂饱和度(例如,培养基的氧饱和度)之间。二氧化碳的水平介于/小于约0和400ppm之间,且磷酸盐水平大于约1微摩尔浓度。在某些方面,氨、铵离子和尿素中的至少一种的水平在约10微摩尔浓度和200毫摩尔浓度之间。微量物质的水平在0.1微摩尔浓度的铁和20微摩尔浓度的铁之间。氧的水平在约5%和100%O₂饱和度之间。二氧化碳的水平介于/小于约0和200ppm之间,且磷酸盐水平大于约10微摩尔浓度。

[0108] 可以诱导多磷酸盐负载状态一段时间,例如,预定的时间段。该预定的时间段可以是允许在氨氧化细菌中积累足够的多磷酸盐的时间段。该预定的时间段是适于提供充足的多磷酸盐负载以允许氨氧化细菌长时间储存的时间段。预定的时间段可以至少部分基于约0.2-10倍、0.3-5倍、0.5-3倍、0.5-1.5倍或0.5-1倍氨氧化细菌的倍增时间的时间段。预定的时间段可以至少部分基于氨氧化细菌的约1个倍增时间的时间段。在一些实施方案中,预定的时间段介于约8小时和12小时之间。在一些实施方案中,预定的时间段为约10小时。在一些实施方案中,预定的时间段为约24小时。

[0109] 多磷酸盐负载状态的目的可以是向AOB提供充足的氨、铵离子和/或尿素和O₂,以使得可以产生ATP,但不向AOB提供CO₂和碳酸盐,以使得它们无法使用该ATP固定CO₂,而是使用该ATP来生成可以由细菌储存的多磷酸盐。

[0110] 如本文中所用,术语“储存状态”是指在具有约7.4或更小的pH(在一些实施方案中,pH可以为7.6或更小)的状态下或环境(例如介质,例如培养基,例如生长培养基)中的自养细菌(例如,氨氧化细菌)。氨、铵离子和尿素中的至少一种的水平在约1和1000微摩尔浓度之间。微量物质的水平在约0.1和100微摩尔浓度之间。氧的水平在约0%和100%饱和度(例如,培养基的饱和度)之间。二氧化碳的水平在约0和800ppm之间。在某些方面,氨、铵离子和尿素中的至少一种的水平在约10和100微摩尔浓度之间。微量物质的水平在约1和10微摩尔浓度之间。氧的水平在约0%和100%饱和度(例如,培养基的饱和度)之间。二氧化碳的水平在约0和400ppm之间。

[0111] 根据本公开的一些实施方案通过在生长状态期间生成AOB生物质,然后使AOB暴露于多磷酸盐负载状态,然后除去培养基并使AOB再悬浮于缓冲液(例如储存缓冲液)中(即,储存状态)来产生AOB。

[0112] 氨氧化细菌可以保持在“储存状态”下一段时间,例如预定的时间段,例如,至少1、2、3、4、5、6、7天;1、2、3、4周;1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月;1、2、3、4或5年。在一些实

施方案中,氨氧化细菌可以保持在储存状态下至少保持约6个月至约1年。在恢复后,氨氧化细菌的活力是氨氧化细菌在储存之前(例如,在生长状态下)的活力的至少约50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中,可以制备氨氧化细菌的制剂,以使得当在选定的条件下储存时,使 NH_4^+ 氧化的能力损失不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%或70%。

[0113] 使氨氧化细菌从储存状态(或多磷酸盐负载状态)恢复所需要的时间可以是预定的时间段。例如,预定的时间段可以小于约75小时或小于约72小时。预定的时间段可以至少部分基于约0.2-10倍、0.3-5倍、0.5-3倍、0.5-1.5倍或0.5-1倍氨氧化细菌的倍增时间的时间段。预定的时间段可以至少部分基于氨氧化细菌的约1个倍增时间的时间段。预定的时间段可以在约8小时和12小时之间。预定的时间段可以为约10小时。预定的时间段可以小于约75小时、72小时、70小时、68小时、65小时、60小时、55小时、50小时、45小时、40小时、35小时、30小时、25小时、20小时、15小时、10小时、5小时、4小时、3小时、2小时或1小时。预定的时间段可以在约5分钟和5小时之间。预定的时间段可以为约5-10分钟、10-15分钟、15-20分钟、20-25分钟、25-30分钟、30-45分钟、45-60分钟、60分钟-1.5小时、1.5小时-2小时、2小时-2.5小时、2.5小时-3小时、3小时-3.5小时、3.5小时-4小时、4小时-4.5小时、4.5小时-5小时。在一些实施方案中,预定的时间段可以为约2小时。例如,预定的时间段可以是实现氨氧化细菌的复活(例如,实现氨氧化细菌相对于该细菌在储存之前(例如,在生长状态下)的活力的活力,例如,至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或100%活力)可能需要的时间。

[0114] 如本文中所用,“活化”就自养细菌,例如氨氧化细菌而言使用。活化指可以将氨氧化细菌置于潜在更具活性的状态,例如生长状态的任何作用。活化可以指刺激自养细菌,例如氨氧化细菌,从而以某种方式辅助将氨、铵离子、和尿素中的至少一种转化成亚硝酸盐、一氧化氮或一氧化氮前体。活化可以指帮助建立细菌菌落,例如以允许自养细菌,例如氨氧化细菌与其它现有的细菌竞争。活化可以指提供可以有利于自养细菌,例如氨氧化细菌的可持续性和/或生长的环境。活化可以指加速自养细菌,例如氨氧化细菌对环境或表面的利用度。“活化”可以规定氨氧化细菌为“活化”或“生长状态”。可以通过使用活化剂发生“活化”。氨氧化细菌可以接触活化剂以提供“活化”或“生长状态”的氨氧化细菌。这可以在容器、递送装置、或递送系统内或外部,例如第一室、第二室、混合室、第三或附加室或其组合内发生。活化剂可以是氨、铵离子、或尿素中的至少一种。活化剂可以是铵盐,例如氯化铵或硫酸铵。活化剂,例如铵盐,例如氯化铵或硫酸铵的浓度可以在约10微摩尔至约100毫摩尔的范围内。在某些方面,活化剂,例如铵盐,例如氯化铵或硫酸铵的浓度可以在约0.5mM至约50mM的范围内。活化剂可以为溶液、悬浮液、粉末、例如晶体形式,在培养基、缓冲液中,或者布置在适合于维持活化剂的载体中或者作为适合于维持活化剂的载体提供。氨氧化细菌可以为任何适合于以期望的状态,例如储存状态维持AOB的形式,例如水性悬浮液、凝胶或粉末形式。氨、铵离子、或尿素中的至少一种可以在培养基或缓冲液中以促进氨氧化细菌的生长,例如AOB培养基或生长培养基。时间释放或控释尿素可以用作活化剂。

[0115] 如本文中所用,“致动”意指正在采取的某种作用,例如,正在开始的过程或正投入运动的某物。在一些实施方案中,致动可指打破容器的屏障,或开始容器一种或多种内容物的运动,例如将容器的一种或多种内容物递送到容器外,例如递送到表面或环境中。

[0116] 如本文中所用,“屏障”可意指可以用于阻碍通道或保持分离,例如介于容器的第一腔室和第二腔室之间的任何结构或构造。屏障可呈阀门(例如止回阀)、过滤材料、薄膜、蜡、脂质、聚合物或受控释放材料(例如,缓释材料)的形式。屏障可以是在容器致动之后,它可允许内容物从第一腔室通过进入第二腔室,内容物从第二腔室通过进入第一腔室,或两者情况的材料。可以在致动时,例如通过刺破、击穿、刺穿、穿孔、穿透、裂开、打开或撕裂屏障而破坏屏障。屏障可呈阀门(例如止回阀)、与容器的一种或多种内容物接触后无法降解的柔性或非柔性材料,或与容器的一种或多种内容物接触后可降解的柔性或非柔性材料、过滤材料的形式。屏障可由适于其目的的任何材料制成,例如,可用于阻碍通道或保持分离的材料,例如,聚合材料或金属材料。

[0117] “微生物群系(microbiome)”指群体,例如生活于受试者表面上,例如在受试者的肠、口腔、皮肤和/或其它地方中的一种或多种微生物。群体可以具有与支持受试者生命有关的一种或多种有益的功能和/或益处。

[0118] “微生物群系友好的(Biome-friendly)”指可以允许受试者的微生物群系的最小程度破坏的某物,例如产品,例如化妆品产品,例如化妆品成品。例如,微生物群系友好指可以应用于受试者,且可以使应用点处的微生物群系得到维持,在最小程度上破坏,和/或能够在应用产品后的一段时间后返回到微生物群系的产品。在实施方案中,微生物群系友好的可以指氨氧化细菌友好的,因为产品可以允许受试者的氨氧化细菌的最小程度破坏。

[0119] 在实施方案中,“生物群系友好的”可以称为“生物群系相容的”。

[0120] “天然产品”是或可以包含可以至少部分源自自然界的产物。它可以是由活的生物体产生的任何物质或包含由活的生物体产生的任何物质,并且可以包括生物体自身。天然产品可以包括或包含整个生物体以及生物体的部分(例如植物的叶)、来自生物体的提取物、来自生物体的有机化合物、来自生物体的纯化的有机化合物。天然产品可以是或包含发现的有机物质和细胞,包括初级代谢物(氨基酸、碳水化合物和核酸)和次级代谢物(在有限的物种范围中找到的有机化合物,例如聚酮化合物、脂肪酸、萜类化合物、类固醇、苯丙素(phenylpropanoids)、生物碱、特殊氨基酸和多肽、特殊碳水化合物)。天然产品可以是或包含聚合有机材料,如纤维素、木素、和蛋白质。

[0121] 天然产品可以是或包含用于商业目的的产品,并且可以指从天然来源产生的化妆品、饮食补充剂、和食物。天然产品可以具有药理学或生物学活性,其在例如治疗疾病或状况中可以具有治疗益处。可以在传统医学、用于美容学目的的治疗、和矿泉治疗中包括天然产品。本文中提及的天然产品可以包含描述为天然产品的任何一种或多种组分,其要掺入包含一种或多种其它组分,例如赋形剂的制剂或配制剂中。称为天然产品的制剂或配制剂可以包含本文中定义的天然产品和一种或多种另外的组分或成分。在本公开的全文中讨论的组合物、制剂或配制剂中的任一种可以是或包含一种或多种天然产品。

[0122] 在一些实施方案中,天然产品或强化的天然产品可以包含下列至少一种:泥、水、食物衍生的产品、植物衍生的产品、提取物、和油。可以在矿泉治疗中使用天然产品或强化的天然产品。

[0123] 在一些实施方案中,天然产品或强化的天然产品可以掺入以下至少一种中:粉末、乳霜、洗剂、围巾、擦洗物、眼膜、面膜、体膜、气雾剂(例如雾)、喷雾、药膏、擦拭物、棒状物、绷带或浸泡物。

[0124] 在一些实施方案中,天然产品或强化的天然产品可以以下列至少一项提供或者可以布置在下列至少一项中布置:婴儿产品,例如,婴儿洗发剂、婴儿润肤露、婴儿油、婴儿粉、婴儿霜;浴用制剂,例如,沐浴油、片剂、浴盐、泡泡浴、浴胶囊;眼妆制剂,例如,眉笔、眼线、眼影、洗眼液、眼部卸妆液、睫毛膏;香料制剂,例如,古龙香水、化妆水、香水、粉末(粉尘和滑石)、香囊;发用制剂,例如,护发素、发胶、直发膏、烫发水、冲洗液、洗发剂、滋补品、敷料、毛发梳理助剂、卷发液;毛发着色制剂,例如,染发剂和颜色、毛发着色剂、染发漂洗剂、染发洗发剂、头发美白用颜色、头发漂白剂;化妆制剂,例如,粉饼、粉底、腿部和身体涂料、唇膏、妆前底霜、胭脂、化妆固定剂;美甲制剂,例如,底漆和底漆、角质层软化剂、指甲霜和指甲乳液、指甲扩展、指甲油、指甲油去除剂;口腔卫生产品,例如,牙粉、漱口水和口气清新剂;浴用香皂和清洁剂、除臭剂、冲洗液、女性卫生除臭剂;剃须制剂,例如,剃须后润肤液、胡须软化剂、滑石粉、剃须前洗剂、剃须膏、剃须皂;护肤制剂,例如,清洗、脱毛、面部及颈部、身体和手部、足部粉末和喷雾、保湿、夜用制剂、粘贴面罩、皮肤清新剂;以及晒黑制剂,例如,凝胶、乳膏和液体和室内晒黑制剂。

[0125] 如本文中所用,“存在”或“水平”可指组分,例如氨氧化细菌、氨、铵离子、尿素、亚硝酸盐或一氧化氮中的任何一种或多种的定性或定量的量。存在或水平可包括零值或缺乏组分的存在。

[0126] 如本文中所用,术语“表面活性剂”包括可降低两种液体之间或液体和固体之间的表面张力或界面张力的化合物。表面活性剂可作为洗涤剂、润湿剂、乳化剂、发泡剂和分散剂。表面活性剂可以包括下列中的一种或多种,单独的或与所列那些的组合,或其它表面活性剂或表面活性剂样化合物:椰油酰胺丙基甜菜碱(ColaTeric COAB)、聚乙烯山梨醇酯(例如,Tween 80)、乙氧基化月桂醇(RhodaSurf 6 NAT)、月桂基醚硫酸钠/月桂基葡糖苷/椰油酰胺丙基甜菜碱(Plantapon 611 L UP)、月桂基醚硫酸钠(例如,RhodaPex ESB 70 NAT)、烷基聚葡糖苷(例如,Plantaren 2000 N UP)、月桂基醚硫酸钠(Plantaren 200)、布朗纳博士的卡斯蒂利亚(Castile)肥皂、布朗纳博士的婴儿肥皂、月桂胺氧化物(ColaLux Lo)、十二烷基硫酸钠(SDS)、聚磺酸酯烷基聚葡糖苷(PolySufanate 160 P)、月桂基硫酸钠(Stepanol-WA Extra K)及其组合。布朗纳博士的卡斯蒂利亚肥皂和婴儿肥皂包含水、有机椰子油、氢氧化钾、有机橄榄油、有机公平交易(fair deal)麻油、有机荷荷巴油、柠檬酸和生育酚。

[0127] 表面活性剂可以包括月桂基葡糖苷羟基丙基磺酸钠(Suga®nate 160NC)、月桂酰胺丙基甜菜碱(Cola®Teric LMB);椰油酰胺丙基羟基磺基甜菜碱(Cocamidopropyl hydroxysultaine) Cola®Teric CBS);椰油酰两性基二乙酸二钠(disodium cocoamphodiacetate) (Cola®Teric CDCX-LV);月桂基葡糖苷羟基丙基磷酸钠(Suga®Fax D12)。

[0128] 表面活性剂可以包括月桂酰甲基羟乙基磺酸钠(sodium lauroyl methyl isethionate) (Iselux®LQ-CLR-SB);甲基椰油酰牛磺酸钠(sodium methyl cocoyl taurate) (Pureact WS Conc.);水(和)月桂酰甲基羟乙基磺酸钠(和)椰油酰胺丙基甜菜碱(和)椰油酰羟乙基磺酸钠(和)甲基油酰牛磺酸钠(Iselux®SFS-SB)。

[0129] 本公开涵盖其它表面活性剂。

[0130] 2. 氨氧化细菌 (AOB)、真养亚硝化单胞菌菌株D23和其它氨氧化细菌

[0131] 自养型氨氧化细菌 (在本文中可以被称为AOBs或AOB) 是如以下文献所记录的专性自养菌: Alan B. Hooper和A. Krummel at al. Alan B. Hooper, Biochemical Basis of Obligate Autotrophy in Nitrosomonas europaea, Journal of Bacteriology, Feb 1969, 第776-779页; Antje Krummel等人, Effect of Organic Matter on Growth and Cell Yield of Ammonia-Oxidizing Bacteria, Arch Microbiol (1982) 133:50-54。这些细菌只从氨氧化为硝酸盐获得所有的代谢能量 (一氧化氮 (NO) 作为其呼吸链中的中间产物) 并且通过固定二氧化碳获得几乎所有的碳。它们不能利用除了一些简单分子外的其它碳源。

[0132] 氨氧化细菌 (AOB) 广泛存在于环境中, 并且在氨、氧和微量金属的存在下将固定二氧化碳和增殖。AOB可以缓慢生长, 并且在AOB可以增殖并使氨减少至无毒水平之前, 毒性水平的氨可能会杀死鱼类和其它生物体。AOB的缓慢生长还可能会延迟AOB在施用于皮肤时所产生的NO和亚硝酸盐的健康效益。

[0133] 向鱼缸、皮肤或加工补充针对该目的而生长和储存的充足的活AOB是理想的。AOB不形成孢子, 因此以高活力储存在干燥状态下是困难的, 且储存在潮湿状态下使它们具有代谢活性。

[0134] 已经研究了在废水处理用AOB的储存期间的硝化能力的衰减, 例如 (Munz G, Lubello C, Oleszkiewicz JA. Modeling the decay of ammonium oxidizing bacteria. Water Res. 2011 Jan; 45 (2) : 557-64. OI: 10.1016/j.watres.2010.09.022.)

[0135] Cassidy等人 (U.S. 5,314,542) 讨论了亚硝化单胞菌的生长、长期储存和活性恢复, 其中他们公开了生长亚硝化单胞菌, 去除有毒废物, 在适当盐度的无菌水中储存长达一年的时间段, 且然后通过添加缓冲液 (CaCO_3) 和200ppm铵复活, 所述复活需要72小时。

[0136] 作为专性自养生物, AOB经由使用能量固定 CO_2 以及还原由氨氧化为亚硝酸盐所生成的等效物来合成蛋白质。生长需要氨、氧、矿物质和二氧化碳。

[0137] 根据K. R. Terry和A. B. Hooper所著的“Polyphosphate and Orthophosphate Content of Nitrosomonas europaea as a Function of Growth”, Journal of Bacteriology, 1970年7月, 第199-206页, 第103卷, 第I期, 亚硝化单胞菌可以以几种代谢状态存在。

[0138] 本公开中涵盖的AOB可以包含相对于野生型AOB的突变。例如, 这些突变可以自发发生, 通过随机诱变引入, 或者通过靶向诱变引入。例如, AOB可以缺乏野生型AOB通常包含的一种或多种基因或调节DNA序列。相对于测序菌株或野生型菌株, AOB也可以包含点突变、取代、插入、缺失、和/或重排。AOB可以是优化的AOB的纯化的制剂。

[0139] 在某些实施方案中, AOB是转基因的。例如, 它可以包含野生型氨氧化细菌缺乏的一种或多种基因或调节DNA序列。更具体地, 氨氧化细菌可以包含例如报告基因、选择标志物、编码酶的基因、或启动子 (包括诱导型启动子或阻抑性启动子)。在一些实施方案中, 将另外的基因或调节DNA序列整合到细菌染色体中; 在一些实施方案中, 另外的基因或调节DNA序列位于质粒上。

[0140] 在一些实施方案中, AOB与天然存在的细菌的不同之处在于至少一个核苷酸。例如, AOB可以与天然存在的细菌在基因或蛋白质上不同, 所述基因或蛋白质是相关途径, 例

如氨代谢途径、尿素代谢途径、或用于产生一氧化氮或一氧化氮前体的途径的一部分。更具体地,AOB可以包含提高途径活性的突变,例如通过提高所述途径的元件的水平的活性实现。

[0141] 可以使用任何合适的技术引入上文提及的突变。用于将突变引入给定位置中的多种方法是已知的。例如,可以使用定点诱变、寡核苷酸指导的诱变、或位点特异性诱变。特异性诱变方案的非限制性实例记载于例如Mutagenesis,第13.1-13.105页(Sambrook and Russell编,Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3卷,第3增补版2001)。另外,可购自商业售主的充分表征的诱变方案的非限制性实例包括但不限于Altered Sites.RTM.II体外诱变系统(Promega Corp.,Madison,Wis.);Erase-a-Base.RTM.系统(Promega,Madison,Wis.);GeneTailor.TM.定点诱变系统(Invitrogen,Inc.,Carlsbad,Calif.);QuikChange.RTM.II定点诱变试剂盒(Stratagene,La Jolla,Calif.);和Transformer.TM.定点诱变试剂盒(BD-Clontech,Mountain View,Calif.)。

[0142] 在本公开的某些实施方案中,所述氨氧化细菌可以是纯性的。氨氧化细菌的制剂(配制剂或组合物)可以包含纯性氨氧化细菌、基本上由纯性氨氧化细菌组成或由纯性氨氧化细菌组成。

[0143] 本公开的氨氧化细菌可以来自选自由亚硝化单胞菌属、亚硝化球菌属、亚硝化螺菌属、亚硝化囊菌属、亚硝化叶菌属、亚硝化弧菌属和其组合所组成的组的属。

[0144] 本公开尤其提供了真养亚硝化单胞菌菌株D23,一种独特的(例如,优化的)氨氧化细菌菌株,其可以增加一氧化氮和一氧化氮前体在受试者(例如,人类受试者)的表面上产生。本公开还提供了使用所述细菌的方法和包含所述细菌的制品。

[0145] 在实施方案中,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌是非天然存在的。例如,它可能已经在选择期间积累理想的突变。在其它实施方案中,理想的突变可以由实验者引入。在一些实施方案中,真养亚硝化单胞菌可以是纯化的制剂,并且可以是优化的真养亚硝化单胞菌。

[0146] 在优选的实施方案中,真养亚硝化单胞菌菌株是自养的且因此不会引起感染。优选的菌株利用尿素以及氨,所以汗水中的尿素在被所述细菌吸收和利用之前不需要水解。另外,为了在低pH下生长,所述细菌可以吸收 NH_4^+ 离子或尿素。选定的菌株还应该能够在受试者(例如,人类)的外部皮肤上生存并且耐受该处的条件。

[0147] 尽管本公开详细地涉及真养亚硝化单胞菌菌株D23,但所述制剂、方法、组合物、治疗方法、可穿戴制品和服装制品可以与下列中的一个或多个一起使用:真养亚硝化单胞菌的一个或多个其它菌株、亚硝化单胞菌属的一个或多个其它物种以及一种或多种其它氨氧化细菌。

[0148] 在某些实施方案中,真养亚硝化单胞菌是在登录号PTA-121157下于2014年4月8日保藏于美国组织培养保藏中心(American Tissue Culture Collection,ATCC)的菌株,称为AOB D23-100(25个小瓶)。D23真养亚硝化单胞菌菌株指具有登录号PTA-121157的在2014年4月8日保藏于美国组织培养保藏中心(ATCC)(10801 University Blvd.,Manassas,VA,USA)的菌株,称为AOB D23-100。登录号PTA-121157的核酸序列,例如基因组序列在此通过引用完整并入。在某些实施方案中,真养亚硝化单胞菌是2015年4月15日提交的PCT申请号PCT/US2015/025909(其通过引用完整并入本文)中描述的菌株。

[0149] 在某些实施方案中,具有上述序列特征的细菌具有下列中的一个或多个:(1)由倍增时间测得的优化的生长速率;(2)由OD600测得的优化的生长速率;(3)优化的 NH_4^+ 氧化速率;(4)优化的 NH_4^+ 抗性;和(4)优化的 NO_2^- 抗性。在以下段落中详细说明了这些特性的特定子组合。

[0150] 在一些实施方案中,氨氧化细菌,例如本文所描述的真养亚硝化单胞菌具有下列中的一个或多个:(1)由倍增时间测得的优化的生长速率;(2)由OD600测得的优化的生长速率;(3)优化的 NH_4^+ 氧化速率;(4)优化的 NH_4^+ 抗性;和(4)优化的 NO_2^- 抗性。例如,该细菌可以具有在本段的开头所列出的特性(1)和(2);(2)和(3);(3)和(4);或(4)和(5)。作为另一个实例,该细菌可以具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)和(3);(1)、(2)和(4);(1)、(2)和(5);(1)、(3)和(4);(1)、(3)和(5);(1)、(4)和(5);(2)、(3)和(4);(2)、(3)和(5);或(3)、(4)和(5)。作为进一步的实例,该细菌可以具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)、(3)和(4);(1)、(2)、(3)和(5);(1)、(2)、(4)和(5);(1)、(3)、(4)和(5);或(2)、(3)、(4)和(5)。在一些实施方案中,该细菌具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)、(3)、(4)和(5)。

[0151] 本公开还提供了氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌的纯性组合物,其具有下列中的一个或多个:(1)由倍增时间测得的优化的生长速率;(2)由OD600测得的优化的生长速率;(3)优化的 NH_4^+ 氧化速率;(4)优化的 NH_4^+ 抗性;和(4)优化的 NO_2^- 抗性。例如,细菌组合物可以具有在本段的开头所列出的特性(1)和(2);(2)和(3);(3)和(4);或(4)和(5)。作为另一个实例,细菌组合物可以具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)和(3);(1)、(2)和(4);(1)、(2)和(5);(1)、(3)和(4);(1)、(3)和(5);(1)、(4)和(5);(2)、(3)和(4);(2)、(3)和(5);或(3)、(4)和(5)。作为进一步的实例,细菌组合物可以具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)、(3)和(4);(1)、(2)、(3)和(5);(1)、(2)、(4)和(5);(1)、(3)、(4)和(5);或(2)、(3)、(4)和(5)。在一些实施方案中,细菌组合物具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)、(3)、(4)和(5)。

[0152] 在2014年4月8日以25个小瓶的形式保藏于ATCC专利保藏所,被命名为A0B D23-100,且登录号为PTA-121157的真养亚硝化单胞菌菌株D23包含具有SEQ ID NO:1或其互补物的环状基因组。因此,在一些实施方案中,本文所述的真养亚硝化单胞菌菌株包含类似于2015年4月15日提交的PCT申请号PCT/US2015/025909的SEQ ID NO:1或其互补物的核酸序列,例如基因组。

[0153] 在某些实施方案中,真养亚硝化单胞菌菌株包含与2015年4月15日提交的PCT申请号PCT/US2015/025909的SEQ ID NO:1或与D23菌株(在2014年4月8日以25个小瓶的形式保藏于ATCC专利保藏所,命名为A0B D23-100,登录号为PTA-121157)的基因组或其补体在本文所述的低严格度、中等严格度、高严格度或极高严格度或其它杂交条件下杂交的核酸序列,例如基因组。

[0154] 如本文中所使用,术语“在低严格度、中等严格度、高严格度或极高严格度条件下杂交”描述用于杂交和洗涤的条件。用于进行杂交反应的指导可以见于Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中,这些文献通过引用并入。该参考文献中描述了水性方法和非水性方法,并且可以使用其中的任一种。本文所提及的具体杂交条件如下:1)低严格度杂交条件:在约45℃下的6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,随后在至少50℃下,在0.2X SSC、0.1% SDS中洗涤两次(在低严格度条件下,洗涤液的温

度可以提高到55℃);2)中等严格度杂交条件:在约45℃下的6X SSC中,随后在60℃下在0.2X SSC、0.1%SDS中洗涤一次或多次;3)高严格度杂交条件:在约45℃下的6X SSC中,随后在65℃下在0.2X SSC、0.1%SDS中洗涤一次或多次;4)极高严格度杂交条件为0.5M磷酸钠,7%SDS,在65℃下,随后在65℃下在0.2X SSC、1%SDS中洗涤一次或多次。除非另有说明,否则极高严格度条件(4)是合适的条件和应该使用的条件。

