ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19)

المملكة المغربية
المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 34734 B1

(43) Date de publication :
03.12.2013

(51) Cl. internationale :
C12N 1/20; A61K 35/74; A61P 17/00; C12R 1/36

(21) N° Dépôt :
36009

(22) Date de Dépôt :
13.06.2013

(30) Données de Priorité :
22.12.2010 FR 1061081

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/EP2011/073747 22.12.2011

(71) Demandeur(s) :
- **UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6), 4, place Jussieu F-75005 Paris (FR)**
- **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), 3, rue Michel Ange F-75016 Paris (FR)**
- **PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE, 45 PLACE ABEL GANCE-92100 BOULOGNE-BILLANCOURT (FR)**

(72) Inventeur(s) :
LEBARON, Philippe ; BOURRAIN, Muriel ; CASTEX-RIZZI, Nathalie ; NGUYEN, Thien

(74) Mandataire :
CABINET PATENTMARK

(54) Titre : **NOUVELLE BACTÉRIE ET EXTRAITS DE LADITE BACTÉRIE, ET LEUR UTILISATION EN DERMATOLOGIE**

(57) Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle souche bactérienne isolée à partir de l'eau souterraine. L'invention concerne également des extraits bactériens et l'utilisation de ceux-ci dans le contexte du traitement d'inflammations. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouvelles compositions d'intérêt dans le traitement et la prévention de troubles inflammatoires, notamment des pathologies dermatologiques.

MA 34734B1

03 DEC 2013

PV. 36009

(بكتيريا جديدة ومستخلصات بكتيرية واستخدامها في الأمراض الجلدية)

الملخص

يتعلق الاختراع الحالي بسلالة بكتيرية جديدة معزولة من المياه الجوفية. يتعلق الاختراع أيضا بمستخلصات بكتيرية واستخدامها في سياق معالجة الإلتهابات. بوجه أخص ، الاختراع الحالي يتعلق بتركيبات جديدة ذات أهمية في العلاج والوقاية من الإضطرابات الإلتهابية ، الأمراض الجلدية بشكل ملحوظ .

(بكتيريا جديدة ومستخلصات بكتيرية واستخدامها في الأمراض الجلدية)

الوصف الكامل

المجال التقني:

يتعلق الاختراع الحالي بسلالة بكتيرية جديدة معزولة من المياه الجوفية. الاختراع يتعلق أيضا بمستخلصات بكتيرية واستخدامها في سياق معالجة الإلتهابات.

بوجة أخص يتعلق الاختراع الحالي بتركيبات جديدة ذات أهمية في العلاج والوقاية من الإضطرابات الإلتهابية ، الأمراض الجلدية بشكل ملحوظ .

الخلفية التقنية:

الأمراض الجلدية مثل التهاب الجلد الاستشرائي ، الحكة ، الأكزيما ، والصدفية تكثر علي نحو متزايد في الأطفال الصغار. قد تضاعف معدل إنتشار إلتهاب الجلد الإستشرائي مرتين أو ثلاث مرات في البلاد المتقدمة علي مدي الثلاثون عام الماضية. 15% الي 30% من الأطفال و2% الي 10% من البالغين مصابين (ويليامز. هـ. وآخرين ، JACI ، عام 2006 ؛ العدد 118 : صفحة 209 – 13). إلتهاب الجلد الإستشرائي هو مظهر من المظاهر الجلدية الإستشرائية ، وهو إلتهاب جلدي مزمن أو إكزيما ، تحدث نتيجة لمجموعة من الظروف محددة وراثيا. ويعتبر الأن بأنه مصدر قلق رئيسي علي الصحية العامة. وكثيرا ما يرتبط إلتهاب الجلد الإستشرائي مع الإضطرابات الإستشرائية الأخري مثل حساسية الأنف والربو. هذا التأثير غالبا يظهر أثناء مرحلة الطفولة المبكرة والتي تتميز بحالات تفشي متكررة علي مدار سنوات عديدة. أنه يتقدم مع إندلاع موجات العنف المتخللة المص العفوي .

نوعية الحياة للمرضي اللذين يعانون من إلتهابات الجلد الإستشرائي تضطرب بعمق .

تتضمن العلاجات المقبولة السيترويدات الموضعية وعوامل ضمن النظام المناعي ، والتي تحد من الأثار الجانبية المتكررة من الاستخدام الطويل الأمد. العلاجات الحالية تكون رد الفعل – معالجة التفشي – ولكن يعتقد الأن أن التدخل المبكر يزيد من السيطرة علي تفشي الأمراض والإلتهابات الجلدية ويمكن أن يكون مفيد سواء من حيث السيطرة علي المرض وإمكانية الظهور المحتمل للربو و / أو إلتهاب الأنف (بيبر ، ت. 2008 ، إلتهاب الجلد الإستشرائي ، مجلة نيو انجلند الجديدة الطبية ، مجلد 358 (14) ، صفحة 1483 – 1494) ، ويعتبر إلتهاب الجلد الإستشرائي كمرحلة أولي من مراحل تطور الإلتهاب الإستشرائي ، يتضمن العلاج مكونات محلية من أجل توفير أفضل إغاثة للمرضي .

العلاجات القياسية للإكزيما ولاسيما استخدام السيترويدات الموضعية أو المثبطة للمناعة ، علي الرغم من أن مثل هذه العلاجات ليست خالية من الأثار السلبية عند الأطفال علي وجه الخصوص .

إلتهاب الجلد الإستشرائي معقد ومتعدد العوامل. في المراجع العلمية ، بعض الدراسات الوبائية أظهرت أن عامل " النظافة " في البيئات الحضارية يشجع المرض مثل الحساسية والمناعة الذاتية. من ناحية أخري ، في المناطق الريفية ، حيث الإنسان يكون علي إتصال مستمر مع الكائنات الدقيقة و / أو مسببات الحساسية مثل التعرض لتحفيز الجهاز المناعي الدفاعي منذ المولد .

في إلتهاب الجلد الإستشرائي ، تضعف وتفسد وظيفة المنع للجلد ، مما يشجع مهاجمة وإستعمار مسببات الأمراض (البكتيريا والفيروسات) ، وعلي وجه الخصوص البكتيريا العنقودية ، والذي يعرف أن تسود هذه البكتيريا المتعايشة في الجلد .

وفيما يتعلق بالمناعة ، فان القضية هي واحدةمن الخلل في الإستجابة المناعية وغالبا ما يوصف الحالة الإستشرائية بأنه مظاهر الحساسية (IgE المتوسطة ، وهيمنة السيتوكينات IL-4 ، IL-5 ، IL-13) أو إستجابة Th2. هذا الأخير هو أكثر بروزا في وجود " محفزات إثارة المولدات المضادة " للبكتيريا العنقودية. الجهاز المناعي الدفاعي عمله يكون في إعادة التوازن إلي ميزان المناعة Th1 / Th2 .

المناعة الفطرية هي الإستجابة الأولية ، السريعة والإستجابة غير المحددة للإستجابة المناعية في الثدييات. يتضمن حاجز الخلايا الحاجزة والدفاعية الأولي مستقبلات — تول (TLRs). كلTLR يعترف بشكل محدد بعوامل المرض المرتبطة بالأنماط الجزيئية (PAMPs) مثل الأحماض النووية (TLR3) ، الببتيدات ، البروتينات السطحية ، وحامض ليبوثيكويك (TLR2) والسكريات المتعددة الدهنية (TLR4) الناشئة من كائنات حية دقيقة غريبة. التفاعل المحدد بين الحافز (المستقبل) ويقوم TLR بعمل تفاعلات متوالية ومعقدة تؤدي إلي نسخ NFκB ، يليه انتاج السيتوكينات الموالية للإلتهابات والمضادة للإلتهابات والكيموكينات (كانج وأخرون. ، 2006). غيره من العواقب الدوائية الناجمة هو تحريض الببلتيدات المضادة للجراثيم (AMPs) ، والتي لديها القدرة علي تثبيط نمو الجراثيم (البكتيريا والفيروسات والطفيليات) (جلاسير ، ر. ، وأخرون. 2005 ، المناعة الطبيعية عدد 6 : صفحة 57 – 64) .

وغالبا ما يتوافق إلتهاب الجلد الإستشرائي مع حكة وإحتكاك ، وبالتالي يسبب عدم الراحة والإنزعاج في الحياة اليومية (الحك ، نقص النوم ، الخ). أحد مسببات حالة اللإتهابات المرضية

يكون بسبب تنشيط مستقبلات المقترنة مع بروتين – G وتدعي PAR2 (مستقبل بروتياز-المنشط 2) (ستينهوف ، م وأخرين ، 2003 مجلة علوم المناعة ، عدد 23 : صفحة 6176 الي 6180). ويتم التعبير عن PAR2 علي سطح العديد من الخلايا ، ولاسيما في الخلايا الكيراتينوسيت ، الخلايا الغشائية ، خلايا القولون ، المعوية ، الخلايا العصبية والخلايا المناعية. بروتيازات (تربسين ، تريبتاز) ، الموجودة في وفرة في البشرة ، يخلع PAR2 عند محطة – N بتعريض ببتيد محدد والذي ينشط نفس هذا المستقبل (ظاهرة التنشيط الذاتي) (فيرجنول ، ن ، 2009 ، مجلة علم الأدوية ، عدد 123 : صفحة 292 – 309). تنطوي هذه العملية علي تنشيط الجين NFκB ، تليها إستثارة السيتوكينات الموالية للإلتهابات ، وبالتالي تسبب الإلتهاب. في هذا السياق ، تطوير مضادات PAR2 و / أو مثبط البروتين لديها إمكانيات عالية لعلاج أمراض من الحكة .

الصدفية هي أيضا مرض جلدي إلتهابي مع تعاقب مزمن ، هي تصيب 2% من السكان. جنبا إلي جنب مع الإكزيما الإستشرائية ، الصدفية تعتبر واحد من الأمراض الجلدية المزمنة الأكثر شيوعا للإلتهابات. وتتميز بواسطة النمو الغير طبيعي لخلايا البشرة المرتبطة برد فعل الإلتهاب. وترتبط الألية المركزية لظاهرة الإلتهاب لعمل خلايا الجهاز المناعي T ، في الغالب خلايا Th1 (ويلزمان – ثيس ، د. وأخرون ، مجلة الأمراض الجلدية الأوربية. ، عدد 18 (2) صفحة 172 – 180) ، والتي تبدأ وتحافظ علي عملية الإلتهاب وتحفز تكاثر الخلايا الكيراتينية والتي من ثم تنتقل خلايا طور التمايز المتسارع الغير مكتمل. مستقبلات الخلايا الكيراتينية والتي تجعلها حساسة لإشارات الإلتهابات وتطلق وسطاء موالية للإلتهابات. يتم إستمرار إلتهاب الصدفية عن طريق إلتهاب التحفيز المتبادل للخلايا T والخلايا الكيراتينية .

ولذلك يجب 0معالجة المرض علي المدي الطويل. وبالتالي فان هناك حاجة وإرتفاع الطلب علي البدائل العلاجية لهذه الأمراض الجلدية الإلتهابية .

الكشف عن الاختراع:

ويمكن الإشارة عن طريق وثيقة براءة الاختراع الأوربية رقم EP 2018891 (جينيش. أ ، 2009) والوثيقة بواسطة جينيش. أ وأخرون ، 2006 (مجلة الأمراض الجلدية الأوربية ، عدد 16 ، جزء ، 4 ، صفحة 380 – 384) والتي وصفت استخدام مستخلص بكتيري زجاجية خيطية الشكل (خيطي V) لعلاج إلتهاب الجلد الإستشرائي. مثل هذا المستخلص له عيب يتطلب ثقافة كما يقال البكتيريا الخيطية 7. البكتيريا الخيطية علي وسط محتوي ماء معدني خالي من الكبريت .

