



## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

用於治療皮膚損傷之細菌性分泌蛋白質體

### 【英文發明名稱】

BACTERIAL SECRETOME FOR USE IN THE  
TREATMENT OF SKIN LESIONS

### 【技術領域】

【0001】本發明係有關於一種細菌性分泌蛋白質體 (bacterial secretome) 在皮膚損傷 (skin lesions) 之治療 (treatment)[而且更特別是傷口癒合 (wound healing)]的領域上之一新穎用途。本發明亦係有關於包含有這樣的一種細菌性分泌蛋白質體作為活性劑 (active agent) 之美容或皮膚科組成物 (cosmetic or dermatological compositions)。

### 【先前技術】

【0002】傷口癒合是一種複雜且動態的生物過程 (complex and dynamic biological process)，它涉及到許多局部性或全身性因子 (local and systemic factors) 在正常的組織修復 (normal tissue repair) 中的交互作用 (interaction)。癒合在三種相互依存的相 (three interdependent phases) 中進展 (progresses)：止血 (haemostasis) 與發炎 (inflammation)、增殖 (proliferation) 以及再成型 (remodelling) (General principles of wound healing. Witte MB, Barbul A. Surg Clin North Am. 1997 June; 77(3):509-28)。增殖涉及到三個可清楚觀察的過程：肉芽形成 (granulation)、收縮 (contraction) 以及再上皮化 (re-epithelialization)。

【0003】在肉芽形成的期間當中，修復過程中所涉及的細胞被觀察到會增殖 (proliferate) 而且朝向傷口床 (wound bed) 來徙動 (migrate)。舉例而言，巨噬細胞 (macrophages)、纖維母細胞 (fibroblasts) 和內皮細胞 (endothelial cells) 在那裡被發現。巨噬細胞穩定地釋放 (steadily release) 趨化性因子 (chemotactic factors) 以及生長因子 (growth factors)。纖維母細胞在傷口的基部 (base) 處建構 (construct) 細胞生長 (cell growth) 所需要的新細胞基質 (new cellular matrix)。這個搭支架 (scaffolding) 支持細胞徙動 (cell migration)。最後，內皮細胞觸發 (trigger) 會建立 (establish) 新的微血管 (capillaries) 之血管芽 (vascular buds) 的形成 (formation)，因而恢復灌注 (restoring perfusion) 以及確保 (ensuring) 傷口內的細胞之代謝活性 (metabolic activity) 所必需的氧氣 (oxygen) 和營養素 (nutrients) 的供應 (supply)。

【0004】傷口收縮 (wound contraction) 是一用以減少傷口尺寸的機制 (mechanism)，而纖維母細胞在這個收縮中扮演一領導角色。

【0005】再上皮化在於一表皮 (epidermis) 的再生 (regeneration)，該表皮覆蓋一傷口以形成一對抗外在環境 (external environment) 的有效屏障 (effective barrier)，能夠變成有色素的 (becoming pigmented) 以及回復 (recovering) 它的感覺和免疫功能 (sensory and immune functions)。其因此涉及到角質細胞 (keratinocyte) 徙動與增殖的細胞過程

(cellular processes)，還有這個新上皮(neo-epithelium)的分化(differentiation)以及一連接真皮(dermis)和表皮的基底膜(basal membrane)的恢復(restoration)。當基底細胞(basal cells)朝向傷口的中心之徙動使得兩個傷口邊緣會合(meet)時，一波的細胞有絲分裂(a wave of cell mitosis)發生(occurs)俾以充填由該徙動所留下的空間(spaces)以及為三維再生(three-dimensional regeneration)中的上皮組織(epithelial tissue)提供細胞。

【0006】角質細胞、纖維母細胞和內皮細胞的增殖階段(proliferation stages)可被視為是顯示一活性劑之癒合活性(healing activity)的功能現象(functional phenomena)之一者。提高的纖維母細胞增殖會參與一深層傷口的癒合(到達真皮)，而提高的角質細胞增殖會參與再上皮化。

【0007】當癒合缺陷(healing defects)或不良的癒合(poor healing)造成難看的(unsightly)而且大多為永久可見的標記(mostly permanent visible marks)[諸如厚疤痕(thick scars)或癭瘤(keloids)]之時，癒合也會挑起(poses)美容問題(cosmetic problems)。

【0008】所有的美容和皮膚外科程序(cosmetic and dermatological surgical procedures)，還有病理性和非醫療創傷性損傷(pathological and nonmedical traumatic lesions)[抓痕(scratches)、割傷(cuts)、刮傷(scrapes)、燒傷(burns)]留下疤痕。整形外科醫師(plastic surgeons)的主要技藝之一是要控制疤痕形成(scar formation)。

【0009】舉例而言，壓力(pressure)已被使用於燒傷疤痕歷時多年，而最近被組合以被直接地放置在疤痕上的矽膠片(silicone sheeting)。

【0010】對於提出用於促進(promoting)受損皮膚(damaged skin)的癒合以及改善疤痕的美容外觀(cosmetic appearance)之新穎組成物，存在有一需求。

【0011】首次地，且令人驚訝地，申請人已顯示一種衍生自一分離自地下水(groundwater)之細菌菌株(bacterial strain)[或細菌(bacterium)] LMB64的細菌性分泌蛋白質體在組織再生(tissue regeneration)以及皮膚損傷的癒合上之有益性質。

【0012】這個細菌已為申請人描述於專利申請案WO 2012/085182之中。更特別地，該細菌已就它的抗發炎活性(anti-inflammatory activities)而被照此描述。又更特別地，被命名為S0、E0和ES0的萃取物(extracts)被描述與例證(exemplified)，該等萃取物分別地係由下列所構成(consisting of)：與生物量(biomass)分開的培養物上澄液(culture supernatant)，溶解的細胞(lysed cells)之生物量，以及培養物在鹼性pH之下培育(incubation)歷時數小時之後的上澄液。只有萃取物E0和ES0的藥理活性(pharmacological activities)被測試，而被顯示出的是：這些萃取物E0和ES0能夠誘發(induce)細胞激素(cytokines)以及蘭格漢氏細胞(Langerhans cells)的成熟(maturation)(就E0而言)，還有TLR2/TLR4/TLR5的活化(activation)、PARs

的拮抗劑 (antagonists) 以及抗微生物勝肽 (antimicrobial peptides) 的誘發 (induction) (就 ES0 而言)。這些結果暗示該等萃取物在治療諸如皮膚搔癢 (pruritis)、乾癬 (psoriasis)、濕疹 (eczema) 或異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 的發炎性疾病 (inflammatory diseases) 上的用途。

【0013】出乎意料之外，申請人在此顯示：一種不是由與上面所述的萃取物 ES0 和 E0 之相同組份所構成，但主要是由該細菌 LMB64 所分泌 (secreted) 且被外部化 (externalized) 至培養物上澄液中的生物分子 (biomolecules) 所構成之細菌性分泌蛋白質體具有令人驚異的癒合性質 (healing properties)。

### 【發明內容】

【0014】根據一個第一具體例，本發明係有關於一種含有一包含有序列辨識編號 1 (SEQ ID No. 1) 之序列的 16S rRNA 或任何一個與該序列辨識編號 1 之序列具有至少 80% 相同性 (identity) 的序列之屬於乙型變形菌綱 (class Betaproteobacteria) 的奈瑟氏菌科 (Neisseriaceae) 之亞科 (subfamily) 的非病原性革蘭氏陰性細菌 (non-pathogenic Gram-negative bacterium) 之一細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷的應用，

該分泌蛋白質體極有可能是或者就是藉由一包括下列步驟的方法而被獲得：

- a) 在一培養基 (culture medium) 內以及在適合於該細菌的生長之條件 (conditions) 下來培養該細菌，

- b) 液體/固體分離(liquid/solid separation)以及液體相的回收(recovery of the liquid phase) ,
- c) 獲得包含有由該細菌分泌在該液體相中的生物分子的該分泌蛋白質體。

【0015】根據本發明的一個第二具體例，根據本發明來供治療皮膚損傷之應用的該細菌性分泌蛋白質體之特徵係在於：一鹼性緩衝液(basic buffer)被添加至步驟b)所得到的該液體相，以及特徵係在於：所得到之經緩衝的液體相(buffered liquid phase)較佳地在一介於1和6℃的溫度下被選擇性地保持接觸歷時1至7小時。

【0016】細菌LMB64已被特徵鑑定(characterized)並且被定義為屬於乙型變形菌綱(class Betaproteobacteria)的奈瑟氏菌科(Neisseriaceae)之亞科，且可能為一尚未被定義的新穎屬別(genus)。編碼(encoding) 16S核糖體RNA(ribosomal RNA, rRNA)的基因序列(gene sequence)之分析使得將這個細菌安置在接近於色桿菌屬(Chromobacterium)、Paludimonas屬、Lutelia屬和Glubenkiana屬成為可能，它與該等屬別共享(shares) 95%序列相似性(sequence similarity)。

【0017】這個非病原性細菌是革蘭氏陰性，而且係分離自地下水。

【0018】更特別地，細菌LMB64是桿狀(rod-shaped)，具有一大約為2.3  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.3$ )的長度與一大約為1.0  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.1$ )的寬度。這個細菌的一個屬性特徵

(characteristic feature)是一極性鞭毛 (polar flagellum)的存在。

【0019】編碼 16S rRNA的基因已幾乎被完全地定序 (sequenced)(1487 bp，對應於序列辨識編號 1 之序列)。細菌 LMB64 具有一為 10948 bp 的環狀質體 (circular plasmid)。這個質體已被完全地定序，而序列被表示於序列辨識編號 2 之序列中。

【0020】根據另一個具體例，一種讓本發明的細菌性分泌蛋白質體由之衍生而出的細菌含有至少一個質體，該質體包含有序列辨識編號 2 之序列，或任何一個與該序列辨識編號 2 之序列具有至少 80% 相同性 (有利地為與該序列辨識編號 2 之序列有至少 85%、至少 90%、至少 95%，甚至至少 97% 且又更優先地至少 98% 相同性) 的序列。

