

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190171 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.24

(22) Дата подачи заявки
2018.11.02

(51) Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 35/741 (2015.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ВИДОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

(31) 16/042,939

(32) 2018.07.23

(33) US

(86) PCT/US2018/059073

(87) WO 2020/023072 2020.01.30

(71) Заявитель:

ЗЭ ЮНАЙТЕД СТЭЙТС ОФ
АМЕРИКА, ЭС РЕПРЕЗЕНТИД БАЙ
ЗЭ СЕКРЕТРИ, ДЕПАРТМЕНТ ОФ
ХЭЛС ЭНД ХЬЮМАН СЕРВИСЕЗ
(US)

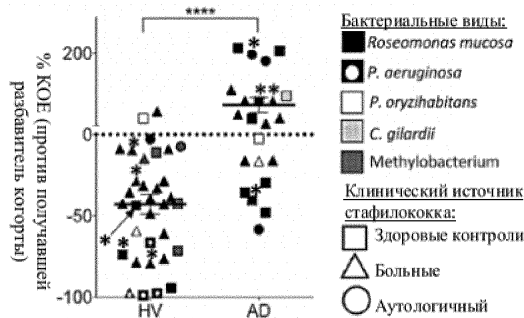
(72) Изобретатель:

Майлз Ян Энтени, Датта Сандип К.
(US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Лыу Т.Н., Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Раскрываются фармацевтические композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество очищенных жизнеспособных грамотрицательных бактерий и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции составляют для местного введения. Также раскрываются способы лечения атопического дерматита с использованием таких фармацевтических композиций.



A1

202190171

202190171

A1

ПРИМЕНЕНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ВИДОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ **АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА**

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента США с серийным № 16/042939, поданной 23 июля 2018 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0002] Настоящее раскрытие относится к области дерматологии, в частности, к применению путем местного нанесения жизнеспособных грамотрицательных бактерий для лечения атопического дерматита.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Термин «экзема», часто используемый для описания атопического дерматита, был придуман в Древней Греции и примерно переводится как «вскипание». Однако современная наука признает вклад факторов хозяина и окружающей среды в развитие этого заболевания. Признаки заболевания включают в себя снижение барьерной функции, снижение активации врожденного иммунитета и восприимчивость к инфекциям, вызываемым *Staphylococcus aureus*. Предрасполагающие факторы хозяина обеспечиваются моногенными мутациями в STAT3, филаггине и других генах, связанных с AD-подобными фенотипами (Lyons *et al.*, *Immunology and allergy clinics of North America* **35**, 161-183 (2015); опубликовано в Интернете Epub Feb (10.1016/j.iac.2014.09.008)). Генетическое влияние хозяина можно терапевтически модулировать с помощью местных стероидов или ингибиторов кальциневрина (Boguniewicz and Leung, *J Allergy Clin Immunol* **132**, 511-512 e515 (2013); опубликовано в Интернете (Epub) Aug (10.1016/j.jaci.2013.06.030)). *S. aureus* вносит свой вклад в патогенез AD, который может быть уменьшен с помощью антибиотиков (Boguniewicz and Leung, *supra*; Kobayashi *et al.*, *Immunity* **42**, 756-766). Недавняя работа показала, что микробиом кожи значительно отличается у здоровых контрольных индивидуумов и больных с AD, и что симптомы связаны с потерей комменсального разнообразия ((Kong *et al.*, *Genome research* **22**, 850-859 (2012); опубликовано в Интернете

(Epub) May (10.1101/gr.131029.111)). Остается потребность в способах терапевтического воздействия на такой дисбиоз и лечения атопического дерматита.

Сущность настоящего изобретения

[0004] В настоящем документе раскрывается, что культивируемые грамотрицательные бактерии (CGN) из кожи здоровых субъектов ассоциировали с активацией врожденного иммунитета, усиленной барьерной функцией и контролем *S. aureus*. Такие грамотрицательные бактерии применяют для лечения атопического дерматита у субъектов с таким состоянием.

[0005] Согласно некоторым вариантам осуществления раскрываются фармацевтические композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество очищенных жизнеспособных грамотрицательных бактерий и фармацевтически приемлемый носитель, в которой а) лизат и/или компонент грамотрицательных бактерий ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе; б) грамотрицательная бактерия стимулирует кератиноциты человека; в) грамотрицательная бактерия индуцирует экспрессию цитокинов из человеческих клеток; и д) грамотрицательная бактерия является непатогенной при введении на кожу субъекта. Фармацевтические композиции составляют для местного введения.

[0006] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество очищенных жизнеспособных грамотрицательных бактерий и фармацевтически приемлемый носитель, при этом очищенные жизнеспособные грамотрицательные бактерии содержат по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa*, и при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность (i) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или (ii) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, и SEQ ID NO: 3. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas*

micosa содержит изолят RM-A, RM-B или RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-A. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-B. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-A, RM-B или RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-A. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-B. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* состоит из изолятов RM-A, RM-B и RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в суммарном количестве от 10^4 до 10^{12} колониеобразующих единиц. Согласно следующим вариантам осуществления фармацевтическая композиция находится в лекарственной форме для местного применения. Согласно следующим вариантам осуществления лекарственная форма для местного применения представляет собой крем, гель, пену, мазь или жидкость. Согласно некоторым вариантам осуществления представлена перевязочный материал, содержащий фармацевтическую композицию согласно любому из упомянутых выше вариантов осуществления. Согласно некоторым вариантам осуществления представлен аэрозольный баллон, содержащий фармацевтическую композицию согласно любому из упомянутых выше вариантов осуществления. Согласно некоторым вариантам осуществления представлен набор для лечения атопического дерматита, содержащий контейнер, содержащий фармацевтическую композицию согласно упомянутым выше вариантам осуществления; контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель; и инструкции по нанесению фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем местным путем на кожу.

[0007] Также раскрываются способы лечения атопического дерматита с использованием таких фармацевтических композиций. Согласно некоторым вариантам осуществления представлен способ лечения атопического дерматита, предусматривающий введение местным путем субъекту, нуждающемуся в этом, очищенных жизнеспособных грамотрицательных бактерий и фармацевтически приемлемого носителя, при этом очищенные жизнеспособные грамотрицательные бактерии включают в себя по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa*, и при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas*

micosa содержит нуклеотидную последовательность (i) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или (ii) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, и при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в количестве, достаточном для лечения атопического дерматита у субъекта. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем с помощью опрыскивания. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем субъекту по меньшей мере два раза в неделю. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем субъекту через сутки на протяжении недели. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем субъекту ежедневно на протяжении недели. Согласно следующим вариантам осуществления субъект представляет собой взрослого человека. Согласно следующим вариантам осуществления субъект представляет собой младенца. Согласно следующим вариантам осуществления субъект представляет собой ребенка. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-A, RM-B или RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-A. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-B. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-A, RM-B или RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-A. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-B. Согласно следующим

вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* состоит из изолятов RM-A, RM-B и RM-C. Согласно следующим вариантам осуществления по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в суммарном количестве от 10^4 до 10^{12} колониеобразующих единиц. Согласно следующим вариантам осуществления фармацевтическая композиция находится в лекарственной форме для местного применения. Согласно следующим вариантам осуществления лекарственная форма для местного применения представляет собой крем, гель, пену, мазь или жидкость.

[0008] Упомянутые выше и другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут более понятными из следующего подробного описания некоторых вариантов осуществления, которые представлены со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

Краткое описание графических материалов

[0009] Файл настоящего патента или заявки содержит по меньшей мере одну выполненную в цвете фигуру. Копии публикации настоящего патента или заявки на выдачу патента с выполненной(ыми) в цвете фигурой(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

[0010] **Фиг. 1A-1D. Изоляты CGN различаются по присутствию и ингибированию *S. aureus* у здоровых добровольцев и больных с АД.** (A) Процент индивидуумов с выходом изолятов CGN от HV ($n = 26$) и субъектов с АД ($n = 17$). Подсчитывали индивидуумов с несколькими изолятами CGN на изолят для $> 100\%$ суммарного количества у HV; подробности см. в таблице 1. (B) Восемь штаммов *S. aureus*, выделенных у HV и больных с АД выращивали в присутствии либо надосадочной жидкости CGN, либо контрольной среды. Каждая точка данных представляет эффект в отношении роста *S. aureus* надосадочной жидкости от одного изолята CGN по сравнению с контролем в виде среды (изоляты HV = 9, изоляты АД = 7); фигуры представляют источник *S. aureus* либо в виде аутологичного *S. aureus* от участника исследования, либо в виде одного изолята *S. aureus* от HV или больных с АД. Точки данных со знаком * представляют один изолят CGN, происходящий от HV, и один, происходящий из АД, выбранный для последующих экспериментов с заражением человека и мышинной модели. В качестве альтернативы, данные представлены по видам CGN, см. фиг. 4. (C) В уши здоровым мышам одновременно инокулировали *S. aureus* (штамм SAAS9) и *R. mucosa* (*Rm*) от HV или больных с АД, или *P. aeruginosa* от HV в течение 10 суток. На сутки 12 уши гомогенизировали и высевали с

помощью серийных разбавлений для КОЕ. Показано процентное изменение роста по сравнению с контролем с разбавителем (без добавления CGN). (D) Выход КОЕ CGN, взятых у тех же мышей, что и панель С. Показанные данные представляют собой комбинацию трех или более независимых экспериментов (B) или представляют два независимых эксперимента (C-D) и представлены как среднее + SEM. SA = *S. aureus*, HV = здоровый доброволец, AD = атопический дерматит, CGN = культивируемые грамотрицательные, Rm = *Roseomonas mucosa*, Pa = *Pseudomonas aeruginosa*. Значимость определяли с помощью t-критерия Стьюдента (B) или ANOVA с поправкой Бонферрони (C-D).

[0011] Фиг. 2A-2D. CGN от HV усиливает врожденный иммунитет и барьерную функцию. (A) Анализ цитокинов для *in vivo* заражения человека путем создания волдыря у здоровых контрольных индивидуумов, демонстрирующий цитокиновые ответы на типичный штамм *R. mucosa* от здорового контрольного индивидуума против такового, выделенного у больного с AD по сравнению с лункой с контролем в виде солевого раствора (пунктирная линия), N = 7. (B) Парный анализ данных, представленных на панели А, демонстрирующий продуцирование цитокина в лунке с содержимым волдыря, подвергнутому полученной от HV *R. mucosa*, меньше продуцирования цитокина в лунке с содержимым волдыря, подвергнутому полученной от AD *R. mucosa*, у одного и того же субъекта-человека. (C) В уши мышей инокулировали ежедневно в течение трех суток $1e7$ КОЕ *R. mucosa* либо от HV, либо от AD. Показана представленность мРНК в сутки 5 для IL-1 β и филаггрина, стандартизованная по GAPDH и сравниваемая с необработанными мышами, N = 4-5 мышей на группу. (D) Спины мышей брили, а волосы удаляли химическим путем в сутки 0. Затем измеряли TEWL после ежедневного нанесения $1e7$ КОЕ *R. mucosa* либо от HV, либо от AD, N = 4-5 мышей на группу. Показанные данные представляют собой комбинацию 7 независимых экспериментов (A-B) или представляют два или более независимых эксперимента (C-D) и представлены как среднее + SEM (C-D) или среднее и отдельные участники (A-B). HV = здоровый доброволец, AD = атопический дерматит, CGN = культивируемые грамотрицательные, Rm = *Roseomonas mucosa*, FLG = филаггрин, IL- = интерлейкин, TEWL = трансэпидермальная потеря воды. Значимость для контроля в виде разбавителя (или как указано) определяли с помощью ANOVA с поправкой Бонферрони.

[0012] Фиг. 3A-3D. CGN от HV улучшает исходы на модели мыши MC903 AD-подобного дерматита. (A-B) В оба уха мышам инокулировали ежедневно *R. mucosa* (Rm) от HV или больного с AD, или *P. aeruginosa* (Pa) от HV, или штамм SAAS9 *S. aureus* в течение 2 суток перед нанесением MC903. Затем бактерии наносили совместно с MC903 ежедневно в течение 13 суток. Показана толщина уха на сутки 14 (A) для каждого уха и

суммарные содержания IgE в сыворотке (B); N = 4-8 мышей на группу. (C-D) Мышей обрабатывали с помощью MC903 в течение 14 суток для индуцирования AD-подобного дерматита. Начиная с суток 13, мышей обрабатывали ежедневно в течение 3 суток с помощью 1е6 КОЕ живой *R. mucosa* от HV или больного с AD (HVCGN и ADCGN), 1е6 КОЕ убитой *R. mucosa* от того же HV, повторно суспензированной в надосадочной жидкости от 3е6 КОЕ аутологичной *R. mucosa* (мертвая смесь), или в надосадочной жидкости от 1е7 КОЕ HV *R. mucosa* (надосадочная жидкость). Показано визуальное покраснение на сутки 21 (D) и толщина уха (C); N = 3-5 мышей на группу. Показанные данные являются типичными для трех независимых экспериментов и представлены как среднее + SEM. Значимость определяли с помощью ANOVA.

[0013] Фиг. 4. Анализ данных по видам из фиг. 1B. Восемь штаммов *S. aureus*, выделенных у HV и больных с AD выращивали в присутствии либо надосадочной жидкости CGN, либо контрольной среды. Каждая точка данных представляет эффект в отношении роста *S. aureus* надосадочной жидкости от одного изолята CGN по сравнению с контролем в виде среды (изоляты HV = 9, изоляты AD = 7). Значимость у изолятов *R. mucosa* определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

[0014] Фиг. 5A-5C. Протокол создания волдырей вакуумом. (A) Изображение созданного по технологии трехмерной печати устройства для индуцирования волдырей. (B) Волдыри появляются через 2 часа после применения вакуума. (C) Камеру для заражения помещают над оголенными областями волдырей, бактериальные изоляты помещают с помощью пипетки в центр каждой крышки для заражения.

[0015] Фиг. 6A-6B. Влияние CGN на ответы цитокинов и противомикробных пептидов. Анализ цитокинов (A) и противомикробных пептидов (B) для *in vivo* заражения человека путем создания волдыря (см. дополнительные способы), N = 5. Представленные данные представляют собой комбинацию пяти независимых экспериментов и представлены как среднее + SEM (B) или среднее и данные отдельных участников эксперимента (A).

[0016] Фиг. 7A-7G. CGN стимулируют первичные кератиноциты человека. Первичные кератиноциты крайней плоти человека культивировали до слияния. В лунку добавляли 1е7 КОЕ грамотрицательных бактерий. мРНК собирали из КС через 24 часа и анализировали с помощью ПЦР. Данные представляют три независимых эксперимента и представлены как среднее + SEM с отдельными точками, представляющими КС, культивируемые с отдельными изолятами. Значимость определяли с помощью t-критерия Стьюдента. * = $p < 0,05$, ** = $p > 0,01$.

[0017] Фиг. 8A-8C. Липиды, продуцируемые HV-*R. mucosa*, ингибируют рост *S. aureus*. (A) Выполняли осаждение сульфатом аммония на надосадочных жидкостях от *R. mucosa* и *P.*

aeruginosa перед оценкой ингибирования *S. aureus* (штамм USA300), как выполняли для фиг. 1В. (В) Три изолята *S. aureus* культивировали в присутствии или в отсутствие лизофосфатидилхолина (LPC) или кардиолипина с ингибированием, оцениваемым как на фиг. 1В по сравнению с разбавителем (0). (С) Оценивали кератиноциты крайней плоти человека, культивируемые в присутствии или в отсутствие LPC. Данные являются типичными для трех независимых экспериментов и представлены как среднее + SEM. Значимость определяли с помощью ANOVA с поправкой Бонферрони. * = $p < 0,05$.

[0018] Фиг. 9. CGN влияет на ответы мыши на филаггрин во время заражения MC903. Мышей подвергали обработке с помощью MC903 вместе с инокуляцией грамотрицательных изолятов, как показано. мРНК собирали из ушей на сутки 14 и анализировали с помощью ПЦР. Показанные данные являются типичными для трех независимых экспериментов и представлены как среднее + SEM. Значительное отличие от MC903 показано, как рассчитанное с помощью ANOVA. * = $p < 0,05$.

[0019] Фиг. 10А-10В. На **фиг. 10А** иллюстрируется график результатов РСТ в режиме реального времени из анализа аллельной дискриминации для идентификации изолятов RM-A и RM-C. По оси X показана относительная представленность амплификации репортера варианта «А», а по оси Y показана относительная представленность амплификации репортера варианта «G». На **фиг. 10А** иллюстрируется график результатов РСТ в режиме реального времени из анализа аллельной дискриминации для идентификации изолятов RM-A и RM-B. По оси X показана относительная представленность амплификации репортера варианта «С», а по оси Y показана относительная представленность амплификации репортера варианта «Т».

[0020] Фиг. 11А-11Е. Краткое описание схемы исследования для взрослых субъектов (**фиг. 11А**). Средние (столбики) и отдельные (кружочки; $n = 10$) баллы до и после обработки для объективной интенсивности (**фиг. 11В**) и субъективного зуда (**фиг. 11С**), как измерено с помощью SCORAD. (**Фиг. 11D**) Специфическая для антекубитальной ямки SCORAD; сумма баллов локальной интенсивности и зуда. (**Фиг. 11Е**) Средние (алый) и индивидуальные (серый) сообщенные участниками значения применения стероидов (сутки/месяц) за 6 недель до включения (неделя 0), после лечения (неделя 6) и после вымывания (неделя 10). Больных инструктировали о соблюдении их домашних режимов на протяжении всего активного лечения; однако больные 2 и 9 прекратили прием местных стероидов после начала лечения *R. mucosa*.

[0021] Фиг. 12А-Ф. Краткое описание схемы исследования для педиатрических субъектов (**фиг. 12А**). Средние (алый) и индивидуальные (серый; $n = 5$) значения SCORAD (**фиг. 12В**) и процентное улучшения (**фиг. 12С**) в ходе лечения. Пунктирная линия указывает уровень

улучшения, который не соответствует нулевой гипотезе. (Фиг. 12D) Средний и индивидуальный зуд. (Фиг. 12e) Средние и индивидуальные сообщаемые больным сутки местного применения стероидов в месяц в течение 3 месяцев до включения в исследование (неделя 0) и в ходе лечения. (Фиг. 12E) Отношение *Staphylococcus aureus* к коагулазаотрицательным стафилококкам из антекубитальной ямки (АС), как определено в культуре. Значимость определили с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия знаковых рангов Уилкоксона. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, как определено в сравнении со значением включения в исследование.

Подробное описание настоящего изобретения

[0022] В настоящем документе раскрывается, что комменсальные организмы от здоровых контрольных индивидуумов отличаются их иммунной активацией, барьерной функцией и противомикробными профилями при сравнении с идентичными видами, взятыми у больных с атопическим дерматитом. Таким образом, представлен биотерапевтический подход на основе живых организмов для лечения больных с атопическим дерматитом.

[0023] В настоящем документе раскрываются составленные для местного введения фармацевтические композиции, которые могут применяться для лечения атопического дерматита. Такие фармацевтические композиции включают в себя терапевтически эффективное количество очищенных жизнеспособных грамотрицательных бактерий и фармацевтически приемлемый носитель, при этом а) лизат и/или компонент грамотрицательных бактерий ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе; б) грамотрицательная бактерия стимулирует кератиноциты человека; в) грамотрицательная бактерия индуцирует экспрессию цитокинов из человеческих клеток; и д) грамотрицательная бактерия является непатогенной при введении на кожу субъекта. В конкретном неограничивающем примере грамотрицательные бактерии продуцируют лизофосфатидилхолин.

[0024] Грамотрицательные бактерии могут быть из любого вида. Таким образом, в некоторых примерах, если грамотрицательная бактерия принадлежит *Pseudomonas*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola* или *Pseudomonas oryzae*. В других примерах, если грамотрицательная бактерия принадлежит *Pantoea*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой *Pantoea septica*. В дополнительных примерах если грамотрицательная бактерия принадлежит *Moraxella*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой *Moraxella osloensis*. В следующих примерах, если грамотрицательная бактерия принадлежит *Roseomonas*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой

Roseomonas mucosa. Грамотрицательные бактерии, включенные в фармацевтическую композицию, могут быть из одного штамма, одного вида или одного рода. В качестве альтернативы, в раскрываемых способах могут быть использованы комбинации штаммов, видов и/или родов грамотрицательных бактерий.

Термины

[0025] Определения общих терминов в молекулярной биологии можно найти в работе Benjamin Lewin, *Genes V*, опубликованной Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, опубликованной Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); и Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, опубликованной VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

[0026] Для облегчения рассмотрения различных вариантов осуществления настоящего раскрытия представлены следующие пояснения определенных терминов.

[0027] Атопический дерматит: хроническое заболевание, поражающее кожу. При атопическом дерматите кожа сильно зудит. Расчесывание приводит к покраснению, отеку, растрескиванию, «просачивающейся» прозрачной жидкости и, наконец, образованию корок и шелушению. В большинстве случаев наблюдаются периоды обострений, за которыми следуют периоды ремиссии. Хотя сложно точно определить, сколько людей страдает атопическим дерматитом, примерно у 20% младенцев и маленьких детей наблюдаются симптомы этого заболевания. У приблизительно 60% этих младенцев сохраняются один или несколько симптомов атопического дерматита во взрослом возрасте. Таким образом, более 15 миллионов человек в Соединенных Штатах Америки имеют симптомы данного заболевания. «Область поражения» представляет собой участок кожи, пораженной атопическим дерматитом. Обычно поражение характеризуется сухостью кожи (ксероз), покраснением, волдырями, корками или любой комбинацией. На непораженную область не влияет атопический дерматит или какая-либо другая кожная патология.

[0028] Животное: живые многоклеточные позвоночные организмы, в категорию которых входят, например, млекопитающие и птицы. Термин «млекопитающее» включает в себя как человека, так и отличных от человека млекопитающих. Подобным образом, термин «субъект» включает в себя как человека, так и ветеринарных субъектов.

[0029] Антибиотик: соединение или вещество, которое убивает или существенно замедляет рост бактерии, грибка или любого другого микроба. Термин «противобактериальное средство» представляет собой соединение или вещество, которое убивает или существенно замедляет рост бактерий.

[0030] Противобактериальные антибиотики обычно классифицируют на основании их механизма действия, химической структуры или спектра активности. Большинство из них нацелены на бактериальные функции или процессы роста. Те, которые нацелены на бактериальную клеточную стенку (например, пенициллины и цефалоспорины) или на клеточную мембрану (например, полимиксины) или мешают основным бактериальным ферментам (например, хинолоны и сульфаниламиды), являются бактерицидными. Те, которые нацелены на синтез белка (например, аминогликозиды, макролиды и тетрациклины), как правило, являются бактериостатиками. Дальнейшая категоризация основана на их целевой специфичности.

[0031] Противобактериальные антибиотики «узкого спектра» нацелены на определенные типы бактерий, такие как грамотрицательные или грамположительные бактерии. «Антибиотики широкого спектра действия» воздействуют на ряд различных типов бактерий. Противобактериальные средства также включают в себя циклические липопептиды (такие как даптомицин), глицилциклины (такие как тигециклин) и оксазолидиноны (такие как линезолид).

[0032] Местные антибиотики представляют собой антибиотики, которые наносят на поверхность тела, такую как кожа или глаз. Местные антибиотики часто состоят в виде мази или крема и содержат активные средства, такие как макролидный антибиотик (такой как эритромицин), сульфамидный антибиотик (такой как сульфациетамид), циклический пептид (такой как бацитрацин и полимиксин), псевдомоносовая кислота (такая как мупироцин), аминогликозид (такой как неомицин) или хинолон (такой как цiproфлоксацин или офлоксацин), нитроимидазол (такой как метронидазол) или комбинация лекарственных средств (такая как бацитрацин/полимиксин или неомицин/полимиксин В/бацитрацин).

[0033] Комменсальный: организмы являются комменсальными, если они могут жить в одной и той же среде, и один получает выгоду от другого, не влияя (не причиняя вред или не принося пользу) другому. Бактерии микробиоты кожи считаются комменсальными по отношению к хозяину, например, человеку. Количество видов комменсальных бактерий, присутствующих в микробиоте кожи, можно определить, например, с помощью рибосомальной РНК 16S для идентификации присутствующих видов бактерий.

[0034] Эпителиальная клетка: плотно упакованная клетка, которая образует эпителий, например, в коже. Существует несколько типов эпителия, в том числе простой плоский эпителий, простой кубовидный эпителий, простой столбчатый эпителий, псевдостратифицированный столбчатый эпителий, многослойный плоский

(некератинизированный) эпителий, многослойный кубовидный эпителий и переходный эпителий.