في هذا السياق ، يوفر الاختراع الحالي الحل لعلاج هذه الإضطرابات الإلتهابية عن طريق العزل ، التوصيف والتجزئ للبكتيريا الجديدة لم يتم وصفها من قبل. وللمرة الأولي ، وبطريقة مفاجئة ، نجح المستخدم في عزل سلالة تنتمي إلي الأنواع البكتيرية من المياه الجوفية ، حيث وكما يقال سلالة بكتيرية جديدة (أو بكتيريا) وتسمي LMB64 .

هذه البكتيريا LMB64 ، بالإضافة إلي حقيقة أنه تم عزلها ، تتميز وتعرف علي أنها تنتمي إلي فئة بيتابروتيوبكتيريا ، من فصيلة نيسيريسا ، و ربما لجنس جديد لم يحدد بعد. التحليل للتسلسل الجيني لترميز 16S RNA الريبوسومال RNA (rRNA) يجعل من الممكن وضع هذه البكتيريا قريبا إلي جينرا كروموبكتيريا ، باليديموناس ، ليتيليا و جلبينكيانا ، التي تشترك معها 95% تشابه في التسلسل .

هذه البكتيريا الغير مسببة لامراض سالبة الجرام وسوف يتم وصفها بمزيد من التفاصيل في الأمثلة. هذه البكتيريا أيضا لها ميزة أنها ليست خيطية. علاوة علي ذلك ، هذه البكتيريا لديها ميزة كونها قادرة علي أن يتم تربيتها علي وسط محتوي علي أي نوع من الماء ، وعلي وجه الخصوص ، المياه العادية. كمثال علي ذلك ، علي النقيض من فيليفورمس V ، تربية بكتيريا الاختراع الحالي

LMB64 لاتحتاج ظروف تربية معينة و ، علي الأخص ، لاتحتاج إلي وسط محتوي علي الأقل علي احد نوعيات من الكبريت الحر لمعدن و / أو مياه حرارية. هذا يمثل ميزة واضحة من حيث الشروط وظروف التربية وتسهل وتجعله أوفر من وجهه النظر الإقتصادية .

الترميز الكودي 16 S rRNA تقريبا قد تم تسلسله (1487bp ، مقابل لتسلسل SEQ No. 1 ID). البكتيريا LMB64 لها بلازميد دائرية من 10948bp . هذه البلازميد قد تم تسلسلها تماما والتسلسل موجود في تسلسل رقم SEQ ID No. 2 .

وفقا للتجسيد الأول ، الاختراع الحالي يتعلق بالبكتيريا سالبة الجرام الغير مسببة لامراض و المنتمية إلي فئة بيتابروتيوبكتيريا ، من فصيلة تيسيريسا ، والتي تسلسلها النيكلوتيدي الجيني المرمز rRNA 16S يتضمن التسلسل SEQ ID No. 1. ، أو أي تسلسل نيكلوتيدي مع تطابق علي الأقل 80% ، يفضل 85% ، 90% ، 95% و 98% مع تسلسل SEQ ID No. 1 .

في طريقة مفضلة ، يتعلق الاختراع الحالي بالبكتيريا سالبة الجرام والغير ضارة من فئة بيتابروتيوبكتيريا ، من فصيلة نيسيريسا ، وتتميز في أن التسلسل النيكلوتيدي من جينات rRNA 16 S للبكتيريا يتضمن أو يشمل التسلسل SEQ ID No. 1 .

في سياق الاختراع الحالي ، تشير "نسبة التطابق" بين تسلسل اثنين من الحمض النووي إلي نسبة النيكلوتيدات المتطابقة بين التسلسلين للمقارنة ، التي تم الحصول عليها بعد أحسن مواءمة (الموائمة المثلي) ، حيث هذه النسبة تكون إحصائية بحتة والفرق بين التسلسلين يكون موزع عشوائيا وعلي طول حياتهم كليا. مقارنات التسلسل بين تسلسل إثنين من الحمض النووي يتم عادة بواسطة مقارنة هذه التسلسلات بعد مواءمتها بطريقة مثلي ، حيث كما يقال يمكن عمل المقارنة في جزء أو في " إطار المقارنة ". المواءمة المثلي للتسلسلات للمقارنة يمكن تنفيذها ، بالإضافة إلي يدويا ، بواسطة الوسائل الجبرية المحلية المماثلة ل سميث و واترمان (1981).

[التطبيقات الحسابية المتقدمة رقم 2 : صفحة 482] ، و أو بواسطة الوسائل الجبرية المماثلة ل نيدمان و ونش (1970) [مجلة البيولوجيا الجزيئية ، عدد 48 : صفحة 443] ، عن طريق الوسائل الجبرية المماثلة ل بيرسون و ليبمان (1988) [مجلة Proc. Natl. Acad. USA. Sci عدد 85 : صفحة 2444] أو عن طريق وسائل برامج الكمبيوتر باستخدام هذه العلاقات الجبرية (GAP ، BESTFIT ، FASTA و TFASTA في مجموعة برامج علم الوراثة ، مجموعة علم الوراثة بالكبيوتر ، 575 علوم ، د. ماديسون ، و أ ، أو برامج BLAST N أو BLAST P للمقارنة) .

نسبة التطابق بين تسلسل إثنين من الحمض النووي تتم عن طريق مقارنة مواءمة التسلسل في طريقة مثالية حيث مقارنة تسلسل الحمض النووي يمكن أن تتضمن إضافات أو حذف فيما يتعلق بالتسلسل المرجعي للمواءمة المثلي بين هذين التسلسلين. نسبة التطابق يتم حسابها عن طريق تحديد عدد المواضع التي تكون فيها النيكلوتيد متطابقة بين التسلسلين ، من خلال تقسيم هذا الرقم للمواضع المتطابقة علي العدد الكلي للمواضع في اطار المقارنة وبواسطة ضرب النتيجة x 100 للحصول علي نسبة التطابق بين التسلسلين .

علي سبيل المثال ، برنامج " تسلسلات BLAST 2 " (تاتوسوفا وأخرين ، " تسلسلات BLAST 2 – أداة جديدة لمقارنة البروتين وتسلسل النيكلوتيد " ، مجلة رسائل الميكروبيولوجي FEMS ، عدد 174 : صفحة 247 – 250) ، متوفرة علي موقع http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2 ، يمكن استخدامها مع المحددات الافتراضية (ولاسيما للمحددات " عقوبة الفجوة المفتوحة " : 5 ، و " تمديد عقوبة الفجوة " : 2 ؛ مع مصفوفة مختارة علي سبيل المثال مصفوفة "BLOSUM 62" المصفوفة المقترحة من قبل البرنامج) ، مع حساب نسبة التطابق بين التسلسلين الذين يتم مقارنتهما مباشرة عن طريق البرنامج. ومن الممكن أيضا استخدام برامج أخري مثل "ALIGN" أو برنامج "Megalign" (DNASTAR).

وصف مختصر للأشكال:

شكل 1 يوضح موقف النشوء والتطور من تسلسل الترميز 16S rRNA من سلالة LMB64. تسلسل الظهور علي هذه الشجرة يكون تسلسلات من أقرب قاعدة بيانات بنك جيني لتسلسل LMB64 .

شكل 2 أو 2ب يعرض صورة بكتيريا LMB64 تحت الميكروسكوب الإليكتروني الإنتقالي(أ) والميكروسكوب الإليكتروني الماسح (ب) .

شكل 3 يعرض نمو مثالي معين كدالة للحرارة ، pH ، والملوحة في مستنبت R3 .

شكل 4 يوضح إستثارة السيتوكينات IL -10 و IL -12 عن طريق الإستخلاص E0 (التأثير المعتمد علي الجرعة) .

شكل 5 يوضح إستثارة جزيئيات السطح CD80 ، CD86 ، CD83 و CD54 عن طريق الإستخلاص E0 (التأثير المعتمد علي الجرعة) .

شكل 6 يوضح تثبيط مستقبلات IgE ومستخلص E0 .

شكل 7 يوضح تفعيل TLR2 بواسطة المستخلص ES0 .

شكل 8 يوضح تفعيل TLR4 بواسطة المستخلص ES0 .

شكل 9 يوضح تفعيل TLR5 بواسطة المستخلص ES0 .

شكل 10 يوضح تحديد الأجسام المضادة ل PAR2 بواسطة المستخلص ES0 .

شكل 11 يوضح إستثارة الببتيدات المضادة للميكروبات والبروتينات بواسطة المستخلص ES0.

شكل 12 يتكون من جيل SDS-PAGE للمستخلص ES0 .

الوصف التفصيلي:

وفقا لتجسيد آخر ، البكتيريا وفقا للاختراع تحتوي علي بلازميد واحد علي الأقل يتضمن تسلسل SEQ ID No. 2 ، أو أي تسلسل مع علي الأقل 80% ، يفضل 85% ، 90% ، 95% و 98% تطابق مع التسلسل SEQ ID No. 2 .

في طريقة مفضلة ، بكتيريا LMB64 تتضمن علي الأقل أحد البلازميد يشمل التسلسل SEQ ID No. 2 .

وفقا لتجسيد مفضل للاختراع ، تتميز بكتيريا LMB64 في أنها غير ضارة .

المميزات الأخري لبكتيريا LMB64 سوف تذكر تفصيلا أدنا في الأمثلة .

علاوة علي ذلك ، بكتيريا LMB64 للاختراع الحالي تم ترسيبها وفقا لمعاهدة بودابست في إسم مقدم الطلب مع المجموعة الوطنية دي كالتيرز دميكرواورجانيزم (CNCM) ، معهد باستير ، باريس ، في 8 أبريل ، 2010 ، تحت رقم مرجعي 4290 – 1.

وهكذا ، أحد أهداف الاختراع هو ترسيب البكتيريا مع CNCM في 8 أبريل ، 2010 ، تحت رقم مرجعي 4290- 1 ، أو مناظرة ، أو أي سلالة متحولة أخري .

المصطلح " متحول " يشير إلي أي بكتيريا تنشأ مباشرة من سلالة 4290-1 ويمكن أن تشمل الطفرات الطبيعية أو إعادة الدمج بينهم ، مثل ، علي سبيل المثال ، أي إعادة دمج تشير إلي

تكاثر الخلية ، تقسيم الخلية (طفرة نتيجة حدوث أخطاء أثناء انقسام البكتيريا أو إنقسام الحمض النووي) أو أي ألية أخري من الإنتقاء الطبيعي ، مثل إختيار الطفرات التي تقاوم أو تكون مقاومة لمركب معين. تتضمن هذه الطفرات أي بكتيريا تنشأ من سلالة 4290-1 المتألفة من واحد أو أكثر من الطفرات في التسلسل الجيني (أو أن البلازميد لهم) ، الذي فيه الطفرات تحدث نتيجة للإشعاع ، عن طريق الفيروس ، التبديل أو المواد الكيميائية المطفرة .

وفقا للتجسيد الاول للاختراع ، من المزرعة البكتيرية ، قد تكون معزولة بالكامل عن طريق مختلف الأساليب المعروفة مثل ، علي سبيل المثال ، الترشيح ، التجلط مع كحول (ايثانول ، ايزوبروبانول ، ايزوبيوتانول) ، عن طريق التجفيف علي إسطوانة مع كشط الطبقات ، الخ ، ثم نستخدم بعد ذلك شكل التجفيف البارد أو الحرارة الغير منشطة .

وفقا لتجسيد آخر ، يتعلق الاختراع بطريقة عامة لإستخلاص البكتيريا ، أيضا يسمي جزء البكتيريا ، الذي يتم الحصول عليه من تعليق البكتيريا كما تم ذكره أعلاه وهي البكتيريا المسماه LMB64 .

يشير المصطلح " مستخلص البكتيريا " إلي أي مستخلص من الكتلة الحيوية الجرثومية أو أي جزء نشط من هذا المستخلص. علي سبيل المثال ، يمكن الحصول علي مثل هذه المستخلصات من مزرعة البكتيريا LMB64 حيث تتضمن طريقة التحضير علي الأقل خطوة واحدة للتحلل وخطوة واحدة لفصل مختلف الأجزاء والذي يكون عن طريق الطرد المركزي أو بواسطة الترشيح .