【0021】此外，一種讓該分泌蛋白質體由之衍生而出的細菌係為一屬於乙型變形菌綱 (class Betaproteobacteria) 的奈瑟氏菌科 (Neisseriaceae) 之亞科 (subfamily) 的非病原性革蘭氏陰性細菌，該細菌含有一包含有序列辨識編號 1 之序列的 16S rRNA 或任何一個與該序列辨識編號 1 之序列具有至少 80% 甚至至少 90%、至少 95%、至少 97% 相同性的序列，而且該細菌含有至少一個質體，該質體包含有序列辨識編號 2 之序列，或任何一個與該序列辨識編號 2 之序列具有至少 80% 相同性 (有利地為與該序列辨識編號 2 之序列有至少 85%、至少 90%、至少 95%，甚至至少 97% 且又更優先地至少 98% 相同性) 的序



列。

【0022】作為示範例，這樣的細菌係以菌株LMB64為代表，該菌株已於2010年4月8日以申請人之名被寄存於巴黎巴斯德研究所(Institut Pasteur, Paris)的國家微生物培養物保藏中心(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)，編號為I-4290。

【0023】有了這個基因型資料(genotypic information)，結合以有關於這個細菌在不含硫的培養基(sulphur-free medium)中的生長之特點(characteristics)以及非絲狀本質(non-filamentous nature)，一熟習本領域技術者將不會有困難來發現/辨識(finding/identifying)另一種允許本發明之一分泌蛋白質體被獲得的細菌。這樣的另一種細菌[當然些微地在基因型上有差異但就該分泌蛋白質體而言則擁有本發明的全部表現型標準(phenotypic criteria)]之鑑定(identification)可在一個不是不能克服的選擇研究(selection study)之後被做到，而這係根據被包含在本件申請案中以及被包含在先前申請案WO 2012/085182中的資料，組合以熟習本領域技術者之基本知識。

【0024】在本發明的上下文中，兩個核酸序列(nucleic acid sequences)之間的“百分比相同性(percentage identity)”意指兩個要被比較的序列之間的相同核苷酸(identical nucleotides)之一百分比，係在最好的比對(best alignment) [最佳比對(optimal alignment)]之後被獲得，這個百分比純粹地是統計的，而該二序列之間的差異

是隨機分佈的並且遍佈於它們的整個長度。兩個核酸序列之間的序列比較通常係藉由在以一最佳方式將這些序列對齊(aligned)之後來比較它們而被做到，其中該比較可就每個片段(segment)或每個“比較窗(comparison window)”而被做到。除了人工地(manually)，可以藉由Smith及Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482]的局部同源性演算法(local homology algorithm)之方式、藉由Needleman及Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443]的局部同源性演算法之方式、藉由Pearson及Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. The USA 85:2444]的相似性搜尋方法(similarity search method)之方式或藉由使用這些演算法的電腦軟體(computer software)[遺傳電腦集團(Genetics Computer Group)(575 Science Dr., Madison, WI)的威斯康辛遺傳套裝軟體程式(Wisconsin Genetics Software Package)之中的GAP、BESTFIT、FASTA與TFASTA，或者BLAST N或BLAST P比較軟體(comparison software)]之方式來執行用於比較的序列的最佳比對。

【0025】兩個核酸序列之間的百分比相同性係藉由比較這兩個以一最佳方式而被對齊的序列來予以決定，其中要被比較的核酸序列可能包含與參考序列(reference sequence)相關的加入(additions)或刪除(deletions)以供這兩個序列之間的最佳比對。百分比相同性係藉由下述來計算：決定出在該二序列之間核苷酸係為相同的位置之數目，將此相同位置(identical positions)的數目除以比較窗中

位置的總數，以及將所得到的結果乘以100，俾以獲得這兩個序列之間的百分比相同性。

【0026】舉例而言，BLAST程式“BLAST 2 序列 (BLAST 2 sequences)”(Tatusova et al., “Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences,” FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)(該程式可取自於 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>)可以系統內定參數(default parameter)來予以使用[特別是有關於參數“開放缺口懲罰(open gap penalty)”：5，以及“延伸缺口懲罰(extension gap penalty)”：2；加上被選擇的矩陣(matrix)係為例如程式所建議的“BLOSUM 62”矩陣]。要被比較的兩個序列之間的百分比相同性係藉由該程式而被直接地計算。亦有可能使用其他程式，諸如“ALIGN”或“Megalign”軟體(DNASTAR)。

【0027】本發明的細菌包含細菌LMB64，它含有至少一個質體，該質體包含有序列辨識編號2之序列，或任何一個與該序列辨識編號2之序列具有至少80% (較佳為85%、90%、95%和98%)相同性的序列。LMB64的其他特徵將會詳述在下面的示範例中。

【0028】更甚者，細菌LMB64已於2010年4月8日以申請人之名被寄存於巴黎巴斯德研究所(Institut Pasteur, Paris)的國家微生物培養物保藏中心(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)，編號為I-4290。

【0029】根據另一個具體例，本發明亦有關於根據

該第二具體例的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：該鹼性緩衝液係選自於Tris緩衝液(Tris buffer)、精胺酸緩衝液(arginine buffer)以及此等的混合物。

【0030】在另一個具體例中，本發明係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：在步驟c)之前，在步驟b)的液體/固體分離之後是一個藉由過濾(filtration)來澄清(clarification)該液體相或該經緩衝的液體相之步驟b')。

【0031】在另一個具體例中，本發明係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：過濾係利用一個0.2  $\mu\text{m}$ 門檻(cut-off)來予以進行。

【0032】根據另一個具體例，本發明亦有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：該等生物分子係由該細菌所分泌的胜肽(peptides)、蛋白質(proteins)以及二次代謝物(secondary metabolites)所構成。

【0033】本發明的另一個具體例是要提供根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：該細菌含有至少一個質體，該質體包含有序列辨識編號2之序列，或任何一個與該序列辨識編號2之序列具有至少80%相同性的序列。

【0034】根據另一個具體例，本發明亦有關於根據

前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：該細菌是於2010年4月8日被寄存於CNCM的細菌，編號為I-4920。

【0035】一般而言，術語“分泌蛋白質體”被用來描述藉由一細胞、一組織或一生物體(organism)而被分泌與排泄(excreted)至培養基之內並且被溶解(solubilized)在此培養基之內的所有生物分子。在本案的情況下，分泌蛋白質體須予以瞭解為意指由細菌LMB64所分泌且被外部化的所有生物分子，而這不具有細菌細胞的改質(modification)、變質(deterioration)或胞溶(lysis)。更特別地，這些生物分子主要係由該細菌所分泌且被外部化至培養基之內的蛋白質、胜肽以及二次代謝物所構成。

【0036】細菌藉由二元分裂(binary fission)來增殖(multiply)，亦即每個細菌生長並接而分裂(divides)成為兩個藉由細胞壁所形成的分裂中隔(division septum)而被分開的子細胞(daughter cells)。在分裂的期間當中，DNA以及其他組份(components)被複製(duplicated)。合成(synthesis)與降解(degradation)之各種不同的酵素系統(enzymatic systems)參與細胞分裂(cell division)。

【0037】細菌生長(bacterial growth)是該細菌之所有組份的有序增加(ordered increase)。它導致細菌數目之增加。在生長的期間當中，一方面存在有培養基中的營養素(nutrients)之耗盡(depletion)，而另一方面存在有由細菌所分泌且被排泄至培養基之內並且被溶解在培養基之內的生

物分子還有代謝副產物 (metabolic by-products) 之增濃 (enrichment)。

【0038】表述(expression)“培養基(culture medium)”或“培養基(medium)”須予以瞭解為意指任何一種至少包含有細菌生長和增殖(multiplication)所必需之營養素的培養基。細菌可在液體、固體或半液體培養基(liquid, solid or semi-liquid medium)之中生長。較佳地，該培養基是一允許含有該分泌蛋白質體的培養物上澄液之回收的液體培養基。

【0039】一合適的培養基含有會促進(promote)細菌生長和增殖的營養素。一般而言，一合適的培養基將會包含有水、一碳源(carbon source)、一氮源(nitrogen source)以及鹽類(salts)。作為例證，一個特別的示範性培養基被描述於下面的示範例中。

【0040】表述“二次代謝物”須予以瞭解為意指本發明之一細菌(特別是細菌LMB64)所生成、分泌以及排泄至培養基之內的小型分子(small molecules)。作為例證，這樣的二次代謝物可為可溶性分子(soluble molecules)[諸如殺菌素(bacteriocins)、非核糖體勝肽(non-ribosomal peptides)、螯鐵蛋白(siderophores)、脂肽(lipopeptides)或多酮類化合物(polyketides)]，或者諸如萜烯(terpenes)、吡啶(pyrazines)、吲哚(indoles)或硫化物衍生物(sulphide derivatives)的分子。存在於該分泌蛋白質體之內的蛋白質具有介於10 kDa和100 kDa之間(較佳為介於18 kDa和98

kDa之間)的尺寸，而且較佳地有一尺寸大約為38 kDa的多數蛋白質(majority protein)。

【0041】在實施上，本發明之一細菌(例如而且特別是細菌LMB64)的分泌蛋白質體可以僅藉由回收含有構成本發明的分泌蛋白質體之被分泌出的生物分子之培養物上澄液而從一位於一允許該細菌的生長、發育(development)和增殖之培養基中的培養物(就像例如下面所描述的那樣)被獲得。具體而言，基於這些生物分子係由該細菌所分泌與外部化並且被溶解於培養基之內的事實，無需執行一個處理該細菌的步驟[機械的(mechanical)或化學的(chemical)，誘發(inducing)整個或部分的細胞溶解(total or partial cell lysis)或者細胞壁、細胞膜或壁膜空間(periplasmic space)的蛋白質或組份之釋放]。該培養物上澄液的組份(以下稱為分泌蛋白質體)可以藉由任何一種液體/固體分離方式而從不溶性固體細胞組份(insoluble solid cellular components)來予以回收。更特別地，因此有可能，藉由熟習本領域技術者所知曉的技術，從含有大多為整個細胞(whole cells)以及包含有表面蛋白質(surface proteins)和/或坐落在該細菌的壁膜空間內的蛋白質之細胞碎片(cell debris)的固體分餾物(solid fraction)分離出含有該等被溶解的生物分子之液體分餾物(liquid fraction)。

【0042】作為例證，可以藉由一種選自於例如離心(centrifugation)、沉降(sedimentation)、過濾(filtration)、超過濾(ultrafiltration)、傾析(decantation)、排洩(draining)的