[0035] Грамотрицательные бактерии: эти бактерии, имеют множество внешних мембран, внутреннюю клеточную мембрану, тонкий слой пептидогликана и внешнюю мембрану, содержащую липополисахариды (LPS). Во внешней мембране имеются порины, и грамотрицательные бактерии не сохраняют окраску кристаллическим фиолетовым, используемую в способе окрашивания по Граму для дифференциации бактерий. Между внешней мембраной и цитоплазматической мембраной имеется пространство, заполненное периплазмой. S-слой прикреплен непосредственно к внешней мембране. Тейхоевые кислоты или липотейхоевые кислоты отсутствуют. Большинство грамотрицательных бактерий (но не все) не образуют спор. Типичные грамотрицательные виды включают в себя без ограничения виды, наиболее часто связанные с сепсисом и септическим шоком у людей, например, как описано в THE HANDBOOK OF ENDOTOXINS, 1: 187-214, eds. R. Proctor and E. Rietschel, Elsevier, Amsterdam (1984). Консервативная сигнатурная инсерционно-делеционная мутация (CSI) в белке HSP60 (GroEL) отличает все традиционные типы грамотрицательных бактерий (например, *Proteobacteria*, *Aquificae*, *Chlamydiae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Fibrobacteres*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Spirochetes* и *Acidobacteria*). Грамотрицательные бактерии включают в себя без ограничения *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, виды *Proteu*, виды *Pseudomonas*, *Salmonella* и *Roseomonas*. CGN представляют собой грамотрицательные бактерии, обнаруживаемые в коже. Под «компонентом» подразумевается любая молекула, присутствующая в грамотрицательных бактериях или секретируемая ими. Таким образом, компонент может присутствовать в лизате или надосадочной жидкости. В конкретных неограничивающих примерах компонент грамотрицательных бактерий, такой как включенный в надосадочную жидкость, ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе.

[0036] Грамположительные бактерии: бактерии, сохраняющие окраску кристаллическим фиолетовым в способе окрашивания по Граму для бактериальной дифференцировки. Эти бактерии характеризуются преобладанием пептидогликанов над молекулами LPS в их мембранах, которые способны индуцировать этиологию заболевания и симптомы, характерные для микробной инфекции, аналогичные тем, которые описаны для грамотрицательных видов.

[0037] Гетерологичный: происходящий из отдельных генетических источников или видов. Полипептид, являющийся гетерологичным, происходит от другого типа клетки или ткани или от другого вида реципиента и клонируется в клетку, которая обычно не экспрессирует этот полипептид.

[0038] Клетки-хозяева: клетки, в которых можно размножить вектор и экспрессировать его ДНК. Клетка может быть прокариотической или эукариотической. Клетка может быть клеткой млекопитающего, такой как клетка человека. Термин также включает в себя любое потомство рассматриваемой клетки-хозяина. Понятно, что все потомство может не быть идентичным родительской клетке, поскольку во время репликации могут иметь место мутации. Однако такое потомство учитывается при использовании термина «клетка-хозяин».

[0039] Микробиом: генетическое содержание сообществ микробов, которые живут в человеческом организме и на нем, как постоянно, так и временно, включая эукариоты, археи, бактерии и вирусы (в том числе бактериальные вирусы (т. е. фаги)), при этом термин «генетическое содержание» включает в себя геномную ДНК, РНК, такую как микро-РНК и рибосомальная РНК, эпигеном, плазмиды и все другие типы генетической информации.

[0040] Иммунокомпетентный: субъект, такой как человек, у которого нет иммунного дефицита, такого как гуморальный (В-клеточный) иммунный дефицит, Т-клеточный дефицит или дефицит комплемента. У иммунокомпетентного субъекта может развиваться иммунный ответ на бактериальную инфекцию. Термин «иммунокомпетентность» представляет собой способность организма продуцировать нормальный иммунный ответ после воздействия антигена или бактерии.

[0041] Выделенная или очищенная: «выделенная» или «очищенная» клетка, такая как грамотрицательная бактерия, была отделена или очищена от других клеток или видов окружающей среды, из которой происходит клетка, такая как бактерия. Термин «выделенная», таким образом, охватывает бактерию, очищенную стандартными способами очистки, такими как клонирование и культивирование одной клетки. Термин также охватывает бактерию, полученную рекомбинантными способами или выделенную из природного источника. Выделенные (или очищенные) грамотрицательные бактерии обычно отделяют от других бактерий, таких как грамположительные бактерии. Выделенные грамотрицательные бактерии могут принадлежать одному роду, виду и/или штамму. Используемый в настоящем документе термин «в значительной степени очищенный» относится к бактериальному роду, виду, штамму или смеси более чем одного бактериального штамма (например, грамотрицательных бактерий), который в значительной степени преобладает в образце, так что другие типы бактерий (например, грамположительных бактерий) истощены. Образец может быть в значительной степени очищен или обогащен бактериальным штаммом или смесью штаммов, представляющих интерес, так что образец представляет собой по меньшей мере приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или больше желаемого бактериального рода, вида, штамма(ов) или

менее чем приблизительно 30%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше нежелательных или других бактериальных родов, видов или штаммов.

[0042] Ингибирование или лечение заболевания: ингибирование заболевания, такого как атопический дерматит, относится к ингибированию полного развития заболевания. В некоторых примерах ингибирование заболевания относится к ослаблению симптомов или снижению размера поражения. Термин «лечение» относится к терапевтическому вмешательству, которое облегчает признак или симптом заболевания, такой как покраснение, отек, растрескивание, «просачивающаяся» прозрачная жидкость и, наконец, образование корок и шелушение кожи.

[0043] Интерлейкин (IL)-6: IL, который действует и как провоспалительный цитокин, и как противовоспалительный миокин. IL-6 передает сигналы через комплекс рецепторов цитокинов типа I на клеточной поверхности, состоящий из лиганд-связывающей цепи IL-6R α (CD126) и передающего сигнал компонента gp130 (также называемого CD130). CD130 является обычным переносчиком сигнала для нескольких цитокинов, включая фактор ингибирования лейкоза (LIF), цилиарный нейротропный фактор, онкостатин M, IL-11 и кардиотропин-1, и почти повсеместно экспрессируется в большинстве тканей. Напротив, экспрессия CD126 ограничена определенными тканями. Когда IL-6 взаимодействует со своим рецептором, он запускает белки gp130 и IL-6R для образования комплекса, тем самым активируя рецептор. Иллюстративные аминокислотные последовательности представлены в базе данных UniProt под регистрационным номером P05231 (человек) и P08505 (мышь), а иллюстративные последовательности мРНК, кодирующие IL-6 (вместе с соответствующей последовательностью белка), представлены в GENBANK® под регистрационными номерами NM_000600.4 (человек), от 5 января 2016 года, и NM_031168.2 (мышь), от 26 октября 2015 года, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0044] Млекопитающее: данный термин включает в себя как человека, так и отличных от человека млекопитающих. Подобным образом, термин «субъект» включает в себя как человека, так и ветеринарных субъектов.

[0045] Нуклеиновая кислота: дезоксирибонуклеотидный или рибонуклеотидный полимер либо в одонитевой, либо в двухнитевой форме и, если специально не ограничено, охватывающий известные аналоги природных нуклеотидов, которые гибридизируются с нуклеиновыми кислотами подобно встречающимся в природе нуклеотидам.

[0046] Фармацевтическое средство: бактерии, такие как грамотрицательные бактерии, химическое соединение, молекула нуклеиновой кислоты или композиция, способные

индуцировать желаемый терапевтический или профилактический эффект при правильном введении субъекту. Согласно одному варианту осуществления фармацевтическое средство представляет собой грамотрицательную бактерию.

[0047] Фармацевтически приемлемые носители: фармацевтически приемлемые носители, применимые в настоящем изобретении, являются общепринятыми. В *Remington's Pharmaceutical Sciences*, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), описываются композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки раскрываемых в настоящем документе грамотрицательных бактерий.

[0048] В целом, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно включают в себя жидкости для инъекций, которые включают в себя фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водная декстроза, глицерин или тому подобное, в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюли, таблетки или капсулы) обычные нетоксичные твердые носители могут включать в себя, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала или стеарата магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции для введения могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты, буферные средства для pH и тому подобное, например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана. Приемлемые носители также включают в себя кремы и мази, например, для местного введения.

[0049] *Pseudomonas*: род грамотрицательных аэробных гаммапротеобактерий, принадлежащих к семейству *Pseudomonadaceae*, содержащему 191 описанный вид. Представители этого рода демонстрируют большое метаболическое разнообразие и, следовательно, способны колонизировать широкий спектр ниш. Представителей этого рода можно определить с помощью анализа рНК 16S. Обычно представители этого рода представляют собой палочковидные аэробные не образующие спор бактерии, имеющие один или несколько полярных жгутиков и демонстрирующие положительные тесты на оксидазу и каталазу.

[0050] *Roseomonas*: род аэробных грамотрицательных палочковидных бактерий, относящихся к типу *Proteobacteria* и семейству *Acetobacteraceae*. В конкретных неограничивающих примерах можно определить принадлежность бактерий к роду *Roseomonas* путем оценки последовательности нуклеиновой кислоты рНК 16S бактерий. *Roseomonas* могут выглядеть как пухлые кокки, коккобациллы или короткие палочки, в зависимости от вида. Большинство штаммов растут на агаре МакКонки, и рост происходит

при 25°C, 30°C и 35°C с промежуточными температурами. Большинство штаммов также растут при 42°C. Продуцируется бледно-розовый ростовой пигмент, см. BERGEY'S MANUAL® of Systemic Bacteriology, Volume Two, The Proteobacteria, Part 3, Springer Science & Business Media, July 25, 2006, страницы 88–89, доступный в Интернете на Google books.

[0051] Терапевтически эффективная доза: доза, достаточная для лечения атопического дерматита. Согласно одному варианту осуществления терапевтически эффективная доза представляет собой количество граммотрицательных бактерий, достаточное для уменьшения размера поражения.

[0052] Местное нанесение: наносимое местным путем средство наносят только на определенный участок, а не на все тело. В конкретных примерах композицию наносят на кожу, например, на поражение. Например, фармацевтическая композиция может быть нанесена в фармацевтическом препарате на поражение.

[0053] Трансдуцированная: трансдуцированная клетка представляет собой клетку, в которую с помощью методик молекулярной биологии была введена молекула нуклеиновой кислоты. Используемый в настоящем документе термин «трансдукция» охватывает все методики, с помощью которых молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в такую клетку, включая трансфекцию вирусными векторами, трансформацию плазмидными векторами и введение «голой» ДНК посредством электропорации, липофекции и ускорения частиц генной пушкой.

[0054] Вектор: молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку-хозяина, с получением тем самым трансформированной клетки-хозяина. Вектор может включать в себя последовательности нуклеиновой кислоты, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может включать в себя один или несколько селективируемых маркерных генов и другие генетические элементы, известные в уровне техники. Векторы включают в себя плазмидные векторы, в том числе плазмиды для экспрессии в граммотрицательных и грамположительных бактериальных клетках. Иллюстративные векторы включают в себя векторы для экспрессии в граммотрицательных бактериях.

[0055] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области, к которой принадлежит настоящее раскрытие. Термины в единственном числе включают в себя ссылки во множественном числе, если контекст явно не указывает иное. Подобным образом, слово «или» предназначено для включения «и», если контекст явно не указывает иное. Кроме того, следует учитывать, что все размеры оснований или размеры аминокислот и все значения молекулярного веса или молекулярной массы,

приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и приведены с целью описания. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при осуществлении или при тестировании настоящего раскрытия, ниже описаны подходящие способы и материалы. Термин «содержит» означает «включает». Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты и другие ссылочные материалы, упоминаемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном своем объеме. В случае противоречия преимущественную силу имеет настоящее описание, в том числе пояснения терминов. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Грамотрицательные бактерии

[0056] Представлены фармацевтические композиции, которые включают в себя выделенные или в значительной степени очищенные грамотрицательные бактерии и комбинации грамотрицательных бактерий с интактной человеческой кожи или размноженные из таких грамотрицательных бактерий. Такие грамотрицательные бактерии обладают способностью в большой степени обеспечивать функции здоровой микробиоты или катализировать прирост резидентного микробиома при введении субъекту с атопическим дерматитом. В частности, представлены композиции, которые лечат, предупреждают, замедляют или уменьшают симптомы атопического дерматита.

[0057] Такие композиции могут включать в себя грамотрицательные бактерии, выделенные у субъекта, который не имеет атопического дерматита, такого как здоровый субъект без какого-либо патологического состояния кожи. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект не имеет какого-либо патологического состояния, например, патологического состояния кожи и/или любого внутреннего органа. Субъект может быть иммунокомпетентным. Грамотрицательные бактерии могут быть выделены из кожи субъекта непосредственно или могут быть размножены *in vitro* с использованием стандартных методик для культивирования бактерий. Однако грамотрицательные бактерии могут быть получены из других источников, как обсуждается ниже. Грамотрицательные бактерии могут представлять собой *Proteobacteria*, *Spirochaetaceae*, *Enterobacteriales*, *Fusobacterium polymorphum* или *Selenomonadales*. Грамотрицательные бактерии могут представлять собой диплококки, коккобациллы, кокки или бациллы.

[0058] Согласно некоторым вариантам осуществления раскрываются композиции, составленные для местного введения, которые включают в себя выделенные или в значительной степени очищенные жизнеспособные грамотрицательные бактерии и фармацевтически приемлемый носитель, при этом а) лизат и/или компонент

грамотрицательных бактерий ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе; b) грамотрицательная бактерия стимулирует кератиноциты человека; c) грамотрицательная бактерия индуцирует экспрессию цитокинов из человеческих клеток; и d) грамотрицательная бактерия является непатогенной при введении на кожу иммунокомпетентного субъекта. Термин «компонент» означает любую молекулу, присутствующую в грамотрицательной бактерии или секретируемую ею. В конкретных неограничивающих примерах надосадочная жидкость, которая содержит молекулы, секретируемые грамотрицательными бактериями, ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе.

[0059] В настоящем документе представлены определенные роды, виды, штаммы и комбинации штаммов или видов, изначально обнаруживаемые в микробиоте человеческой кожи субъекта без атопического дерматита, такого как здоровый субъект.

[0060] Согласно некоторым вариантам осуществления эти виды/штаммы способны значительно снижать скорость размножения патогенов кожи в *in vitro* анализе. Эти виды/штаммы способны обеспечивать безопасное и эффективное средство, которое воздействует на рост, размножение таких бактериальных патогенов и тяжесть вызываемого ими заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления представлены бактериальные композиции, способные устранять патогенные бактерии.

[0061] Показано, что иллюстративные бактериальные композиции снижают скорость роста определенного патогена, такого как *S. aureus*. Грамотрицательные бактерии, способные на длительное время уменьшать *S. aureus* в коже, могут быть идентифицированы с использованием методики оценки фактора экологического контроля (ECF) для компонентов микробиоты человека. ECF определяют путем оценивания антагонистической активности данного комменсального штамма или комбинации штаммов по отношению к данному патогену (например, *S. aureus*) с использованием *in vitro* анализа, что приводит к наблюдаемым уровням экологического контроля при различных концентрациях добавленных комменсальных штаммов. ECF для комменсального штамма или комбинации штаммов в некоторой степени аналогичен устоявшейся оценке минимальной ингибиторной концентрации (MIC), которую используют при оценке антибиотиков. ECF позволяет оценивать и ранжировать относительные эффективности комменсальных штаммов и комбинаций штаммов по их способности антагонизировать кожных патогенов. ECF комменсального штамма или комбинации штаммов может быть рассчитан путем оценивания концентрации такой композиции, которая способна опосредовать данный процент ингибирования (например, по меньшей мере 10%, 20%, 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%) целевого патогена (например, *S. aureus*) в *in vitro* анализе.

[0062] Согласно некоторым вариантам осуществления грамотрицательная бактерия стимулирует кератиноциты человека. Грамотрицательная бактерия может стимулировать кератиноциты *in vivo* и/или *in vitro*. Грамотрицательные бактерии стимулируют кератиноциты путем усиления транскрипции мРНК иммунных медиаторов или молекул, вовлеченных в эпителиальную барьерную функцию, такую как продуцирование мРНК, кодирующей IL-1 β , мРНК, кодирующей дефензин бета 4, мРНК, кодирующей Cyp27b1, мРНК, кодирующей рецептор витамина D, мРНК, кодирующей окклюдин, мРНК, кодирующей клаудин 1, и/или мРНК, кодирующей филаггрин.

[0063] Согласно дополнительным вариантам осуществления грамотрицательная бактерия индуцирует экспрессию цитокинов из человеческих клеток. Человеческие клетки включают в себя без ограничения клетки кожи, такие как фибробласты и кератиноциты. Цитокины включают в себя без ограничения интерлейкин (IL), такой как IL-6 и IL-1 β .

[0064] Согласно другим вариантам осуществления грамотрицательные бактерии продуцируют лизофосфатидилхолин.

[0065] Согласно следующим вариантам осуществления грамотрицательная бактерия является непатогенной при введении на кожу субъекта, например, у иммунокомпетентного субъекта. Как правило, грамотрицательная бактерия не вызывает никакой инфекции при введении на интактную человеческую кожу. Таким образом, после лечения патогенез не наблюдают.

[0066] Жизнеспособные грамотрицательные бактерии, включенные в раскрываемую композицию, могут принадлежать любому роду. Согласно некоторым вариантам осуществления грамотрицательная бактерия представляет собой *Pseudomonas*. Согласно дополнительным вариантам осуществления грамотрицательная бактерия представляет собой *Pantoea* или *Moraxella*. Согласно другим вариантам осуществления грамотрицательная бактерия представляет собой *Roseomonas*.

[0067] В фармацевтическую композицию может быть включена бактерия только из одного рода. В качестве альтернативы, комбинации родов могут быть включены в фармацевтическую композицию и предназначены для применения в раскрываемых способах. Таким образом, композиция может включать в себя, например, 1, 2, 3, 4 или 5 родов грамотрицательных бактерий. В одном конкретном неограничивающем примере композиция содержит жизнеспособные *Roseomonas*. В других конкретных неограничивающих примерах композиции включают в себя жизнеспособные *Pseudomonas*. В еще одном конкретном неограничивающем примере композиции включают в себя жизнеспособные *Roseomonas* и жизнеспособные *Pseudomonas*.

[0068] Жизнеспособные грамотрицательные бактерии могут принадлежать любому виду. Таким образом, в некоторых примерах, если грамотрицательная бактерия представляет собой *Pseudomonas*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola* или *Pseudomonas oryzae*. В других примерах, если грамотрицательная бактерия принадлежит *Pantoea*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой *Pantoea septica*. В дополнительных примерах, если грамотрицательная бактерия принадлежит *Moraxella*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой *Moraxella osloensis*. В следующих примерах, если грамотрицательная бактерия представляет собой *Roseomonas*, то грамотрицательная бактерия может представлять собой *Roseomonas aerilata*, *Roseomonas aerophila*, *Roseomonas aestuarii*, *Roseomonas alkaliterrae*, *Roseomonas aquatic*, *Roseomonas cervicalis*, *Roseomonas fauriae*, *Roseomonas frigidaquae*, *Roseomonas gilardii*, *Roseomonas lacus*, *Roseomonas ludipueritiae*, *Roseomonas mucosa*, *Roseomonas pecuniae*, *Roseomonas rhizosphaerae*, *Roseomonas riguiloci*, *Roseomonas rosea*, *Roseomonas soli*, *Roseomonas stagni*, *Roseomonas terrae* или *Roseomonas vinacea*. В одном конкретном неограничивающем примере грамотрицательная бактерия представляет собой *Roseomonas mucosa*.

[0069] Грамотрицательные бактерии одного вида могут быть включены в фармацевтическую композицию. В качестве альтернативы, в фармацевтическую композицию могут быть включены комбинации видов грамотрицательных бактерий, предназначенных для применения в раскрываемых способах. Таким образом, композиция может включать в себя 1, 2, 3, 4 или 5 видов грамотрицательных бактерий. В одном конкретном неограничивающем примере композиция содержит жизнеспособную *Roseomonas mucosa*. В других конкретных неограничивающих примерах композиции включают в себя жизнеспособную *Pseudomonas aeruginosa*. В еще одном конкретном неограничивающем примере композиции включают в себя жизнеспособную *Roseomonas mucosa* и жизнеспособную *Pseudomonas aeruginosa*.

[0070] Применяемые жизнеспособные грамотрицательные бактерии могут быть из одного штамма. В качестве альтернативы, грамотрицательные бактерии могут быть из нескольких штаммов. Грамотрицательные бактерии одного штамма или комбинации штаммов грамотрицательных бактерий могут быть включены в раскрываемые композиции, предназначенные для применения в раскрываемых способах. Таким образом, композиция может включать в себя 1, 2, 3, 4 или 5 видов грамотрицательных бактерий. В одном конкретном неограничивающем примере композиция содержит один штамм жизнеспособной *Roseomonas mucosa*. В следующем конкретном неограничивающем примере композиция содержит 2, 3, 4 или 5 штаммов жизнеспособной *Roseomonas mucosa*.

В других конкретных неограничивающих примерах композиция содержит единственный штамм жизнеспособной *Pseudomonas aeruginosa*. В следующем конкретном неограничивающем примере композиция содержит 2, 3, 4 или 5 штаммов жизнеспособной *Pseudomonas aeruginosa*. В еще одном конкретном неограничивающем примере композиция содержит штамм жизнеспособной *Roseomonas mucosa* и штамм жизнеспособной *Pseudomonas aeruginosa*. В других конкретных неограничивающих примерах композиция содержит 2, 3, 4 или 5 штаммов жизнеспособной *Roseomonas mucosa* и 2, 3, 4 или 5 штаммов жизнеспособной *Pseudomonas aeruginosa*.

[0071] Таким образом, фармацевтические композиции могут включать в себя два типа грамотрицательных бактерий («бинарные комбинации» или «бинарные пары») или более двух типов грамотрицательных бактерий. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция может включать в себя по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, или по меньшей мере 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, или по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или более чем 50 типов грамотрицательных бактерий, как определяется с помощью рода, вида и/или операционной таксономической единицы (OTU), такой как штамм. Как правило, род, вид или штамм, индивидуально или в комбинации, обладает следующими характеристиками: а) лизат и/или компонент грамотрицательных бактерий ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе; б) грамотрицательная бактерия стимулирует кератиноциты человека; с) грамотрицательная бактерия индуцирует экспрессию цитокинов из человеческих клеток; и д) грамотрицательная бактерия является непатогенной при введении на кожу субъекта.

[0072] Согласно некоторым вариантам осуществления грамотрицательная бактерия трансформирована гетерологичной нуклеиновой кислотой, например, в форме плазмиды. Вектор экспрессии может кодировать любой представляющий интерес белок. Экзогенная ДНК может быть введена в бактериальные клетки с помощью стандартных методик, таких как электропорация или опосредованная фосфатом кальция трансфекция.

[0073] Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота включена в плазмиду. Плазида, как правило, содержит несколько генетических элементов, позиционно и последовательно ориентированных относительно других необходимых генетических элементов, так что нуклеиновая кислота в кассете нуклеиновой кислоты могут быть транскрибирована и при необходимости транслирована в

трансфицированных клетках. Плазмиды включают в себя нуклеиновые кислоты, которые представляют собой ДНК, полученную из плазмидного вектора, космиды или фагмиды, в которые могут быть вставлены одна или несколько гетерологичных нуклеиновых кислот. Гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать белок, который может быть функционально связан с промотором для экспрессии в грамотрицательных бактериях.

[0074] Плазмиды, как правило, содержат один или несколько уникальных сайтов рестрикции. Кроме того, плазида может обеспечивать некоторый хорошо определенный фенотип на организме-хозяине, который является либо селективируемым, либо легко выявляемым, например, устойчивость к лекарственному средству. Таким образом, плазида может включать в себя кассету экспрессии, в которой кодируется полипептид. Экспрессия предусматривает эффективную транскрипцию вставленного гена, последовательности нуклеиновой кислоты или кассеты нуклеиновой кислоты с помощью плазмиды.

[0075] Согласно одному варианту осуществления, когда кольцевая плазида переносится в бактериальную клетку, она может быть автономно реплицирующейся, внехромосомной молекулой ДНК, отличной от нормального бактериального генома и несущественной для выживания бактериальной клетки в неселективных условиях. Используемый в настоящем документе термин «постоянная экспрессия» относится к введению генов в клетку вместе с генетическими элементами, которые обеспечивают эписомную (внехромосомную) репликацию и/или поддержание генетического материала в клетке. Это может привести к очевидно стабильной трансформации клетки без интеграции нового генетического материала в хромосому клетки-хозяина.

[0076] Плазида также может вводить генетический материал в хромосомы целевой клетки, где она интегрируется и становится постоянным компонентом генетического материала в этой клетке. Экспрессия гена после стабильного введения может навсегда изменить характеристики клетки и ее потомства, что происходит в результате репликации, ведущей к стабильной трансформации.