بطريقة غير محدودة ، المستخلص وفقا للاختراع يمكن أن يتكون من خلايا بكتيرية معزولة من وسط المزرعة والذي تم تركيزه ، علي سبيل المثال ، عن طريق الطرد المركزي ، أو تركيز الخلايا البكتيرية التي خضعت لعملية تم فيها تمزيق غلاف الخلية عن طريق أي وسائل معروفة لهؤلاء العاملون في هذا المجال ، مثل عن طريق تأثير الموجات الصوتية أو التعقيم أو عن طريق الترشيح .

خطوة هامة في طريقة تحضير المستخلص وفقا للاختراع تتكون من القضاء علي عناصر مختلفة داخل الخلايا مثل ، علي سبيل المثال ، الأحماض النووية (كروموسومات DNA ، الحمض النووي خارج الصبغي الدائري DNA ، البلازميدات) ، الريبوسومات والمحتويات الداخلية للخلايا حيث يتم تخزين مواد مثل الجليكوجين ، النشا وبولي – B – هيدروكسي بيتريات ، الخ .

بطريقة مفضلة ، يتم الحصول علي مستخلص البكتيريا وفقا للاختراع بعد معالجة معلق البكتيريا في طريقة للتخلص من المكونات داخل الخلايا .

والنتيجة هي أن المستخلص وفقا للاختراع يتضمن أساسا مكونات ناشئة من الغشاء ، من المساحة البلازمية و / أو من المساحة خارج الخلية .

بوجه أخص ، كما يقال المكونات داخل الخلايا تضم الأحماض النووية علي الأقل .

بالإضافة إلي التخلص من المركبات بداخل الخلايا ، وكمثال غير محدود أو مقيد ، أنه أيضا بسهولة يمكن لهؤلاء العاملون في هذا المجال أن يقوموا بالفصل ، بعد تحلل البكتيريا والطرد المركزي ، مكونات طافية فوق الراسب (من الأن فصاعد جزء S0) والعناصر التي تشكل القرص الصغير (هنا بعد E0). علي سبيل المثال ، أنه يمكن اقتراح أن الفصل بين مكونات S0 و E0 يكون حول الوزن الجزيئي 100 كيلو دالتون. وبالتالي ، فان جزء من مكونات S0 لها ، بالنسبة للجزء الأكبر ، وزن جزيئي أقل من 100 كيلو دالتون ، في حين أن مكونات جزء E0 لها ، بالنسبة للجزء الأكبر ، وزن جزيئي أكبر من 100 كيلو دالتون .

بوجه أخص ، وبالتالي فمن الممكن بواسطة تقنيات معروفة لهؤلاء الأشخاص العاملين في مجال إستخلاص وفصل الجزيئيات الحيوية الموجودة في الطبقة الطافية (S0) من تلك التي تتألف أساسا

من البروتينات السطحية والبروتينات الموجودة في المساحة المحيطة بالغشاء البلازمي للبكتيريا (E0)

.

وفقا لأحد تجسيدات الاختراع ، يتضمن مستخلص البكتيريا جزء E0 يضم علي الأقل بروتينات الغشاء ، والبروتينات المحيطة بالغشاء البلازمي والبروتينات الناشئة من الزائدة الشبيهه بالسوط .

والبروتينات البلازمية تشمل البروتينات المستقرة في الفضاء البلازمي للبكتيريا جرام – سالب والتي يمكن أن تصدر عن طريق الصدمة التناضحية أو عن طريق الحضانة في وسط محتوي علي عامل شاتوتروبك أو منظفات (الإستنساخ الجزيئي : دليل المختبر ، الطبعة 3. سامبروك وروسيل. مطبعة سشل) .

البروتينات الناشئة من الزائدة الشبيهة بالسوط تتضمن بروتينات مالتي ميريك من الزائدة أو أجزاء من السوط. طرق فصل والتنقية للسياط الجرثومية مع المنظفات يليها فصل بالطرد المركزي (في وجود CsCl متدرج) وهي موصوفة في المراجع العلمية. في الاختراع ، الأمثلة لطرق الإستخلاص تجعل من الممكن إسترجاع أجزاء شظايا السوط .

بروتينات الغشاء تتضمن البروتينات التي ترسو في الغشاء والتي منها جزء يتعرض للسطح (بروتينات الغشاء الخارجي ، أو Omp) ، البروتينات التي التصقت بسطح الغشاء من البروتينات الدهنية والبورينز (وارد ج ب ، الإلتصاق الميكروبيولوجي للسطح ، 1980) .

في طريقة مفضلة، كما يقال بروتينات الغشاء تتكون من بورينز ، OmpA ، سكريات متعددة دهنية و / أو بروتينات دهنية . وفقا لتجسيد آخر للاختراع ، قد يكون من المفضل استخدام جزء S0 .

بوجه أخص ، يتضمن المستخلص البكتيري وفقا للاختراع جزء S0 يتضمن علي الأقل الببتيدات والبروتينات والأيضات الثانوية .

الببتيدات والبروتينات التي تفرز تتضمن ببتيدات وبروتينات التي تنتج بشكل طبيعي والتي تفرز عن طريق البكتيريا LMB64 و التي يمكن إستعادتها عن طريق الطرد المركزي أو الترشيح .

الأيضات الثانوية وتشمل الجزيئيات الصغيرة التي تفرزها بكتيريا LMB64 في وسط المزرعة .

وجود السكريات المتعددة الدهنية في جزء S0 يجب ذكره هنا. علي الرغم من أنها وجدت أساسا في جزء E0 ، ورغم ذلك وجدت أيضا بكميات أصغر في جزء S0 .

بطريقة مفيدة ، الأجزاء E0 و S0 يمكن أن يتحدوا في مثل هذه الطريقة للحصول علي جزء ES0 عن طريق تركه ، علي سبيل المثال ، وضع وسط المزرعة في الحضانة وتفاعله في وسط قاعدي (pH = 9 إلي 11) لنحو 5 ساعات ودرجة حرارة 4°م ، وعن طريق الطرد المركزي والترشيح عند 0.2 ميكرون من أجل الحصول علي محلول ES0 رائق .

المستخلص البكتيري ES0 قد يتكون ، من بين أمور أخري ، من بروتينات الغشاء ، السكريات العديدة الدهنية ، والبروتينات المحيطة بالغشاء البلازمي ، وأجزاء بروتين من السوط والأيضات الإبتدائية والثانوية التي تنتجها البكتيريا .

في الطريقة المفضلة ، مستخلص ES0 لديه توصيف بروتين يتضمن علي الأقل ، وفقا لأسلوب SDS-PAGE ، إثني عشر نطاق بينهم ثلاث نطاقات رئيسية المقابلة ، علي التوالي ، للأوزان الجزيئية (الأوزان الجزيئية المعطاه تقريبية بالنسبة للأوزان الجزيئية القياسية ، لاسيما من خلال التي يتم توفيرها بواسطة معامل بيو — راد) تتراوح بين :

- نطاق 1 : 30 كيلودالتون و 36 كيلودالتون ، بشكل مفضل 34 كيلودالتون ؛

- نطاق 2 : 41 كيلودالتون و 45 كيلودالتون ، بشكل مفضل 43 كيلودالتون ؛
- نطاق 3 : 47 كيلودالتون و 51 كيلودالتون ، بشكل مفضل 49 كيلودالتون .

وفقا لتجسيد آخر للاختراع ، المستخلص البكتيري يتضمن جزء ES0 متضمن علي الأقل جزء E0 وجزء S0 .

وفقا لتجسيد مفضل للاختراع ، المستخلص البكتيري يتضمن جزء ES0 مع شكل بروتين ، تم الحصول عليها عن طريق SDS-PAGE ، والتي تشمل ثلاث نطاقات رئيسية مقابلة للأوزان الجزيئية تتراوح بين 30 كيلودالتون و 36 كيلودالتون ، 41 كيلودالتون و 45 كيلودالتون ، 47 كيلودالتون و 51 كيلودالتون ، علي التوالي .

وفقا لتجسيد مفضل للاختراع ، المستخلص البكتيري يتضمن جزء ES0 مع لمحة بروتين ، تم الحصول عليه بواسطة SDS-PAGE ، والذي يتضمن ثلاث نطاقات رئيسية مقابلة للأوزان الجزيئية من 34 كيلودالتون و 43 كيلودالتون و 49 كيلودالتون ، علي التوالي .

وفقا لجانب آخر ، وصف الاختراع طريقة لتحضير المستخلص البكتيري يتضمن الخطوات :

أ) زرع البكتيريا LMB64 في وسط مناسب ، و

ب) القضاء علي المكونات داخل الخلايا .

وفقا لتجسيد آخر ، الطريقة وفقا للاختراع تتكون من طريقة تحضير مستخلص بكتيري S0 ، حيث كما يقال طريقة تتضمن الخطوات :

أ) زرع البكتيريا LMB64 في وسط مناسب ؛

ب) استخدام الطرد المركزي للمزرعة ؛ و

ج) إستعادة الطبقة الطافية S0 .

وفقا لتجسيد آخر ، الطريقة للاختراع تتكون من طريقة لتحضير المستخلص البكتيري E0 ، حيث كما يقال طريقة تتضمن الخطوات :

أ) زرع البكتيريا LMB64 في وسط مناسب ؛

ب) استخدام الطرد المركزي للمزرعة وإستعادة الطبقة الطافية ؛

ج) معالجة الكتلة الحيوية الناتجة عن الخطوة (ب) في مثل هذه الطريقة للقضاء علي مكونات الخلايا ؛ و

د) إستعادة الأساس E0 .

في طريقة مفضلة ، خطوة (ج) تتكون من معالجة بالموجات فوق الصوتية للكتلة الحيوية الناتجة من خطوة (ب) وبعد ذلك الطرد المركزي الأولي الذي يهدف إلي القضاء علي الكريات المتضمنة كما يقال مكونات الخلايا ثم الطرد المركزي الثاني للجزء الطافي .

وفقا لتجسيد آخر ، الطريقة وفقا للاختراع تتكون من طريقة تحضير المستخلص البكتيري E0 ، حيث كما يقال طريقة تتضمن الخطوات :

أ) زرع البكتيريا LMB64 في وسط مناسب ؛

ب) استخدام الطرد المركزي للمزرعة و التخلص من الجزء الطافي ؛

ج) المعالجة بالموجات فوق الصوتية للكتلة الحيوية الناتجة من الخطوة (ب) ؛

د) كما يقال الطرد المركزي للكتلة الحيوية المعالجة بالموجات فوق الصوتية والتخلص من الكتلة الحيوية الناتجة ؛

هـ) الطرد المركزي للوسط الطافي الناتج من الخطوة (د) ؛ و

و) إستعادة الأساس E0 .

وتجدر الإشارة إلي أنه يتم توفير الأساليب المختلفة المذكورة أعلاه من أجل التوضيح فقط وأنه يمكن استخدام آية طرق معروفة لهؤلاء الأشخاص المهرة في هذا المجال .

وسوف يصبح واضحا من الأمثلة أدناه ، وقد أثبت مقدم الطلب ، بالإضافة إلي النشاط المتوقع لهذا النوع من المستخلصات ، أنشطة جديدة عديدة لم توصف من قبل .

والهدف المفيد الأول من الاختراع ، يتعلق بالتغير المناعي ، وتقع علي تعديل خواص التغير المناعي المؤيدة لإلتهابات السيتوكينات. بوجه أخص ، استخدام البكتيريا و / أو المستخلص وفقا للاختراع يدفع بشكل ملموس كثيرا من السيتوكينات IL-10 ، IL-12 و TNF-α ، التي تشارك في الإستجابة بشكل مفضل في الإستجابة والحس المناعي Th1 ، ويثبط بشكل ملحوظ السيتوكينات IL-4 و IL-6. النتيجة هي تنشيط خلايا لانجرهانس والعودة إلي التوازن Th1/Th2 .

وعلاوة علي ذلك ، مشاهدة أخري توضح أن استخدام البكتيريا و / أو المستخلص وفقا للاختراع يجعل من الممكن خفض بشكل كبير مستقبلات IgE ، والتي هي من المصلحة أن تقوي ظاهرة الحساسية IgE .