技術來執行液體/固體分離。

【0043】較佳地，藉由細菌培養物的離心來執行液體/固體分離，俾以將含有細胞和細胞碎片的固體相(solid phase)[亦即沉澱丸(pellet)]與包含有該等可溶性分子(亦即該分泌蛋白質體)的液體相(亦即該上澄液)分開。

【0044】該上澄液(亦即該液體相)可照此情形或者在簡單的過濾之後被使用，俾以移除有可能存在的細胞碎片以及將它滅菌(sterilize)。亦可設想到將它濃縮(concentrate)，例如藉由透析過濾(diafiltration)。構成該分泌蛋白質體的蛋白質亦可藉由利用硫酸銨(ammonium sulphate)的沉澱(precipitation)來予以回收。

【0045】如上面所指明的，用以製備本發明之一細菌性分泌蛋白質體的該方法之特徵係在於：一鹼性緩衝液被添加至步驟b)所得到的該液體相，以及特徵係在於：所得到之經緩衝的液體相被選擇性地與這樣一種緩衝液保持接觸歷時1至7小時，特別係在低溫之下，較佳為在一介於1和6°C的溫度下。

【0046】對該上澄液添加一鹼性緩衝液改善了溶液中的蛋白質和胜肽之可溶性(solubility)和/或安定性(stability)。

【0047】較佳地，這個鹼性緩衝液是一種Tris緩衝液或一種精胺酸緩衝液或一種Tris-精胺酸混合物。較佳地，它是一種Tris-精胺酸混合物。

【0048】被添加至該液體相的鹼性緩衝液(優先為Tris-精胺酸)之數量係為使得所得到之經緩衝的液體相具



有一介於 100 mM 和 500 mM 之間的精胺酸濃度和/或一介於 10 mM 和 90 mM 之間的 Tris 濃度。

【0049】該經緩衝的液體相的 pH 值可為介於 8 和 12 之間，而且較佳為介於 9 和 11 之間。

【0050】一鹼性緩衝液(Tris、精胺酸或 Tris-精胺酸)的使用允許溶液中的蛋白質之安定化(stabilization)並且避免它們隨著一長期儲存期間(storage period)而發生聚集(aggregation)。

【0051】一種用於培養本發明的細菌(特別是菌株 LMB64)之較佳方法可以包括三個步驟。

- 可在一艾氏燒瓶(Erlenmeyer flask)中、於一含有適合於這個預培養物(pre-culture)的礦物質、蛋白質和碳水化合物物質(mineral, protein and carbohydrate substances)的合適培養基內來製備一第一接種物(first inoculum)。
- 接而在一類似於或相同於該第一培養基[或任何一種等效培養基(equivalent medium)]的第二培養基內以批次模式(batch mode)來製備一第二預發酵培養物(second pre-fermentation culture)。
- 最後，在一相同於或類似於該第二培養基的培養基內以進料-批次模式(fed-batch mode)來進行發酵(fermentation)俾以獲得一高細胞密度(cell density)。

【0052】一個離心步驟接而允許細胞和細胞碎片的移除以及該培養物上澄液的回收。

【0053】這個經緩衝的上澄液，或經緩衝的液體相，可接而藉由過濾而被澄清(clarified)。

【0054】如上面所指明的，在步驟c)之前，在步驟b)的液體/固體分離之後是一個例如藉由過濾來澄清該液體相或該經緩衝的液體相之步驟b')。

【0055】可藉由任何一種允許該液體相(或者如果適用的話，該經緩衝的液體相)之澄清的合適方式來執行過濾。這樣的藉由過濾之澄清移除掉在該液體/固體分離步驟的期間當中未被移除的懸浮顆粒(suspended particles)，而且係針對生成一個澄清的分泌蛋白質體。

【0056】可藉由任何一種過濾、超過濾或透析過濾方式來執行過濾。

【0057】有利地，過濾係藉由通經一具有0.4  $\mu\text{m}$  (較佳為0.2  $\mu\text{m}$ )門檻的過濾器(filter)或濾筒(cartridge filter)來予以執行。在這個情況下，該細菌性分泌蛋白質體的特徵係在於：被分泌的胜肽、蛋白質以及二次代謝物具有一為0.2  $\mu\text{m}$ 或更小的尺寸。

【0058】較佳地，非靜電電荷的(non-electrostatically-charged)過濾器或預濾器(prefilters)可被使用，俾以避免負責全部或部分活性的生物分子之任何吸收。

【0059】該等培養基以及各種不同步驟的確切本質(exact nature)將會在實施例中被更詳細地描述。須予以瞭解的是：任何方法、培養基或步驟的順序之修改，參照本案說明內容對於一熟習本領域技術者而言會是顯而易見

者，須予以視為係落在本件專利申請案的範疇之內。

【0060】如上面所提到的，在另一個具體例中，本發明亦係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：該等皮膚損傷係選自於由擦傷 (abrasions)、燒傷、曬傷 (sunburns)、抓痕、割傷、刮傷、縫合線 (stitches) 所構成的群組。

【0061】本發明亦係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，以供用於癒合缺陷的減輕 (mitigation)。

【0062】在另一個具體例中，本發明亦係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：該等皮膚損傷跟隨在創傷、外科手術 (surgery)、一皮膚科程序 (dermatological procedure) 或一美容醫學程序 (cosmetic medicine procedure) 之後。

【0063】有利地，本發明亦係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：它被組合以一銅鹽 (copper salt) 或一鋅鹽 (zinc salt)。

【0064】在另一個具體例中，本發明亦係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷之應用，特徵係在於：皮膚損傷的治療在於改善癒合以及皮膚修復。

【0065】在另一個具體例中，本發明進一步係有關於一種用於減輕皮膚癒合缺陷的美容治療 (cosmetic treatment) 方法，其包括施用一有效數量之一組成物，該組成物含有一有效數量之一如前述具體例之中一者所界定的細菌性分泌蛋白質體組合以一美容上有效的賦形劑 (cosmetically acceptable excipient) 並且被配製 (formulated) 為呈一適合供局部施用 (topical application) 的形式。

【0066】有利地，本發明亦係有關於根據前述具體例之中一者的一種細菌性分泌蛋白質體來供治療癒合缺陷之應用，特徵係在於：它被組合以一銅鹽 (copper salt) 及/或一鋅鹽 (zinc salt)。

【0067】因此，在另一個具體例中，本發明進一步係有關於如前述具體例之中一者所定義的一種細菌性分泌蛋白質體來供皮膚癒合缺陷之緩和美容治療 (mitigating cosmetic treatment) 的應用。根據一個特別的具體例，本發明的分泌蛋白質體被組合以一銅鹽和/或一鋅鹽來使用。

【0068】在另一個具體例中，本發明係有關於一種皮膚科組成物，其含有一如前述具體例之中一者所定義的細菌性分泌蛋白質體以及一適合供局部施用的皮膚科賦形劑 (dermatological excipient)。在一個有利的具體例中，該皮膚科組成物進一步包含一鋅鹽和/或一銅鹽。

【0069】在另一個具體例中，本發明進一步係有關於根據前述具體例之中一者的一種皮膚科組成物來供治療皮膚損傷的應用。在一個有利的具體例中，該皮膚科組成

物進一步包含一鋅鹽和/或一銅鹽。

【0070】在另一個具體例中，本發明係有關於一種美容組成物，其含有一如前述具體例之中一者所定義的細菌性分泌蛋白質體以及一適合供局部施用的美容用賦形劑(cosmetic excipient)。該美容組成物可進一步包含一鋅鹽和/或一銅鹽。

【0071】最後，在另一個具體例中，本發明係有關於根據一前述具體例的一種美容組成物來供皮膚癒合缺陷之緩和美容治療的應用。

【0072】根據一個具體例，本發明係有關於一如前述具體例之中一者所定義的細菌性分泌蛋白質體來供促進纖維母細胞增殖(fibroblast proliferation)的局部應用。

【0073】根據一個具體例，本發明係有關於一如前述具體例之中一者所定義的細菌性分泌蛋白質體來供促進角質細胞增殖和/或徙動的局部應用。

【0074】根據一個具體例，本發明係有關於一如前述具體例之中一者所定義的細菌性分泌蛋白質體來供治療皮膚損傷的局部應用。

【0075】根據一個具體例，本發明係有關於一如前述具體例之中一者所定義的細菌性分泌蛋白質體來供改善皮膚癒合和復原(skin healing and recovery)的局部應用。

【0076】本發明亦係有關於一種用以加速皮膚修復(accelerating skin repair)俾以恢復皮膚完整性與品質的組成物，包含有作為活性成份(active principle)的被定義於前述

具體例之中一者的細菌性分泌蛋白質體。更加有利地，該組成物可進一步包含一銅鹽和/或一鋅鹽。

【0077】較佳地，該分泌蛋白質體在本發明之一組成物內的濃度係在0.05%和10%之間。更佳地，它係在0.1%和5%之間。

【0078】為了要獲得一供局部施用的組成物，本發明的組成物可進一步包含熟習本領域技術者所知曉的一或多種傳統的皮膚科上和/或美容上相容的賦形劑，諸如乳化劑(emulsifiers)、增稠劑(thickeners)、膠凝劑(gelling agents)、水黏合劑(water binders)、散佈劑(spreading agents)、安定劑(stabilizers)、染料(dyes)、芳香劑(fragrances)以及防腐劑(preservatives)。

【0079】在本發明中，表述“皮膚科上或美容上可接受的(dermatologically or cosmetically acceptable)”被意欲為意指在一皮膚科或美容組成物之製備上是有用的那一者，它通常是安全的、無毒的(nontoxic)並且在生物學上或者其它方面不是非為所欲的，而且它對於皮膚科或美容應用(特別是皮膚科或皮膚美容應用)而言是可接受的，特別是藉由局部施用。

【0080】根據本發明的組成物有利地係供局部施用，特別是針對皮膚。

【0081】本發明的組成物可被製備成為呈一乳液(emulsion)、一分散體(dispersion)或一水性或油性洗劑(aqueous or oily lotion)的形式。

【0082】在另一個特別的具體例中，本發明之皮膚科或美容組成物包含至少一種其他的活性成份，更特別地是至少一種保濕活性成份(moisturizing active principle)。