Способы получения бактериальной композиции для введения

[0077] Способы получения бактериальных композиций могут предусматривать три основных стадии обработки, объединенных с одной или несколькими стадиями смешивания. Стадиями являются создание банка организмов, получение организмов и консервирование.

[0078] Для создания банка штаммы, включенные в бактериальную композицию, могут быть (1) выделены непосредственно из образца, такого как без ограничения человеческая кожа, или взяты из хранящейся в банке маточной культуры, (2) необязательно

культивированы на питательном агаре или бульоне, который поддерживает рост, для создания жизнеспособной биомассы, и (3) необязательно консервированы в виде биомассы в нескольких аликвотах для длительного хранения.

[0079] Грамотрицательные бактерии могут быть выделены из кожи субъекта-человека. Как правило, субъект-человек не имеет атопического дерматита или какого-либо другого кожного состояния. Таким образом, субъект может быть здоровым, что означает, что он не имеет никакого другого патологического состояния. Субъект может быть иммунокомпетентным. Однако грамотрицательные бактерии могут быть выделены из других источников, таких как коммерческие источники или образцы из окружающей среды, и использованы в способах и композициях, раскрываемых в настоящем документе. Как раскрывается в настоящем документе, могут быть использованы любые грамотрицательные бактерии при условии, что а) лизат и/или компонент грамотрицательных бактерий ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе; б) грамотрицательная бактерия стимулирует кератиноциты человека; в) грамотрицательная бактерия индуцирует экспрессию цитокинов из человеческих клеток; и д) грамотрицательная бактерия является непатогенной при введении на кожу субъекта. Затем грамотрицательные бактерии могут быть размножены.

[0080] Согласно вариантам осуществления с использованием стадии культивирования агар или бульон может содержать питательные вещества, которые обеспечивают незаменимые элементы и специфические факторы, которые обеспечивают рост. Неограничивающим примером является среда, состоящая из 0,5 г/л декстрозы, 0,5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л протеозопептона, 0,5 г/л казаминовой кислоты, 0,3 г/л гидрофосфата калия, 50 мг/л сульфата магния, 0,3 г/л пирувата натрия. Ряд микробиологических сред и вариаций хорошо известен в уровне техники (например, R. M. Atlas, Handbook of Microbiological Media (2010) CRC Press). Среда может быть добавлена к культуре в начале, может быть добавлена во время культивирования или может периодически/непрерывно пропускаться через культуру. Виды/штаммы можно культивировать по отдельности или в виде всей коллекции, включающей в себя виды/штаммы бактерий. В качестве примера, первый штамм может культивироваться вместе со вторым штаммом в смешанной непрерывной культуре при степени разбавления ниже максимальной скорости роста любой клетки, чтобы предотвратить вымывание культуры из культивирования.

[0081] Культуру инкубируют в благоприятных условиях в течение времени, достаточного для создания биомассы. Для бактериальных композиций для использования человеком это часто осуществляют при приблизительно 32-37°C, pH и других параметрах со значениями,

аналогичными нормальной человеческой нише. Окружающей средой можно активно управлять.

[0082] Когда культура произвела достаточное количество биомассы, ее можно сохранить для создания банка. Организмы могут быть помещены в химическую среду, которая защищает от замерзания (например, за счет добавления криопротекторов), высыхания и/или осмотического шока (например, за счет добавления осмопротекторов), с распределением их по нескольким (необязательно одинаковым) контейнерам для создания единого банка с последующей необязательной обработкой культуры для консервирования. Контейнеры обычно непроницаемы и имеют крышки, обеспечивающие изоляцию от окружающей среды. Криоконсервирование можно осуществлять путем замораживания жидкости при сверхнизких температурах (например, при приблизительно -70°C или ниже). При сухом консервировании удаляют воду из культуры путем выпаривания (в случае распылительной сушки или холодной сушки) или путем сублимации (например, для сублимационной сушки, сублимационной сушки распылением). Удаление воды улучшает долгосрочную стабильность бактериальной композиции при хранении при более высоких температурах. Штаммы и/или виды можно культивировать и консервировать по отдельности или виды/штаммы можно смешивать вместе для создания банка.

[0083] В одном неограничивающем примере криоконсервирования бактериальная культура может быть собрана центрифугированием для осаждения клеток из культуральной среды, надосадочная жидкость декантирована и заменена свежим культуральным бульоном, содержащим 15% глицерина. Затем культуру можно разделить на аликвоты в криопробирки объемом 1 мл, запечатать и поместить при -80°C или -70°C для длительного сохранения жизнеспособности. Эта процедура обеспечивает приемлемую жизнеспособность после восстановления из замороженного хранилища.

[0084] Получение организмов можно проводить с использованием подобных стадий для создания банка, в том числе композиции среды и условий культивирования. Получение может осуществляться с использованием крупномасштабной операции, особенно для клинических разработок или коммерческого производства. В более крупных масштабах перед окончательным культивированием может быть проведено несколько пересевов бактерий. В конце культивирования культуру собирают для составления в лекарственную форму для введения. Это может предусматривать концентрирование, удаление нежелательных компонентов среды и/или введение в химическую среду, которая сохраняет бактериальную композицию и делает ее приемлемой для введения выбранным путем. В одном неограничивающем примере бактериальная композиция может быть культивирована до концентрации 10^{10} КОЕ/мл с консервантной средой, состоящей из 15% сахарозы в воде.

Местные составы и способы лечения

[0085] Представлены фармацевтические композиции, которые включают в себя раскрываемые выделенные или в значительной степени очищенные грамотрицательные бактерии, при этом фармацевтическую композицию составляют для местного введения. Такие композиции включают в себя фармацевтически приемлемый носитель и необязательно включают в себя дополнительные соединения. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит дополнительные активные и/или неактивные материалы для получения конечного продукта, который может быть в единичной лекарственной форме или во многодозовом формате.

[0086] Любого субъекта, который имеет атопический дерматит, можно лечить с использованием способов, раскрываемых в настоящем документе. Субъектом может быть человек. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой ребенка, такого как субъект возрастом 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 год или меньше. Субъектом может быть младенец, такой как субъект возрастом менее чем 1 год. Согласно другим вариантам осуществления субъект представляет собой взрослого человека, такого как субъект возрастом 18 лет, возрастом более чем 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 лет. Субъектом может быть пожилой человек, такой как субъект возрастом более чем 65, 70, 75 или 80 лет. Субъект может быть иммунокомпрометированным или может иметь интактную иммунную систему (иммунокомпетентный).

[0087] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция может включать в себя одно или несколько из буферного средства, консерванта, стабилизатора, связующего, уплотняющего средства, смазки, усилителя дисперсии и/или красителя. Неограничивающие примеры подходящих буферных средств включают в себя цитрат натрия, карбонат магния, бикарбонат магния, карбонат кальция и бикарбонат кальция. Неограничивающие примеры подходящих консервантов включают в себя антиоксиданты, такие как альфа-токоферол и аскорбат, парабены, хлорбутанол и фенол. Неограничивающие примеры подходящих связующих включают в себя сахарозу, крахмалы, прежелатинизированные крахмалы, желатин, поливинилпирролидон, целлюлозу, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, этилцеллюлозу, полиакриламиды, поливинилоксоазолидон, поливиниловые спирты, спирт C₁₂-C₁₈ жирных кислот, полиэтиленгликоль, многоатомные спирты, сахараиды, олигосахарида и их комбинации. Неограничивающие примеры подходящих смазок включают в себя стеарат магния, стеарат кальция, стеарат цинка, гидрогенизированные растительные масла, стеротекс, моностеарат полиоксиэтилена, тальк, полиэтиленгликоль, бензоат натрия, лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния и легкое минеральное масло. Буферное(ые)

средство(а) для регулировки рН, при использовании и при растворении в водном компоненте композиции, может(могут) обеспечивать рН в диапазоне от 5 до 7 (например, приблизительно рН 5,5).

[0088] Фармацевтическая композиция может включать в себя другие ингредиенты, например, для поддержания роста бактерий. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция может включать в себя питательное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит по меньшей мере один углевод. Термин «углевод» относится к сахару или полимеру сахаров. Термины «сахарид», «полисахарид», «углевод» и «олигосахарид» могут использоваться взаимозаменяемо. Большинство углеводов представляют собой альдегиды или кетоны с множеством гидроксильных групп, обычно по одной на каждый атом углерода в молекуле. Углеводы обычно имеют молекулярную формулу $C_nH_{2n}O_n$. Углевод может быть моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, олигосахаридом или полисахаридом. Самый основной углевод — это моносахарид, такой как глюкоза, сахароза, галактоза, манноза, рибоза, арабиноза, ксилоза и фруктоза. Дисахариды — это два соединенных моносахарида. Иллюстративные дисахариды включают в себя сахарозу, мальтозу, целлобиозу и лактозу. Обычно олигосахарид содержит от трех до шести моносахаридных единиц (например, рафинозу, стахиозу), а полисахариды включают в себя шесть или более моносахаридных единиц. Иллюстративные полисахариды включают в себя крахмал, гликоген и целлюлозу. Углеводы могут содержать модифицированные сахаридные звенья, такие как 2'-дезоксирибоза, в которой удалена гидроксильная группа, 2'-фторрибоза, в которой гидроксильная группа заменена фтором, или N-ацетилглюкозамин, азотсодержащая форма глюкозы (например, 2'-фторрибоза, дезоксирибоза и гексоза). Углеводы могут существовать во многих различных формах, например, конформеры, циклические формы, ациклические формы, стереоизомеры, таутомеры, аномеры и изомеры.

[0089] Согласно некоторым вариантам осуществления композиция включает по меньшей мере один липид. Термин «липид» включает жиры, масла, триглицериды, холестерин, фосфолипиды или жирные кислоты в любой форме, включая свободные жирные кислоты. Жиры, масла и жирные кислоты могут быть насыщенными, ненасыщенными (цис или транс) или частично ненасыщенными (цис или транс). Согласно некоторым вариантам осуществления липид содержит по меньшей мере одну жирную кислоту, выбранную из лауриновой кислоты (12:0), миристиновой кислоты (14:0), пальмитиновой кислоты (16:0), пальмитолеиновой кислоты (16 1), маргариновой кислоты (17:0), гептадеценовой кислоты (17:1), стеариновой кислоты (18:0), олеиновой кислоты (18:1), линолевой кислоты (18:2), линоленовой кислоты (18:3), октадекатетраеновой кислоты (18:4), арахидовой кислоты

(20:0), эйкозеновой кислоты (20:1), эйкозодиеновой кислоты (20:2), эйкозатетраеновой кислоты (20:4), эйкозапентаеновой кислоты (20:5) (EPA), докозановой кислоты (22:0), докозеновой кислоты (22:1), докозапентаеновой кислоты (22:5), докозагексаеновой кислоты (22:6) (DHA) и тетракозановой кислоты (24:0).

[0090] Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит по меньшей мере один дополнительный минерал или минеральный источник. Примеры минералов включают в себя без ограничения хлорид, натрий, кальций, железо, хром, медь, йод, цинк, магний, марганец, молибден, фосфор, калий и селен. Подходящие формы любого из упомянутых выше минералов включают в себя растворимые минеральные соли, малорастворимые минеральные соли, нерастворимые минеральные соли, хелатные минералы, минеральные комплексы, неактивные минералы, такие как карбонильные минералы, и восстановленные минералы, а также их комбинации.

[0091] Согласно дополнительным вариантам осуществления композиция содержит по меньшей мере один дополнительный витамин. По меньшей мере один витамин может быть жирно- или водорастворимым витамином. Подходящие витамины включают в себя без ограничения витамин С, витамин А, витамин Е, витамин В12, витамин К, рибофлавин, ниацин, витамин D, витамин В6, фолиевую кислоту, пиридоксин, тиамин, пантотеновую кислоту и биотин. Подходящими формами любого из перечисленного выше являются соли витамина, производные витамина, соединения, обладающие такой же или подобной активностью витамина, и метаболиты витамина.

[0092] В композиции могут быть включены различные другие добавки. Они включают в себя без ограничения антиоксиданты, вяжущие вещества, отдушки, консерванты, смягчающие вещества, пигменты, красители, увлажнители, пропелленты и солнцезащитные средства, а также другие классы материалов, присутствие которых может быть фармацевтически или иным образом желательным. Неограничивающими примерами необязательных добавок являются следующие: консерванты, такие как сорбат; растворители, такие как изопропанол и пропиленгликоль; вяжущие вещества, такие как ментол и этанол; смягчающие вещества, такие как полиалкиленметилглюкозиды; увлажнители, такие как глицерин; эмульгаторы, такие как стеарат глицерина, стеарат ПЭГ-100, полиглицерил-3-гидроксилауриловый эфир и полисорбат 60; сорбит и другие полигидроксиспирты, такие как полиэтиленгликоль; солнцезащитные средства, такие как октилметоксилциннамат (коммерчески доступный как Parsol MCX) и бутилметоксибензоилметан (доступный под торговой маркой Parsol 1789); антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота (витамин С), α -токоферол (витамин Е), β -токоферол, γ -токоферол, δ -токоферол, ϵ -токоферол, ζ -токоферол, Z^{\wedge} -токоферол, η -токоферол и ретинол

(витамин А); эфирные масла, керамиды, эфирные жирные кислоты, минеральные масла, растительные масла (например, соевое масло, пальмовое масло, жидкая фракция масла ши, подсолнечное масло), животные масла (например, пергидросквален), синтетические масла, силиконовые масла или воски (например, циклометикон и диметикон), фторированные масла (обычно перфторполиэфиры), жирные спирты (например, цетиловый спирт) и воски (например, пчелиный воск, карнаубский воск и парафиновый воск); модификаторы ощущения кожи; а также загустители и структурирующие вещества, такие как набухающие глины и сшитые карбоксиполиалкилены.

[0093] Другие добавки включают в себя материалы, которые кондиционируют кожу (в частности, верхние слои кожи в роговом слое) и сохраняют ее мягкость, замедляя снижение содержания в ней воды и/или защищая кожу. Такие кондиционеры и увлажняющие средства включают в себя, например, пирролидинкарбоновую кислоту и аминокислоты; органические противомикробные средства, такие как 2,4,4'-трихлор-2-гидроксифениловый эфир (триклозан) и бензойная кислота. Дополнительные добавки включают в себя противовоспалительные средства, такие как ацетилсалициловая кислота и глицирретиновая кислота; антисеборейные средства, такие как ретиноевая кислота; вазодилататоры, такие как никотиновая кислота; ингибиторы меланогенеза, такие как койевая кислота; и их смеси.

[0094] Согласно другим вариантам осуществления композиция может включать в себя альфа-гидроксикислоты, альфа-кетокислоты, полимерные гидроксикислоты, увлажнители, коллаген, экстракт из морских организмов и антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота (витамин С) и/или альфа-токоферол (витамин Е). Также могут быть включены солнцезащитные средства. В композицию могут быть добавлены дополнительные компоненты, такие как ферменты, травы, экстракты растений, экстракты желез или животные экстракты. Количества этих различных добавок представляют собой количества, обычно используемые в области косметики, и находятся в диапазоне, например, от приблизительно 0,01% до приблизительно 20% от общей массы состава для местного применения.

[0095] Композиции могут также включать в себя противомикробные средства для предотвращения порчи при хранении, т. е. для подавления роста микробов, таких как дрожжи и плесневые грибки. Подходящие противомикробные средства обычно выбирают из группы, состоящей из метиловых и пропиловых сложных эфиров п-гидроксибензойной кислоты (т. е. из метил- и пропилпарабена), бензоата натрия, сорбиновой кислоты, имидмочевины и их комбинаций.

[0096] Композиции также могут содержать смягчающие раздражение добавки, чтобы минимизировать или исключить возможность раздражения кожи или повреждения кожи в результате введения химического соединения или других компонентов композиции. Подходящие смягчающие раздражение добавки включают в себя, например, альфа-токоферол; ингибиторы моноаминоксидазы, в частности, фениловые спирты, такие как 2-фенил-1-этанол; глицерин; салицилаты; аскорбаты; ионофоры, такие как монензин; амфифильные амины; хлорид аммония; N-ацетилцистеин; капсаицин и хлорохин. Смягчающая раздражение добавка, если присутствует, может быть включена в композиции при концентрации, эффективной для смягчения раздражения или повреждения кожи, обычно составляющей не более приблизительно 20 мас. %, более типично не более приблизительно 5 мас. % состава.

[0097] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные подходящие фармакологически активные средства, которые можно включать в составы в соответствии с настоящим изобретением и, таким образом, наносить местными путем вместе с активным средством включают в себя без ограничения следующие: средства, которые улучшают или устраняют пигментные или непигментные возрастные пятна, кератозы и морщины; локальные анестетики и анальгетики; кортикостероиды; ретиноиды и гормоны. Некоторые примеры фармакологически активных средств для местного применения включают в себя ацикловир, амфотерицины, хлоргексидин, клотримазол, кетоконазол, эконазол, миконазол, метронидазол, миноциклин, фенитоин, сложные эфиры пара-аминобензойной кислоты, октилметоксициннамат, октилсалицилат, оксибензон, диоксибензон, токоферол, токоферилацетат, пиритион цинка, дифенгидрамин, прамоксин, лидокаин, прокаин, кротамитон, гидрохинон и его монометилвые и бензиловые эфиры, напроксен, ибупрофен, кромолин, ретинол, ретинилпальмитат, ретинилацетат, каменноугольную смолу, гризеофульвин, эстрадиол, гидрокортизон, ацетат гидрокортизона 21, валерат гидрокортизона 17, бутират гидрокортизона 17, прогестерон, валерат бетаметазона, бетаметазона дипропионат, триамцинолона ацетонид, флуоцинонид, клобетазола пропионат, миноксидил, дипиридамола, дифенилгидантоин, пероксид бензоила, 5-фторурацил, такролимус и стероиды для местного применения, такие как алклометазон, амцинонид, бетаметазон, клобетазол, дезонид, дезоксиметазон, дифлоразон, флуцинонид, флурандренолид, галобетазол, галцинонид, гидроксикортизон и/или триамцинолон.

[0098] Тогда как рассматриваются составы для местного применения, такие как кремы и бальзамы, составленные для доставки через кожу, системы доставки могут включать в себя системы доставки с замедленным высвобождением, отсроченным высвобождением или пролонгированным высвобождением. Такие системы позволяют избежать повторных

введений композиций, что повышает удобство для субъекта и врача. Доступны многие типы высвобождающих систем доставки, известных специалистам в данной области. Конкретные примеры включают в себя без ограничения (а) эрозионные системы, такие как те, которые описаны в патентах США №№ 4452775, 4667014, 4748034, 5239660 и 6218371, и (b) диффузионные системы, в которых активный компонент проникает с контролируемой скоростью из полимера, такие как описанные в патентах США №№ 3832253 и 3854480.

[0099] Система доставки может включать в себя коллаген, фибрин или экстракт мембран, такой как экстракт базальной мембраны, например, если композицию составляют для введения на кожу. Подходящие экстракты базальной мембраны включают в себя биологически активный полимеризируемый экстракт, содержащий в частях по массе приблизительно 60-85% ламинина, 5-30% коллагена IV, 1-10% нидогена, 1-10% гепарансульфата протеогликана и 1-5% энтактина (см. патент США № 4829000, включенный в настоящий документ посредством ссылки, в котором раскрываются композиции ВМЕ, а также способы получения этих композиций). ВМЕ может поддерживать нормальный рост и дифференцировку различных типов клеток, включая эпителиальные клетки, при культивировании. Экстракты базальной мембраны хорошо известны в уровне техники и коммерчески доступны.

[0100] Для лечения кожи терапевтически эффективное количество композиции можно локально вводить в пораженный участок. Раскрываемые в настоящем документе фармакологические композиции облегчают применение по меньшей мере грамтрицательных бактерий для лечения атопического дерматита. Такая композиция может быть подходящей для доставки активного ингредиента любому подходящему субъекту, такому как без ограничения субъект-человек, и может быть изготовлена способом, который сам по себе известен, например, посредством традиционных процессов смешивания, растворения, гранулирования, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации. Фармакологические композиции могут быть составлены традиционным способом с использованием одного или нескольких фармакологически (например, физиологически или фармацевтически) приемлемых носителей, а также необязательных вспомогательных веществ, которые облегчают обработку активных соединений в препараты, которые могут быть использованы фармацевтически, как обсуждалось выше.

[0101] Композиция может содержать одну (единичную) дозу грамтрицательных бактерий. Иллюстративные количества составляют 10^5 - 10^{12} колониеобразующих единиц (КОЕ), например, 10^6 - 10^{10} , например, 10^5 - 10^7 КОЕ, например, 10^6 КОЕ. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие дозы грамтрицательных бактерий

могут находиться в диапазоне от 10^4 до 10^{12} КОЕ, например, в диапазоне от 10^4 до 10^{10} , от 10^4 до 10^8 , от 10^6 до 10^{12} , от 10^6 до 10^{10} или от 10^6 до 10^8 КОЕ. Согласно другим вариантам осуществления композиция может включать в себя по меньшей мере приблизительно 0,01%, приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,5%, приблизительно 2,0%, приблизительно 3,0%, приблизительно 4,0%, приблизительно 5,0%, приблизительно 6,0%, приблизительно 7,0%, приблизительно 8,0%, приблизительно 9,0%, приблизительно 10,0%, приблизительно 11,0%, приблизительно 12,0%, приблизительно 13,0%, приблизительно 14,0%, приблизительно 15,0%, приблизительно 16,0%, приблизительно 17,0%, приблизительно 18,0%, приблизительно 19,0%, приблизительно 20,0%, приблизительно 25,0%, приблизительно 30,0%, приблизительно 35,0%, приблизительно 40,0%, приблизительно 45,0%, приблизительно 50,0% массы бактерий. Согласно другим вариантам осуществления композиция может включать в себя по меньшей мере от приблизительно 0,01% до приблизительно 30%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 20%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 30%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 20%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 15%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 10%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 5%, от приблизительно 1% до 10 приблизительно 5% массы грамотрицательных бактерий.

[0102] Композиция может быть нанесена на кожу, например, на пораженные участки и вокруг пораженного участка или на участки интактной кожи (непораженные участки) для предупреждения образования поражений. Композиция может быть использована для уменьшения размера поражения. Композицию можно наносить ежедневно. Композицию можно наносить 1, 2, 3, 4 или 5 раз в сутки. Композицию можно наносить через сутки или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 раз в неделю. Композицию можно наносить еженедельно. В одном конкретном неограничивающем примере 10^6 КОЕ наносят на кожу 2 или 3 раза в неделю. Композиция может быть составлена как однократная доза для введения.

[0103] Способы получения фармацевтических композиций для местного применения, таких как кремы, мази, лосьоны, аэрозоли и стерильные водные растворы или суспензии, хорошо известны в уровне техники. Подходящие способы получения фармацевтических композиций для местного применения описаны, например в РСТ публикации

№ WO95/10999, РСТ публикации № WO2012150269, патенте США № 6974585 и РСТ публикации № WO2006/048747, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Композиция может включать в себя водный носитель и может быть нанесена на кожу в виде аэрозоля.

[0104] Необязательно, композиция может включать в себя фармацевтически приемлемый усилитель вязкости и/или пленкообразующее средство. Усилитель вязкости усиливает вязкость состава, чтобы препятствовать его распространению за пределы места нанесения. Balsam Fir (Oregon) является примером фармацевтически приемлемого усилителя вязкости, используемого с грамотрицательными бактериями.

[0105] Пленкообразующее средство при высыхании образует защитную пленку на месте нанесения. Пленка препятствует удалению активного ингредиента и удерживает его в контакте с обрабатываемым участком. Примером пленкообразующего средства, подходящего для применения в настоящем изобретении, является Flexible Collodion, USP. Как описано в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, PA: Mack Publishing Co., 1995), на странице 1530, коллодии представляют собой растворы этилового эфира/этанола, содержащие пироксилин (нитроцеллюлозу), которые при испарении оставляют пленку пироксилина. Пленкообразующее средство может дополнительно действовать в качестве носителя. Растворы, которые высыхают с образованием пленки, иногда называют красками. Кремы, как хорошо известно в области фармацевтических составов, представляют собой вязкие жидкости или полутвердые эмульсии либо «масло в воде», либо «вода в масле».

[0106] Основы кремов смываются водой и содержат масляную фазу, эмульгатор и водную фазу. Масляная фаза, также называемая «внутренней» фазой, обычно состоит из петролатума и жирного спирта, такого как цетиловый или стеариловый спирт. Водная фаза обычно, хотя и не обязательно, превышает по объему масляную фазу и обычно содержит увлажнитель. Эмульгатор в составе крема обычно представляет собой неионогенное, анионное, катионное или амфотерное поверхностно-активное вещество.

