



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102549143 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201080039417. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 08. 26

C12N 1/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/133 (2006. 01)

10-2009-0083621 2009. 09. 04 KR

A61K 35/74 (2006. 01)

PCT/KR2010/001787 2010. 03. 23 KR

A61K 39/00 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/53 (2006. 01)

2012. 03. 05

C12R 1/44 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2010/005721 2010. 08. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02011/027990 KO 2011. 03. 10

(71) 申请人 阿昂梅迪克斯公司

地址 韩国庆尚北道浦项市

(72) 发明人 高用松 金润根 李恩暎 洪成旭

金志贤 崔昇振

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 楼高潮

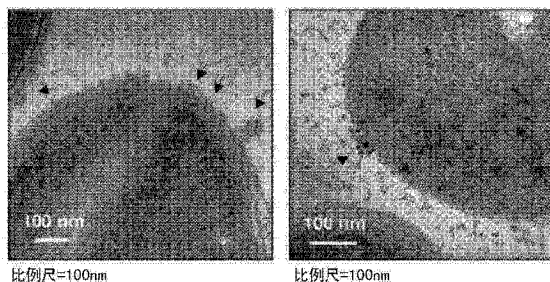
权利要求书 9 页 说明书 30 页 附图 25 页

(54) 发明名称

源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡 (extracellular vesicle, EV), 具体地说, 本发明提供了利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡构建的疾病动物模型、通过上述疾病动物模型筛选能够有效地预防或治疗疾病的备选物质的方法、能够预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的疫苗, 以及利用上述细胞外小泡诊断由革兰氏阳性细菌诱发疾病的致病因子的方法等。



1. 一种细胞外小泡,其特征在于:

上述小泡源于革兰氏阳性细菌。

2. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于厚壁菌门。

3. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌从由葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、放线菌属 (*Actinobacteria*) 及李斯特菌属 (*Listeria*) 构成的群中选择。

4. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌为,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 或枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

5. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于柔膜体纲。

6. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌为支原体 (*Mycoplasma*)。

7. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述细胞外小泡从动物的体内分泌物中分离得到。

8. 如权利要求 7 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述体内分泌物从由皮肤洗涤液、鼻涕、痰、大便、血液、小便、关节液、脑脊液、胸水及腹水构成的群中选择。

9. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述细胞外小泡从周边环境分离得到。

10. 如权利要求 11 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述周边环境从由室内空气、室外空气、土壤及海洋构成的群中选择。

11. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述细胞外小泡从细菌培养液中分离得到。

12. 如权利要求 1 所述的细胞外小泡,其特征在于:

上述细胞外小泡通过自然分泌或者人工分泌生成。

13. 一种源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的构建制造方法,其特征在于:

上述方法包括以下步骤:将革兰氏阳性细菌培养液通过离心分离提取上层液的步骤;将上述提取的上层液进行过滤的步骤。

14. 一种源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的制造方法,其特征在于:

上述方法包括以下步骤:(a) 将革兰氏阳性细菌培养液通过离心分离提取上层液的步骤;(b) 将上述提取的上层液通过第 1 过滤器进行过滤的步骤;(c) 将上述过滤物通过第 2 过滤器进行过滤的步骤;(d) 将得到的上述过滤物通过超速离心分离提取沉淀物的步骤。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于:

上述 (b) 步骤还包括:将过滤物浓缩的步骤。

16. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于:

还包括：经过上述 (d) 步骤后，将上述沉淀物进行悬浮的步骤。

17. 一种疾病动物模型，其特征在于：

上述模型利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡。

18. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述革兰氏阳性细菌属于厚壁菌门。

19. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述革兰氏阳性细菌从由葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、放线菌属 (*Actinobacteria*) 及李斯特菌属 (*Listeria*) 构成的群中选择。

20. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述革兰氏阳性细菌为，金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 或枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

21. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述革兰氏阳性细菌属于柔膜体纲。

22. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述革兰氏阳性细菌为支原体 (*Mycoplasma*)。

23. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述细胞外小泡从动物的体内分泌物中分离得到。

24. 如权利要求 23 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述体内分泌物从由皮肤洗涤液、鼻涕、痰、大便、血液、小便、关节液、脑脊液、胸水及腹水构成的群中选择。

25. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述细胞外小泡从周边环境分离得到。

26. 如权利要求 25 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述周边环境从由室内空气、室外空气、土壤及海洋构成的群中选择。

27. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述细胞外小泡从细菌培养液中分离得到。

28. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述细胞外小泡通过自然分泌或者人工分泌生成。

29. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述疾病从由皮肤疾病、呼吸器官疾病、消化器官疾病、生殖器官疾病、血管疾病、代谢疾病、肺部疾病、骨关节疾病及脑神经疾病构成的群中选择。

30. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述皮肤疾病为特应性皮炎。

31. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述呼吸器官疾病从由鼻炎、急性鼻窦炎、鼻咽癌、支气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺病、支气管扩张症、肺炎及肺癌构成的群中选择。

32. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型，其特征在于：

上述消化器官疾病从由口腔炎、口腔癌、食道炎、食道癌、胃炎、胃癌、炎症性肠炎及大肠癌构成的群中选择。

33. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型,其特征在于:

上述生殖器官疾病为阴道炎、宫颈炎或宫颈癌。

34. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型,其特征在于:

上述血管疾病从由败血症、血栓 / 栓塞症、动脉硬化、脑卒中、急性冠状动脉综合症、缺血性血管疾病构成的群中选择。

35. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型,其特征在于:

上述代谢疾病包为,糖尿病或肥胖。

36. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型,其特征在于:

上述肺部疾病为,肺气肿或急性呼吸窘迫综合症。

37. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型,其特征在于:

上述骨关节疾病为,关节炎或骨质疏松症。

38. 如权利要求 29 所述的疾病动物模型,其特征在于:

上述脑神经疾病为,痴呆症、退化性脑部疾病或忧郁症。

39. 如权利要求 17 所述的疾病动物模型,其特征在于:

上述疾病模型为老鼠。

40. 一种疾病动物模型构建方法,其特征在于:

将源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡注入动物。

41. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于:

上述注入从由皮肤注入、鼻腔注入、气管注入、口腔注入、皮下注入、腹腔注入、血管注入及肛门注入构成的群中选择。

42. 一种生物标志物的发掘方法,其特征在于:

上述方法利用通过源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡构建的疾病动物模型。

43. 一种预防或治疗疾病的备选药物的筛选方法,其特征在于:

上述方法利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡。

44. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于厚壁菌门。

45. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌从由葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、放线菌属 (*Actinobacteria*) 及李斯特菌属 (*Listeria*) 构成的群中选择。

46. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌为,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 或枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

47. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于柔膜体纲。

48. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌为支原体 (Mycoplasma)。

49. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡从动物的体内分泌物中分离得到。

50. 如权利要求 49 所述的筛选方法,其特征在于:

上述体内分泌物从由皮肤洗涤液、鼻涕、痰、大便、血液、小便、关节液、脑脊液、胸水及腹水构成的群中选择。

51. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡从周边环境分离得到。

52. 如权利要求 51 所述的筛选方法,其特征在于:

上述周边环境从由室内空气、室外空气、土壤及海洋构成的群中选择。

53. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡从细菌培养液中分离得到。

54. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡通过自然分泌或者人工分泌生成。

55. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述疾病从由皮肤疾病、呼吸器官疾病、消化器官疾病、生殖器官疾病、血管疾病、代谢疾病、肺部疾病、骨关节疾病及脑神经疾病构成的群中选择。

56. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述皮肤疾病为特应性皮炎。

57. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述消化器官疾病从由口腔炎、口腔癌、食道炎、食道癌、胃炎、胃癌、炎症性肠炎及大肠癌构成的群中选择。

58. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述生殖器官疾病为,阴道炎、宫颈炎或宫颈癌。

59. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述血管疾病从由败血症、血栓 / 栓塞症、动脉硬化、脑卒中、急性冠状动脉综合症、缺血性血管疾病构成的群中选择。

60. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述代谢疾病为,糖尿病或肥胖。

61. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述肺部疾病为,肺气肿或急性呼吸窘迫综合症。

62. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述骨关节疾病为,关节炎或骨质疏松症。

63. 如权利要求 55 所述的筛选方法,其特征在于:

上述脑神经疾病为,痴呆症、退化性脑部疾病或忧郁症。

64. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述方法利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡对细胞进行处理。

65. 如权利要求 64 所述的筛选方法,其特征在于:

上述细胞从由炎症细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、干细胞及成纤维细胞构成的群中选择。

66. 如权利要求 65 所述的筛选方法,其特征在于:

上述干细胞源于骨髓组织或者脂肪组织。

67. 如权利要求 43 所述的筛选方法,其特征在于:

上述方法对炎症媒介进行测定。

68. 一种用于预防或治疗由革兰氏阳性细菌感染的疫苗,其特征在于:

上述疫苗含有源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡。

69. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于厚壁菌门。

70. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌从由葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、放线菌属 (*Actinobacteria*) 及李斯特菌属 (*Listeria*) 构成的群中选择。

71. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述疫苗为,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 或枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

72. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于柔膜体纲。

73. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌为支原体 (*Mycoplasma*)。

74. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述疫苗基于增强效果或者减少副作用的目的而变形使用。

75. 如权利要求 74 所述的疫苗,其特征在于:

上述变形为使用转化的细菌。

76. 如权利要求 74 所述的疫苗,其特征在于:

上述变形为利用化学物质对细菌进行处理。

77. 如权利要求 76 所述的疫苗,其特征在于:

上述化学物质为药物。

78. 如权利要求 74 所述的疫苗,其特征在于:

上述变形为利用化学物质对细胞外小泡进行处理。

79. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述疫苗基于增强效果或者减少副作用的目的而与药物并用。

80. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述疫苗基于增强效果或者减少副作用的目的而与免疫增强剂并用。

81. 如权利要求 68 所述的疫苗,其特征在于:

上述感染从由皮肤感染、呼吸器官感染、泌尿生殖器官感染、骨关节感染、中枢神经系统感染及败血症构成的群中选择。

82. 一种用于预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的疫苗,其特征在于:

上述疫苗包含源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡。

83. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述革兰氏阳性细菌属于厚壁菌门。

84. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述革兰氏阳性细菌从由葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、放线菌属 (*Actinobacteria*) 及李斯特菌属 (*Listeria*) 构成的群中选择。

85. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述革兰氏阳性细菌为,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 或枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

86. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述革兰氏阳性细菌属于柔膜体纲。

87. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述革兰氏阳性细菌为支原体 (*Mycoplasma*)。

88. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述疫苗基于增强效果或者减少副作用的目的而变形使用。

89. 如权利要求 88 所述的疫苗,其特征在於:

上述变形为使用转化的的细菌。

90. 如权利要求 88 所述的疫苗,其特征在於:

上述变形为利用化学物质对细菌进行处理。

91. 如权利要求 90 所述的疫苗,其特征在於:

上述化学物质为药物。

92. 如权利要求 88 所述的疫苗,其特征在於:

上述变形为利用化学物质对细胞外小泡进行处理。

93. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述疫苗基于增强效果或者减少副作用的目的而与药物并用。

94. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述疫苗基于增强效果或者减少副作用的目的而与免疫增强剂并用。

95. 如权利要求 82 所述的疫苗,其特征在於:

上述疾病从由皮肤疾病、呼吸器官疾病、消化器官疾病、生殖器官疾病、血管疾病、代谢疾病、肺部疾病、骨关节疾病及脑神经疾病构成的群中选择。

96. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在於:

上述皮肤疾病为特应性皮炎。

97. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在於:

上述消化器官疾病从由口腔炎、口腔癌、食道炎、食道癌、胃炎、胃癌、炎症性肠炎及大肠癌构成的群中选择。

98. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在于:

上述生殖器官疾病为阴道炎、宫颈炎或宫颈癌。

99. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在于:

上述血管疾病从由败血症、血栓 / 栓塞症、动脉硬化、脑卒中、急性冠状动脉综合症、缺血性血管疾病构成的群中选择。

100. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在于:

上述代谢疾病为,糖尿病或肥胖。

101. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在于:

上述肺部疾病为,肺气肿或急性呼吸窘迫综合症。

102. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在于:

上述骨关节疾病为,关节炎或骨质疏松症。

103. 如权利要求 95 所述的疫苗,其特征在于:

上述脑神经疾病为,痴呆症、退化性脑部疾病或忧郁症。

104. 一种预防或治疗疾病的方法,其特征在于:

上述方法包括:将源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡按低于致死量的标准注入哺乳动物的步骤。

105. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于厚壁菌门。

106. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌从由葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、放线菌属 (*Actinobacteria*) 及李斯特菌属 (*Listeria*) 构成的群中选择。

107. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌为,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 或枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

108. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于柔膜体纲。

109. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述细胞外小泡从革兰氏阳性细菌培养液中分离得到。

110. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述细胞外小泡通过自然分泌或者人工分泌得到。

111. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述细胞外小泡基于增强或者减少副作用的目的而变形使用。

112. 如权利要求 111 所述的方法,其特征在于:

上述变形为使用转化的细菌。

113. 如权利要求 111 所述的方法,其特征在于:

上述变形为利用化学物质对细菌进行处理。

114. 如权利要求 111 所述的方法,其特征在于:

上述变形为利用化学物质对细胞外小泡进行处理。

115. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述注入基于增强效果或者减少副作用的目的而与药物并用。

116. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述注入基于增强效果或者减少副作用的目的而与免疫增强剂并用。

117. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述疾病从由革兰氏阳性细菌引发的皮肤感染、呼吸器官感染、泌尿生殖器官感染、骨关节感染、中枢神经系统感染及败血症构成的群中选择。

118. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述疾病为由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发或者导致恶化的疾病。

119. 如权利要求 118 所述的方法,其特征在于:

上述疾病从由皮肤疾病、呼吸器官疾病、消化器官疾病、生殖器官疾病、血管疾病、代谢疾病、肺部疾病、骨关节疾病及脑神经疾病构成的群中选择。

120. 如权利要求 104 所述的方法,其特征在于:

上述注入从由皮下注射、皮肤涂抹、静脉注射、鼻腔注入、舌下注入、气管吸入、口服、肛门注入及血管注入构成的群中选择。

121. 一种疾病致病因子的诊断方法,其特征在于:

上述方法利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡。

122. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于厚壁菌门。

123. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌从由葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、放线菌属 (*Actinobacteria*) 及李斯特菌属 (*Listeria*) 构成的群中选择。

124. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌为,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 或枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

125. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述革兰氏阳性细菌属于柔膜体纲。

126. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述疾病从由革兰氏阳性细菌引发的皮肤感染、呼吸器官感染、泌尿生殖器官感染、骨关节感染、中枢神经系统感染及败血症构成的群中选择。

127. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述疾病从由皮肤疾病、呼吸器官疾病、消化器官疾病、生殖器官疾病、血管疾病、代谢疾病、肺部疾病、骨关节疾病及脑神经疾病构成的群中选择。

128. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述方法为,对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡所含的遗传物质的碱基序列进行分析。

129. 如权利要求 128 所述的诊断方法,其特征在于:

上述遗传物质为 16S rRNA。

130. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述方法为,对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡所含蛋白质进行测定。

131. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述方法为,对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的免疫反应进行测定。

132. 如权利要求 131 所述的诊断方法,其特征在于:

上述免疫反应为,对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的抗体进行测定。

133. 如权利要求 121 所述的诊断方法,其特征在于:

上述诊断从由血液、痰、鼻涕、皮肤洗涤液、大便、小便、脑脊液、关节液、胸水及腹水构成的群中选择。

源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡 (extracellular vesicle, EV) 及利用该小泡的疾病模型、备选药物筛选方法、疫苗、疾病致病因子诊断方法等。

背景技术

[0002] 革兰氏阳性细菌的特征在于,在进行革兰氏染色时被染成紫色,与革兰氏阴性细菌相比,它是一种没有细胞外膜 (outer membrane) 的细菌。从系统分类学的角度讲,厚壁菌门、放线菌门、无壁菌门属于革兰氏阳性细菌。厚壁菌门与放线菌门的特征在于,细胞壁中的肽聚糖非常丰富,前者的遗传物质中 G+C 量较少,与此相反,后者的 G+C 量就非常多,无壁菌门的特征在于没有细胞壁。

[0003] 导致人生病的病原菌大部分都是革兰氏阳性细菌,其中,作为双球状细菌的代表性的病原菌是链球菌属 (Streptococcus) 和葡萄球菌属 (Staphylococcus),作为杆状细菌的代表性的病原菌是不形成孢子 (spore) 的棒状杆菌属 (Corynebacterium) 和李斯特菌属 (Listeria) 及形成孢子的芽孢杆菌属 (Bacillus) 与梭菌属 (Clostridium) 等。

[0004] 另外,革兰氏阴性细菌分泌的细胞外小泡与革兰氏阴性细菌诱发疾病之间的关联性最近正受到研究人员的广泛关注 [Kuehn, M. J., Kesty, N. C., Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. Genes Dev. 2005,19, 2645-2655]。虽然有研究披露革兰氏阴性细菌分泌的细胞外小泡是由细胞外膜 (outer membrane) 分泌的。但是,对于革兰氏阳性细菌来说,它没有细胞外膜,且细胞膜被细胞壁包裹着,到目前为止还没有披露分泌细胞外小泡或者源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的相关信息。

发明内容

[0005] 技术问题

本发明的目的在于,提供一种源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡。

[0006] 本发明的另一个目的在于,提供一种通过革兰氏阳性细菌分离提取细胞外小泡的方法。

[0007] 本发明的另一个目的在于,提供一种将源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡注入试验动物而提供疾病动物模型。

[0008] 本发明的另一个目的在于,提供一种通过疾病动物模型或者体外筛选系统筛选预防或治疗疾病的有效备选物质的方法。

[0009] 本发明的另一个目的在于,提供一种利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡能够有效预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的疫苗。

[0010] 本发明的另一个目的在于,提供一种利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡能够有效地预防或治疗针对革兰氏阳性细菌感染的疫苗。

[0011] 本发明的另一个目的在于,提供一种利用分离的细胞外小泡对由革兰氏阳性细菌

诱发的疾病的致病因子进行诊断的方法。

[0012] 本发明所要解决的技术问题并不仅限于上面提到的问题,对于上面未提到的问题或者其它相关问题本领域技术人员可通过以下的记述明确理解。

[0013] 技术方案

本发明的第一方面,提供了源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡。

[0014] 在本发明的一个实施例中,上述革兰氏阳性细菌虽然是构成厚壁菌门的细菌,但并不仅限于此。

[0015] 上述厚壁菌门包括:葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒状杆菌属 (*Croynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Norcardia*)、梭菌属 (*Clostridium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 及李斯特菌属 (*Listeria*),但并不仅限于此。

[0016] 在本发明的另一个实施例中,上述革兰氏阳性细菌虽然属于构成柔膜体纲 (Class) 的细菌,但并不仅限于此。

[0017] 上述柔膜体纲 (Class Mollicutes) 包括支原体 (*Mycoplasma*),但并不仅限于此。

[0018] 在本发明的另一个实施例中,上述革兰氏阳性细菌包括:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等。