【0083】這個其他的活性成份因此特別地可以選自於由下列所構成的群組：

- 詳知的癒合或恢復劑(healing or restorative agents)：泛醇(panthenol)、羥基積雪草苷(madecassoside)、尿囊素(allantoin)、蘆薈(aloe vera)、蜂蜜(honey)；
- 抗感染劑(anti-infective agents)：銅-鋅型式微量元素(copper-zinc-type trace elements)、蜂蜜；
- 保濕與滋養劑(moisturizing and nourishing agents)：甘油(glycerine)、乳油木果油(shea butter)、天然蠟(natural waxes)、玻尿酸(hyaluronic acid)、脂肪酸(fatty acids)；
- 舒緩劑(soothing agents)：尿囊素、沒藥醇(bisabolol)、泛醇、甘草次酸(enoxolone)；
- 紫外線過濾劑(UV filters)。

【0084】較佳地，該第二活性成份將會是一種銅-鋅型式微量元素。在這個較佳的具體例中，本發明的組成物因此將會包含該分泌蛋白質體以及該銅-鋅型式微量元素。

【0085】如已提及的，本發明之一包含有該分泌蛋白質體的皮膚科或美容組成物可包含一銅鹽或一鋅鹽。較佳地，該銅鹽將會是硫酸銅(copper sulphate)。有利地，該

鋅鹽將會選自於氧化鋅 (zinc oxide) 和硫酸鋅 (zinc sulphate)。

【0086】本發明之一組成物中的硫酸銅之數量可在該組成物的0.05和0.5 wt%之間變化，較佳地係介於該組成物的0.1和0.25 wt%之間，更加優先地係大略為該組成物的0.2 wt%。

【0087】本發明之一組成物中的硫酸鋅之數量可在該組成物的0.05和0.5 wt%之間變化，較佳地係介於該組成物的0.1和0.4 wt%之間，更特別地是介於該組成物的0.1和0.2 wt%之間。

【0088】本發明之一組成物中的氧化鋅之數量可在該組成物的0.5和10 wt%之間變化，優先地係介於該組成物的1和5 wt%之間，更特別地係大略為該組成物的2至4 wt%。

【0089】本發明之一具體例設想到一種根據前述具體例之中一者的組成物，特徵係在於它進一步包含至少一種其他的活性成份係選自於癒合劑、抗感染劑、保濕劑、舒緩劑以及此等的混合物。根據另一個具體例，至少一種其他的活性成份將會是選自於保濕劑、癒合劑、舒緩劑以及此等的混合物，較佳地係為保濕劑。這樣的一種活性成份較佳地將會被使用於皮膚科組成物之中。

【0090】本發明亦有關於一種用於治療和癒合皮膚損傷的方法，其包括一有效數量之一組成物的投藥(較佳為局部的投藥)，該組成物含有本發明之一分泌蛋白質體



來作為活性成份。

【0091】根據本發明的組成物特別地係供具有持續損傷(sustained lesions)的皮膚之照護(care)。

【0092】皮膚損傷可能跟隨在創傷或者醫療或外科程序之後出現，無論是侵入性(invasive)或非侵入性(non-invasive)、治療性(curative)或者供美容目的。

【0093】舉例而言，侵入性醫療或外科程序包含：有或無縫合線的外科程序[切除(excision)、修剃(shaving)]、冷凍治療(cryotherapy)、雷射消融(laser ablation)、溫和性或強烈性化學換膚(moderate or strong chemical peels)、縫合線、中胚層療法(mesotherapy)或刮除術(curettage)。

【0094】創傷後的皮膚損傷(post-traumatic skin lesions)，例如對皮膚的輕度外部損害(mild external damage)，包含割傷、抓痕、刮傷以及表面燒傷或曬傷(superficial burns or sunburn)，舉例來說。

【0095】需要一會加速皮膚復原並且適合於長期使用(long-term use)(直到皮膚被完全地修復)的癒合產品(healing product)之表面非侵入性醫療程序包含輕度化學換膚(mild chemical peels)、雷射除毛(laser hair removal)和表面血管(酒糟)治療[vascular (rosacea) treatments]，舉例來說。

【0096】本發明之皮膚與黏膜損傷(skin and mucous membrane lesions)的治療特別地可包含割傷、縫合線、擦

傷、刮傷、抓痕、在外科手術或一美容皮膚科程序之後的疤痕、表面燒傷、曬傷的治療。

【0097】本發明進一步係有關於本發明之一美容組成物用來改善癒合以及皮膚修復(而且特別是用來減輕癒合缺陷)的應用。

### 【圖式簡單說明】

【0098】本發明將藉由閱讀下面的示範例而被更佳地瞭解，該等示範例例證解說了本發明而不限其範圍。

【0099】該等示範例參照下面的圖式。

**圖1：**分泌蛋白質體蛋白質的十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳凝膠(SDS-PAGE gel)，

第1行[M，分子量標記(molecular weight markers)，海洋藍色(Sea Blue)]，

第2至5行分別為：(Sec，在精胺酸緩衝液的添加之前的分泌蛋白質體)，10  $\mu$ l、15  $\mu$ l、20  $\mu$ l和30  $\mu$ l裝載(loads)，

第6至9行分別為：(Sec+Arg，在精胺酸緩衝液的添加之後的分泌蛋白質體)，10  $\mu$ l、15  $\mu$ l、20  $\mu$ l和30  $\mu$ l裝載。

**圖2：**相較於對照組細胞，以各種不同的產物予以處理的正常人類纖維母細胞(normal human fibroblasts)之增殖刺激百分比(% stimulation of proliferation)[n=3個供給者庫(donor pools)]。

**圖3：**相較於對照組細胞，以各種不同的化合物予以處理的HaCaT角質細胞細胞株的徙動刺激百分比(% stimulation of migration)(平均值 $\pm$ SEM)(n=2)。

**圖 4**：相較於一參考修復霜 (reference restorative cream)，各種不同的產物施用至豬耳的外植體(explants)上歷時48小時之後的傷口再上皮化[n=10個獨立的供給者(independent donors)]。

### 【實施方式】

#### 示範例1：細菌LMB64的培養

**【0100】**作為非限制性的示範例，較佳的培養基含有氯化銨 (ammonium chloride)、硫酸鎂 (magnesium sulphate)和酵母萃取物(yeast extract)。須予以注意的是：如從申請案WO 2012/085182等等可以看出，其他類似的培養基可以被使用而因此必須予以視為形成本案發明說明之一不可缺部分(integral part)。任何藉由熟習本領域技術者的調整(adaptation)也須予以視為是本發明的一部分。

**【0101】**一個例示性培養方法被描述於下。在此應予以回想到：這個示範例僅係供解說之目的，而決不能被視為是限制性的。

**【0102】**菌株LMB64被養育於三個步驟中，亦即一第一接種物、一呈批次模式的預培養物[或預發酵物]以及最後為一個然而呈進料-批次模式的培養物(葡萄糖的添加)。

**【0103】**接種物：一試管的WCB LMB64被用來接種含有1000 mL的無菌培養基之艾氏燒瓶。該艾氏燒瓶接而被放置在一振盪培養箱(incubator shaker)中並且予以振盪。當培養液(broth)的細胞密度足夠之時，培養被停止。

細胞接而被冷卻直到轉移至預發酵槽 (pre-fermenter) 為止。

【0104】**預培養物**：該預發酵槽接而被充填以大略為 16 L 的培養基然後被完全地滅菌。

【0105】在槽桶 (tank) 以及接而加入阻擋件 (addition blocks) 的滅菌 (sterilization) 之後，兩個衛星燒瓶 (satellite flasks) 被連接至該預發酵槽：

- 一個含有一為無菌的 (sterile) 50% 葡萄糖溶液之燒瓶。這個溶液 [葡萄糖批式預培養物 (Glucose batch pre-culture)] 被立即轉移至培養基以達到一為 20 g/L 的初始葡萄糖濃度 (initial glucose concentration)。
- 含有被描述於上面的**接種物**步驟中之接種物的該艾氏燒瓶，其被接種至該預發酵槽。

【0106】預培養被開始並且接而被自動地調節。作為示範例，下面的參數可予以提及：溫度、振盪速度 (shaking speed)、壓力、空氣流動速率 (air flow rate) 或  $PO_2$ 。

【0107】細胞生長係藉由測量在 620 nm 之下的光學密度 (optical density) 而被監測 (monitored)。當它達到一足夠的密度時，預培養被停止。

【0108】**培養**：發酵槽 (fermenter) 接而被充填以 127 L 的培養基 (被調整至 pH 7.0) 然後被完全地滅菌。三個衛星燒瓶被使用：

- 一個含有一為無菌的葡萄糖溶液之燒瓶。這個溶液

被立即轉移至培養基以達到初始葡萄糖濃度係為 20 g/L。

- 一個含有消泡劑(antifoam)的燒瓶。這個消泡劑將會在培養的期間當中被自動地添加俾以控制槽桶中的泡沫位準(level of foam)。
- 一個含有進料-批次葡萄糖(fed-batch glucose)的燒瓶。這個溶液將會在培養的期間當中被添加必以促進細胞生長。

【0109】培養被開始並且接而被自動地調節。作為示範例，下面的參數亦可予以提及：溫度、pH、振盪、壓力、空氣流動速率、 $PO_2$ 。

【0110】在初始存在於培養基內的葡萄糖之耗盡(exhaustion)( $PO_2$ 的上升)後，進料-批次葡萄糖的添加被觸發(triggered)，因而允許高密度細胞生長。在葡萄糖的總消耗(total consumption)之後，發酵被停止。在這個階段，發酵必須被自動地冷卻。在整個培養當中，細胞生長係藉由測量在620 nm之下的光學密度而被監測。在培養結束之時所得到的乾生物量(dry biomass)之數量(g/L)係使用一重量法(weight method)來予以測定。

## 示範例2： 分泌蛋白質體的萃取(extraction)

【0111】下面的示範例係作為一較佳的具體例之例證而被給予，但不可將之視為是限制性的。

【0112】一般而言，該分泌蛋白質體係在將該培養步驟的結果離心俾以移除該細菌的細胞、表面蛋白質以及

坐落在壁膜空間內的蛋白質之後被獲得的。這個離心步驟之後接而為對該上澄液添加一種Tris-精胺酸鹼性緩衝液。一個過濾該上澄液的最後步驟亦為可能的。任何藉由熟習本領域技術者的調整也須予以視為是本發明的一部分。