[0107] Лосьоны представляют собой препараты, которые следует наносить на поверхность кожи без трения, и обычно представляют собой жидкие или полужидкие препараты, в которых частицы, включающие в себя активное средство, присутствуют в водной или спиртовой основе. Лосьоны обычно представляют собой суспензии твердых веществ и предпочтительно содержат жидкую масляную эмульсию типа «масло в воде». Лосьоны можно использовать для лечения больших участков тела из-за простоты нанесения более жидкой композиции. Обычно необходимо, чтобы нерастворимое вещество в лосьоне было тонко измельчено.

[0108] Лосьоны обычно содержат суспендирующие средства для получения лучших дисперсий, а также соединения, применимые для локализации и удержания активного средства в контакте с кожей, например, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия и т. п.

[0109] Растворы представляют собой гомогенные смеси, полученные путем растворения одного или нескольких химических веществ (растворенных веществ) в жидкости, так что молекулы растворенного вещества диспергируются среди молекул растворителя. Раствор может содержать другие фармацевтически или косметически приемлемые химические вещества для буферизации, стабилизации или сохранения растворенного вещества. Общими примерами растворителей, используемых при приготовлении растворов для местного применения, являются этанол, вода, пропиленгликоль или любые другие приемлемые среды-носители. Их можно наносить любым способом, например, распылять на кожу, окрашивать ими кожу или смачивать перевязочный материал раствором.

[0110] Гели представляют собой полутвердые системы суспензионного типа. Однофазные гели содержат органические макромолекулы, распределенные в значительной степени равномерно в жидкости-носителе, которая обычно является водной, но также, предпочтительно, содержит спирт и необязательно масло. Некоторые используемые «органические макромолекулы», в частности, гелеобразующие средства, представляют собой сшитые полимеры акриловой кислоты, такие как полимеры «карбомерного» семейства, например, карбоксиполиалкилены, которые коммерчески доступны как CARBOPOL®. Также используются гидрофильные полимеры, такие как оксиды полиэтилена, сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена, а также поливиниловый спирт; целлюлозные полимеры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксизетилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и метилцеллюлоза; камеди, такие как трагакант и ксантановая камедь; альгинат натрия и желатин. Для приготовления однородного геля могут быть добавлены диспергирующие средства, такие как спирт или глицерин, или гелеобразующее средство может быть диспергировано путем растирания, механического смешивания или перемешивания, или их комбинациями. Эти гели используют в раскрываемых в настоящем документе способах.

[0111] Также в раскрываемых способах можно использовать мази. Мази представляют собой полутвердые препараты, которые обычно основаны на вазелине или других производных нефти. Специалистам в данной области будет понятно, что конкретная мазевая основа, которая будет использоваться, будет обеспечивать ряд желаемых характеристик, например, смягчающее действие или т. п. Мазевая основа обычно инертна,

стабильна, не вызывает раздражения и не вызывает сенсбилизации. Мазевые основы сгруппированы в четыре класса: масляные основы; эмульгируемые основы; эмульсионные основы и водорастворимые основы (см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 Ed. (Easton, PA: Mack Publishing Co., 1995), на страницах 1399-1404). Масляные мазевые основы включают в себя, например, растительные масла, жиры, полученные от животных, и полутвердые углеводороды, полученные из нефти. Эмульгируемые мазевые основы, также известные как абсорбирующие мазевые основы, содержат мало воды или не содержат ее и включают в себя, например, гидроксистеарина сульфат, безводный ланолин и гидрофильный петролатум. Эмульсионные мазевые основы представляют собой либо эмульсии «вода в масле» (W/O), либо эмульсии «масло в воде» (O/W) и включают в себя, например, ацетиловый спирт, моностеарат глицерина, ланолин и стеариновую кислоту. Водорастворимые мазевые основы готовят из полиэтиленгликолей различной молекулярной массы.

[0112] Также используют пасты, которые представляют собой полутвердые лекарственные формы, в которых активное средство суспендировано в подходящей основе. В зависимости от характера основы пасты делят на жирные пасты или пасты, полученные из однофазных водных гелей. Основа жирной пасты обычно представляет собой вазелин, или гидрофильный вазелин, или подобное. Пасты, полученные из однофазных водных гелей, обычно включают в себя карбоксиметилцеллюлозу или подобное в качестве основы.

[0113] Композиция для местного применения может находиться в любой форме, подходящей для нанесения на поверхность тела, такой как крем, лосьон, аэрозоли, раствор, гель, мазь, паста, пластырь, краска, биоадгезив, перевязочный материал, аэрозоли, суспензии или подобное, и/или может быть получена таким образом, что содержит липосомы, мицеллы и/или микросферы. Композицию для местного применения можно использовать в комбинации с окклюзионным верхним слоем, чтобы влага, испаряющаяся с поверхности тела, сохранялась внутри состава при нанесении на поверхность тела и после этого.

[0114] Крем, лосьон, гель, мазь, паста или подобное могут быть распределены по пораженной поверхности. Раствор может быть нанесен тем же путем, но чаще наносится пипеткой, тампоном, распылителем или подобным и может быть осторожно нанесен на пораженные участки. Композиция может быть нанесена непосредственно на целевое место, например, в препарате для местного применения, таком как мазь, или как часть повязки или перевязочного материала. Композиция может быть составлена как однократная дозировка для введения с помощью какого-либо устройства для введения на кожу. Однократная дозировка может находиться в резервуаре для активного средства в носителе, например,

адгезивном носителе, способном прилипнуть к коже, на протяжении желаемого периода времени, например, по меньшей мере сутки или больше.

[0115] Фармацевтические композиции предназначены для применения в лечении атопического дерматита. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления местное нанесение приводит к пониженному размеру поражения, уменьшает количество поражений и/или снижает симптомы. Нанесение таких фармацевтических композиций может снизить количество *S. aureus* в коже субъекта, подлежащего лечению. Нанесение фармацевтической композиции может обеспечивать усиленную барьерную функцию кожи, как измерено с помощью трансэпидермальной потери воды.

[0116] Атопический дерматит проявляется в виде обострений, и могут наблюдаться периоды ремиссии. Местное нанесение может уменьшать рецидивы, так что дополнительные случаи атопического дерматита уменьшаются по количеству, интенсивности или частоте. Местное нанесение может увеличивать время ремиссии, например, промежуток времени между случаями. Согласно некоторым вариантам осуществления повторный случай атопического дерматита не произойдет в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель после нанесения. Согласно дополнительному варианту осуществления повторный случай атопического дерматита не произойдет в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев после местного нанесения.

[0117] Способ может предусматривать измерение микробиоты кожи субъекта. В частности, диагностические анализы могут быть выполнены для определения того, изменились ли бактериальные таксоны в коже субъекта после лечения. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления определяют, изменены ли тип бактерий, классы бактерий, отряды бактерий, семейства бактерий, роды бактерий и/или виды бактерий в коже субъекта с атопическим дерматитом. Согласно одному варианту осуществления определяют, изменяется ли количество *S. aureus* в коже субъекта после лечения.

[0118] Такой способ идентификации микробиоты в образце может предусматривать обеспечение образца, такого как образец кожи, и выявление по меньшей мере одной микробиоты в образце. Один вариант осуществления способа может предусматривать получение образца нуклеиновой кислоты, включающего в себя молекулярный индикатор идентичности по меньшей мере от одной микробиоты, присутствующей в образце, и выявление молекулярного индикатора идентичности. Например, способ может предусматривать получение по меньшей мере одного образца нуклеиновой кислоты путем приготовления образца ДНК. Молекулярный индикатор идентичности может представлять собой полиморфный полинуклеотид, такой как ген рРНК (например, ген 16S рРНК).

Молекулярный индикатор идентичности может быть выявлен путем определения нуклеотидной последовательности полиморфного полинуклеотида, такого как ген 16S рРНК, или его части или подпоследовательности. Согласно дополнительным вариантам осуществления определение молекулярного индикатора идентичности может также включать в себя ПЦР с селективными праймерами, количественную ПЦР с селективными праймерами, гибридизацию ДНК-ДНК, гибридизацию РНК-ДНК, гибридизацию *in situ* и их комбинации. Например, полиморфный полинуклеотид можно выявлять путем гибридизации с определенным зондом. В таком примере определенный зонд гибридизируется с полиморфной целевой нуклеиновой кислотой, такой как ген 16S рРНК. Необязательно, нуклеиновая кислота может быть гибридизована по меньшей мере с одним чипом, содержащим множество определенных зондов, например, множество определенных зондов, каждый из которых идентифицирует бактерии. Выявление молекулярного индикатора идентичности также может быть выполнено с использованием белковых зондов (таких как антитела), которые связываются с полиморфными целевыми белками, например, с полиморфными целевыми белками, которые идентифицируют микробиоту (см. патент США № 9173910, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

[0119] Относительную представленность одной или нескольких бактерий, таких как *S. aureus*, можно измерять в образце от субъекта. Используемый в настоящем документе, термин «относительная представленность» относится к стандартности или редкости организма по сравнению с другими организмами в определенном месте или сообществе. Например, относительную представленность можно определять, как правило, измеряя присутствие определенного организма по сравнению с суммарным присутствием организмов в образце.

[0120] Относительную представленность бактерий можно измерять непосредственно или опосредованно. Непосредственные измерения могут предусматривать способы на основе культуры. Опосредованные измерения могут предусматривать сравнение распространенности молекулярного индикатора идентичности, такого как последовательности гена рибосомальной РНК (рРНК), специфические для организма или группы организмов, относительно всего образца.

[0121] Согласно одному варианту осуществления относительная представленность микробиоты, такой как *S. aureus* и/или любой тип граматрицательных бактерий, в коже отдельного субъекта может быть вычислена путем измерения отношения одной или нескольких конкретных бактерий в образце от индивидуума для получения профиля микробиоты субъекта. Относительная представленность может быть получена из

суммарной представленности бактерий, присутствующих в образце. Используемый в настоящем документе термин «суммарная представленность», как правило, относится к сумме бактерий в образце. Таким образом, термин «профиль микробиоты» относится к представлению, такому как график, относительной представленности одной или нескольких микробиот у субъекта или в образце кожи от субъекта.

Наборы

[0122] Раскрываемое терапевтически эффективное количество очищенных жизнеспособных грамотрицательных бактерий может быть обеспечено в виде компонентов набора. Очищенные жизнеспособные грамотрицательные бактерии могут быть обеспечены в ростовой среде, в лиофилизированной форме, или в виде замороженных клеток. Таким образом, набор может включать в себя контейнер, содержащий терапевтически эффективное количество очищенных жизнеспособных грамотрицательных бактерий, при этом i) лизат и/или компонент грамотрицательных бактерий ингибирует рост *S. aureus* в *in vitro* анализе; ii) грамотрицательная бактерия стимулирует кератиноциты человека; iii) грамотрицательная бактерия индуцирует экспрессию цитокинов из человеческих клеток; и iv) грамотрицательная бактерия является непатогенной при введении на кожу субъекта.

[0123] Согласно некоторым вариантам осуществления набор может включать в себя компоненты, необходимые для получения фармацевтической композиции, такие как один контейнер, содержащий грамотрицательные бактерии (в любой форме), и один контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель для суспендирования грамотрицательных бактерий в нем. Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой, например, забуференный солевой раствор или раствор сахарозы. Согласно другим вариантам осуществления набор может включать в себя контейнер, содержащий грамотрицательные бактерии, второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель, и устройство, такое как без ограничения шприц, для отмеривания фармацевтически приемлемого носителя. Согласно еще одному варианту осуществления набор может включать в себя устройство, такое как без ограничения распылительная форсунка или перевязочный материал, для местного нанесения грамотрицательных бактерий после того, как они суспендированы в фармацевтически приемлемом носителе.

[0124] Необязательно такой набор содержит дополнительные компоненты, включающие в себя упаковку, инструкции и различные другие реагенты, такие как дополнительные буферы, или другие терапевтические ингредиенты. Набор может включать в себя контейнер и этикетку или листок-вкладыш на контейнере или связанные с ним. Подходящие

контейнеры включают в себя, например, бутылки, флаконы, пробирки и т. д. Контейнеры могут быть сформированы из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер обычно содержит композицию, включающую в себя грамотрицательную бактерию, которая эффективна для лечения атопического дерматита. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнер может иметь порт для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). На этикетке или листке-вкладыше указывается, что композиция используется для лечения определенного состояния, такого как атопический дерматит.

[0125] Этикетка или листок-вкладыш обычно дополнительно содержит инструкции по применению. Листок-вкладыш обычно содержит инструкции, обычно включаемые в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов. В некоторых неограничивающих примерах инструкции включают в себя информацию о количестве фармацевтически приемлемого носителя для добавления во флакон, содержащий грамотрицательные бактерии, инструкции по суспендированию грамотрицательных бактерий в фармацевтически приемлемом носителе и инструкции по местному нанесению на кожу. Нанесение может представлять собой распыление на кожу, нанесение тампоном на кожу или нанесение суспензии на перевязочный материал для нанесения на кожу.

[0126] Материалы инструкции могут быть написаны в электронной форме (например, компьютерная дискета или компакт-диск) или могут быть визуальными (например, видеофайлы). Наборы могут также включать в себя дополнительные компоненты для облегчения конкретного нанесения, для которого предназначен набор, такие как распылительные наконечники, перевязочные материалы или тампоны для кожного нанесения. Наборы могут дополнительно включать в себя буферы и другие реагенты, обычно используемые для осуществления определенного способа. Наборы и соответствующее содержимое хорошо известны специалистам в данной области.

[0127] Настоящее раскрытие иллюстрируется следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

[0128] Выполняли исследования, чтобы оценить, различаются ли иммунологические исходы после воздействия различных комменсальных грамотрицательных (CGN) бактерий, собранных с кожи человека. Для этих исследований CGN бактерии собирали у здоровых

контрольных индивидуумов и больных с атопическим дерматитом (AD). Их иммуногенность оценивали с использованием различных клеточных моделей и моделей на основе культуры. Отбирали типичные штаммы CGN и их влияние оценивали на мышинной модели MC903 для AD. Выяснили, что CGN бактерии, взятые у здоровых добровольцев, но не у больных с AD, связаны с усилением барьерной функции, активацией врожденного иммунитета и контролем *S. aureus*. Лечение AD с помощью CGN у здоровых контрольных индивидуумов улучшало исходы на мышинной модели.

Пример 1

Материалы и способы

[0129] *Сбор и идентификация грамотрицательных бактерий.* Двумя тампонами FloqSwab (Coran, Brescia, Italy), смоченными стерильным забуференным фосфатом солевым раствором (PBS; Corning Cellgro, Corning, NY), интенсивно растирали кожу субъекта (в области антекубитальной ямки) в течение 15-30 секунд. Один тампон помещали в коническую пробирку объемом 15 мл (Corning Life, Corning, NY) с 2 мл стерильного сбалансированного солевого раствора Хэнка (HBSS; Sigma-Aldrich), содержащего ванкомицин (300 мкг/мл) и амфотерицин В (5 мкг/мл; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) для ингибирования роста грамположительных бактерий и грибов. Оставшийся тампон помещали в коническую пробирку объемом 15 мл, содержащую 2 мл бульона R2A (Reasoner's 2A) (Teknova, Hollister, CA) с аналогичными концентрациями ванкомицина и амфотерицина В. Затем пробирки с оставленными тампонами инкубировали при 32°C при постоянном встряхивании в течение 48-72 часов перед нанесением по 100 мкл из каждой пробирки на чашку с агаром R2A (Remel, Lenexa, KS). Затем отбирали колонии для идентификации видов с помощью анализа времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF). Экстракцию бактериального белка для MALDI-TOF MS с использованием BioTyper (v3.1, Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA) проводили в микробиологической лаборатории Клинического центра НИИ с использованием ранее описанных способов (Lau *et al.*, *Journal of clinical microbiology* **51**, 828-834 (2013); опубликовано в сети Epub Aug (10.1128/JCM.00694-14), настройки прибора и калибровки (Lau *et al.*, *Journal of clinical microbiology* **51**, 828-834 (2013); опубликовано в Интернете (Epub) Mar (10.1128/JCM.02852-12); Youn *et al.*, *Journal of clinical microbiology*, (2015); опубликовано в Интернете (Epub) 2 сентября (10.1128/JCM.01643-15)). Идентификацию BioTyper дополняли дополнительными масс-спектрометрическими профилями, предоставленными несколькими базами данных, разработанными НИИ (Lau *et al.*, 2014, *supra*; Stevenson *et al.*, *Journal of clinical microbiology* **48**, 3482-3486 (2010); опубликовано в Интернете (Epub) Oct (10.1128/JCM.00687-09; Myles *et al.*, *Nature*

immunology **14**, 804-811 (2013); опубликовано в Интернете (Epub) Aug (10.1038/ni.2637)). Десять штаммов *R. mucosa* от здоровых контрольных индивидуумов, представленных на фиг. 1, идентифицировали исключительно на основании уникальной морфологии колоний, реактивности УФ излучения и характеристик окраски по Граму, которые наблюдали у других изолятов *R. mucosa*, идентифицированных с помощью анализа MALDI-TOF. Все изоляты *R. mucosa*, предназначенные для использования в последующих исследованиях, проверяли с помощью анализа MALDI-TOF. Письменное информированное согласие получали от всех участников данного исследования.

[0130] *In vitro* анализ ингибирования *Staphylococcus aureus*. Грамотрицательные изоляты культивировали, как описывается выше, в 5 мл R2A в течение 8-10 суток. Бактерии осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 12 минут. Надосадочные жидкости собирали, замораживали, затем лиофилизировали (Labconco FreeZone 2.5, Kansas City, MO). Лيوфилизированный продукт и контроль в виде параллельно инкубируемой и лиофилизированной R2A без бактерий суспендировали в 1 мл триптического соевого бульона (TSB). Культуру штаммов *S. aureus*, выращиваемых на протяжении ночи в 5 мл TSB, разбавляли 1:100 свежей средой, затем 100 мкл свежеразбавленной культуры объединяли со 100 мкл TSB, содержащего надосадочную жидкость CGN или лиофилизированный контроль в виде R2A. Образцы инкубировали в течение 3 часов при 37°C при постоянном взбалтывании. Выполняли серийные разбавления и высевали их на чашки; на следующие сутки колонии подсчитывали и определяли среднее значение для всех подсчитываемых чашек. Вычисляли процент воздействия на рост *S. aureus* путем деления числа КОЕ в культуре, подвергнутой воздействию надосадочной жидкости CGN, на число КОЕ в культуре, подвергнутой воздействию только R2A.

[0131] *Индукция волдырей и заражение бактериями*. Разрабатывали всасывающую камеру с восемью лунками (Amnra Creations; San Jose, CA) и создавали по технологии трехмерной печати из бронзы (Shapeways; New York, NY). Ее размещали на стерилизованное этанолом ладонную сторону предплечья участников и помещали под вакуум 30 мм рт. ст. на 2 часа с использованием устройства для микродермальной абразии (Kendal Diamond HB-SF02). После удаления устройства верхние стенки образовавшихся эпидермальных волдырей удаляли хирургическим путем. Разрабатывали восемь камер для заражения (Amnra Creations) и создавали по технологии трехмерной печати из бронзы (Shapeways) (фиг. 4C). С использованием соответствующего восьмилуночного шаблона (Amnra Creations) для 10-мм пробивных биопсий (Acu-Punch, Acu-derm; Fort Lauderdale, FL) вырезали один перевязочный материал Duoderm размером 4" × 4" (ConvaTec; Bridgewater, NJ). Края камер для заражения обрабатывали адгезивом Dermabond (Ethicon;

Somerville, NJ) перед наложением на открытые волдыри. Каждую лунку заполняли 1 мл стерильного солевого раствора (Corning Life) или 2×10^7 КОЕ облученных бактерий, суспендированных в стерильном солевом растворе. На следующее утро жидкость из волдырей удаляли пипеткой (Eppendorf; Hauppauge, NY). Собранные образцы центрифугировали при 350 g в течение 7 минут, надосадочные жидкости удаляли и замораживали для анализа партии.

[0132] *Выявление цитокинов и противомикробных пептидов.* Стандарты reg3gamma человека (Sino Biologicals; Beijing, China) или образцы жидкости из волдырей (100-12,5%, разбавленные с помощью 0,9% NaCl) наносили на чашки Nunc Maxisorp на протяжении ночи. На следующие сутки лунки промывали $5 \times$ PBS и блокировали 3% BSA в PBS в течение 1 часа. Лунки один раз промывали с помощью PBS. Добавляли поликлональные очищенные белком А кроличьи антитела против мышинового reg3gamma (13,2 мг/мл; любезно предоставленные J. Kolls, University of Pittsburgh) при разбавлении 1:1000 с помощью 1% BSA/PBS и инкубировали 90 минут при комнатной температуре. Добавляли антитела против HRP кролика (Санта-Крус; Dallas, TX) и субстрат ТМВ (Ebioscience; San Diego, CA) и чашку инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 минут. Добавляли 2 н. H_2SO_4 , чтобы остановить реакцию; чашки считывали при 450 нм. LL-37 (Nucult; Plymouth Meeting, PA) и человеческий бета-дефензин 3 (PeproTech; Rocky Hill, NJ) измеряли с помощью коммерческих наборов для ELISA. Содержания цитокинов определяли с помощью Bio-Plex (BIO-Rad; Hercules, CA) в соответствии с инструкциями производителя.

[0133] *Культуры кератиноцитов.* Культуры первичных кератиноцитов крайней плоти (КС) собирали и стимулировали, как описано ранее (Myles *et al.*, *Nature immunology* **14**, 804-811 (2013); опубликовано на сайте Epub Aug (10.1038/ni.2637)). В культуральную среду КС добавляли 1×10^7 КОЕ живых комменсальных грамотрицательных бактерий. мРНК экстрагировали через 24 часа для ПЦР-анализа способом $\Delta \Delta CT$.

[0134] *Мыши.* Мышей BALB/c приобретали в компании Taconic Farms (Hudson, NY). Использовали мышей возрастом 8 и 14 недель. Эксперименты выполняли как с самцами, так и с самками мышей, но возраст и пол в каждом эксперименте совпадали.

[0135] *Измерения трансэпидермальной потери воды (TEWL).* Мышей брили и химически путем удаляли волоски (Nair). Начиная со следующих суток, ежедневно на обнаженные участки помещали приблизительно 1×10^7 КОЕ живых бактерий. Непосредственно перед инокуляцией измеряли TEWL ежедневно с помощью VapoMeter (Delfin; Greenwich, CT) в соответствии с инструкциями производителя.

[0136] *MC903 и инокуляции в уши.* Создавали модель мыши MC903 для AD, как описано ранее (Wang *et al.*, *The Journal of allergy and clinical immunology* **135**, 781-791 e783 (2015); опубликовано в Интернете (Epub) Mar (10.1016/j.jaci.2014.09.015)). Для исследований предупреждения $1e7$ КОЕ грамотрицательных бактерий суспендировали в стерильном PBS и капали на уши мышей в объеме 10 мкл. Инокуляции начинали за двое суток до MC903 и продолжали в течение всего воздействия MC903. Сначала помещали MC903, обеспечивали испарение этанола в течение 2-5 минут перед помещением бактериальных изолятов. Толщину ушей измеряли в сутки 14. Выделение мРНК и ПЦР выполняли, как описано ранее ((Myles *et al.*, 2013, *supra*). Для экспериментов с одновременной инокуляцией *S. aureus* $1e6$ КОЕ штамма SAAS9 *S. aureus* капали на ухо непосредственно перед инокуляцией грамотрицательного изолята. Исследования лечения проводили, подвергая мышей воздействию MC903 ежесуточно в течение 14 суток и инокулируя $1e7$ КОЕ грамотрицательных бактерий в сутки 13-15. Измеряли толщину уха и делали фотографии в сутки 21.

[0137] *Анализ суммарного IgE в сыворотке.* Сыворотку собирали в сутки 14 обработки с помощью MC903. Определяли суммарный IgE, как описано ранее (Myles, *Nutrition journal* **13**, 61 (2014) 10.1186/1475-2891-13-61)) с использованием коммерческого набора (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX).

[0138] *Статистическая характеристика.* Среднее сравнивали с использованием непарного двустороннего t-критерия Стьюдента или ANOVA для сравнения нескольких образцов с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad, San Diego, CA). NS = незначимый, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

[0139] *Одобрение исследования.* Все эксперименты на животных проводили в соответствии с утвержденными процедурами Управления по уходу за животными и их использованию. Весь сбор и обработку образцов от людей проводили в рамках клинических испытаний, одобренных IRB, и все субъекты давали полное согласие на забор образцов. Все участники предоставляли письменное согласие на протокол исследования, и перед забором крови получали согласие институционального наблюдательного совета (IRB).