[0019] 在本发明的另一个实施例中,上述源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡包括由栖息于动物体内的革兰氏阳性细菌分泌的小泡,但并不仅限于此。上述细胞外小泡可以从动物体内的分泌物中分离,上述动物体内的分泌物包括:皮肤洗涤液、鼻涕、痰、大便、血液、小便、关节液、脑脊液、胸水及腹水等。

[0020] 在本发明的另一个实施例中,上述源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡包括由栖息于周边环境的革兰氏阳性细菌分泌的小泡,上述周边环境包括:室内空气、室外空气、土壤及海洋等。

[0021] 在本发明的另一个实施例中,上述源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡包括由革兰氏阳性细菌培养液分泌的小泡,但并不仅限于此。

[0022] 依据本发明的另一实施例,上述细胞外小泡可以通过自然分泌或者人工分泌得到。

[0023] 本发明的第二方面,提供了一种源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的制造方法。

[0024] 在本发明的一个实施例中,上述制造方法包括以下步骤:将革兰氏阳性细菌培养液通过离心分离提取上层液的步骤;以及对上述提取的上层液进行过滤的步骤。

[0025] 在本发明的另一个实施例中,上述制造方法包括以下步骤:将革兰氏阳性细菌培养液通过离心分离提取上层液的步骤;将上述提取的上层液通过第1过滤器进行过滤的步骤;将上述过滤物通过第2过滤器进行过滤的步骤;以及将获得的上述过滤物通过超速离心分离提取沉淀物的步骤。

[0026] 在本发明的另一个实施例中,还可以包括:通过第1过滤器过滤后并对其过滤物进行浓缩的步骤。

[0027] 在本发明的另一个实施例中,对于上述提取沉淀物的步骤来说,还可以包括:将上述沉淀物悬浮的步骤。

[0028] 本发明的第三方面,提供了一种利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的疾病动物模型。

[0029] 本发明的革兰氏阳性细菌及细胞外小泡如前面所述。

[0030] 上述本发明的疾病,为局部疾病包括:特应性皮炎等皮肤疾病,,鼻炎、急性鼻窦炎、鼻咽癌、支气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺病、支气管扩张症、肺炎、肺癌等呼吸器官疾病,口腔炎、口腔癌、食道炎、食道癌、胃炎、胃癌、炎症性肠炎、大肠癌等消化器官疾病,阴道炎、宫颈炎、宫颈癌等生殖器官疾病,但并不仅限于此。

[0031] 另外,上述本发明的疾病,为全身疾病包括:败血症、血栓/栓塞症、动脉硬化、脑卒中、急性冠状动脉综合征、缺血性血管疾病等血管疾病,糖尿病、肥胖等代谢疾病,肺气肿、急性呼吸窘迫综合征等肺部疾病,关节炎、骨质疏松症等骨关节疾病,痴呆症、退化性脑部疾病、忧郁症等脑神经疾病,但并不仅限于此。

[0032] 在本发明的一个实施例中,上述动物可以是老鼠,但并不仅限于此。

[0033] 本发明的第四方面,提供了一种以将源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡注入动物为特征的疾病动物模型的构建方法。

[0034] 上述本发明的革兰氏阳性细菌、细胞外小泡及疾病如前面所述。

[0035] 上述本发明的注入包括:皮肤注入、鼻腔注入、气管注入、口腔注入、皮下注入、腹腔注入、血管注入、肛门注入等。

[0036] 本发明的第五方面,提供了一种利用通过源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡构建的疾病动物模型发掘生物标志物的方法。

[0037] 本发明的第六方面,提供了一种利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的疾病预防或治疗的备选药物的筛选方法。

[0038] 上述本发明的革兰氏阳性细菌、细胞外小泡及疾病如前面所述。

[0039] 在本发明的一个实施例中,上述筛选方法可以包括:将源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡注入细胞进行处理的步骤。上述细胞包括:炎症细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、干细胞等。另外,上述炎症细胞包括:单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞在组织中分化的细胞等,上述干细胞可以是源于骨髓组织或者脂肪组织的细胞,但并不仅限于此。

[0040] 在本发明的另一个实施例中,上述筛选方法包括:将备选物质与源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡一起注入后测定炎症相关媒介的标准或者对炎症相关信号传递过程进行评估的步骤。

[0041] 本发明的第七方面,为预防或治疗由革兰氏阳性细菌诱发的感染而提供了一种含有源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的疫苗。

[0042] 上述本发明的革兰氏阳性细菌及源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡如前面所述。

[0043] 依据本发明的一个实施例,由上述革兰氏阳性细菌引发的感染包括:皮肤感染、呼吸器官感染、泌尿生殖器官感染、骨关节感染、中枢神经系统感染及败血症等,但并不仅限于此。

[0044] 依据本发明的另一实施例,上述疫苗可以基于增强效果或者减少副作用的目的而变形使用。上述变形包括:使用转化的细菌、将化学物质注入细菌进行处理等,上述化学物质包括药物。

[0045] 依据本发明的另一实施例,上述细胞外小泡可以基于增强效果或者减少副作用的目的而变形使用。上述变形包括将化学物质注入细胞外小泡进行处理,上述化学物质包括药物。

[0046] 依据本发明的另一实施例,上述疫苗可以基于增强效果或者减少副作用的目的而与药物并用或者与免疫增强剂并用,但并不仅限于此。

[0047] 本发明的第八方面,为了预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发的疾病而提供了一种含有源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的疫苗。

[0048] 上述本发明的革兰氏阳性细菌、细胞外小泡、疾病等如前面所述。

[0049] 依据本发明的一个实施例,上述疫苗可以基于增强效果或者减少副作用的目的而变形使用。上述变形包括:使用转化的细菌、将化学物质注入细菌进行处理等,上述化学物质包括药物。

[0050] 依据本发明的另一实施例,上述细胞外小泡可以基于增强效果或者减少副作用的目的而变形使用。上述变形包括将化学物质注入细胞外小泡进行处理,上述化学物质包括药物。

[0051] 依据本发明的另一实施例,上述疫苗可以基于增强效果或者减少副作用的目的而与药物并用或者与免疫增强剂并用,但并不仅限于此。

[0052] 本发明的第九方面,提供了一种预防或者治疗疾病的方法,该方法包括将源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡按低于致死量的标准注入哺乳动物的步骤。

[0053] 上述本发明的革兰氏阳性细菌及源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡如前面所述。

[0054] 依据本发明的一个实施例,上述疾病包括:由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发或者导致恶化的疾病。上述本发明由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发或者导致恶化的疾病可以是包含特应性皮炎等皮肤疾病,鼻炎、急性鼻窦炎、鼻咽癌、支气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺病、支气管扩张症、肺炎、肺癌等呼吸器官疾病,口腔炎、口腔癌、食道炎、食道癌、胃炎、胃癌、炎症性肠炎、大肠癌等消化器官疾病,阴道炎、宫颈炎、宫颈癌等生殖器官疾病在内的局部疾病,但并不仅限于此。

[0055] 上述本发明的由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发或者导致恶化的疾病可以是包含败血症、血栓/栓塞症、动脉硬化、脑卒中、急性冠状动脉综合症、缺血性血管疾病等血管疾病,糖尿病、肥胖等代谢疾病,肺气肿、急性呼吸窘迫综合症等肺部疾病,关节炎、骨质疏松症等骨关节疾病,痴呆症、退化性脑部疾病、忧郁症等脑神经疾病在内的全身疾病,但并不仅限于此。

[0056] 依据本发明的另一实施例,上述疾病包括:由革兰氏阳性细菌引发的感染。

[0057] 上述本发明的由革兰氏阳性细菌引发的感染包括:皮肤感染、呼吸器官感染、泌尿生殖器官感染、骨关节感染、中枢神经系统感染及败血症等,但并不仅限于此。

[0058] 依据本发明的另一实施例,上述注入包括:皮下注射、皮肤涂抹、静脉注射、鼻腔注入、舌下注入、气管吸入、口服、肛门注入等。

[0059] 依据本发明的另一实施例,上述细胞外小泡可以基于增强效果或者减少副作用的目的而变形使用。上述变形包括:使用转化的细菌、将化学物质注入细菌进行处理、将化学物质注入细胞外小泡进行处理等,上述化学物质包括药物。

[0060] 依据本发明的另一实施例,上述注入可以基于增强效果或者减少副作用的目的而

与药物并用或者与免疫增强剂并用,但并不仅限于此。

[0061] 本发明的第十方面,提供了一种应用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡对疾病的致病因子进行诊断的方法。

[0062] 上述本发明的革兰氏阳性细菌及细胞外小泡如前面所述。

[0063] 依据本发明的一个实施例,上述疾病包括由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发或者导致恶化的疾病。由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发或者导致恶化的疾病如前面所述。

[0064] 依据本发明的另一实施例,上述疾病包括由革兰氏阳性细菌引发的感染。上述本发明的由革兰氏阳性细菌引发的感染包括:皮肤感染、呼吸器官感染、泌尿生殖器官感染、骨关节感染、中枢神经系统感染及败血症等,但并不仅限于此。

[0065] 在本发明的另一个实施例中,上述应用包括:对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡所含遗传物质的碱基序列进行分析,上述遗传物质包括 16S rRNA,但并不仅限于此。

[0066] 依据本发明的另一实施例,上述应用包括:对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡所含蛋白质进行测定或者对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的免疫反应进行测定,但并不仅限于此。上述免疫反应的测定包括:对源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的抗体进行测定,但并不仅限于此。

[0067] 依据本发明的另一实施例,上述诊断可以利用从血液、痰、鼻涕、皮肤洗涤液、大便、小便、脑脊液、关节液、胸水或者腹水等提取的样本,但并不仅限于此。

[0068] 技术效果

本发明通过发现栖息于体内或者存在于周边环境的革兰氏阳性细菌即葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)分泌细胞外小泡,而源于葡萄球菌的细胞外小泡不仅诱发以皮肤及粘膜出现炎症为特征的局部疾病,而且被血液吸收后还会引发以全身出现炎症反应为特征的败血症、因血液凝固而导致的血栓/栓塞症等全身疾病,从而提供一种利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡的疾病模型,预防或治疗疾病的备选药物的筛选技术,利用细胞外小泡的疾病预防或治疗用疫苗技术及疾病致病因子的诊断方法等。

[0069] 具体地说,当将源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡分离后注入细胞时,会分泌炎症媒介;当局部注入时,会引发皮肤或粘膜出现炎症;当通过腹腔注入时,细胞外小泡流入血管内会引发以全身出现炎症反应为特征的败血症,同时,还会诱发因血液凝固而导致的血栓/栓塞症等疾病。本发明可以利用以上特征提供一种有效地筛选疾病动物模型及备选药物的筛选方法。另外,还可以通过利用源于肠道共生细菌的细胞外小泡的疾病模型或者体外筛选系统有效地发掘可以预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡而引发疾病的药物。另外,可以通过将源于肠道共生细菌的细胞外小泡本身或者将其变形后注入以调节免疫反应,从而将其应用于有效地预防或治疗由革兰氏阳性细菌引发的感染或者由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的疫苗的研发。另外,还可以利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡研发诊断革兰氏阳性细菌的感染或者由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的致病因子的技术。

附图说明

[0070] 图 1 是通过透射式电子显微镜观察到的在金黄色葡萄球菌中形成并分泌细胞外

小泡的图像；

图 2 是通过扫描电子显微镜观察到的在金黄色葡萄球菌中形成并分泌细胞外小泡的图像；

图 3 是通过透射式电子显微镜 (a) 和扫描电子显微镜 (b) 观察到的从金黄色葡萄球菌中提取的细胞外小泡的图像；

图 4 是对从金黄色葡萄球菌中提取的细胞外小泡的粒度进行分析的分布图；

图 5 是葡萄球菌的全细胞蛋白 (WC), 细胞壁蛋白 (CW), 膜蛋白 (MP), 细胞溶质蛋白 (CY) 及细胞外小泡 (EV) 蛋白经考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE 后的照片；

图 6 是通过透射式电子显微镜观察到的在表皮葡萄球菌中形成并分泌细胞外小泡的图像；

图 7 是通过扫描电子显微镜观察到的在表皮葡萄球菌中形成并分泌细胞外小泡的图像；

图 8 是通过透射式电子显微镜 (a) 和扫描电子显微镜 (b) 观察到从表皮葡萄球菌中提取的细胞外小泡的图像；

图 9 是对从表皮葡萄球菌中提取的细胞外小泡的粒度进行分析的分布图；

图 10 是通过透射式电子显微镜观察到的在枯草芽胞杆菌中形成并分泌细胞外小泡的图像；

图 11 是通过扫描电子显微镜观察到的在枯草芽胞杆菌中形成并分泌细胞外小泡的图像；

图 12 是通过透射式电子显微镜 (a) 和扫描电子显微镜 (b) 观察到的从枯草芽胞杆菌中提取的细胞外小泡的图像；

图 13 是对从枯草芽胞杆菌中提取的细胞外小泡的粒度进行分析的分布图；

图 14 是对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡蛋白质组进行分析的维恩图。可以看出, 通过凝胶 (in-gel) 分解法鉴定 41 个, 通过溶解 (in-solution) 降解法鉴定 84 个, 其中有 35 个在两种方法中都能观察到, 因此总共鉴定出 90 个蛋白质；

图 15 是显示将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入老鼠巨噬细胞处理时炎症性细胞因子即 TNF- α 和 IL-6 的分泌量增加的示意图；

图 16 是显示将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入从老鼠皮肤提取的成纤维细胞处理时, 产生包含多种细胞因子的炎症性媒介的示意图；

图 17 是将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入老鼠处理时通过诱发类似特应性皮炎的症状的实验方法按每周 3 次处理 4 周后再间隔 48 小时后对多个指标进行确认的示意图；

图 18 是根据图 17 将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入老鼠进行处理后在皮肤组织中出现了表皮层的增殖 (红色圆圈所示部分) 和嗜酸性粒细胞的渗透 (箭头所示) 等类似特应性皮炎症状的示意图；

图 19 是将从图 18 看到的皮肤组织的症状进行数值化处理的示意图。可以看出, 在源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的作用下表皮的厚度、渗透的肥胖细胞和嗜酸性粒细胞的数量都增加了；

图 20 是根据图 17 将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入老鼠处理后对处理后的皮

肤组织中存在的炎症性细胞因子的量进行测定的示意图。可以看出,利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡处理后其量增加了;

图 21 是显示将患者的患部洗涤液浓缩后通过酶联免疫吸附试验确认源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡中存在的抗原的示意图;

图 22 是显示患有特应性皮炎的患者血清中针对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的 IgE 量与正常对照群相比显著增加的示意图;

图 23 是将对观察老鼠气管吸入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡引发先天免疫反应情况的方法进行图形化处理的示意图;

图 24 是显示按图 23 所示方法吸入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的老鼠肺泡灌洗液中存在的炎症细胞的数量和炎症性细胞因子 IL-6 的量与对照群相比增加的示意图;

图 25 是将对观察老鼠气管吸入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡而引发后天免疫反应情况的方法进行图形化处理的示意图;

图 26 是显示按图 25 所示方法吸入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的老鼠肺泡灌洗液中存在的炎症细胞的数量和 IL-17 的量与对照群相比增加了,并由此显示气管粘膜上诱发了 Th17 的后天免疫反应的示意图;

图 27 是确认源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发老鼠死亡的实验方案(protocol);

图 28 是用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡将老鼠处理后显示其存活率的示意图;

图 29 是显示由源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的全身炎症反应的指标之一即低烧的示意图;

图 30 是构建源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡引发弥散性血管内凝血动物模型的方案;

图 31 是将图 30 中利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡处理后对摘出的肺组织进行 H&E 染色的示意图;

图 32 是将图 30 中利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡处理后对血浆内 D-二聚体(Dimer)的增加进行测定的示意图;

图 33 是将图 30 中利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡处理后对血浆内血小板的数量减少进行测定的示意图;

图 34 是利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡发掘药物备选物质的方法的模式图;

图 35 是将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡和前药同时注入老鼠巨噬细胞处理后对培养液中存在的 IL-6 的量以仅用细胞外小泡单独处理的阳性对照群的测定值为基准用百分比显示的函数图;

图 36 是将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入老鼠鼻腔后将前药即多塞平(doxepin)和氟哌啶醇(haloperidol)注入腹腔时对支气管肺泡灌洗液内 IL-6 分泌进行测定的示意图;

图 37 是通过荧光显微镜观察到的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡向老鼠树突状细胞内摄取(uptake)的图像;

图 38 是显示将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入老鼠树突状细胞处理时 IL-12p40 细胞因子的分泌增加的示意图;

图 39 是显示将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡注入老鼠树突状细胞处理时树突状细胞表面的 CD40 和 MHCII 的表达增加的示意图；

图 40 是对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱导的免疫反应的指标即抗体进行测定的方案；

图 41 是显示通过图 40 所示方法获得的老鼠血清中细胞外小泡特异 IgG 抗体增加的示意图；

图 42 是将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡作为预防疫苗注入老鼠后对免疫学指标进行测定的方案；

图 43 是显示通过图 42 所示方法获得的老鼠脾脏细胞中 IFN- γ 和 IL-17 的细胞因子增加的函数图；

图 44 是显示将老鼠皮肤进行剥带(Tape stripping)处理后按每周 3 次共进行 4 周通过修补(patch)法注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的方法的示意图；

图 45 是显示按图 42 所示方法将小泡处理后对抗体的量进行比较时针对老鼠血清内源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的 IgG 抗体的量与对照群相比增加的示意图；

图 46 是显示按图 42 所示方法将小泡处理后用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡刺激脾脏细胞时,细胞外小泡特异性地增加 Th1 和 Th17 细胞因子的示意图；

图 47 是将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡和 polyI:C 复合注入后对葡萄球菌细胞进行激发(challenge)并评估免疫反应指标的方案；

图 48 是显示通过图 47 所示方法获得的老鼠血清中细胞外小泡的特异 IgG 抗体增加的示意图；

图 49 是显示通过图 47 所示方法获得的老鼠脾脏细胞中 IFN- γ 和 IL-17 的细胞因子增加的函数图；

图 50 是向老鼠咽喉注入两种用量的金黄色葡萄球菌后显示其存活率的示意图；

图 51 是显示在由源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡和 polyI:C 组合构成的疫苗作用下源于葡萄球菌的肺炎模型中老鼠存活率增加的示意图；

图 52 是显示向老鼠注入源于肠球菌的细胞外小泡后获得的血清中小泡特异 IgG 抗体增加的函数图；

图 53 是显示向老鼠注入源于肠球菌的细胞外小泡后获得的脾脏细胞中 IFN- γ 细胞因子增加的函数图；

图 54 是对细胞外小泡内的 16S rRNA 利用 RT-PCR, DNA 利用 PCR 进行分析的示意图。

具体实施方式

[0071] 在本发明中,所谓的“革兰氏阳性细菌”是指包括以细胞没有外膜且细胞壁较厚为特征的厚壁菌门(Phylum Firmicutes)及放线菌门(Phylum Actinobacteria),以及虽然没有细胞壁但进化性地源于厚壁菌门的柔膜体纲(Class Mollicutes),有细胞壁的细菌包括:葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、肠球菌属(Enterococcus)、芽孢杆菌属(Bacillus)、棒状杆菌属(Croynebacterium)、诺卡氏菌属(Norcardia)、梭菌属(Clostridium)、乳杆菌属(Lactobacillus)、放线菌属(Actinobacteria)、李斯特菌属(Listeria)等,没有细胞壁的细菌包括支原体