ميزة أخري للاختراع ترتكز علي حقيقة أن ، كما سيتضح من الأمثلة ، استخدام البكتيريا و / أو المستخلص وفقا للاختراع سيث علي إنتاج الببتيدات المضادة للجراثيم مثل ، علي سبيل المثال ، ببتيد hBD-2 ، hBD-3 ، S1007A و LL-31 .

بوجه أخص ، علي النحو المذكور أعلاه ، مستخلص البكتيريا فيتروسيلا الخيطية (جينش. أ. وأخرون ، مجلة الأمراض الجلدية الأوربية 2006 ، عدد 16 : صفحة 380) كان معروفا مع النشاط علي TLR2 ، نتيجة لوجود OmpA ، وعلي TLR4 ، نتيجة لوجود السكريات العديدة الدهنية. بسبب عدم وجود بكتيريا في سياط خيطي – V ليس له نشاط علي TLR5 .

لأول مرة ، يصف مقدم الطلب مستخلص البكتيريا وفقا للاختراع والذي له ، بالإضافة إلي النشاط علي TLR2 و TLR4 ، نشاط علي TLR5 .

يتعلق الاختراع بذلك للاستخدام للبكتيريا و / أو مستخلص البكتيريا الموصوف أعلاه كمنشط لكل من TLR2 ، TLR4 و TLR5 .

في طريقة مفضلة ، كما يقال يتكون المستخلص البكتيري المنشط لكل من TLR2 ، TLR4 و TLR5 من مستخلص يتضمن كل أو جزء من البروتينات الناشئة من السوط. في هذه الحالة ، علي سبيل المثال ، كما يقال يفضل أن يكون المستخلص مستخلص E0 أو مستخلص ES0 .

وكما يقال فعالية نشاط TLR5 ذو أهمية كبيرة في أن TLR5 معروف علي حث بعض الببتيدات المضادة للميكروبات مثل البسورياسيز (S100A7) و hBD-2 (جلاسير و أخرون ، مجلة التحقيق في الأمراض الجلدية (2009) عدد 129 ، صفحة 641 – 649). وعلاوة علي ذلك ، تعمل TLR5 كمنبهات تعمل بالتأزر مع تلك TLR2 و TLR4 ، مما يجعل من الممكن تحفيز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات. وقد تبين أنه من خلال منع TLR5 مع الأجسام المضادة ، يتم إنتاج هذا الأخير قليلا أو لاينتج علي الإطلاق .

هذا الجانب هو مبتكر وبالتالي لاسيما في مجال التطبيقات المناعية للبكتيريا و / أو المستخلصات وفقا للاختراع .

وعلاوة علي ذلك ، بطريقة غير متوقعة ، قد أثبت مقدم الطلب أيضا وعلي النقيض لمستخلصات البكتيريا المذكورة ، الفعالية المضادة تجاه PAR2. هذا النشاط هو ذو أهمية كبيرة في سياق العلاجات المضادة للإلتهابات .

يتعلق الاختراع بذلك ، وبصورة خاصة جدا ، إلي استخدام البكتيريا و / أو مستخلص البكتيريا كما هو موصوف أعلاه بإعتبارهم مضادات ل PAR2 .

في طريقة مفضلة ، وكما يقال مستخلص البكتيريا المضادة ل PAR2 يتكون من مستخلص S0 أو مستخلص ES0 .

يظهر PAR2 بوضوح في الخلايا البطانية ، القولون ، الخلايا المعوية ، الخلايا العصبية ، الخلايا المناعية والخلايا الكيراتينية. بروتياسيز (تربسين ، تربتيز) موجود بكثرة في البيئة و يلتصق مع PAR2 في محطة N – محطة تعرض ببتيد محدد والذي ينشط نفس هذا المستقبل (ظاهرة التنشيط التلقائي). وبالتالي ، فإن هذا ينشط السيتوكينات الموالية للإلتهابات ومفجرة للإلتهاب (فيرجنول رن. 2009 مجلة علاجات الفارماكولوجي ، العدد 123 : صفحة 292 – 309). ويلاحظ هذه الظاهرة في الفئران البرية ولكن لايظهر في الفئران KO (نقص في PAR2). العلاج مع مضاد البروتييز و / أو الأجسام المضادة ل PAR2 تجعل من الممكن تجنب ظاهرة الإلتهابات هذه .

إتحاد وتضافر جميع هذه الأنشطة يعطي هذه البكتيريا LMB64 ، أو أي مستخلص ناشئ من نفس البكتيريا ، قدرة عالية لعلاج الأمراض الإلتهابية و ، وخاصة جدا ، الأمراض الإلتهابية التي فيها PAR2 يكون مشارك و / أو التي فيها ضعف في الجهاز المناعي ، مضطربة أو غير متوازنة .

الاختراع لذلك يتعلق باستخدام البكتيريا كما تم ذكره أعلا و / أو مستخلص البكتيريا الناشئ من البكتيريا لتحضير وتكوين مقصود لعلاج و / أو الوقاية من الإضطرابات الإلتهابية الجلدية .

في طريقة مفضلة ، كما يقال تتألف الإضطرابات الإلتهابية الجلدية من الإكزيما ، الحكة والصدفية .

وفقا لتجسيد آخر ، يتعلق الاختراع الحالي بتركيبة تتضمن ، كمادة فعالة ، واحد علي الأقل من البكتيريا و / أو أحد مستخلصات البكتيريا وفقا للاختراع .

الاختراع لذلك يتعلق ، في طريقة مفضلة ، لتكوين مستحضرات التجميل أو مستحضرات الأمراض الجلدية .

التكوين وفقا للاختراع يتعلق بعلاج الإضطرابات والإلتهابات الجلدية .

في طريقة مفضلة ، وكما يقال تتألف الإضطرابات الإلتهابية الجلدية من الإكزيما ، الحكة ، الصدفية .

التكوين وفقا للاختراع يمكن بصفة خاصة أن يحتوي مواد مضافة ذات صياغات معينة مثل المستحلبات ، المكثفات ، عوامل التحويل إلي مادة غروانية ، روابط مائية ، عوامل إنتشار ، مثبتات ، ملونات ، المواد المعطرة والمواد الحافظة .

تركيبة مستحضرات التجميل أو الأمراض الجلدية وفقا للاختراع تتضمن المزيد واحد أو أكثر من الصيغ المتوافقة مع الجلد .

التركيبة وفقا للاختراع يمكن أن يتم تحضيرها في صورة مستحلب ماء – في – زيت (W/O) أو زيت – في – ماء (O/W) ، مستحلب متعدد مثل ، علي سبيل المثال مستحلب ماء – في –

زيت – في – ماء (W/O/W) أو زيت – في – ماء – في – زيت (O/W/O) وهو ميكرومستحلب أو في صورة منتشر في الماء أو منتشر في الدهون ، أو جيل أو ايروسول .

الإضافات الغير فعالة المتألفة مع مستحضرات التجميل أو الجلد و أمراض الجلد يمكن أن تكون إضافة غير فعالة بين تلك المعروفة لهؤلاء الأشخاص ذوي المهارات في هذا المجال من أجل الحصول علي تكوين للتطبيق الموضعي في شكل الحليب ، كريم ، مرهم ، زيت ، لوسيون ، جيل ، جيل رغوي ، دهن للشعر ، رذاذ ... الخ .بالإضافة إلي التراكيب الجلدية ومستحضرات التجميل ، الاختراع يتعلق أيضا بالتراكيب الدوائية للاستخدام كعلاج .

يتعلق الاختراع بتكوين مزيد من الأدوية الحاملة المقبولة دوائيا .

في الوصف الحالي ، " حامل مقبول دوائيا " يشير الي المركب أو اتحاد مركبات مصنوعة لتصبح جزء من تركيبة الأدوية التي لاتسبب ردود أفعال ثانوية ، علي سبيل المثال ، تسهيل إدارة المركبات النشطة ، زيادة عمرها و / أو فعاليتها في الجسم ، وزيادة القابلية للذوبان في المحاليل أو تحسين الحفاظ عليها. وكما يقال حاملات مقبولة دوائيا معروفة وسيتم تكييفها من قبل أولئك الأشخاص المهرة في هذا المجال وفقا لطبيعة وطريقة إدارة المركبات النشطة المحددة .

ويفضل ، كما يقال مركبات يمكن أن يتم التعامل معها بواسطة الجهاز العضلي ، داخل الجلد ، أو داخل التجويف الجنبي ، أو الطريق تحت الجلد ، أو عن طريق الفم. يمكن إعطاء تكوين الأجسام المضادة وفقا للاختراع في عدة جرعات تنتشر علي مر الزمن .

ويمكن تحديد الأسلوب الأمثل للتناول ، وجداول الجرعات و أشكال خاصة بالصناعة وفقا لمعايير هامة عموما لثبات العلاج ومهيئة للمريض مثل ، علي سبيل المثال ، عمر أو وزن المريض ، مدي الخطورة علي الصحة العامة للمريض ، الإشارة إلي التفاوت المسموح به و الأثار الجانبية للعلاج .

سيتم فهم أفضل للاختراع عند النظر في الأمثلة التالية التي توضح الاختراع دون الحد من نطاقه.

مثال 1 : إختيار وتوصيف بكتيريا LMB64

تم عزل بكتيريا AV13 من المياه الجوفية .

ويقترح وضع التصنيف للبكتيريا LMB64 في الشكل 1 .

بوجه أخص ، بكتيريا LMB64 علي شكل قضيب بطول حوالي 2.3 ميكرون (± 0.3) وعرض ما يقرب من 1.0 ميكرون (± 0.1). ومن الخصائص المميزة لهذه البكتيريا وجود السوط القطبي (أشكال 2 أو 2ب). كما يمكن أيضا أن نري في هذه الصور ، بكتيريا LMB64 في صورة بكتيريا غير خيطية .

كما تم بأعلا ، بكتيريا LMB64 لها بلازميد دائرية من حوالي 11كيلو زوج قاعدة . هذه البلازميد قد تم تسلسلها بالكامل (SEQ ID No. 2) .

الترميز الجيني ل 16S rRNA قد تم أيضا تسلسله (SEQ ID No. 1). تم زرع البكتيريا في وسط صناعي متخمر. معدل النمو يكون أعلي عندما الوسط يكون له تركيز منخفض من ركائز الكربون .

وسط المزرعة المختبر هي R3 ، MS – جلوكوز و وسط LB الذي تركيبهم مذكور أدناه في جدول 1 أ ، 1 ب ، 1 ج علي التوالي .

تركيب الوسط	
مستخلص خميرة	1جم/لتر
ديفكو البروتيوز ببتون	1 جم/لتر
أحماض امينية كاس	1 جم/لتر
جلوكوز	1 جم/لتر
نشا ذائب	1 جم/لتر
بيروفات الصوديوم	0.5 جم/لتر
K_2HPO_4	0.6 جم/لتر
$MgSO_4, 7H_2O$	0.1 جم/لتر

جدول 1 أ

تركيب وسط الجلوكوز–م س	
جلوكوز	6.0 جم/لتر
حامض الستريك	0.84 جم/لتر
$MgSO_4, 7H_2O$	0.25 جم/لتر
NH_4Cl	1.06 جم/لتر
K_2HPO_4 غير مائي	8.75 جم/لتر
حامض البيروفيك ملح صوديمي	0.5 جم/لتر

كبريتات زنك -7 جزئيات ماء	4 مجم/لتر
كلوريد كوبالت-6جزئيات ماء	3.5 مجم/لتر
مولبيدات الصوديوم-2جزئ ماء	3.5 مجم/لتر
كبريتات الماغنسيوم-1جزئ ماء	5 مجم/لتر
حمض البوريك	2 مجم/لتر
حامض هيدروكلوريك مركز	50 مجم/لتر
كبريتات نحاس-5جزئيات ماء	4مجم/لتر
كلوريد حديد-6جزئيات ماء	27 مجم/لتر

جدول 1 ب

تركيب الوسط ل ب	
تريبتون	10 جم/لتر
مستخلص خميرة	5 جم/لتر
كلوريد صوديوم	5 جم/لتر

جدول 1 ج

معدل نمو البكتيريا LMB64 كدالة لوسط المزرعة موجودة في حدول 2 بأسفل

	معدل النمو (/ساعة)
LB	0.25 (±0.05)
LB (2/1تخفيف)	0.46 (±0.11)
LB (5/1 تخفيف)	0.60 (±0.14)
LB (10/1 تخفيف)	0.69 (±0.15)
جلوكوز–م س	0.13 (±0.04)
R3	0.62 (±0.14)

جدول 2

تم تحديد النمو المثالي كدالة لدرجة الحرارة ، ودرجة الحموضة والملوحة لوسط الاستنبات R3 (شكل 3) .