Пример 2

Комменсальная грамотрицательная микробиота кожи различается у здоровых контрольных индивидуумов и больных с AD

[0140] Генетическая идентификация микробиома выявляла значительные различия в грамотрицательном биоме кожи между больными с AD и здоровыми контрольными индивидуумами (4). Способ культивирования грамотрицательной флоры кожи путем соответствующего выбора среды, антибиотиков и температуры обеспечивал

функциональную характеристику и сравнение видов CGN. Значительные различия обнаруживали в культивируемых бактериях, присутствующих на коже 17 больных с AD, по сравнению с 26 здоровыми добровольцами (фиг. 1А; таблица 1).

Таблица 1. Демографические показатели контрольных индивидуумов и больных

Демографический показатель	Контрольные индивидуумы	Больные	Значимость
Число	26	17	--
Возраст			
Среднее (диапазон)	32,5 (8-65)	18,5 (8-51)	**
Пол (%)			
Мужской	50	70	NS
Женский	50	30	
Раса (%)			
Белые	39	47	NS
Черные	15	18	
Латиноамериканцы	0	0	
Азиаты	31	24	
Другие/смешанные	15	11	
SCORAD (диапазон)	0 (0)	19,7 (1-56)	****

Возраст, пол, раса и SCORAD участников включены в фиг. 1. Значимость определяли с помощью t-критерия Стьюдента (возраст, SCORAD) или Хи-квадрата (пол, раса). ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,001$, NS = незначимый.

[0141] Преобладающим грамотрицательным видом, идентифицированным у здоровых добровольцев (HV), был *Roseomonas mucosa*. Примерно у половины больных с AD не наблюдали никаких культивируемых грамотрицательных бактерий, что согласуется с анализом на основе ДНК (Kong *et al.*, *Genome research* **22**, 850-859 (2012); опубликовано в Интернете EpubMay (10.1101/gr.131029.111)).

Пример 3

CGN от здоровых добровольцев ингибируют рост *S. aureus*

[0142] Чрезмерный рост и инфицирование *S. aureus* является как фактором, так и следствием иммунного дисбаланса и плохой барьерной функции, характерных для AD. *S. aureus* может непосредственно активировать аллергические тучные клетки (Schlievert *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* **125**, 39-49 (2010); опубликовано в Интернете (EpubJan) (10.1016/j.jaci.2009.10.039; Nakamura *et al.*, *Nature* **503**, 397-401 (2013); опубликовано в Интернете (Epub) 21 ноября (10.1038/nature12655)) и Т-клетки (Brauweiler *et al.*, *The Journal*

of investigative dermatology **134**, 2114-2121 (2014); опубликовано в Интернете (Epub) Aug (10.1038/jid.2014.43)). Лечение антибиотиками может уменьшить нагрузку *S. aureus* и улучшить симптомы, но не нормализует основную патологию (Boguniewicz and Leung, *J Allergy Clin Immunol* **132**, 511-512 e515 (2013); опубликовано в Интернете (Epub) Aug (10.1016/j.jaci.2013.06.030)). Чтобы оценить влияние штаммов CGN на рост *S. aureus*, несколько изолятов *S. aureus* выращивали в присутствии надосадочной жидкости из культур CGN. В среднем надосадочные жидкости от HV-CGN ингибировали *S. aureus* почти на 50% (фиг. 1B; фиг. 4). Напротив, AD-CGN оказывал более вариабельные эффекты, при этом большинство штаммов не ингибировались (фиг. 1B; фиг. 4). Повторная инокуляция *S. aureus* из надосадочных жидкостей, подавляющих CGN, в свежую среду обеспечивала нормальный рост, что свидетельствует о бактериостатической, а не бактерицидной активности. В соответствии с этим *in vitro* анализом совместная инокуляция CGN и *S. aureus* на уши мышей также снижала выход *S. aureus* (фиг. 1C). Такое ингибирование связывали с продуцированием липид-лизофосфатидилхолина (LPC) и повторяли с использованием коммерчески приобретенного LPC (фиг. 8B), что указывает на то, что уникальные признаки бактерий в соответствии с настоящим изобретением были связаны с потенциальной клинической пользой.

Пример 4

CGN от здоровых добровольцев индуцировали врожденный иммунитет у людей

[0143] Для измерения кожной иммунной реактивности человека к этим бактериям *in vivo* на предплечьях здоровых добровольцев индуцировали волдыри вакуумом (фиг. 5A) и удаляли верхние стенки эпидермальных волдырей (фиг. 5B) аналогично тому, что было описано ранее (Follin and Dahlgren, *Methods in molecular biology* **412**, 333-346 (2007)10.1007/978-1-59745-467-4_22). Камеры для заражения (фиг. 5C) использовали для воздействия на основание дермального волдыря летально облученными изолятами либо полученных от HV, либо полученных от AD *R. mucosa*, выбранных на основе их несхожего ингибирования *S. aureus* (фиг. 1B).

[0144] После 20-24 часов стимуляции содержания цитокинов в волдырях для IL-6 (фиг. 2A-2B) были значительно выше в ответ на *R. mucosa* HV по сравнению с таковыми у больного с AD (фиг. 2A-2B). Не наблюдали различия в содержаниях традиционных цитокинов Th (Т-хелперных), таких как интерлейкин (IL)-17, интерферон гамма (IFN γ) или IL-4 (фиг. 2A), а также не наблюдали значительных различий в содержаниях многих других цитокинов (фиг. 6A) или противомикробных пептидов (фиг. 6B); однако адаптивные Т-клеточные цитокины также следует измерять в более поздние моменты времени. Инфекция первичных происходящих из крайней плоти человека кератиноцитов (КС) несколькими

изолятами живых CGN *in vitro* показывала разное влияние различных изолятов на маркеры врожденного иммунитета КС, но по сравнению с AD-CGN, HV-CGN увеличивали представленность мРНК дефензина $\beta 4A$ (фиг. 7A) и модуляторов в обратном направлении (Miller *et al.*, *Dermatologic therapy* **23**, 13-22 (2010); опубликовано в Интернете (Epub) Jan-Feb (10.1111/j.1529-8019.2009.01287.x); Schaubert and Gallo, *Experimental dermatology* **17**, 633-639 (2008); опубликовано в Интернете (Epub) Aug (10.1111/j.1600-0625.2008.00768.x)), CYP27b1 (фермента, превращающего витамин D; фиг. 7B), рецептора витамина D (VDR) (фиг. 7C) и противомикробного пептида кателицидина (фиг. 7D). Не наблюдали различия в содержаниях транскриптов для IL-1 β или IL-6 (фиг. 7E-7F). Представленность мРНК CD14, IL-8, фактора некроза опухоли альфа (TNF α), Toll-подобного рецептора (TLR) 2, TLR3, TLR4, TLR9 или тимического стромального лимфопоэтина (TSLP) также не различалась, и не наблюдали очевидной корреляции между способностью изолята ингибировать *S. aureus* и активировать КС.

Пример 5

CGN от здоровых добровольцев сохраняет барьерную функцию у мышей

[0145] Потеря барьерной функции при AD вызывает сухость и зуд кожи из-за трансэпидермальной потери воды (TEWL) (TEWL) (Boguniewicz *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* **125**, 4-13; quiz 14-15 (2010); опубликовано в Интернете (Epub) Jan (10.1016/j.jaci.2009.11.027)) и кожной сенсибилизации к антигенам (Pyun, *Allergy, asthma & immunology research* **7**, 101-105 (2015); опубликовано в Интернете (Epub) Mar (10.4168/aaif.2015.7.2.101)). У подгруппы больных этот дефект барьера связан с дисфункцией белка плотного контакта филаггрина (Bantz *et al.*, *Journal of clinical & cellular immunology* **5**, (2014); опубликовано в Интернете (Epub) Apr (10.4172/2155-9899.1000202)). Местное нанесение на уши здоровых мышей типичного изолята HV-CGN, использованного в исследованиях волдырей на людях, увеличивало содержания транскрипта филаггрина по сравнению с изолятом AD-CGN (фиг. 2C) без каких-либо заметных изменений эритемы или толщины уха. Нанесение AD-CGN увеличивало TEWL, в то время как HV-CGN не оказывали эффекта (фиг. 2D). Взятые вместе, эти данные предполагают, что штаммы CGN, связанные со здоровым статусом, индуцируют потенциально благоприятные иммунные исходы, связанные с активацией витамина D, стимуляцией врожденного иммунитета и сохранением барьерной функции.

Пример 6

CGN от здоровых добровольцев улучшают исходы на мышинной модели AD

[0146] MC903, аналог витамина D, индуцирует AD-подобный дерматит при нанесении на уши мышей (22). Одновременное нанесение полученного от HV изолята *R. mucosa*

защищало от развития дерматита, индуцированного MC903, что измеряли по толщине уха (фиг. 3А). Напротив, полученный от AD изолят *R. mucosa* не смог защитить от развития заболевания, как и полученная от HV *P. aeruginosa* (фиг. 3А), несмотря на влияние последней на активацию КС (фиг. 7) и ингибирование *S. aureus* (фиг. 1В). Нанесение полученной от AD *R. mucosa* усиливало индуцирование сывороточного IgE, тогда как полученная от HV *R. mucosa* не оказывала значительного воздействия (фиг. 3В). В соответствии с инокуляцией ушей здоровых мышей содержания транскрипта филагтрина были значительно ниже у мышей, получавших лечение MC903, подвергшихся воздействию полученной от AD *R. mucosa* (фиг. 9).

[0147] Для тестирования терапевтического потенциала CGN с помощью MC903 индуцировали AD-подобный дерматит, а затем в уши ежедневно инокулировали CGN в течение трех суток. Лечение с помощью HV-*R. mucosa* было связано с уменьшением толщины уха и видимого покраснения (фиг. 3С-3D). Чтобы оценить необходимость живого биотерапевтического средства или то, что поверхностные и секретлируемые факторы отдельно могут обеспечивать аналогичные результаты, авторы настоящего изобретения наносили эквивалентную концентрацию КОЕ летально облученных HV-CGN, суспендированных в их надосадочной жидкости. Ни эта «мертвая смесь», ни надосадочная жидкость сами по себе не принесли никакой пользы, и каждая из них увеличивала толщину уха (фиг. 3С-3D).

[0148] В то время как исследования геномного сцепления (Barnes *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* **125**, 16-29 e11-11; quiz 30-11 (2010); опубликовано в Интернете (Epub) Jan (10.1016/j.jaci.2009.11.008)) и характеристика *S. aureus* прояснили патогенез AD, многие причинные основы остаются невыясненными. Современные терапевтические подходы, нацеленные на ответ хозяина и колонизацию *S. aureus*, могут значительно улучшить симптомы AD, но даже в случае успеха эти методы лечения не являются излечивающими и наносят значительный эмоциональный урон больным и их семьям (24). Раскрываемые в настоящем документе исследования свидетельствуют о том, что зарегистрированный дисбактериоз при AD не является просто ассоциированным выявленным нарушением, но может способствовать развитию патологии. Штаммы *R. mucosa*, выделенные у здоровых контрольных индивидуумов, были способны влиять на многие признаки AD, улучшая барьерную функцию, усиливая врожденную активацию и ограничивая рост *S. aureus*. Другие грамотрицательные бактерии могут оказывать аналогичный эффект.

[0149] Добавление грамотрицательных лизатов *V. filiformis* к кремам для кожи может обеспечивать положительный эффект при лечении AD (Gueniche *et al.*, *The British journal of dermatology* **159**, 1357-1363 (2008); опубликовано в Интернете (Epub) Dec (10.1111/j.1365-

2133.2008.08836.x). Однако отсутствие эффективности убитых *R. mucosa* предполагает, что применение выделенных секретируемых и/или поверхностных продуктов без живых комменсалов может не принести пользы. Без ограничения какой-либо теорией считают, что динамическое взаимодействие комменсал-хозяин может потребоваться для клинического применения *R. mucosa*, а возможность колонизации дает преимущества ограниченного повторного нанесения и более физиологических фармакокинетических показателей.

Пример 7

Создание фармацевтического состава *R. mucosa* от здоровых добровольцев

[0150] Три изолята *R. mucosa*, взятых от 3 здоровых добровольцев (HV), выращивали в минимальной среде (бульон R2A, Текнова; или забуференный солевой раствор Хэнка, HBSS, Gibco) в течение 24-48 часов. Изоляты отбирали на основании их способности ингибировать рост *S. aureus*, активировать пути витамина D в кератиноцитах человека и улучшать исходы на мышинных моделях AD. Выполняли геномное секвенирование на всех штаммах, чтобы убедиться в отсутствии передающихся, клинически значимых генов устойчивости к антибиотикам. Бактериальные клетки промывали 3 раза в PBS (Gibco) и повторно суспендировали в 10-15% сахарозе в воде до концентрации 10^9 КОЕ/мл. Выполняли серийные разбавления в 10% - 15% сахарозе для создания маточных культур 10^4 , 10^5 и 10^6 на мл. Аликвоты разбавленных бактериальных образцов помещали на агар R2A (Remel) и инкубировали при 32°C в течение 48-72 часов для подсчета концентрации КОЕ перед лиофилизацией. Начальные значения КОЕ составляли 90-105% от ожидаемых концентраций. Перед лиофилизацией восемьсот микролитров (для взрослых) или 1,5 мл (для детей) бактериального раствора замораживали в ампулах из янтарного стекла объемом 1,5 мл (Wheaton; для взрослых) или в автономной системе распыления объемом 3 мл (Discount Vials; для детей). Флаконы/распылители запечатывали, маркировали и хранили при -70°C до выдачи больным.

[0151] Три аликвоты на партию восстанавливали в стерильной воде и высевали после серийного разбавления для подсчета концентрации КОЕ после лиофилизации. Выживаемость составляла 93-99% исходных КОЕ после лиофилизации. Эти аликвоты также высевали на соево-казеиновый агар (BD Bioscience), агар с декстрозой Сабуро (Remel), агар МакКонки (BD Bioscience), ксилозо-лизиновый агар (Remel), угольный агар (BD Bioscience) и агар с маннитоловой солью (Remel) и оценивали на наличие контаминирующих бактерий в соответствии с USP 61/62. Никаких загрязнений не обнаруживали ни в одной из партий обработки Roseomonas.

Пример 8

Характеристика консорции *R. mucosa* от здоровых добровольцев

[0152] Геномы трех изолятов *R. mucosa*, полученных в примере 7, секвенировали и оценивали, чтобы рассмотреть анализ, подтверждающий их последовательность. Идентифицировали области последовательности, специфические для каждого из трех изолятов, как показано в **таблице 2** (основания, специфические для каждого штамма, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты).

Таблица 2.

Штамм	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO:
RM-A	CGGCGGCGGACAGCCCCTCCAC <u>CCC</u> <u>A</u> TCCTCGCCGAGCCC GATGATGCTAA	1
RM-B	CGGCGGCGGACAGCCCCTCCACT <u>CC</u> <u>A</u> CCTCGCCGAGCCCG ATGATGCTAA	2
RM-C	CGGCGGCGGACAGCCCCTCCAC <u>CCC</u> <u>G</u> TCCTCGCCGAGCCC GATGATGCTAA	3

[0153] Конструировали праймеры для амплификации области, в которой идентифицировали специфическую для штамма вариацию. Для проведения анализа по выявлению каждого штамма использовали специальные наборы TaqMan® SNP Genotyping Assays, Non-human, SM и протокол. Вкратце, ДНК из каждого изолята подвергали ПЦР, в которой праймеры представляли собой SEQ ID NO: 4 (CACCGGACAGCAGGCT) и SEQ ID NO: 5 (GCGGTGGCTTAGCATCATC). Продукты амплификации подвергали анализу аллельной дискриминации. В первом сравнении использовали следующие репортеры: SEQ ID NO: 6 (CACCCATCCTCG) и SEQ ID NO: 7 (CACCCGTCCTCG). Это был анализ дискриминации аллелей A/G. Результаты скрининга продуктов амплификации изолятов RM-A и RM-C показаны на **фиг. 10А**. Во втором сравнении использовали следующие репортеры: SEQ ID NO: 8 (CCCTCCACCCATCCT) и SEQ ID NO: 9 (CCCTCCACTCCATCCT). Это был анализ дискриминации аллелей T/C. Результаты скрининга продуктов амплификации изолятов RM-A и RM-B показаны на **фиг. 10В**. Как видно из результатов, комбинация анализов обеспечивала четкий инструмент для подтверждения идентичности каждого штамма.

[0154] Анализ секвенирования трех штаммов *Roseomonas* демонстрирует, что каждый имеет специфическую генную последовательность, выявляемую с помощью ПЦР с использованием праймеров для создания специфических для штаммов ампликонов. Результаты секвенирования по Сэнгеру для уникальных областей генов трех штаммов представлены в **таблице 3**.

Таблица 3

Штамм	Последовательность	SEQ ID NO:
RM-A	ATGGGCCGTGCGATACGAGTCGCAGAGGTCCGAGCGGAGCAT CTGCTGACCGAACTCCTAACTGTCCAGGGTTGGGGGGCACTAC GCCCACCCAAAGGAGATCTTCTGCGGCAGCAAGAGTATAAAG ATTATCCTCATCTTCTTGAGATTTTTAAGGGAAGAAGCAAGTC GTCCGGCGGGGGCGATGGGCTTCCAGAAGCTCTCCTTGTGAC GAAAATCTGCAGCCCCTGGCCGTGATCGAGGTAAAGGCGCTT AGAGCCGAACTGCCGAAGGCTGTGACGAAGTCACAAATAAG TATGGGGCATGGTGTCTTGAGGCTGGCTATGAACCTCTGGCGA TAGCCCTCGCCGGCACATCCGGCGACGCCTTCGATCTGAGGGT ATTCAAAGCGGTTTCGTAATAAATGGGCAGCGGTCACTTACGA GGGGAATCCGATCAACTGGATTCCTAACC GCGCAGATCTAGG CCACCTTCGTGCGACCGGGGGCCTGACGGAAGTGCAGGCCATC CGTTCCCCCTCCCGAAGTGCTGGCCGCAAAGGCGGACGAAAT CAATCGCCTGCTTCGAGAAGCGAACATTACTGACGCGCATAG GCCGGCGGTTCGTCGGCGCAATTATGCTGGCTCTGTGGAAGTCA AAGGGCAAGATCCGGCGCGACCCTGAATACATTCTTAGTGAC ATTAATAGCGCGGCCCAAGAGGCATTTTGGGTTGCCAAGAAG CCCAAGATTGCAGCCAGTCTCAACGTTCCAAGTCAAATATGG CGCTGGCGAACAGTGCTGTCCGCATTGCAAGCATACTTGAGA AGCTGAATGTGACCGTCCTTAATGCCGAACTGATTACCTCGG CCAGCTTTACGAGACGTTCTTCACCTATGTTGGCGGAAACACG ATCGGACAGATTTTACACCGAGACACTTGGCTGCATTTATGG CCGAGATTACGAACGTCGAGCGTGAGGACAACGTCTTAGACC CTGCGTGTGGAACGGGCGGATTCTTGATCGCGGCCATGAACC GCGTTCAGCGCCGAAGCAAGTTGTCCGGGCGCAGATCGTTG AAATCATCAAGGAGCATCTGTTGGGCTTTGAGGACGAGCCCA CCACAGCGGCCCTGTGCGTCGCCAATATGATTCTCAGGGGCG ATGGCTCCACGAAGGTGAATCAGGGAAGTTGTTTTACCTCGA AGCAGTTTCAGGCTGGATGGGCATCGATAGTGCTCATGAACC CGCCGTTCCCTCACAAGGCCACTGATACTCCGCCTGAGGATTT TATCGCCCGTGGACTAGAAGGGCTGCGGCATAAAGGAATTCT GGCATCCATTGTGCCGAGTCGCTTCTCGTAAAGCGCGACAAG CAAGACTGGCGCGATGAGATCCTGCAGAAGAACACGCTTCTC GGCGTCGTGGTTTTGCCTGACGAACTGTTTATGCCTTTTGCTC CGCTTTTACAGCTGCCTTATTATTGAAAAGGGCACCCCGCAC CCGCAAGGTTCGAAGGTCTTTTTTTGCTCGGGTGCAAATGACG GTTTCCGAATCAAGAAAAACGTCCGTGTGCCGCGAAGCGGGG ACCAACTGCCGATCGTCTTGATGCCTTTAAAGAAGGGAAAT CCATTTGCGGGCTTTGCGGCTGGTCCGCTCTTGACCAGAGTGA ACCGCTTTGGCACCCGGCCGCGCCTAACTATATCCCTACTTCT CCGCTGAACATCGAAGAGGTTTCGCGAGGACATCAGATATCTG ACTGGGTCCAGATCGGCCTTTGTGGTCAGACACGCTCGTGAAC TTCAGAACATGCTTGACAAGATCGCCAGCGGTGAACTGTCGA CCAAGTCAGTTAGGACCATTTCGCAAGAAGGCGATAGAGGTTG AAAGTGCGCCGGGGACCATCGGGGCAAGTTTCGACATCTACG GTGGGCAACGGGAGTTGCATAACAAGGAGAATTTACTACCAG GAGATTCAGTGGTTATTTATCGAGCGGGGCGGACAACGGTG CGTATGGGTTCTTTGACTTTAACCAACTCTTAGAGCCTCCTTTT GTAACGGTGCCCTGGAACCGGGAGCATTGGGGAGGCTCATGTG CAAGAATGGCCCTGCGGGGTAAGCGACCACTGCTACATCCTC	10

	<p>GTTCCCAAGCCCGGCGTTGAGCCAGAAATGCTCTACTTGGCGT CCGCCGCAATCCGACGTGAGATTTGGCGGTTTAGCTATGGCGC CCAGATCACACCCAGGAGGATCGCTTGGTTTCCTCTGACAAAG TCAGAGGATGCGATCATGTTGGTCCGAGACCATCTCGCGTCAG CCGCTCGGATTGAGGAGGTTGCATTGGAAGAGGCTGCCGACG ATCGTGACAGGGAGATCGCCCGAAAGCGTCTGGACAGCCTTC AGGCTGGCAAGGTGAAGGTGGTCTATGGCGATGAGCTTGAGG CCAGACTAGCCGCGCTTGAAGCCGAGTGA</p>	
RM-B	<p>ATGGTCCGCGAAGTCCTGCGCGAGCGTTTCATTGAGACCCTGA CGGAACTCGGCGGCAGCGCCGGCAATGGTTCGTCTTCGCGAGA TGATCGGCTGGCAGGACGACACTTACTGGTCCGTACACGCAG CACTGATCGAAGACGGAACCATTATTGCCGGCCGGGGGCGTG GCGGGTCTGTTGCACTTGCCGCGCGGCCCAAACAGGCCACCC CGCCCCCGGCTAAGACGGCATCGGAGCCCGACCTGCTCGCAC CAATTGTCGCACCAACCGCTGCGCCGAAGCCCGCCGCGAAGC GGGCAGCGGGCAATGGCGCCGCCCTCGGCTTCGAGGCGCAAC TCTTCAGGCAGCCGACAAGCTGCGCAAGAATCTCGAACCGT CCGATTACAAGCACGTCGCCCTCGGCCTGATCTTCCTAAAGCA CATCTCGCTGGCCTTCGAGGCGAAGCGCGCCGCCCTGCTGGCC GAGGACCCACCCGCGGCCGAGGACCCTGACGAGTACCTCGCC GAGAACGTCCTTCTGGGTGCCGAAGGAAGCGCGCTGGTCCGAT CTCCAGGCCAGCGCACGCCAGACCGCCATCGGCAAGATCATC GACGACGCCATGGCGGCATCGAGGAGCACAACCCCGGCCTC AAGGGTGTGCTTCCGAAAGACTACAACCGCCCCGCCCTCGAT AAGGTCATGCTGGGCGAGCTGATCGACCTGATCTCAGGCATC GCCACCGGGGAGCCGGGCGGCGCCGGAAGGACCTGCTCGGC CGGGTTTATGAATACTTCTCGGCGGCTTCGCCGGATCGGAAG GCAAGCGCGGCGGCGAGTTCTACACCCCTCGCTCCGTTCGTGCG GGTGCTGGTCGAGATGCTGGAGCCCTATAAGGGCCGGGTCTA CGACCCCTGCTGCGGCTCGGGCGGGATGTTTCGTGCAGTCGGA GAAATTCGTGGCCGAACATGGCGGGCGGATCGGCGATATCGC GATCTACGGCCAGGAGAGCAATTATAACCACTGGCGCCTGGC GAAGATGAATCTGGCGGTGCGCGGCATCGACGCCGACATCCG CTGGAACAATGAGGGCAGCTTCCACAAGGATGAGTTGAAGGA TCTGCGCTTCGACCACATCCTGGCCAACCCGCCCTTCAACATC TCCGACTGGGGCGGGGAGCGCTTGCGGGAGGATGCGCGCTGG GTGTTCCGGTGCGCCGCCCGCAGCCAACGCCAATTATGGTTGGC TGCAGCACATCTGGTGGCACTTGGCTCCTGGTGGTGCCGCCGG CGTAGTGCTGGCCAATGGAGCTCTAACGTGCAATCAATCTGGC GAAGGTGAAATACGTAAGGCATTACTGGAAGCTGATGCGCTG GACTGCATCATATCGCTGCCAGCGCAACTTTTTTACTCAACGC AAATTCCC GCGAGCCTTGGTTCTTGGCTCGCGACAAGGCCCC TCCGGGTTGGCGGAAACGCAGCGGCTCTATGTTGATGATTGAT GCCC GCAAATGGGAGGGCTTGTGATCGCACCCGCCGCGAA CTCGCGGACGATGAGATTGAGCGCATCACTTCAACGTATCAC GCTTGGCAAGGGCGGCCAGGCGCAAAGCCGTATAACCGATGTA CTAGGCTTTTGCCGCTCGTGCTCGATAAGCGAGGTTTCGCGAGC ATCACTATGCTTTAGTTCCC GCGCTACGTGGGGTTTCGAACC GGTGCCGCTCGACCAGCCCGGTTGGAGGGCATAACGAGCGGA GTTTACCGAAGCGATAGACGCGGTGCTTGCATTTGCAAGTGAC</p>	11