[0155] D23菌株不被认为是自然的产物,而是在实验室的长时间的培养和选择期间已经获得某些突变和特征。例如,D23具有在大于约200或250mM NH_4^+ 的条件下生长超过24小时的能力。

[0156] 在一些实施方案中,本文所公开的真养亚硝化单胞菌与天然存在的细菌的不同之处在于铁载体的丰度。例如,真养亚硝化单胞菌相比于真养亚硝化单胞菌C91可以具有升高或降低的铁载体水平。通常,铁载体是分泌的铁螯合化合物,其帮助细菌从其环境中清除铁。一些铁载体是肽,且其它是有机小分子。

[0157] AOB(例如,在本公开中预期的真养亚硝化单胞菌)可以包含相对于野生型真养亚硝化单胞菌和/或本文所公开的真养亚硝化单胞菌序列的突变。这些突变可以例如自然发生、由随机诱变引入或由定点诱变引入。例如,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌可以缺少野生型真养亚硝化单胞菌通常包含的一个或多个基因或调控DNA序列。氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌还可以包含相对于测序菌株或野生型菌株的点突变、替代、插入、缺失和/或重排。氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌可以是优化的氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌的纯化制剂。

[0158] 在某些实施方案中,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌是转基因的。例如,它可以包含野生型真养亚硝化单胞菌D23缺少的一个或多个基因或调控DNA序列。更具体地说,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌可以包含例如报告基因、选择标记、编码酶的基因或启动子(包括诱导型启动子或阻抑型启动子)。在一些实施方案中,额外的基因或调控DNA序列被整合到细菌染色体;在一些实施方案中,额外的基因或调控DNA序列位于质粒(例如,与真养亚硝化单胞菌N91中发现的质粒有关的质粒)上。

[0159] 在一些优选的实施方案中,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌与天然存在的细菌的不同之处在于至少一种核苷酸。例如,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌与天然存在的细菌的不同之处可以在于作为相关途径(例如,氨代谢途径、尿素代谢途径或用于产生一氧化氮或一氧化氮前体的途径)的一部分的基因或蛋白质。更具体地说,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌可以包含提升所述途径的活性(例如,通过提高该途径的要素的水平或活性)的突变。

[0160] 上述突变可以使用任何合适的技术来引入。用于将突变引入给定位置中的许多方法是已知的。例如,可以使用定点诱变、寡核苷酸定向诱变或位点特异性诱变。具体诱变方案的非限制性实例描述于例如Mutagenesis,13.1-13.105页(Sambrook和Russell编辑,Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3卷,第3增补版,2001)中。此外,可从商业供应商得到的充分表征的诱变方案的非限制性实例包括但不限于:Altered Sites.RTM.II体外诱变系统(Promega Corp.,Madison,Wis.);Erase-a-Base.RTM.系统(Promega,Madison,Wis.);GeneTailor.TM.定点诱变系统(Invitrogen,Inc.,Carlsbad,Calif.);QuikChange.RTM.II定点诱变试剂盒(Stratagene,La Jolla,Calif.);以及

Transformer.TM. 定点诱变试剂盒 (BD-Clontech, Mountain View, Calif.)。

[0161] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌的制剂可以包含一定浓度或量的氨氧化细菌以至少部分治疗病症或疾病。氨氧化细菌的制剂可以包含一定浓度或量的氨氧化细菌, 以改变 (例如, 减少或增加) 表面 (例如, 皮肤表面) 上的细菌或细菌属的量、浓度或比例。所述细菌可以是非致病性的或致病性的, 或潜在致病性的。

[0162] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌的制剂可以包含约 10^8 至约 10^{14} CFU/L。所述制剂可以包含至少 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 2×10^{11} , 5×10^{11} , 10^{12} , 2×10^{12} , 5×10^{12} , 10^{13} , 2×10^{13} , 5×10^{13} 或 10^{14} ; 或约 10^8 - 10^9 , 10^9 - 10^{10} , 10^{10} - 10^{11} , 10^{11} - 10^{12} , 10^{12} - 10^{13} 或 10^{13} - 10^{14} CFU/L。

[0163] 在某些方面, 所述制剂可以包含约 1×10^9 CFU/L 至约 10×10^9 CFU/L。在某些方面, 所述制剂可以包含约 1×10^9 CFU 至约 10×10^9 CFU。在某些方面, 所述制剂可以包含约 1×10^9 CFU/mL- 10×10^9 CFU/mL。在某些方面, 所述制剂可以包含约 1×10^9 CFU/mL。

[0164] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌的制剂可以包含约 0.1 毫克 (mg) 至约 1000mg 氨氧化细菌。在某些方面, 所述制剂可以包含约 50mg 至约 1000mg 氨氧化细菌。所述制剂可以包含约 0.1-0.5mg、0.2-0.7mg、0.5-1.0mg、0.5-2mg、0.5-5mg、2.5-5mg、2.5-7.0mg、5.0-10mg、7.5-15mg、10-15mg、15-20mg、15-25mg、20-30mg、25-50mg、25-75mg、50-75mg、50-100mg、75-100mg、100-200mg、200-300mg、300-400mg、400-500mg、500-600mg、600-700mg、700-800mg、800-900mg、900-1000mg、100-250mg、250-500mg、100-500mg、500-750mg、750-1000mg 或 500-1000mg。

[0165] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌的制剂可以包含在约 0.1 克/升至约 1 克/升的范围内的氨氧化细菌对赋形剂 (例如, 药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂) 的质量比。所述制剂可以包含在约 0.1-0.2、0.2-0.3、0.1-0.5、0.2-0.7、0.5-1.0 或 0.7-1.0 克/升的范围内的氨氧化细菌对赋形剂的质量比。

[0166] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌制剂可以包含与氨 (例如约 0.01mM 至约 100mM 的氨浓度) 组合的具有如本文中所述的剂量的氨氧化细菌。例如, 氨浓度可以是约 0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.5、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.5、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、45.0、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0、90.0、95.0、100.0mM。

[0167] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌制剂可以包含水性缓冲溶液中的氨氧化细菌, 基本上由水性缓冲溶液中的氨氧化细菌组成, 或者由水性缓冲溶液中的氨氧化细菌组成, 所述水性缓冲溶液包含磷酸氢二钠和氯化镁, 基本上由磷酸氢二钠和氯化镁组成, 或者由磷酸氢二钠和氯化镁组成, 例如 50mM Na_2HPO_4 和 2mM MgCl_2 。在某些方面, 制剂可以包含水中的约 1×10^9 CFU/mL、50mM Na_2HPO_4 和 2mM MgCl_2 。

[0168] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌制剂可以包含提供氨氧化细菌的预活化的组分。例如, 预活化可以涉及具有制剂, 所述制剂具有氨氧化细菌和氨。

[0169] 在一些实施方案中, 氨氧化细菌制剂可以为在递送到受试者后提供活化, 例如共活化的形式。这会在递送氨氧化细菌前或同时提供氨氧化细菌对受试者上存在的利用性氨的递送。例如, 氨可以源自受试者自身的氨源, 或者在氨氧化细菌前或同时应用。氨可以在分开的容器中提供或者可以天然源自受试者。

[0170] 制剂可以包含约0.1-约100液体盎司、约0.2-约50液体盎司、约0.5-约25液体盎司、约1.0-约10液体盎司、约2.0-约7液体盎司、约3-约5液体盎司的体积。在一些实施方案中,制剂可以包含约3.4液体盎司的体积。

[0171] 可以在容器中提供制剂,所述容器构建为含有约0.1-约100液体盎司、约0.2-约50液体盎司、约0.5-约25液体盎司、约1.0-约10液体盎司、约2.0-约7液体盎司、约3-约5液体盎司的体积。在一些实施方案中,制剂是构建为含有约3.4液体盎司的容器。容器可以是一室容器,或者本文中公开的任何其它容器。

[0172] 在一些实施方案中,氨氧化细菌的制剂可以处于生长状态。生长状态可以通过使氨氧化细菌暴露于可以促进生长的环境来提供。生长状态可以是例如氨氧化细菌处于允许氨氧化细菌能够即时将铵离子(NH_4^+)转化为亚硝酸盐(NO_2^-)的环境中的状态。生长状态可以包括在具有大于约7.6的pH的环境中提供氨氧化细菌。生长状态还可以包括在如在以上部分1中所述的具有氨、铵盐和/或尿素、微量矿物质以及充足的氧和二氧化碳的环境中提供氨氧化细菌。

[0173] 在一些实施方案中,氨氧化细菌的制剂可以处于多磷酸盐负载状态,其中所述状态或环境(例如介质,例如培养基,例如生长培养基)可以具有小于约的7.4的pH。氨、铵离子和尿素中的至少一种的水平可以在约10微摩尔浓度和200毫摩尔浓度之间。微量物质的水平可以在0.1微摩尔浓度的铁和20微摩尔浓度的铁之间。氧的水平可以在约5%和100%氧饱和度之间。二氧化碳的水平可以介于/小于约0和200ppm之间,且磷酸盐水平大于约10微摩尔浓度。多磷酸盐负载状态的目的是向AOB提供氨和氧,以使得可以产生ATP,但不向AOB提供二氧化碳和碳酸盐,以使得它们无法使用该ATP固定二氧化碳,而是使用该ATP来生成可以储存的多磷酸盐。

[0174] 在一些实施方案中,氨氧化细菌的制剂可以处于储存状态。储存状态可以被定义为氨氧化细菌处于它们可以被储存至稍后恢复的环境中。储存状态可以是例如氨氧化细菌处于允许氨氧化细菌在复活后(例如,在放置于促进生长状态的环境中预定的时间段后)可用的环境中的状态。

[0175] 储存状态可以包括在具有小于约7.4的pH的环境中提供氨氧化细菌。储存状态还可以包括在如在以上部分1中所述的具有氨、氨盐和/或尿素、微量矿物质、氧和低浓度二氧化碳的环境中提供氨氧化细菌。

[0176] 储存还可以通过在4℃下储存最多几个月来完成。储存缓冲液在一些实施方案中可以包含50mM Na_2HPO_4 -2mM MgCl_2 (pH 7.6)。

[0177] 在一些实施方案中,氨氧化细菌可以低温保存。可以将1.25ml氨氧化细菌对数中期培养物添加到2ml的冻存管和0.75ml无菌的80%甘油中。管可以轻轻振荡,并在室温下培养15分钟,以允许细胞吸收冷冻保护剂。可以将所述管直接储存在-80℃冷冻器中用于冷冻和储存。

[0178] 对于培养物的复苏,可以使冷冻原液在冰上解冻10到20分钟,然后在4℃下,在8000x g下离心3分钟。球团可以通过将它悬浮在2ml AOB培养基中进行洗涤,随后在4℃下,在8000x g下再离心3分钟,以降低冷冻保护剂的潜在毒性。可以使所述球团再悬浮于2ml AOB培养基中,接种到含50mM NH_4^+ 的50ml AOB培养基中,并通过在200rpm下振荡,在30℃的黑暗环境中培养。

[0179] 在一些实施方案中,氨氧化细菌的制剂可以包括在储存状态下的氨氧化细菌和/或在多磷酸盐负载状态下的氨氧化细菌和/或在生长状态下的氨氧化细菌。

[0180] 不希望受理论的束缚,通过将氨氧化细菌保持在具有低二氧化碳以及足够的氧和氨的条件下或环境中,它们可以积累多磷酸盐达预定的时期,例如,约一个倍增时间的时期,例如约8-12小时,例如约10小时。氨氧化细菌可以积累足够的多磷酸盐以延长其储存活力、储存时间,并加快其复活。这可以在添加或不添加缓冲液和氨的情况下发生。

[0181] 存在储存充足的多磷酸盐可以允许氨氧化细菌(ATP资源)在甚至不存在氨和氧的情况下维持代谢活性,并在原本将会致命的攻击下存活。

[0182] 氨氧化产生ATP的过程具有两个步骤。第一步是通过氨单加氧酶(Amo)使氨氧化为羟胺,然后通过羟胺氧化还原酶(Hao)使羟胺转化为亚硝酸盐。来自第二步(羟胺转化为亚硝酸盐)的电子被用来驱动第一步(氨氧化为羟胺)。

[0183] 如果氨氧化细菌不具有羟胺来生成用于Amo的电子,则羟胺不可用于Hao。例如,乙炔不可逆地抑制对于氨氧化为亚硝酸盐中的第一步(氨氧化为羟胺)而言关键的酶。一旦AOB暴露于乙炔,Amo即被不可逆地抑制,并且在可以产生羟胺之前必须合成新的酶。在正常的聚生体生物膜栖息地,AOB可以分享和接收来自其它AOB(甚至是对抑制剂具有不同易感性的不同菌株)的羟胺,因此生物膜趋于比单个生物体对抑制剂如乙炔更具抗性。AOB可以使用储存的多磷酸盐来合成新的Amo,即使在没有羟胺的情况下。

[0184] 本文所讨论的氨氧化细菌的任何实施方案、制剂、组合物或配制剂可以包含任选纯性的氨氧化细菌、基本上由任选纯性的氨氧化细菌组成或由任选纯性的氨氧化细菌组成。

[0185] 3. 包含氨氧化细菌的组合物;包含真养亚硝化单胞菌,例如D23真养亚硝化单胞菌的组合物

[0186] 本公开尤其提供了包含氨氧化细菌的组合物,例如,氨氧化细菌的制剂或氨氧化细菌的纯化制剂,例如,天然产品或强化的天然产品。

[0187] 可以提供贯穿本公开的本文中公开的组合物以用于治疗皮肤病况,例如痤疮,例如寻常痤疮。

[0188] 可以在美容产品或治疗产品中提供包含氨氧化细菌的组合物,例如,氨氧化细菌的制剂或氨氧化细菌的纯化制剂。所述制剂可以包含尤其是氨、铵盐和尿素中的至少一种。氨氧化细菌可以是任何氨氧化细菌,或氨氧化细菌的组合,如本文中公开。

[0189] 本公开尤其提供了包含真养亚硝化单胞菌的组合物,例如优化的真养亚硝化单胞菌的纯化制剂。在一些实施方案中,所述组合物中的真养亚硝化单胞菌具有选自优化的生长速率、优化的 NH_4^+ 氧化速率和优化的 NH_4^+ 抗性的至少一种特性。

[0190] 在一些方面,本公开提供了具有限定数量的物种的组合物。例如,本公开提供具有真养亚硝化单胞菌和另一种类型的生物体且没有其它类型的生物体的组合物。在其它实例中,所述组合物具有真养亚硝化单胞菌和2、3、4、5、6、7、8、9或10种其它类型的生物体,并且不含其它类型的生物体。该组合物中的其它类型的生物体可以是例如细菌,如氨氧化细菌。适用于此目的的氨氧化细菌包括亚硝化单胞菌属、亚硝化球菌属、亚硝化螺菌属、亚硝化囊菌属、亚硝化叶菌属或亚硝化弧菌属中的氨氧化细菌。

[0191] 在一些实施方案中,包含氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌的组合物提供支持

氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌活力的条件。例如,所述组合物可以促进氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌生长和代谢,或者可以促进休眠状态(例如,冷冻),活的氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌可以从所述休眠状态恢复。当所述组合物促进生长或代谢时,其可以包含水和/或氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌消耗的营养物,例如铵、氨、尿素、氧、二氧化碳或微量矿物质。

[0192] 在一些实施方案中,在氨氧化细菌的制剂中可以包括除了氨氧化细菌以外的一种或多种其它生物体。例如,可以在氨氧化细菌的制剂中提供选自由乳酸杆菌属、链球菌属、双歧杆菌属及其组合所组成的组的属的生物体。在一些实施方案中,所述制剂可以基本上不含其它生物体。

[0193] 氨氧化细菌的制剂可以包含约 10^8 CFU/L至约 10^{14} CFU/L。所述制剂可以包含至少 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 2×10^{11} 、 5×10^{11} 、 10^{12} 、 2×10^{12} 、 5×10^{12} 、 10^{13} 、 2×10^{13} 、 5×10^{13} 或 10^{14} ;或约 10^8 – 10^9 、 10^9 – 10^{10} 、 10^{10} – 10^{11} 、 10^{11} – 10^{12} 、 10^{12} – 10^{13} 或 10^{13} – 10^{14} CFU/L。其它制剂可以包含约 2×10^9 、 4×10^9 或 8×10^9 CFU/L。

[0194] 氨氧化细菌的制剂可以包含约 10^8 –约 10^{14} CFU/ml。制剂可以包含至少约 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 2×10^{11} 、 5×10^{11} 、 10^{12} 、 2×10^{12} 、 5×10^{12} 、 10^{13} 、 2×10^{13} 、 5×10^{13} 或 10^{14} ;或约 10^8 – 10^9 、 10^9 – 10^{10} 、 10^{10} – 10^{11} 、 10^{11} – 10^{12} 、 10^{12} – 10^{13} 或 10^{13} – 10^{14} CFU/ml。其它制剂可以包含约 2×10^9 、 4×10^9 、或 8×10^9 CFU/mL。

[0195] 在一些实施方案中,所述制剂可以包含约 1×10^9 CFU/L至约 10×10^9 CFU/L。在一些实施方案中,所述制剂可以包含约 3×10^{10} CFU,例如 3×10^{10} CFU/天。在一些实施方案中,所述制剂可以包含约 1×10^9 至约 10×10^9 CFU,例如约 1×10^9 至约 10×10^9 CFU/天。

[0196] 在一些实施方案中,氨氧化细菌的制剂可以包含约0.1毫克(mg)至约1000mg氨氧化细菌。在某些方面,所述制剂可以包含约50mg至约1000mg氨氧化细菌。所述制剂可以包含约0.1–0.5mg、0.2–0.7mg、0.5–1.0mg、0.5–2mg、0.5–5mg、2.5–5mg、2.5–7.0mg、5.0–10mg、7.5–15mg、10–15mg、15–20mg、15–25mg、20–30mg、25–50mg、25–75mg、50–75mg、50–100mg、75–100mg、100–200mg、200–300mg、300–400mg、400–500mg、500–600mg、600–700mg、700–800mg、800–900mg、900–1000mg、100–250mg、250–500mg、100–500mg、500–750mg、750–1000mg或500–1000mg。

[0197] 在一些实施方案中,氨氧化细菌的制剂可以包含在约0.1克/升至约1克/升的范围内的氨氧化细菌对赋形剂(例如,药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂)的质量比。所述制剂可以包含在约0.1–0.2、0.2–0.3、0.1–0.5、0.2–0.7、0.5–1.0或0.7–1.0克/升的范围内的氨氧化细菌对赋形剂的质量比。

[0198] 在一些实施方案中,氨氧化细菌制剂可以是水性缓冲溶液中的氨氧化细菌,所述水性缓冲溶液包含磷酸氢二钠和氯化镁,基本上由磷酸氢二钠和氯化镁组成,或由磷酸氢二钠和氯化镁组成,例如50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 。氨氧化细菌可以具有本文中公开的任何浓度,例如 1×10^9 CFU/ml。可以在缓冲液中以例如约0.1–约100液体盎司、约0.2–约50液体盎司、约0.5–约25液体盎司、约1.0–约10液体盎司、约2.0–约7液体盎司、约3–约5液体盎司的体积的预先确定的体积提供制剂。在一些实施方案中,可以在容器中提供制剂。可以在构建为含有约3.4液体盎司或本文中公开的任何其它体积的容器中提供制剂。制剂可以为可以能够被气雾化、喷雾或雾化的形式,即雾形式,例如在A0+喷雾产品中。

[0199] 有利地,配制剂可以具有促进AOB(例如,真养亚硝化单胞菌)活力(例如,代谢活性)的pH。尿素将水解为氨并且将使pH提高到7至8。AOB在该pH范围下极具活性并且将使pH降低至约6,在此pH下NH₃转化为铵并且不可利用。较低的pH水平(例如,约pH4)也是可接受的。

[0200] 氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)可以与一种或多种药学上或美容上可接受的赋形剂组合。在一些实施方案中,“药学上可接受的赋形剂”是指药学上可接受的物质、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或封装材料。在一些实施方案中,每种赋形剂从与药物制剂的其它成分相容的意义上说是“药学上可接受的”,并且适用于接触人类和动物的组织或器官,而没有过度的毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或合理的效益/风险比相称的其它问题或并发症。参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版;Lippincott Williams&Wilkins:Philadelphia,Pa.,2005;Handbook of Pharmaceutical Excipients,第6版;Rowe等人编辑;The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association:2009;Handbook of Pharmaceutical Additives,第3版;Ash和Ash编辑;Gower Publishing Company:2007;Pharmaceutical Preformulation and Formulation,第2版;Gibson编辑;CRC Press LLC:Boca Raton, Fla.,2009。

[0201] 在一些实施方案中,美容上可接受的赋形剂是指美容上可接受的物质、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或封装材料。在一些实施方案中,每种赋形剂从与美容制剂的其它成分相容的意义上说是美容上可接受的,并且适用于接触人类和动物的组织或器官,而没有过度的毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或合理的效益/风险比相称的其它问题或并发症。

[0202] 虽然活性成分(例如,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌)可以单独施用,但在许多实施方案中,其存在于药物制剂或组合物中。因此,本公开提供一种药物配制剂(制剂或组合物)或化妆配制剂(制剂或组合物),其包含氨氧化细菌,以及药学上可接受的赋形剂或化妆上可接受的赋形剂。药物组合物和化妆组合物可以采用如下所述的配制剂的形式。

[0203] 本文所述的药物和化妆配制剂(制剂或组合物)可以包括那些适用于口服(通过在胃肠道中沉积或者为了在胃肠道中沉积)、肠胃外(包括皮下、皮内、肌内、静脉内和关节内)、吸入(包括可以通过各种类型的定量加压气雾剂、喷雾器或吹入器产生的细颗粒粉剂或细雾,并且包括鼻内(鼻)或经肺(肺))、直肠和局部(包括皮肤、经皮、经粘膜、口腔、舌下和眼内)施用的药物制剂,但最合适的途径可以取决于例如接受者的状况和病症。

[0204] 配制剂(制剂或组合物)可以方便地以单位剂型呈现,并且可以通过药学或美容学领域中已知的任何方法来制备。通常,方法包括使活性成分(例如,氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌)与组成一种或多种辅助成分的药物或化妆品载体缔合的步骤。通常,配制剂是通过使活性成分与液体载体或微细固体载体或两者均匀和紧密地缔合且然后在必要时使产品成型为所需制剂来制备。

[0205] 配制剂可以呈现为离散单位如胶囊剂、扁囊剂或片剂,每个单位包含预定量的例如真养亚硝化单胞菌;呈现为散剂或颗粒剂;呈现为在水性液体或非水性液体中的溶液剂或混悬剂;或呈现为水包油液体乳剂或油包水液体乳剂。活性成分还可以呈现为大丸剂、药糖剂或糊剂。各种药学上可接受的载体和它们的制剂描述于标准配制论文例如E.W.Martin

所著的Remington's Pharmaceutical Sciences中。还参见Wang,Y.J.and Hanson,M.A., Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No.10, Supp.42: 2S, 1988。

[0206] 氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)组合物可以例如以适于立即释放或长期释放的形式来施用。合适的缓释系统的实例包括合适的聚合物材料,例如呈成形制品的形式(例如,薄膜或微胶囊)的半渗透性聚合物基质;合适的疏水性材料,例如作为在可接受的油中的乳剂;或离子交换树脂。缓释系统的施用方式可以为:口服;经直肠;肠胃外;脑池内;阴道内;腹膜内;局部,例如作为粉末、软膏、凝胶、滴剂或透皮贴剂;口腔;或作为喷雾剂。

[0207] 可以适当地配制用于施用的制剂以提供氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)的控制释放。例如,药物组合物可以为包含生物可降解聚合物、多糖胶凝和/或生物粘附聚合物或两亲性聚合物中的一个或多个的颗粒的形式。这些组合物表现出允许活性物质的控制释放的某些生物相容性特征。参见美国专利第5,700,486号。

[0208] 示例性组合物包括混悬液,其可以含有例如用于赋予体积的微晶纤维素、藻酸或作为悬浮剂的藻酸钠、作为增粘剂的甲基纤维素、磷酸二钙、淀粉、硬脂酸镁和/或乳糖和/或其它赋形剂、粘合剂、增量剂、崩解剂、稀释剂和润滑剂、甘露醇、乳糖蔗糖和/或环糊精。此类制剂中还可以包括高分子量赋形剂如纤维素(微晶纤维素(avicel))或聚乙二醇(PEG)。此类制剂还可以包括用于辅助粘膜粘附的赋形剂,如羟丙基纤维素(HPC)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羧甲基纤维素钠(SCMC)、马来酸酐共聚物(例如,Gantrez),以及用于控制释放的试剂如聚丙烯酸类共聚物(例如,Carbopol 934)。还可以添加润滑剂、助流剂、香料、着色剂和稳定剂以便于制造和使用。表面活性剂可以是两性离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂或阴离子型表面活性剂。

[0209] 可以用于本公开的实施方案的赋形剂如表面活性剂可以包括下列中的一个或多个:椰油酰胺丙基甜菜碱(ColaTeric COAB)、聚山梨醇酯(例如,Tween 80)、乙氧基化月桂醇(RhodaSurf 6 NAT)、月桂基醚硫酸钠/月桂基葡萄糖苷/椰油酰胺丙基甜菜碱(Plantapon 611 L UP)、月桂基醚硫酸钠(例如,RhodaPex ESB 70 NAT)、烷基聚葡萄糖苷(例如,Plantaren 2000 N UP)、月桂基醚硫酸钠(Plantaren 200)、布朗纳博士的卡斯蒂利亚肥皂、布朗纳博士的婴儿肥皂、月桂胺氧化物(ColaLux Lo)、十二烷基硫酸钠(SDS)、聚磺酸酯烷基聚葡萄糖苷(PolySufanate 160 P)、月桂基硫酸钠(Stepanol-WA Extra K)及其组合。布朗纳博士的卡斯蒂利亚肥皂和布朗纳博士的婴儿肥皂包含水、有机椰子油、氢氧化钾、有机橄榄油、有机公平交易麻油(organic fair deal hemp oil)、有机荷荷巴油、柠檬酸和生育酚。

[0210] 在一些实施方案中,表面活性剂可以以允许亚硝酸盐产生发生的量与氨氧化细菌一起使用。在一些实施方案中,所述制剂可以具有少于约0.0001%至约10%的表面活性剂。在一些实施方案中,所述制剂可以具有约0.1%至约10%的表面活性剂。在一些实施方案中,所用的表面活性剂的浓度可以在约0.0001%至约10%之间。在一些实施方案中,所述制剂可以基本上不含表面活性剂。

[0211] 在一些实施方案中,配制剂例如制剂可以包括可增强氨氧化细菌的有效性,维持或增强氨氧化细菌的存活力,或增强治疗或指示的其它组分。

[0212] 在一些实施方案中,制剂中可以包括螯合剂。螯合剂可以是与另一种化合物

(例如,金属)结合的化合物。螯合剂可以帮助从环境中去除不想要的化合物,或可以以保护方式起到减少或消除特定化合物与环境(例如,氨氧化细菌,例如氨氧化细菌的制剂,例如赋形剂)的接触的作用。在一些实施方案中,所述制剂可以基本上不含螯合剂。