تميزت مصادر الكربون الماثلة بواسطة البكتيريا باستخدام معرض API 50CH (درجة حرارة الحضانة : 25 درجة مئوية). وتتلخص النتائج في الجدول 3 أدناه .

	زمن الحضانة	
	4ايام	5ايام
1- جليسرول		
2- اريثريتول		
3- د. أربانوز		
4- د. أربانوز		
5- د. ريبوز		
6- د. سيلوز		

MA 34734B1

	7- ل. سيلوز		
	8- د. أدونوثول		
	9- ميثيل-B-D- اكسيلوبيرانزايد		
	10- د. جالاكتوز		
5	11- د. جلوكوز	+	+
	12- د. فركتوز	+	+
	13- د. مانوز		
	14- ل. سوربوز		
	15- ل. رمنوز		
10	16- ديلسيتول		
	17- انوسيتول	I	+
	18- د. مانيتول		
	19- د. سوربيتول		
	20- ميثيل- α - د — مانوبيرانوزيد		
15	21- ميثيل - α - جلوكوبيرانوزيد		
	22- ن — اسيتيل جلوكوزامين		
	23- أميجدالين		
	24- أربيوتين		
	25- ايسكلين		
20	26- ساليسين		
	27- د. سيلوبيوز		
	28- د. مالتوز	I	+
	29- د. لاكتوز		
	30- د. ميليبوز		
25	31- د. سكروز	+	+
	32- د. ترالوز	I	+
	33- انيولين		
	34- د. ميليزتوز		
	35- د. رافينوز		
30	36- نشا		

37- جليكوجين
38- زيليتول
39- جينتبيوز
40- د. تيورانوز I +
41- د. ليكسوز
42- د. تاجتوز
43- د. فيكوز
44- ل. فيكوز
45- د. ارابيتول
46- ل. ارابيتول
47- جلوكينات البوتاسيوم
48- 2-كيتوجلوكينات البوتاسيوم
49- 5-كيتوجلوكينات البوتاسيوم

+ صالحة للاستعمال ، I : استعمال قليل

جدول 3

برهنت النشاطات الأنزيمية في معرض API ZYM : الفوسفاتيز القلوية ، استيريز (C4) ، استيريز / ليباز (C8) ، ليسين أريل أميديز ، فالين أريل أميديز ، الفوسفاتيز الحامضية ، نافثول – BI – AS – فوسفو هيدروليز ، وجلوكوسيديز .

البكتيريا LMB64 تكون حساسة الي جميع المضادات الحيوية المختبرة كما رأينا في الجدول 4 أدناه .

المضاد الحيوي المختبر	قطر منطقة التثبيط (m m)			نشاط التثبيط
	R3	LB 1/2	LB 1/5	
أمبسيلين (10 ميكروجم)	29	28	29	+
كلورومفينيكول(3 ميكروجم)	29	26	24	+
سيبروفلوكساسين(5 ميكروجم)	38	34	34	+
كانامايسين (30 ميكروجم)	27	30	27	+
بينسلين (6 ميكروجم)	21	26	20	+
بولي ميكسين (50 ميكروجم)	11	15	13	+

ريفامبسين (30 ميكروجم)	20	19	15	+
تيتراسيكلين (30 ميكروجم)	30	25	20	+
ستريتوميسين (10 ميكروجم)	25	25	24	+
فانكوميسين (30 ميكروجم)	20	21	21	+

جدول 4

مثال 2 : طريقة إستخلاص الأجزاء E0 ، S0 و ES0

الزرع الاولي : هو تلقيح سلالة AV13 في قارورة ايرلينمير تحتوي علي 250 مل من وسط MS جلوكوز بيروفيت (انظر جدول 5 أدناه) ، تليها الحضانة مع التقليب لمدة 40 ساعة تقريبا عند 30°م (pH 7) و 200 دورة تقليب حتي يتم الحصول علي $OD_{600}\approx 1.5$.

MS Glucose Pyruvate	
حامض الستريك (جم)	0.84
كبريتات ماغنسيوم/7جزئيات ماء (جم)	0.25
كلوريد أمونيوم (جم)	1.06
فوسفات البوتاسيوم اللامائي (جم)	8.75
حامض البيروفيك ملح صوديومي(جم)	0.5
أوليجو ميكس(مل)	1
ماء حتي(مل)	1000
ضبط درجة الحموضة	7
اتوكلاف لمدة 30 دقيقة (C°)	121
بعد الاوتوكلاف نضيف:20% جلوكوز(مل)	30

أوليجو ميكس	
يذوب في 100 مل ماء مقطر:	
كبريتات خارصين/7جزئيات ماء (جم)	4
كلوريد كوبالت/6جزئيات ماء (جم)	3.5
مولبيدات الصوديوم (جم)	3.5
كبريتات ماغنسيوم/1جزئي ماء (جم)	5
حامض البوريك (جم)	2
حامض هيدروكلوريك مركز (جم)	50
كبريتات نحاس/5جزئيات ماء (جم)	4
تذوب في 50 مل من الماء المقطر:	
كلوريد الحديد/6جزئيات ماء (جم)	27
ماء حتي(مل)	1000

جدول 5

الزرع : ثم تلقح المزرعة الاولية في مخمر (أبيكون) محتوي علي 3.7 ليتر من وسط MS بيروفيت + 114 مللي من 20% محلول جلوكوز. جهاز إستشعار درجة الحرارة ينظم درجة الحرارة ويفضل بالقرب من 30°م. جهاز إستشعار الأوكسجين (أبيل سينس) يستخدم للحفاظ علي تركيز الأوكسجين الذائب في الوسط عند 18 - 25%. جهاز إستشعار درجة الحموضة PH (أبيل سينس) يستخدم للحفاظ علي درجة الحموضة عند 7 بإضافة 10% هيدروكسيد أمونيوم عن طريق مضخة ذات معدل ضخ ثابت. يستخدم جهاز إستشعار ويدجوود التحليلي لرصد

التغيرات في الكثافة الضوئية في الوقت الحقيقي. تمت برمجة الزرع في وضع تغذية دفعي ؛ عبر مضخة ذات معدل ضخ متغير يتم امداد محلول 20% جلوكوز. يتم إيقاف التخمر عند OD_{600}≈22-26 ، بشكل عام بعد ما يقرب من 30 ساعة .

استخلاص SO : يتم فصل الطبقة الطافية من الكتلة الحيوية بواسطة الطرد المركزي لمدة ساعة عند 4 °م و 4000جم.

إستخلاص E0 : تؤخذ الكتلة الحيوية الرطبة كلوريد صوديوم (امولر). بعد الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة عند 40°م و 9000جم ، يتم تجاهل الطبقة الطافية وأخذ الكريات في محلول كلوريد صوديوم (امولر). ثم تدخل أنبوبة العينة إلي داخل حمام بالموجات نو الصوتية وتبرد عند إعداد قوة 50 – 60 وات لعدة دقائق. بعد الطرد المركزي لمدة 30 دقيقة عند 4°م و 6000جم ، يتم تجاهل الكريات ويؤخذ المحلول الطافي. يضاف حجمين من الايثانول البار ويترك المعلق طوال الليل عند 4°م. بعد الطرد المركزي لمدة 30دقيقة عند 4°م و 6000جم ، يتم تجاهل الطبقة الطافية وتؤخذ الكريات في 25 مل مول محلول منظم تريس ، درجة حموضة 8.8 .

إستخلاص ES0 : المزرعة تحلب إلي درجة حموضة قلوية (pH 9– 11) مع محلول منظم قلوي. الخطوة التالية هي الحضانة مع التقليب لمدة 5 ساعات عند درجة حرارة 4°م. بعد الطرد المركزي ، يتم إعادة ترشيح الطبقة الطافية للتخلص من الكتلة الحيوية الباقية ترشح علي مرشح 0.2 ميكروميتر. يتم الحصول علي محلول أصفر رائق (ES0) .

تعاير البروتينات وفقا لبروتوكول (بيو – راد) لمعايرة البروتين DC .

يتم معايرة السكريات في معادل الجلوكوز وفقا لطريقة حامض الكبريتيك / فينول (ديبوس ، م. و أخرون ، 1956) .

كمثال ، جدول 6 أدناه يعرض بعض الخصائص المعينة من مستخلص ES0 الذي تم الحصول عليه تحت الظروف المذكورة أعلاه .

	اختبار دفعة	دفعة قبل الاكلينيكي 1
الخواص العضوية	سائل أصفر رائق و متجانس الكثافة مقاربة لكثافة الماء	
درجة الحموضة (في وجود محلول منظم قلوي)	10.0	10.2
بقايا جافة (متوازنة حراريا)	%5.9	%5.1
شكل البروتين (SDS-PAGE)	12 نطاق محدد(متضمنا 3 نطاقات رئيسية تقريبا عند 34 كيلو دالتون، 43 و 49 كيلو دالتون علي التوالي)	
تقدير البروتين الكلي (µBCA)	2.9 ملجم/مل	3.0 ملجم/مل

جدول 6

ومن المفهوم بوضوح أنه يتم تقديم البيانات المذكورة أعلاه هنا فقط لأغراض التوضيح. بدقة أكثر ، تتعلق البيانات بتعريف البروتينات التي تم الحصول عليها بواسطة SDS-PAGE التي تعرض نطاقات رئيسية .

بروتوكول SDS-PAGE :

يؤخذ المستخلص ES0 في محلول منظم (20 مل مول تريس هيدروكلوريد ، درجة حموضة 8.0 ، 1 مل مول EDTA ، 2.5% SDS و 0.01% بروموفينول الأزرق) و 1 مول DTT (4.1- دايثيوسريتول) والعينة والخليط مع علامات الوزن الجزيئي (ويسترن سي ، بيو – راد) يتم إيداعهم علي التوالي في الأبار من 8 – 16% SDS-PAGE أكريل أميو جيل (GeBaGel, Gene – Bio –Application). المحلول المنظم المنقول يحتوي علي 2.5 ملي مول تريس ، 19.2 مليي جليسين و 0.01% SDS (وزن / جم). يسمح بالانتقال تحت فولت ثابت حوالي 160 فولت تقريبا لمدة 1 ساعة (نظام GeBaGel). نطاقات البروتين تلون بالكوميس بلو (انستانت بلو ، اكسبيدون). يتم حساب الأحجام فيما يتعلق بالمعايير المعروفة (STD) .

تم عرض الجيل الناتج في شكل 12 .

وفقا لأحد تجسيدات الاختراع ، هذه النطاقات الثلاث لها وزن جزيئي تقريبا 34 كيلودالتون ، 43 كيلودالتون و 49 كيلودالتون علي التوالي .

مثال 3 : عرض للأنشطة الدوائية لأجزاء E0 و ES0

يتم إنشاء خلايا لانجرهانس (LC) في المعمل من خلايا انسان حي معزولة من أكياس الدم عن طريق خدمات الدم الدولية الفرنسية (فرنسا – دي سانج (EFS) بيرينية – البحر الأبيض المتوسط) : العزل علي تدريج فيكول (وسط فصل الخلايا الليمفاوية ، كثافة 1.077 جم / مللي) والتنقية بواسطة إنتقاء مناعي مغناطيسي (ميلتين بيوتيك) ؛ يتم التفريق LC لمدة 6 أيام في وجود كوكتيل سيتوكين (GM-CSF/IL-4/TGFβ). يتم توزيع LC علي ألواح 24 – بئر في 5% FCS – RPMI وسط مستنبت وتوضع في الحضانة لمدة 24 ساعة مع المستخلص ES0 .