【0113】離心：從該發酵槽至離心機(centrifuge)的傳輸管路(transfer line)被滅菌。發酵(fermentation)必須接而藉由在一離心機上的連續離心(continuous centrifugation)來予以分離。離心係在150 L/h ( $\pm 30$  L/h)之下、以一為10900 $\pm$ 1000 rpm的鍋槽轉速(bowl rotation speed)被執行的。該上澄液被收集在一個裝有一可棄式囊袋(disposable pouch)的容器(container)中。該上澄液的重量係在檯秤(balance platform)上被量測。

【0114】精胺酸的添加：Tris 精胺酸萃取緩衝液被滅菌並接而被轉移至含有該上澄液的該可棄式囊袋。所需要的接觸時間(contact time)是在1和7小時之間。在添加至該可棄式囊袋之後的Tris和精胺酸之目標濃度(target concentration)大略係為0.3 M L-精胺酸以及20 mM Tris。

【0115】在該萃取緩衝液的添加之後的總容積大略係為240 L。

【0116】過濾：兩個過濾步驟被連線執行(performed on-line)，俾以澄清該上澄液以及生成一個澄清的無菌(germ-free)分泌蛋白質體。過濾係藉由過濾/分配系統(filtration/distribution system)來予以控制。可棄式深層過濾匣(disposable depth-filtration cartridge)被放置在它的過濾

器外殼(filter housing)內。所有的過濾產物(filtered product)被無菌地回收在一個裝有一可棄式囊袋的容器中。含有過濾產物的該囊袋在檯秤(balance platform)上被秤重並接而被儲存在5℃直到分配之時。

**【0117】** 分泌蛋白質體蛋白質的凝膠電泳 (gel electrophoresis)：參見圖1。Bis-Tris SDS-PAGE 凝膠 (4-12%)，在變性和還原條件 (denaturing and reducing conditions)下，在精胺酸緩衝液的添加之前和之後，具有各種不同容積的培養物上澄液(分別為10  $\mu$ l、15  $\mu$ l、20  $\mu$ l、30  $\mu$ l)之裝載藉由考馬斯藍(Coomassie Blue)的偵測。在這兩種情況下，尺寸在14和100 kDa之間的各種不同的蛋白質帶被觀察到，包含一為大約38 kDa的主要帶(major band)。

### 示範例3：分泌蛋白質體在正常人類纖維母細胞的增殖上之效用

**【0118】** 被使用的技術係為那個在37℃下，一種核苷酸，5-溴-2'-去氧尿苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)[一種胸腺核苷類似物(thymidine analogue)]，至S-相細胞(S-phase cells)的DNA內之併入(incorporation)。這個技術允許它們在細胞週期(cell cycle)中的進展(progression)係為一增殖細胞(proliferative cell)的特徵(characteristic)[S相或DNA合成相(S or DNA synthesis phase)]之細胞的定量(quantification)。

**【0119】** 纖維母細胞被播種(seeded)在一個96-孔盤

(96-well plate)內並且接而在要被測試的化合物[作為正對照組(positive control)的EGF以及0.4、0.6和1%分泌蛋白質體]之存在下予以培育(incubated)歷時72小時。BrdU併入係在最後的24小時期間當中被執行並且使用BrdU酵素連結免疫吸附分析套組(ELISA kit)[品項編號(item no.) 11647229001, Roche Diagnostics]來予以定量。

【0120】根據下面方程式來計算對照組% (% of the control)：

$$(\text{數值}/\text{對照組的平均值}) \times 100$$

根據下面方程式來計算刺激% (stimulation in %)：

$$\text{刺激}\% \text{平均值} = (\text{平均值}(\text{數值}/\text{對照組的平均值}) \times 100) - 100$$

$$\text{SEM} = \text{標準偏差} / \sqrt{n}$$

【0121】使用司徒頓的t-檢驗(Student's t-test)來執行統計分析(statistical analyses)。該等研究係用3個供給者庫來進行。

【0122】正對照組，即EGF，在3個供給者庫上強烈地且顯著地並以一可再現的方式(in a reproducible manner)來刺激纖維母細胞增殖(95%刺激)。這驗證了該等實驗。結果顯示：在0.4%、0.6%和1%之下被測試的分泌蛋白質體顯著地刺激正常人類纖維母細胞的增殖。下面的表1概述正常人類纖維母細胞(n=3個供給者庫)在被測試的化合物之存在下培育72小時之後的BrdU併入(平均值±SEM)之結果(藉由ELISA)。該等結果被顯示於圖2中。

表 1



| 化合物       | 對照組 | EGF<br>10 ng/ml | 分泌蛋白質體<br>0.4% | 分泌蛋白質體<br>0.6% | 分泌蛋白質體<br>1% |
|-----------|-----|-----------------|----------------|----------------|--------------|
| 對照組%平均值   | 100 | 195             | 138            | 134            | 127          |
| SEM       | 2   | 10              | 6              | 4              | 3            |
| 刺激%平均值    | 0   | 95              | 38             | 34             | 27           |
| SEM       | 2   | 10              | 6              | 4              | 3            |
| 司徒頓的 t-檢驗 | -   | ***             | ***            | ***            | ***          |

**示範例4： 分泌蛋白質體在HaCaT角質細胞細胞株的徙動上之效用**

【0123】研究係使用 Oris 細胞徙動分析 (Oris Cell Migration Assay)(Platypus Technologies)根據廠商所推薦的標準操作程序(standard protocol)來予以執行。主要地，HaCaT (人類角質細胞細胞株)細胞被播種在一個96-孔盤內。Oris™塞件(Oris™ stoppers)被移除，而要被評估的化合物被添加至培養基內。培育進行歷時24小時俾以允許細胞徙動。一可穿透細胞的螢光追蹤劑(cell-permeable fluorescent tracer)，即鈣黃綠素(calcein)，接而被添加俾以允許位在該等塞件所劃界(delimited)的區域(zone)內之細胞的視覺化(visualization)。

【0124】細胞徙動係藉由拍攝(photographing)該等孔(wells)以及量測單位為mm<sup>2</sup>的徙動表面區域(migration surface area in mm<sup>2</sup>)來予以評估。

根據下面方程式來計算對照組%：

$$(\text{數值}/\text{對照組的平均值}) \times 100$$

根據下面方程式來計算刺激%：

$$\text{刺激\%平均值} = (\text{平均值}(\text{數值}/\text{對照組的平均值}) \times 100) - 100$$

$$\text{SEM} = \text{標準偏差} / \sqrt{n}$$

使用司徒頓的t-檢驗來執行統計分析。

【0125】該等研究係在6個技術複製品(technical replicas)以及在n = 2個獨立實驗(independent experiments)中予以進行。

【0126】正對照組，即TGF-b與胎牛血清(foetal calf serum, FCS)，強烈地且顯著地並以一可再現的方式刺激細胞徙動(分別為51%和176%刺激)。這驗證了該等實驗。結果顯示：在0.4%、0.6%和1%之下被測試的分泌蛋白質體顯著地刺激HaCaT角質細胞徙動。下面的表2概述在以各種不同的化合物培育24小時之後的HaCaT細胞徙動之結果(n=2)。該等結果被顯示於圖3中。

表 2

| 化合物       | 對照組 | FCS<br>10% | TGF-b<br>10 ng/ml | 分泌蛋白質體<br>0.4% | 分泌蛋白質體<br>0.6% | 分泌蛋白質體<br>1% |
|-----------|-----|------------|-------------------|----------------|----------------|--------------|
| 對照組%平均值   | 100 | 276        | 151               | 267            | 266            | 272          |
| SEM       | 5   | 9          | 7                 | 8              | 10             | 9            |
| 刺激%平均值    | 0   | 176        | 51                | 167            | 166            | 172          |
| SEM       | 5   | 9          | 7                 | 8              | 10             | 9            |
| 司徒頓的 t-檢驗 | —   | ***        | ***               | ***            | ***            | ***          |

示範例5： 分泌蛋白質體在一癒合的離體模型(ex vivo model)上的傷口閉合(wound closing)上之效用

【0127】豬耳的皮膚外植體被維持在生存條件(survival conditions)下。在中心處被做出一個圓形3 mm傷口的6毫米生物檢體(six-millimetre biopsies)被執行。該傷口損害了整個表皮以及上方真皮(upper dermis)。要被評估的產物被局部地施用。48小時之後，該等生物檢體被冷凍，並且在切片上予以執行蘇木精-伊紅染色(haematoxylin-eosin staining)。再上皮化的動力學(kinetics)係根據下面方法來予以評估：

- 1) 一個根據由J. Brandner所發展的操作程序而被定義為從0至3的分數(score)之歸因(attriution)(Pollok et al., 2010, J Cell Mol Med)。

來自傷口邊緣之再上皮化區域(re-epithelialized zone)的範圍(extent)之單位為 $\mu\text{m}$ 的準確測量(precise measurement)。

為求顯著性(significance)而予以施用司徒頓的t-檢驗。

- 2) 在傷口邊緣處的形態外觀(morphological appearance)亦被評估俾以評定(assess)組織保存品質(tissue preservation quality)。

【0128】要被施用的產物的製備：分泌蛋白質體係在0.4、0.6和1 wt%之下被添加至基底配方(base formulation)中，其與一個被並行測試的參考修復霜(Cicalfate<sup>®</sup>乳霜)之基底配方相同。再上皮化係與這個參考修復霜做比較而被評估。

【0129】該等結果顯示了該分泌蛋白質對於傷口再上皮化的進展之一劑量效應(dose effect)。相較於該參考修復霜，含有1%分泌蛋白質的配方顯著地加速傷口閉合的進展( $p=0.043$ )。再者，組織的形態分析顯示出含有該分泌蛋白質的配方之一優異的耐受性(excellent tolerance)。該等結果被顯示於圖4中。

例示性組成物：水包油乳液(oil-in-water emulsion)