[0213] 配制剂还可以包含抗氧化剂、缓冲剂、防止非所需细菌的生长的制菌剂、溶质以及可以包括悬浮剂和增稠剂的水性和非水性无菌混悬液。配制剂可以呈现在单位剂量或多剂量容器(例如,密封的安瓿和小瓶)中,并且可以储存在仅需要在使用前立即加入无菌液体载体(例如,盐水或注射用水)的冷冻干燥(冻干)条件下。临时性溶液和混悬液可以由先前所描述的种类的粉末、颗粒和片剂制备。示例性组合物包括溶液或混悬液,其可以含有例如合适的无毒的药学上可接受的稀释剂或溶剂,如甘露醇、1,3-丁二醇、水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液,或其它合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂,包括合成的单甘油酯或二甘油酯,以及脂肪酸,包括油酸或Cremaphor。水性载体可以是例如在约3.0至约8.0的pH、约3.5至约7.4(例如3.5至6.0,例如3.5至约5.0)的pH下的等渗缓冲溶液。有用的缓冲剂包括柠檬酸钠-柠檬酸和磷酸钠-磷酸,以及乙酸钠/乙酸缓冲剂。在一些实施方案中,组合物不包括氧化剂。

[0214] 可以包括的赋形剂是例如蛋白质,如人血清白蛋白或血浆制剂。必要时,药物组合物还可以含有少量的无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或山梨糖醇酐单月桂酸酯。在一些实施方案中,赋形剂(例如,药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂)可以包括抗粘附剂、粘合剂、涂层剂、崩解剂、填充剂、调味剂、着色剂、润滑剂、助流剂、吸附剂、防腐剂或甜味剂。在一些实施方案中,所述制剂可以基本上不含赋形剂。

[0215] 在一些实施方案中,配制剂可以基本上不含本公开中所列的化合物或物质中的一种或多种。

[0216] 用于气雾剂施用的示例性组合物包括盐水溶液,其可以含有例如苺醇或其它合适的防腐剂、用于提高生物利用度的吸收促进剂和/或其它增溶剂或分散剂。方便的是,在用于气雾剂施用的组合物中,氨氧化细菌例如真养亚硝化单胞菌以从泵的气雾剂喷雾表现的形式递送。在其它实施方案中,用于氨氧化细菌例如真养亚硝化单胞菌的气雾剂施用的组合物是以从加压包装或喷雾器的气雾剂喷雾表现的形式,使用合适的推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体)来递送。在加压气雾剂的情况下,剂量单位可以通过提供阀以递送计量的量来确定。可以将由例如明胶制成的胶囊和药盒配制成包含真养亚硝化单胞菌和合适的粉末基质(例如,乳糖或淀粉)的粉末混合物。在某些实施方案中,真养亚硝化单胞菌是作为气雾剂,通过气雾剂适配器(又称致动器)从定量阀施用。任选地,还包括稳定剂,且/或包括用于深肺递送的多孔颗粒(例如,参见美国专利第6,447,743号)。组合物或制剂可以为可以能够被气雾剂、喷雾或雾化的形式,即雾形式。氨氧化细菌制剂可以是水性缓冲液中的氨氧化细菌,所述水性缓冲液包含磷酸氢二钠和氯化镁,基本上由磷酸氢二钠和氯化镁组成,或者由磷酸氢二钠和氯化镁组成,例如50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 ,并且在本公开的全文中可以称为A0+喷雾。A0+喷雾制剂包含50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 的水性缓冲溶液中 1×10^9 CFU/mL浓度的氨氧化细菌。

[0217] 配制剂可以与载体如可可脂、合成甘油酯或聚乙二醇一起呈现。此类载体在常温下通常为固体,但在体温下液化和/或溶解以释放氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。

[0218] 用于局部施用的示例性组合物包括局部载体如Plastibase (与聚乙烯一起胶化的矿物油)。在一些方面,所述组合物和/或赋形剂可以是液体、固体或凝胶中的一个或多个的形式。例如,液体混悬剂可以包括但不限于水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、氢氧化储存缓冲液或水性缓冲溶液,其包含例如 Na_2HPO_4 和 MgCl_2 ,例如50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 。

[0219] 凝胶配制剂可以包括但不限于琼脂、二氧化硅、聚丙烯酸(例如Carbopol®)、羧甲基纤维素、淀粉、瓜耳胶、藻酸盐或壳聚糖。

[0220] 在一些实施方案中,配制剂可以补充有氮源,包括但不限于氯化铵或硫酸铵。

[0221] 在一些实施方案中,氢氧化细菌组合物(例如,真养亚硝化单胞菌)组合物被配制来提高NO渗透到皮肤中。凝胶形成材料如KY胶或各种发胶将形成NO损失到环境空气中的扩散障碍,从而提高NO的皮肤吸收。皮肤中的NO水平一般不会大大超过20nM/L,因为该水平激活GC并且将会引起局部血管舒张和过量NO的氧化破坏。

[0222] 应当理解的是,除了上文特别提到的成分,如本文所述的制剂可以包括在涉及所讨论的制剂类型的领域中常用的其它试剂。

[0223] 配制剂(例如,制剂,例如组合物)可以提供在容器、递送系统或递送装置中,所述容器、递送系统或递送装置具有包括或不包括容器的内容物可以小于约50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500或2000克的重量。

[0224] 合适的单位剂量制剂是含有如前文所述的有效剂量或其适当分数的氢氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)的那些单位剂量制剂。

[0225] 治疗有效量的氢氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)可以作为单脉冲剂量、作为单次剂量或作为随时间施用的脉冲剂量来施用。因此,在脉冲剂量中,提供氢氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)的推注施用,在随后的时间段中将氢氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)施用给受试者,接着进行第二推注施用。在具体的非限制性实例中,在一天期间、在一周期间或在一个月期间施用脉冲剂量。

[0226] 可以以气雾剂或雾形式作为单次喷雾或泵,或多次喷雾或泵施用治疗有效量的氢氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。在单次施用中,可以致动一次或多次喷雾或泵。治疗有效量可以是在一天或多天过程期间、在一周或多周过程期间、在一个月或多个月过程,或更长期间的单次施用或多次施用的结果。

[0227] 治疗有效量可以是足以在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52周时改善下列任一项或多项的量:痤疮计数、PIH/PIE损害分级、SkinDex16数据、修改的Griffiths 10点量表、可耐受性评估、皮脂仪测量、和调查人员的全局痤疮(IGA)量表。

[0228] 在一些实施方案中,可以施用氢氧化细菌的制剂(例如,配制剂,例如组合物)预定的天数。这可以至少部分基于例如病症或疾病的严重程度、治疗反应、施用剂量和给药频率。例如,可以施用所述制剂约1-3天、3-5天、5-7天、7-9天、5-10天、10-14天、12-18天、12-21天、21-28天、28-35天、35-42天、42-49天、49-56天、46-63天、63-70天、70-77天、77-84天、84-91天,例如约1个月、约2个月、约3个月。在一些实施方案中,施用氢氧化细菌无限期的时间,例如,大于一年、大于5年、大于10年、大于15年、大于30年、大于50年、大于75年。在某些方面,可以施用制剂约16天。在某些方面,可以将制剂应用约4周。

[0229] 在一些实施方案中,可以每天施用氢氧化细菌的制剂(例如,配制剂,例如组合物)

预定的次数。这可以至少部分基于例如病症或疾病的严重程度、治疗反应、施用剂量和给药频率。例如，可以每天施用所述制剂1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24次。

[0230] 在一些实施方案中，所述制剂可以每天施用一次。在其它实施方案中，所述制剂可以每天施用两次。在一些实施方案中，可以在某几天施用第一预定量的所述制剂，且在随后的某几天施用第二预定量的所述制剂。在一些实施方案中，可以施用所述制剂约16天。

[0231] 消费产品

[0232] 氨氧化细菌（例如，真养亚硝化单胞菌）可以与多种消费产品相关，且此类产品的实例如下所述并且由贯穿本公开内容公开的配制剂、组合物或制剂构成。在一些实施方案中，将与产品相关的氨氧化细菌（例如，真养亚硝化单胞菌）与所述产品混合，例如均匀地散布在整个产品中，并且在一些实施方案中，与产品相关的氨氧化细菌（例如，真养亚硝化单胞菌）层叠在所述产品上。

[0233] 在一些实施方案中，氨氧化细菌（例如，真养亚硝化单胞菌）与粉末相关。粉末通常是小颗粒固体，它们彼此不粘附并且在倾斜时可以自由流动。消费用途的示例性粉末包括滑石粉和一些化妆品（例如，粉底霜）。

[0234] 在一些实施方案中，氨氧化细菌与化妆品相关。化妆品可以是旨在改变个人的外观的供局部施用的物质，例如，粉底液、粉底霜、腮红或唇膏，并且可以成为制剂。化妆品可以是在食品和药物管理法规中例如根据21C.F.R. §720.4所列举的任何物质。

[0235] 制剂，例如化妆品可以是下列中的至少一种：婴儿产品，例如，婴儿洗发剂、婴儿润肤露、婴儿油、婴儿粉、婴儿霜；浴用制剂，例如，沐浴油、片剂、浴盐、泡泡浴、浴胶囊；眼妆制剂，例如，眉笔、眼线、眼影、洗眼液、眼部卸妆液、睫毛膏；香料制剂，例如，古龙香水、化妆水、香水、粉末（粉尘和滑石）、香囊；发用制剂，例如，护发素、发胶、直发膏、烫发水、冲洗液、洗发剂、滋补品、敷料、毛发梳理助剂、卷发液；毛发着色制剂，例如，染发剂和颜色、毛发着色剂、染发漂洗剂、染发洗发剂、头发美白用颜色、头发漂白剂；化妆制剂，例如，粉饼、粉底、腿部和身体涂料、唇膏、妆前底霜、胭脂、化妆固定剂；美甲制剂，例如，底漆和底漆、角质层软化剂、指甲霜和指甲乳液、指甲扩展、指甲油、指甲油去除剂；口腔卫生产品，例如，牙粉、漱口水和口气清新剂；浴用香皂和清洁剂、除臭剂、冲洗液、女性卫生除臭剂；剃须制剂，例如，剃须后润肤液、胡须软化剂、滑石粉、剃须前洗剂、剃须膏、剃须皂；护肤制剂，例如，清洗、脱毛、面部及颈部、身体和手部、足部粉末和喷雾、保湿、夜用制剂、粘贴面罩、皮肤清新剂；以及晒黑制剂，例如，凝胶、乳膏和液体和室内晒黑制剂。

[0236] 在一些实施方案中，本文所述的配制剂、组合物或制剂可以包含下列中的至少一种，作为下列中的至少一种提供，或布置在下列中的至少一种中：婴儿产品，例如，婴儿洗发剂、婴儿润肤露、婴儿油、婴儿粉、婴儿霜；浴用制剂，例如，沐浴油、片剂、浴盐、泡泡浴、浴胶囊；粉末（粉尘和滑石）、香囊；发用制剂，例如，护发素、冲洗液、洗发剂、滋补品；粉饼、角质层软化剂、指甲霜和指甲乳液、口腔卫生产品、漱口水、浴用香皂、冲洗液、女性卫生除臭剂；剃须制剂，例如，剃须后润肤液；护肤制剂，例如，清洗、面部及颈部、身体和手部、足部粉末和喷雾、保湿、夜用制剂、粘贴面罩、皮肤清新剂；以及晒黑制剂，例如，凝胶、乳膏和液体。

[0237] 在一些实施方案中，氨氧化细菌（例如，真养亚硝化单胞菌）与化妆品相关。化妆品可以是旨在改变个人的外观的供局部施用的物质，例如，粉底液、粉底霜、腮红或唇膏。可以

向这些化妆品制剂中添加由化妆品制剂领域的技术人员选择的其它组分,诸如(例如)水、矿物油、着色剂、香料、芦荟、甘油、氯化钠、碳酸氢钠、pH缓冲剂、防紫外线剂、硅油、天然油、维生素E、草药浓缩物、乳酸、柠檬酸、滑石、粘土、碳酸钙、碳酸镁、氧化锌、淀粉、尿素和异抗坏血酸,或本领域技术人员已知的任何其它赋形剂(包括本文中所公开的那些)。

[0238] 在一些实施方案中,所述制剂可以布置在粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、喷雾、药膏、擦拭物或绷带中,或作为这些来提供。

[0239] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与乳霜相关。乳霜可以是包含增稠剂的流体,且一般具有允许其均匀涂敷在皮肤上的稠度。示例性乳霜包括保湿乳液、面霜和润肤霜。

[0240] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与棒状物相关。棒状物通常是当放置成与表面接触时将棒状物内容物的一些转到到表面的固体。示例性棒状物包括除臭棒、唇膏、棒状润唇膏和防晒霜涂抹棒。

[0241] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与气雾剂相关。气雾剂通常是微细固体颗粒或微细液滴在气体如空气中的胶体。气雾剂可以通过将真养亚硝化单胞菌(和任选的载体)放置在处于压力下的容器中且然后打开阀门以释放内容物来产生。所述容器可以被设计为仅施加与真养亚硝化单胞菌活力相容的压力水平。例如,仅可以短时间施加高压,且/或压力可以足够低而不损害活力。气雾剂的消费用途的实例包括用于防晒霜、脱臭剂、香料、发胶和驱虫剂。气雾剂可以称为喷雾。

[0242] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与药膏相关。药膏可以是具有液体或奶油样稠度的局部施用剂,其旨在保护皮肤或促进愈合。药膏的实例包括烧伤膏和润肤液。

[0243] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与擦拭物相关。擦拭物可以是适于将液体或乳霜局部施用至皮肤上的柔性材料。擦拭物可以是例如纸基或布基的。示例性擦拭物包括纸巾和湿巾。

[0244] 包含氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)的组合物还可以包含保湿剂、脱臭剂、香味剂、着色剂、驱虫剂、清洁剂或防紫外线剂中的一种或多种。

[0245] 例如,保湿剂可以是减少或防止皮肤干燥的试剂。示例性的保湿剂包括润湿剂(例如,尿素、甘油、 α -羟基酸和聚二甲基硅氧烷)和润肤剂(例如,羊毛脂、矿物油和矿脂)。保湿剂可以包括在例如含有氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)的乳霜、香脂、洗剂或防晒霜中。

[0246] 脱臭剂可以是减少非所需的气味的试剂。脱臭剂可以通过直接中和气味、防止排汗或防止产生气味的细菌的生长来起作用。示例性的脱臭剂包括铝盐(例如,氯化铝或羟基氯化铝)、环甲硅油、滑石、小苏打、香精油、矿物盐、啤酒花和金缕梅。脱臭剂通常存在于除臭喷雾或除臭棒中,并且还可以发现于一些皂类和服装中。

[0247] 驱虫剂可以是能够被施加至表面(例如,皮肤)以阻止昆虫和其它节肢动物停落在该表面上的试剂。驱虫剂包括DEET(N,N-二乙基-间-甲苯甲酰胺)、对-薄荷烷-3,8-二醇(PMD)、埃卡瑞丁(icaridin)、荆芥内酯(nepetalactone)、香茅油、印楝油、沼泽番石榴、胍基甲酸酯二甲酯、三环癸烯基烯丙醚和IR3535(3-[N-丁基-N-乙酰基]-氨基丙酸乙酯)。

[0248] 清洁剂可以是表面如皮肤去除污物或非所需的细菌的试剂。示例性清洁剂包括

条皂、液体皂和洗发剂。

[0249] 防紫外线剂可以是能够被施加到表面上以减少表面的紫外光接收量的试剂。防紫外线剂可以阻挡UV-A和/或UV-B光线。防紫外线剂可以通过吸收、反射或散射紫外线而起作用。示例性防紫外线剂包括吸收剂,例如,胡莫柳酯(homosalate)、奥替柳酯(octisalate)(又称水杨酸辛酯)、奥西诺酯(octinoxate)(又称甲氧基肉桂酸辛酯或OMC)、奥克立林(octocrylene)、羟苯甲酮和阿伏苯宗(avobenzone);以及反射剂(例如,二氧化钛和氧化锌)。防紫外线剂通常存在于防晒霜中,并且还可以发现于护肤霜和一些化妆品中。

[0250] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与护发素相关。护发素一般是指可以施用于毛发以改善其外观、强度或顺滑性的具有奶油样稠度的物质。

[0251] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与布料相关。布料一般是指适用于制成服装的柔性材料,例如,其具有足够的材料强度来承受穿着者的日常运动。布料可以是纤维的、织造的或针织的;它可以由天然存在的材料或合成材料制成。示例性布料包括棉、亚麻、羊毛、苧麻、丝、牛仔布、皮革、尼龙、聚酯和氨纶及其共混物。

[0252] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与纱相关。纱通常是指适合于针织或编织的细长柔性纺成材料。纱可以由例如羊毛、棉、聚酯和其共混物组成。

[0253] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与线相关。线通常是指适合于缝纫的细长柔性纺成材料。线通常具有比纱更细的直径。线可以由例如棉、聚酯、尼龙、丝及其共混物制成。

[0254] 还可以用氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)处理服装制品,如(例如)鞋类、鞋垫、睡衣、运动鞋、皮带、帽子、衬衫、内衣、运动服装、头盔、毛巾、手套、袜子、绷带等。还可以用氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)处理床上用品,包括床单、枕头、枕套和毛毯。在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)还可以接触在一段时间内不能清洗的皮肤区域。例如,封闭在矫形铸件(其在愈合过程中固定受伤肢体)中的皮肤,以及为了适当愈合而必须保持干燥的接近受伤处的区域(如缝合伤口)可以受益于与氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)的接触。

[0255] 在一些方面,本公开提供了一种可穿戴制品,其包含如本文所述的真养亚硝化单胞菌菌株。可穿戴制品可以是能够与使用者的身体密切相连而不妨碍行走的轻质制品。可穿戴制品的实例包括手表、腕带、头带、头筋、发网、浴帽、帽子、假发和珠宝。包含氨氧化细菌(例如,本文所述的真养亚硝化单胞菌菌株)的可穿戴制品可以例如在提供下列中的一个或多个的浓度下提供:治疗或预防皮肤病症、治疗或预防与低亚硝酸盐水平有关的疾病或状况、治疗或预防体臭、用于向受试者供应一氧化氮的治疗或用于抑制微生物生长的治疗。

[0256] 在一些实施方案中,氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)与旨在接触毛发的产品(例如,刷子、梳子、洗发剂、护发素、头带、头筋、发网、浴帽、帽子和假发)相关。在头发上形成的远离皮肤表面的一氧化氮可以被捕获在帽子、头巾或面罩内并引导至吸入的空气中。

[0257] 接触人类受试者的表面的制品如尿布可以与氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)相关。因为尿布被设计成保持和容纳由失禁个体产生的尿液和粪便,尿液和粪便中的尿素可以被皮肤和粪便细菌水解而形成游离氨,所述游离氨具有刺激性且可能导致尿布疹。掺入将尿素代谢成亚硝酸盐或硝酸盐的细菌(如氨氧化细菌,例如,真养亚硝化单胞菌)可

以避免游离氨的释放,并且可以释放亚硝酸盐和最终 NO ,它们可以有助于维持儿童和失禁成年人的健康皮肤。一氧化氮在尿布中的释放还可以对存在于人类粪便中的致病生物体具有抗微生物作用。这种作用即使在一次性尿布被作为废物处置后仍可以持续,并且可以通过接触弄脏的一次性尿布而减少疾病传播的发生。

[0258] 在一些实施方案中,将包含氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)的产品包装。包装可以用于压缩产品或保护其免受损坏、污垢或降解。包装可以包括例如塑料、纸、纸板或木材。在一些实施方案中,包装是不透细菌的。在一些实施方案中,包装可渗透氧气和/或二氧化碳。

[0259] 4. 使用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌的治疗方法

[0260] 本公开提供了使用氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)来治疗疾病和病症的各种方法。可以用于治疗疾病和病症的氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)包括所有氨氧化细菌,例如本公开中所描述的真养亚硝化单胞菌组合物,例如优化的氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌,例如菌株D23)的纯化制剂。

[0261] 为了治疗皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮而施用的氨氧化细菌可以选自以下组成的组:亚硝化单胞菌属、亚硝化球菌属、亚硝化螺菌属、亚硝化囊菌属、亚硝化叶菌属、亚硝化弧菌属和其组合。在某些方面,氨氧化细菌可以是真养亚硝化单胞菌。在某些方面,氨氧化细菌是具有ATCC登录号PTA-121157的真养亚硝化单胞菌D23。

[0262] 可以提供方法以施用或递送治疗产品或化妆品产品。

[0263] 可以使用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌治疗皮肤状况,如痤疮、酒渣鼻、湿疹、或银屑病。

[0264] 在某些实施方案中,本公开提供了氨氧化细菌,例如具有下列中的一个或多个的真养亚硝化单胞菌的任选纯性的组合物用于治疗病症或疾病(例如,抑制受试者皮肤上的微生物生长)的用途:(1)优化的生长速率;(2)优化的 NH_4^+ 氧化速率;(3)优化的 NH_3 抗性;(4)优化的 NH_4^+ 抗性;和(5)优化的 NO_2^- 抗性。例如,所述纯性亚硝化单胞菌组合物可以具有在本段的开头所列出的特性(1)和(2);(2)和(3);(3)和(4);或(4)和(5)。作为另一个实例,纯性真养亚硝化单胞菌组合物可以具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)和(3);(1)、(2)和(4);(1)、(2)和(5);(1)、(3)和(4);(1)、(3)和(5);(1)、(4)和(5);(2)、(3)和(4);(2)、(3)和(5);或(3)、(4)和(5)。作为进一步的实例,所述任选为纯性的真养亚硝化单胞菌组合物可以具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)、(3)和(4);(1)、(2)、(3)和(5);(1)、(2)、(4)和(5);(1)、(3)、(4)和(5);或(2)、(3)、(4)和(5)。在一些实施方案中,纯性真养亚硝化单胞菌组合物具有在本段的开头所列出的特性(1)、(2)、(3)、(4)和(5)。

[0265] 氨氧化细菌可以用于治疗皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮。

[0266] 在一些实施方案中,使用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌,任选为纯性的真养亚硝化单胞菌(例如,菌株D23)来治疗受试者。受试者可以包括动物、哺乳动物、人类、非人类动物、家畜动物或伴侣动物。

[0267] 受试者可以是女性或男性。受试者可以是下列种族性/人种之一:亚洲裔、黑人或非洲裔美国人、西班牙裔或拉丁裔、白人、或多种族的。受试者可以表征为具有下列皮肤类型中的至少一种:正常、油性、和混合性皮肤。受试者可以表征为具有下列Fitzpatrick皮肤类型之一:I、II、III、IV、V。受试者的痤疮类型可以是青年期痤疮或成年人痤疮之一。受试

者的年龄可以是约12-15、16-18、19-28、或大于28岁。

[0268] 成年人痤疮指年龄19岁以上的受试者的痤疮。青年期痤疮指小于19岁龄的受试者的痤疮。

[0269] 在一些实施方案中,提供了治疗受试者的皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮的方法,其包括对受试者的表面施用,例如应用,例如局部施用氨氧化细菌,例如包含氨氧化细菌的制剂。

[0270] 施用,例如应用的量和/或频率可以足以降低受试者表面上的致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的量或浓度。量可以是氨氧化细菌的治疗有效剂量。

[0271] 施用可以提供炎症损伤的治疗。炎症损伤可以为丘疹、脓疱、和囊肿/结节中的任一种或多种的形式。

[0272] 丘疹和脓疱可以描述为由受到刺激的毛孔引起的丘疹。丘疹是皮肤上出现并且通常具有粗糙的肌理且在触摸时较硬的小块。可以当毛囊壁破裂并且下陷时发生丘疹。脓疱类似于丘疹,只是微黄色的液体脓液可以填充它们。白细胞上升到丘疹皮肤表面以形成脓疱。

[0273] 阻塞的毛孔可以变得更受刺激并且更大,并且更深地穿透入皮肤中以提供结节和囊肿。囊肿通常在皮肤表面下形成,并且白细胞、油和流体的积累开始积累,引起囊肿,或脓液填充区的出现。结节是硬的,并且可以在囊底部脱落(这可以使囊瓦解)时形成。这可以在皮肤表面上产生较大的疮块,称为结节。结节可以延伸到皮肤的深层中。

[0274] 施用可以提供非炎症损伤的治疗。非炎症损伤可以是粉刺,例如开放性粉刺和/或闭合性粉刺。

[0275] 闭合性粉刺或白头是小的堵塞囊,其内容物未暴露于皮肤。开放性粉刺或黑头是具有对皮肤的扩大开口,使囊内的碎片氧化,从而导致黑色的小囊。

[0276] 施用可以提供炎症后色素沉着过度/炎症后红斑(PIH/PIE)损伤的治疗或改善。色素沉着过多的特征在于由皮肤中的色素(例如黑色素)的过度生成引起的皮肤区域的变暗。炎症后指任何类型的皮肤炎症,例如痤疮相关皮肤炎症后局部化的皮肤红斑,包括可以导致瘢痕的红斑。

[0277] 施用可以提供红斑、水肿、鳞屑、刺痛、烧伤、和瘙痒中的一种或多种的治疗或改善。红斑可以指由于损伤或刺激,引起毛细血管的扩张所致的皮肤表面变红,通常为块状。水肿可以指以受试者的腔或组织中收集的过多水样流体为特征的状况,例如肿胀。

[0278] 施用可以提供油性外貌、毛孔外貌、发光、斑点、皮肤色调均匀度、视觉平滑和触觉平滑中一种或多种的治疗或改善。

[0279] 施用可以提供皮脂仪测量中的治疗或改善。皮脂是皮脂腺的油性分泌。例如,皮脂可以在受试者身体的任何区域上找到。

[0280] 施用可以提供下列一项或多项:降低损伤的炎症,降低损伤的频率,并且降低致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的存在。

[0281] 施用可以提供致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的存在的降低。施用可以提供受试者对其疾病的情绪评估的改善,如通过Skindex16生活质量调查测量。施用可以提供下列一项或多项的改善:受试者中的皮肤状况刺痛、受试者中皮肤状况的持续性/复发、和受试者中皮肤状况的外观。根据临床分级,施用可以提供下列一项或多项的改善(降低):视觉和触

觉平滑、和斑点的分级得分。

[0282] 氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂的施用可以包括用氨氧化细菌预处理受试者。例如,预处理可以涉及在痤疮或痤疮相关发作前,例如痤疮相关症状或状况出现前施用氨氧化细菌。施用可以包括在皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮发生前局部施用。