ويتم تحليل جزيئيات السطح عن طريق التدفق الخلوي (FACSCalibur, BD Biosciences) مع صبغ ثلاثي أو رباعي : CD1a/CD54/CD80/CD83/CD86/FcεRI ؛ ويتم تحليل السيتوكينات مع مصفوفة الخرز الخلوي (رقم كودي 550749 ، BD) في التدفق الخلوي : IL-6, IL-8, TNF, IL-4, IL-10, IL-12 .

1.3 إستثارة السيتوكينات الرئيسية للإستقطاب Th1

يستثار المستخلص E0 وفقا للتاثر إعتمادا علي الجرعة علي التعبير عن السيتوكينات IL-10 و IL-12 بواسطة خلايا لانجرهانس (شكل 4). هذه السيتوكينات تعزز إستثارة التقاطب TH1 من الخلايا الليمفاوية T .

2.3 إنضاج خلايا لانجرهانس وتثبيط مستقبل IgE (FcεRI)

يتم إستثارة المستخلص E0 علي نضوج خلايا لانجرهانس التي تم ملاحظتها عن طريق التأثير إعتمادا علي الجرعة للجزيئيات السطحية CD80 ، CD86 ، CD83 و CD54 (شكل 5). وبالمثل ،يثبط المستخلص E0 مستقبل IgE (FcεRI) وفقا للتأثير إعتمادا علي الجرعة (شكل 6)

3.3 تنشيط مستقبلات مثل تول (TLRs)

يتم تقييم نشاط TLR ل ES0 علي TLR2 ، TLR4 و TLR5 باستخدام النموذج من الخلايا HEK293 المحملة بجين TLR2 ، TLR4 أو TLR5 وبواسطة مستقبل الجين NFκB-sAP (يفرز الفوسفتيز القلوية). ربط اللجند مع TLR يؤدي إلي التنشيط لعامل NFκB ؛ جيني sAP يوضع تحت الملاحظة للمشجع بحيث أن يستطيع أن يستثار بواسطة NFκB. هذا التقرير الجيني يجعل من الممكن رصد إرشادات الخلية عبر TLRs : أخلاق sAP الناتج عن طريق ES0 وقياسه

بمقاييس لونية يجعل من الممكن تحديد نشاط هذا العنصر النشط بإعتباره جسم مضاد TLR2 ، TLR4 أو TLR5 .

تم تنفيذ الدراسة علي خلية الكلي لأجنة الانسان (HEK293) خطوات الخلية :

- HEK-Blue™-2 خلايا TLR2 ،
- HEK-Blue™-4 خلايا TLR4 ،
- HEK-Blue™-5 خلايا TLR5 ،

وقد تم الإحتفاظ بهذه الخطوط من الخلايا في إختيار HEK-Blue™ 10% وسط زرع ثم توزع في ألواح ذات 96 بئر في HEK-Blue™ كوسط كاشف في وجود ES0 لمدة 18 ساعة. يتم قراءة الألواح باستخدام الكالورميترية عند 620 نانوميتر

1.3.3 تنشيط TLR2

يحث المستخلص ES0 علي تنشيط TLR2 وفقا للتأثير إعتمادا علي الجرعة مع أعلي نشاط عند 100 نانوجرام / مل (شكل 7) .

2.3.3 تنشيط TLR4

يحث المستخلص ES0 علي تنشيط TLR4 مع أعلي نشاط عند 10 نانوجرام / مل (شكل 8) .

3.3.3 تنشيط TLR5

يحث المستخلص ES0 علي تنشيط TLR5 في طريقة الإعتماد علي الجرعة . يتم تثبيط هذا النشاط في وجود الأجسام المضادة ل TLR5 مما يدل علي خصوصية تنشيط المستخلص ES0 علي TLR5 (شكل 9) .

4.3 تثبيط البروتييز – المنشط المستقبل 2 (PAR2)

تثبيط البروتييز – المنشط بالمستقبلات عن طريق المستخلص ES0 تم تقسيمه علي خلايا كيراتينية بشرية من خط الخلية (HaCaT) بواسطة قياس تدفق الكالسيوم داخل الخلايا التي يسببها بعد التحفيز المحدد ل PAR2 مع انزيم ستارتيم كورنيم تربتيك (SCTE). يتم استخدام مسيار Fluo-4/AM الضوئي : شكل الاستير يسهل إختراقها بواسطة التغلغل السلبي في الخلية ؛ فقط علي شكل ديسترفيد منضمة إلي أيونات الكالسيوم ويكون مثار تحت ومضات 485 نانوميتر وتنبعث عند 535 نانوميتر.

يتم إدراج المسيار الفلورسينت لمدة 30 دقيقة في الخلايا الملقحة في ألواح 96 – بئر ثم يتم وضع المستخلص ES0 في الحضانة لمدة 30 دقيقة. تدفق الكالسيوم يتم قياسه في لئر لئر في الوقت الحقيقي وفقا للحركية قبل وبعد حقن SCTE. يتم قراءة الألواح باستخدام قارئ ميتراس ال بي 940 (برتهولد تكنولوجي) .

يثبط المستخلص ES0 نشاط PAR2 في طريقة الإعتماد علي الجرعة التي يسببها الإنسان SCTE (شكل 10) .

5.3 تعديل من الأهداف من إلتهاب الجلد الإستشرائي علي الكيراتينية

تم إجراء الدراسة علي بشرة كيراتينية بشرية (NHEK, K-SFM مستنبت) في سياق إستثارة النمط الظاهري للاكزيما. تم دراسة نشاط ES0 علي الكيراتينية المبدية نمط إلتهاب جلدي ظاهري

بعد التحفيز لمدة 24 ساعة مع بولي I : C + IL-4 + IL-13 + TNF-α و تحليلها بواسطة جهاز PCR يعبر علي لوحة من 32 جين مختار .

علي الكيراتينية (القرنية) ، يثبط المستخلص ES0 وفقا للتأثير إعتمادا علي الجرعة 15 هدف بين الوسطاء اللذين شاركوا في علم أمراض الجلد الإستشرائي ، ويمكن رؤيتها بوضوح في الجدول 7 أدناه (النتائج تشير لكل الجينات المستهدفة نسبة تثبيط تم الحصول عليها) .

		ES0			ديكساميثاسون
		10ميكروجرام/مل	**30**ميكروجرام/مل	**60**ميكروجرام/مل	**2** ميكرو مول
سيتوكينات	TSLP	% 56	% 75	% 92	% 91
	IL-1α	% 35	% 46	% 59	% 54
	IL-18	%27	% 44	% 65	% 44
	IFN-β1	% 66	% 82	% 90	% 49
كيموكينيز	IL-8	%37	% 55	% 88	% 75
	MIP-1α	%10	% 43	% 75	% 76
	RANTES	%15	% 44	% 65	% 12
	MCP-3	%43	% 63	% 88	برو 20 %
	TARC	%58	% 64	% 39	برو 20 %
	MIP-3α	%41	% 61	% 80	% 40
	MDC	%16	% 44	% 58	% 45
	Skinkine	%28	% 32	% 39	% 59
مستقبلات	IL-4-R	%30	% 45	% 69	% 75
	RARRES3	%30	% 47	% 63	% 28
	TLR3	%22	% 50	% 60	برو 29 %

جدول 7

6.3 إيثارة البيتيدات المضادة للميكروبات

تم دراسة نشاط المستخلص ES0 علي البيتيدات المضادة للميكروبات والبروتينات علي خط خلية كيراتينية HaCaT : بعد 3 ساعات من المعالجة في وجود ES0 ، تم إستعادة الخلايا من أجل التحليل للتعبير عن الأهداف المضادة للميكروبات بواسطة RT-PCR كمي ؛ يتم إستخلاص الحمض النووي الإجمالي وتتم معايرته ؛ بعد النسخ العكسي من mRNA الي cDNA ، تجري خطوة التكبير PCR الكمي في أطباق ذات 96 – فتحة علي نظام PCR الكمي iCycler (بيو – راد). النتائج التي تم الحصول عليها يتم التعبير عنها بكمية نسبية (RQ) من mRNA بعد المعالجة بواسطة ES0 بالنسبة للتحكم بدون العنصر النشط. يتم استخدام IL-1β بالتوازي كمؤشر إيجابي للتعبير عن البيتيدات المضادة للميكروبات. ويعتبر تنظيم التعبير الجيني للإهتمام منظم عندما RQ≥2 (استثارة) أو RQ≤0.5 (تثبيط) .

المستخلص ES0 يحث علي التعبير عن البيتيدات المضادة للميكروبات و البروتينات hBD2 ، hBD3 ، S1007A ، LL37 ، PI3 ، RNase 7 و NOD2 (شكل 11) .

مثال 4 : صياغة كريم " وجه وجسم " يتضمن المستخلص البكتيري ES0

مستخلص ES0	% 5 – 0.1
زيت زهرة الربيع المسائية	% 3 – 1
جليسين	% 0.4 – 0.1
سيراميدات	% 0.3 – 0.1
مغذي	% 20 – 5
مستحلب	% 7 – 2

كابريك / كابريك تراي جليسريد	% 10 – 1
المواد الحافظة	
المياه بنسبة	% 100

مثال 5 : صياغة جيل منظف " للوجه والجسم " متضمن مستخلص البكتيري ES0

مستخلص ES0	% 5 – 0.1
زيت زهرة الربيع المسائية	% 2 – 0.5
جليسين	% 0.4 – 0.1
سيراميدات	% 0.4 – 0.1
منشط سطحي	% 20 – 10 في الحالة النشطة
مغذي	% 15 – 5
المواد الحافظة	
المياه حتي نسبة	% 100

عناصر الحماية

1- البكتيريا الغير ضارة سالبة الجرام وتنتمي إلي عائلة بيتا بروتيوباكتيريا ، فئة فرعية نيسرياسيا ، وتتميز في أن التسلسل النيكلوتيدي للجين 16S rRNA كما يقال بكتيري متضمن تسلسل SEQ ID No. 1 .

2- بكتيريا وفقا لعنصر الحماية 1 ، تتميز في أنها تتضمن علي الأقل بلازميد واحد متضمن تسلسل SEQ ID No. 2 ، أو أي تسلسل مع علي الأقل 80% تطابق مع تسلسل SEQ ID No. 2 .

3- بكتيريا وفقا لعنصر الحماية 1 أو عنصر الحماية 2 ، تتميز في أنها تكون غير خيطية .

4- بكتيريا وفقا لأي من عناصر الحماية من 1 إلي 3 ، مودعة مع CNCM في 8 أبريل 2010 ، تحت مرجع 4290-I أو أي متغير آخر .

5- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 5 ، يتميز في أنه يتم الحصول عليه بعد معالجة معلق البكتيريا في مثل الطريقة للتخلص من المكونات داخل الخلايا .

6- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 5 ، يتميز في أنه يتم الحصول عليه بعد معالجة معلق البكتيريا في مثل الطريقة للتخلص من المكونات داخل الخلايا .

7- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 6 ، تتميز في أن كما يقال المكونات الداخلية للخلايا تتضمن أحماض نووية علي الأقل .

8- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 6 أو عنصر الحماية 7 ، تتميز في أنه يتضمن جزء E0 متضمن علي الأقل بروتينات سطحية ، بروتينات بلازمية وبروتينات تنشأ من السوط

9- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 8 ، تتميز في أن البروتينات السطحية تتكون من بورينات ، OmpA ، سكريات عديدة دهنية و / أو بروتينات دهنية .

10- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 6 أو 7 ، يتميز في أنه يحتوي علي جزء S0

متضمن علي الأقل ببتيدات مفرزة وبروتينات والأيضات الثانوية .

11- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 6 أو 7 ، يتميز في أنه يحتوي علي جزء ES0 متضمن علي الأقل جزء E0 وجزء S0 .