(Mycoplasma) 等。

[0072] 在本发明中,所谓的“体内”是指包括动物皮肤的表面、动物粘膜的内腔及表面,在这里,“粘膜”是指包括消化器官、呼吸器官、泌尿生殖器官,例如:“消化器官”是指口腔、食道、胃、小肠、大肠、直肠、肛门、胆管、胆囊、胰管等的内腔及表面,“呼吸器官”是指结膜、鼻腔、鼻窦、鼻咽、气管、支气管、细支气管、肺泡等的内腔及表面,“泌尿生殖器官”是指肾脏、输尿管、膀胱、尿道、阴道、宫颈、子宫等的内腔及表面,但并不仅限于此。

[0073] 在本发明中,所谓的“周边环境”是指除上述体内之外的自然界,例如:包括除动物体内之外的室内空气、室外空气、土壤、海洋等,但并不仅限于此。

[0074] 在本发明中,所谓的“源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡”是指包括栖息在体内或者周边环境的革兰氏阳性细菌自然或者人工分泌的小泡,其特征不在于,比原来的细胞小,但并不仅限于此。

[0075] 革兰氏阳性细菌一般是指通过革兰氏染色染成紫色的细菌,其特征不在于,与革兰氏阴性细菌相比,没有细胞外膜,细胞壁上有大量的肽聚糖。

[0076] 从系统分类上看,作为构成以细胞壁较厚且遗传物质中 G+C 的量较少为特征的厚壁菌门的革兰氏阳性细菌来说,球状(cocci)的葡萄球菌属、链球菌属、肠球菌等和杆状(rod)的芽孢杆菌属、棒状杆菌属、诺卡氏菌属、梭菌属、乳杆菌属、李斯特菌属等具有代表性。

[0077] 虽然没有细胞壁但进化性地源于厚壁菌门的柔膜体纲也属于革兰氏阳性细菌,在这里,支原体是代表性的细菌。

[0078] 对人类引起感染的病原菌大多为革兰氏阳性细菌,在这里,链球菌属、葡萄球菌属、棒状杆菌属、李斯特菌属、芽孢杆菌属、梭菌属等是具有代表性的病原菌。

[0079] 20 世纪 60 年代,研究人员通过电子显微镜发现革兰氏阴性细菌分泌出细胞外小泡。源于革兰氏阴性细菌的细胞外小泡成球状,由双层磷脂构成,其大小约为 20-200nm。源于革兰氏阴性细菌的细胞外小泡不仅含有 LPS,而且还含有多种外膜蛋白(outer membrane protein)。最近,本发明人发现,当肠道共生细菌即源于大肠杆菌的细胞外小泡被全身吸收时,就会引发败血症、血液凝固、肺气肿等全身疾病。

[0080] 由于人们此前一直受“革兰氏阴性细菌分泌的细胞外小泡主要来源于细胞外膜”这一偏见的影响,认为革兰氏阳性细菌没有细胞外膜,且细胞膜被厚厚的细胞壁包裹。因此,革兰氏阳性细菌能够分泌细胞外小泡的事实还未被公众知晓。

[0081] 本发明人发现球状革兰氏阳性细菌即金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)能够分泌细胞外小泡,在电子显微镜下观察大致成球状,通过动态光散射法测定可知其大小约为 10-100nm。

[0082] 另外,本发明人发现杆状革兰氏阳性细菌即枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)能够分泌细胞外小泡,在电子显微镜下观察大致成球状,通过动态光散射法测定可知其大小约为 10-100nm。

[0083] 本发明人通过凝胶(in-gel)胰蛋白酶消解法(tryptic digestion)和溶解(in-solution)胰蛋白酶消解法对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡蛋白质组进行了分析,结果通过凝胶分解法分析鉴定出 41 个蛋白质,通过溶解分解法分析鉴定出 84 个,通过凝胶法分析的结果中有 35 个蛋白质与通过溶解法鉴定的蛋白质相互重合,因此,总共找出

90 个源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的蛋白质。

[0084] 通过上述方法鉴定的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡中含有与疾病相关的多种蛋白质。其中,作为病毒性(virulence)蛋白质存在诱发败血症或者毒性休克综合征(toxic shock syndrome)的超抗原(superantigen)即葡萄球菌肠毒素 Q(staphylococcus enterotoxin Q),葡萄球菌分泌抗原(staphylococcus secretory antigen)(ssaA1, ssaA2)等。另外,观察到小泡中还含有破坏红细胞使血红蛋白溶解的 α -溶血素(alpha-hemolysin)和 γ -溶血素(gamma-hemolysin)等毒素。另外,还含有直接干预细菌向宿主组织内的渗透和潜入的蛋白酶(protease)即 ScpA(staphopain A)和细胞外 ECM 以及血浆蛋白结合(plasma binding protein)。另外,还含有与血液凝固相关的蛋白质即葡萄球菌凝固酶(staphylocoagulase),血管性血友病因子-结合蛋白(von Willebrand factor-binding proteins)等,这种蛋白质不仅干预以血管内凝血为特征的败血症、毒性休克综合征等的疾病的发生,而且还对在动脉内形成血栓(thrombosis)诱发的急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome)、脑卒中(stroke)等,在静脉内形成血栓诱发的深静脉血栓形成(deep vein thrombosis),以及血栓脱落产生的栓塞(embolism)诱发的肺动脉栓塞症(pulmonary embolism)等疾病的病因进行干预。另外,还存在金黄色葡萄球菌 IgG-结合蛋白(S. aureus IgG-binding protein)(SbI),这样就不仅能够抑制宿主免疫细胞的噬菌作用(phagocytosis)并维持细菌的免疫赦免机能,而且还能够诱导上皮细胞(epidermal cell)中 IL-18 的表达,增强血清(serum)内 IgE 抗体,并对诱发皮肤发生特应性皮炎进行干预。

[0085] 通过蛋白质组分析,基于源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡中含有能够诱发多种疾病的蛋白质这一事实,通过从体外向老鼠巨噬细胞注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡对炎症媒介分泌进行了评估。结果表明,诱导炎症媒介即 TNF- α 和白细胞介素-6(IL-6)的分泌与源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的浓度成比例。

[0086] 另外,当从体外向老鼠成纤维细胞注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡对炎症媒介分泌进行评估时,源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡不仅诱导炎症媒介即 TNF(tumor necrosis factor)- α , IL-6 的分泌,而且还诱导胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin)(TSLP),嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin),巨噬细胞炎性蛋白质(macrophage inflammatory protein)(MIP)-1 α 等分泌。

[0087] 金黄色葡萄球菌栖息于皮肤内,特别是,特应性皮炎患者的皮肤上几乎 100% 栖息。基于上述体外实验结果,对向皮肤注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡时是否能够诱发类似特应性皮炎等局部炎症进行了评估。进行剥带(tape stripping)处理后,将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡按每周 3 次注射 4 周时,观察到特应性皮炎患者出现炎症情况。另外,从特应性皮炎患者的皮肤洗涤液中将细胞外小泡分离后,利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡特异抗体使其反应时,确认从患者洗涤液中分离的细胞外小泡中存在源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡。另外,将特应性皮炎患者的血清分离后,对血清内源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡特异 IgE 抗体进行测定时,与正常人相比,IgE 抗体显著增加。从上述结果可以看出,源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡对于特应性皮炎的发生或者恶化都是重要的致病因子。

[0088] 金黄色葡萄球菌不仅存在于上呼吸道粘膜等体内,而且还栖息于空气中。本发明

人对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡作用于呼吸器官粘膜是否诱发局部炎症进行了评估。当将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 1 次注入鼻腔时, 支气管肺泡灌洗液中的炎症细胞数量与小泡浓度成比例增加, 对 Th17 (type 17 helper T) 细胞的裂解有重要影响的 IL-6 的分泌也增加。另外, 当将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡按每周 2 次向鼻腔注入 3 周时, 不仅显著增加了支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的总数, 而且也显著增加了中性粒细胞数量, 同时, Th17 细胞分泌的 IL-17 也明显增加。上述结果表明, 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡是通过作用于粘膜对以 IL-17 为媒介的中性粒细胞性炎症的发生有重要影响的致病因子。

[0089] 败血症是当局部细菌感染时源于病原菌的物质流入血管引发以全身出现炎症反应为特征的疾病。本发明人对通过静脉注射源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡是否诱发败血症进行了评估。当按大用量通过静脉注射细胞外小泡时, 大约有 40% 的老鼠死亡。另外, 在注入细胞外小泡的情况下观察到出现了败血症的指标即低烧。这意味着, 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡如果流入血管, 就会诱发败血症。

[0090] 上述对蛋白质组的分析可知, 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡中含有与血液凝固相关的蛋白质。本发明人根据血液凝固实验及其结果对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡是否诱发血栓的形成进行了评估。结果表明, 当将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡通过静脉注射、皮下注射或者鼻腔注入时, 血清中导致血管内凝血的指标即 D- 二聚体的浓度增加, 另一指标即血小板的数量在外周血中减少了。关于小泡诱发的血栓形成, 当将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡通过静脉注射、皮下注射或者鼻腔注入时, 观察到肺部血管中有血栓 (thrombus)。上述结果表明, 源于葡萄球菌的细胞外小泡流入血管时, 就会通过血管内凝血而诱导血栓或者栓塞。

[0091] 为了研发预防或治疗疾病的药物, 准确掌握致病物质是非常重要的。例如: 将致病物质从体外向细胞注入的过程中, 通过对备选药物进行处理就可以检验其效果, 可以通过向上述动物模型注入备选药物检验其效果。为了研发用于预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发疾病的药物, 本发明人确立了对利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的备选药物进行筛选的筛选方法, 并通过这一方法发掘出了药物。即, 通过上述筛选方法从 102 种前药中发掘 19 种备选药物, 并通过上述疾病动物模型检验了其效果。这意味着, 通过本发明研发的备选药物筛选方法能够非常有效地发掘用于预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发疾病的药物。

[0092] 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡含有多种蛋白和毒素 (金黄色葡萄球菌肠毒素 Q, K) (Staphylococcal enterotoxin Q, K) 等蛋白质及脂磷壁酸 (LTA) 和肽聚糖等免疫佐剂 (immune adjuvant)。本发明人为了确认是否可以将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡作为预防或治疗细菌感染的疫苗使用, 对老鼠体内的免疫学指标进行了评估, 设计了能够增强细胞外小泡的效果或者减少副作用的方法。结果表明, 当将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡与合成 dsRNA 即聚肌苷-聚胞苷酸 (polyinosinic-polycytidylic acid) (polyI :C) 一起通过皮下注射时, 老鼠血清内抗体 (IgG) 增加, 脾脏细胞分泌的细胞因子即 IFN(interferon)- γ 和 IL-17 也增加。这意味着, 当将源于葡萄球菌的细胞外小泡通过皮下注射时, 不仅能够诱导抗体反应, 而且还能够有效地诱导 Th1 (type 1 helper T cell) 及 Th17 免疫反应。

[0093] 评估了源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡疫苗对由金黄色葡萄球菌引发肺炎的发生所起的效果。结果表明,如果不注射小泡疫苗,有60%的老鼠因患肺炎而死亡,但是,如果注射小泡疫苗,则未观察到因患肺炎而死亡的现象。这意味着,如果事先注射小泡疫苗,就能够有效地预防细菌感染。

[0094] 如上所述,源于葡萄球菌的细胞外小泡能够诱发各种疾病的发生,这意味着,细胞外小泡对疾病的发生是非常重要的致病因子。为了提供诊断疾病致病因子的方法,进行了确认源于该细菌的细胞外小泡中是否存在遗传物质的实验,并最终通过PCR法确认存在16S rRNA及DNA。这样,就通过对从感染部位或者患者血液等提取的细胞外小泡的遗传物质进行分析而提供了能够有效地诊断疾病致病因子的方法。

[0095] 下面,为了有助于对本发明的理解,将提供理想的实施例。但是,以下实施例仅用于能够更加容易地理解本发明,不能依据以下实施例限定本发明的内容。

[0096] 实施例 1. 通过电子显微镜观察金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 细胞

将金黄色葡萄球菌 (ATCC14458) 放入营养液 (nutrient broth) 培养,使其吸光度 (600 nm) 值达到 1.0 后,将培养液在 10,000 x g 条件下离心分离 20 分钟。将沉淀的金黄色葡萄球菌细胞利用 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 固定 (fix) 2 小时,再利用 1% 四氧化钼 (osmium tetroxide) 后固定 (post-fix) 1 小时,然后,再利用乙醇 (ethanol) 实施阶段性脱水,制作环氧树脂模块 (epoxy resin),按 70 nm 厚度制作超薄切片。将细胞切片放于辉光放电涂碳铜载网 (glow-discharged carbon-coated copper grid) 上吸附 3 分钟后,利用 2% 醋酸铀 (uranylacetate) 和铅柠檬酸钙 (lead calcium citrat) 进行染色 (staining),并通过 JEM101 (Jeol, Japan) 透射式电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 进行观察。如图 1 的透射式电子显微镜图像所示,金黄色葡萄球菌细胞表面向外分泌有 20~100 nm 大小的细胞外小泡。

[0097] 为了通过扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察,将按与上述相同的方法培养的金黄色葡萄球菌在 10,000 x g 条件下离心分离 20 分钟使其沉淀后,利用 2.5% 戊二醛固定 1 小时,再利用 1% 四氧化钼后固定 1 小时后,利用乙醇实施阶段性脱水,然后利用 CO₂ 系统 (HCP-2 critical point dryer, HITACH, Japan) 实施临界点干燥 (critical point drying)。将细菌样本置于样品台 (stub) 上,利用铂 (Pt) 涂布后,通过 JSM-7401F (Jeol, Japan) 扫描电子显微镜进行观察。

[0098] 如图 2 的扫描电子显微镜图像所示,金黄色葡萄球菌细胞表面向外分泌有细胞外小泡。

[0099] 实施例 2. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的制备

[普通的细胞外小泡分离方法]

将金黄色葡萄球菌放入装有 3 ml 营养液的试管内接种后在 37°C 条件下培养 6 小时,将其中的 5 ml 移入装有 500 ml 营养液的 2 L 三角烧瓶中,在 37°C 条件下培养 4 小时,使其吸光度 (600 nm) 值达到 1.0。将培养液装入 500 ml 容量的高速离心管 (high speed centrifuge tube) 内,在 4°C 条件下按 10,000 x g 标准离心分离 20 分钟。将除去细菌的上层液 1 次通过带有 0.45 μm 大小孔的薄膜过滤器 (membrane filter) 进行过滤后,利用装有能够除去分子量小于 100 kDa 蛋白质的薄膜的超滤系统 (Quixstand system) 浓缩

25 倍,将浓缩液 1 次通过带有 0.22 μm 大小孔的薄膜过滤器进行过滤后,将其装入 70 ml 容量的超速离心管 (ultracentrifuge tube) 内,在 4°C 条件下按 150,000 $\times$ g 标准超速离心分离 3 小时 (ultracentrifugation),将沉淀物利用 PBS (phosphate buffered saline) 进行悬浮 (resuspension) 后就可以获得源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡。

[为了分析蛋白质组的细胞外小泡分离方法]

将通过与上述普通的细胞外小泡分离法相同的方法获得的浓缩液 1 次通过带有 0.22 μm 大小孔的薄膜过滤器进行过滤后,装入 70 ml 容量的超速离心管内,在 4°C 条件下按 150,000 $\times$ g 标准超速离心分离 3 小时。将沉淀物利用 50% 碘克沙醇 (Optiprep) 2.2 ml 进行悬浮后放入 5 ml 容量的超速离心管底部,依次放入 40% 碘克沙醇 2 ml 和 10% 碘克沙醇 0.8 ml。然后,在 200,000 $\times$ g 条件下超速离心分离 2 小时,从 40% 碘克沙醇与 10% 碘克沙醇之间的层中提取细胞外小泡。

[0100] 实施例 3. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的特性

将根据实施例 2 所述方法从金黄色葡萄球菌中分离的细胞外小泡放于辉光放电涂碳铜载网上吸附 3 分钟,将载网利用蒸馏水冲洗后,利用 2% 醋酸铀进行染色,并通过 JEM101 透射式电子显微镜观察。

[0101] 如图 3a 的透射式电子显微镜图像所示,源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡成闭合的球状,大小为 20-100 nm。将分离的细胞外小泡贴在盖玻片 (cover glass) 上后,利用 2.5% 戊二醛固定 1 小时,再利用 1% 四氧化锇后固定 1 小时后,利用乙醇实施阶段性脱水,然后,利用 CO_2 系统进行临界点干燥。将粘有细胞外小泡的盖玻片置于样品台上利用铂进行涂布后,通过 JSM-7401F 扫描电子显微镜观察。

[0102] 如图 3b 的扫描电子显微镜图像所示,可以观察到大小比较均匀的 (20-100 nm) 圆形细胞外小泡。

[0103] 将根据实施例 2 所述方法从金黄色葡萄球菌中分离的细胞外小泡按 1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度利用 PBS 1 ml 进行稀释。将装有细胞外小泡的 PBS 1 ml 放入试管 (cuvette) 内,利用动态光散射粒度分析仪进行分析,其结果如图 4 所示。

[0104] 从图 4 可以看出,细胞外小泡大小为 20-100 nm,平均大小为 28.3 nm。

[0105] 全细胞 (whole cell) 与细胞壁 (cell wall),细胞膜 (membrane), 细胞溶质 (cytosol) 的蛋白质可以通过下述方法获得。将金黄色葡萄球菌在 3 ml 的营养液中培养使其吸光度 (600 nm) 值达到 1.0 后,在 10,000 $\times$ g 条件下离心分离 20 分钟,获得细胞沉淀物。向上述沉淀物中加入 20 $\mu\text{g/ml}$ 的溶葡萄球菌酶缓冲液 (lysostaphin, Tris-EDTA) 在 37°C 条件下处理 15 分钟。通过超声降解法 (sonication) 将细胞完全粉碎后,在 8000 $\times$ g 条件下离心分离 10 分钟除去不可溶物质 (insoluble material),将上层液作为全细胞蛋白使用。为形成原生质体 (protoplast) 而向金黄色葡萄球菌细胞沉淀物中加入 20 $\mu\text{g/ml}$ 的溶葡萄球菌酶缓冲液 (lysostaphin, Tris-EDTA) 和 1.1 M 的蔗糖 (sucrose),在 37°C 条件下处理 15 分钟。在 10,000 $\times$ g 条件下离心分离 20 分钟后,将上层液作为细胞壁蛋白使用,沉淀物溶于低渗缓冲液 (hypotonic buffer) 后再在 40,000 $\times$ g 条件下超高速离心分离 1 小时。从上层液中提取细胞溶质蛋白,将沉淀物放入三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 中进行悬浮后作为膜蛋白使用。将分离的全细胞、细胞壁、细胞膜、细胞溶质蛋白与实施例 2 中分离的细胞外小泡蛋白分别准备 7 后,加入 5 X 荷载染料