[0283] 施用,例如局部施用可以包括对受试者局部施用有效剂量的氨氧化细菌。有效剂量可以是下列任一项或多项:约 0.1×10^9 、 0.2×10^9 、 0.3×10^9 、 0.4×10^9 、 0.5×10^9 、 0.6×10^9 、 0.7×10^9 、 0.8×10^9 、 0.9×10^9 、 1.0×10^9 、 1.2×10^9 、 1.4×10^9 、 1.5×10^9 、 1.6×10^9 、 1.8×10^9 、 2.0×10^9 、 2.2×10^9 、 2.4×10^9 、 2.6×10^9 、 2.8×10^9 、 3.0×10^9 、 3.2×10^9 、 3.4×10^9 、 3.6×10^9 、 3.8×10^9 、 4.0×10^9 、 4.2×10^9 、 4.4×10^9 、 4.6×10^9 、 4.8×10^9 、 5.0×10^9 、 5.5×10^9 、 6.0×10^9 、 6.5×10^9 、 7.0×10^9 、 7.5×10^9 、 8.0×10^9 、 8.5×10^9 、 9.0×10^9 、 9.5×10^9 、 10.0×10^9 、 12×10^9 、 14×10^9 、 16×10^9 、 18×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 、 40×10^9 、 50×10^9 CFU。

[0284] 有效剂量还可以包含与氨,例如约0.01mM-约100mM的氨浓度组合的具有如本文中所述的剂量的氨氧化细菌。例如,氨浓度可以是约0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.5、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.5、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、45.0、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0、90.0、95.0、100.0mM。

[0285] 皮肤病症,例如痤疮,例如寻常痤疮可以存在于受试者的靶部位处,所述靶部位可以包含一种或多种不想要的细菌,例如致病性细菌。靶部位可以包含痤疮丙酸杆菌。

[0286] 治疗方法还可以包括确定受试者是否需要治疗皮肤病症。这可以涉及确定受试者是否需要治疗痤疮,例如寻常痤疮。方法还可以包括选择需要治疗皮肤病症的受试者。

[0287] 在某些实施方案中,方法可以包括基于受试者需要受试者表面上致病性细菌,例如痤疮丙酸杆菌的量或浓度的降低,选择受试者。

[0288] 施用可以包括受试者自身施用氨氧化细菌。施用可以包括受试者外的人施用氨氧化细菌。例如,可以将氨氧化细菌施用,例如应用到受试者身体的任何部分,例如头、肩、臂、腿、腋下、躯干、脚、膝、踝或臀部。在某些方面,可以将氨氧化细菌应用于受试者的脸、颈、和头皮中的任一种或多种。

[0289] 在一些实施方案中,施用可以包括将氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂施用,例如应用合适的次数以提供痤疮的有效治疗,如通过本文中所述的任何一项或多项测量技术的改善描述。例如,施用可以每天发生约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、或24次。施用可以包括每天一次施用,例如应用氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂。施用可以包括每天两次施用,例如应用氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂。

[0290] 在一些实施方案中,制剂的施用可以包括将氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂施用,例如应用合适的时间段以提供痤疮的有效治疗,如通过本文中所述的任何一项或多项测量技术的改善描述。制剂的施用可以包括将氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂施用,例如应用约1-3、3-5、5-7、7-9、9-10、10-14、12-18、12-21、21-28、28-35、35-42、42-49、49-56、46-63、63-70、70-77、77-84、或84-91天。例如,可以将制剂应用约7天。例如,可以将制剂应用约14天。例如,可以将制剂应用约21天。例如,可以将制剂应用约28天。

[0291] 氨氧化细菌,例如氨氧化细菌制剂可以为可以能够气雾化、喷雾或雾化的形式,例

如在介质中,即为雾的形式。可以以气雾剂或雾施用,例如应用,例如局部应用氨氧化细菌,例如氨氧化细菌的制剂。气雾剂或雾可以包含水性介质。氨氧化细菌的制剂可以在维持或促进氨氧化细菌存活力的制剂中。制剂可以在缓冲溶液,例如水性缓冲溶液中。缓冲溶液,例如水性缓冲溶液。水性缓冲液可以包含磷酸二氢钠和氯化镁。水性缓冲液可以包含水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 。氨氧化细菌浓度可以是本文中公开的AOB的任何浓度。在某些方面,水性缓冲液可以包含水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 ,并且还包含 1×10^9 CFU/mL浓度的氨氧化细菌,例如D23真养亚硝化单胞菌。

[0292] 在添加氨氧化细菌前的水性缓冲溶液可以包含磷酸二氢钠和氯化镁,基本上由磷酸二氢钠和氯化镁组成或者由磷酸二氢钠和氯化镁组成,例如水中的50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 。

[0293] 在一些实施方案中,制剂可以包含氨、铵盐、和尿素中的至少一种。制剂可以包含受控释放材料。例如,受控释放材料可以是缓慢释放材料。氨氧化细菌的制剂可以包含赋形剂。赋形剂可以是药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂,如本公开的全文中公开。赋形剂可以是表面活性剂,例如,本公开的全文中公开的表面活性剂。在一些实施方案中,赋形剂,例如药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂包含抗粘附剂、粘合剂、涂层剂、崩解剂、填充剂、调味剂、着色剂、润滑剂、助流剂、吸附剂、防腐剂或甜味剂。

[0294] 制剂可以基本上不含其它生物体。制剂可以包含第二生物体,例如选自由以下组成的组的生物体:乳杆菌属、链球菌属、双歧杆菌属及其组合。

[0295] 在一些实施方案中,用于治疗皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮的制剂可以布置在粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带中或者作为粉末、化妆品、乳霜、棒状物、气雾剂、例如雾、药膏、擦拭物或绷带提供。在一些实施方案中,用于治疗皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮的制剂可以包含保湿剂、脱臭剂、香味剂、着色剂、驱虫剂、清洁剂、或防紫外线剂。

[0296] 在一些实施方案中,用于治疗皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮的制剂可以包含具有约 10^8 -约 10^{14} CFU/mL氨氧化细菌的浓度的氨氧化细菌。在某些方面,制剂可以包含约 1×10^9 CFU/mL-约 10×10^9 CFU/mL氨氧化细菌。在一些实施方案中,制剂可以包含约50毫克(mg)-约1000mg氨氧化细菌的氨氧化细菌。在一些实施方案中,氨氧化细菌与赋形剂,例如药学上可接受的赋形剂或美容上可接受的赋形剂的质量比在每升约0.1克-约1克的范围内。

[0297] 可以在容器中提供可以用于治疗痤疮的氨氧化细菌的制剂,所述制剂和容器具有小于约50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、或2000克的重量。

[0298] 方法还可以包括从皮肤表面获得样品。可以在施用氨氧化细菌前的任何时间,或者施用氨氧化细菌后的任何时间采集样品。例如,可以在施用前约1分钟、5分钟、10、15、20、25、30、45、60、90、120分钟、或施用前3小时、4、5、6、7、8、12、18、24小时、或施用前1周、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12周采集样品。或者/另外,可以在施用后约1分钟、5分钟、10、15、20、25、30、45、60、90、120分钟、或施用后3小时、4、5、6、7、8、12、18、24小时、或施用后1周、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12周采集样品。

[0299] 方法还可以包括分离样品中的细菌的DNA。细菌可以是痤疮丙酸杆菌。氨氧化细菌的施用提供痤疮丙酸杆菌的减少。可以在约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、35、42、49、56、63、70、77、84、91、98、105、或更多

天后发生痤疮丙酸杆菌的减少。

[0300] 如本文中所述的化妆品产品,例如微生物群系相容性化妆品产品,例如洗发剂、护发素、和清洁剂的使用可以与皮肤状况,例如痤疮,例如寻常痤疮的治疗一起使用。这些化妆品产品可以与氨氧化细菌的施用一起使用。例如,贯穿对受试者施用氨氧化细菌的治疗时间段,可以使用化妆品产品。可以在开始经由对受试者施用氨氧化细菌治疗皮肤状况前将化妆品产品使用一段时间。可以在开始经由对受试者施用氨氧化细菌治疗皮肤状况后将化妆品产品使用一段时间。可以在中断经由对受试者施用氨氧化细菌治疗皮肤状况后将化妆品产品使用一段时间。

[0301] 在一些实施方案中,受试者可以应用一种或多种化妆品产品,并且在施用氨氧化细菌前等待一段时间。在其它实施方案中,受试者可以施用氨氧化细菌,并且在应用一种或多种化妆品产品之前等待一段时间。

[0302] 受试者可以等待的时间段可以是应用一种或多种化妆品产品后约1分钟、5分钟、10、15、20、25、30、45、60、90、120分钟、或3小时、4、5、6、7、8、12、18、24小时且在施用氨氧化细菌前。

[0303] 受试者可以等待的时间段可以是施用氨氧化细菌后约1分钟、5分钟、10、15、20、25、30、45、60、90、120分钟、或3小时、4、5、6、7、8、12、18、24小时且在应用一种或多种化妆品产品前。

[0304] 可以在开始治疗,例如施用氨氧化细菌前评估受试者。可以在开始治疗后,例如在第一次施用,例如应用氨氧化细菌后评估受试者。

[0305] 可以在开始治疗,例如施用氨氧化细菌前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42天;或7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52周;或2、3年、4、或5年评估受试者

[0306] 可以在开始治疗,例如第一次施用,例如应用氨氧化细菌后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42天;或7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52周;或2、3年、4、或5年评估受试者。

[0307] 可以在受试者清洁、沐浴或淋浴之前或之后的一段时间发生施用。例如,可以在受试者清洁、沐浴或淋浴之前或之后30、60、90、120、150、180分钟的时间段发生施用。

[0308] 在一些实施方案中,使用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌,例如任选地本文所述的纯性的真养亚硝化单胞菌(例如,贯穿本公开描述的真养亚硝化单胞菌,例如菌株D23)来抑制其它生物体的生长。例如,真养亚硝化单胞菌D23良好地适于长期定植于人类皮肤,并且在一些实施方案中,它竞争过在皮肤上非所需的其它细菌。非所需的皮肤细菌包括例如那些可以感染伤口、提高疾病的风险或严重程度或产生气味的细菌。某些非所需的皮肤细菌包括金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、化脓性链球菌(*S.pyogenes*)和鲍曼不动杆菌(*A.baumannii*)。本文所述的真养亚硝化单胞菌可以通过例如消耗稀少的营养物或产生有害于其它生物体的副产物(例如,使皮肤的pH变成不利于非

所需生物体的生长的水平) 竞争过其它生物体。

[0309] 因此, 本公开尤其提供了抑制受试者皮肤上的微生物生长的方法, 其包括向有需要的人类局部施用有效剂量的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌, 如本文所述 (例如, 菌株D23)。类似地, 本公开提供了用于抑制受试者皮肤上的微生物生长的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌。同样地, 本公开提供了氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌在制造用于抑制受试者皮肤上的微生物生长的药物中的用途。

[0310] 因此, 本公开尤其提供了治疗皮肤状况, 例如痤疮, 例如寻常痤疮的方法, 包括对此需要的人局部施用有效剂量的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地如本文中描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如菌株D23)。类似地, 本公开提供了氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地如本文中描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如菌株D23), 用于治疗受试者皮肤上的皮肤状况, 例如痤疮, 例如寻常痤疮。同样地, 本公开提供了氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文中描述的纯性真养亚硝化单胞菌在制造药物中的用途, 所述药物用于治疗受试者皮肤上的皮肤状况, 例如痤疮, 例如寻常痤疮。

[0311] 本公开还提供了一种向受试者供应一氧化氮的方法, 其包括将有效剂量的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23) 放置在紧邻所述受试者处。类似地, 本公开提供了用于向受试者供应一氧化氮的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23)。同样地, 本公开提供了氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23) 在制造适于放置在紧邻受试者处的药物或组合物中的用途。

[0312] 本公开还提供了一种减少体臭的方法, 其包括向有需要的受试者局部施用有效剂量的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23)。类似地, 本公开提供了用于减少受试者的体臭的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23)。同样地, 本公开提供了氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23) 在制造用于减少体臭的药物或组合物中的用途。

[0313] 本公开还提供了一种治疗或预防与低亚硝酸盐水平有关的疾病的方法, 其包括向有需要的受试者局部施用治疗有效剂量的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23)。类似地, 本公开提供了用于治疗与低亚硝酸盐水平有关的疾病的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23) 的局部制剂。同样地, 本公开提供了氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23) 在制造用于治疗与低亚硝酸盐水平有关的疾病的局部药物中的用途。

[0314] 本公开还提供了一种治疗或预防皮肤病症或皮肤感染的方法, 其包括向有需要的受试者局部施用治疗有效剂量的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌 (例如, 菌株D23)。类似地, 本公开提供了用于治疗受试者中的皮肤病症的氨氧化细菌, 例如真养亚硝化单胞菌, 例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化

单胞菌(例如,菌株D23)。同样地,本公开提供了氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌,例如任选地本文描述的纯性真养亚硝化单胞菌(例如,菌株D23)在制造用于治疗皮肤病症的药物中的用途。在实施方案中,所述皮肤病症是痤疮、酒渣鼻、湿疹、银屑病或荨麻疹;所述皮肤感染是脓疱病。

[0315] 虽然不希望受理论的束缚,但提出了用治疗有效剂量的如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌细菌(例如,菌株D23)治疗痤疮可以涉及由于NO生成所引起的炎症下调;和/或通过酸化的亚硝酸盐和NO产生来限制和/或抑制与寻常痤疮有关的痤疮丙酸杆菌的扩散和增殖。

[0316] 例如,本公开提供了氨氧化细菌的组合物用于治疗病症或疾病(例如,抑制受试者皮肤上的微生物生长)的用途。在实施方案中,可以使用氨氧化细菌来治疗例如慢性创伤、痤疮、酒渣鼻、湿疹、银屑病、荨麻疹、皮肤感染。

[0317] 本公开的系统和方法可以提供或含有可用于下列中的一个或多个的内容物:治疗或预防皮肤病症;治疗或预防与低亚硝酸盐水平有关的疾病或状况;治疗或预防体臭;用于向受试者供应一氧化氮的治疗;或用于抑制微生物生长的治疗。

[0318] 本公开的系统和方法可以用于减少环境中(例如,受试者的表面)的非所需细菌的量。

[0319] 本公开的系统和方法可以提供或含有可用于治疗下列中的至少一个的内容物:痤疮、湿疹、银屑病、荨麻疹、酒渣鼻、皮肤感染和伤口(感染的伤口)。

[0320] 在一些实施方案中,氨氧化细菌可以用于治疗受试者。受试者可以包括动物、哺乳动物、人类、非人类动物、家畜动物或伴侣动物。

[0321] 在一些实施方案中,使用本文所述的氨氧化细菌来抑制其它生物体的生长。例如,氨氧化细菌可以良好地适于长期定植于人类皮肤,并且在一些实施方案中,它竞争过在皮肤上非所需的其它细菌。非所需的皮肤细菌包括例如那些可以感染伤口、提高疾病的风险或严重程度或产生气味的细菌。非所需的细菌可以被称为致病性细菌。某些非所需的皮肤细菌包括金黄色葡萄球菌例如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、化脓性链球菌、鲍曼不动杆菌、丙酸杆菌和寡养单胞菌。本文所述的氨氧化细菌可以通过例如消耗稀少的营养物或产生有害于其它生物体的副产物(例如,使皮肤的pH变成不利于非所需生物体的生长的水平)竞争过其它生物体。

[0322] 因此,本公开尤其提供了一种抑制受试者皮肤上的微生物生长的方法,其包括向有需要的人类局部施用有效剂量的如本文所述的氨氧化细菌。类似地,本公开提供了用于抑制受试者皮肤上的微生物生长的如本文所述的氨氧化细菌。同样地,本公开提供了氨氧化细菌在制造用于抑制受试者皮肤上的微生物生长的药物中的用途。

[0323] 本公开尤其提供了一种改变环境(例如表面,例如受试者的表面)中的皮肤微生物群系的组成(例如,调节皮肤微生物群系的组成,例如调节或改变皮肤微生物群系的比例)的方法。所述方法可以包括向环境(例如表面,例如受试者的表面)施用(例如,施加)含有氨氧化细菌的制剂。在一些实施方案中,施用(例如,施加)的量和频率可以足以减少皮肤表面上的致病性细菌的比例。在一些实施方案中,所述受试者可以基于受试者需要减少皮肤表面上的致病性细菌的比例来选择。

[0324] 本公开还可以提供从皮肤表面获得样品,并分离所述样品中的细菌的DNA。还可以

对所述样品中的细菌的DNA进行测序,以确定或监测受试者的样品中的细菌的量或比例。

[0325] 本公开还可以用于增加表面上的非致病性细菌的比例。在一些实施方案中,所述非致病性细菌可以是共生非致病性细菌。在一些实施方案中,非致病性细菌可以是葡萄球菌属细菌。在一些实施方案中,非致病性细菌可以是表皮葡萄球菌。在一些实施方案中,比例增加的非致病性细菌可以是葡萄球菌属细菌,其包含至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的表皮葡萄球菌。

[0326] 非致病性细菌的比例增加可以在预定的时间段内发生,例如,在小于1天、2天、3天、4天、5天、1周、2周、3周或4周内发生或在小于1-3天、3-5天、5-7天、7-9天、5-10天、10-14天、12-18天、12-21天、21-28天、28-35天、35-42天、42-49天、49-56天、46-63天、63-70天、70-77天、77-84天、84-91天内发生。

[0327] 可以在小于约3周(例如,约16天,例如约2周)内观察到葡萄球菌属细菌(例如,表皮葡萄球菌)的比例的增加。

[0328] 本公开可以用于减少表面上的致病性细菌(例如,潜在致病性细菌,例如与疾病相关的细菌)的比例。在一些实施方案中,致病性细菌可以是丙酸杆菌属。在一些实施方案中,致病性细菌可以是寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)。

[0329] 致病性细菌的比例减少可以在预定的时间段内发生,例如,在小于1天、2天、3天、4天、5天、1周、2周、3周或4周内发生或在小于1-3天、3-5天、5-7天、7-9天、5-10天、10-14天、12-18天、12-21天、21-28天、28-35天、35-42天、42-49天、49-56天、46-63天、63-70天、70-77天、77-84天、84-91天内发生。

[0330] 可以在小于约3周(例如,约16天,例如约2周)内观察到丙酸杆菌属细菌和/或寡养单胞菌属细菌的比例的减少。

[0331] 本公开还提供了一种向受试者供应一氧化氮的方法,其包括将有效剂量的本文所述的氨氧化细菌放置在紧邻所述受试者处。类似地,本公开提供了用于向受试者供应一氧化氮的如本文所述的氨氧化细菌。同样地,本公开提供了在制造适于放置在紧邻受试者处的药物或组合物中的用途。

[0332] 本公开还提供了一种减少体臭的方法,其包括向有需要的受试者局部施用有效剂量的本文所述的氨氧化细菌。类似地,本公开提供了用于减少受试者的体臭的如本文所述的氨氧化细菌。同样地,本公开提供了如本文所述的氨氧化细菌在制造用于减少体臭的药物或组合物中的用途。

[0333] 本公开还提供了一种治疗或预防与低亚硝酸盐水平有关的疾病的方法,其包括向有需要的受试者局部施用治疗有效剂量的本文所述的氨氧化细菌。类似地,本公开提供了用于治疗与低亚硝酸盐水平有关的疾病的如本文所述的氨氧化细菌的局部制剂。同样地,本公开提供了如本文所述的氨氧化细菌在制造用于治疗与低亚硝酸盐水平有关的疾病的局部药物中的用途。

[0334] 本公开还提供了一种治疗或预防皮肤病症或皮肤感染的方法,其包括向有需要的受试者局部施用治疗有效剂量的如本文所述的氨氧化细菌。类似地,本公开提供了用于治疗受试者中的皮肤病症的如本文所述的氨氧化细菌。同样地,本公开提供了如本文所述的氨氧化细菌在制造用于治疗皮肤病症的药物中的用途。在实施方案中,所述皮肤病症是痤疮。

疮、酒渣鼻、湿疹、银屑病或荨麻疹；所述皮肤感染是脓疱病。

[0335] 虽然不希望受理论的束缚，但提出了用治疗有效剂量的氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌细菌（例如，菌株D23）治疗酒渣鼻可以涉及由于NO生成所引起的下调。这可能是由于Kazal型KLK5/KLK7抑制剂的表达，其可以减少人类cathelicidin肽LL-37从其前体前肽hCAP18的形成。

[0336] 虽然不希望受理论的束缚，但提出了用治疗有效剂量的氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌细菌（例如，菌株D23）治疗湿疹和/或特应性皮炎可以涉及由于NO生成所引起的炎症下调；和/或通过酸化的亚硝酸盐和NO产生来限制和/或抑制金黄色葡萄球菌和经常与特应性皮炎中的极高的定殖率和皮肤负荷有关的其它皮肤病原体的扩散和增殖。

[0337] 虽然不希望受理论的束缚，但提出了用治疗有效剂量的氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌细菌（例如，菌株D23）治疗银屑病可以涉及由于NO生成所引起的炎症下调以及人类cathelicidin肽LL-37的形成的减少。

[0338] 虽然不希望受理论的束缚，但提出了用治疗有效剂量的如本文所述的氢氧化细菌，例如任选纯性的真养亚硝化单胞菌细菌（例如，菌株D23）治疗银屑病可以涉及由于NO生成所引起的炎症下调。

[0339] 虽然不希望受理论的束缚，但提出了用治疗有效剂量的氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌细菌（例如，菌株D23）治疗脓疱病或其它皮肤感染和软组织感染可以涉及限制和/或抑制金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的扩散和增殖。

[0340] 本公开还提供了一种促进伤口愈合的方法，其包括向伤口施用有效剂量的氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌细菌（例如，菌株D23）。类似地，本公开提供了用于治疗伤口的氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌（例如，菌株D23）。同样地，本公开提供了氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌（例如，菌株D23）在制造用于治疗伤口的药物或组合物中的用途。

[0341] 氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌（例如，菌株D23）可以用于促进愈合能力受损的患者（例如，糖尿病患者）中的伤口愈合。

[0342] 在一些实施方案中，本公开提供了使用氢氧化细菌，例如如本文所述的任选纯性的真养亚硝化单胞菌（例如，菌株D23）来预防疾病或病症（例如，皮肤病症）的方法。在某些实施方案中，预防意指相比于类似的未经治疗的受试者降低受试者发展疾病的风险。需要将所述风险降低至零。

[0343] 在一些实施方案中，本公开提供了一种通过将含有真养亚硝化单胞菌的绷带施加到伤口上来治疗所述伤口的方法。还提供了制造这种绷带的方法。所述绷带可以包括例如将绷带固定在伤口附近的未受损皮肤上的粘附部分以及包覆或覆盖伤口的柔软的柔性部分。在一些实施方案中，所述绷带不包含除真养亚硝化单胞菌以外的其它生物体。所述绷带可以由可渗透材料制成，所述可渗透材料在绷带被施加至伤口上时允许气体如氧气和二氧化碳触及真养亚硝化单胞菌。在某些实施方案中，所述绷带包含用于真养亚硝化单胞菌的营养物，如铵、氨、尿素或微量矿物质。在某些实施方案中，所述绷带包含真养亚硝化单胞菌耐受的抗生素。所述抗生素抗性可以产生自一个或多个内源性抗性基因或产生自一个或多个转基因。

[0344] 在一些实施方案中,以每次施用约 10^8 - 10^9 CFU、 10^9 - 10^{10} CFU、 10^{10} - 10^{11} CFU或 10^{11} - 10^{12} CFU的剂量施用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。在一些实施方案中,以约 10^{10} - 10^{11} CFU,例如约 1×10^{10} - 5×10^{10} 、 1×10^{10} - 3×10^{10} 或 1×10^{10} - 2×10^{10} CFU的剂量局部施用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。在一些实施方案中,以约 2×10^9 、 4×10^9 或 8×10^9 CFU的剂量局部施用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。

[0345] 在一些实施方案中,以每剂约1-2ml、2-5ml、5-10ml、10-15ml、12-18ml、15-20ml、20-25ml或25-50ml的体积施用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。在一些实施方案中,溶液的浓度为约 10^8 - 10^9 、 10^9 - 10^{10} 或 10^{10} - 10^{11} CFU/ml。在一些实施方案中,每天以两个15ml剂量施用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌,其中每个剂量的浓度为 10^9 CFU/ml。在一些实施方案中,以 2×10^9 、 4×10^9 或 8×10^9 CFU/L的浓度施用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。在一些实施方案中,以 2×10^9 、 4×10^9 或 8×10^9 CFU/mL的浓度施用氨氧化细菌,例如真养亚硝化单胞菌。

[0346] 在一些实施方案中,氨氧化细菌的制剂可以包含与氨,例如约0.01mM-约100mM的氨浓度组合的具有如本文中所述的剂量的氨氧化细菌。例如,氨浓度可以是约0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.5、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.5、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、45.0、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0、90.0、95.0、100.0mM。

[0347] 在一些实施方案中,每天施用氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)一次、两次、三次或四次。在一些实施方案中,每周施用氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)一次、两次、三次、四次、五次或六次。在一些实施方案中,在沐浴后不久施用氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)。在一些实施方案中,在睡觉前不久施用氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)。

[0348] 在某些方面,本公开提供了组合疗法,其包括氨氧化细菌(例如,真养亚硝化单胞菌)和第二治疗剂。例如,本公开提供了两种(或更多种)疗法的物理混合物。在其它实施方案中,将两种(或更多种)疗法作为单独的制剂组合施用。第二疗法可以是例如药物制剂、手术或治疗有关疾病或病症的任何其它医疗方法。以下段落描述能够治疗慢性创伤、痤疮、酒渣鼻、湿疹和银屑病的组合疗法。

[0349] 在能够治疗慢性创伤的组合疗法中,第二疗法可以包括例如抗生素(例如,局部或全身性的,以及杀菌或抑菌的),如青霉素、头孢菌素、多粘菌素、利福霉素(rifamycin)、台勾霉素(lipiamycin)、喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类、林可酰胺类、四环素类、环脂肽、甘氨酸环素类、恶唑烷酮类和台勾霉素;血管紧张素、血管紧张素类似物;清创术;引流;伤口冲洗;负压伤口疗法;加热;动脉血管再生;高压氧疗法;抗氧化剂,如抗坏血酸、谷胱甘肽、硫辛酸、胡萝卜素、 α -生育酚或泛醇;低强度激光疗法;腓肠肌退缩术;生长因子,如血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子1-2、血小板源性生长因子、转化生长因子 β 或表皮生长因子;施用自体血小板,如那些分泌一种或多种生长因子如血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子1-2、血小板源性生长因子、转化生长因子 β 或表皮生长因子的自体血小板;角化细胞培养物的植入;同种异体移植物;胶原蛋白,例如包含胶原蛋白的敷料;或蛋白酶抑制剂如SLPI。组合疗法可以包含上述治疗中的一个或多个。

[0350] 在能够治疗痤疮的组合疗法中,第二疗法可以包括例如药物治疗(例如,全身或局部的),如过氧化苯甲酰、抗生素(如红霉素、克林霉素或四环素)、水杨酸、激素(例如,包括孕激素如去氧孕烯(desogestrel)、诺孕酯(norgestimate)或屈螺酮(drospirenone));类视黄醇如维甲酸(tretinoin)、阿达帕林(adapalene)、他扎罗汀(tazarotene)或异维甲酸(isotretinoin)。第二疗法还可以是诸如粉刺摘除、皮质类固醇注射或手术切缝的程序。组合疗法可以包含上述治疗中的一个或多个。联合疗法可以包含上文表1中描述的一种或多种疗法,例如选自下组的痤疮治疗:局部类视黄醇、壬二酸、水杨酸、局部抗微生物剂、口服抗生素、过氧苯甲酰、口服抗雄激素、口服异维甲酸及其组合。