	TTAGAAACATCGGCAGCGCGTCTCAGGGATGCTCTCAATGGCTAG	
RM-C	ATGTCAGACTCAGATGCCGACGTCGCGGCCCGCCTTGCATAC TCGAAGAACGCACCAAGCCGAAGTCGAAGAACTGGATGGATT ACATCAAGGATTGGTCCGGCCTCATCAGCGCGCTTGTGGTGAT CGGCATCAGCTACCCTATCGGGGCTGGAACCTTTCATCGTA TCGCCAAAAGCGAAGGTGGAAAGCGAGGTCCAGCAGCTTCGC GATGTCGTCCTACAGCTTCCGACCTGGAGGCACGCTATGCAC AGTACTATTCGGGCATCAGGGAACCACAACCTGAAAAGCTTCT ATTCTAATGCCATGGGGTCACAGCGCTCAGCCATCATTGCACG CTCCCTAGAACTACTGAAGAAGCGCCACTCGGCACTGACCGT GCAGGAAGAGGTCTTGCTTGGGTATAATCTTGGCCAAGCCGG TCTCTACGATGATTCCGACAAAGTGCTCCGGAGCGCCCAGAA CAAGGCAATCGAGCACAACCTCATCCCAGCTTATCCAGCTCGTC GCAGAAACACACCGGCTGCAAGGCATGTCATATTCGACCCGG GGTGGAGCCGACCAGAAGGCCAAGACCAGGGCCGCTTATGCG GCAAGCATTCACCTTCTGCTCGCGATGGATGGCGATGCTCCTC GGCTTCAGGCGGCCAACACTGCTTTCGAATGGTCGCTCATCGA GTTACGTCAAGGCGATCAGCTTTGTGGCGAGAGGCTGGCGCA GTGGGCTCGCCAGACACTCGACCGGCTTCGCATGATCGGTCCA GCCGCTGCGGACATGCTGGCGACCTACGAAGACCTTCCAGA CGTGTCAATCCCGCCGACACCCTGAGCCGCGATGGCTGTCCGG CGACGGAAACCGAATGGCTCCAGAGCTAG	12

[0155] Два набора праймеров идентифицировали для каждого штамма и праймеры группировали вместе для мультиплексирования ПЦР и последующего секвенирования по Сэнгеру, а также проверки каждого штамма (данные не показаны). Праймеры, используемые в каждом мультиплексном анализе, перечислены в **таблице 4**. Включенные реагенты для амплификации: Platinum Taq от компании ThermoFisher в соответствии с предложениями производителя в общем реакционном объеме 25 мкл со всеми 6 праймерами со всей гДНК из каждого из 3 штаммов. Амплификацию выполняли в следующих условиях цикла: (а) 96 градусов Цельсия в течение 3 минут; (b) 30 циклов (i) 94 градуса Цельсия в течение 30 секунд; (ii) 60 градусов Цельсия в течение 30 секунд и (iii) 72 градуса Цельсия в течение 75 секунд; (c) окончательное расширение до 72 градусов Цельсия в течение 3 минут и (d) удерживание 4 градусов Цельсия.

Таблица 4.

Штамм	SEQ ID NO:	Последовательность	Размер продукта ПЦР	Мультиплекс
RM-C	13	TCGGCATCAGCTACCCTATC	623 п. о.	1
	14	AAGCCGGTTCGAGTGTCTG		1
RM-A	15	TCCTAACTGTCCAGGGTTGG	887 п. о.	1
	16	AATCTCGGCCATAAATGCAG		1

RM-B	17	GAATCAATCTGGCGAAGGTG	377 п. о.	1
	18	GGCCGGGAАCTAAAGCATAG		1
RM-C	19	TCCTACAGCTTTCCGACCTG	655 п. о.	2
	20	CTCTGGAGCCATTCGGTTTC		2
RM-A	21	GGCTCTGTGGAAGTCAAAGG	832 п. о.	2
	22	TGTAАAAGCGGAGGCAАAAG		2
RM-B	23	GGCAGGACGACACTTACTGG	339 п. о.	2
	24	CCAGCGAGATGTGCTTTAGG		2

Пример 9

Введение консорции *R. mucosa* взрослым и педиатрическим субъектам

[0156] Исследование проводили с участием субъектов для сравнения введения консорции *R. mucosa* изолятов RM-A, RM-B и RM-C (полученных в примере 7 и охарактеризованных в примере 8) с плацебо у субъектов, имеющих атопический дерматит (AD).

[0157] А) *Субъекты.* Значения SCORAD (установленный алгоритм оценки атопического дерматита) определяли с использованием стандартных подходов. Наблюдали пораженные участки поверхности и интенсивность заболевания. Субъекты предоставили субъективные оценки зуда и нарушения сна. Чтобы соответствовать критериям включения, субъекты должны иметь значение SCORAD 10 или выше, иметь заболевание в области антекубитальных ямок и/или предплечий и ранее пытаться проходить стандартную терапию. Значения специфической для антекубитальной области SCORAD получали путем прибавления значений интенсивности для антекубитальной области (оценки 0-3 для сухости, эритемы, отека, выделения, эксфолиации и лихенификации) к сообщаемой субъектом субъективной оценке (оценке 0-10) для зуда антекубитальной области. Брели мазки из антекубитальной ямки на наличие грамотрицательных бактерий, как описано ранее. Нагрузку *S. aureus* и CNS определяли путем откручивания на вортексе тампонов в 2 мл трипсинового бульона (Remel) в течение 30 секунд и высеивания 100 мкл на чашки с кровяным агаром (Remel). На следующие сутки количество колоний подсчитывали и умножали на 20, чтобы получить суммарное количество КОЕ в собираемом объеме 2 мл, а затем усредняли значения для обеих рук. Относительную представленность *S. aureus* получали путем деления количества колоний *S. aureus* на количество колоний CNS. Субъекты имели возраст 18 лет и старше (взрослая когорта) или возраст 7-17 лет (педиатрическая когорта); (b) значение SCORAD по меньшей мере 10; (c) имели поставленный врачом диагноз AD с активным поражением антекубитальной ямки; (d) были готовы разрешить хранение крови для будущего исследования; (e) характеризовались

отсутствием в анамнезе других кожных заболеваний; (f) начинали или пытались использовать стандартную терапию по меньшей мере за 6 месяцев до включения в исследование; и (g) давали согласие на использование адекватных контрацептивов, если показано. Основными конечными точками были (a) частота сообщаемых и несообщаемых нежелательных явлений, серьезных нежелательных явлений и смерти; и (b) сокращение на 50% регионального или суммарного SCORAD. Вторичными конечными точками (применимыми только к педиатрической когорте) были (a) 30% улучшение индекса качества жизни при заболеваниях кожи у детей (CDLQI); и (b) улучшение на 30% индекса качества жизни при семейных заболеваниях кожи (FDLQI).

[0158] *B) Введение дозы и нанесение.* Выбирали дозы дважды в неделю из-за медленного роста *R. mucosa* и желания избежать нанесения новых бактерий до того, как предыдущая доза достигнет стационарной фазы роста. Взрослые больные получали флаконы по 2 мл стерильной воды (Wheaton). Взрослых обучали аспирировать 800 мкл воды с помощью шприца объемом 1 мл (BD Bioscience). 800 мкл воды инъецировали во флаконы с лиофилизированными бактериями, пробку заменяли и флаконы осторожно встряхивали в течение приблизительно 1 минуты. Затем больные аспирировали 200-250 мкл восстановленного бактериального раствора и помещали наконечник распылителя на шприц (MAD300, Teleflex). Раствор распыляли на антекубитальную область/область предплечья одной руки, а затем повторяли на противоположной стороне. Субъектам разрешали использовать оставшиеся 300-400 мкл раствора на дополнительных участках поверхности тела при условии, что они документировали, какие участки обрабатывали. Всего субъекты осуществляли 1 нанесение два раза в неделю в течение 6 недель. В течение первых 2 недель больные восстанавливали флаконы с концентрацией 10^4 КОЕ/мл; поэтому нанесение 200-250 мкл соответствовало лечебной дозе от 2×10^3 до $2,5 \times 10^3$ суммарных бактериальных колоний на площадь поверхности. После того, как было выполнено дистанционное наблюдение, чтобы убедиться в отсутствии осложнений лечения, больные переходили к 2 неделям лечения от 2×10^4 до $2,5 \times 10^4$ бактериальными колониями на площадь поверхности, затем, наконец, от 2×10^5 до $2,5 \times 10^5$ суммарными бактериальными колониями на площадь поверхности.

[0159] Педиатрическим субъектам предоставляли лиофилизированные бактерии в автономной распылительной системе (Discount Vials). Предоставляли пипетки (United States Plastic Corp) с 1,5 мл стерильной воды. Для каждой дозы больных или их родителей инструктировали наполнять содержимым пипетки флакон с распылителем, ждать 2-5 минут для восстановления, а затем распылять. Распылители дозировали таким образом, чтобы 3 нажатия на помпу соответствовали 250 мкл, наносимым в испытании с участием взрослых.

Дозовые концентрации КОЕ/мл были идентичны введению дозы для взрослых. Как и взрослые, педиатрические субъекты получали лечение два раза в неделю в течение первых 3 месяцев лечения, затем через сутки в течение последнего месяца. Повышения дозы производили каждые 4 недели после оцениваний безопасности.

[0160] С) Консорция *R. mucosa* была связана с клиническим улучшением и безопасностью у взрослых. Растворы сахарозы, содержащие возрастающие дозы живой *R. mucosa*, наносили местным путем дважды в неделю в течение 6 недель с последующей 4-недельной фазой вымывания (фиг. 11А). 10 взрослым субъектам предоставляли достаточные объемы для местного нанесения на их антекубитальные ямки с двух сторон и один дополнительный участок поверхности тела по их выбору. Степень тяжести АД оценивали с использованием шкалы SCORAD. Среди учитываемых в исследовании культур в антекубитальной ямке у субъектов не выявляли грамотрицательные бактерии.

[0161] Лечение было связано со значительным снижением объективной интенсивности (фиг. 11В), субъективного регионального зуда (фиг. 11С) и специфического для антекубитальной ямки значения SCORAD (фиг. 11D). Субъектов инструктировали соблюдать свои домашние режимы на протяжении всего активного лечения. Однако к концу фазы вымывания щадящие стероидные эффекты лечения с помощью *R. mucosa* были очевидны (фиг. 11Е). Некоторые субъекты испытывали ответы на обработанных (но не необработанных) участках за пределами антекубитальной области (данные не показаны), что указывает на то, что любой пассивный перенос с обработанных на необработанные участки был недостаточен для выработки ответа. Ответы на обеих сторонах были равными при обработке поверхностей с двух сторон (данные не показаны). Обработка рук не была связана с клинической пользой, даже у субъектов с улучшением антекубитального участка (данные не показаны).

[0162] D) Консорция *R. mucosa* была связана с клиническим улучшением и безопасностью у детей. 5 педиатрических субъектов (в возрасте 9-14 лет) проходили оценивание по аналогичной программе (фиг. 12А). Как и во взрослой когорте, запрашиваемых или незапрашиваемых нежелательных явлений не наблюдали. В дополнение к запрашиваемым явлениям для взрослых субъектов оценивали ухудшение значения SCORAD (увеличение площади поражения на > 20% после включения в исследование) и ухудшение в отношении зуда (увеличение показателя зуда на > 20% по сравнению с таковым на момент включения в исследование). Лабораторные значения общего анализа крови с дифференциалом, химической панелью, печеночными ферментами, минеральной панелью, а также скоростью оседания эритроцитов и С-реактивным белком отслеживали для педиатрической когорты и

не выявляли никаких неблагоприятных изменений (данные не показаны). В объединенной когорте можно было выявлять нежелательное явление с истинной частотой 10%.

[0163] Педиатрическую когорту лечили два раза в неделю в течение 16 недель и обеспечивали достаточно раствора для лечения всех пораженных участков поверхности тела. Подобно региональным данным для взрослых, лечение педиатрических субъектов было связано со значительным снижением значения SCORAD (**фиг. 12B-12C**), зуда (**фиг. 12D**) и использования стероидов (**фиг. 12E**). Кроме того, в соответствии с данными взрослых и отраженными в суммарном значении SCORAD лечение за пределами антекубитальной области также было связано с улучшением (данные не показаны). Все педиатрические субъекты были колонизированы *S. aureus* (**фиг. 12F**). Лечение было связано со снижением культуральной нагрузки *S. aureus* (данные не показаны) и доли *S. aureus* по сравнению с коагулазоотрицательными стафилококками (CNS) как в антекубитальной (**фиг. 12F**), так и в подколенной ямках (данные не показаны).

[0164] Десять из объединенных 15 (66,7%) субъектов достигли порога улучшения более чем на 50% регионального или суммарного значения SCORAD ($P = 0,016$). Объединенное среднее улучшение для когорты составляло 63,9%; среднее улучшение в отношении респондеров составляло 84,1%, а среднее улучшение в отношении частичных респондеров и нереспондеров составляло 21,7%.

[0165] Принимая во внимание множество возможных вариантов осуществления, к которым могут применяться принципы нашего изобретения, следует учитывать, что проиллюстрированные варианты осуществления являются исключительно примерами настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:
по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa*, при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3; и
фармацевтически приемлемый носитель.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.
4. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.
5. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.
6. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-A, RM-B или RM-C.
7. Фармацевтическая композиция по п. 6, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-A.
8. Фармацевтическая композиция по п. 6, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-B.
9. Фармацевтическая композиция по п. 6, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-C.
10. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-A, RM-B или RM-C.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-A.

12. Фармацевтическая композиция по п. 10, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-B.

13. Фармацевтическая композиция по п. 10, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-C.

14. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* состоит из изолятов RM-A, RM-B и RM-C.

15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-14, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в суммарном количестве от 10^4 до 10^{12} колониеобразующих единиц.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-15, при этом фармацевтическая композиция находится в лекарственной форме для местного применения.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, при этом лекарственная форма для местного применения представляет собой крем, гель, пену, мазь, лосьон или жидкость.

18. Перевязочный материал, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-17.

19. Аэрозольный баллон, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-17.

20. Способ лечения атопического дерматита, предусматривающий введение местным путем субъекту, нуждающемуся в этом, по меньшей мере одного штамма *Roseomonas mucosa*, при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, и при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в количестве,

достаточном для лечения атопического дерматита у субъекта.

21. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем с помощью опрыскивания.

22. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем субъекту по меньшей мере два раза в неделю.

23. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем субъекту ежедневно на протяжении недели.

24. Способ по п. 20, при котором субъект представляет собой взрослого человека, ребенка или младенца.

25. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

26. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит изолят RM-A, RM-B или RM-C.

27. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* представляет собой изолят RM-A, RM-B или RM-C.

28. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* состоит из изолятов RM-A, RM-B и RM-C.

29. Способ по п. 20, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в суммарном количестве от 10^4 до 10^{12} колониеобразующих единиц.

30. Набор для лечения атопического дерматита, содержащий:

- a) контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-17;
- b) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель; и
- c) инструкции по нанесению фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем местным путем на кожу.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa*, при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12; и фармацевтически приемлемый носитель.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10.

33. Фармацевтическая композиция по п. 31, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11.

34. Фармацевтическая композиция по п. 31, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

35. Фармацевтическая композиция по п. 31, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

36. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 31-35, в которой по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в суммарном количестве от 10^4 до 10^{12} колониеобразующих единиц.

37. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 31-36, при этом фармацевтическая композиция находится в лекарственной форме для местного применения.

38. Фармацевтическая композиция по п. 37, при этом лекарственная форма для местного применения представляет собой крем, гель, пену, мазь, лосьон или жидкость.

39. Способ лечения атопического дерматита, предусматривающий введение местным путем субъекту, нуждающемуся в этом, по меньшей мере одного штамма *Roseomonas mucosa*, при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, и при этом по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в количестве, достаточном для лечения атопического дерматита у субъекта.

40. Способ по п. 39, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем с помощью опрыскивания.

41. Способ по п. 39, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем субъекту по меньшей мере два раза в неделю.

42. Способ по п. 39, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* вводят местным путем субъекту ежедневно на протяжении недели.

43. Способ по п. 39, при котором субъект представляет собой взрослого человека, ребенка или младенца.

44. Способ по п. 39, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

45. Способ по п. 39, при котором по меньшей мере один штамм *Roseomonas mucosa* присутствует в суммарном количестве от 10^4 до 10^{12} колониеобразующих единиц.

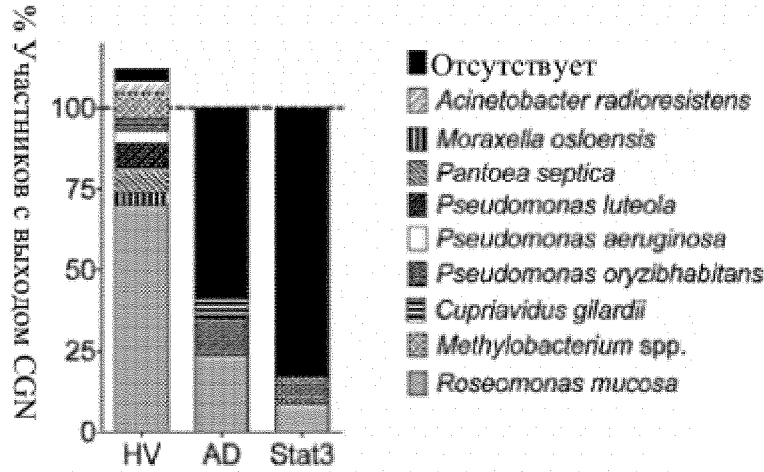
46. перевязочный материал, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 31-38.

47. Аэрозольный баллон, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 31-38.

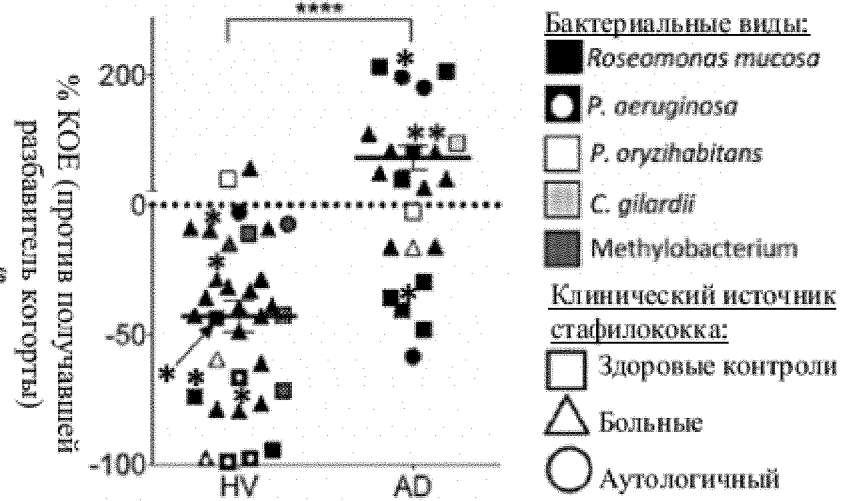
48. Набор для лечения атопического дерматита, содержащий:

- а) контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 31-38;
- б) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель; и
- с) инструкции по нанесению фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем местным путем на кожу.

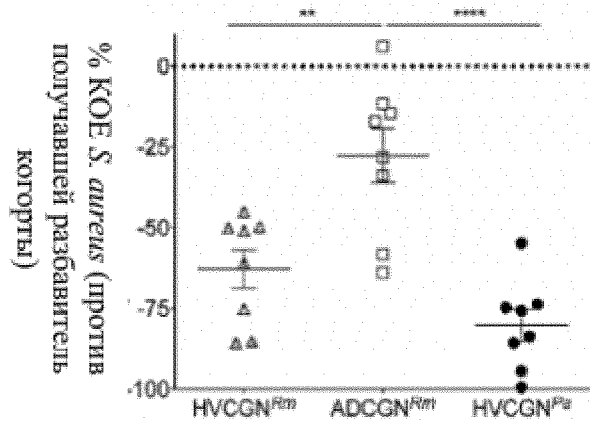
Фиг. 1А



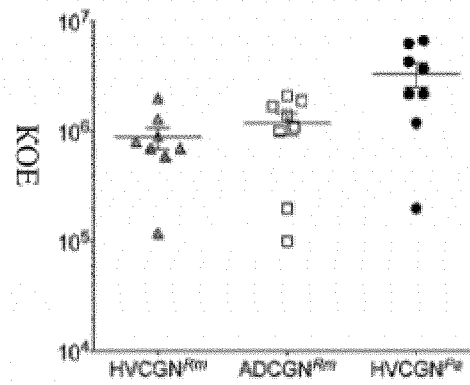
Фиг. 1В

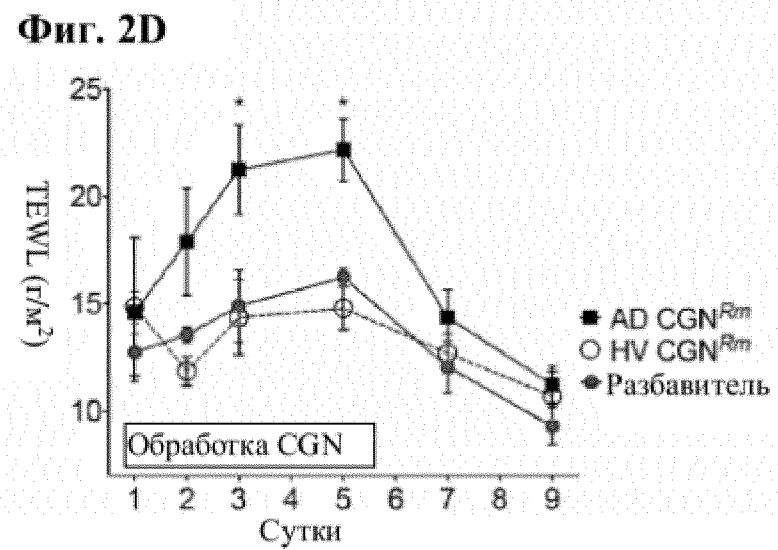
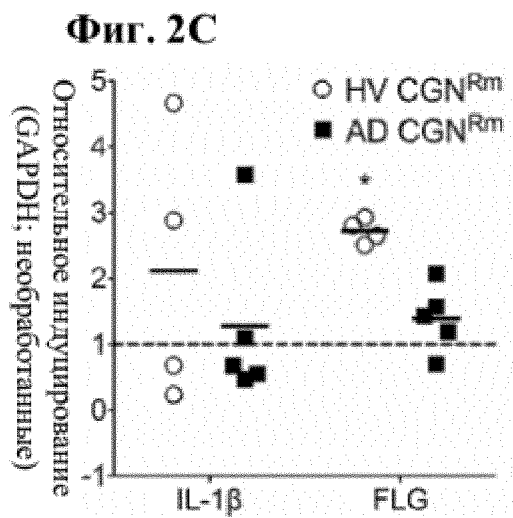
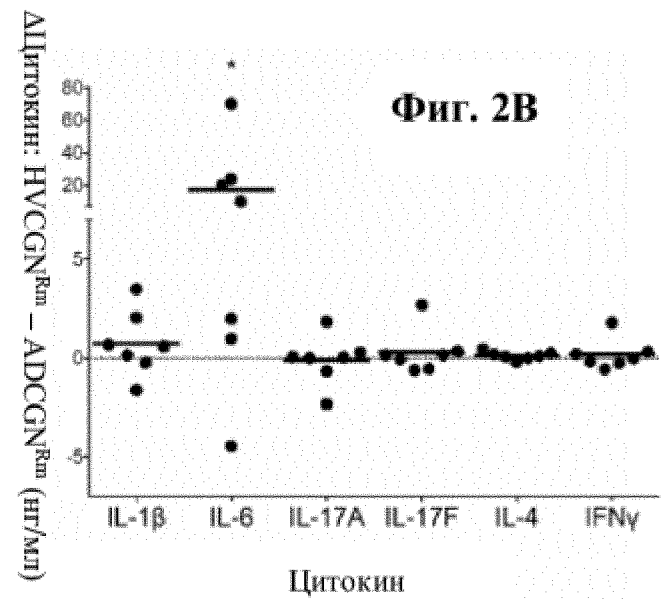
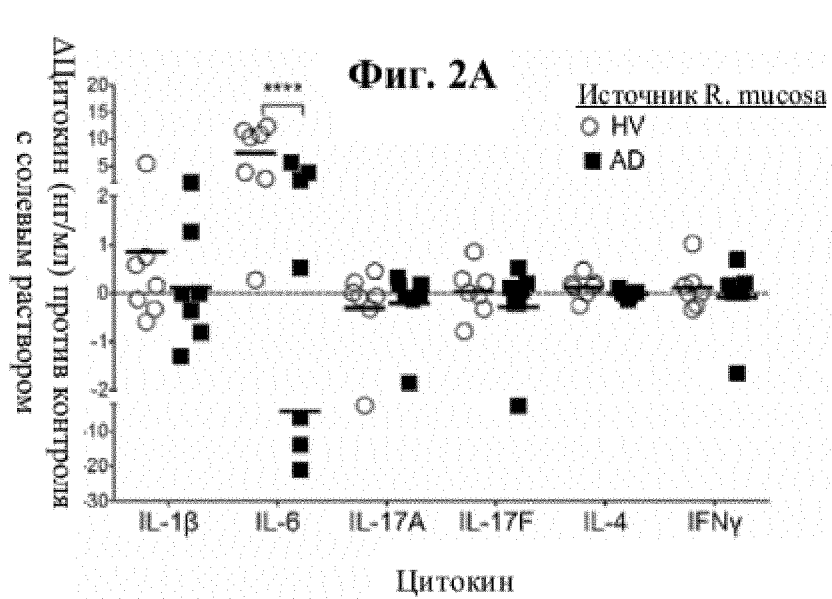