(loading dye, 250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 0.5% 酚蓝, 50% 甘油) 使其达到 1 X, 在 100°C 条件下高温处理 10 分钟。准备 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel), 加载样本, 在 80 V 条件下电泳 2 小时后, 将凝胶 (gel) 利用考马斯亮蓝 (0.25% Coomassie Brilliant Blue) 染色 2 小时。将染色后的凝胶利用脱色 (destaining) 溶液 (甲醇:DDW:乙酸 = 5:4:1) 使其反应 6 小时。

[0106] 图 5 是通过考马斯亮蓝染色法 (Coomassie staining) 将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡蛋白图谱与全细胞蛋白 (WC), 细胞壁蛋白 (CW), 膜蛋白 (MP), 细胞溶质蛋白 (CY) 的图谱进行比较的示意图。可以看出, 特定蛋白质可以从细胞外小泡 (EV) 内筛选 (sorting)。

[0107] 实施例 4. 通过电子显微镜观察表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermis*) 细胞

将表皮葡萄球菌 (ATCC12228) 在营养液培养使其吸光度 (600nm) 值达到 1.0 后, 将培养液在 10,000 x g 条件下离心分离 20 分钟。将沉淀的表皮葡萄球菌细胞利用 2.5% 戊二醛固定 2 小时, 再利用 1% 四氧化锇后固定 1 小时后, 利用乙醇实施阶段性脱水, 制作环氧树脂模块, 按 70 nm 厚度制作超薄切片。将细胞切片放在辉光放电涂碳铜载网上吸附 3 分钟, 其后, 利用 2% 醋酸铀与铅柠檬酸钙进行染色, 并通过 JEM101 透射式电子显微镜进行观察。从图 6 的透射式电子显微镜图像可以看出, 表皮葡萄球菌细胞表面向外分泌有 20~100 nm 大小的细胞外小泡。

[0108] 为了通过扫描电子显微镜观察, 将按照与上述相同的方法培养的表皮葡萄球菌在 10,000 x g 条件下离心分离 20 分钟使其沉淀后, 利用 2.5% 戊二醛固定 1 小时, 再利用 1% 四氧化锇后固定 1 小时后, 利用乙醇实施阶段性脱水, 然后利用 CO₂ 系统实施临界点干燥。将样本放于样品台上, 用铂涂布后, 通过 JSM-7401F 扫描显微镜观察, 从图 7 的扫描电子显微镜图像可以看出, 表皮葡萄球菌细胞表面向外分泌有细胞外小泡。

[0109] 实施例 5. 制备源于表皮葡萄球菌的细胞外小泡

将表皮葡萄球菌放入装有 3 ml 营养液的试管内进行接种后, 在 37°C 条件下培养 6 小时, 将其中 5 ml 移入装有 500 ml 营养液的 2 L 三角烧瓶内, 在 37°C 条件下培养 4 小时使其吸光度 (600nm) 值达到 1.0。将培养液放入 500 ml 容量的高速离心管内, 在 4°C, 10,000 x g 条件下离心分离 20 分钟。将除去细菌的上层液 1 次通过带有 0.45 μm 大小孔的薄膜过滤器进行过滤后, 利用装有能够除去分子量低于 100 kDa 蛋白质薄膜的超滤系统浓缩 25 倍。将浓缩液 1 次通过带有 0.22 μm 大小孔的薄膜过滤器进行过滤后, 装入 70 ml 容量的超速离心管内, 在 4°C, 150,000 x g 条件下超速离心分离 3 小时。将沉淀物利用 PBS 进行悬浮后, 获得源于表皮葡萄球菌的细胞外小泡。

实施例 6. 源于表皮葡萄球菌的细胞外小泡的特性

将按实施例 5 所述方法从表皮葡萄球菌中分离的细胞外小泡放在辉光放电涂碳铜载网上吸附 3 分钟, 将载网利用蒸馏水冲洗后, 利用 2% 醋酸铀染色, 并通过 JEM101 透射式电子显微镜观察。

[0110] 如图 8a 的透射式电子显微镜图像所示, 源于表皮葡萄球菌的细胞外小泡成闭合的球状, 大小为 20-100 nm。

[0111] 将从表皮葡萄球菌中分离的细胞外小泡粘在盖玻片上后, 利用 2.5% 戊二醛固定 1

小时,再利用 1% 四氧化钨后固定 1 小时,利用乙醇实施阶段性脱水,再利用 CO_2 系统进行临界点干燥。将粘有细胞外小泡的盖玻片放在样品台上用铂进行涂布后,通过 JSM-7401F 扫描电子显微镜观察。

[0112] 如图 8b 的扫描电子显微镜图像所示,可以观察到大小比较均匀 (20-100 nm) 的圆形细胞外小泡。

[0113] 将按实施例 5 所述方法从表皮葡萄球菌中分离的细胞外小泡利用 PBS 1 ml 稀释到 $1 \mu\text{g/ml}$ 浓度,将含有细胞外小泡的 PBS 1 ml 放入试管内,利用动态光散射粒度分析仪进行分析,其结果如图 9 所示。

[0114] 从图 9 可以看出,细胞外小泡大小为 20-100 nm,平均大小为 34 nm。

[0115] 实施例 7. 通过电子显微镜观察枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 细胞

将枯草芽胞杆菌 (KCTC3729) 在营养液中培养使其吸光度 (600nm) 值达到 1.0 后,将培养液在 $6,000 \times g$ 条件下离心分离 15 分钟。将沉淀的枯草芽胞杆菌细胞利用 2.5% 戊二醛固定 2 小时,再利用 1% 四氧化钨固定 1 小时后,利用乙醇实施阶段性脱水,制作环氧树脂组件,按 70 nm 厚度制作超薄切片。将细胞切片放在辉光放电涂碳铜载网上吸附 3 分钟后,利用 2% 醋酸铀和铅柠檬酸钙染色,并通过 JEM101 透射式电子显微镜观察。

[0116] 如图 10 的透射式电子显微镜图像所示,枯草芽胞杆菌细胞表面向外分泌有 20~100 nm 大小的细胞外小泡。

[0117] 为了通过扫描电子显微镜观察,将按与上述相同的方法培养的枯草芽胞杆菌在 $6,000 \times g$ 条件下离心分离 15 分钟使其沉淀后,利用 2.5% 戊二醛固定 1 小时,再利用 1% 四氧化钨后固定 1 小时后,利用乙醇实施阶段性脱水,再利用 CO_2 系统进行临界点干燥。将样本放在样品台上用铂涂布后,通过 JSM-7401F 扫描电子显微镜观察。如图 11 的扫描电子显微镜图像所示,枯草芽胞杆菌细胞表面向外分泌有细胞外小泡。

[0118] 实施例 8. 制备源于枯草芽胞杆菌的细胞外小泡

将枯草芽胞杆菌放入装有 3 ml 营养液的试管内进行接种后,在 37°C 条件下培养 6 小时,将其中的 5 ml 移入装有 500 ml 营养液的 2 L 三角烧瓶内,在 37°C 条件下培养 4 小时使其吸光度 (600nm) 值达到 1.0。将培养液放入 500 ml 容量的高速离心管内,在 4°C , $6,000 \times g$ 条件下离心分离 20 分钟。将除去细菌的上层液 1 次通过带有 $0.45 \mu\text{m}$ 大小孔的薄膜过滤器进行过滤后,利用装有能够除去分子量低于 100 kDa 蛋白质薄膜的超滤系统浓缩 25 倍。将浓缩液 1 次通过带有 $0.22 \mu\text{m}$ 大小孔的薄膜过滤器进行过滤后,放入 70 ml 容量的超速离心管内。在 4°C , $150,000 \times g$ 条件下超速离心分离 3 小时,将沉淀物利用 PBS 进行悬浮培养后,获得枯草芽胞杆菌的细胞外小泡。

实施例 9. 源于枯草芽胞杆菌的细胞外小泡的特性

将按实施例 8 所述方法从枯草芽胞杆菌中分离的细胞外小泡放在辉光放电涂碳铜载网上吸附 3 分钟,将载网利用蒸馏水进行冲洗后,利用 2% 醋酸铀染色,并通过 JEM101 透射式电子显微镜观察。

[0119] 如图 12a 的透射式电子显微镜图像所示,源于枯草芽胞杆菌的细胞外小泡成闭合的球状,大小为 20-200 nm。

[0120] 将从枯草芽胞杆菌中分离的细胞外小泡粘在盖玻片上后,利用 2.5% 戊二醛固定 1 小时,再利用 1% 四氧化钨后固定 1 小时后,利用乙醇实施阶段性脱水,然后,利用 CO_2

系统进行临界点干燥,将粘有细胞外小泡的盖玻片放在样品台上用铂进行涂布后,通过JSM-7401F 扫描电子显微镜观察。

[0121] 如图 12b 的扫描电子显微镜图像所示,可以观察到大小比较均匀 (20-200 nm) 的圆形细胞外小泡。

[0122] 将按实施例 8 所述方法从枯草芽胞杆菌中分离的细胞外小泡利用 PBS 1 ml 稀释到 1 μ g/ml 浓度。将含有细胞外小泡的 PBS1ml 放入试管内,利用动态光散射粒度分析仪进行分析,其结果如图 13 所示。

[0123] 从图 13 可以看出,细胞外小泡大小为 20-100 nm,平均大小为 30 nm。

[0124] 通过上述实施例,最初发现革兰氏阳性细菌的代表性菌珠即金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、枯草芽胞杆菌等在生长过程中自然分泌细胞外小泡,并阐述了分离制备细胞外小泡的方法及其具有的多种特性。但是,源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡并不仅限于上述实施例中提到的细菌,它与所有的革兰氏阳性细菌相关。利用分离的细胞外小泡的疾病动物模型聚焦于诱发人类疾病的主要致病菌珠即金黄色葡萄球菌,但并不仅限于此。

[0125] 实施例 10. 分析源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的蛋白质组

[凝胶 (in-gel) 胰蛋白酶消解 (tryptic digestion)]

向从金黄色葡萄球菌中按实施例 2 所述对蛋白质组分析的方法分离的细胞外小泡 50 μ g 中放入 5 X 荷载染料 (loading dye) 使其达到 1 X,在 100°C 条件下高温处理 10 分钟。准备 4-20% 硫双对氯酚三羟甲基氨基甲烷 - 甘氨酸凝胶 (Novex Tris-glycine gel, Invitrogen),加载样本。在 90 V 条件下电泳 2 小时后,利用凝胶染色剂 (GelCode Blue Stain Reagent, Pierce) 染色。将凝胶按相同大小切成 11 个后,利用 13 ng/ 的胰蛋白酶 (trypsin, Promega) 在 37°C 条件下处理 16 小时使蛋白质消解 (digestion)。

[0126] [溶解 (in-solution) 胰蛋白酶消解法]

将从金黄色葡萄球菌中按实施例 2 所述对蛋白质组分析的方法分离的细胞外小泡 100 μ g 中放入样本 4 倍体积的甲醇 (methanol) 混合后,在 9000 x g 条件下轻轻地离心分离 10 秒钟。然后,放入等体积的三氯甲烷 (chloroform) 混合后,再在 9000 x g 条件下轻轻地离心分离 10 秒钟。然后,放入样本 3 倍体积的 HPLC 用水混合后,在 16,000 x g 条件下离心分离 1 分 30 秒。如果上层液形成 2 层,将上层除去后放入样本 3 倍体积的甲醇进行混合,然后,在 16,000 x g 条件下离心分离 3 分钟提取沉淀物。将沉淀物利用消解液 (6 M 尿素,40 mM 碳酸氢铵) 进行悬浮后,与 5 mM 的三 (2- 羧乙基) 膦盐酸盐 (tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) 在常温条件下还原 (reduction) 1 小时。然后,向样本中加入 25 mM 的碘乙酰胺 (iodoacetamide),在蔽光的常温条件下反应 30 分钟,使蛋白质烷化 (alkylation)。最后,利用 5 ng/ μ l 的胰蛋白酶进行处理,然后在 37°C 条件下使其反应 16 小时。将消解的肽利用游离胶分馏系统 (OFFGEL fractionators system, Agilent) 进行分离。首先,将 24 cm 的 IPG 胶条 (IPG strip) (pH 3-10) 利用 IPG 再水化 (IPG-rehydration) 缓冲液使其进行再水化反应 (rehydrate)。再将消解的肽溶于 2.8 ml 的游离胶 (off-gel) 缓冲液中,将其中 150 μ l 装入到一个泳道 (lane) 内,然后,按照 50 μ A,8000 电压通电 47 小时,使肽根据各自的等电点 (pI) 分离,将分离后获得的样本利用 C18 ZipTip (Millipore) 进行脱盐 (desalting) 处理。

[0127] [纳米离子质量分析 (Nano-LC-ESI-MS/MS)]

将通过凝胶分解法或者溶解降解法准备的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的降解肽装载于填充有 C18 树脂 (resin) 的毛细管柱 (microcapillary column, 75 μm x 12 cm) 中, 然后, 再采用下述方法进行分离: 3-30% 缓冲液 B 70 份; 30-40% 缓冲液 B 5 份; 40-90% 缓冲液 B 20 份; 血流速度 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (缓冲液 A 组成: 0.1% 甲酸水 (H_2O), 缓冲液 B 组成: 0.1% 甲酸乙腈 ACN)。将洗脱的 (eluted) 肽利用 LTQ-ion-trap 质量分析仪 (Thermo Finnigan) 进行分析。离子化电喷雾 (electrospray) 的电压为 2.0 kV, 按照 35% 的归一化碰撞能量 (normalized collision energy) 条件进行质量分析 (MS/MS)。所有的光谱 (spectra) 都通过数据依赖 (data-dependent) 扫描 (scan) 获得。LTQ 参数 (parameter) 在全质谱联用扫描 (full MS scan) 中选取 5 个丰度最高质谱 (most intense peak) 进行分裂 (fragmentation), 动态排除 (dynamic exclusion) 的重复数 (repeat count) 为 1, 重复时间 (repeat duration) 为 30 秒, 动态排除时间 (dynamic exclusion duration) 为 180 秒, 排除质量 (exclusion mass) 为 ± 1.5 Da, 动态排除的目录大小 (list size) 设定为 50。

[0128] [数据分析]

将现有构建氨基酸碱基序列的 9 个金黄色葡萄球菌数据库与靶标 (正向) 和诱捕 (decoy) (反向) 的碱基序列组合构建一个 NCBI 数据库。将通过质量分析获得的所有质谱 (MS/MS 谱) 通过上述数据库利用 SEQUEST 引擎工具 (SEQUEST engine tool) 进行筛选。鉴定的肽的假阳性率 (false-positive rate) 在 1% 以下, 仅筛选出最少匹配 (match) 有 2 个以上独一无二 (unique) 肽的蛋白质。

[0129] [结果]

蛋白质组学分析结果如图 14 所示, 通过凝胶分解法鉴定 41 个蛋白质, 通过溶解降解法鉴定 84 个蛋白质, 通过凝胶分解法鉴定的结果中有 35 个蛋白质与通过溶解降解法鉴定的蛋白质相互重合, 因此, 总共找出 90 个源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡蛋白。鉴定的 90 个蛋白质如表 1 所示。

[0130] 鉴定的细胞外小泡蛋白中含有与疾病相关的多种蛋白质, 其中病毒性 (virulence) 蛋白质包括诱发败血症或者毒性休克综合征的超抗原 (superantigen) 即葡萄球菌肠毒素 Q, 葡萄球菌分泌抗原 ssaA1 和葡萄球菌分泌抗原 ssaA2。另外, 观察到小泡中还含有破坏红细胞使血红蛋白溶解的 α -溶血素和 γ -溶血素等毒素。另外, 还含有直接干预细菌向宿主组织内渗透和潜入的蛋白酶 (protease) 即 ScpA (staphopain A) 和细胞外 ECM 和血浆蛋白结合。另外, 还含有与血液凝固相关的蛋白质即葡萄球菌凝固酶血管性血友病因子-结合蛋白等, 这种蛋白质不仅干预以弥散性血管内凝血为特征的败血症、毒性休克综合征等的疾病的发生, 而且还对在动脉内形成血栓 (thrombosis) 诱发的急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome), 脑卒中 (stroke) 等在静脉内形成血栓诱发的深静脉血栓形成 (deep vein thrombosis), 以及血栓脱落产生的栓塞 (embolism) 诱发的肺动脉栓塞症 (pulmonary embolism) 等多种血管栓塞症的病因进行干预。另外, 对于 IgG-结合蛋白之一即 Sbl 来说, 不仅可以抑制宿主免疫细胞的噬菌作用 (phagocytosis) 并维持细菌的免疫赦免机能, 而且还能够诱导上皮细胞 (epidermal cell) 中 IL-18 的表达, 增强血清 (serum) 内 IgE 抗体, 并对诱发特应性皮炎进行干预。

[0131] [表 1] 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡蛋白质组

Gi编号	蛋白质名称	功能	具体功能	凝胶 分解 法鉴 定	溶解 降解 法鉴 定
细胞外分泌蛋白					
150375723	β -内酰胺酶	对刺激的应答	β -内酰胺酶活性	√	√
21282496	胞外ECM和血浆结合蛋白	多生物体过程	粘附素		√
21282773	α -溶血素		另一生物体细胞的细胞溶解		√
81704164	γ -溶血素组份C		通过与宿主红细胞共生进行溶血		√
57650962	IgG-结合蛋白Sbl		发病机制	√	√
81704132	葡萄球菌分泌抗原ssaA1		发病机制	√	√
81762108	葡萄球菌分泌抗原ssaA2		发病机制	√	√
21281935	葡萄球菌凝固酶前体		凝固	√	√
57652487	葡萄球菌凝固酶前体		凝固	√	√
37088995	ScpA		蛋白水解		√
21284294	N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶	细胞过程	细胞壁组织	√	√
21282322	假定蛋白MW0593		细胞壁组织		√
81762626	双官能自溶素		细胞壁组织	√	√
21284065	假定蛋白MW2336	定位	运输		√