[0351] 例如,本公开提供了物理混合两种(或更多种)疗法的物理混合物。在其它实施方案中,以分开的配制剂组合施用两种(或更多种)疗法。可以以“同时”或“伴随”或“并行递送”施用疗法。在其它实施方案中,一种治疗的递送在递送另一种治疗开始前结束。这在本文中有时称为“连续”或“序贯递送”。治疗或疗法的开始可以在将受试者诊断为具有皮肤状况或病症之前或之后开始。用氨氧化细菌治疗的开始可以在已经对另一种治疗有不充分的响应的情况下开始。方法可以包括与开始中断氨氧化细菌的施用结合,其它治疗的使用,和/或继续其它治疗的使用。

[0352] 可以在开始施用氨氧化细菌前将疗法,例如痤疮治疗,如上文表1中列出的那些治疗施用一段时间。可以在氨氧化细菌施用的整个时间段中继续疗法,例如痤疮治疗,如上文表1中列出的治疗。在某些实施方案中,可以在施用氨氧化细菌期间停止疗法,例如痤疮治疗,如上文表1中列出的那些治疗施用。可以在氨氧化细菌的整个施用中继续疗法,例如痤疮治疗,如上文表1中列出的治疗。可以在停止氨氧化细菌施用后开始疗法,例如痤疮治疗,如上文表1中列出的那些治疗。

[0353] 在能够治疗酒渣鼻的组合疗法中,第二疗法可以包括例如抗生素,例如,口服四环素抗生素如四环素、强力霉素或米诺环素,或局部抗生素如甲硝唑;壬二酸; α -羟基酸;可以开具异维甲酸的处方;檀香油;可乐定(clonidine); β -阻断剂如纳多洛尔(nadolol)和普萘洛尔(propranolol);抗组胺药(如氯雷他定(loratadine));米氮平(mirtazapine);甲基磺酰甲烷或水飞蓟素,任选地彼此组合;激光,如皮肤血管激光或CO₂激光;或光疗法,如强脉冲光、低强度光疗法或光子嫩肤术。组合疗法可以包含上述治疗中的一个或多个。

[0354] 在能够治疗湿疹的联合疗法中,第二疗法可以包括例如皮质类固醇,如氢化可的松或丙酸氯倍他索、免疫抑制剂(局部或全身)如吡美莫司、他克莫司、环孢素、硫唑嘌呤或甲氨蝶呤或光照疗法,如用紫外线。组合疗法可以包含上述治疗中的一个或多个。

[0355] 在能够治疗银屑病的组合疗法中,第二疗法可以包括例如皮质类固醇,如去羟米松;类视黄醇;焦油;维生素D或其类似物,如帕立骨化醇(paricalcitol)或卡泊三醇(calcipotriol);保湿剂和润肤剂,如矿物油、凡士林、卡泊三醇、decubal或椰子油;地蒽酚(dithranol);或醋酸氟轻松(fluocinonide)。组合疗法可以包含上述治疗中的一个或多个。

[0356] 虽然不希望受理论的束缚,但提出了用治疗有效剂量的本文所述的氨氧化细菌治疗银屑病可以涉及由于NO生成所引起的炎症下调以及人类cathelicidin肽LL-37的形成的减少。

[0357] 虽然不希望受理论的束缚,但提出了用治疗有效剂量的如本文所述的氨氧化细菌

治疗银屑病可以涉及由于NO生成所引起的炎症下调。

[0358] 虽然不希望受理论的束缚,但提出了用治疗有效剂量的如本文所述的氨氧化细菌治疗脓疱病或其它皮肤感染和软组织感染可以涉及限制和/或抑制金黄色葡萄球菌例如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、化脓性链球菌、鲍曼不动杆菌、丙酸杆菌和寡养单胞菌的扩散和增殖。

[0359] 本公开还提供了一种促进伤口愈合的方法,其包括向伤口施用有效剂量的如本文所述的氨氧化细菌。类似地,本公开提供了用于治疗伤口的如本文所述的氨氧化细菌。同样地,本公开提供了如本文所述的氨氧化细菌在制造用于治疗伤口的药物或组合物中的用途。

[0360] 在一些实施方案中,本公开提供了使用如本文所述的氨氧化细菌来预防疾病或病症(例如,皮肤病症)的方法。在某些实施方案中,预防意指相比于类似的未经治疗的受试者降低受试者发展疾病的风险。需要将所述风险降低至零。

[0361] 沐浴频率降低的个体(如宇航员、潜艇船员、战役期间的军事人员、偏远地区的民工、难民、卧床不起的个体和许多其它人)可以通过将氨氧化细菌保持在皮肤上来维持更健康的皮肤。关于卧床不起的个体,在一些实施方案中,氨氧化细菌通过扩张不充分循环来降低褥疮的频率或严重性。

[0362] 应当理解,许多现代的退行性疾病可能由缺乏NO种类所引起,且外部皮肤上的氨氧化细菌可以通过扩散供应那些种类,并且对皮肤施用氨氧化细菌解决长期的医疗状况。在某些实施方案中,向受试者施用氨氧化细菌以抵消现代的沐浴实践,尤其是阴离子去污剂从外部皮肤上除去氨氧化细菌。

[0363] 局部施用的一种合适的方法为施加足够的氨氧化细菌,然后穿上足够的衣物,以便诱导出汗。然而,许多人将希望得到氨氧化细菌的益处,同时维持他们当前的沐浴习惯,在这种情况下,可以连同足够的底物一起施用所述细菌的培养物以供它们产生NO。接近人类汗液的无机组成的营养液可以用于此目的。利用适于接近人类汗液的培养基的细菌使它们在被施用适应的时间减至最少。由于汗液一旦分泌到皮肤表面上便蒸发,因此使用具有较高离子强度的培养基是理想的。约两倍于人类汗液的浓度是合适的,但还考虑了其它条件。 NH_3 或尿素、 O_2 、 CO_2 和矿物质通常满足氨氧化细菌的营养需求。在一些实施方案中,所述底物包含微量矿物质,其包括铁、铜、锌、钴、铝、锰、钠、钾、钙、镁、氯化物、磷酸盐、硫酸盐或其任何组合。

[0364] 在一些实施方案中,本公开提供了一种通过将含有氨氧化细菌的绷带施加到伤口上来治疗所述伤口的方法。还提供了制造这种绷带的方法。所述绷带可以包括例如将绷带固定在伤口附近的未受损皮肤上的粘附部分以及包覆或覆盖伤口的柔软的柔性部分。在一些实施方案中,所述绷带不包含除氨氧化细菌以外的其它生物体。所述绷带可以由可渗透材料制成,所述可渗透材料在绷带被施加至伤口上时允许气体如氧气和二氧化碳触及氨氧化细菌。在某些实施方案中,所述绷带包含用于氨氧化细菌的营养物,如铵、氨、尿素或微量矿物质。在某些实施方案中,所述绷带包含氨氧化细菌耐受的抗生素。所述抗生素抗性可以产生自一个或多个内源性抗性基因或产生自一个或多个转基因。

[0365] 在一些实施方案中,以每次施用或每天约 10^8 - 10^9 CFU、 10^9 - 10^{10} CFU、 10^{10} - 10^{11} CFU或 10^{11} - 10^{12} CFU的剂量施用氨氧化细菌(例如,氨氧化细菌的制剂)。在一些实施方案中,以约

10^9 - 10^{10} CFU,例如约 1×10^9 - 5×10^9 、 1×10^9 - 3×10^9 或 1×10^9 - 10×10^9 CFU的剂量局部施用氨氧化细菌。

[0366] 在一些实施方案中,以每剂约1-2ml、2-5ml、5-10ml、10-15ml、12-18ml、15-20ml、20-25ml或25-50ml的体积施用氨氧化细菌。在一些实施方案中,溶液的浓度为约 10^8 - 10^9 、 10^9 - 10^{10} 或 10^{10} - 10^{11} CFU/ml。在一些实施方案中,每天以两个15ml剂量施用氨氧化细菌,其中每个剂量的浓度为 10^9 CFU/ml。

[0367] 在一些实施方案中,每天施用氨氧化细菌一次、两次、三次或四次。在一些实施方案中,每周施用氨氧化细菌一次、两次、三次、四次、五次或六次。在一些实施方案中,在沐浴后不久施用氨氧化细菌。在一些实施方案中,在睡觉前不久施用氨氧化细菌。

[0368] 在一些实施方案中,施用氨氧化细菌约1-3天、3-5天、5-7天、7-9天、5-10天、10-14天、12-18天、12-21天、21-28天、28-35天、35-42天、42-49天、49-56天、46-63天、63-70天、70-77天、77-84天、84-91天,例如约1个月、约2个月、约3个月。在一些实施方案中,施用氨氧化细菌无限期的时间,例如,大于一年、大于5年、大于10年、大于15年、大于30年、大于50年、大于75年。

[0369] 5. 与施用氨氧化细菌一起使用微生物群系相容性化妆品,例如清洁剂、洗发剂、和/或护发素

[0370] 本公开的系统和方法尤其提供了化妆品产品,例如化妆品成品,其可以认为是“生物群系友好的”或“生物群系相容的”。本公开的系统和方法可以提供可以与细菌,例如非致病性细菌,例如氨氧化细菌组合使用的化妆品产品,例如化妆品成品的用途,所述细菌可以以制剂或组合物的形式使用以应用于受试者。表4提供了一批组分,其中的一种或多种在制剂或组合物中提供,并且可以提供过生物群系友好的或生物群系相容的产品。

[0371] 表4:生物群系友好的产品的潜在组分。

组分	类别
癸基葡萄糖苷	表面活性剂/清洁剂
椰油酰胺丙基甜菜碱(ColaTeric COAB)	表面活性剂/清洁剂
聚乙烯山梨醇酯(例如Tween 80)	表面活性剂/清洁剂
乙氧基化月桂醇(RhodaSurf 6 NAT)	表面活性剂/清洁剂
月桂基醚硫酸钠/月桂基葡萄糖苷/ 椰油酰胺丙基甜菜碱(Plantapon 611 L UP)	表面活性剂/清洁剂
月桂基醚硫酸钠(例如RhodaPex ESB 70 NAT)	表面活性剂/清洁剂
烷基聚葡萄糖苷(例如Plantaren 2000 N UP)	表面活性剂/清洁剂
月桂基醚硫酸钠(Plantaren 200)	表面活性剂/清洁剂
布朗纳博士的卡斯蒂利亚肥皂	表面活性剂/清洁剂
布朗纳博士的婴儿肥皂	表面活性剂/清洁剂
月桂胺氧化物(ColaLux Lo)	表面活性剂/清洁剂
[0372] 十二烷基硫酸钠(SDS)	表面活性剂/清洁剂
聚磺酸酯烷基聚葡萄糖苷(PolySufanate 160 P)	表面活性剂/清洁剂
月桂基硫酸钠(Stepanol-WA Extra K)	表面活性剂/清洁剂
月桂基葡萄糖苷羟基丙基磺酸钠 (Suga®nate 160NC)	表面活性剂/清洁剂(基于生物的)
月桂酰胺丙基甜菜碱(Cola®Teric LMB)	表面活性剂/清洁剂
椰油酰胺丙基羟基磺基甜菜碱(Cola®Teric CBS)	表面活性剂/清洁剂
椰油酰胺两性基二乙酸二钠(Cola®Teric CDCX-LV)	表面活性剂/清洁剂
月桂基葡萄糖苷羟基丙基磷酸钠 (Suga®Fax D12).	表面活性剂/清洁剂
月桂酰甲基羟乙基磺酸钠(Iselux® LQ-CLR-SB)	表面活性剂/清洁剂
甲基椰油酰牛磺酸钠(Pureact WS Conc.)	表面活性剂/清洁剂
水(和)月桂酰甲基羟乙基磺酸钠 (和) 椰油酰胺丙基甜菜碱(和)	表面活性剂/清洁剂

	椰油酰羟乙基磺酸钠(和)	
	甲基油酰牛磺酸钠(Iselux ®SFS-SB)	
	椰油基葡萄糖苷(Coco glucoside) (Plantacare 818)	表面活性剂/清洁剂 (基于生物的)
	椰油酰基甘氨酸钠	表面活性剂/清洁剂(基于生物的)
	辛酸/癸酸甘油三酯(Myritol)	护发素
	阳离子瓜尔胶(Cationic guar) (N-Hance)	护理/去结
	椰子油	护理
	苹果糖类, 例如苹果果实提取物 例如苹果果实提取物和甘油 (Botanimoist AMS);	湿润剂
[0373]	水解的昆诺阿藜(quinoa)	水分结合
	水解的猴面包树种子蛋白质	软化剂
	羟乙基纤维素(Natrosol)	粘度改进剂
	羟丙基纤维素(Klucel MCS)	粘度改进剂/薄膜形成剂
	水解的大豆蛋白质(Soy Tein NPNF)	
	天然玫瑰水溶胶	香味剂
	天然玫瑰水	香味剂
	大马士革玫瑰(Damascena)花水	香味剂
	椰油基葡萄糖苷和油酸甘油酯(Lamisoft® PO 65)	脂质层增强剂
	Polysorbate 80	乳化剂
[0374]	柠檬酸	pH稳定剂

[0375] 可以与本公开一起使用的化妆品产品可以是或包括下列一项或多项或者布置在下列一项或多项中：婴儿产品，例如，婴儿洗发剂、婴儿润肤露、婴儿油、婴儿粉、婴儿霜；浴用制剂，例如，沐浴油、片剂、浴盐、泡泡浴、浴胶囊；眼妆制剂，例如，眉笔、眼线、眼影、洗眼液、眼部卸妆液、睫毛膏；香料制剂，例如，古龙香水、化妆水、香水、粉末（粉尘和滑石）、香囊；发用制剂，例如，护发素、发胶、直发膏、烫发水、冲洗液、洗发剂、滋补品、敷料、毛发梳理助剂、卷发液；毛发着色制剂，例如，染发剂和颜色、毛发着色剂、染发漂洗剂、染发洗发剂、头发美白用颜色、头发漂白剂；化妆制剂，例如，粉饼、粉底、腿部和身体涂料、唇膏、妆前底霜、胭脂、化妆固定剂；美甲制剂，例如，底漆和底漆、角质层软化剂、指甲霜和指甲乳液、指甲扩展、指甲油、指甲油去除剂；口腔卫生产品，例如，牙粉、漱口水和口气清新剂；浴用香皂，例如泡沫沐浴露和清洁剂、除臭剂、冲洗液、女性卫生除臭剂；剃须制剂，例如，剃须后润肤液、胡须软化剂、滑石粉、剃须前洗剂、剃须膏、剃须皂；护肤制剂，例如，清洗、脱毛、面部及颈部、身体和手部、足部粉末和喷雾、保湿、夜用制剂、粘贴面罩、皮肤清新剂；以及晒黑制剂，例如，凝胶、乳膏和液体和室内晒黑制剂。

[0376] 化妆品产品可以包含本文中公开的任一种或多种成分，例如表4中公开的成分。

[0377] 化妆品产品或化妆品成品可以包含以下组合物，基本上由以下组合物组成或由以下组合物组成，如下文表5中所示：

[0378] 表5：

[0379]

组分	优选的浓度	优选的浓度范围	描述
Klucel MCS (羟基丙基纤维素)	1.5%	1.0-2.0%	粘度改进剂
椰油酰胺丙基甜菜碱	20.0%	15.0%-30.0%	清洁剂/表面活性剂
癸基葡糖苷	7.5%	0.0-10.0%	清洁剂/表面活性

[0380]

			剂
Botanimoist AMG (甘油+ 苹果提取物)	3.0%	0.0-4.0%	湿润剂
水解的猴面包树蛋白质	2.0%	0.0-4.0%	皮肤护发素
天然玫瑰水溶胶	10.0%	0.0-15.0%	香味剂

[0381] 可以使用此产品作为化妆品产品，例如用于洗发剂，例如用于沐浴露。产品包含水以构成100%。在一些实施方案中，化妆品产品，例如洗发剂可以或者不可以含有柠檬酸，并

且在需要或期望pH稳定的情况下可以需要柠檬酸。

[0382] 化妆品产品或化妆品成品可以包含以下组合物,基本上由以下组合物组成或由以下组合物组成,如下文表6中所示:

[0383] 表6:

[0384]

组分	优选的浓度	优选的浓度范围	描述
Klucel MCS (羟基丙基纤维素)	0.25%	0.10-0.50%	粘度改进剂
椰油酰胺丙基甜菜碱	8.00%	5.0-12.0%	清洁剂/表面活性剂
癸基葡糖苷	4.0%	0.0-6.0%	清洁剂/表面活性剂
Botanimoist AMG (甘油+ 苹果提取物)	2.0%	0.0%-4.0%	湿润剂
水解的昆诺阿藜蛋白护发素	1.0%	0.0-3.0%	皮肤护发素
天然玫瑰水溶胶	7.5%	0.0%-10.0%	香味剂
柠檬酸	按需要添加,通常以非常少的量,用于pH	按需要添加,通常以非常少的量,用于pH	pH稳定剂

[0385]

	稳定	稳定	
--	----	----	--

[0386] 可以使用此产品作为化妆品产品,例如用于清洁剂,例如用于身体、手或脸。产品包含水以构成100%。在一些实施方案中,化妆品产品,例如清洁剂可以或者不可以含有柠檬酸,并且在需要或期望pH稳定的情况下可以需要柠檬酸。

[0387] 可以使用其它水解蛋白质,并且可以包含但不限于稻、大豆、猴面包树、和燕麦。可以涵盖其它芳香备选。

[0388] 化妆品成品可以具有一种或多种,或所有本文中所述的特性。

[0389] 涵盖其它产品,包括护发素和/或护肤素,其可以包含以下各项,基本上由以下各项组成,或由以下各项组成,如下文表7中所示:

[0390] 表7:

[0391]

组分	优选的浓度	优选的浓度范围	描述
羟基丙基纤维素 (Klucel MCS)	1.5%	0.50-2.50%	粘度改进剂/薄膜 形成剂
阳离子瓜尔胶 (N-Hance)	0.5%	0.10-1.5%	调理和去结
椰子油	1.0%	0.0-3.0%	调理
香味剂	根据需要	根据需要	

[0392] 产品包含水以构成100%。在一些实施方案中,化妆品产品,例如护发素可以或者不可以含有柠檬酸,并且在需要或期望pH稳定的情况下可以需要柠檬酸。

[0393] 6. 治疗效益的机制

[0394] 不受理论的束缚,据信,以下机制有助于氨氧化细菌如真养亚硝化单胞菌在治疗本文所讨论的疾病和状况的有益效果。其它机制性细节在国际申请W0/2005/030147中找到,所述申请全文以引用方式并入本文。

[0395] 为了理解这些细菌有益的方面,理解血管生成是有帮助的。所有的体细胞,除了那些暴露在几百微米外界空气中的细胞,都从血液供应中获取所有代谢氧气。氧气被肺中的血液吸收,作为氧合血红蛋白被红细胞运载到外周组织,在那里和二氧化碳交换,二氧化碳然后被运回,从肺中呼出。氧气必须从红细胞中扩散,通过细胞质,穿过内皮,并穿过各种组织直到到达利用氧气的细胞线粒体。人体内含有约5升血液,所以循环系统的体积与身体的体积相比而言很小。氧气不能主动被运输。它被动的通过浓度梯度从空气扩散到红细胞中,从红细胞扩散到细胞中,再从细胞到消耗氧气的细胞色素氧化酶。消耗氧气部位的氧气浓度在体内是最低的,且O₂通量由扩散阻力和浓度梯度决定。完成给所有的外周组织供应充足氧气需要对毛细血管的大小和位置进行敏锐的控制。如果毛细血管的空间增加,完成同样的氧气通量就需要更大的浓度差和因此更低的细胞色素氧化酶的O₂浓度。毛细血管之间的细胞越多,O₂的需求就会更大。如果毛细血管之间的空间减小,完成器官代谢功能的细胞的可利用的空间也减小。

[0396] 在某些方面,应当理解,来自氨氧化细菌的NO容易被外皮肤所吸收,且由于外皮肤没有血红蛋白而转化成S-亚硝基硫醇。M.Stucker等人在“The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis”中已经表明,外皮肤从外界空气中接受所有的氧气。(Journal of Physiology (2002), 538.3,第985-994页。)这是显然的,因为可以看到外皮肤基本上不含红细胞。因为它们是活的,且需要血液中的营养而不仅仅是氧气,所以这些层之间存在血浆循环。形成的S-亚硝基硫醇是稳定的,可以扩散通过身体,并构成可靠NO的体积源和使蛋白巯基转亚硝基的NO源。

[0397] 在一些方面,应当理解,毛细血管稀薄是NO水平不足的首要表现之一。F.T.Tarek等人表明,疏松的毛细血管或者说毛细血管稀薄在患有原发性高血压的人群中较为常见。(Structural Skin Capillary Rarefaction in Essential

Hypertension. Hypertension. 1999; 33: 998-1001

[0398] 许多状况与毛细血管密度变得疏松有关。高血压是其中一种,且研究者报道稀疏的毛细血管也见于原发性高血压人群的孩童时期中以及糖尿病人群中。糖尿病的严重并发症是高血压、糖尿病性肾病,糖尿病性视网膜病,糖尿病性神经病。R.Candido等人已经发现,最后两种状况的特征是观察到症状之前流向受影响部位的血流量降低。(Haemodynamics in microvascular complications in type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2002; 18: 286-304。)降低的毛细血管密度和肥胖症相关,且普通体重降低增加毛细血管密度,如由A Philip等人在“Effect of Weight Loss on Muscle Fiber Type, Fiber Size, Capilarity, and Succinate Dehydrogenase Activity in Humans”中所示。The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 第84卷,第11期 4185-4190, 1999。

[0399] 研究者已表明,在原发性雷诺现象 (PRP) 中,甲襞毛细血管比正常对照组的稀薄(轻微的),且比已经发展为全身硬化 (SSc) 的病人丰富的多。M. Bukhari, Increased Nailfold Capillary Dimensions In Primary Raynaud's Phenomenon And Systemic Sclerosis. British Journal of Rheumatology, 第24卷,第35期: 1127-1131, 1996。他们发现毛细血管密度从35环 (loops) /mm² (正常对照组) 降到33 (PRP组)、17 (SSc组)。对照组、PRP组、SSc组毛细血管支路之间的平均距离分别是18μ、18μ和30μ。

[0400] 在某些方面,应当理解,正常情况下身体用于感受“缺氧”的机制可影响到调节毛细血管密度的身体系统。根据本发明的这个方面,大量的“缺氧”成分被感受到,不是通过O₂水平的降低,而是通过一氧化氮NO水平的增加。NO基础水平的降低干扰了“缺氧”的感受,所以影响了许多通过“缺氧”调节的身体功能。例如,贫血通常被定义为“血红蛋白不足”,血红蛋白不足的一个后果就是“缺氧”,它被定义为“氧气不足”。根据一些方面,这些普通的定义不能解释两种状况的一氧化氮引起的方面。

[0401] 在休息状态时,急性等容贫血的耐受性良好。血细胞比容的2/3的减少对静脉回流的PvO₂影响很小,这暗示了无论是O₂压还是整个身体的运输都没有降低。Weiskopf等人, Human cardiovascular and metabolic response to acute, severe isovolemic anemia. JAMA 1998, 第279卷,第3期, 217-221。在降低50%时 (从140到70g Hb/L), 平均PvO₂饱和度 (大于32个受试者) 从大约77%降到74%。血液中O₂容量的降低通过血管舒张和心率从63增加到85bpm的心动过速来补偿。补偿是有效而明显的,然而,机制却不是。典型的解释是“缺氧”感受器检测到了“缺氧”,并用血管舒张和心动过速的方式补偿。然而,却检测不到“缺氧”。血液乳酸 (厌氧呼吸的标志物) 轻微地从0.77降到0.62mM/L,暗示了较少厌氧呼吸和较少“缺氧”。静脉回流PvO₂的3%的降低与人的海拔上升300米 (通常不会产生心动过速) 是同样水平的“缺氧”。静脉回流的O₂浓度保持不变,且O₂消耗保持不变,在体内没有O₂浓度降低的空间。因为O₂感应,等容贫血期间的代偿不会发生。

[0402] 因此,急性等容贫血中观察到的血管舒张可归因于血管壁处的NO浓度增加。NO响应剪切应力和其它因素介导血管扩张。观察到NO代谢水平没有改变,因为NO的产生速率没有改变,且继续等于其消耗速率。没有观察到“低氧症”的metHb代偿是很容易理解的,因为metHb就像Hb那样结合NO,因此当Hb降低导致metHb代偿时NO浓度并没有增加。

[0403] 一氧化氮在许多代谢途径中起重要作用。已经表明,NO的基本水平在色调抑制反

应中发挥作用,并且这个基本水平的降低导致这些路径双重抑制。Zanzinger等人曾经报道NO抑制基本交感紧张和减弱兴奋反射。(Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. *Am.J.Physiol.* 268 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 37):R958-R962, 1995.)

[0404] 在一些方面,应当理解,NO体积源的一种组分为低分子量S-亚硝基硫醇,其在无红细胞皮肤上通过氨氧化细菌由外皮肤上产生的NO产生。这些低分子量S-亚硝基硫醇长期稳定,并且可以在血浆中自由扩散和循环。多种酶可从多种S-亚硝基硫醇裂解出NO,从而在酶切位点释放出NO。皮肤上的AOB的这个NO体积源的损失导致破坏正常生理。身体使用S-亚硝基硫醇远离毛细血管产生NO的优点在于从S-亚硝基硫醇生产NO无需O₂。一氧化氮合成酶(NOS)产生NO需要O₂。当有足够的S-亚硝基硫醇背景时,甚至在缺氧区域中也可以生成NO。也不需要自由的NO,因为NO只有与另一个分子附接时才发挥作用,如半胱氨酸残基的巯基或血红素的铁,因此NO的作用可以被转亚硝基化所介导,甚至没有自由NO而只要有S-亚硝基硫醇和转亚硝基酶存在时也是可以的。

[0405] Frank等人已表明,伴随普通创伤恢复的血管生成部分是由提升的VEGF产生的,VEGF是由增加的一氧化氮诱导的。(Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J.* 13, 2002-2014 (1999).)