Фиг. 1С

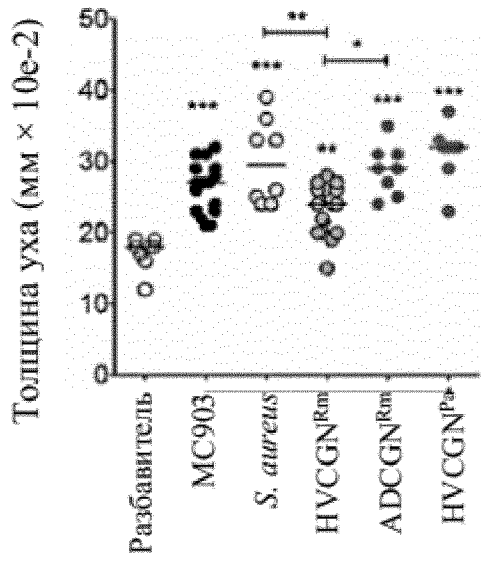


Фиг. 1D

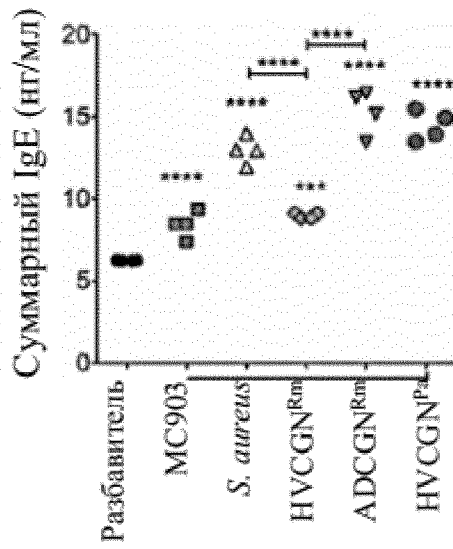




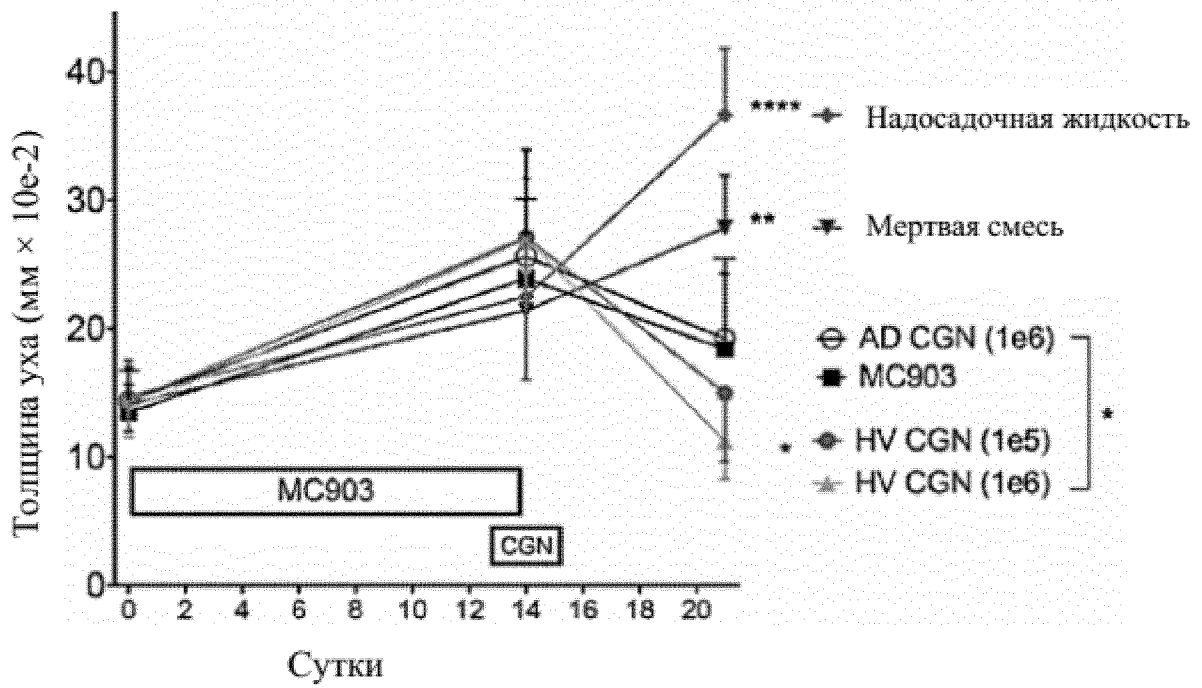
Фиг. 3А



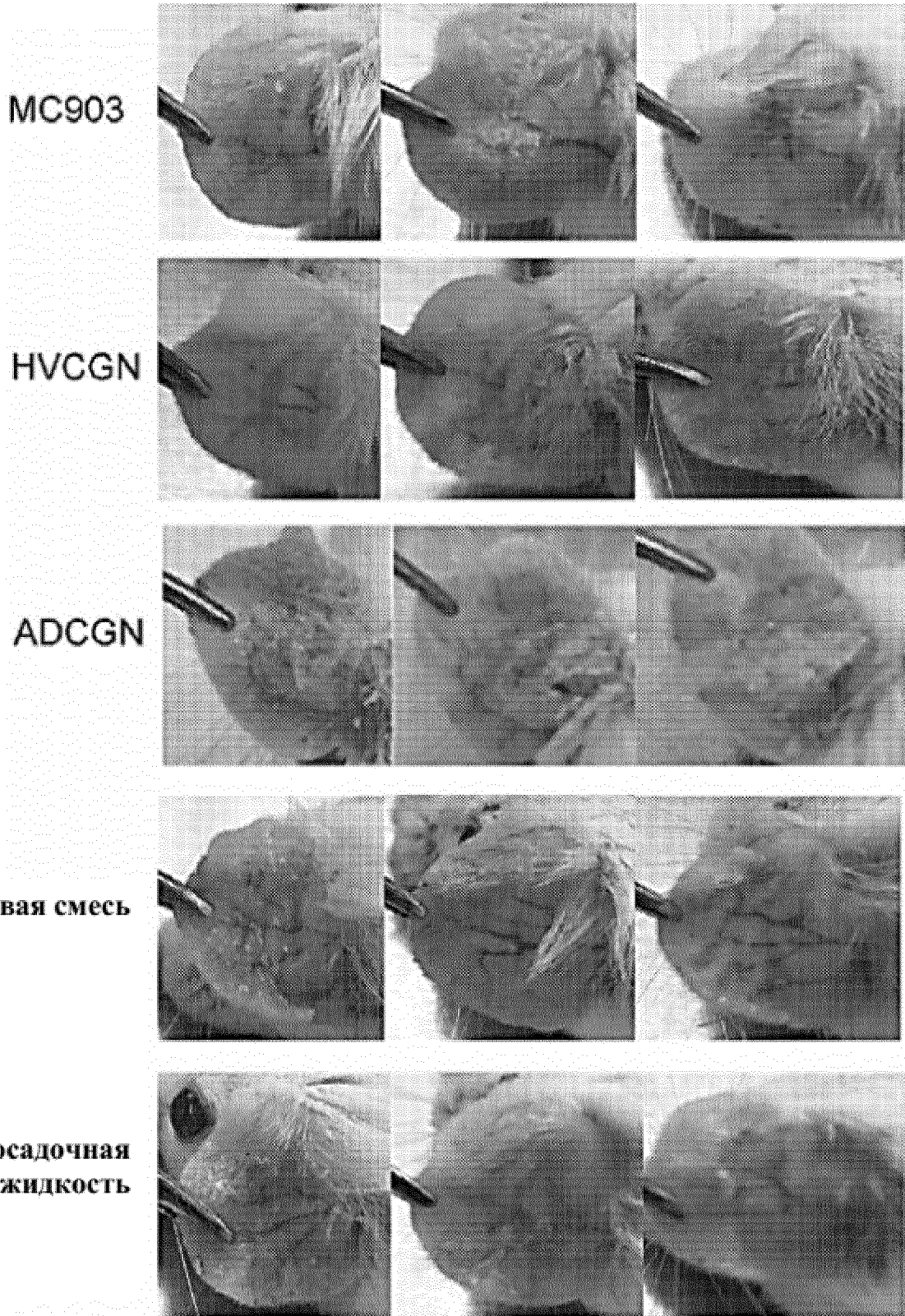
Фиг. 3В

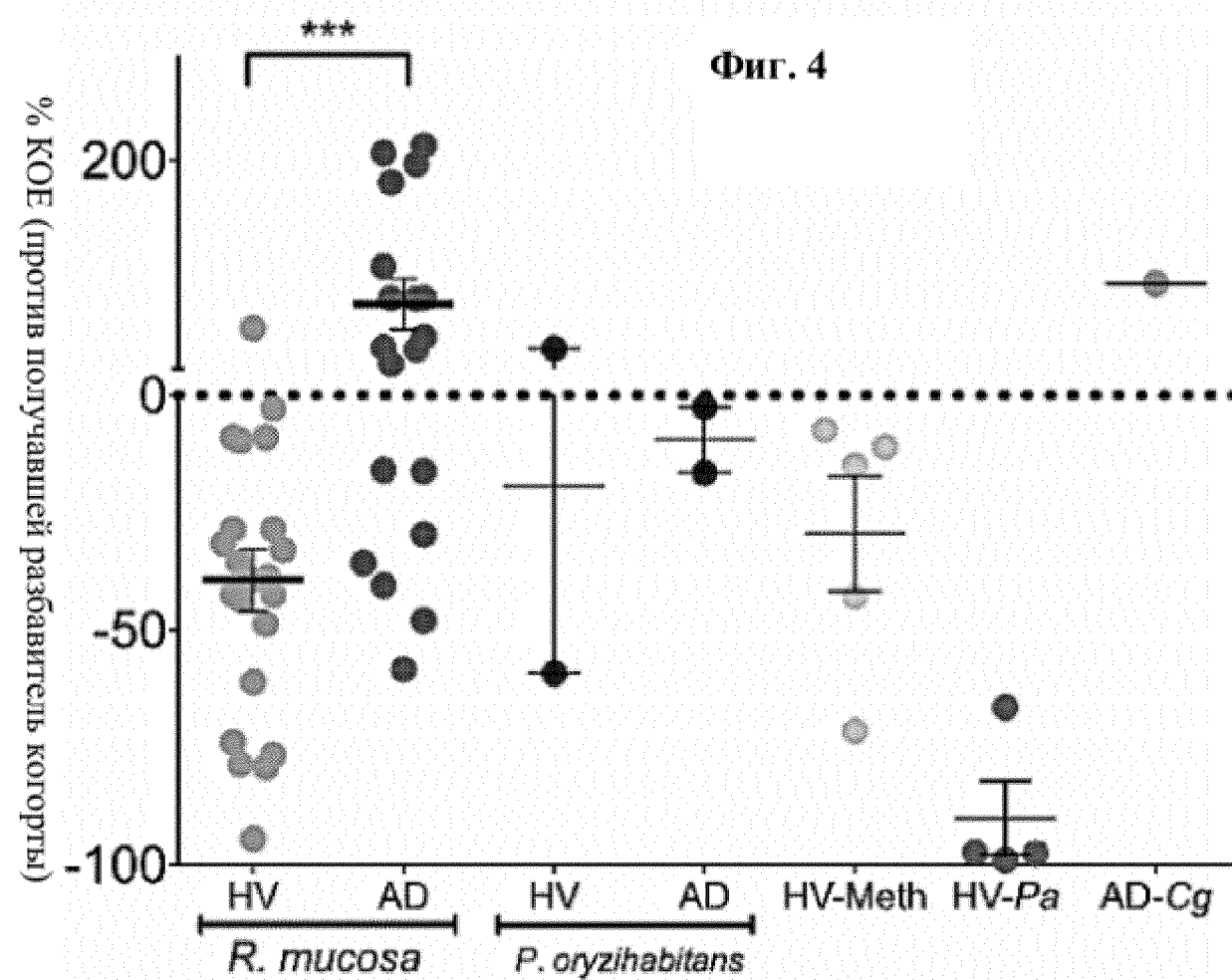


Фиг. 3С

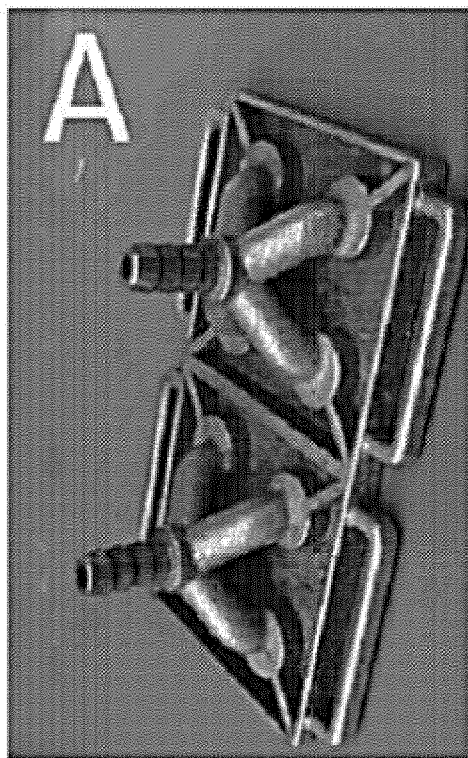


Фиг. 3D

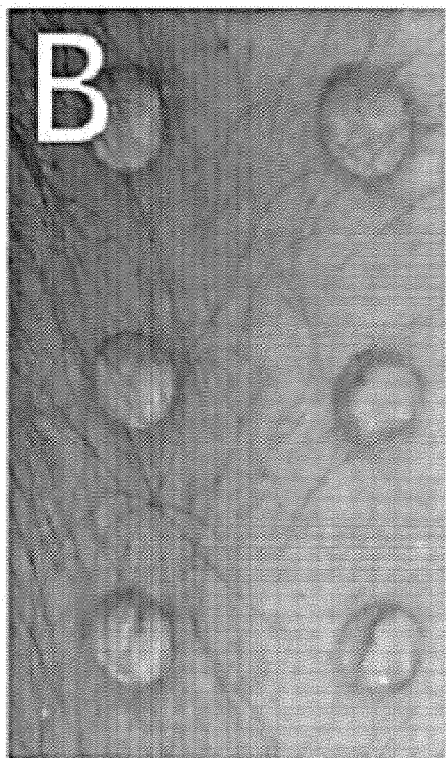




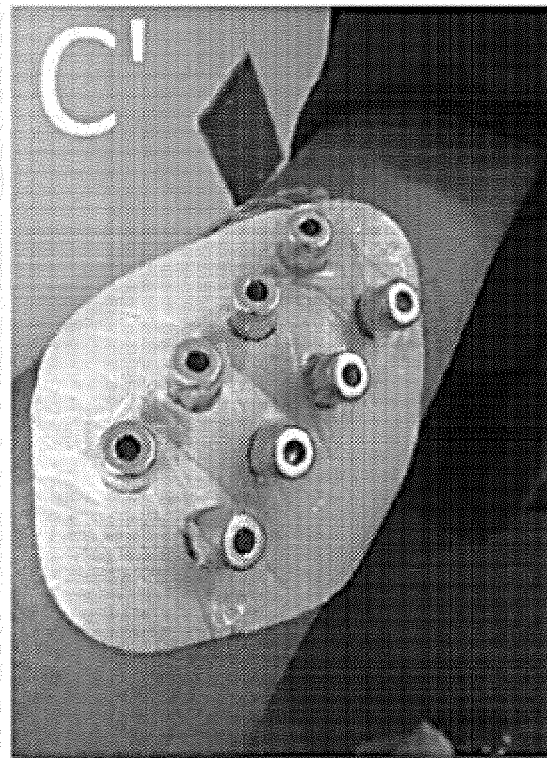
Фиг. 5А



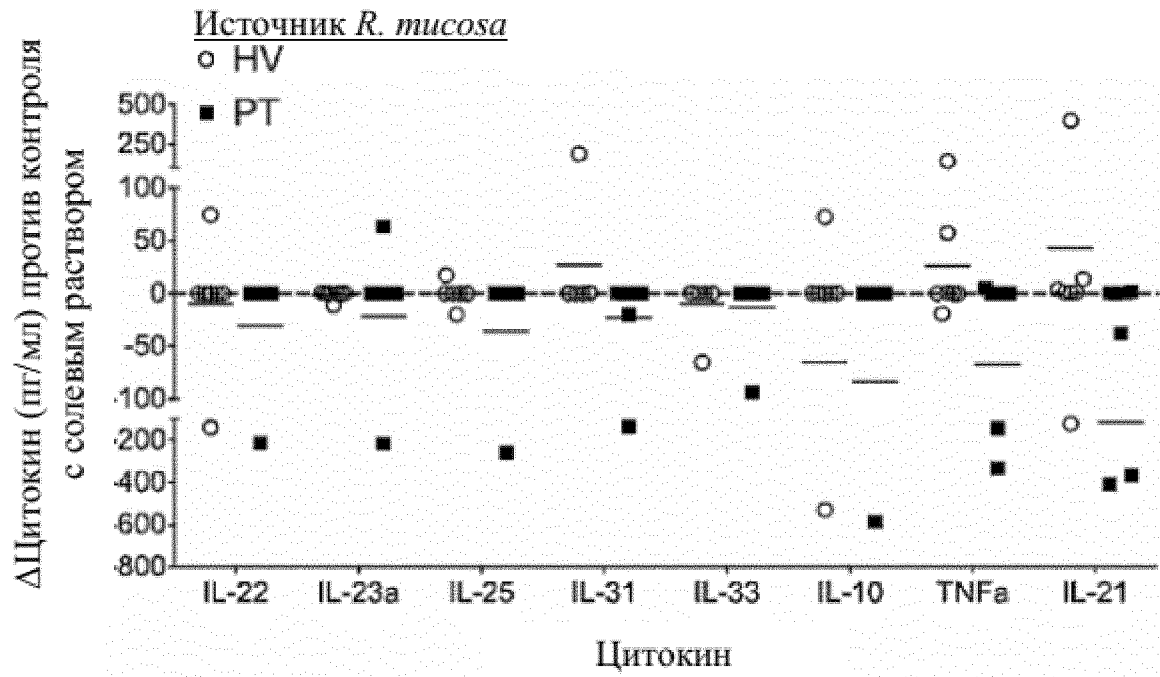
Фиг. 5В



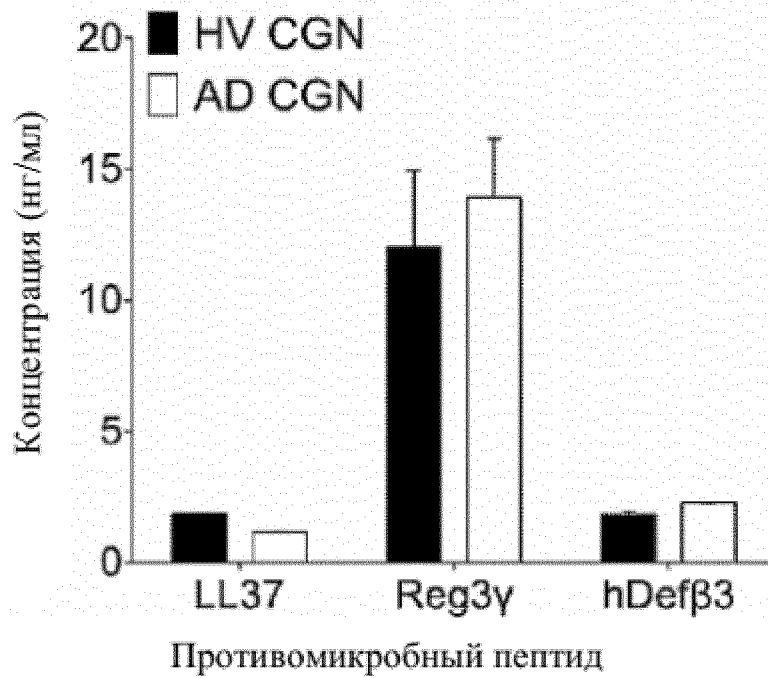
Фиг. 5С

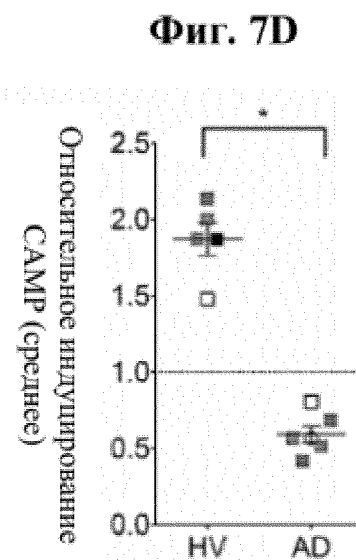
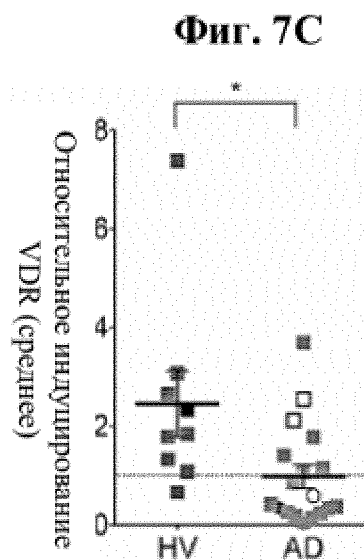
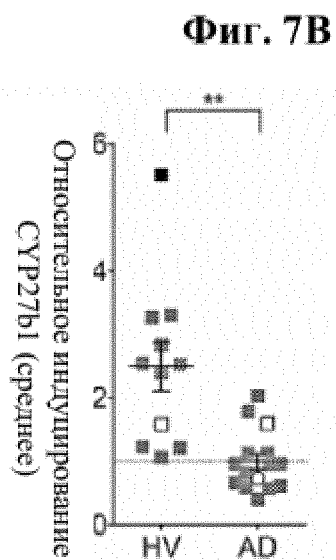
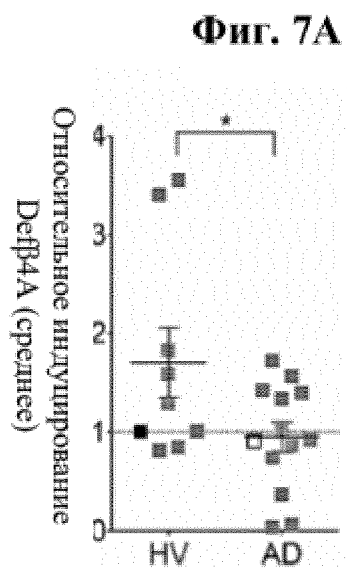