21283931	异羟脂肪酸含铁细胞结合脂蛋白		高亲和力铁离子运输	√	√
38604669	脂肪酶2	新陈代谢	脂质分解代谢过程		√
57651231	5'-核苷酸酶	不良	无意义	√	√
21282013	假定蛋白MW0284	特点	无意义	√	√
57651320	假定蛋白SAC0L0479		无意义		√
21282306	假定蛋白MW0577		无意义		√
21283609	被截断的细胞表面蛋白质图谱-W		无意义	√	√
细胞膜蛋白					
21282793	青霉素结合蛋白1	对刺激的应答	对抗生素的应答		
		细胞过程	基于肽聚糖的细胞壁生物发生		√
21283069	青霉素结合蛋白2	对刺激的应答	对抗生素的应答		
		细胞过程	基于肽聚糖的细胞壁生物发生		√
21283233	青霉素结合蛋白3	对刺激的应答	对抗生素的应答		
		细胞过程	基于肽聚糖的细胞壁生物发生		√
21282494	截断分泌的血管性血友病因子结合蛋白VWbp	多生物体过程	凝固		√
21282495	截断分泌的血管性血友病因子结合蛋白VWbp		凝固		√
21283671	假定蛋白MW1942		另一生物体细胞的溶解	√	√
21283666	葡萄球菌肠毒素SeQ		发病机制		√

61213890	77kDa膜蛋白		发病机制	√	
81704700	N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸酰胺酶sle1前体	细胞过程	细胞壁生物发生/降解	√	√
81704612	甘油磷酸脂磷壁酸合酶		细胞壁生物发生/降解	√	√
21283316	双官能前蛋白移位酶亚基SecD/SecF	定位	蛋白运输	√	√
60392183	膜结合核糖体蛋白复合物50kDa亚基	新陈代谢	糖酵解	√	√
21284194	假定蛋白MW2465	不良特点	无意义		√
21284271	假定蛋白MW2542		无意义	√	
73621231	调节蛋白msrR		无意义		√
21283575	ATP-依赖DNA解旋酶	细胞质内蛋白对刺激的应答	DNA修复		√
81762575	核糖体RNA大亚基甲基转移酶N		对抗生素的应答	√	
50402228	烯醇或丙酮酸转移酶I	细胞过程	rRNA过程		
38604895	DNA旋转酶A亚基	对刺激代谢的应答	基于肽聚糖的细胞壁生物发生		√
			对抗生素的应答		√
			DNA代谢过程		
54036785	ATP合酶β亚基		ATP生物合成过程		√
59799526	谷氨酰胺合成酶		谷氨酰胺生物合成过程		√
54037697	磷酸核糖焦磷酸激酶		核苷酸生物合成过程		√

21283340	谷氨酸-1-半醛转氨酶	卟啉生物合成过程	√	
60392318	甘油醛-3-磷酸脱氢酶1	糖酵解	√	√
21282096	双官能GMP合酶/谷氨酰胺转氨酶蛋白	GMP生物合成过程		√
21282838	假定蛋白MW1109	甘油代谢过程		√
21283766	丝氨酸羟甲基转移酶	甘氨酸代谢过程	√	√
21283370	丙酮酸激酶	糖酵解		√
21283383	乙酰激酶	磷酸化	√	√
21283307	假定蛋白MW1578	代谢过程		√
81832404	NAD-特异谷氨酸脱氢酶	氨基酸代谢过程		√
54038961	GTP合酶	谷氨酰胺代谢过程		√
38604707	丙酮酸脱氢酶 E1组分α亚单位	糖酵解	√	√
38604917	丙酮酸脱氢酶复合物的 二氢脂酰氨基酸-残基 乙酰转移酶组分	糖酵解	√	√
60392857	丙酮酸脱氢酶E1 组分β亚单位	糖酵解	√	√
119390865	嘧啶-核苷磷酸化酶	嘧啶碱基代谢过程	√	
21282878	转录延伸因子NusA	信息储存 和处理		√
21282422	核糖核苷酸-二磷酸 还原酶α亚单位	DNA复制		√

21283872	DNA指导的RNA聚合酶 α 亚单位	转录	√	
21282226	DNA指导的RNA聚合酶 β 亚单位	转录	√	√
21282227	DNA指导的RNA聚合酶 β' 亚单位	转录	√	√
21282201	赖氨酰-tRNA合成酶	赖氨酰-tRNA氨酰化反应	√	
38258392	苏氨酰-tRNA合成酶	苏氨酰-tRNA氨酰化反应		√
21282875	脯氨酰-tRNA合成酶	脯氨酰-tRNA氨酰化反应		√
21283246	甘氨酰-tRNA合成酶	甘氨酰-tRNA氨酰化反应		√
21283570	谷氨酰-tRNA ^{Gln} 转酰胺酶A亚单位	翻译		√
21282868	30S核糖体蛋白S2	翻译		√
54039504	30S核糖体蛋白S3	翻译	√	√
21283391	30S核糖体蛋白S4	翻译	√	√
54039545	30S核糖体蛋白S7	翻译		√
54039108	50S核糖体蛋白L1	翻译	√	√
21283895	50S核糖体蛋白L2	翻译	√	√
21283897	50S核糖体蛋白L4	翻译		√
50401243	50S核糖体蛋白L5	翻译		√
21283883	50S核糖体蛋白L6	翻译		√
21283866	50S核糖体蛋白L13	翻译		√
21283879	50S核糖体蛋白L15	翻译		√
81704219	50S核糖体蛋白L16	翻译	√	√
21282853	50S核糖体蛋白L19	翻译		√
21282326	50S核糖体蛋白L21	翻译		√
23821722	翻译起始因子IF-2	翻译		√
21282231	延伸因子G	翻译	√	√
54037028	延伸因子Tu	翻译	√	√
21282409	假定蛋白MW0680	不良特点 无意义		√
81704520	核糖核酸酶J1	无意义		√
150392829	假定蛋白	无意义	√	√
细胞内位置不明的蛋白				
24638020	可能苹果酸: 醌氧化还原酶2	新陈代谢 三羧酸循环		√
81847838	NADH脱氢酶-样蛋白	氧化还原	√	√
81704263	可能DEAD-盒ATP依赖RNA解旋酶	不良特点 无意义	√	√

[0132] 实施例 11. 从体外注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的巨噬细胞的先天免疫反应

将老鼠巨噬细胞 (RAW 264.7) 按照 1×10^5 放于 24 孔板上接种后, 培养 24 小时, 利用 PBS 灌洗 1 次后, 放入 10% FBS/RPMI 培养基 $500 \mu\text{l}$, 分别按 1, 10, 100, 1000, 10000 ng/ml 浓度利用通过实施例 2 所述方法分离的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡进行处理后, 培养 15 小时。收集培养液在 4°C , $500 \times g$ 条件下离心分离 10 分钟, 提取上层液后, 再在 $3000 \times g$ 条件下离心分离 20 分钟, 提取上层液。对分离的上层液中含有的细胞因子量通过酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 进行测定。

[0133] 图 15 是显示细胞因子量的示意图, 可以看出, 炎症性细胞因子即 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 与细胞外小泡的量成比例增加。这意味着, 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡通过作用于巨噬细胞而诱发先天免疫反应, 从而引发宿主内部出现炎症。

[0134] 实施例 12. 从体外注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的皮肤成纤维细胞的先天免疫反应

将老鼠的皮肤组织取下, 取下表皮后, 将真皮部分小心切开, 在这里, 利用胰蛋白酶处理后, 分离出各自的细胞, 提取皮肤成纤维细胞。将这样获得的成纤维细胞放于 24 孔板上接种 1×10^4 个细胞后, 培养 24 小时。将培养的细胞通过 DMEM 培养基利用 $1, 10 \mu\text{g/ml}$ 的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡处理后, 培养 24 小时。24 小时后, 收集培养液, 将细胞进行离心分离, 提取上层液, 再通过酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 测定上层液中含有的炎症性细胞因子 ($\text{TNF-}\alpha$, IL-6) 和对后天免疫的分化产生影响的细胞因子 (TSLP), 趋化因子 (MIP-1 α , 嗜酸性粒细胞趋化因子) 的量, 其结果如图 16 所示。

[0135] 图 16 是显示免疫及炎症相关细胞因子的量在源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的作用下而增加的示意图, 可以看出, 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡作用于皮肤的成纤维细胞使其产生炎症性细胞因子, 并吸引作用于免疫反应的多种免疫细胞从而诱发炎症。

[0136] 实施例 13. 利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的特应性皮炎 (atopic dermatitis) 动物模型

在老鼠 (SKH-HR1 种, 雌性) 的背部贴) 胶带 (Durapore, 3M), 然后再取下, 反复 4~6 次。反复执行后, 将 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 大小的纱布放于老鼠的背上, 利用溶于 $100 \mu\text{l}$ 的 PBS 中的 $0.1 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡作用于纱布上, 然后, 利用透明敷料 (Tegaderm) (3M) 将纱布固定在老鼠的背部防止脱落。这样每 1 周进行 3 次并反复进行 4 周。最后进行处理后, 经过 24 小时后对老鼠实施安乐死, 摘出皮肤组织 (参照图 17)。通过组织学分析的结果表明, 进行剥带处理后, 如果注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡, 出现能在特应性皮炎患者的皮肤组织观察到的一种特征即表皮层变厚, 当渗透到真皮层的炎症细胞中渗入的嗜酸性粒细胞和肥胖细胞定量化时, 与注入生理盐水的情况相比, 在注入细胞外小泡的情况下, 上皮细胞的表皮厚度 (epidermal thickness) 与嗜酸性粒细胞 (eosinophils) 和肥胖细胞 (mast cells) 的渗透明显增加 (参照图 18 及图 19)。另外, 当对皮肤组织中特应性皮炎的特征即免疫学上的异常现象即 2 型辅助性 T 细胞 (type 2 helper T cell) (Th2 cell) 免疫反应的表达情况进行评估时, Th2 细胞分泌的细胞因子即

IL-4 和 IL-5 的浓度在注入细胞外小泡的情况下增加,由这些细胞因子诱导的趋化因子即嗜酸性粒细胞趋化因子的浓度也在注入细胞外小泡的情况下增加(参照图 20)。

[0137] 实施例 14. 测定特应性皮炎患者的皮肤洗涤液中源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡

将特应性皮炎患者的患部利用灭菌盐水进行多次清洗后,收集 40 ml 的清洗液。为了除去清洗液中的异物及细菌,在 5,000g, 10,000g 条件下离心分离,然后,收集上层液,通过 0.45 μ m, 0.22 μ m 的过滤器过滤。将过滤后的清洗液利用仅能让 100 kD 大小的物质滤过的工具 (centriprep) 将其浓缩至 1 ml。将浓缩液 (lavage fluid) 的一部分进行保管,其余部分添加相同体积的灭菌盐水,在 150,000g 条件下超速离心分离,获得细胞外小泡 (EV fraction)。为了确认获得的浓缩液和细胞外小泡中是否存在源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 (SA_EV),利用特异性抗体通过酶联免疫吸附试验评估源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡中是否存在源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡特异蛋白质。具体地说,首先,于源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的抗原中特异性抗体涂布在 96 孔板上后,利用 1% BSA (Bovine Serum Albumin) 进行模块化 (blocking) 处理,将提取的部分反应 2 小时。2 小时后,利用含有吐温 20 的 PBS 对孔进行冲洗,利用特异性抗体对带有生物素基的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡抗原处理 2 小时。然后,利用与链霉亲和素 (Streptavidin) 连接的辣根过氧化物酶 (HRP) 进行处理,使其与 HRP 反应,再利用发光的基质 (Substrate) 即 BM-POD 进行处理后,对发光的量进行测定,结果用 RLU 值表示。

[0138] 图 21 是显示通过患者获得的浓缩液中含有源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡内存在抗原的示意图,另外,通过从浓缩液中仅分离细胞外小泡,可以再次确认,特应性皮炎患者的患部处存在源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡内存在的抗原。

[0139] 实施例 15. 特应性皮炎患者血清内源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的特异抗体 (IgE) 的增加

从 0-10 岁的特应性皮炎患者群 20 名和多个相同年龄段的正常对照群 20 名中提取血液,在 4°C, 3,500 x g 条件下离心分离 10 分钟后,提取上层液即血清。

[0140] 图 22 是通过酶联免疫吸附试验测定针对细胞外小泡的 IgG1 和 IgE 抗体的示意图,可以看出,与正常对照群相比,特应性皮炎患者群中其血清内针对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的特异性 IgE 抗体显著增加。

[0141] 实施例 16. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的气管粘膜的 Th17 炎症

给老鼠注入氯胺酮和甲苯噻嗪 (Rompun) 进行麻醉后,将 1 μ g, 10 μ g 的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡放入 30 μ L 的生理盐水中混合,并且通过老鼠的鼻子吸入。为了掌握源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡对先天免疫反应的影响,间隔 24 小时后,利用 1 mL 生理盐水提取老鼠的支气管肺泡灌洗液,并确认炎症的程度(参照图 23)。测定炎症细胞的数量和诱导 Th17 分化的炎症性细胞因子即 IL-6 的量,结果表明,支气管肺泡灌洗液中含有的炎症细胞(特别是中性粒细胞)的数量和 IL-6 的量与源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的量成比例增加(参照图 24)。这意味着,源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡能够诱发气管粘膜发生与 Th17 相关的炎症。

[0142] 为了掌握由源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的后天免疫反应,按每周 2 次共 3 周时间内通过老鼠的鼻子吸入 1 μ g 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡,最后一次吸

入后间隔 24 小时后,提取支气管肺泡灌洗液,并确认炎症反应(参照图 25)。

[0143] 如图 26 所示,在吸入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的一组中,支气管肺泡灌洗液中含有的炎症细胞显著增加,并确认主要是中性粒细胞渗透(参照图 26a)。另外,通过支气管肺泡灌洗液中含有的细胞因子量确认气管粘膜的免疫反应,结果表明,在吸入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡一组中,Th17 细胞分泌的细胞因子即 IL-17 的量显著增加(参照图 26b)。

[0144] 上述结果表明,当源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡反复通过气管吸入时,气管粘膜内会出现由 Th17 免疫反应诱发的中性粒细胞性炎症。

[0145] 实施例 17. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的败血症

将按实施例 2 所述方法分离的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡分别按 15, 25, 50 μg 的量通过血管注入(intravenous) 3 只老鼠(C57B6 种,雄性)中,每隔 12 小时确认死亡老鼠的数量(参照图 27)。

[0146] 结果如图 28 的存活(survival)函数图所示,当将 25 μg 与 50 μg 的细胞外小泡注入老鼠时,存活率减少至 66.6%,这表明,超过一定量的细胞外小泡会导致老鼠死亡。

[0147] 图 29 是向老鼠(C57B6 种,雄性)注射源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡后在 12 小时内测定老鼠体温的示意图。为了测定体温,将直肠体温计插入老鼠肛门,每隔 2 小时记录体温计数字画面上显示的数值。结果观察到,出现了由 15, 25, 50 μg 的细胞外小泡诱发的全身炎症反应(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的指标即体温降低的低烧现象。

[0148] 实施例 18. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的血管内凝血及血栓形成

将通过实施例 2 所述方法分离的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 5 μg 通过多种途径注入老鼠(C57B6 种,雄性),间隔 8 小时注射一次共注入 3 次后,间隔 6 小时后对老鼠实施安乐死,摘出肺(参照图 30)。将生理盐水(PBS)通过血管注入(intravenous, I.V.)老鼠尾巴,并作为阴性对照群使用。将细胞核使用苏木精染色(蓝色),细胞溶质使用伊红(eosin)进行染色的(红色)H&E(Hematoxylin-Eosin)的方法对将摘出的肺进行染色。

[0149] 图 31 是显示 H&E 染色结果的示意图,可以观察到,当将细胞外小泡通过血管注入(intravenous, I.V.)老鼠尾巴时,静脉内形成血栓,通过皮下注射(subcutaneous, S.C.)时,血管周边渗透有炎症细胞,通过鼻腔注入(intranasal, I.N.)时,肺血管内有血栓。

[0150] 为了测定老鼠血液内弥散性血管内凝血的指标,将从老鼠心脏提取的血液与抗凝剂即柠檬酸钠(sodium citrate)按 9:1 的比例混合形成血浆(plasma)。图 32 是利用 D-二聚体诊断用试剂盒(Kit)对弥散性血管内凝血的指标即 D-二聚体(D-dimer)进行测定的示意图,可以看出,所有注入途径中,与对照群相比,血浆内 D-二聚体的量增加了,特别是,通过血管注射(I.V.)和皮下注射(S.C.)时,血浆内 D-二聚体的增加量较高。另外,为了测定弥散性血管内凝血的另一指标即血小板的减少,将血浆 1 μl 利用 199 μl 的 1% 草酸铵(ammonium oxalate)稀释后,在湿润板上使其反应 10 分钟,然后,在血球计(hemocytometer)内放 10 μl ,测定血小板(platelet)的个数,其结果如图 33 所示。

[0151] 从图 33 可以观察到,所有注入途径中,利用细胞外小泡处理的群像对于对照群,出现了血小板数量减少的血小板减少症(thrombocytopenia)现象。

[0152] 实施例 19. 构建筛选预防或治疗由源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡引发疾病

的备选药物体外(in vitro)筛选系统

通过上述实施例,确认了源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的炎症性细胞因子极大地干预各种疾病,基于此,研发出能够发掘可以抑制炎症性细胞因子分泌的物质的体外筛选系统。图 34 是发掘抑制源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡引发的炎症性细胞因子分泌的物质的模式图。利用按实施例 2 所述方法制备的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡($1\ \mu\text{g/ml}$)单独或者与药物备选物质($10\ \mu\text{M}$)一起对按实施例 11 所述方法准备的老鼠巨噬细胞(RAW 264.7)进行处理后,放入 37°C 培养器中培养 15 小时。15 小时后,提取上层液,在 4°C , $500\times\text{g}$ 条件下离心分离 10 分钟后,再在 4°C , $3000\times\text{g}$ 条件下离心分离 20 分钟。通过 ELISA 方法测定分离的上层液中含有的炎症性细胞因子即 IL-6 的量。这样,就构建了利用体外筛选抑制源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的 IL-6 分泌的备选物质的方法,从而就可以提供预防或治疗由源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡引发疾病的备选药物。