[0406] NO在形成癌症中起重要作用,表明本文所述细菌可用于癌症治疗和预防的方法中。根据某些方面,应当理解,在缺氧期间存在NO可阻止细胞在缺氧应激下分裂,这时细胞复制DNA的错误风险较大。一个相关的细胞功能是调控细胞周期。这是控制着细胞如何和何时复制DNA、组装成双染色体和分裂的调控程序。细胞周期的调控是非常复杂的,并且没有完全理解。但是,已知,在细胞周期的路径上存在许多点,在这些点上细胞周期可以被停止,且分裂可以被阻止直至发生这种情况的状态被改善。P53肿瘤抑制蛋白是细胞周期调控时的关键蛋白,且它通过包括DNA损伤的不同细胞压力信号启动细胞阻滞和凋亡,并且P53在超过一半以上的人类癌症中发生突变,如Ashcroft等人在“Stress Signals Utilize Multiple Pathways To Stabilize p53”中所报道。(Molecular And Cellular Biology, May 2000年5月,第3224-3233页。)缺氧启动p53的积累,而且当缺氧在调控细胞周期中很重要时,缺氧单独不能诱导p53mRNA效应蛋白的下游表达,因此不能够引起细胞周期的停止。Goda等人曾经报道到细胞阻滞的缺氧诱导需要缺氧-诱导因子-1 (HIF-1 α)。(Hypoxia-Inducible Factor 1 α Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia. *Molecular And Cellular Biology*, 2003年1月,第359-369页。)Britta等人曾经报道,NO是HIF-1 α 的主要刺激物之一。(Accumulation of HIF-1 α under the influence of nitric oxide. *Blood*, 2001年2月15日,第97卷,第4号。)相比之下,NO引起转录活性p53的积累,并且引起细胞周期的阻滞,和引起凋亡。Wang等人, P53 Activation By Nitric Oxide Involves Down-Regulation Of Mdm2. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 第277卷,第18期,发行期5月3日,第15697-15702号, 2002。

[0407] 在本发明的某些方面,应当理解,通过阻止会导致缺氧性死亡的毛细血管稀薄来阻止细胞坏死性死亡可以防止自身免疫性疾病。当细胞暴露于慢性缺氧时,反应性氧物质(ROS)生产增加,且对细胞代谢机能的损伤增加,最终导致细胞DNA的损伤增加。降低的代谢

能力,由于ROS和外源性致癌物质暴露,将会降低损伤恢复能力。随时间推移,损伤积累,并增加三个事件的概率:细胞将缺失抑癌基缺失,且细胞将变得癌化,细胞将通过坏死而死亡,或细胞通过细胞凋亡而死亡。当细胞死亡时,无论是坏死还是凋亡,细胞残骸必须从那个部位中清除。死亡细胞被免疫细胞,包括树枝状细胞和巨噬细胞所吞噬。当这些细胞吞噬主体,所述主体通过各种蛋白水解酶消化为抗原片段,然后将这些抗原附接至主要组织相容性复合物(MHC1、MHC2),并将抗原-MHC复合物移动到细胞表面,在那里与它可与T细胞相互作用,并以各种方式激活T细胞。任何细胞损伤都会通过不同方式释放出刺激免疫系统的辅助因子。一般来说,坏死的细胞会比凋亡的细胞刺激更大的免疫反应。因此,将免疫细胞长期暴露于已经死亡或正在死亡的细胞有可能导致自身性免疫疾病。

[0408] 在某些方面,应当理解,低基础NO导致纤维性肥大。一旦清除死亡细胞后,新的细胞无法轻易取代其位置,因为没有足够O₂的支持。任何此类新的细胞将遭遇相同宿命。空间可保持空置,其这种情况下,器官萎缩,毛细血管彼此靠的更紧,现在新的细胞被由正在死亡的细胞剥夺先前产生的VEGF,所以毛细血管消失,并重新形成缺氧区。这可导致受影响的组织全面萎缩。在支持纤维化的组织中,相对惰性的胶原纤维可填充空间。因为身体对正在讨论的特定器官的代谢需求没有降低,器官就试图变大,但现在有着大量纤维含量。这可导致纤维性肥大,例如心脏和肝脏的纤维化肥大。一些器官如脑无法变大或变小,因为神经和血管的三维连通性很重要,且无法连续并同时地映射到不对称萎缩的脑上。空间必须充满着物质,且β-淀粉可能会成为(不太惰性的)空间填充物。肾脏因为肾囊而无法变大,所以活细胞的数量变少,且它们被纤维化组织替代。如果死亡细胞被清除,组织萎缩,而且NO/O₂的比例又下降,且毛细血管又变稀薄。这就形成以下疾病的恶性循环:终末期肾病、充血性心力衰竭/心脏肥大、原发性胆汁性肝硬化、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、炎性肠病、瘢痕增生、和以雷诺现象开始并以全身性硬化和原发性干燥综合征结束的多种结缔组织疾病,其中还观察到毛细血管稀薄。Ferrini等人已表明,由于用L-NAME造成的NOS的慢性抑制引起的基础NO水平的降低导致了心脏和肾脏的全面纤维化。(Antifibrotic Role of Inducible Nitric Oxide Synthase. Nitric Oxide: Biology and Chemistry 第6卷,第3期,第283-294页(2002)。)可能是低基础NO导致了纤维性肥大。

[0409] 在某些方面,应当理解,毛细血管稀薄影响受试者控制食欲的能力。在老人和动物的脑中观察到毛细血管稀薄。毛细血管稀薄与循环生长因子(包括胰岛素样生长因子-1)的下降相关。成年人脑中的神经形成与血管生成相配合。因为脑调节许多稳态功能,为控制脑成分,毛细血管间的扩散长度增加可“理解”为那些物质的血液浓度不足。脑中葡萄糖的通量相当接近正常代谢需求,其中葡萄糖通量只比葡萄糖消耗大50至75%,且跨血脑屏障的葡萄糖转运体可以是饱和的,笛类特异性的,且不依赖于能量或离子梯度。胃口的大部分调节通过脑介导,且毛细血管稀薄可导致“营养物质”(或与“营养物质”成比例的标记化合物)的充足血液浓度被解读为不充足。这可能是肥胖症的一个原因。

[0410] 根据某些方面,应当理解,毛细血管稀薄可以是非胰岛素依赖型糖尿病的原因。非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)也称为代谢综合征或第2型糖尿病,特征为胰岛素抗性。身体对胰岛素的敏感性降低,且胰岛素水平增加。患有NIDDM的人具有高血液葡萄糖、高血液三甘油酯,通常很肥胖,有高血压,且通常具有大量内脏脂肪。

[0411] NIDDM伴有其它症状,毛细血管稀薄可能为原因。在研究40名患有或不患有NIDDM、

肥胖症 (BMI 29) 和消瘦病 (lean) (BMI 24) (每种10名) 的男性时, Konrad等人报道, 对于不患NIDDM的消瘦男性、不患NIDDM的肥胖男性、患有NIDDM的消瘦男性、患有NIDDM的肥胖男性, 休息时的血液乳酸水平分别为1.78、2.26、2.42和2.76 (mM/L)。(A-Lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:280-287, 1999.) 乳酸是无氧糖酵解的量度。当 O_2 不足以通过氧化磷酸化生成ATP时, 细胞可通过无氧糖酵解产生ATP。无氧糖酵解的产物之一是乳酸, 乳酸必须从细胞排出, 否则pH下降, 且功能受损。血液乳酸通常在运动研究中测到, 其中增加暗示了可完成最大氧化工作的工作负荷。在休息时较高的乳酸水平将指示休息时无氧糖酵解增加, 这与毛细血管稀薄相一致。

[0412] 原发性胆汁性肝硬化与雷诺现象、瘙痒症、干燥综合征、骨质疏松、门静脉血压过高、神经病和胰功能不全相关, 且肝功能异常与风湿性疾病相关。肝酶升高是肝炎症的症状, 肝酶升高是作为“无症状”原发性胆汁性肝硬化的早期症状观察到。因此, 本文所述细菌可用于治疗肝炎症。

[0413] Torre等人已经报道, 阿尔茨海默病 (AD) 是微血管疾病, 伴随着低灌注激发的神经性退化, 这部分是由一氧化氮不足导致的。(Review: Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide, *Brain Research Reviews* 34 (2000) 119-136.) 因此, 本文所述细菌可用于治疗AD。

[0414] 与高血压相关的不利健康影响也可以是低基础NO的结果。对血管舒张的反应下降也与低基础NO相一致。NO是从来源扩散到传感器位置的可扩散分子, NO在传感器位置具有信号传递效果。因为NO水平低, 每个NO来源必须产生较多NO来生成与某一距离的某一强度相等的NO信号。NO在三个维度扩散, 且所述扩散范围内的全部体积必须提升至将在传感器位置给出适当信号的水平。这可在来源处和来源与传感器之间导致较高NO水平。接近来源的NO高NO的不利局部效果可由过低NO背景引起。有一些证据表明实际上发生这种情况。在大鼠胰岛中, Henningsson等人已报道, 用L-NAME抑制NOS通过诱导iNO增加总NO生产。(Chronic blockade of NO synthase paradoxically increases islet NO production and modulates islet hormone release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E95-E107, 2000.) 通过增加NOS活性增加NO将只能在一定限度下起作用。当NOS被活化但未供应足够四氢生物喋呤 (BH4) 或L-精氨酸时, 其“解偶联”并生成超氧化物 (O_2^-) 而非NO。这个 O_2^- 随即可以破坏NO。试图以超过供应BH4或L-精氨酸的速率生产NO反而降低NO水平。这可导致正反馈, 低的NO水平由于NOS的刺激而变得更糟糕, 且解偶联的NOS生成大量的 O_2^- , 造成局部活性氧物质 (ROS) 损伤, 如在动脉粥样硬化、终末期肾病、阿尔兹海默病和糖尿病中所观察到的那样。

[0415] 本文所述细菌也可以用于延迟衰老迹象。热量限制延长寿命, 且Hollooszy报道, 限制食物摄入至随意对照的70%, 将静坐大鼠的寿命从858天延长至1,051天, 延长几乎25%。(Mortality rate and longevity of food restricted exercising male rats: a reevaluation. *J. Appl. Physiol.* 82 (2):399-403, 1997.) 热量限制与延长寿命之间的联系已被确立, 然而, 原因机制并不清楚。Lopez-Torres等人报道, 检查大鼠中肝线粒体酶表明, H_2O_2 的生产由于与热量限制相关的复合物I活性降低而减少。(Influence Of Aging And

Long-Term Caloric Restriction On Oxygen Radical Generation And Oxidative DNA Damage In Rat Liver Mitochondria. *Free Radical Biology&Medicine* 第32卷第9期第882-8899页, 2002。) H_2O_2 是由 O_2^- 歧化产生,它是在呼气作用期间由线粒体生产的主要ROS。Kushareva等人和其他人提出, O_2^- 的主要来源是复合物I,它通过来自复合物III(琥珀酸盐还原位点)的电子逆流催化NAD/NADH氧化还原对。提出的老化自由基理论假定,自由基对细胞DNA、抗氧化剂系统和DNA修复系统的伤害随着年龄累积,且当关键系统的损伤到无法修复的程度,随即死亡。(The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581, 1998.)

[0416] 作为另一机制,Vasa等人已经证实,NO激活端粒酶并延缓内皮细胞衰老。(Nitric Oxide Activates Telomerase and Delays Endothelial Cell Senescence. *Circ Res.* 2000;87:540-542.) 低基础NO将通过解除细胞色素氧化酶抑制来增加基础代谢速率。增加的基础代谢还将增加细胞再生和生长速率。毛细血管稀薄通过诱导慢性缺氧可增加自由基损伤,且还可增加细胞再生,且因此通过两种机制加速老化。

[0417] 在一些方面,应当理解自养氨氧化细菌可产生过敏和自身性免疫疾病的保护方面。最为人所知的自身免疫疾病可能是第1型糖尿病,它是由通过免疫系统破坏胰腺中的胰岛细胞引起的。复发性流产也与自身性免疫疾病相关,其中阳性自体免疫抗体的数量与复发性流产的次数呈正相关。全身性硬化、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、和各种风湿病是自身性免疫疾病的其它实例。观察到,施用AOB减少过敏、枯草热,如WO/2005/030147中所述。

[0418] AOB借以对过敏和自身性免疫疾病发挥保护作用的一个机制是通过产生一氧化氮,主要是通过调节抑制NF- κ B和防止免疫细胞活化和诱导炎症反应。NF- κ B是上调基因表达的转录因子,且这些基因中的许多与炎症和免疫反应相关,包括导致释放细胞因子、趋化因子和各种粘附因子。这些各种免疫因子导致免疫细胞迁移到它们的释放位点,导致炎症反应。已显示,组成型NO生产通过防止IK β 降解稳定IK β (NF- κ B的抑制剂) 而抑制NF- κ B。

[0419] Xu等人已证实,施用NO供体防止大鼠中实验性过敏性脑脊髓炎的发展。(SIN-1, a Nitric Oxide Donor, Ameliorates Experimental Allergic Encephalomyelitis in Lewis Rats in the Incipient Phase: The Importance of the Time Window. *The Journal of Immunology*, 2001, 166:5810-5816.) 在此研究中,已证实,施用NO供体减少巨噬细胞浸润中枢神经系统,减少血液单核细胞增生,并增加血液单核细胞凋亡。所有这些结果都被认为降低了诱导免疫反应的程度和严重性。

[0420] 低基础NO可通过以下机制导致自闭症,所述机制为由于基础一氧化氮不足,不足以在脑中形成新的连接。尽管不希望限制于理论,但在一些实施方案中,通过NO调节神经连接的形成。在这些情况下,任何降低NO扩散范围的条件都可以减小可经历连接的脑要素的体积尺寸。在低基础NO水平条件下发育的脑可布置在小体积要素中,因为NO的有效范围减小。

[0421] 自闭症个体中呈现的其它症状也可以将低NO指定为病因,包括音高辨别增加、肠道紊乱、免疫系统异常、脑血流量减少、脑葡萄糖消耗增加、血浆乳酸增加、依附障碍和哼唱。这些症状中的每一种都可以归因于低基础NO水平。

[0422] Takashi Ohnishi等人已经报道,自闭症个体的血流量减少。Takashi Ohnishi等人, Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. *Brain* (2000), 123, 1838-1844。J.M.Rumsey等人已报道,自闭症个体的葡萄糖消耗增加。Rumsey JM, Duara R, Grady C, Rapoport JL, Margolin RA, Rapoport SI, Cutler NR. 自闭症的脑代谢。用正电子发射断层扫描测量静息脑葡萄糖利用率。 *Arch Gen Psychiatry*, 1985年5月; 42 (5) : 448-55 (摘要)。D.C.Chugani已报道,自闭症个体的血浆乳酸水平增加。Chugani DC等人, Evidence of altered energy metabolism in autistic children. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1999年5月; 23 (4) : 635-41。出现这些效果可能是脑中毛细血管稀薄的结果,脑中毛细血管稀薄可减少血流量和O₂供应,使得脑的一些代谢负荷可通过糖酵解而非氧化磷酸化产生。

[0423] B.A.Klyachko等人已经证实,一氧化氮通过离子通道的cGMP修饰增加后超级化而增加神经元的兴奋性。Vitaly A.Klyachko等人, cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike after hyperpolarization. *Neuron*, 第31卷, 1015-1025, September 27, 2001。C.Sandie等人已经表明,抑制NOS减少吃惊。Carmen Sandi等人, Decreased spontaneous motor activity and startle response in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *European journal of pharmacology* 277 (1995) 89-97。已经利用自发性高血压大鼠 (SHR) 和那不勒斯高兴奋 (NHE) 大鼠建立注意力缺陷多动障碍 (ADHD) 模型。Raffaele Aspide等人已经表明,这两个模型在急性NOS抑制期间的注意力缺陷加剧。Raffaele Aspide等人, Non-selective attention and nitric oxide in putative animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behavioral Brain Research* 95 (1998) 123-133。因此,本文的细菌可用于治疗ADHD。

[0424] M.R.Dzoljic还表明抑制NOS可抑制睡眠。M.R.Dzoljic, R.de Vries, R.van Leeuwen. Sleep and nitric oxide: effects of 7-nitro indazole, inhibitor of brain nitric oxide synthase. *Brain Research* 718 (1996) 145-150。G.Zoccoli已经报道,当NOS受到抑制时,睡眠期间的多个生理作用被改变,包括眼球快速运动和脑循环的睡眠-清醒区别。G.Zoccoli等人, Nitric oxide inhibition abolishes sleep-wake differences in cerebral circulation. *Am.J.Physiol.Heart Circ Physiol* 280:H2598-2606, 2001。L.Kapas等人已表明,NO供体促进非-REM睡眠,然而,这些增加比NO供体的持续时间持续长得多的时间,暗示可能是反弹效应。Levente Kapas等人 Nitric oxide donors SIN-1 and SNAP promote nonrapid-eye-movement sleep in rats. *Brain Research Bullitin*, 第41卷, 第5期, 第293-298页, 1996。M.Rosaria等人, Central NO facilitates both penile erection and yawning. Maria Rosaria Melis and Antonio Argiolas. Role of central nitric oxide in the control of penile erection and yawning. *Prog Neuro-Psychopharmacol&Biol.Psychiat*. 1997, 第21卷, 第899-922页。P.Tani等人已报道,失眠常见于患有亚斯伯格氏综合征 (Asperger's) 的成年人中。Pekka Tani等人, Insomnia is a frequent finding in adults with Asperger's syndrome. *BMC Psychiatry* 2003, 3:12。Y.Hoshino还在自闭症儿童中观察到睡眠障碍。Hoshino Y, Watanabe H, Yashima Y, Kaneko M, Kumashiro H. An investigation on sleep disturbance of autistic children. *Folia Psychiatr Neurol Jpn*. 1984; 38 (1) : 45-51。(摘要) K.A.Schreck等人观察到,睡眠

障碍的严重性与自闭症症状的严重性相关。Schreck KA等人, Sleep problems as possible predictors of intensified symptoms of autism. Res Dev Disabil. 2004年1月-2月; 25(1): 57-66。(摘要)。因此, 本文的细菌可用于治疗失眠。

[0425] W.D.Ratnasooriya等人报道, 抑制雄性大鼠中的NOS减少性交前活动, 减少性欲, 并降低能育性。W.D.Ratnasooriya等人, Reduction in libido and fertility of male rats by administration of the nitric oxide (NO) synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester. International journal of andrology, 23:187-191 (2000)。

[0426] 许多看似截然不同的以ATP耗竭和最终器官衰竭为特征的病症实际上可能是由一氧化氮匮乏 (nitropenia) “引起”, 由基础一氧化氮的全身缺乏引起。当这种情况出现在心脏中时, 结果是扩张型心肌病。当这种情况出现在脑中时, 结果是白质高信号、阿尔茨海默病、血管性抑郁、血管性痴呆、帕金森氏症和路易体痴呆。当这种情况出现在肾脏中时, 结果为终末期肾病, 当这种情况出现在肝脏中时, 结果为原发性胆汁性肝硬化。当这种情况出现在肌肉中时, 结果为纤维肌痛、海湾战争综合征或慢性疲劳综合征。当这种情况出现在肠中时, 结果为缺血性肠病。当这种情况出现在胰脏中时, 结果为首先第2型糖尿病, 接着为胰脏慢性炎症, 接着为胰脏的自身免疫攻击 (或胰脏癌), 接着为第1型糖尿病。当这种情况出现在结缔组织中时, 结果为全身性硬化。

[0427] 在终末期肾病放入残肾模型中, 部分肾被移除, (无论是外科手术或是毒素), 这样增加对剩余部分的代谢负荷。生成超氧化物以降低NO, 并增加O₂扩散至肾线粒体中。长期超负荷导致进行性肾毛细血管稀薄和进行性肾衰竭。在急性肾衰竭中, 给人透析可让肾“休息”, 并允许其恢复。在由横纹肌溶解 (将肌红蛋白释放至血流中的肌肉损伤) 诱导的急性肾衰竭中, 肾损伤是以缺血性损伤为特征。肌红蛋白清除NO, 就如同血红蛋白一样, 且将在肾脏中引起血管收缩, 导致局部缺血。肌红蛋白也将诱导局部一氧化氮匮乏和一连串事件, 导致进一步ATP耗竭。

[0428] 在一些方面, 低NO水平导致线粒体生物发生减少。在减少的线粒体密度下生产相同ATP将导致O₂消耗增加, 或基础代谢速率加快。在许多状况中观察到加快的基础代谢速率, 包括: 镰状细胞性贫血、充血性心力衰竭、糖尿病、肝硬化、克罗恩病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、肥胖症、终末期肾病、阿尔茨海默病和慢性阻塞性肺病。

[0429] 虽然一定程度增加的O₂消耗可被高效利用, 但在这些状况中的许多中, 解偶联蛋白也向上调节, 表明至少部分增加的代谢速率是由低效率引起。解偶联蛋白已知被向上调节的状况包括肥胖症和糖尿病。

[0430] 随着较少线粒体将O₂消耗至较低O₂浓度, 驱动O₂扩散的O₂梯度较大, 所以O₂扩散路径长度可增加, 导致毛细血管稀薄, 在扩张型心肌病、高血压、第2型糖尿病和肾性高血压中观察到毛细血管稀薄。

[0431] 铜, 不管作为Cu²⁺或血浆铜蓝蛋白 (CP) (主要的含铜血清蛋白, 在成年人血清中以0.38g/L存在, 也就是0.32%的Cu, 且包含94%的血清铜) 催化从NO和含硫巯基基团 (RSH) 形成S-NO-硫醇。血浆的Cu含量是可变的, 且在感染条件下增加。Berger等人报道, 烧伤渗出物的Cu和Zn含量相当多, 1/3皮肤烧伤的患者在7天内损失20至40%正常身体Cu和5至10%的Zn含量。(Cutaneous copper and zinc losses in burns. Burns. 1992年10月; 18(5): 373-80。) 如果患者皮肤被AOB寄居, 包含AOB需要的尿素和Fe、Cu和Zn的伤口渗出物将被转化为

NO和亚硝酸盐,通过iNOS大大增补NO的局部生产,而不消耗代谢激发伤口中的来源(诸如O₂和L-精氨酸)。预期,伤口表面上的AOB造成的高NO和亚硝酸盐生产抑制感染,特别抑制厌氧细菌如梭菌感染,所述厌氧细菌导致破伤风、气性坏疽和肉毒中毒。

[0432] 除非另有指示,否则本发明的实施可采用本领域的技术范围内的常规免疫学方法、分子生物学和重组DNA技术。文献中全面阐释此类技术。参见例如Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(最新版本);和Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编,现行版)。

[0433] 7.用氨氧化细菌调节皮肤微生物群系

[0434] 本公开提供了用于改变皮肤微生物群系(例如,人类皮肤微生物群系)的系统和方法。所述系统和方法可以提供例如涉及皮肤的感染或病症(例如,皮肤感染和/或皮肤病症)的治疗。

[0435] 亚硝化单胞菌属的氨氧化细菌(AOB)是革兰氏阴性专性自养菌,其具有只从作为能量来源的氨产生亚硝酸盐和一氧化氮的独特能力。它们在土壤和水环境中均广泛存在并且是环境硝化过程的重要组分。由于人类皮肤上的亚硝酸盐和一氧化氮作为若干生理功能(如血管舒张、皮肤炎症和伤口愈合)的重要组分的作用,这些细菌对于健康的皮肤状况和免疫病理性皮肤状况都可以具有有益性质。这些细菌可以在人类中安全使用,因为它们生长缓慢,无法在有机碳源上生长,可以对皂类和抗生素敏感,并且从未与动物或人类中的任何疾病或感染有关。

[0436] 对受试者(例如,人类受试者)局部施用氨氧化细菌可以导致皮肤微生物群系发生出乎意料的变化,并且更具体地说,它可以导致正常的共生非致病性物种的比例增加以及潜在致病性的、致病性的或引起疾病的生物体的比例减少。

实施例

[0437] 实施例1:对于人类皮肤用氨氧化细菌的研究:化妆品效果、安全性、检测和皮肤宏基因组学(Metagenomics)

[0438] 进行以4:1AOB与安慰剂对照随机化的盲的、安慰剂对照的24名人志愿者的研究。受试者每天两次将亚硝化单胞菌悬浮液(10⁹CFU/ml,每天2次,每天总共3x 10¹⁰CFU)应用到其脸和头皮达一周,并且应用后再追踪两周。指示志愿者在1周AOB应用以及应用后一周避免使用毛发产品,然后对于第三周回到惯常的洗发剂使用。在第0天获得头皮拭子作为基线对照和第1、3、8、14和21天获得头皮拭子以通过PCR和16S rRNA测序分析评估AOB的存在/缺乏。

[0439] 无严重不利事件与持续一周的AOB应用有关,并且认为产品是安全的。AOB使用者报告了皮肤状况和质量的清晰改善,如通过在7天应用期后完成的自我评估报告指示。使用皮肤样品的AOB特异性PCR分析,我们可以证明在应用期期间83-100%AOB使用者中存在细菌,而在安慰剂对照样品中检测不到AOB。所有受试者缺乏来自研究启动前获得的基线拭子的AOB,与这些细菌对肥皂和其它商业产品的预测敏感性一致。16S rRNA基因的扩增和样品亚组的测序确认了相应样品中AOB的存在,并且提示了通过局部AOB应用调节皮肤微生物群系中的潜在趋势。总之,基于活AOB的产品是安全的,并且可以保持作为亚硝酸盐和一氧化氮对人皮肤的新型自身调节的局部递送剂的极大希望。

[0440] 如下文表8中所示,当比较第0天与第8天时,亚硝化单胞菌(AOB)比例上升。当比较第0天与第8天时,其它细菌,

[0441] 丙酸杆菌、肠杆菌和柠檬酸杆菌的比例下降。表8中指示的p值证明了用亚硝化单胞菌(AOB)观察到第0天和第8天之间最显著的变化,接着是丙酸杆菌。肠杆菌和柠檬酸杆菌也在较小程度上显示第0天和第8天之间的变化。

[0442] 表8:AOB应用后微生物群系组成的趋势(第0天对第8天)

[0443]

属	P-值(未调节)	倍数变化	趋势
亚硝化单胞菌(AOB)	0.0039	10.0	上
丙酸杆菌	0.0078	0.4	下
肠杆菌	0.0346	0.8	下
柠檬酸杆菌	0.036	0.6	下

[0444] 实施例2:安慰剂对照单独、双盲、随机化、多地点化妆品试验以在有痤疮倾向的受试者中评估化妆品产品改善油性皮肤的外貌、面部毛孔和其它化妆品参数的性能和可耐受性

[0445] 2b期研究:

[0446] A0+喷雾(D23真养亚硝化单胞菌制剂)处理在Skindex,调查人员全局评估和炎性损伤计数(成年人分组)两者中表明强的效力信号。

[0447] 实施例2测试中使用的A0+喷雾制剂包含50mM Na_2HPO_4 和2mM MgCl_2 的水性缓冲溶液中 $1 \times 10^9 \text{CFU/mL}$ 浓度的氨氧化细菌。

[0448] 在4周(两周处理,两周间歇)中,36名具有寻常痤疮的成年人(年龄18+)中B244(D23真养亚硝化单胞菌)的随机化(1:1:1:1)双盲安慰剂对照剂量范围(2、4、8 $\times 10^9 \text{CFU}$)研究。研究有80%把握检测在第2周时IGA(%受试者改善)的30%净改善(合并的B244对安慰剂)。研究还有80%把握检测合并处理组和安慰剂之间从基线的损伤计数的平均变化的30%差异($p < 0.05$)。

[0449] 处理方案的简短汇总如下。受试者将氨氧化细菌施用到脸、颈和头皮,总共持续4周。在4周时间段后,发生氨氧化细菌应用的中断1周。发生生物群系相容性洗发剂和护发素的使用达全部5周。在基线(时间0)、第4周和第5周时进行临床评估。

[0450] 目的

[0451] 进行此多地点、双盲、随机化、4周、安慰剂对照的化妆品试验以评估当由具有轻度至中度痤疮倾向的皮肤的年龄12-45岁的男性和女性使用时A0+喷雾对皮肤外貌和耐受性的总体化妆品效力。