12- مستخلص بكتيري وفقا لعنصر الحماية 11 ، يتميز في أنه يحتوي علي جزء ES0 مع شكل بروتين ، تم الحصول عليه عن طريق SDS-PAGE ، والذي يحتوي علي ثلاث نطاقات أساسية مناظرة لأوزان جزيئية تتراوح بين 30 كيلودالتون و36 كيلودالتون ، 41 كيلودالتون و 45 كيلودالتون و 47 كيلودالتون و 51 كيلودالتون ، علي التوالي .

13- استخدام بكتيريا وفقا لأي من عناصر الحماية 1 إلي 4 و / أو مستخلص بكتيري وفقا لأي من عناصر الحماية من 5 إلي 9 و 12 لتحضير التركيبة المعدة لتنشيط TLR2 ، TLR4 و TLR5 .

14- استخدام بكتيريا وفقا لأي من عناصر الحماية 1 إلي 4 و / أو مستخلص بكتيري وفقا لأحد عناصر الحماية 10 أو 12 لتحضير وتكوين الأجسام المضادة ل PAR2 .

15- استخدام بكتيريا وفقا لأي من عناصر الحماية 1 إلي 4 و / أو مستخلص بكتيري وفقا لأحد عناصر الحماية 5 إلي 12 لتحضير التركيبة المعدة للمعالجة و / أو الوقاية من إضطرابات الإلتهابات الجلدية .

16- استخدام وفقا لعنصر الحماية 13 ، تتميز في أن كما يقال إضطرابات الإلتهابات الجلدية تتكون من الإكزيما الحكة ، الإكزيما والصدفية .

17- تركيبة تتضمن ، كمادة فعالة ، علي الأقل واحد من البكتيريا وفقا لأي من عناصر الحماية 1 إلي 4 و / أو مستخلص بكتيري وفقا لأي من عناصر الحماية 5 إلي 12 .

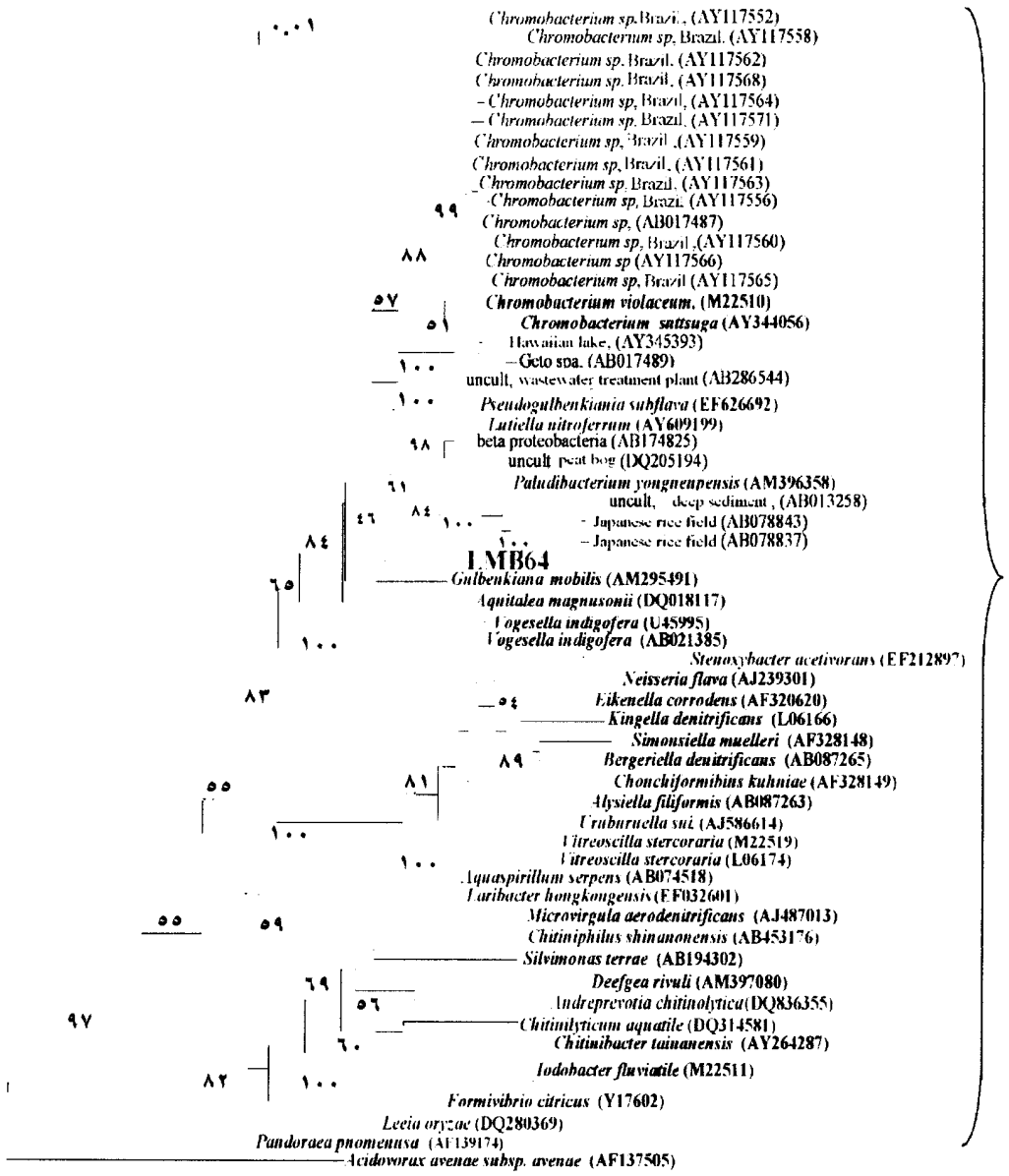
18- تركيبة وفقا لعنصر الحماية 15 ، لمعالجة إضطرابات الإلتهابات الجلدية .

19- تركيبة وفقا لعنصر الحماية 18 ، تتميز في أن إضطرابات الإلتهابات الجلدية تتكون

من إلتهاب الجلد التأتبي ، الحكة ، الإكزيما والصدفية .

20- تركيبة مستحضرات تجميل أو الأمراض الجلدية وفقا لأي من عناصر الحماية 17 إلي 19 ، تتميز في أنها تضم أيضا واحد أو أكثر نموذجية مقبولة ومتوافقة مع علم الأمراض الجلدية .

MA 34734B1

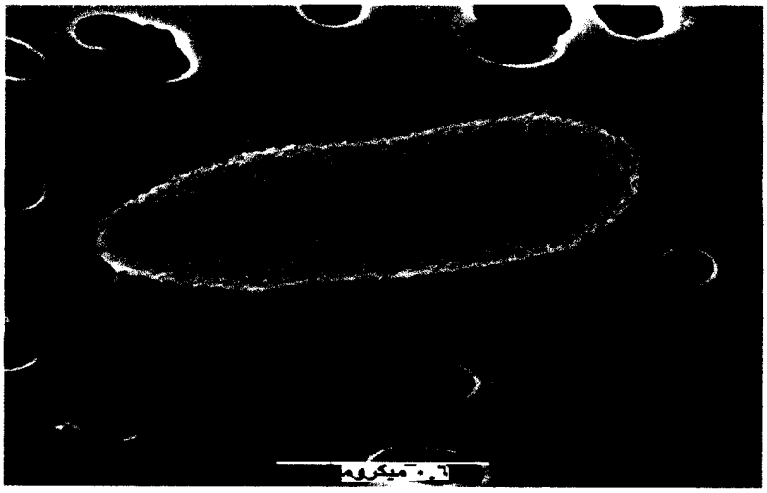


شكل ١

أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	1
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			

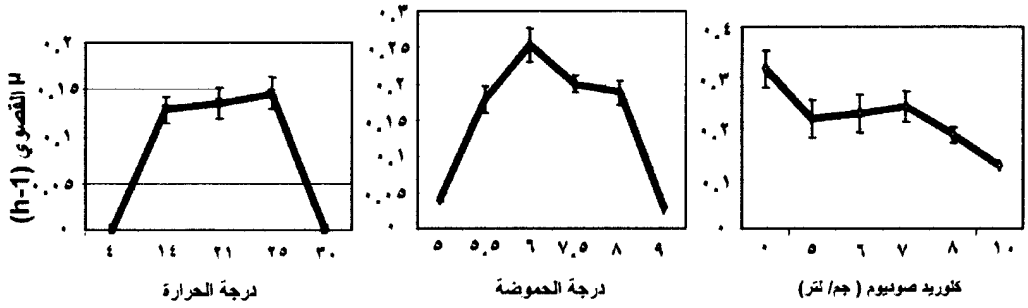
أ)

ب)

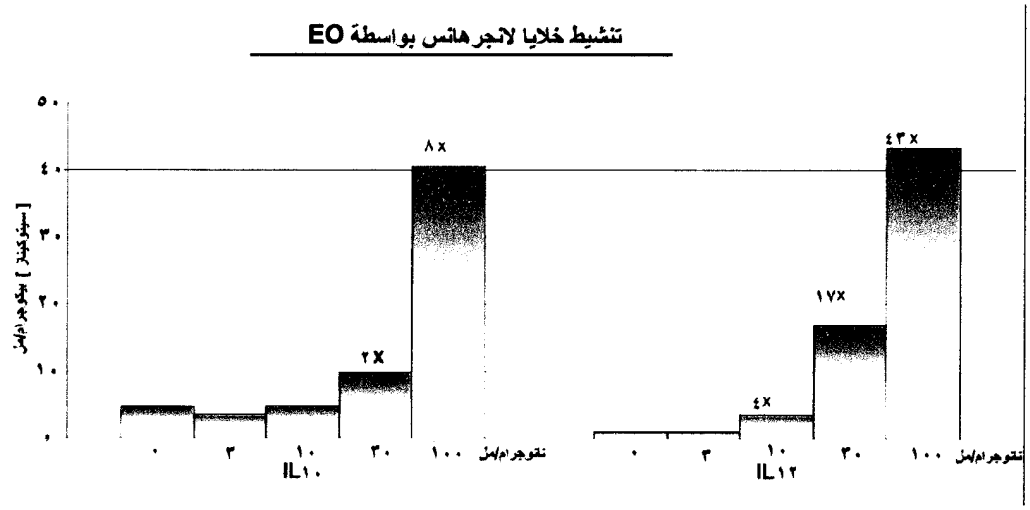


شكل ٢

أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	2
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			



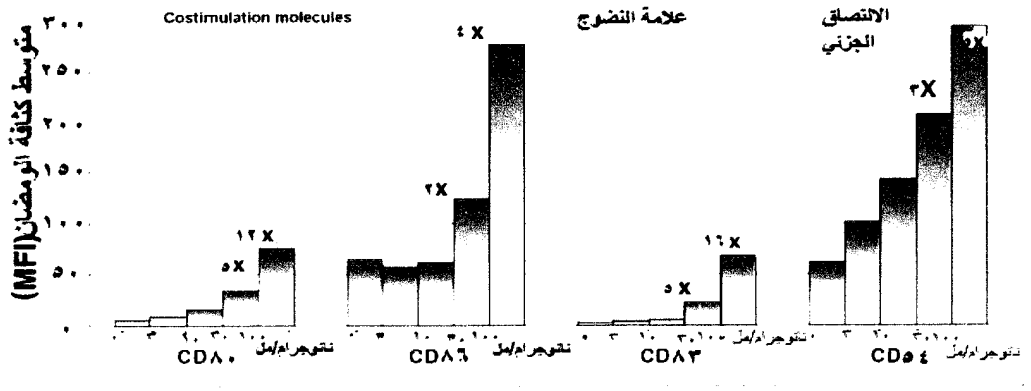
شـــكل ٣



شكـــل ٤

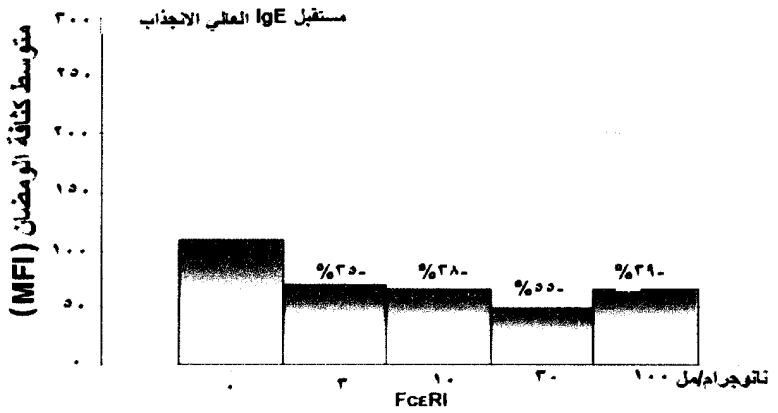
أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	3
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			