[0153] 实施例 20. 检验利用体外筛选系统发掘的前药在体内的效果

图 35 是按实施例 19 所述方法对 102 种前药(醋氨酚, 乙酰半胱氨酸, 别嘌呤醇, 盐酸阿普洛尔, 盐酸阿密替林, 阿托品, 托西溴苄铵, 溴苯那敏, 布地奈德, 盐酸丁螺环酮, 头孢呋辛, 水合氯醛, 盐酸氯丙嗪, 甲氧咪胍, 盐酸氯米帕明, 克霉唑, 环苯扎林, 盐酸地昔帕明, 双氯芬酸, 二氟尼柳, 地尔硫卓, 盐酸苯海拉明, 达舒平, 双硫仑, D-甘露醇, 多塞平, 强力霉素一水物, 琥珀酸多西拉敏, 依酚氯铵, 马来酸依那普利, 法莫替丁, 芬布芬, 非诺贝特, 苯氧布洛芬钙, 氟桂嗪二盐酸盐, 氟非那嗪二氯化物, 氟比洛芬, 速尿灵, 吉非贝齐, 格列齐特, 格列吡嗪, 氟哌啶醇, 双氢氯噻嗪, 氢氟噻嗪, 盐酸羟嗪, 布洛芬, 盐酸丙咪嗪, 吲达帕胺, 吲哚-2-羧酸, 消炎痛, 异丙托溴铵, 酮洛芬, 酮咯酸氨丁三醇, 盐酸马普替林, 甲氯灭酸, 褪黑素, 甲福明甲福明, 盐酸美沙吡林, 甲巯咪唑, 美索巴莫, 盐酸甲氧氯普胺, 甲硝唑, 萘丁美酮, 萘普生, 溴新斯的明, 烟酸, 盐酸尼卡地平, 硝苯吡啶, 呋喃妥英, 尼扎替丁, 炔诺酮, 去甲替林, 盐酸邻甲苯海明, 奥昔布宁, 盐酸苯乙双胍, 苯基丁氮酮, 苯妥英, 吡罗昔康, 强的松, 丙磺舒, 盐酸普萘洛尔, 溴吡斯的明, 盐酸雷尼替丁, 安体舒通, 磺胺甲氧嘧啶(sulfameth), 止呕灵, 替诺昔康, 特非那定, 茶碱, 盐酸噻氯匹定, 甲磺氮卓脲, 妥拉唑林, 甲糖宁, 托灭酸, 盐酸曲马多, 反苯环丙胺, 盐酸曲唑酮, 氨苯蝶啶, 三氯噻嗪, 盐酸苄吡二胺, 维拉帕米, 杀鼠灵)进行处理并发掘出使 IL-6 的量与阳性对照群相比减少至 50 % 以下的药物备选物质 19 种(醋氨酚, 盐酸阿密替林, 阿托品, 托西溴苄铵, 溴苯那敏, 盐酸氯丙嗪, 盐酸氯米帕明, 环苯扎林, 盐酸地昔帕明, 双硫仑, 多塞平, 强力霉素一水物, 琥珀酸多西拉敏, 氟哌啶醇, 盐酸丙咪嗪, 盐酸尼卡地平, 去甲替林, 盐酸普萘洛尔, 替诺昔康)的示意图。

[0154] 图 36 是将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 $1\ \mu\text{g}$ 向 C57BL/6 老鼠(雄性, 6 周, 每组 4 只)鼻腔注射诱发免疫反应的老鼠模型中腹腔注射上述发掘的前药(10mg/kg) 间隔 12 小时后提取支气管肺泡灌洗液并通过 ELISA 方法测定支气管肺泡灌洗液内 IL-6 量的示意图。可以确认,通过体外筛选系统发掘的多塞平有抑制源于葡萄球菌的细胞外小泡诱发的支气管肺泡灌洗液 IL-6 增加的效果,将其与通过体外筛选系统发掘的其它药物备选物质即氟哌啶醇一起注射时就可以增强使 IL-6 减少的效果。

[0155] 由此,就可以确认利用实施例 19 所述源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的体外药物筛选系统非常有效,并筛选出了对细胞外小泡诱发各种疾病有效的药物。

[0156] 实施例 21. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡诱发的体外免疫反应

在实施例 11 中利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡对老鼠巨噬细胞 (RAW 264.7) 进行处理时,通过诱导引发 Th17 细胞分裂的 IL-6 的分泌,源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡与炎症细胞发生作用,从而可以诱发宿主内发生免疫反应。利用通过 DiI (1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚菁高氯酸盐) (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) 染色剂标记的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡对源于老鼠骨髓的树突状细胞 (Bone marrow-derived dendritic cell, BMDC) 处理后,间隔 6 小时后通过荧光显微镜观察时,可以确认树突状细胞在细胞内获得小泡 (参照图 37)。

[0157] 另外,利用细胞外小泡对树突状细胞进行 24 小时处理后,收集树突状细胞的培养液,通过酶联免疫吸附试验测定细胞因子,结果表明,Th1 诱导细胞因子即 IL-12 增加了 (参照图 38),同时,树突状细胞的激活标志即 CD40 和 MHCII 的表达也增加了 (参照图 39)。上述结果表明,源于葡萄球菌的细胞外小泡不仅通过作用于抗原提示细胞而增强后天免疫反应,而且诱导 T 细胞分化为 Th1 及 Th17 细胞。

[0158] 实施例 22. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的皮下注射诱发的小泡特异抗体及 T 细胞免疫反应

为了测定源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡疫苗诱发的抗体免疫反应,将按实施例 2 所述方法分离的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 1,5,20 μ g 按间隔 1 周的频率分 3 次通过皮下注射向老鼠 (C57B6 种,雄性) 注入,分别在第 1 周、第 2 周、第 3 周从老鼠眼睛的血管内提取部分血液 (参照图 40),将提取的血液在常温下放 30 分钟使其凝固后,在 4°C, 3,500 x g 条件下离心分离 10 分钟后,提取上层液即血清。

[0159] 图 41 是通过酶联免疫吸附试验测定血清内针对细胞外小泡的免疫反应指标即 IgG 抗体的示意图,可以看出,从 2 次注入后开始针对小泡蛋白的特异抗体形成依赖于用量而增加。这意味着,当将细胞外小泡分 2 次以上通过皮下注射时,就形成针对金黄色葡萄球菌或者源于该细菌的细胞外小泡含有蛋白质的特异抗体。

[0160] 为了通过 3 次注入源于葡萄球菌的小泡评估小泡特异 T 细胞免疫反应,将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 2,5,10 μ g 按间隔 5 日的频率分 3 次通过皮下注射向老鼠 (C57B6 种,雄性) 注入,最后完成接种后,间隔 24 小时后测定脾脏细胞的免疫反应 (参照图 42)。

[0161] 图 43 是为了测定通过注入细胞外小泡诱发的 T 细胞免疫反应,将从脾脏分离免疫细胞后在体外培养 72 小时,之后取上层培养液测定细胞因子的示意图,可以看出,在注入细胞外小泡 (10 μ g) 的群中,Th1 细胞分泌的 IFN- γ 和 Th17 细胞分泌的 IL-17 显著增加了。

[0162] 上述结果表明,当将金黄色葡萄球菌的细胞外小泡作为预防疫苗注入时,不仅诱发体液免疫反应即 IgG 抗体增加,而且还诱导对细菌的防御有重影响的 T 细胞免疫反应中的 Th1 及 Th17 免疫反应,这样就能够有效地预防由金黄色葡萄球菌引发的感染和由源于该细菌的细胞外小泡诱发的疾病。

[0163] 实施例 23. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡通过皮肤涂抹 (patch) 注入诱发的小泡特异抗体及 T 细胞免疫反应

按实施例 13 所述方法将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 5 μ g 在 4 周内通过皮肤

涂抹注入并对免疫反应进行评估（参照图 44）。图 45 是显示将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡通过皮肤涂抹注入诱发的 IgG 抗体形成的示意图，可以看出，源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡特异 IgG 抗体在注入细胞外小泡的情况下与注入生理盐水的情况相比显著增加了。

[0164] 为了测定注入细胞外小泡诱发的 T 细胞免疫反应，从脾脏分离免疫细胞后利用源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 在体外培养 24 小时，然后，测定上层培养液中细胞因子的浓度，其结果如图 46 所示。

[0165] 从图 46 可以看出，注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡的群与注入生理盐水的群相比，Th1 细胞分泌的 γ 干扰素（IFN- γ ）和 Th17 细胞分泌的 IL-17 显著增加。

[0166] 上述结果表明，注入源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡可以诱发源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡特异性 Th1 及 Th17 细胞免疫反应，当将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡通过皮肤涂抹注入时，不仅诱导针对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡特异蛋白的抗体形成，而且还诱导 T 细胞免疫反应，从而就能够有效地预防或治疗金黄色葡萄球菌引发的感染和由源于该细菌的细胞外小泡引发的疾病。

[0167] 实施例 24. 源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡和免疫增强剂（polyI :C）的并用注入诱发的小泡特异抗体及 T 细胞免疫反应

将按实施例 2 所述方法分离的源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 $5 \mu\text{g}$ 单独或者与合成 dsRNA 即聚肌苷-聚胞苷酸（polyinosine-polycytidylic acid）（polyI :C） $20 \mu\text{g}$ 并用，按间隔 1 周分 3 次通过腹腔注射向老鼠（C57B6 种，雄性）注入，最后的疫苗注射完成后在第 7 日和第 9 日将金黄色葡萄球菌（ 2.4×10^8 个）通过腹腔向老鼠注入使其感染（参照图 47），将提取的血液在常温下放 30 分钟使其凝固后，在 4°C ， $3,500 \times \text{g}$ 条件下离心分离 10 分钟，提取上层液即血清。

[0168] 图 48 是通过酶联免疫吸附试验测定血清中针对细胞外小泡的免疫反应指标即 IgG 抗体的示意图，可以看出，当将细胞外小泡和 polyI :C 通过腹腔注入时，针对金黄色葡萄球菌或者源于该细菌的细胞外小泡含有蛋白质的特异抗体显著增加。

[0169] 另外，为了通过注入源于金黄色葡萄球菌的小泡和 polyI :C 而评估小泡特异 T 细胞免疫反应，从老鼠的脾脏分离免疫细胞在体外培养 72 小时后，测定上层培养液中的细胞因子。结果表明，注入细胞外小泡和 polyI :C 的群中，Th1 细胞分泌的 IFN- γ 和 Th17 细胞分泌的 IL-17 显著增加（参照图 49）。

[0170] 上述结果表明，当将金黄色葡萄球菌的细胞外小泡与 polyI :C 等免疫佐剂并用注入时，与将小泡疫苗单独注入时相比，不仅诱导体液免疫反应即 IgG 抗体生成，而且还诱导对细菌的防御有重要影响的 Th1 及 Th17 免疫反应，从而能够有效地预防由金黄色葡萄球菌引发的感染和由源于该细菌的细胞外小泡诱发的疾病。

[0171] 实施例 25. 金黄色葡萄球菌诱发的肺炎模型中源于金黄色葡萄球菌的小泡疫苗和 polyI :C 并用注入的效果

为了构建金黄色葡萄球菌诱发的肺炎模型，将 4×10^8 ， 2×10^8 CFU 的金黄色葡萄球菌注入老鼠咽喉使其吸入后，并确认其存活率。结果表明，在 24 小时内注入 4×10^8 CFU 的老鼠全部导致死亡，但是，注射 2×10^8 CFU 的老鼠却有 40 % 的存活率（参照图 50）。

[0172] 为了确认上述金黄色葡萄球菌诱发的肺炎模型中小泡疫苗的效果，按实施例 23

所述方法将源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 5 μg 和 polyI:C 20 μg 分 3 次注入腹腔后,将 2×10^8 CFU 的金黄色葡萄球菌注入咽喉使其吸入,并确认存活率。结果表明,注入疫苗一组的老鼠经过 24 小时后仍然保持 100% 的存活率,但是,未注入疫苗的老鼠的存活率为 40%(参照图 51)。

[0173] 上述结果表明,小泡疫苗能够非常有效地预防金黄色葡萄球菌引发的肺炎发生及由此导致的死亡。

[0174] 实施例 26. 源于肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 的细胞外小泡通过腹腔注射诱发的小泡特异抗体及 T 细胞免疫反应

向老鼠 (C57B6 种,雄性) 按照与实施例 2 所述方法相同的方法从肠球菌中分离细胞外小泡。为了通过用源于肠球菌的细胞外小泡代替如实施例 22 所述源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡并评估体内的免疫反应,将源于肠球菌的小泡 5, 10 μg 间隔 1 周分 2 次通过腹腔注射注入,从最后一次完成注射开始间隔 72 小时后评估免疫反应。

[0175] 为了测定抗体,将提取的血液在常温下放 30 分钟使其凝固,然后在 4°C , 3,500 $\times$ g 条件下离心分离 10 分钟,提取上层液即血清。图 52 是通过酶联免疫吸附试验测定血清内针对细胞外小泡的免疫反应指标即 IgG 抗体的示意图,可以看出,当将细胞外小泡通过腹腔注射 2 次以上时,就形成针对源于肠球菌的细胞外小泡含有蛋白质的特异抗体。

[0176] 另外,注入源于肠球菌的细胞外小泡后,为了测定 T 细胞免疫反应,从脾脏中分离免疫细胞,在体外培养 72 小时后,测定上层培养液中的细胞因子,其结果如图 53 所示。

[0177] 从图 53 可以看出,在注入细胞外小泡 (10 μg) 的群中,Th1 细胞分泌的 IFN- γ 显著增加。

[0178] 上述结果表明,当将肠球菌细胞外小泡作为预防疫苗注入时,不仅诱导体液免疫反应即 IgG 抗体的增加,而且还诱导对细菌的防御有重要影响的 T 细胞免疫反应中的 Th1 免疫反应,从而就能够有效地预防金黄色肠球菌引发的感染和由源于该细菌的细胞外小泡诱发的疾病。

[0179] 实施例 27. 对源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡内 16S rRNA 及 DNA 的基因型分析

利用金黄色葡萄球菌特异 16S rRNA 的引物 (正向:AGCTTGCTTCTCTGATGTTA,反向:TTTCACTTTTGAACCATGCG) 并通过聚合酶链式反应 (PCR) 技术确认金黄色葡萄球菌及源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡 (0.2, 0.5, 1.0 μg) 中是否存在基因 [95°C , 5 分 - (94°C , 30 秒 - 46°C , 30 秒, 72°C 20 秒) $\times$ 35 周期 - 72°C , 7 分 - 4°C]。在同一条件下,将大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞作为对照阴性群使用。将逆转录-PCR 和 PCR 结果通过 2% 琼胶糖凝胶进行确认,其结果如图 54 所示。

[0180] 从图 54 可以看出,对 120 碱基对中确认了条带,这意味着,源于金黄色葡萄球菌的细胞外小泡中存在 RNA 及 DNA。

[0181] 上述所述的本发明的说明是只是用于举例,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想或必须特征的范围内,可转换成其他具体的形式。因此,上述所述的实施例只是在全方面内进行了举例,但并不限于此。

[0182] 工业实用性

利用本发明的源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡构建疾病动物模型,由此能够有效地

发掘可以预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发疾病的药物。另外,通过注入源于肠道共栖细菌的细胞外小泡本身或者将其变形注入以调节免疫反应,从而能够研发出可以有效预防或治疗由革兰氏阳性细菌引发感染或者由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的疫苗。另外,还能够研发出诊断革兰氏阳性细菌感染或者源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡引发疾病的致病因子的技术。