根據示範例2的分泌蛋白質體：0.1-5%

甘油：1-30%

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| 己二醇(Hexylene glycol)：          | 0.1-7%      |
| 鯨蠟硬脂基葡萄糖苷(Cetearyl glucoside)： | 0.1-1%      |
| 鯨蠟硬脂醇(Cetearyl alcohol)：       | 0.9-4%      |
| 硬脂酸(Stearic acid)：             | 0.5-4%      |
| 硬脂酸甘油酯(Glyceryl stearate)：     | 0.1-4%      |
| 植物油(Vegetable oil)：            | 0.1-10%     |
| 水                              | 加至(qs) 100% |

【序列表】

<110> 法商皮爾法伯皮膚化妝品公司

<120> 用於治療皮膚損傷之細菌性分泌蛋白質體

<130> B373871PCT D37050

<150> FR1753012

<151> 2017 - 04 - 06

<160> 2

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1

<211> 1487

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 新細菌LMB64，屬於乙型變形菌綱，衍生自地下水

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 1                                                           |     |
| agtttgatca tggctcagat tgaacgcggg cggcatgctt tacacatgca agtcgaacgg | 60  |
| cagcacgggc ttcgccctgg tggcagtg gaaacgggtg agtaatgcgt cggaacgcgc   | 120 |
| cgagtagtg gggataacgc agcgaagct gtgctaatac cgcatacgta ctgaggtaga   | 180 |
| aagtggggga ctttcgggcc tcacgtatt cgagcggccg acgtctgatt agctagttag  | 240 |
| tggggtaag gccaccaag gcgacgatca gtagcgggtc tgagaggatg atccgccaca   | 300 |
| ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat tttggacaat | 360 |
| gggcgcaagc ctgatccagc catgccgcgt gctgaagaa ggccttcggg ttgtaaagga  | 420 |
| cttttgtccg ggagcaaagc ctgcttgta ataccgagtg gggatgagag taccggaaga  | 480 |
| ataagcaccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtata ctaggggtgc aagcgtaat   | 540 |
| cggaattact gggcgtaaag cgtgcgcagg cgttggtgca agtctgatgt gaaagccccg | 600 |
| ggctcaacct gggaacggca ttggagactg cacggctaga gtgcgtcaga ggggggtaga | 660 |
| attccacgtg tagcagtga atgcgtagag atgtggagga ataccgatgg cgaaggcagc  | 720 |
| cccctgggat gacactgacg ctcatgcacg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac | 780 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| cctggtagtc cacgccctaa acgatgtcaa ttagctgttg ggggtttgaa tccttggtag | 840  |
| cgaagctaac gcgtgaaatt gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggtta aaactcaaag | 900  |
| gaattgacgg ggaccgcac aagcggtgga tgatgtggat taattcgatg caacgcgaaa  | 960  |
| aaccttacct gctcttgaca tgtaccgaag cctgaagaga ttgggtgtg cccgaaaggg  | 1020 |
| agcggtaaca cagggtctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag | 1080 |
| tcccgcacg agcgcaacct ttgtcattag ttgccatcat ttggttgggc actctaatga  | 1140 |
| gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtag ggatgacgtc aagtcctcat ggcccttatg | 1200 |
| agcagggctt cacacgtcat acaatggtcg gtacagaggg tcgccaagcc gcgaggtgga | 1260 |
| gccaatctca gaaagccgat cgtagtccgg atcgcacctt gcaactcgag tgcgtgaagt | 1320 |
| cggaatcgct agtaatcgca gatcagcatg ctgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac | 1380 |
| acaccgcccc tcacaccatg ggagtggggg ataccagaag tgggtaggct aaccgcaagg | 1440 |
| gaggccgctt accacggtat gcttcatgac tggggtgaag tcgtaac               | 1487 |

<210> 2  
<211> 10948  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 新細菌LMB64，屬於乙型變形菌綱，衍生自地下水

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 2                                                           |     |
| gggcgcagca ccatcgccca ggccaaaagc caccctgtcc gattcggcgg cctgttgctc | 60  |
| gcgtcaatg cgctgcgcct ggtcggccaa gtcggcggct tgctgctcgg ccttgcccgc  | 120 |
| caggggtgtc cgctcgcggg tcagttccgc cacctgctcg gctagggcat cgcgctcggc | 180 |
| ctcgatcacc tcaccagcgg ccgccagctc ggcggtctcg ctctgcgcct ggaccaagcg | 240 |
| gccctcgacc tcggcgcggg cctgggcggc tgcgcgtcg atctcggcgg caatggcggc  | 300 |
| ggtcaatgcc tggggcagtt ccggcgcagc agcagcggcc accggccggg cctctcgcca | 360 |
| ggcagttaga tgcttgtgaa cggtattcgg gctgccggtg cccaaacgt cgcggatcgc  | 420 |
| gcggatagtc ggctgtgtcc ctctgccgac cagcgcacat gcggcggcgg cgaacgggtg | 480 |

|                       |                                              |      |
|-----------------------|----------------------------------------------|------|
| gcccgtgcag aggcccgcg  | cgagcagatc gagcagcagg ccgccaaggc ggcacaggcc  | 540  |
| cacgaagaag cccgcgccgc | cgccacgcag gaagcccggc aagtgcaagc cgaacgcgac  | 600  |
| gaagcccgca aggtggccgc | cgaggcgcg                                    | 660  |
| gaagccctca ccgcgaagga | gcgaaaagcc gatgaaagac cgtgaccaca acgaagcgat  | 720  |
| ggccggcatg tttcaggccg | acccccgatt tgcgcggac tatctgcgc aggtgttggc    | 780  |
| cgatggcgag cctaccgacg | tgcgcggcg cttgcggcaa atggcggatg tgctgcgcgt   | 840  |
| cagtcaggcc gccgcgccga | ccgattctgc gccttcggcg ggctctttg accgggccgg   | 900  |
| cgtgcgttac gaagtgcggt | gcgatgtgat cggggcggtg attgccatt acgccgaaat   | 960  |
| catgggacgg gaacgcgagc | aggcgcgacc gaatgaggcg gttttgcgcg tggccggagc  | 1020 |
| catgaaggcg gcgctggccg | gggagcgggga tgatctcgat ccgcgcgata gcgccggcat | 1080 |
| cgaggcgggc atttcgcgt  | atgcgccact ggcgcgccgg ctgtatggcc aggcctgaaaa | 1140 |
| cgaccacgcc cgccaggaac | agcgtcgcgc cgatttcgac caggtgcatg cttcgtggc   | 1200 |
| cttgaggggg ctggccatga | gcgcggacga tttggcggtt caggcgctgc tgatccgggg  | 1260 |
| cgacattacc cacgatgagg | cggtgcagtg ctaccgcac ctgcatcgcc atgcgcggta   | 1320 |
| aaaccgactg gccgcccag  | gtggccggtg tgctgggttt gctcgaatcg cagccgccag  | 1380 |
| aggcgcgcat gctggctggc | tgttttctgg cggcggtagc ccatccgat catgcggccg   | 1440 |
| aattggcgat gttcgacaaa | ttgccgccag cggcccgat ggtcgtcggg cgatttttc    | 1500 |
| tcgtttttct ggcgggcggc | ctggacgatg ccggcgcgga aaaactgcat tcgcacatgc  | 1560 |
| aggcatggtt tgtccgtcag | cgccgttttc ggtgaatggc ttgcctcacc cactagggcc  | 1620 |
| gggcaagggg tgaacagcgg | gcgatgctgg cttgcgggac gacccgcac ccccgaaaa    | 1680 |
| cttgtcacac accacgcaac | tcccgttgct tcgctaaaag ccttgtgccg caaggctttt  | 1740 |
| agcgaggcga caccgaagac | acatcgcggc gacaccgaaa gggccgaacc ggcctaaaac  | 1800 |
| ccttgctgcg caaggagaac | agccgcgctt tcgcgcgcga aagtgcctca aatgcctgtc  | 1860 |
| ggcatcagca gggatatgat | cggcacgccg aaggcggttg cgatgcgctc caggttgtec  | 1920 |
| aaggagatgt ttctgacttg | gcgctcgag tcgcgaacga aggtgcgatg taggccgcac   | 1980 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| tcaaaggcga gcgcttcttg tgaccagcct ctttcccggc gtaatcggat catgttggcc   | 2040 |
| gcgagcacgg cccgcgcgga atgcgcggtt ggtgcgggag gttgagcggc gggagacatg   | 2100 |
| caaaccagtc tcctgataatg ccgcttttac gtcagccgtg tttaaagtcac aatatggttt | 2160 |
| tctcatagag aaagacggcg tgacgatggg cagaaaaaca gcaatcaggc gagggggtgc   | 2220 |
| cgtgttggcc agcctgttga tttgcgcaat tgaaccggtc ggcgcggcct ccctggtcgg   | 2280 |
| cggtcaaaacc gatgattccg tgtgcgacct gggcagcgcg ccacagaacg cccggaagct  | 2340 |
| gtcggcagcg ggcgacttca tccgcgcgca gtgcaaaaac ggtcaaatgt tggtaggttc   | 2400 |
| cggcatcgtg cctgccggcg ggtttgactc ggaagtggtg cgcctggcgc gcaccttctg   | 2460 |
| ccgcatggcg gacattcaga ctgcgcgcac gcagggcaac atggccggcc tcgtcatgga   | 2520 |
| gatcgacgag gtacggtgca tcatcgggaa gttgccgaca tgagaaaagc gatgttggct   | 2580 |
| ggctttctgg ccgttgttgt ggccaacgtg gttgccgctg agggcggtgc gcccttgcgc   | 2640 |
| ggcggtgttt gcatcggacc gttccgtggc gctgattccg tcgtgactg cgagcacatc    | 2700 |
| ggcaaggtga cgatccgcca gatttacgaa aagggtttc gggtcgttca catgcaggac    | 2760 |
| gacaagaaca cagccagcta cgttgtgtg gttatcgagg agcaggcgcg atgagggcga    | 2820 |
| aagcgtggcg gatgtgttt gccggcgggc gctgggtgct ctggcttccc gtgccggcgt    | 2880 |
| cgglatggct ggcactgccc gaatggcagc acattcccgc catgttggtg ggcggcctga   | 2940 |
| tcgtgtggat tcccttctgg ctgcgttgtt ggctcagtga tggcttcgcg ggcatgtcca   | 3000 |
| ggtggccagg aaccggcgca cctgcggtat ctggcgggtt gaaccgcac accggcaagc    | 3060 |
| catgcacggt gtatcaccag ccgtggggag ataccttctg gggtaggagac tgattatttg  | 3120 |
| attgaggaac gatgacaagg gccagcaaca agctggccct tgtcgttttc tggactgttt   | 3180 |
| taccacaac atccgtctg ctgctgaatt ggcggacatg gcaccgagcc gaacgaacag     | 3240 |
| aacacgcagc aatcccccg cttggggcgc agcagcgtat ggcaggccgg gcactcgtag    | 3300 |
| tagaactggc aggcgtccgt gggcatggtt tcctgctgtg cgtggccgca gtgcgggcag   | 3360 |
| gtcagcacgg attcgagaat gacggcgctc atcgtggcgt tacctctgca cggtagacgg   | 3420 |
| atagcctgcg ttctgtgttg ccgaggtaaa cgcttccggc ttggccttgt cggcgtcata   | 3480 |