Фиг. 6А








Фиг. 6В

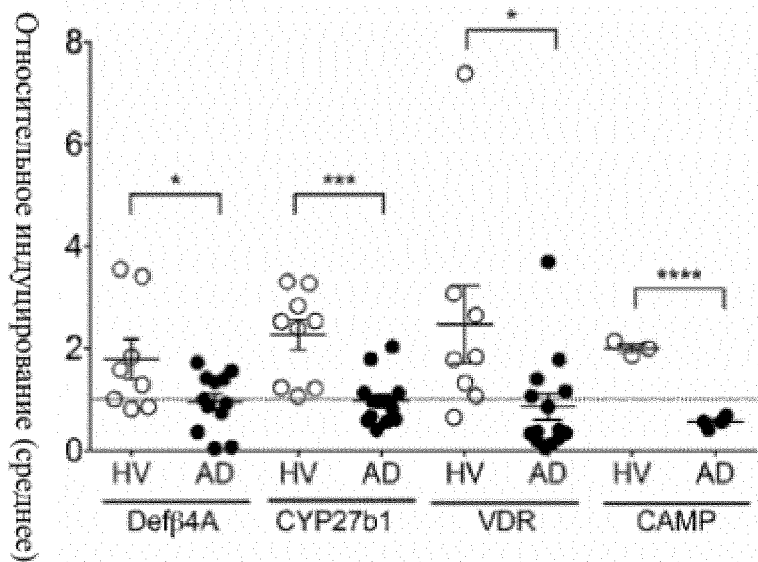




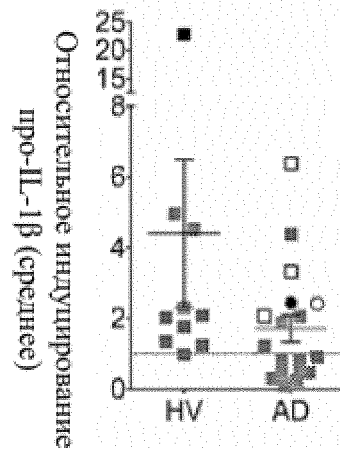
Бактериальные виды:

-  *Roseomonas mucosa*
-  *P. aeruginosa*
-  *P. oryzae*
-  *C. gilardii*
-  *Methylobacterium*

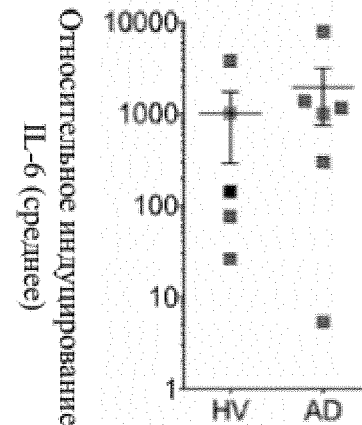
Фиг. 7Е








Фиг. 7F

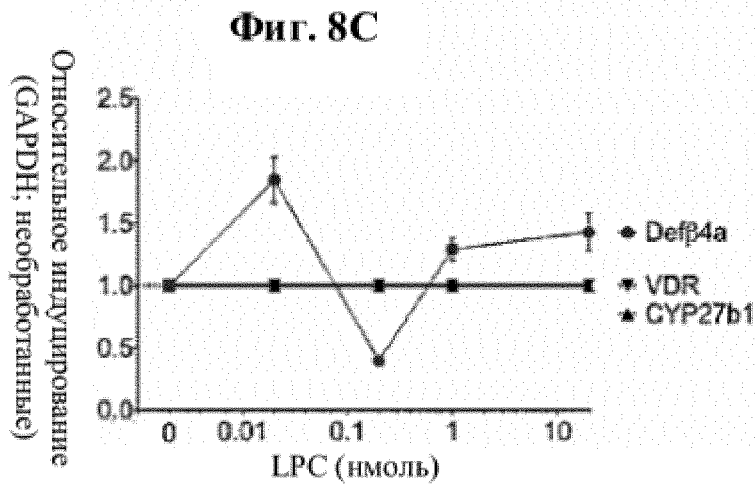
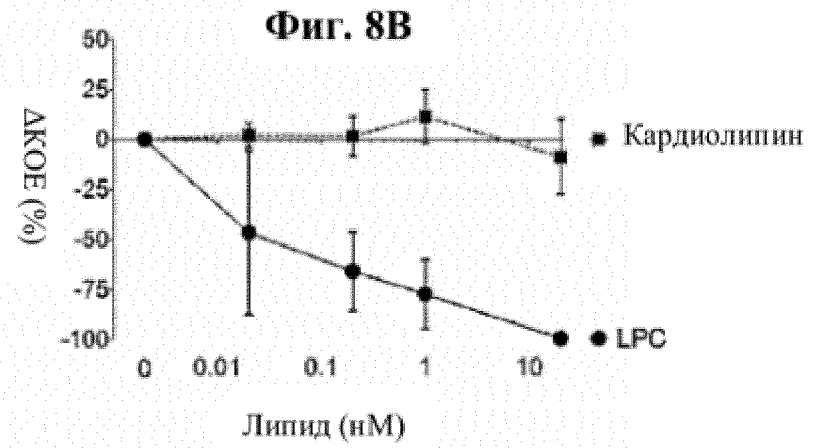
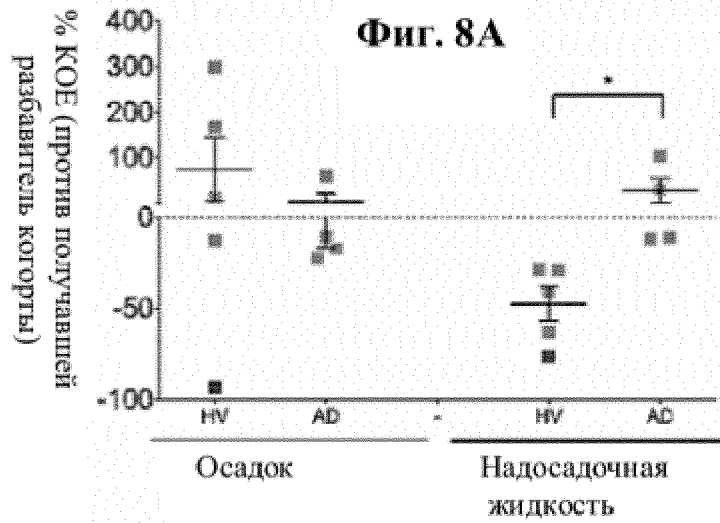


Фиг. 7G



Бактериальные виды:

-  *Roseomonas mucosa*
-  *P. aeruginosa*
-  *P. oryzae*
-  *C. gilardii*
-  *Methylobacterium*



Фиг. 9

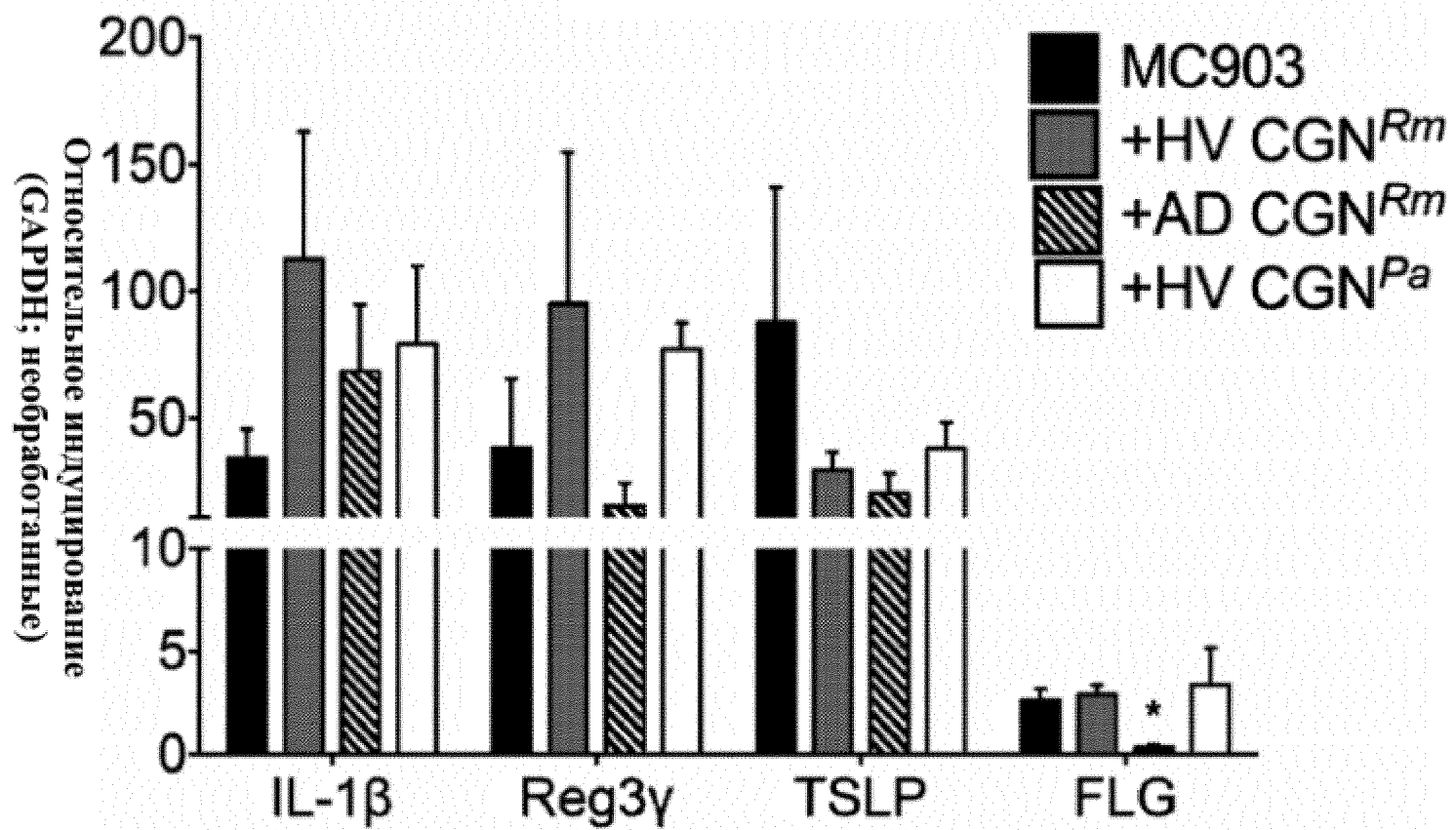
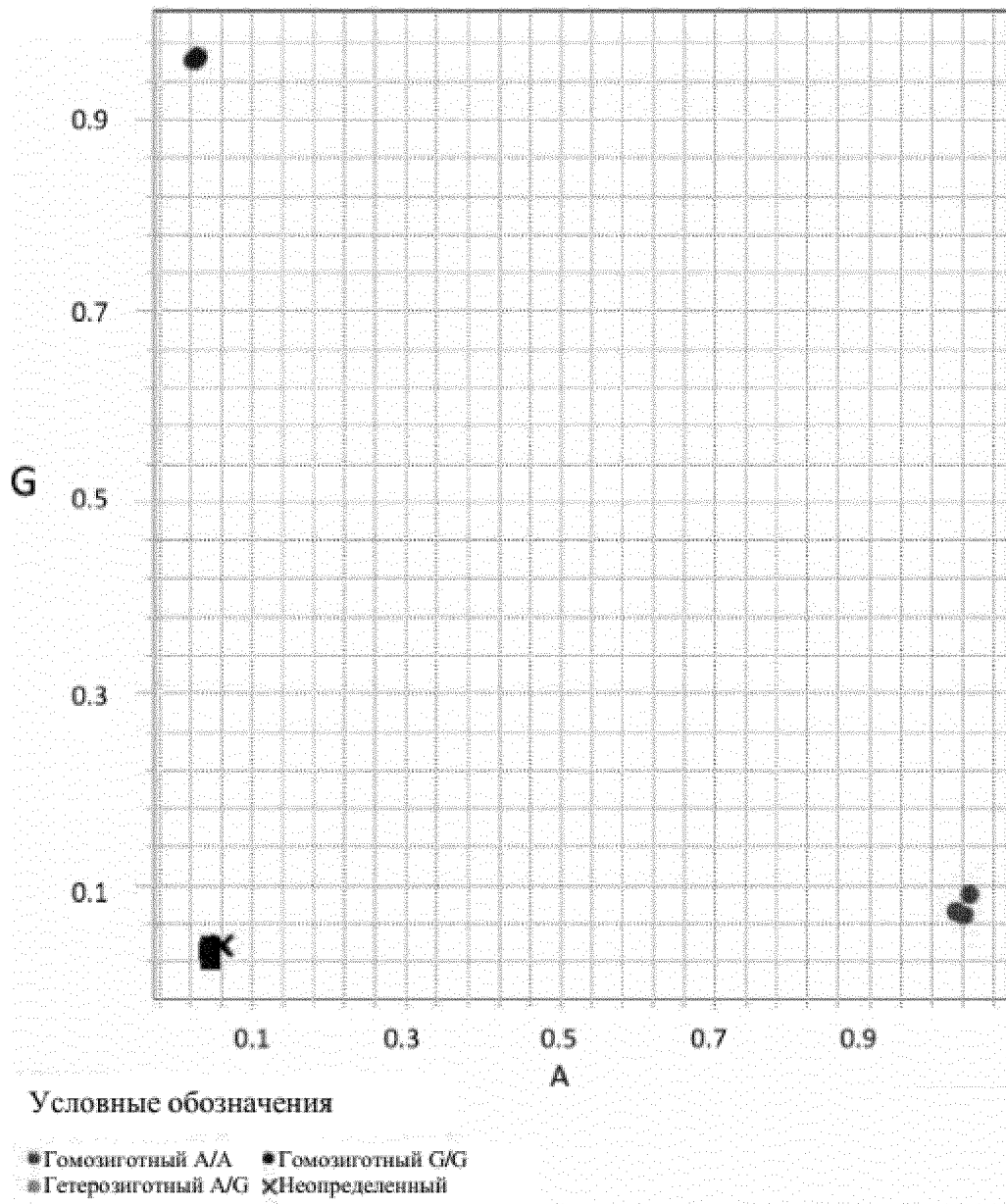
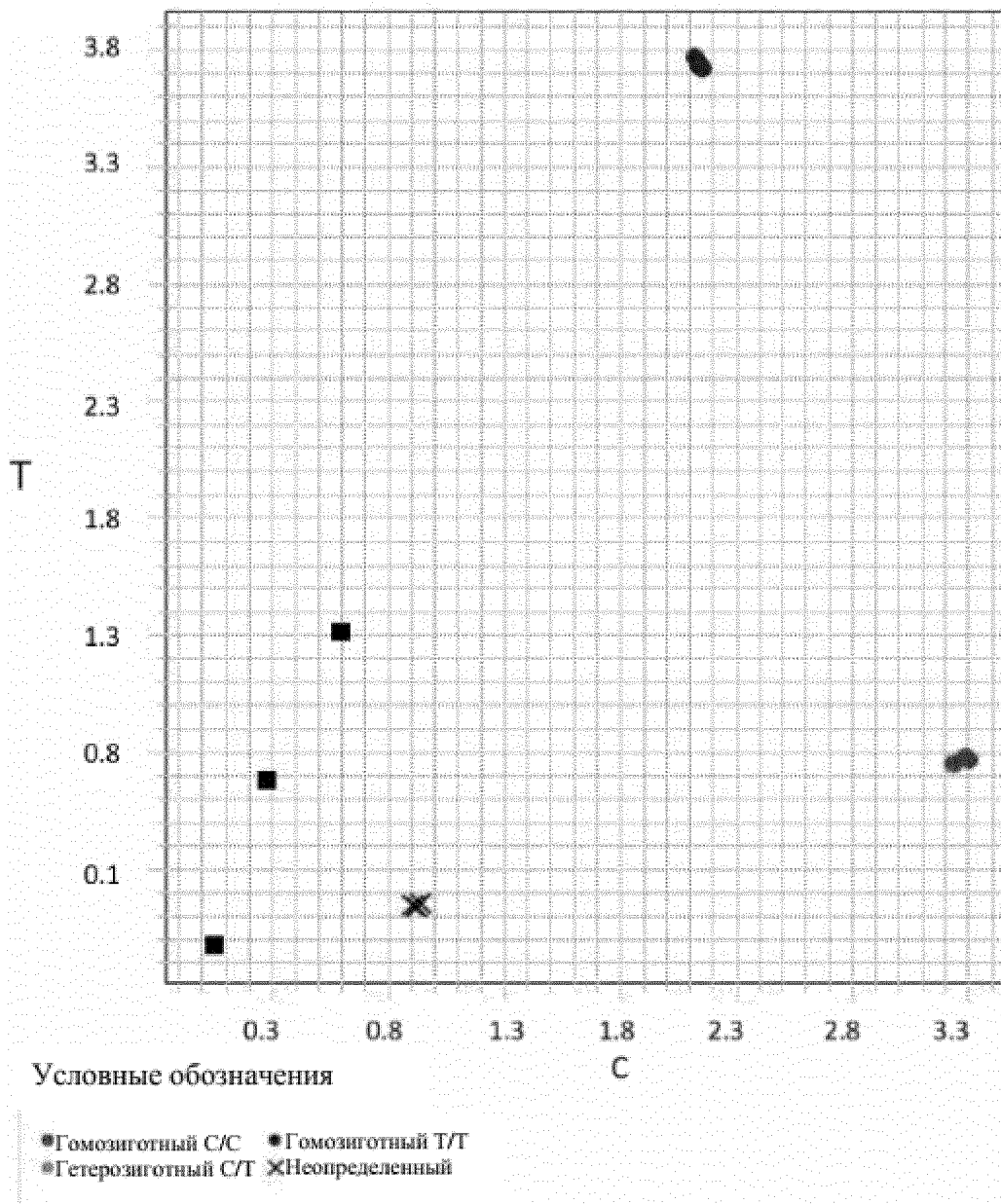


График аллельной дискриминации



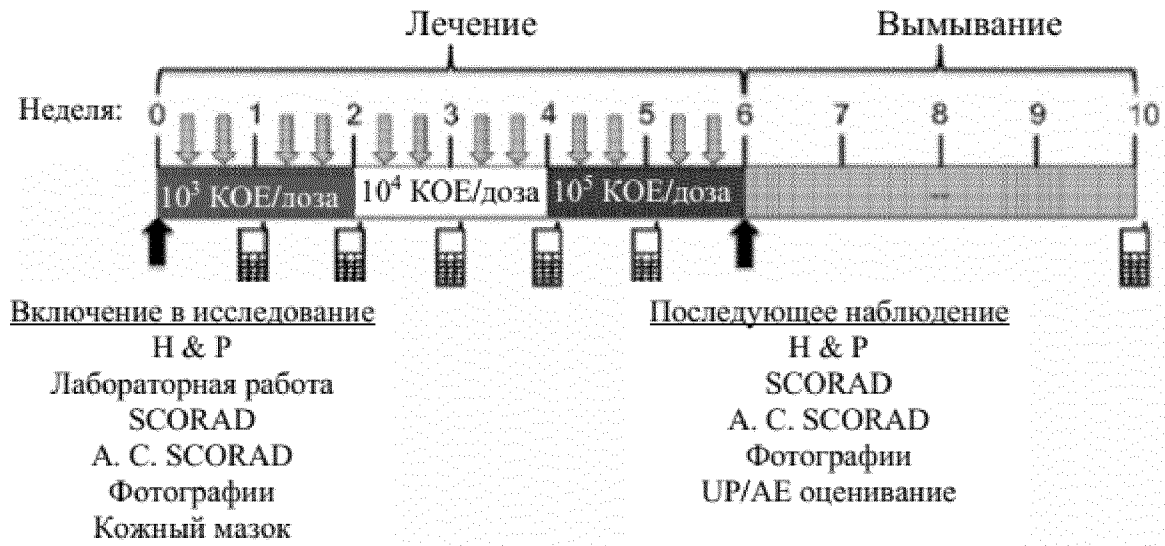
Фиг. 10А

График аллельной дискриминации

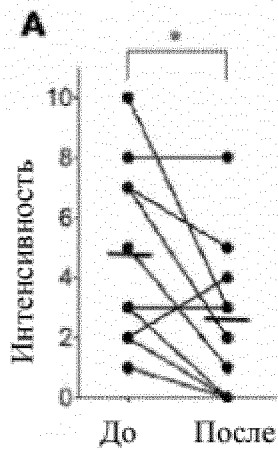


Фиг. 10В

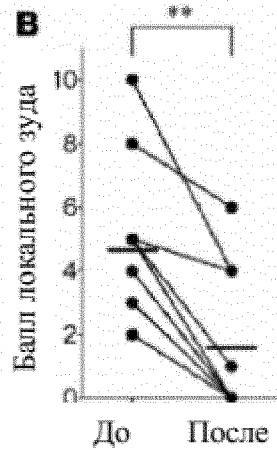
Фиг. 11А



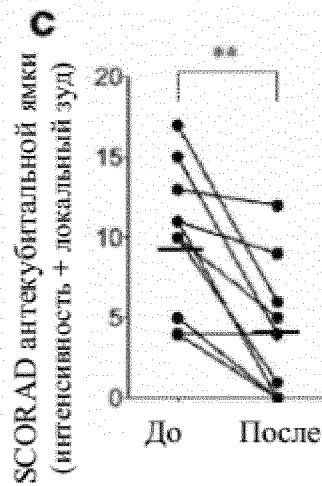
Фиг. 11В



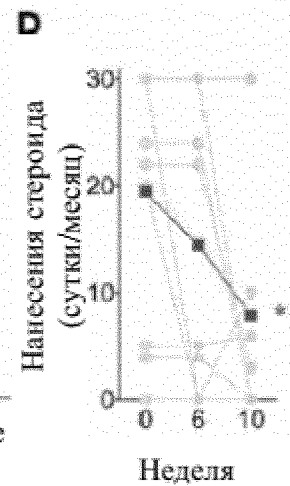
Фиг. 11С



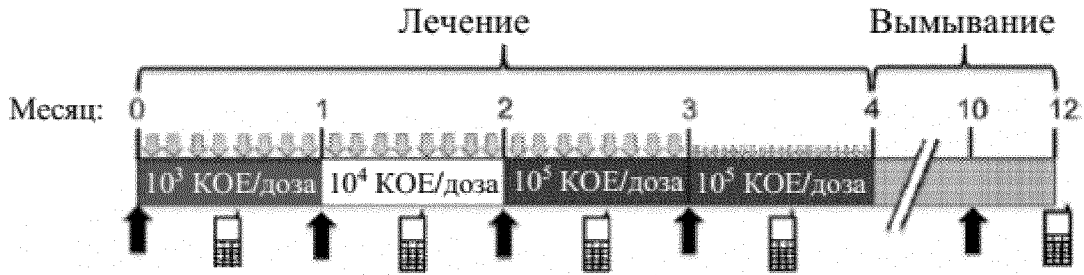
Фиг. 11D



Фиг. 11Е



Фиг. 12А



Включение в исследование

H & P

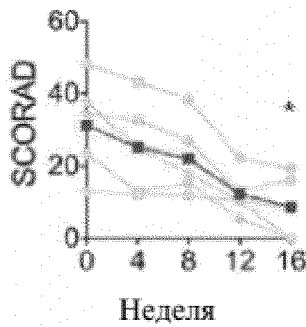
Лабораторная работа

SCORAD

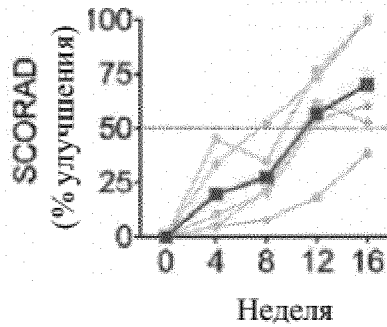
Фотографии

Кожный мазок

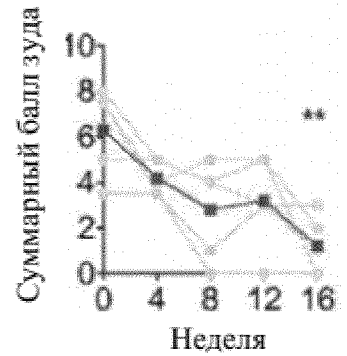
Фиг. 12В



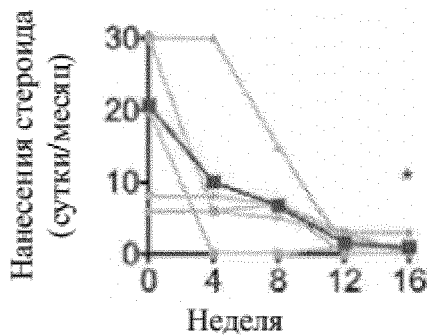
Фиг. 12С



Фиг. 12D



Фиг. 12Е



Фиг. 12F