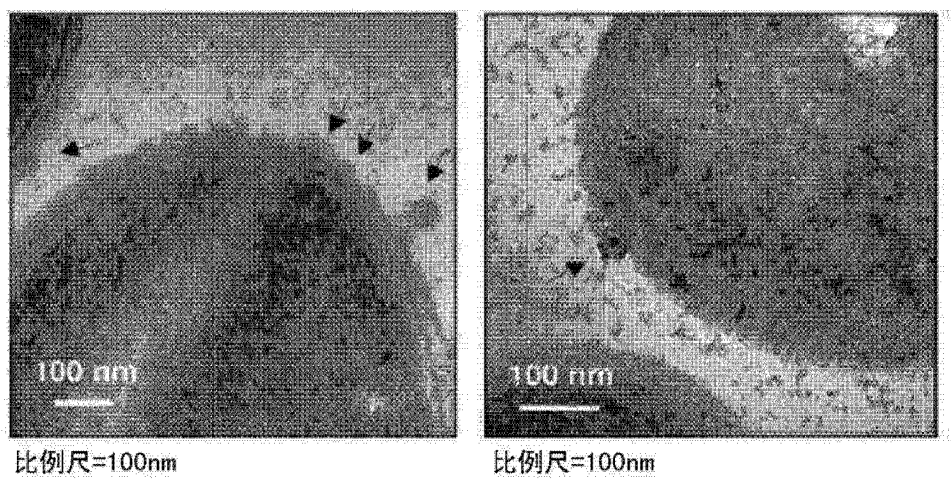


图 1

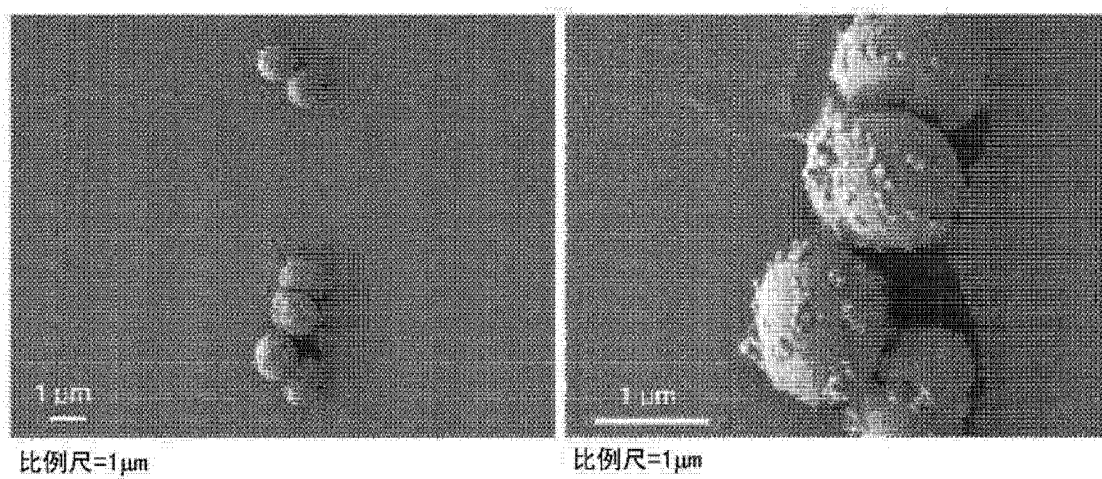


图 2

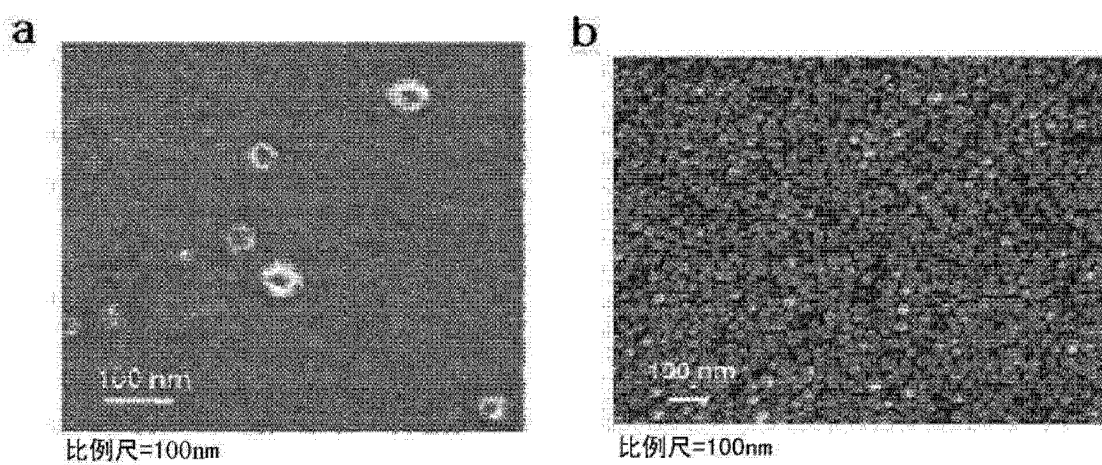


图 3

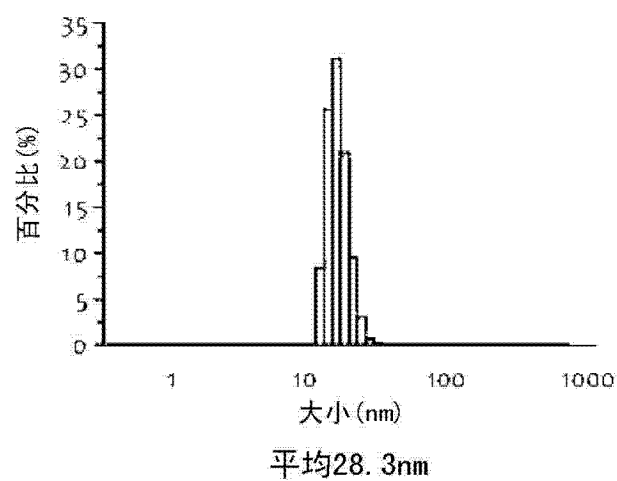


图 4

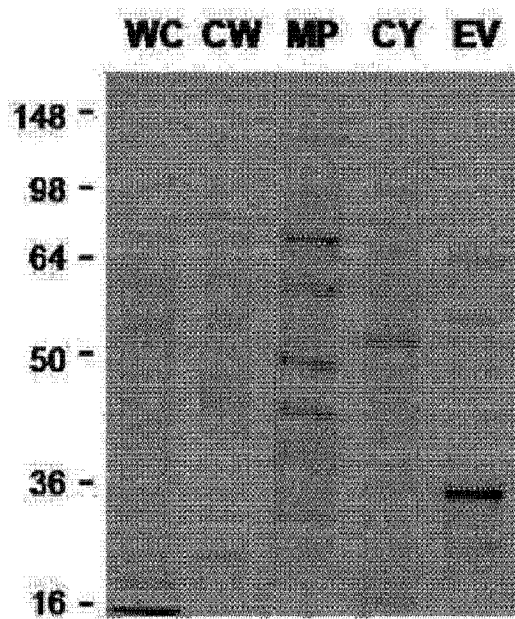


图 5

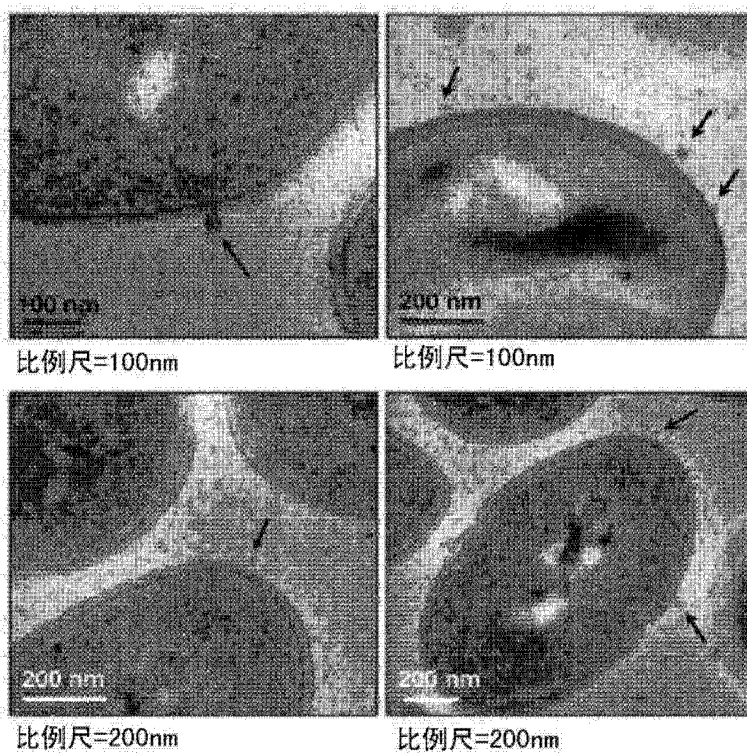


图 6

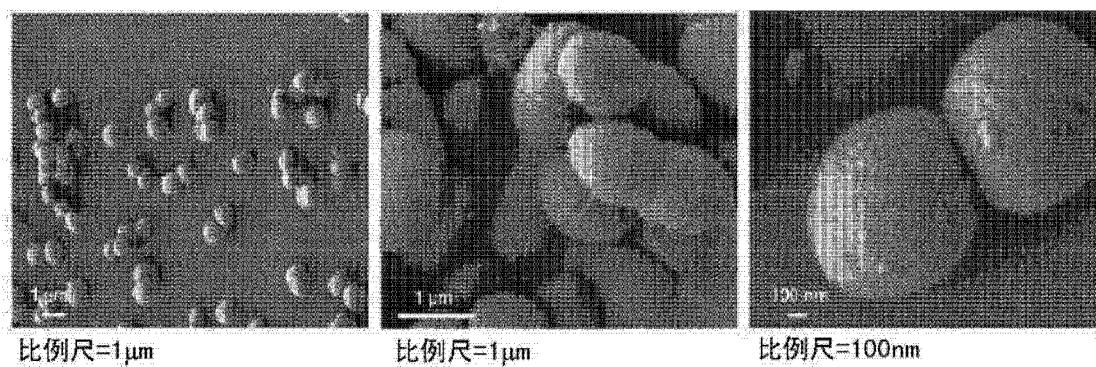


图 7

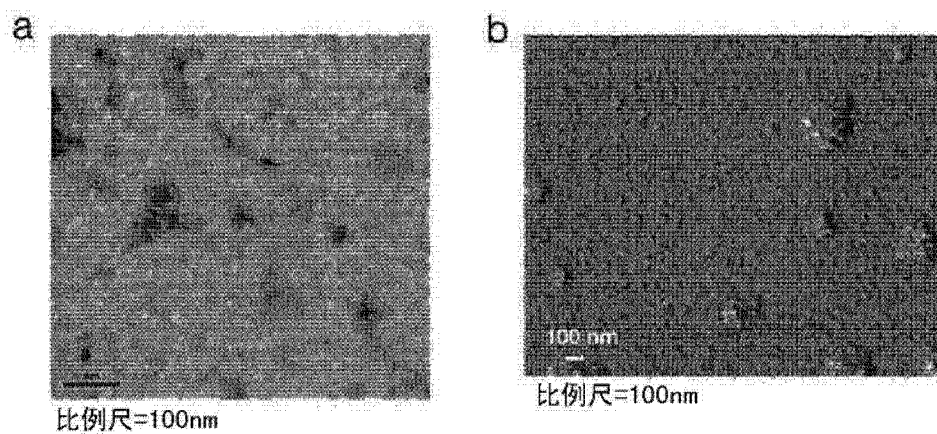


图 8

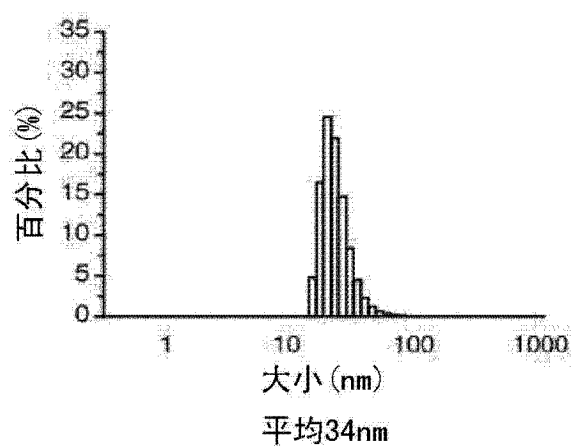


图 9

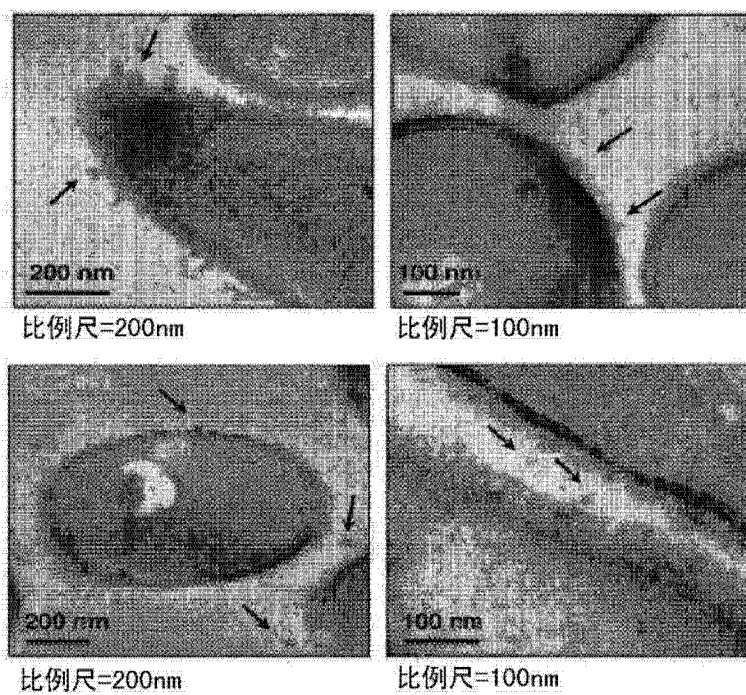


图 10

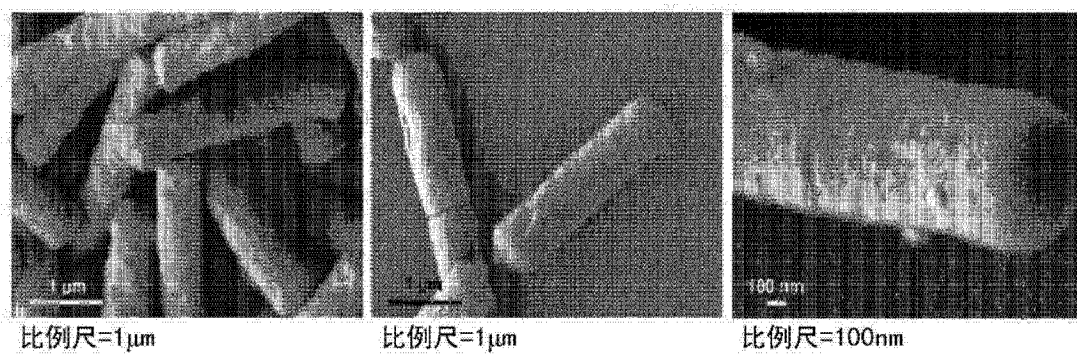


图 11

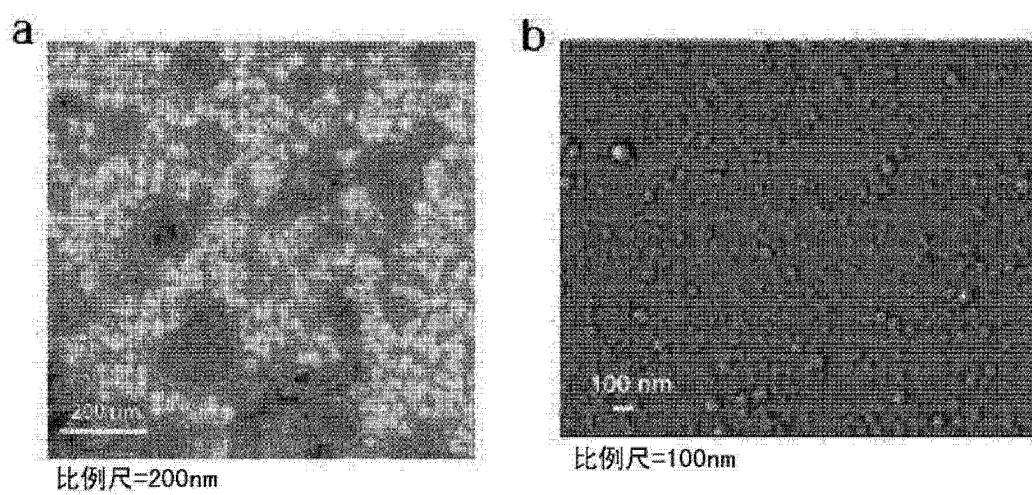


图 12

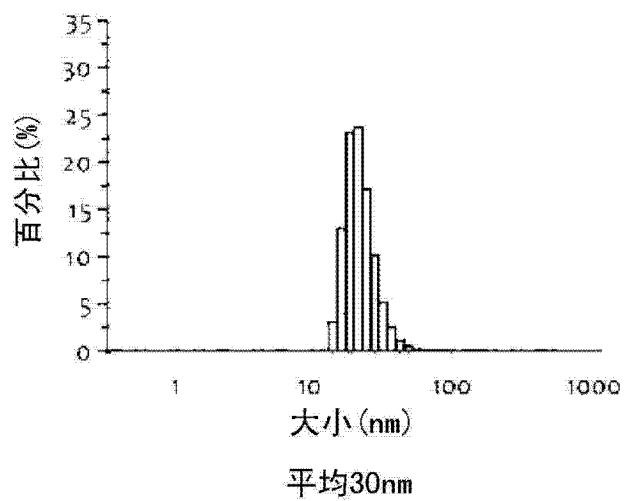


图 13

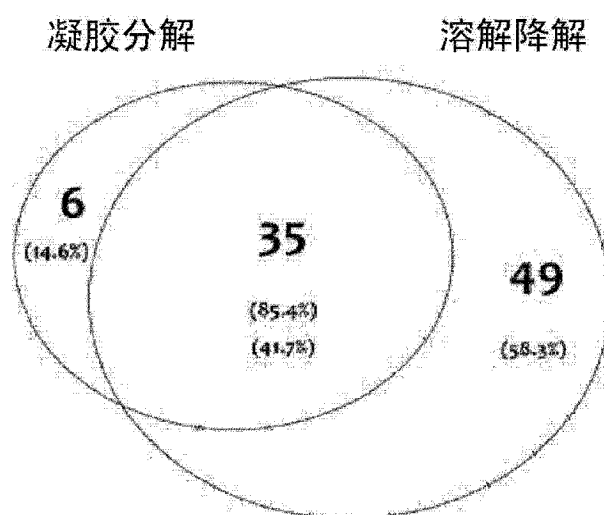


图 14

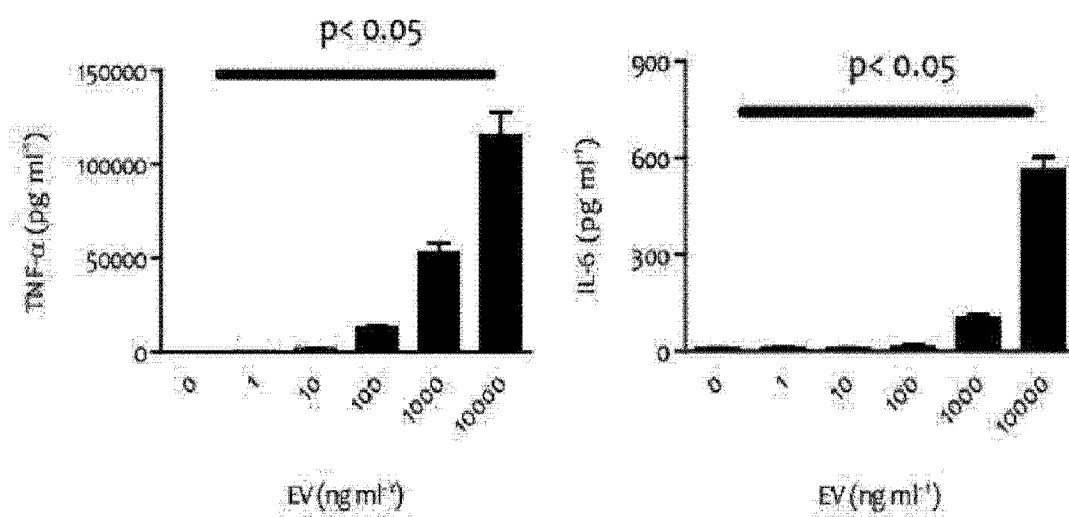


图 15