|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ggtgacggtg gccgttttct tgtcgaaatc gaccttgacg gcgctcacac cgggcacttt  | 3540 |
| ctccagcgac ttcttgactg tgatcgggca tagctcgag gtcatttct gaacggccag    | 3600 |
| cgtgacggtt ttcggggtgg cggccagcac ggcgagcggc acggcagcca gcagagcaat  | 3660 |
| cagcagtttg cgcatgggag tctcctttca atagaacagc ggggcgaacc acggcacggc  | 3720 |
| caacagggca agcaacagca cagtgcgat ccagaacgtc aggcgtgcc gctggcgtgt    | 3780 |
| gcgcggatca gcgcatggcg tgccgggcgt gcagacctgc ggcaccagat agagcttgcg  | 3840 |
| gaaggccagt ccgagaaaga gcagcgtcat gccgatgaaa aagggccggt acggctccat  | 3900 |
| cgcggtcagg ctgccaaccc atgagccacc aatgccaagc accagcagga caagcggccc  | 3960 |
| gacacagcac accgacgcgc cgatggcggg cagtacgtc acgatcaacg agcttttttc   | 4020 |
| agtgagtcgt gccatgtcg tttccttgta cctgtttgcc caagtgttac tctaaatccc   | 4080 |
| gtacctaatg acggagtcaa ggggggtgtga tgggaacaga actgaccatc ggcaagctgg | 4140 |
| ctgacgtgc cggggtgaat atcgagacga ttcgctacta ccagcggcgc ggccctgtgg   | 4200 |
| atgagccgcc taaaccgcca gggggggcatc ggcgctaigc gcctgagcag gcaaaacgtg | 4260 |
| tgcgatttat caagcgggca caggcgttg gtttcacgt ggacgaggta ggcgcgtac     | 4320 |
| tgaccctgga tgcggcctgc gcctgcggtg agacgcgagc gctggctgtg cgcaagctgg  | 4380 |
| gtctgatcga gcagaagatg gctgacctcg cggccatgcg gcaggcgtg ggtggattgg   | 4440 |
| tgcagcagtg tgatcgggc gacggtggag ccagctgtcc catcatcgac gtgctggcag   | 4500 |
| gtaattagat gtgttcaaaa aatggtggtt ttctggacac atgccggtt gccctgtcct   | 4560 |
| gagttgtcct gatgcgttaa agtggtcatt tattcgttca gctttcaatg tggcggaaact | 4620 |
| gttcatgaat caacgcacg gctatgcccg cgtttcgacc gacgacaaa acctagacct    | 4680 |
| gcaacgggac gcactccggc aggctggatg ctcaaccatt tacgaggaag cagccagcgg  | 4740 |
| aaagagcgca gcaaggcccc agcttgagca gtgtcggaag gctctccggc ccggcgacac  | 4800 |
| gcttgtggtg tggcggcttg atcgcccttg gcgcagcctg cccgacctgg tgcagatcgt  | 4860 |
| ggctgatctt gaacagcgcg gcgtgcattt cgagagcctg accgagaaga tcgagacggg  | 4920 |
| gagcgcagcg ggtaagctgc aattccatgt ttctgctgca ctgccgagt tcgagcgcgg   | 4980 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cctgatccgg gagcgaaccc gggcagggct ggatgcagct cgcgcccg tg gccgatccgg | 5040 |
| tggacgcaaa ccgaagctgg acgccaagca gatacgccac attaaggcgc tactacgtga  | 5100 |
| cccgaatacc tgtgtttgctg aactcgcccc tgactacggc gtgtcgagaa caactatcta | 5160 |
| taaacactgc ggtgttggtt tgccgcgtac agccgatgaa ggggcaatat gacaaaaaag  | 5220 |
| acaacagcat tcgatgtatt cgagaaatgc gtccaagcag ttcaggctgg tgaactgac   | 5280 |
| gaatccgttt ctgcgaagga caaggaattc catttccaga actggtttca gaagcgcctc  | 5340 |
| cagagcctgt cgatgcactt cgaggggtcg ggtcgcaaca cctacccgga cttctgcttg  | 5400 |
| gtagagcaca ccgagggcta cgagatcaag ggtttggcat ggcctggccg cgagcgcgac  | 5460 |
| tacgactcga acagccaagt gccgactggc tatcacaacg gccgtcaaat cttctacgtg  | 5520 |
| ttcgggcgtt accccgcaga cctgtctggc tatgccgatc agggcaacgg ccgcaggcag  | 5580 |
| taccgggtgg ttgacctcgt ggtctgccac ggcgacttcc tcaacgccga tcacaactac  | 5640 |
| gtccataaga acaagagcgt aaagggcttt ggcacctacg gcgacatcat gatccgcgac  | 5700 |
| cggaagatgt acgtcgcgcc gacgccattt gcgctgaccg aaggcaccac tggcctgatg  | 5760 |
| actttgatcc tgccggagaa cttcggcacc gatgaccgtt accagggtggc cggtaacctc | 5820 |
| actcgcgtcg aggcggaaac gctgggtggt ggctacaaact ttgacctgcg cacgaacgag | 5880 |
| ctgagcgcag agcgcgtgcc caatcccaac gcaggcacc agcaccgatt cgtggcctac   | 5940 |
| cggtcaagg atcaagcgag caagcctgtc tccatgactg gcacccaggt gcagcccgc    | 6000 |
| gagaacaacc tgccggacga cgaatgaaca ccatcaccga caagatcggg ttcgcttacc  | 6060 |
| cggttgacgc gaccgcgtg gagtgcgact tcccgtggt cgaaatcagc cagatcgccg    | 6120 |
| agcaggaaag ttggcgaaag gagatcaaca ggcgatcta ccacatccac aagtgtgtgg   | 6180 |
| cgaccagact tgggtcgtg tttcgtggca ttacccttgg tgctttgagt cagcctggt    | 6240 |
| ctgacctctg ggcgcgattc tacaaaacgc acgacctggc cggtaaaggt gtgtcgatc   | 6300 |
| ccttcatggg cagtggcacg acgcttggcg aggccgtcaa gctgggtgcc aaggccatcg  | 6360 |
| gctgcgacat caaccagtc agtaccttcc tcgtacgtca ggcgttcacg ccggcgctccg  | 6420 |
| aggcagagct gcgtgccgt ttcgagcggc tggaaactga cgtggcaccg gagattcggc   | 6480 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gctactacca gacgcgcgat cctaagacgg gcgagctgat tcaggtcttg tactacttct  | 6540 |
| gggtcaagac ggtgacgacg cccgagggcg aggtaatccc ctigtgtgctg cgctacgtgt | 6600 |
| tttcacaaga cgcctacccg aagaagaagc gcgagcgca gatcgtgtgc cctggctgct   | 6660 |
| ggagtgtgct ggaggatcgc tacgatgcga ctgacctgca ctgccagcac tgcggccacc  | 6720 |
| agttcaatcc gcaggaaggc ccggccgctg gtcagtacgt caaaaccaag ggcggtcacc  | 6780 |
| gttaccgcat caaggaacta ctgccaaagg acggtacgcc gccctctcat cgaatgtacg  | 6840 |
| cgatgatggc cttagcgagcg gatggatcga aggtctatct gccggtgcgg aatgaggact | 6900 |
| tggccctcta cgaggaagcc caagaacgcc ttgctacaga ggcactgccg ctgccgaaaa  | 6960 |
| cctctgttcg acctggccac aacaccgacc aggcgcgcgg ctacaactac acccaatggc  | 7020 |
| gcgacttctt caatgcgcgc caactgctgt gccctggcct gctgctgcgg gaaatcctga  | 7080 |
| ccatcgacga cctggcagtg caagagcaga tgctgtgctt gtctctccagc accttggagt | 7140 |
| tcaacaacct gttttgcagc ttcaagggtg agggaaacagg ggccgtgcgg catagtttct | 7200 |
| cgaaccacat cctcaagcca gagcgcaccc cgctggagaa ctccgtgtgg ggcactggca  | 7260 |
| agagcagcgg tacgtttagc acgtttgtcg agtctgcct gctacgtgcg aagcgctacc   | 7320 |
| tcgatgagcc gttcgagatc gcgttcgagc atgaccagga cggtaaccgc gcaggctcgc  | 7380 |
| gcaagacggt ggctagccat ccgatccgcg cccgtcgcgt cgaaacctgg ccggaattgg  | 7440 |
| aggccgcaga tcatggcctg ctgatcctca acggtgacag ctcgaagctg ccggtgcccg  | 7500 |
| ctggttcggg ggatgccgtg gtgactgac cgcctactt cgacttcgtt cattactcgg    | 7560 |
| agttgagcga cttctttttt gcttggtcga cccctgtgct gcgccagcgc tatccgtgga  | 7620 |
| tggcccgca ggactcgtct gaccaagggg aggtgcagca caaagacct cgtgtgttcg    | 7680 |
| cccgtcagct tgcgtcggtg ttacaggagg cgtgccgcgt gcttaaggac gatggagtgt  | 7740 |
| tggcgttcag cttccaccac tcgcgtgccg agggctgggc ggccatctat gaagcgatca  | 7800 |
| acaaggcggg cctggccgta gttgcggctc accctgtcca tgccgagctg cgcgcggcaa  | 7860 |
| gtcccaagac tgcggccaaa gacctgatca gccctgatgc gattctggtg tgtcgcaaaa  | 7920 |
| aggcgtttgc cctgcaccag tcgcctgcta tccaggatgt ccgccaggct gttgatgcgc  | 7980 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tggcatcacg gctgcaagct gctggccttc gcatctcggc gggtgaccgc ttcgtgatcg  | 8040 |
| gcgcagcgca aaccttgatt gcacgcgtg ctgatgacat gggcttcgac gagatcaagg   | 8100 |
| ttgatcttga ggcaattcgg ctggccgtgg ggccaagggc tgcaacatca aaggctgcga  | 8160 |
| gtgcgtggga tgacgatgtg cccctctgat tggctgcacg gccttgtcgg cgcattcggt  | 8220 |
| ttgatggcag ccgctgcacg caagcccgct cctccgct aaagttcatt tatacgcaaa    | 8280 |
| tacgtatttg cgtgatacaa taacccata ttaatggagg tgcgtaaatg cggactattg   | 8340 |
| tttggttag caaaaagggt ggctcggca agacaacgat tgcaagtcac ttgggtgtca    | 8400 |
| tggccgagca gagcaaagag gggccagtgg cgtgatcga cacagacca caaggctcgc    | 8460 |
| tcgcgtcctg gtggaatgag cgaaccaatg aggcaccgt gtttgacgg gtggaaatcg    | 8520 |
| gcaagctgac cgagcacctt caggcattgt ccaagggtgg catcaagctg gccatcatcg  | 8580 |
| acaccccgcc ctctgttacg gaaatgattc agcaggtgct ccgcaccgcc gacttggtag  | 8640 |
| tgatcccccac caggccgagt ccgcatgact tgcgcgcgt cggtatctacc gtcgaactgg | 8700 |
| tggagaacgc aggcaagcga atgatcttcg tcatcaatgg ggcggcacct cgcgcgcgga  | 8760 |
| tcgcgggtga ggctgccgtg gcgctttcgc agcatggcac ggttgcccc gtgacgtgt    | 8820 |
| accagcgcac cgacttcgcc agctcgatga tcgacggccg caccgtccag gaaatcgacc  | 8880 |
| ccaaggggcg gtcggccgaa gaaatcgggc agttgtggaa atacgtatct acacaactgc  | 8940 |
| gtaaaatttg atataatacg tacatgcgta ttaatggaga tacgtaaatg gctaaaactg  | 9000 |
| catctttgac tgccggcctg gtggccaaga aaggggaggc gtcccctgct acggttgctg  | 9060 |
| cggcacccca ggttcaacct atcgaagtga aggcattcgc gactggcgc ggccgggatt   | 9120 |
| actacaaggc gttgaccgtc aagttggatc gtgaccgcta cgagagtctg aaaagcatgg  | 9180 |
| gcgtgaagct ggacaagaag agccaggaaa tctttgtcga ggccctggat ttgtggatga  | 9240 |
| agtcggccgc tggccagcaa cacgcctaag agggccctat gcgttcagt cgtctgccg    | 9300 |
| tcgaactcgc caaggagttag gccgaaaaag ccaaggcccg ccgcctagcg gcggaaga   | 9360 |
| acgagctggg acttgaaggc ccggcgagg gcaacgccgg caccactccc agcccgtga    | 9420 |
| aggttgcgc cgaagtgtg ggcgagcagc cggcacgacg caagggagcg ccgaaaggc     | 9480 |