[0452] 汇总

[0453] 总共83名受试者完成了研究,其中42名受试者使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂),并且41名受试者使用安慰剂。在研究过程期间,根据预先确定的随机化分配受试者以使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)或安慰剂。如指示,受试者每天两次将测试材料应用

到毛发、头皮、和脸。在研究的整个过程中,受试者每天一次使用(“生物群系相容性”)标准化肥皂和洗发剂作为支持材料、洗发剂(批次293178;在表5中显示为“优选的浓度”)和清洁剂(批次293162;;在表6中显示为“优选的浓度”)。在4周使用期后,受试者中断测试材料使用(期间仍使用支持材料),并且参与1周消退期。在访视1(基线)、访视2(第4周)、和访视3(第5周)时进行临床评估。受试者在每个时间点时参与以下方案(除非另有指示):

[0454] • 痤疮的临床分级

[0455] 专业临床分级者针对研究后痤疮状态评估每名受试者的VISIA和自拍照片。

[0456] • 痤疮计数

[0457] 专业临床分级者计算每名受试者的前额、左颊、下颏、和右颊(分开)上的炎性损伤(丘疹、脓疱、和囊肿/结节)和非炎性损伤(开放和闭合性粉刺)。

[0458] • 调查人员的全局改善评估(IGIA)

[0459] 调查人员或指派者在第4周和第5周时进行脸的全局痤疮评估。可以经由美国食品药品监督管理局找到IGA的描述,例如在

[0460] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM071292.pdf>: Guidance for Industry;Acne Vulgaris:Developing Drugs for Treatment (U.S.Department of Health and Human Services;Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research(CDER);September 2005,Clinical/Medical。

[0461] • PIH/PIE损伤分级

[0462] 为每名受试者选择炎症后色素沉着过度/炎症后红斑(PIH/PIE)损伤,并且专业临床分级者针对暗度和大小分级所选择的PIH/PIE损伤。

[0463] • 成像方案

[0464] 使用具有Canon Mark II 5D数字SLR照相机(Canon Incorporated,Tokyo,Japan)的VISIA CR光照(Canfield Imaging Systems,Fairfield,New Jersey),使用标准1和2、交叉极化、平行极化、和UV-NF光照条件,对每名受试者的脸(右侧、左侧和中心视图)拍摄数字图像。分析使用交叉极化的数字图像的孔。

[0465] • 调查和自拍照片

[0466] 受试者每周使用其智能手机拍摄标准化的自拍照片(“自己”)并且完成问卷。

[0467] • 可耐受性评估

[0468] 专业临床分级者评估每名受试者的全局脸部的客观刺激参数(红斑、水肿、和鳞屑),并且受试者报告主观刺激参数(刺痛、烧伤、和瘙痒)的程度。

[0469] • 化妆品效力参数的临床分级

[0470] 专业临床分级者评估每名受试者脸部的油性外貌(光泽和感觉)、毛孔外貌、发光、斑点、肤色(颜色)均匀度、视觉平滑、和触觉平滑度。

[0471] • 皮脂仪测量

[0472] 对前额采集一式三份皮脂仪SM 815(Courage+Khazaka,Germany)测量以使用光测量法测量皮肤上的皮脂量。

[0473] • 微生物群系样品收集

[0474] 在颈背部上、右耳后、和右颊(来自每个位置的1)收集微生物群系样品。总体结论

[0475] 来自此多地点、双盲、随机化、4周、安慰剂对照的化妆品试验的总体结果指示证明了测试材料AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的使用在具有轻度和中度痤疮状况的受试者中是安全且有效的。显示了成年人中疾病的严重性和炎性损伤的计数用AO+喷雾处理得到了改善。受试者非常好地耐受AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的使用,在与基线得分相比时所述受试者没有在第4周时针对红斑、鳞屑、水肿、烧伤、刺痛、和瘙痒的临床分级得分的统计学显著增加(恶化)。

[0476] 研究使用标准FDA调查人员全局痤疮(IGA)量表¹以在完全盲的条件下使用VISIA图像评估痤疮状况。当与基线得分相比时,使用AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的受试者,在第4和5周时显示IGA得分的统计学显著降低(改善)。基于从基线的变化的测试材料间的比较指示第4周时痤疮分级的统计学显著差异,有利于AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)。

[0477] 使用AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的痤疮计数的结果显示了当与基线计数相比时,第4和5周时丘疹和炎性损伤计数和第4周时全局损伤计数的统计学显著降低(改善)。虽然在AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)和安慰剂之间没有观察到统计学显著差异,但是数据指示使用AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的成年人受试者中炎性损伤计数的更大且更持续的降低,如图4中显示。图上描绘的AO+喷雾柱形是第一(从左起)和第三(从左起)。图上描绘的安慰剂柱形是第二(从左起)和第四(从左起)。

[0478] 使用Skindex16生活质量调查测量受试者报告的结果。AO+喷雾与捕捉受试者对其疾病的情绪评估的问题组中的变化(改善)有关。具体地,对于皮肤状况伤害(第2周)、皮肤状况的持续性/复发(第4周)、对皮肤状况的担忧(第5周)、和皮肤状况的外观(第2、4、和5周)观察到统计学上显著的改善,有利于AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)。

[0479] 使用AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的临床分级的结果显示了在与基线得分相比时,第4和5周时视觉和触觉平滑,以及第5周时斑点的临床分级得分的统计学显著降低(改善)。

[0480] 测试材料描述

[0481] 表9和表10呈现了每种测试材料和支持材料的描述。

[0482] 表9:测试材料描述

[0483]

TMIN	ID	物理特性	频率
0052-15C	AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)	清澈, 透明液体	每天两次(早晨和晚上)
0053-15C	安慰剂	清澈, 透明液体	每天两次(早晨和晚上)

[0484] 表10:支持材料描述

[0485]

TMIN	ID	物理特性	频率
0099-15C	清洁剂(批次293162)	浅黄色, 透明液体	每天一次
0100-15C	洗发剂(批次293178)	浅黄色, 透明液体	每天一次

[0486] 受试者布置和人口统计数据

[0487] 表11中包括受试者布置信息的汇总。表12中呈现了按方案 (PP) 群体的人口统计学信息。对于可适用的参数,每个类别中的受试者数目与括号中的总受试者的百分比一起列出。

[0488] 表11:受试者布置

[0489]

	所有受试者	AO+喷雾	安慰剂
	n	n	n
登记的受试者	98	49	49
完成的受试者(PP群体)	83	42	41
中断的受试者	15	7	8
中断的原因			
请求撤出的受试者	7	5	2
非顺从性	3	0	3
失去随访	5	2	3

[0490] 表12:人口统计学信息的汇总-PP群体

[0491]

	所有受试者	AO+喷雾	安慰剂
N	83	42	41
年龄(岁)			
平均值	19.8	18.9	20.8
标准差	8.5	7.6	9.3
最小值	12	12	12
中值	17.0	16.0	17.0
最大值	44	40	44

	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
性别			
女性	50 (60.2)	23 (54.8)	27 (65.9)
男性	33 (39.8)	19 (45.2)	14 (34.1)
种族性/人种			
亚裔	8 (9.6)	4 (9.5)	4 (9.8)
黑人或非洲裔美国人	9 (10.8)	5 (11.9)	4 (9.8)
西班牙裔或拉丁裔	6 (7.2)	2 (4.8)	4 (9.8)
白人	50 (60.2)	24 (57.1)	26 (63.4)
[0492] 多种族	10 (12.0)	7 (16.7)	3 (7.3)
皮肤类型			
混合	49 (59.0)	22 (52.4)	27 (65.9)
正常	15 (18.1)	7 (16.7)	8 (19.5)
油性	19 (22.9)	13 (31.0)	6 (14.6)
Fitzpatrick皮肤类型			
I	2 (2.4)	2 (4.8)	0 (0.0)
II	6 (7.2)	5 (11.9)	1 (2.4)
III	49 (59.0)	21 (50.0)	28 (68.3)
IV	19 (22.9)	10 (23.8)	9 (22.0)
V	7 (8.4)	4 (9.5)	3 (7.3)
痤疮类型			
青年期痤疮	55 (66.3)	30 (71.4)	25 (61.0)
成年人痤疮	28 (33.7)	12 (28.6)	16 (39.0)
[0493] 年龄组(岁)			
12-15	33 (39.8)	16 (38.1)	17 (41.5)
16-18	22 (26.5)	14 (33.3)	8 (19.5)
19-28	12 (14.5)	5 (11.9)	7 (17.1)
>28	16 (19.3)	7 (16.7)	9 (22.0)

[0494] 方案和方法

[0495] 在开始研究前,经由使用IRB批准的合格标准文本用电话筛选潜在的受试者。安排具有自我感知的正常、油性和混合皮肤类型的年龄12-45岁的女性和男性青少年和成年人

在诊所进行合格筛选。指示预期的受试者在每次安排的访视前至少3小时除去所有化妆品。

[0496] 在访视1(基线)时,在解释了研究性质并且问答了任何研究相关问题后,年龄18岁以上的预期受试者或任何年龄18岁以下的未成年人受试者的父母/法定监护人阅读并且签署了知情同意表。预期的未成年人受试者阅读并且签署了同意表。对签署此初始文书工作的预期受试者分配筛选号,并且评估以下合格标准:

[0497] • Fitzpatrick皮肤分类:I-V类合格

[0498] Fitzpatrick皮肤分类基于在无阳光暴露的冬季后皮肤对前30-45分钟的阳光暴露的无保护响应。皮肤类型的类别如下在表13中:

[0499] 表13.

[0500]

类型	身体特征	皮肤对UV的反应
I	白色; 非常白皙; 红发或金发; 蓝眼; 雀斑	总是容易灼伤; 从不晒黑
II	白色; 白皙; 红发或金发; 蓝眼、淡褐色眼、或绿眼	总是容易灼伤; 最小程度晒黑

[0501]

III	乳白色; 白皙, 具有任何眼或头发颜色; 非常常见	中等灼伤; 逐渐晒黑
IV	褐色; 典型的地中海白色皮肤	最小程度灼伤; 总是良好晒黑
V	暗褐色; 中东皮肤类型, 黑发, 橄榄色皮肤	很少灼伤; 充分晒黑
VI	黑色; 黑发、黑眼、黑色皮肤	从不灼伤; 深度着色

[0502] • 临床确定的轻度至中等痤疮组合痤疮严重性量表(最小值5-50个炎性损伤和5-100个炎性损伤以取得资格。

[0503] • 脸上至少1个靶标PIH/PIE损伤

[0504] 预期受试者完成合格性和健康问卷。将通过合格性要求的筛选受试者登记到研究中,并且分配受试者号。受试者参与以下方案:

[0505] • 化妆品效力参数的临床分级

[0506] 通过专家盲性临床分级者,使用修改的Griffiths 10分量表³根据以下数值定义(在必要时分配半分得分以准确描述皮肤状况)在脸上对受试者全面评估以下化妆品参数:

[0507] 0=无(最好的可能状况)

[0508] 1-3=轻度

[0509] 4-6=中等

[0510] 7-9=严重(最差的可能状况)

[0511] 根据列出的量表锚定分级以下参数(表14):

[0512] 表14.

[0513]

参数	0 =	9 =
油性外貌(光泽和感觉)	无光泽, 平坦/粗糙外貌	强光泽/油性外貌
毛孔外貌	小、紧密、几乎觉察不到毛孔	大、显著的毛孔
发光	容光焕发、发光外貌	暗淡/粗糙和或/灰黄外貌

[0514]

		貌
斑点	无斑点/白皙	有疤的皮肤外貌
皮肤色调(颜色)均匀	均匀、健康皮肤颜色	不均匀, 脱色外貌
视觉平滑	平滑, 均匀相貌的皮肤肌理	粗糙、不均匀相貌的皮肤肌理
触觉平滑	平滑, 均匀感觉的皮肤肌理	粗糙、不均匀感觉的皮肤肌理

[0515] • PIH/PIE损伤分级

[0516] 专家盲性临床分级者选择每名受试者的脸上的炎症后色素沉着过度/炎性后红斑(PIH/PIE)损伤,并且使用以下分级量表针对暗度和大小对损伤分级:

[0517] 暗度

- 1 比周围皮肤的色调/颜色略亮
- 2 等于周围皮肤的色调/颜色(无可见的PIH/PIE)
- 3 比周围皮肤的色调/颜色略黑/略红
- 4 在中等程度上比周围皮肤的色调/颜色黑/红
- 5 明显比周围皮肤的色调/颜色黑/红
- 6 极其比周围皮肤的色调/颜色黑/红

[0518]

[0519] 大小

- 0 看不到
- 1 直径0.5 mm或更小
- [0520] 2 直径大于0.5 mm - 1.5 mm
- 3 直径大于1.5 mm - 2.5 mm
- 4 直径大于2.5 mm
- [0521] • 痤疮计数
- [0522] 专家盲性临床分级者分别计数并且记录每名受试者的前额、左颊、下颏、和右颊上的炎性痤疮损伤(丘疹、脓疱、和囊肿/结节)和非炎性痤疮损伤(开放性粉刺和闭合性粉刺)(排除鼻上、下颌外形下或沿着头型轮廓,包括眉的损伤)的数目。
- [0523] • 可耐受性评估
- [0524] 通过在每名受试者的脸(化妆品处理区)上全面评估客观和主观刺激的体征和症状来评估局部皮肤可耐受性。评估以下刺激参数:
- [0525] -客观刺激(临床分级):红斑、水肿、和鳞屑
- [0526] -主观刺激(由受试者评估):刺痛、烧伤、和瘙痒
- [0527] 使用以下量表评估刺激评估的结果(在必要时分配半分得分以更好描述临床状况):
- [0528] 红斑
- 0 = 无 化妆品处理区无红斑
- [0529] 1 = 轻度 化妆品处理区的略微但明确的红色
- 2 = 中等 化妆品处理区的明确的红色
- 3 = 严重 化妆品处理区的明显红色
- [0530] 水肿
- 0 = 无 化妆品处理区无水肿/肿胀
- [0531] 1 = 轻度 化妆品处理区略微但明确的水肿
- 2 = 中等 化妆品处理区的明确的水肿
- 3 = 严重 化妆品处理区的明显水肿
- [0532] 鳞屑
- 0 = 无 化妆品处理区无鳞屑
- [0533] 1 = 轻度 化妆品处理区的有限区域中几乎察觉不到的细鳞屑
- 2 = 中等 延及到化妆品处理区的所有区域的细鳞屑
- 3 = 严重 化妆品处理区的全部区域上的皮肤鳞屑和蜕皮
- [0534] 刺痛
- 0 = 无 化妆品处理区无刺痛
- [0535] 1 = 轻度 化妆品处理区的略微刺痛感觉; 实际上不令人烦恼

[0536]

2 = 中等 化妆品处理区的明确刺痛，有时令人烦恼

3 = 严重 化妆品处理区的明显刺痛感觉，引起明确的不适并且可以中断日常活性和/或睡眠

[0537] 烧伤

[0538]

0 = 无 化妆品处理区无烧伤

1 = 轻度 化妆品处理区的略微烧伤感觉；实际上不令人烦恼

2 = 中等 化妆品处理区的明确的温暖烧伤，有时令人烦恼

3 = 严重 化妆品处理区的热烧伤感觉，引起明确的不适并且可以中断日常活性和/或睡眠

[0539] 瘙痒

[0540]

0 = 无 化妆品处理区无瘙痒

1 = 轻度 化妆品处理区的略微瘙痒感觉；实际上不令人烦恼

2 = 中等 化妆品处理区的明确的瘙痒，有时令人烦恼

3 = 严重 化妆品处理区的明显瘙痒感觉，引起明确的不适并且可以中断日常活性和/或睡眠

[0541] 在参与生物检测/成像/微生物群系取样方案前，受试者适应周围温度和湿度条件达至少15分钟。在研究过程期间，将可应用的等待/生物检测室维持于68°F-75°F的温度和范围为35%-65%的相对湿度。

[0542] 在适应后，受试者参与以下方案：

[0543] • 皮脂仪测量

[0544] 在前额上采集一式三份皮脂仪SM 815 (Courage+Khazaka, Germany) 测量以使用不依赖于湿度的光度测定法测量皮肤上的皮脂量。测量是光穿过脂带 (sebutape) (一种在与皮脂接触后变得透明的合成材料) 的传播。基于脂带的透明性，皮脂仪中的微处理器计算皮肤表面上的量(μg 皮脂/ cm^2)。

[0545] • 成像方案

[0546] 在摄影术方案前，诊所人员确保受试者具有无化妆品的清洁脸部，并且受试者从要照相的区域除去了任何珠宝。给受试者提供黑色或灰色的磨砂束发带以头发远离脸部，并且在受试者的衣服上披盖黑色磨砂衬衫或黑色或灰色磨砂布。指示受试者采用自然的、非微笑表情，轻轻闭上眼睛，并且对于每张照片注意定位。在标准光照1 (可见)、标准光照2 (可见/亮)、交叉极化、平行极化、和UV-NF光照条件下使用具有Canon Mark II 5D数字SLR照相机 (Canon Incorporated, Tokyo, Japan) 的VISIACR光站 (Canfield Imaging Systems, Fairfield, New Jersey) 对每名受试者 (中心、右侧、和左侧视图) 拍摄全脸图像。

[0547] • 微生物群系方案

[0548] 在每名受试者的颈背部上、在右耳下、和右颊收集微生物群系样品(来自每个位置的1个)。将拭子从其无菌包装材料取出,从远离拭子的茎部握住,用力摩擦约20次,并且在所取样的位置的3英寸区域里旋转。然后,将拭子置于管(用时间点标记)中,并且将茎部夹住以确保管可以闭合。收集皮肤拭子,并且在-80℃冷冻,以用于随后的DNA提取和微生物群系概况分析(profiling)。

[0549] 指示受试者如何使用其智能手机每周拍摄标准化的自拍照片(“自拍”)并且完成问卷。

[0550] 对受试者分配支持材料的单元,并且指示每天一次将洗发剂(批次293178)应用到头发和头皮,并且在脸上每天一次使用清洁剂(批次293162),持续整个研究。根据预先确定的随机化对受试者分配测试材料、A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)、或安慰剂的预先称重的单元。

[0551] 对受试者给予以下口头和书面用法指示:

[0552] 用法指示

[0553] 在清洁后和在睡前每天两次对头发、头皮和脸应用测试材料(每次至少6次抽吸)(每个早晨和晚上),并且从不直接在淋浴前应用。在产品应用后1小时不应用任何化妆品(粉底、眼影等),并且使用最小量。

[0554] 给受试者提供书面用法指示、研究指示、研究访视的日历、和记录产品应用时间的每日日志。

[0555] 受试者返回诊所进行访视2(第4周),并且参与以下方案:

[0556] -诊所人员记录伴随药物,并且对受试者询问其健康的变化。若适用的话,记录不利事件。

[0557] -收集每日日志,审阅遵从性,并且由诊断保留。分配新的日志。

[0558] -收集测试材料单元,视觉检查,针对遵从性称重,并且由诊所保留。对支持材料视觉检查遵从性,并且返回给受试者。

[0559] -对于基线,受试者参与如所述的以下方案:

[0560] • 化妆品功效参数的临床分级

[0561] • PIH/PIE损伤分级

[0562] • 痤疮计数

[0563] • 可耐受性评估

[0564] -受试者参与以下方案:

[0565] • 使用以下量表和数字定义进行调查人员全局改善评估(IGA):

[0566] 1=恶化

[0567] 2=无改善

[0568] 3=轻度改善

[0569] 4=中等改善

[0570] 5=明显改善

[0571] -受试者适应至少15分钟,并且然后对于基线,参与如下所述的以下方案:

[0572] • 皮脂仪测量

[0573] • 成像方案

[0574] • 微生物群系取样

[0575] 在完成第4周评估后,受试者参与1周消退期,其中中断测试材料使用(仍使用支持材料)。受试者返回到诊所进行访视3(第5周),并且参与以下方案:

[0576] -诊所人员记录伴随药物,并且对受试者询问其健康的变化。若适用的话,记录不利事件。

[0577] -收集每日日志,审阅遵从性,并且由诊断保留。

[0578] -收集支持材料单元,视觉检查遵从性,并且由诊所保留。

[0579] -对于基线和第4周,受试者参与如下所述的以下方案:

[0580] • 化妆品效力参数的临床分级

[0581] • PIH/PIE损伤分级

[0582] • 痤疮计数

[0583] • 调查人员的全局改善评估

[0584] • 可耐受性评估

[0585] -受试者适应至少15分钟,然后对于基线,参与如下所述的以下方案:

[0586] • 皮脂仪测量

[0587] • 成像方案

[0588] • 微生物群系取样

[0589] 在完成第5周研究方案后,通过盲性临床分级者进行以下方案:

[0590] • 痤疮分级

[0591] 使用修改的Griffiths 10分量表³(其中0=无痤疮和9=严重痤疮)在基线、第4周和第5周时在诊所拍摄的VISIA图像上和从基线和第1、2、3、4、和5周时拍摄的受试者的自拍照片进行痤疮的临床分级以筛选受试者的潜在痤疮的任何恶化。

[0592] 另外,使用FDA IGA量表¹(0-4)对VISIA图像进行痤疮的临床分级:

[0593]

0 = 干净 无炎性或非炎性损伤

1 = 几乎干净 几乎没有非炎性损伤,具有不超过1个小的炎性损伤

2 = 轻度 大于1级,一些非炎性损伤,具有不超过几个炎性损伤(仅丘疹/脓疱,无结节性损伤)

3 = 中等 大于2级,多至多个非炎性损伤,并且可以具有一些炎性损伤,但是不超过一个小的结节性损伤

4 = 严重 大于3级,多至多个非炎性和炎性损伤,但是不超过几个结节性损伤

[0594] 生物统计学和数据管理

[0595] 全方案(PP)群体是所有统计学分析测试的主要群体。PP群体包括视为对于研究参与而言合格并且根据方案完成研究的所有受试者。仅分析完成受试者的数据。在AE、SAE、非遵从性或调查人员判断的情况下可以已经从分析中除去受试者。

[0596] 在统计学分析前对每名受试者和时间点的一式三份皮脂仪测量取平均值。

[0597] 使用由Stephens&Associates开发的Macroversion“Pore_20121207”使用Image Pro Plus v7软件(MediaCybernetics, Inc., Rockville, Maryland)对使用交叉极化光照条件拍摄的数字图像分析毛孔。在颊区域上选择不规则形状的兴趣区域以进行分析。毛孔分析报告毛孔数目(计数)、由毛孔覆盖的总面积、和毛孔的平均深度的数值。

[0598] 如下对每个分级位置和对总共4个分级区域(前额、右颊、左颊、和下颏)分析痤疮计数数据:

[0599] • 分别为丘疹、脓疱、囊肿/结节、开放性粉刺和闭合性粉刺。

[0600] • 分别为炎性痤疮损伤(组合丘疹、脓疱和囊肿/结节)和非炎性痤疮损伤(组合开放性粉刺和闭合性粉刺)

[0601] • 全局损伤(总共所有5类痤疮)

[0602] 对于化妆品效力分级数据、痤疮分级数据、PIH/PIE损伤分级数据、痤疮计数、可耐受性评估数据、皮脂仪测量、和毛孔图像分析参数,提供了描述统计汇总,包括所有访视时的观察数目(N)、平均值、中值、标准差(SD)、最小值(MIN)和最大值(MAX)。

[0603] 在每次适用的基线后时间点时评估从基线变化(定义为基线后数值减去基线数值)的平均值。在第4周时评估从基线的均值变化为0的零假设,并且使用化妆品效力分级参数、痤疮分级、痤疮计数、毛孔数目(计数)的图像分析、和可耐受性评估的Wilcoxon符号秩检验,以及皮脂仪测量和毛孔图像分析(由毛孔覆盖的总面积,和毛孔的平均深度)的成对t检验测试。对于消退期,对第5周时间点时从第4周的变化进行类似的分析,包括使用Wilcoxon符号秩检验测试调查人员全局改善评估。

[0604] 使用以下公式计算从基线/第4周的百分比均值变化和显示改善或恶化的受试者的百分比:

[0605] 从基线的百分比均值变化 = (访视均值得分 - 基线均值得分) x 100 / 基线均值得分

[0606] 改善/恶化受试者的百分比 = (从基线的改善/恶化受试者的数目) x 100 / 受试者总数

[0607] 就从基线的变化而言在第4周时进行处理细胞之间的比较。使用化妆品效力分级参数、痤疮分级、痤疮计数、毛孔数目(计数)的图像分析、和可耐受性评估的Wilcoxon秩和检验,和用于皮脂仪测量和毛孔图像分析(由毛孔覆盖的总面积和毛孔的平均深度)的两样品t检验在每个适用的基线后时间点时对所有参数(除了调查人员全局改善评估外)测试从基线的均值变化在2个处理细胞之间相等的零假设。

[0608] 对于消退期,就从第4周的变化而言在第5周进行相似的分析,包括使用Wilcoxon秩和检验测试调查人员全局改善评估。

[0609] 对于化妆品效力参数的临床分级、PIH/PIE损伤分级、痤疮分级、痤疮计数、调查人员全局改善评估、皮脂仪测量、和毛孔大小的图像分析呈现了总体统计学结果,以及通过年龄(12-15, 16-18, 19-28, 29和以上)、性别(男性/女性)、成年人痤疮(年龄19和以上)和青年期痤疮(年龄小于19岁)、和Fitzpatrick皮肤类型(III、IV、和V[由于小的样品尺寸而没有对I和II运行分析])分层的统计学结果。另外,对于年龄、性别、成年人和青年期痤疮、和Fitzpatrick皮肤类型呈现了通过处理的人口统计制表。

[0610] 对于痤疮分级,对于每个适用的时间点和处理计算了使用2种量表(Griffiths量表³和FDA量表¹)的得分的Spearman秩相关系数。

[0611] 对于相关系数等于0的零假设,提供统计学检验。未进行处理比较。对于来自VISIA和自拍图像的修改的Griffiths得分计算相似的相关系数。

[0612] 提供SkinDex数据(评估生活质量的受试者报告的结果),其含有在基线和第2、4和5周时来自每名受试者的对16个问题的答复。对于SkinDex数据,提供了频率表,其包括计数和百分比。提供了关于临床分级数据的相似分析,包括根据年龄、性别、成年人和青年期痤疮、和Fitzpatrick类型的数据分析。

[0613] 关于Skindex的信息可以经由以下找到:[http://www.researchgate.net/publication/51646907_Using_the_Skindex-16_and_Common_Terminology_Criteria_for_Adverse_Events_to_assess_rash_symptoms_results_of_a_pooled-analysis_\(N0993\)](http://www.researchgate.net/publication/51646907_Using_the_Skindex-16_and_Common_Terminology_Criteria_for_Adverse_Events_to_assess_rash_symptoms_results_of_a_pooled-analysis_(N0993))。