تنشيط خلايا لانجرهانس بواسطة EO



شـــكل ٥

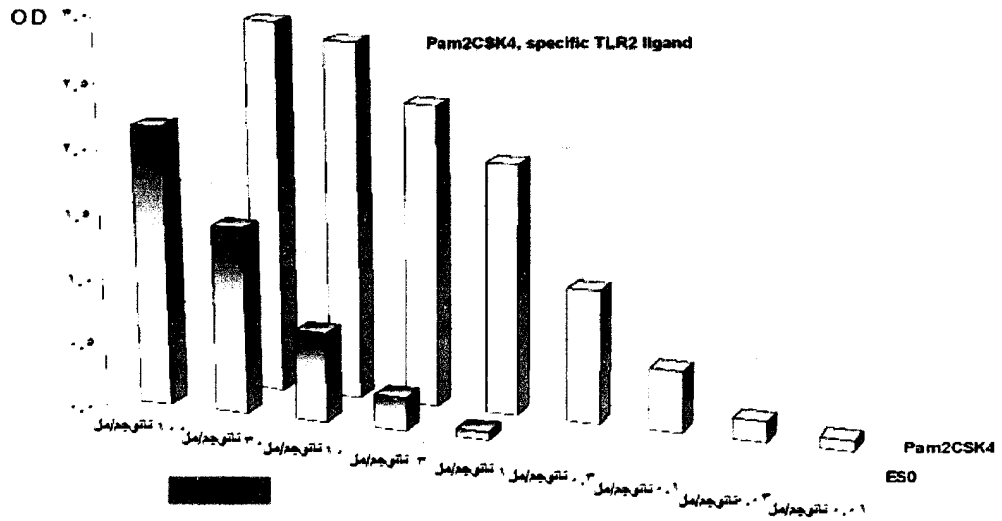
تنشيط FcεRI بواسطة EO



شـــكل ٦

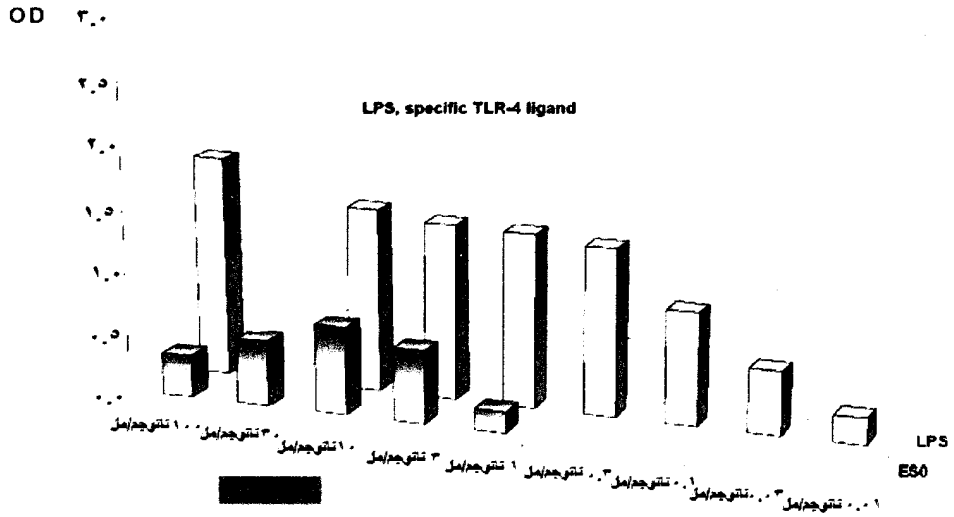
أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	4
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			

تنشيط TLR2 بواسطة ESO



شكـــل ٧

تنشيط TLR4 بواسطة ESO

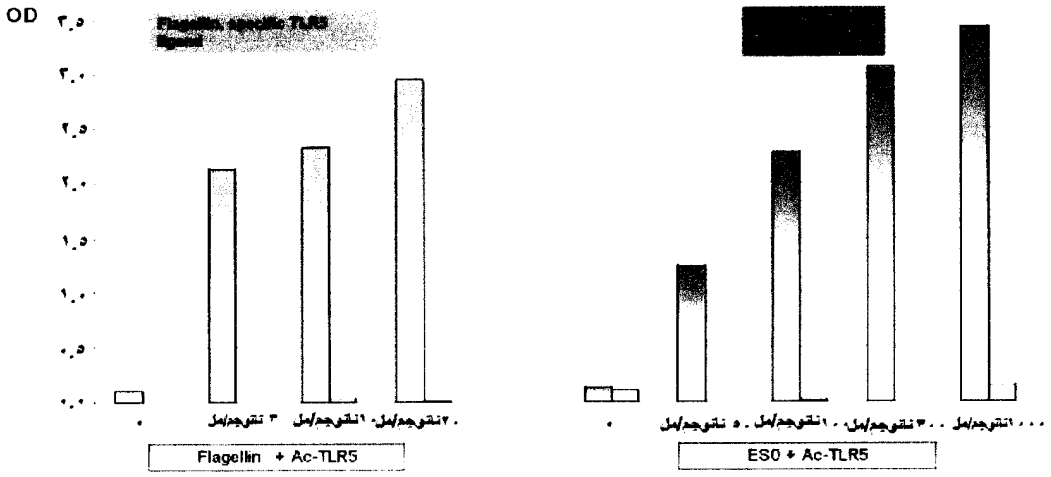


شكـــل ٨

أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	5
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			

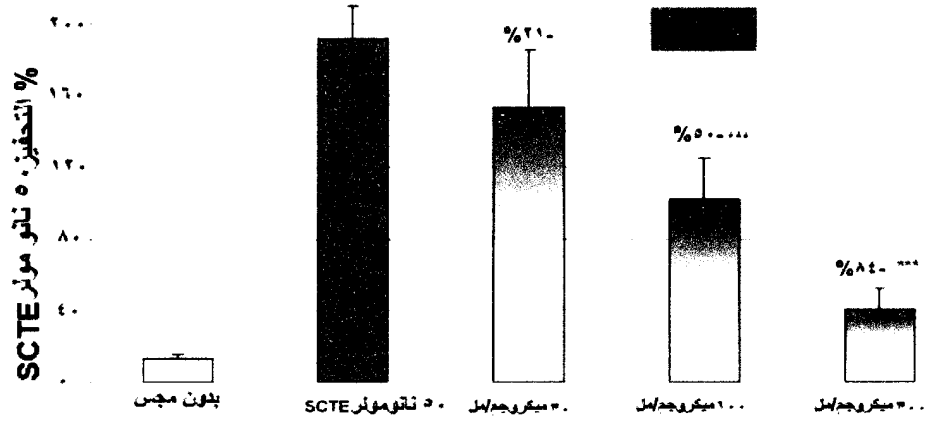
٨/٦

تنشيط TLR-5 بواسطة ESO



شكـــل ٩

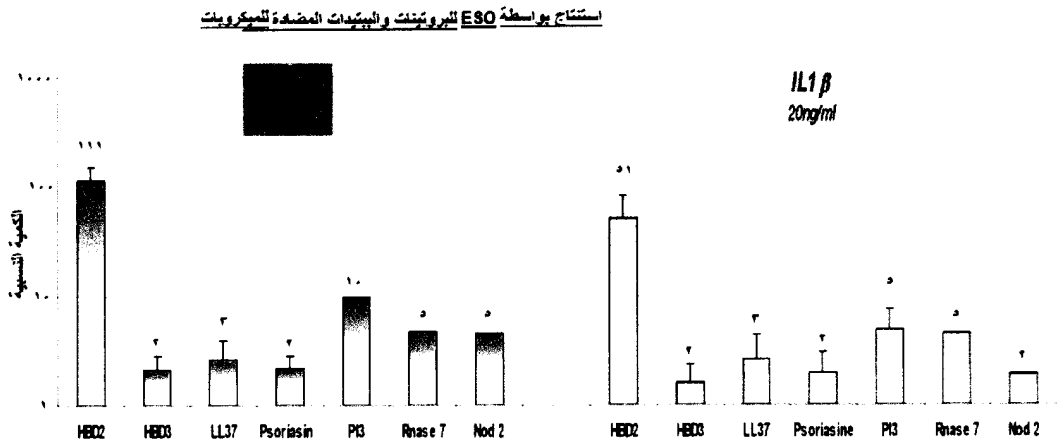
ESO، تحديد نشاط الاجسام المضادةعلىPAR2



التحفيز بواسطة تريبسين بشري، SCTE، من أجلPAR2

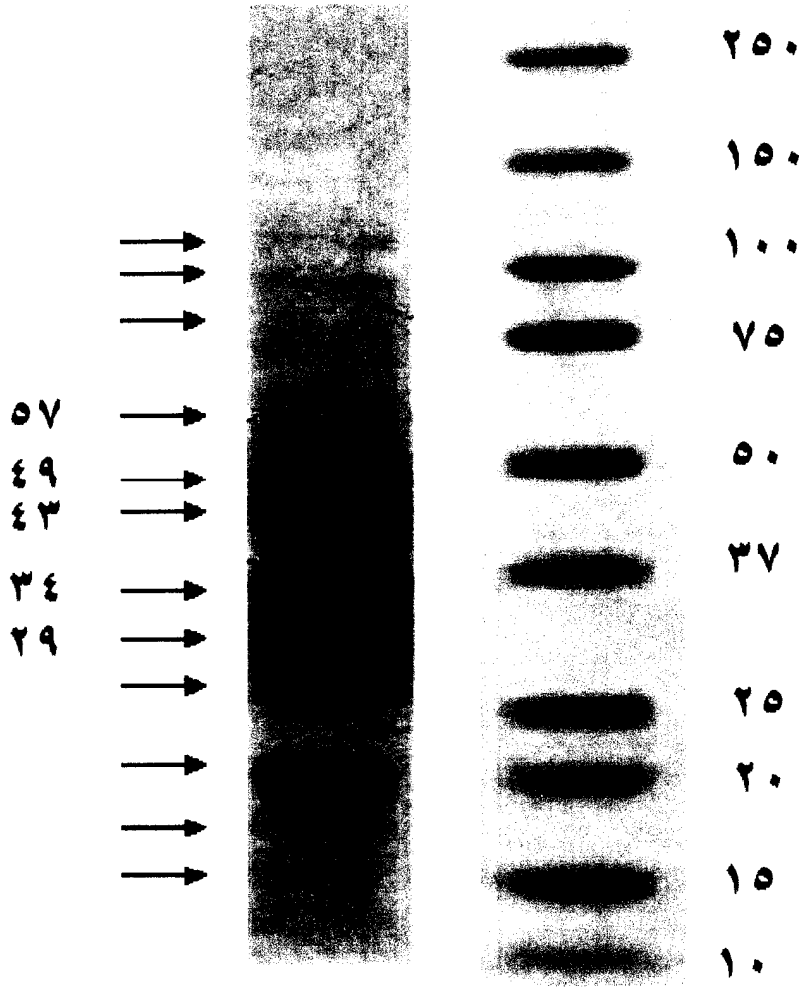
شكـــل ١٠

أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	6
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			



شكـــل ١١

أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	7
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			



شكل ١٢

أصل			
اسم الطالب			
عدد اللوحات	8	رقم اللوحة	8
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			