|                                                                    |       |
|--------------------------------------------------------------------|-------|
| cgcgtggcct gatgccggtg catcatccaa accgcgattt ctctttgtgc gatctgtttg  | 9540  |
| actacgccct aaaggatgac ggcgtagaca tggaggcccc catcttcacc ttggcaacca  | 9600  |
| ggccggacac ctctgtttgg cattgggaaa gcaaggatgg gacacgcgcc atcacctca   | 9660  |
| cgccaaagcgt gaaggggagg gccacgcagt ttgataagga ttiacttatt tacgtagtta | 9720  |
| gccagatgac cgaggctatc aatcgcggtc ggccatgatc gaacaatcga accgtgcgt   | 9780  |
| ttcgcgtcta tgactacttg gtctcaacca acaagccgac tggcggcaag gagtaccagc  | 9840  |
| gactggagga tgccctagac aggcctgcggg gtacatcat caagacgaac atcaagacgg  | 9900  |
| gtggccagcg tgtgaaggaa ggcttcggca tcgtcgaatg ctggacgac atcgagaagg   | 9960  |
| ccccgcagca tgaccgcatg attgccgtcg aggtcacgt ctccaagtgg cttttcaatg   | 10020 |
| cagtcaggc ccacgaggtt ctgaccatca acccggacta ttcccgctg cgtaagccaa    | 10080 |
| ttgagcgccg ttgtiacgag ctggccagga agcactgtgg cgaccaggcc tttttgtga   | 10140 |
| ttgggctgga actgttgag gacaagtgc gcagcaagtc ggcaactgtt gagttccgcc    | 10200 |
| gtgccttgcg cgagatcatc aaggccgaca cttgccaga ctaccgcatg acgcttgatg   | 10260 |
| acgagaaaga ccaggtgatt ttctacacc gcgacacgaa gaagctagcg gcgtctaccg   | 10320 |
| ctctggcccc gcgcttcag tgacgcccc agtattgacg gtcaatactt cgttatttca    | 10380 |
| cccatgcgtt gttaccgctg cgtgttgac gtcccttga cctagcgcc gaggcagggc     | 10440 |
| tttcgcgtt tgcatgagc caccaagtgc gtctcgctcc ttcgagcatc aagccctaac    | 10500 |
| gcgtttcatg tcactttgc gcacgaaagt cgaggcaaga ggcttgatcg tgtctatcgt   | 10560 |
| tacatcacc atgcctgtgg atggacacgt tacatcacc atgttttctg tggatgggca    | 10620 |
| cgttacatca cccatactc acttcgttac atcgcccatg cagcgatttg tggaagcctt   | 10680 |
| gagcagcaag gctttacgag cgttatccac agccgtaaca cgcgcgcgcg attttttaac  | 10740 |
| tttataaatc tttaacgcgg ttgcggacaa agcccgcgcc gccctttggg ggctacgccc  | 10800 |
| ccgccgctc ctacgggccc caagcgcccc tccgccgcg cttcgcgctc cctcccggca    | 10860 |
| tccccgagg gtttcgctt cgtgcacccc tcgcgcttc cgtcacccg catatcgagg      | 10920 |
| cccccaaagg gggccggatg gtgcccc                                      | 10948 |





201841647

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

用於治療皮膚損傷之細菌性分泌蛋白質體

### 【英文發明名稱】

BACTERIAL SECRETOME FOR USE IN THE TREATMENT OF SKIN LESIONS

### 【中文】

本發明係有關於一種細菌性分泌蛋白質體在皮膚損傷之治療(而且更特別是傷口癒合)的領域上之一新穎用途。本發明亦係有關於包含有這樣的一種細菌性分泌蛋白質體作為活性劑之美容或皮膚科組成物。

### 【英文】

The present invention relates to a novel use of a bacterial secretome in the field of the treatment of skin lesions and more particularly of wound healing. The invention also relates to cosmetic or dermatological compositions comprising such a bacterial secretome as active agent.

【指定代表圖】(無)

【代表圖之符號簡單說明】  
(無)

【特徵化學式】  
(無)



## 【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種屬於乙型變形菌綱 (class Betaproteobacteria)的奈瑟氏菌科(Neisseriaceae)之亞科的非病原性革蘭氏陰性細菌之細菌性分泌蛋白質體，其係供用於皮膚損傷的治療，該非病原性革蘭氏陰性細菌含有一包含有序列辨識編號1之序列的16S rRNA或任何一個與該序列辨識編號1之序列具有至少80%相同性的序列，

該分泌蛋白質體是藉由一包括下列步驟的方法而被獲得：

- a) 在一培養基內以及在適合於該細菌的生長之條件下來培養該細菌，
- b) 液體/固體分離以及液體相的回收，
- c) 獲得包含有由該細菌分泌在該液體相中的生物分子的該分泌蛋白質體。

【第2項】 如請求項1之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：一鹼性緩衝液被添加至步驟b)所得到的該液體相，以及所得到之經緩衝的液體相較佳地在一介於1和6℃的溫度下被選擇性地保持接觸歷時1至7小時。

【第3項】 如請求項2之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該鹼性緩衝液係選自於Tris緩衝液、精胺酸緩衝液以及此等的混合物。

【第4項】 如請求項1至3中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：在步驟c)

之前，在步驟b)的液體/固體分離之後是一個藉由過濾來澄清該液體相或該經緩衝的液體相之步驟b')。

【第5項】 如請求項4之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：過濾係利用一個0.2  $\mu\text{m}$  門檻(cut-off)來予以進行。

【第6項】 如請求項1至5中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該等生物分子係由該細菌所分泌的胜肽、蛋白質以及二次代謝物所構成。

【第7項】 如請求項1至6中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該細菌含有至少一個質體，該質體包含有序列辨識編號2之序列，或任何一個與該序列辨識編號2之序列具有至少80%相同性的序列。

【第8項】 如請求項1至7中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該細菌是於2010年4月8日被寄存於CNCM的細菌，編號為I-4920。

【第9項】 如請求項1至8中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該等皮膚損傷係選自於由擦傷、燒傷、曬傷、抓痕、割傷、刮傷、縫合線(stitches)所構成的群組。

【第10項】 如請求項1至9中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該等皮膚損傷跟隨在創傷、外科手術、一皮膚科程序或一美容醫學

程序之後。

【第11項】如請求項1至10中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該皮膚損傷的治療在於改善癒合以及皮膚修復。

【第12項】如請求項1至11中任一項之供用於皮膚損傷的治療之細菌性分泌蛋白質體，其特徵在於：該細菌性分泌蛋白質體被組合以一銅鹽和/或一鋅鹽。

【第13項】一種皮膚科組成物，其含有一如請求項1至8中任一項所定義的細菌性分泌蛋白質體以及一適合供局部施用的皮膚科賦形劑，以供用於皮膚損傷的治療。

【第14項】一種皮膚科組成物，其含有一如請求項1至8中任一項所定義的細菌性分泌蛋白質體、一銅鹽和/或一鋅鹽以及一合適的皮膚科賦形劑。

【第15項】如請求項14之皮膚科組成物，其係供用於皮膚損傷的治療。