[0614] 提供了调查,其含有在第1、2、3、4、和5周时受试者回答的对37个问的答复。

[0615] 对于问题1到19,答复范围为0(恶化)至6(改善)。对于问题的剩余部分,答复范围为-1(否/无变化)至1(是/正面变化)。

[0616] 对于调查数据提供了频率表,其包括选择每个答复选项的受试者的计数和百分比。另外,进行二项(符号)检验以在每个时间点时对于每个问题测试组合的指定为有利/正面的答复的比例是否等于组合的指定为不利/负面的答复。使用费希尔(Fisher)精确检验进行处理比较。对于问题#1至#19,检验零假设是有利/不利/中性答复的比例在处理间是相等的。对于问题的剩余部分,检验零假设是正面/负面答复的比例在处理间是相等的。还根据年龄、性别、成年人和青年期痤疮、和Fitzpatrick类型进行了数据的分析。所有统计学检验在限制性水平 $\alpha=0.05$ 是2侧的。报告了P值是3位小数(0.000)。在研究中不考虑多重测试校正。使用SAS software第9.30版系列(SAS Statistical Institute)进行统计学分析。使用Stephens电子数据捕获(EDC)系统记录临床分级和生物检测测量。Stephens EDC是设计用于以电子形式收集临床数据的计算机化系统。EDC的3个主要方面由数据输入的图形用户界面、检查用户数据的验证组件、和用于分析收集数据的报告工具组成。

[0617] 结果

[0618] 从图像对痤疮的临床分级

[0619] 对于使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的受试者,当与基线得分相比时在第4和5周时使用FDA量表¹和第5周时使用Griffiths量表³在VISIA图像上痤疮分级得分上有统计学显著降低(改善)。基于痤疮分级得分的从基线的变化,测试材料间的比较指示在第4周时使用FDA量表¹的VISIA成像痤疮分级统计学显著的差异,有利于A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)。

[0620] 从图像分级结果的相关系数的分析指示基线、第4周和第5周时VISIA图像上痤疮分级得分之间的统计学显著的正相关(相关系数范围为0.495-0.847),这提示了自拍照片可以是用于记录临床试验期间的进展的可行方法。

[0621] 痤疮计数

[0622] 所有受试者

[0623] 当与基线计数相比时,使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的受试者具有第4和5周时丘疹和炎性痤疮和第4周时对于全局损伤的总共4个分级区域(前额、左颊、下颏、和右颊)的计数的统计学显著降低(改善)。当与基线计数相比时,使用安慰剂的受试者具有第4

和5周时开放性粉刺、闭合性粉刺、非炎性痤疮、和全局损伤和第4周时丘疹和炎性痤疮的总共4个分级区域的计数的统计学显著降低(改善)。基于对于总共4个分级区域的痤疮计数从基线的变化的测试材料间的比较指示第4周时闭合性粉刺的统计学显著差异,有利于安慰剂。

[0624] 成年人痤疮受试者

[0625] 当与基线计数相比时,使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的受试者具有第4和5周时丘疹、炎性痤疮、和全局损伤的总共4个分级区域(前额、左颊、下颚、和右颊)的痤疮计数的统计学显著降低(改善)。当与基线计数相比时,使用安慰剂的受试者具有第4和5周时闭合性粉刺、非炎性痤疮、和全局损伤和第5周时开放性粉刺的总共4个分级区域的痤疮计数的统计学显著降低(改善)。基于对于总共4个区域的痤疮计数从基线的变化的测试材料间的比较指示第4周时对于丘疹有利于A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)和第5周时对于非炎性痤疮有利于安慰剂的统计学显著差异。

[0626] PIH/PIE损伤分级

[0627] 所有受试者

[0628] 当与基线得分相比时,使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)或安慰剂的受试者具有第4和5周时损伤1和损伤2的暗度和大小的PIH/PIE损伤分级得分的统计学显著降低(改善)。基于PIH/PIE损伤分级得分的从基线的变化的测试材料间的比较指示第4周时损伤1的大小的统计学显著差异,有利于安慰剂。

[0629] 成年人痤疮受试者

[0630] 当与基线得分相比时,使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)或安慰剂的受试者具有第4和5周时损伤1的暗度和第5周时损伤1的大小,以及对于安慰剂在第4周时损伤1的大小的PIH/PIE损伤分级得分的统计学显著的降低(改善)。基于PIH/PIE分级得分的从基线的变化的测试材料间的比较指示没有统计学显著差异。

[0631] SkinDex16

[0632] 来自使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的受试者的SkinDex16数据的结果指示当与基线得分比较时下列询问的答复得分的统计学显著降低(改善)和时间点:

[0633] -担忧皮肤状况-第2周

[0634] -皮肤状况的外观-第2、4、和5周

[0635] -对皮肤状况感到挫折-第2和4周

[0636] -对皮肤状况感到窘迫-第2和5周

[0637] -对皮肤状况感到苦恼-第2和4周

[0638] 使用安慰剂的受试者的结果指示当与基线得分相比时在第4周时询问“皮肤状况的持续性/复发”的答复得分的统计学显著增加(恶化)。这显示于图2A。图上描绘的A0+喷雾柱形是第一(从左起)和第三(从左起)。图上描绘的安慰剂柱形是第二(从左起)和第四(从左起)。图3A还显示了使用A0+喷雾在第2周、第4周和第6周时皮肤状况的持续性的改善。描绘A0+喷雾数据的线存在于描绘安慰剂数据的线上方。

[0639] 基于SkinDex答复得分的从基线的变化的测试材料间的比较指示在指定的时间点时以下询问的统计学显著差异,有利于A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂):

[0640] -皮肤状况伤害-第2周

[0641] -皮肤状况的持续性/复发-第4周

[0642] -担忧皮肤状况-第5周

[0643] -皮肤状况的外观-第2、4、和5周

[0644] 可耐受性评估

[0645] 所有受试者和成年人痤疮

[0646] 当与基线得分相比时在第4周和第5周和当将第5周与第4周相比时,A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)或安慰剂的使用在消退期期间没有产生红斑、鳞屑、水肿、烧伤、刺痛、和瘙痒的可耐受性评估得分的任何统计学显著增加(恶化)。

[0647] 基于可耐受性评估得分的从基线的变化的测试材料间比较指示第4和5周时无统计学显著差异。

[0648] 化妆品功效参数的临床分级

[0649] 所有受试者

[0650] 当与基线得分相比时,使用测试材料A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)达4周的受试者具有第5周(消退)时斑点和第4和5周(消退)时视觉和触觉平滑的临床分级得分的统计学显著降低(改善)。

[0651] 当与基线得分相比时,使用安慰剂的受试者在第4周时具有油性外貌(光泽和感觉)的临床分级得分的统计学显著降低(改善)。基于临床分级得分的从基线的变化的测试材料间比较指示第5周时斑点的统计学显著差异,有利于A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)。

[0652] 成年人痤疮受试者

[0653] 当与基线得分相比时,使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的受试者具有第5周时斑点和第4周时触觉平滑的临床分级得分的统计学显著降低(改善)。基于临床分级得分的从基线的变化的测试材料间比较指示第5周时斑点和皮肤色调(颜色)均匀性的统计学显著差异,有利于A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)。

[0654] 皮脂仪测量

[0655] 所有受试者和成年人痤疮

[0656] 表15、16、和17与皮脂仪测量相关,并且显示了A0B应用降低痤疮患者脸上的皮脂水平。认为过量的皮脂促成痤疮。

[0657] 表15.用于皮脂仪测量的C15-CD035描述统计量

[0658]

参数	处理	时间点	N (总体 可用)	平均值	标准差	最小值	中值	最大值
皮脂仪测量	AO+ 喷雾	基线	18	151.69	39.76	109.33	153.5	222.33
		第4周	18	117.17	54.98	56.67	99.17	217.67
		第5周	18	128.94	63.61	45.67	108.1	240.33
	安慰剂	基线	18	154.50	47.68	100.67	142.6	249.33
		第4周	18	148.89	62.53	42.00	143.3	248.33
		第5周	18	120.56	67.96	38.67	112.0	299.00

[0659] 表16. 用于皮脂仪测量的从基线统计量的C15-CD035变化

[0660]

参数	处理	时间点	N (总体 可用)	改善的 受试者, %	恶化的 受试者, %	均值 变化	变化的 标准差	均值 变化, %	配对 T检验P 值 ^a
皮脂 仪测量	AO+ 喷雾	第 4 周	18	77.8	22.2	-34.52	39.96	-22.8	0.002
		第 5 周	18	61.1	38.9	-22.74	46.27	-15.0	0.052
	安慰剂	第 4 周	18	50.0	50.0	-5.61	46.91	-3.6	0.619
		第 5 周	18	77.8	22.2	-33.94	54.56	-22.0	0.017

[0661] ^a从配对t检验计算

[0662] 测试假设是从基线的均值变化等于0。

[0663] 表17. 皮脂仪测量的处理之间的C15-CD035比较

	参数	时间点	比较	评估的 差异(SE)	成对 P 值 ^a
[0664]	皮脂仪测量	第4周	AO+喷雾对安慰剂	-28.91 (14.52)	0.055
		第5周	AO+喷雾对安慰剂	11.20 (16.86)	0.511

[0665] ^a从两样品t检验计算。

[0666] 测试假设是从基线的均值变化在处理之间是相等的。

[0667] 毛孔参数的图像分析

[0668] 当与任一测试材料的基线数值相比时,在第4周时毛孔数目、由毛孔覆盖的总面积、和毛孔的平均深度的图像分析数据上没有统计学显著变化。

[0669] 基于图像分析数据的从基线的变化的测试材料间的比较指示第4周时毛孔的平均深度的统计学显著差异,有利于安慰剂。

[0670] 讨论和结论

[0671] 来自此多地点、双盲、随机化、4周、安慰剂对照化妆品试验的总体结果指示使用测试材料AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)表明治疗轻度至中等痤疮的安全性和效力。疾病的严重性、受试者报告的生活质量、和炎性损伤计数的数目都显示在4周治疗过程的情况下AO+处理组中的改善。AO+处理看起来在成年人痤疮状况中具有特别有益的效果。

[0672] 研究使用标准FDA调查人员全局痤疮(IGA)量表¹以使用VISIA图像在完全盲性条件下评估痤疮状况。当与基线得分相比时,来自VISIA图像的痤疮分级的结果指示使用AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的受试者具有在第4和5周时使用FDA量表¹的IGA得分和在第5周时使用Griffiths量表³的得分的统计学显著降低(改善)。基于从基线的变化的测试材料间的比较指示在第4周时使用FDA量表¹的痤疮分级的统计学显著差异,有利于AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)。(参见图1)。

[0673] 痤疮计数的结果显示了使用AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)导致当与基线计数相比时在第4和5周时丘疹和炎性损伤计数,和第4周时全局损伤计数的统计学显著降低(改善)。虽然在AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)和安慰剂之间没有观察到统计学显著差异,但是数据指示使用AO+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的成年人受试者中痤疮计数的更好且更持续的降低。

[0674] 研究的测试产品含有活的真养亚硝化单胞菌的AO+喷雾将汗中的氨局部转化为酸化的亚硝酸盐和一氧化氮。预期此机制通过降低局部炎症并且降低致病性细菌的增殖潜在减轻痤疮的主要原因。相对短的4周时段中丘疹和炎性损伤的降低和IGA的VISIA分级与AO+喷雾的预期机制一致。图1显示了与安慰剂相比,通过使用AO+喷雾,第4周时改善的IGA结果。图上描绘的AO+喷雾柱形是第一(从左起)和第三(从左起)。图上描绘的安慰剂柱形是第二(从左起)和第四(从左起)。

[0675] 在临床前研究中,较高浓度的真养亚硝化单胞菌显示针对引起痤疮的生物体痤疮丙酸杆菌的增强的抗微生物效应,并且加速皮肤愈合。使用Skindex16生活质量调查测量受

试者报告的结果。A0+喷雾与捕获受试者对其疾病的情绪评估的问题组中的变化(改善)相关。具体地,对于皮肤状况伤害(第2周)、皮肤状况的持续性/复发(第4周)(参见图2A)、担忧皮肤状况(第5周)、和皮肤状况的外观(第2、4、和5周),观察到统计学显著的改善,有利于A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)。皮肤状况的外观显著改善,如可以在图2B中看到。图上描绘的A0+喷雾柱形是第一(从左起)和第三(从左起)。图上描绘的安慰剂柱形是第二(从左起)和第四(从左起)。图3B也显示了使用A0+喷雾在第2周、第4周和第6周时皮肤状况的外观的改善。描绘A0+喷雾数据的线存在于描绘安慰剂数据的线上方。

[0676] 使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的临床分级的结果显示了当与基线得分相比时在第4和5周时视觉和触觉平滑和当与基线得分和与安慰剂相比时在第5周时斑点的临床分级得分的统计学显著降低(改善)。

[0677] 受试者非常好地耐受使用A0+喷雾(真养亚硝化单胞菌制剂)的使用,当与基线得分相比在第4周时红斑、鳞屑、水肿、烧伤、刺痛、和瘙痒的临床分级得分没有统计学显著增加(恶化)。

[0678] AE的发生率为约2%,并且与来自A0+喷雾的约3,000名使用者的自发报告的发生率一致。此安全性可耐受性概貌对于包括女性和青少年的许多群体将是有吸引力的。

[0679] 此临床试验是使用自拍照片(“自拍”)捕获试验过程期间的脸部痤疮状况的首创之一。为了测定自身自拍照片对于临床评估是否具有足够质量,通过盲性的受过训练的分级者评估由受试者拍摄的照片和诊所中拍摄的VISIA-CR图像。来自分级结果的相关系数的分析指示第4周和第5周时来自VISIA图像(使用Griffiths量表³)和来自自拍图像(使用Griffiths量表³)的痤疮分级得分之间的统计学显著的正相关(相关系数范围为0.692-0.847),提示了受试者的自拍照片可以是用于记录临床试验期间的进展的可行方法。

[0680] 参考文献

[0681] 1.U.S.Food and Drug Administration.Guidance for industry:acne vulgaris:developing drugs for treatment.September 2005.<http://www.fda.gov>.

[0682] 2.Shai,A.,Maibach,HI,Baran,R.Baran.Acne in Handbook of Cosmetic skin Care.Publisher

[0683] Martin Duntiz Ltd.,Chapter 9,81-100,2001.

[0684] 3.Griffiths CE,Wang TS,Hamilton TA,Voorhees JJ,Ellis CN.A photonumeric scale for the

[0685] assessment of cutaneous photodamage.Arch Dermatol.1992;128(3):347-351.

[0686] 4.Rizer,RL,Mills,OH,Trookman,NS.The assessment of acne:a re-evaluation of grading

[0687] strategies.Scientific Poster,Annual Meeting of the Am.Acad.Dermatol (2001).

[0688] 通过引用并入

[0689] 本文提及的所有出版物和专利都通过引用整体并入本文,如同每个单独的出版物或专利具体地且单独地指出通过引用并入一样。

[0690] 虽然已经讨论了本发明的具体实施方案,但是上述说明书是阐述性的而不是限制

性的。在阅读本说明书和所附权利要求书后,本发明的许多变化对于本领域技术人员来说将变得显而易见。本发明的全部范围应该通过参考权利要求以及它们的等同方案的全部范围和说明书以及此类变化来确定。

[0691] 某些实施方案在所附权利要求书内。

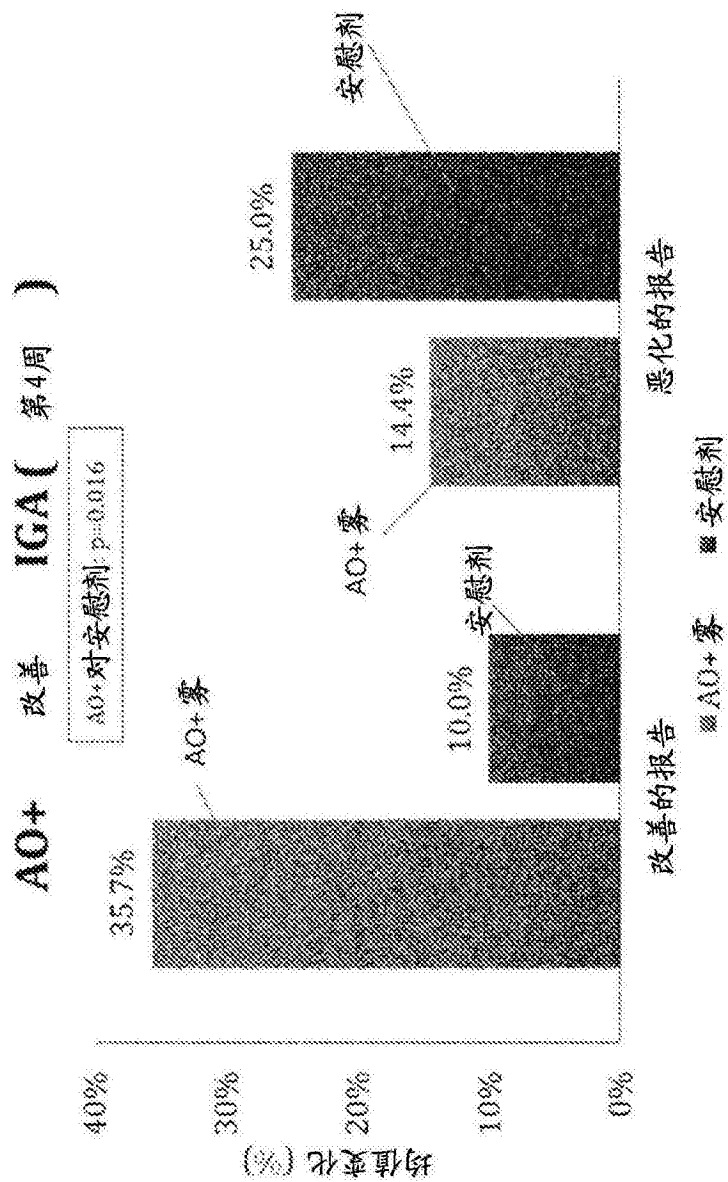


图1

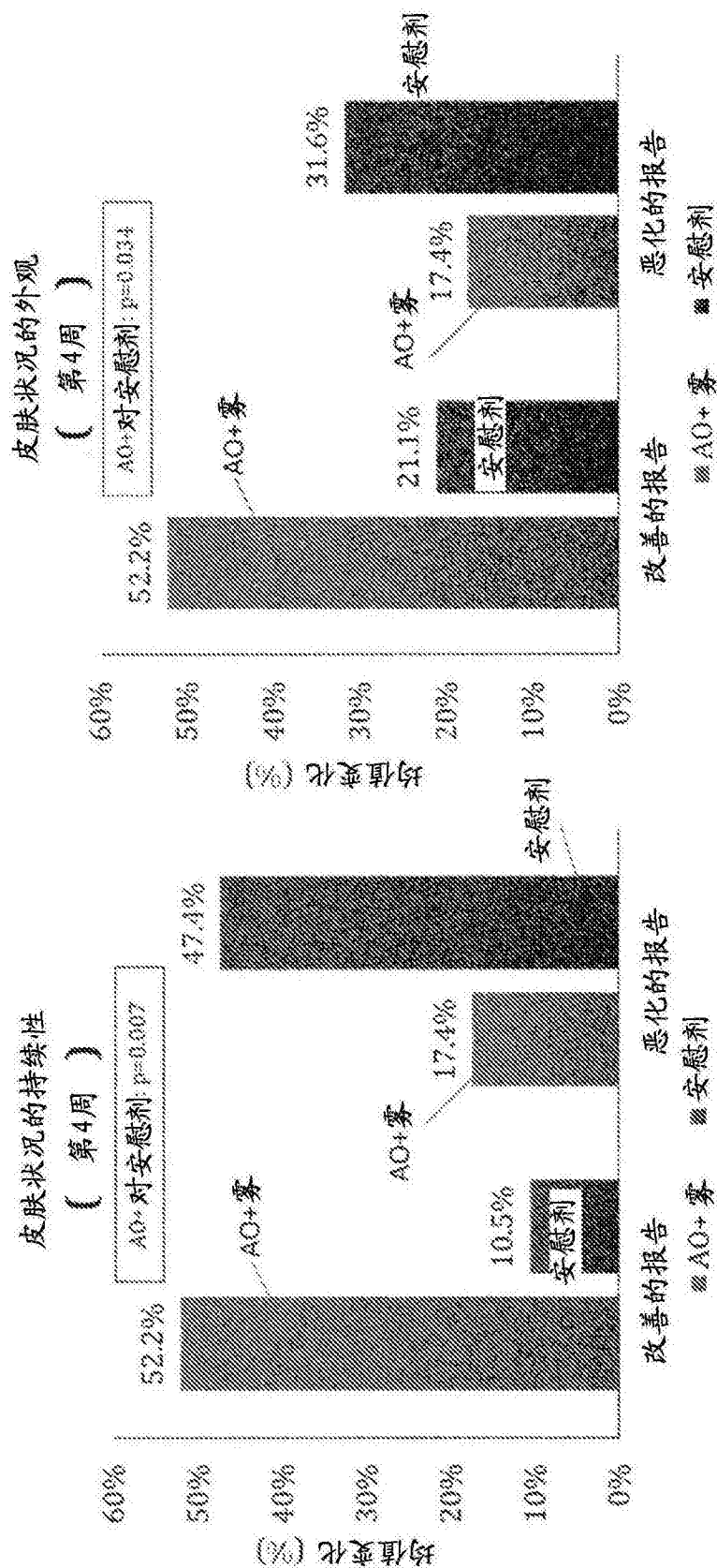


图 2B

图 2A

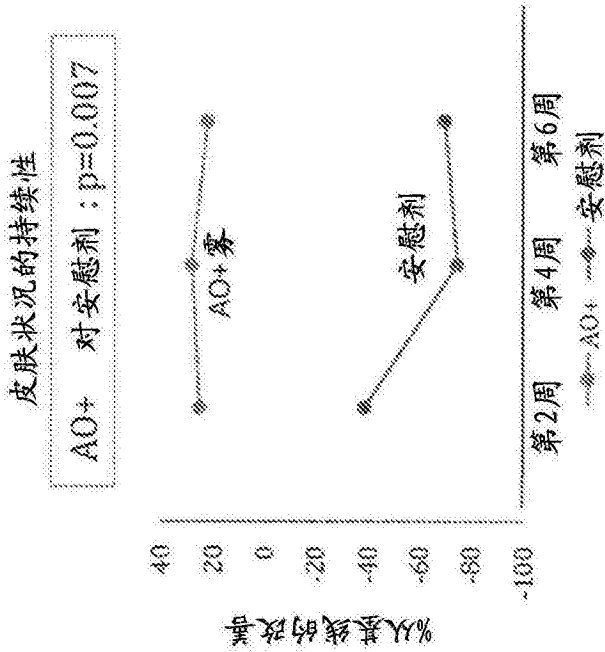


图3A

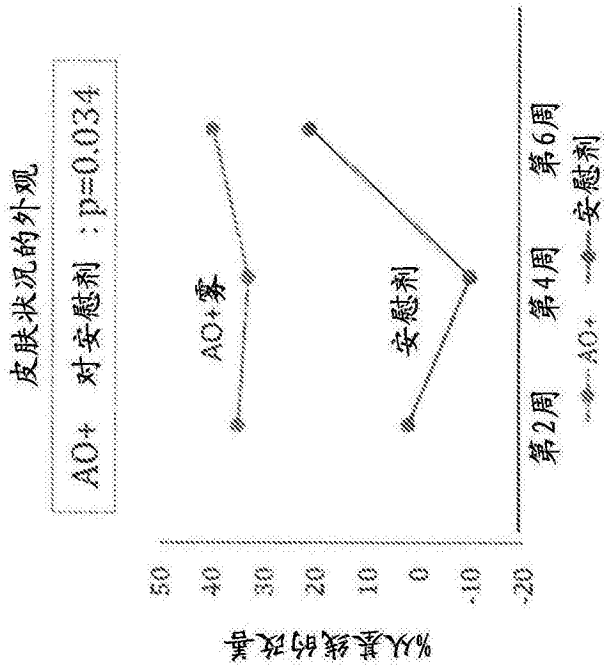


图3B

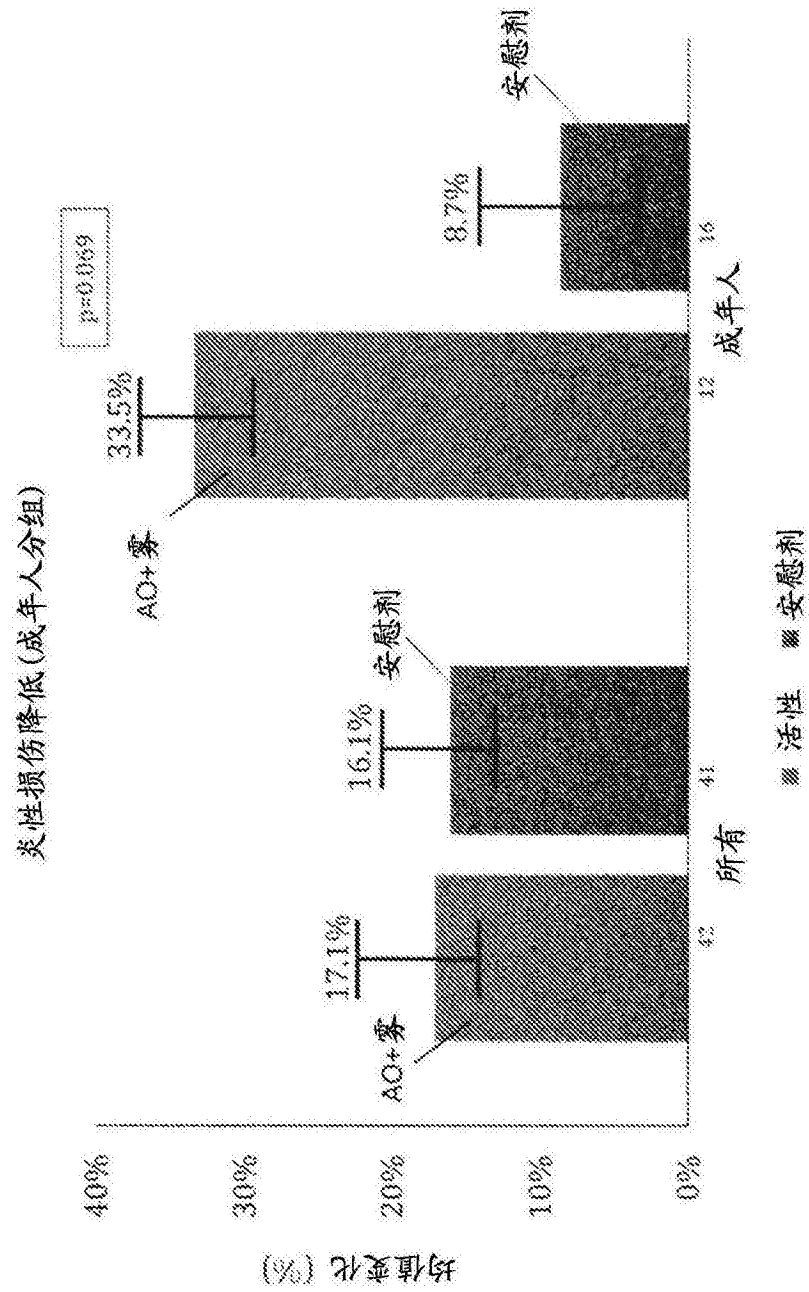


图4