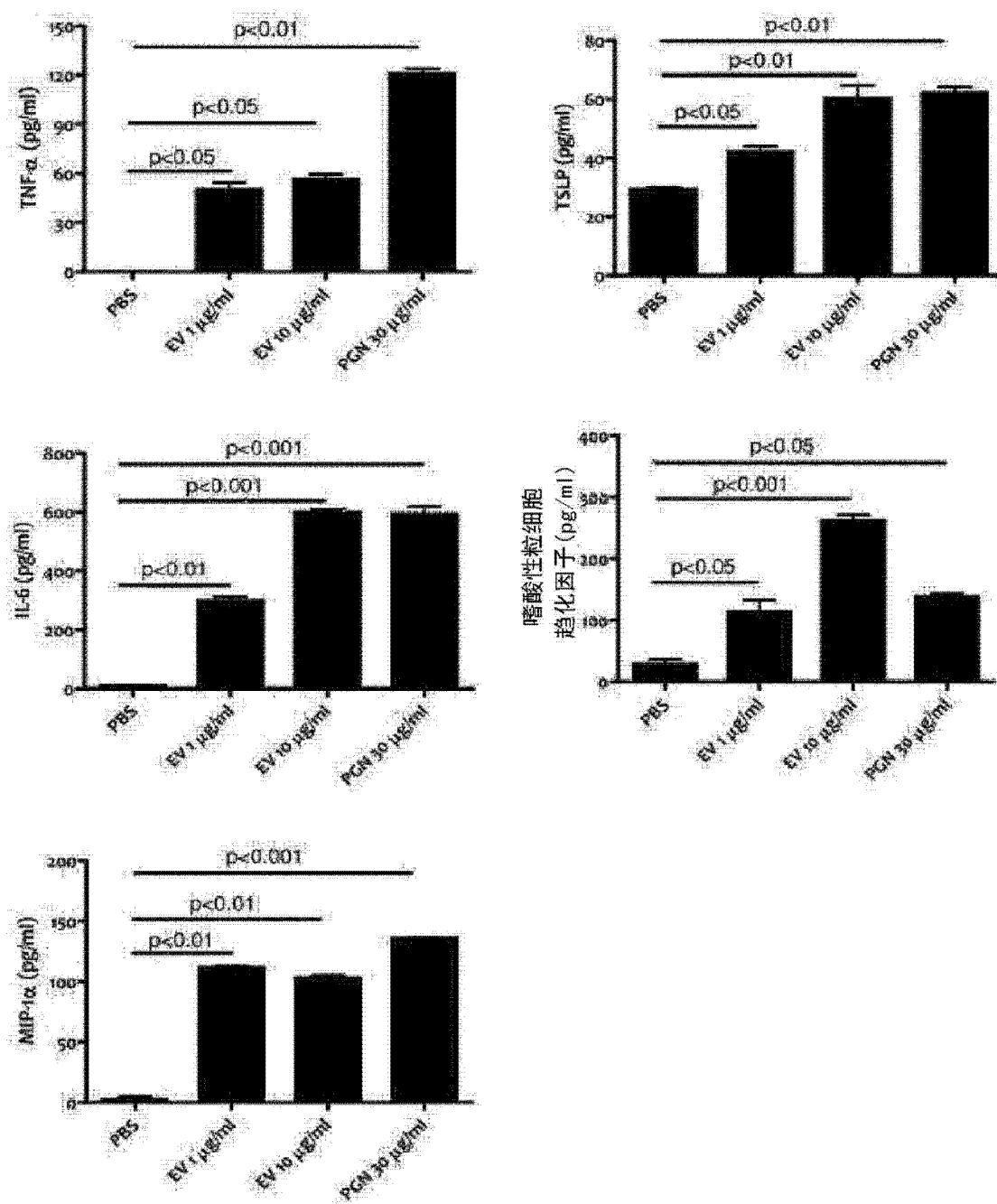


图 16

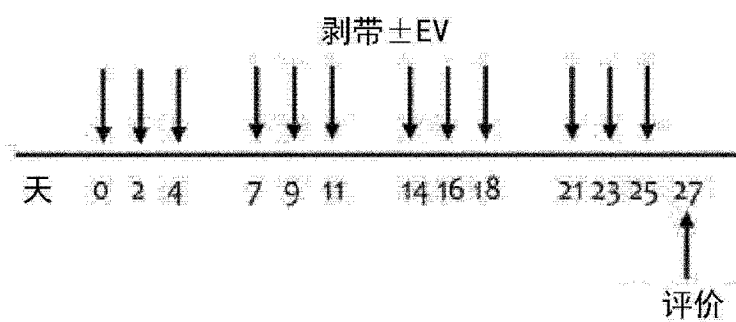


图 17

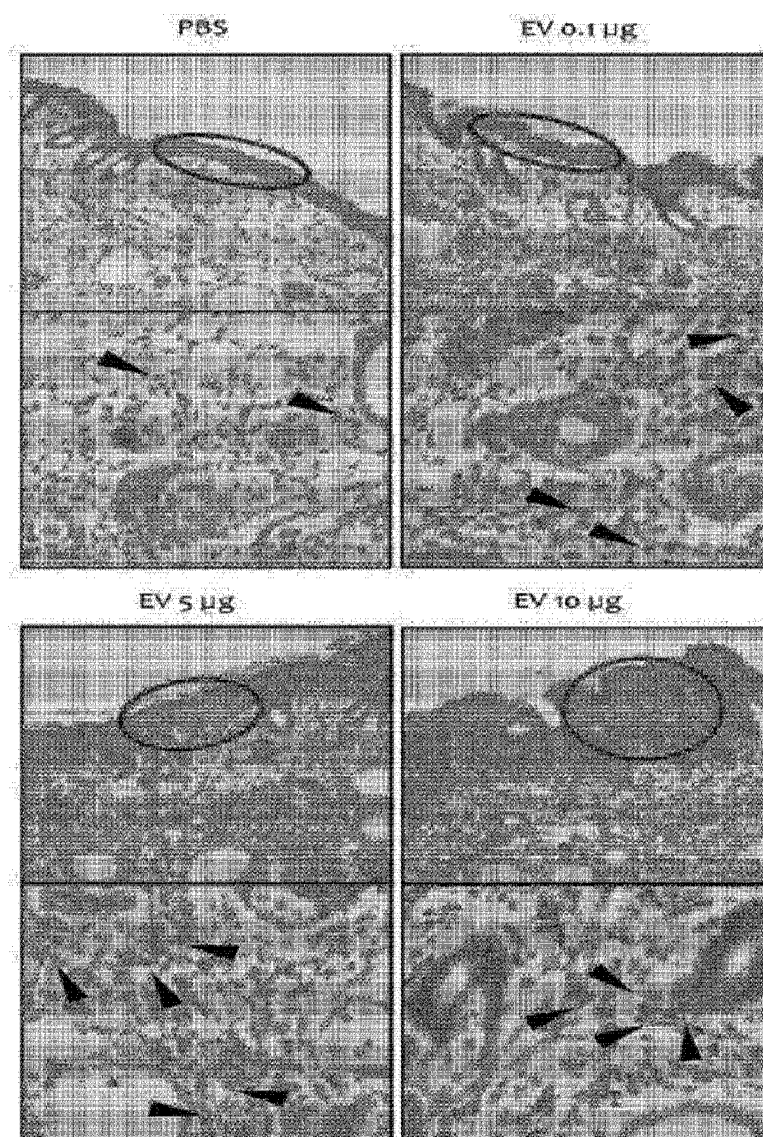


图 18

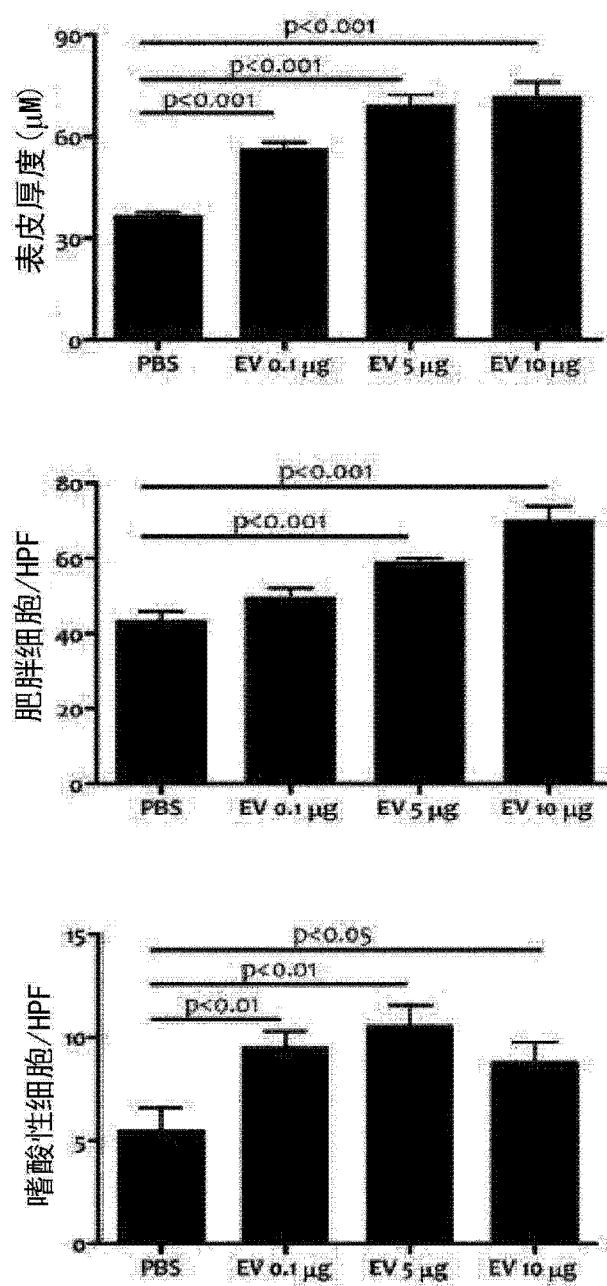


图 19

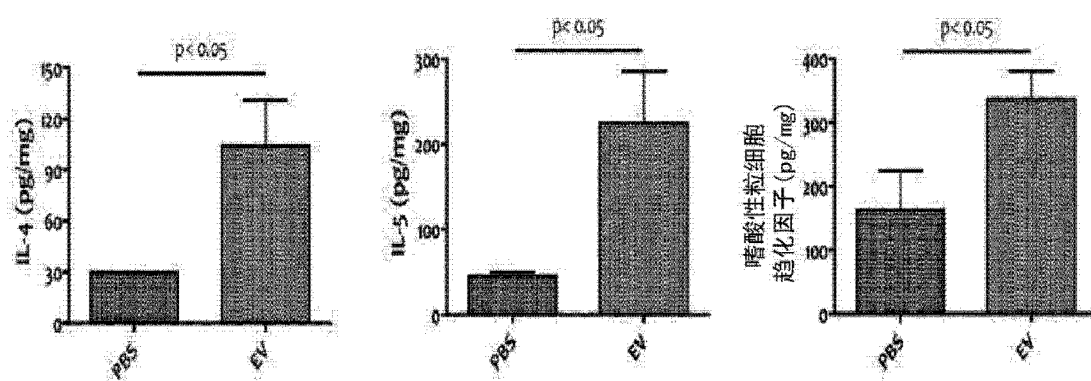


图 20

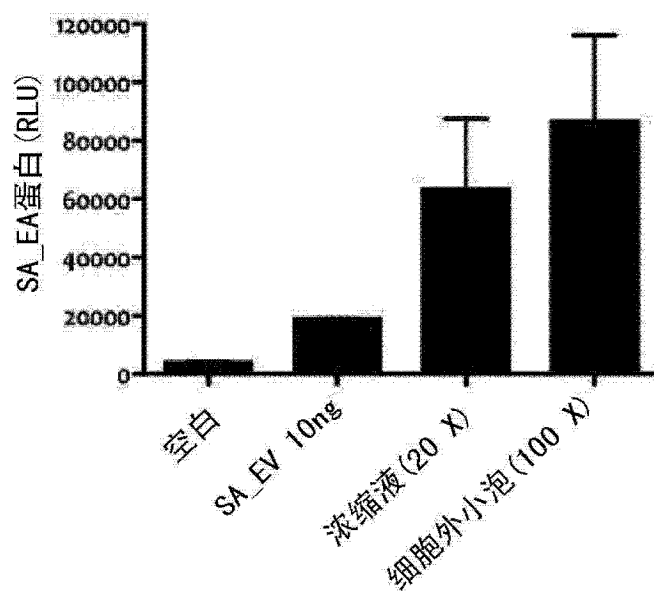


图 21

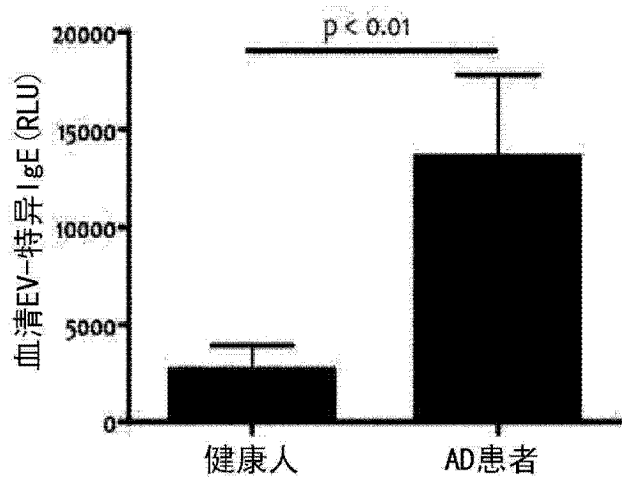


图 22

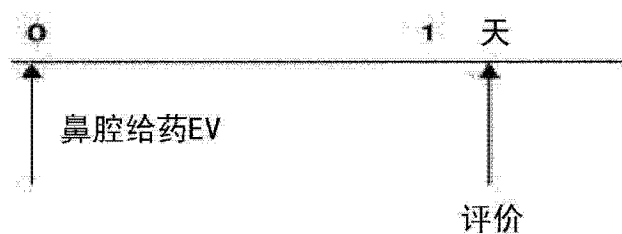


图 23

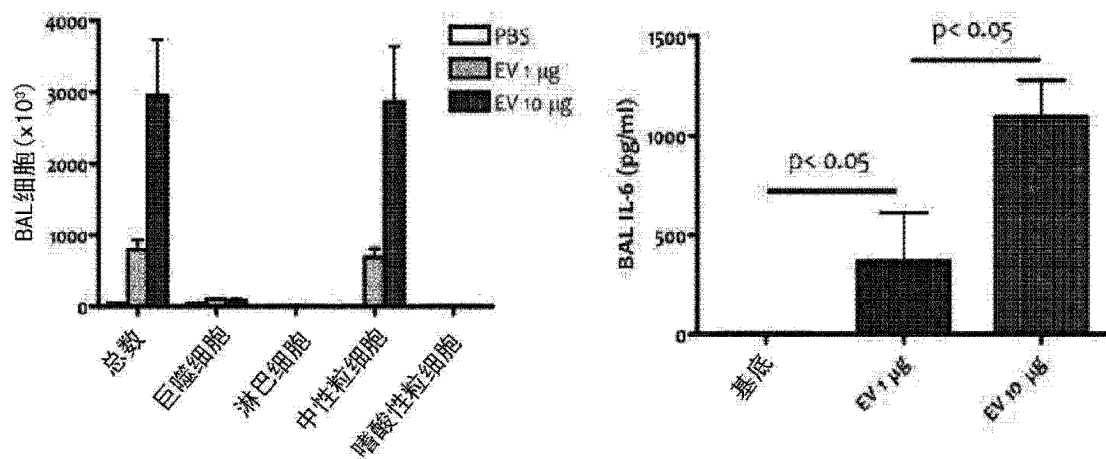


图 24

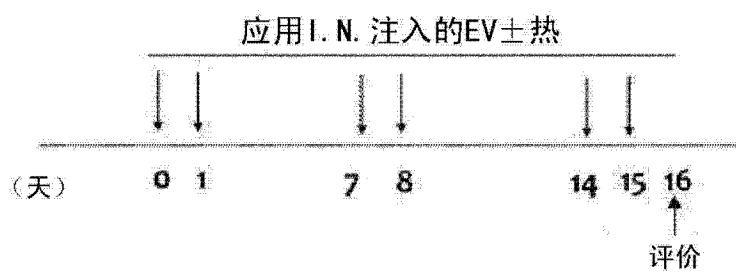


图 25

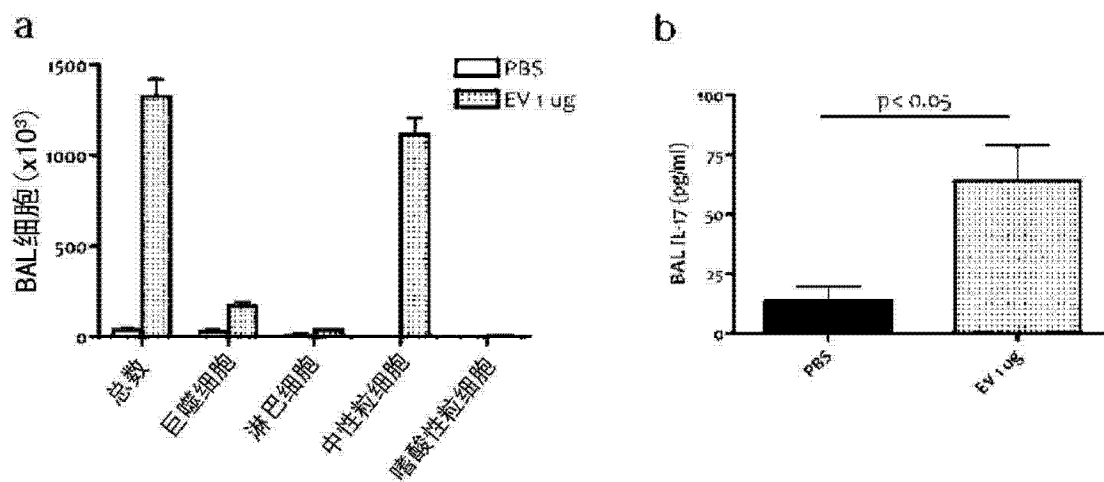


图 26

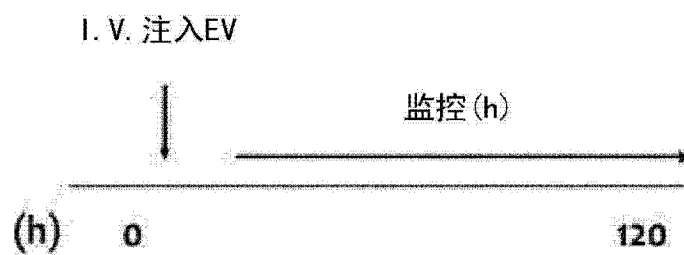


图 27

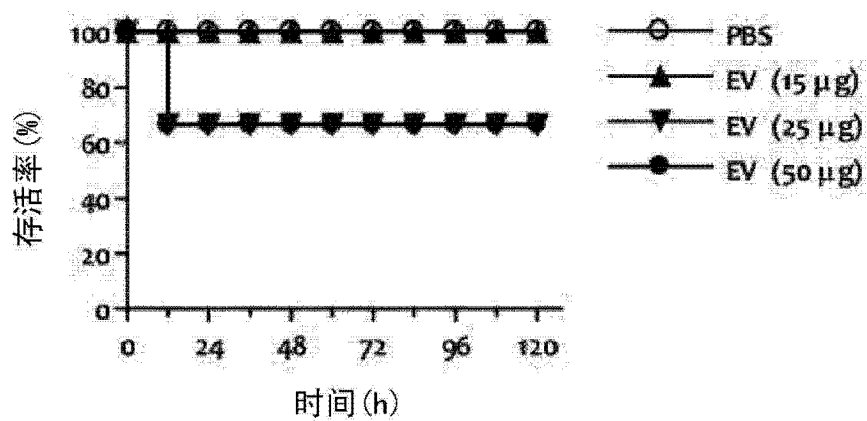


图 28

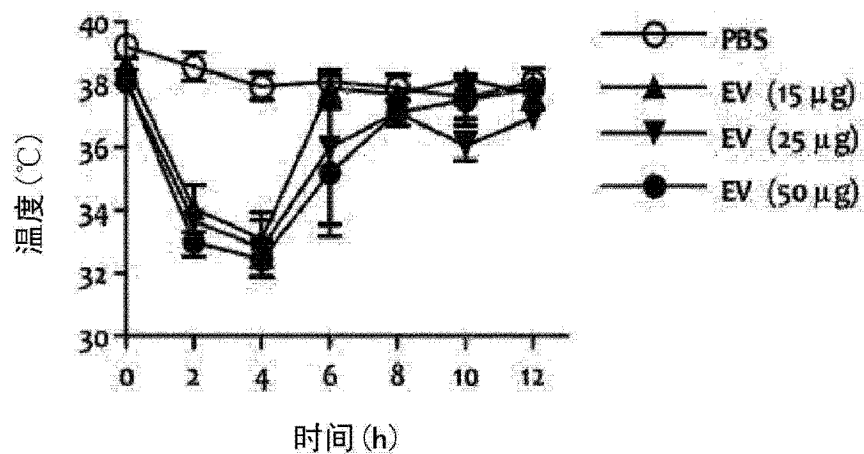


图 29

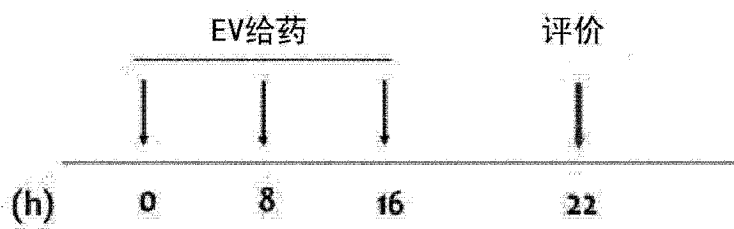


图 30

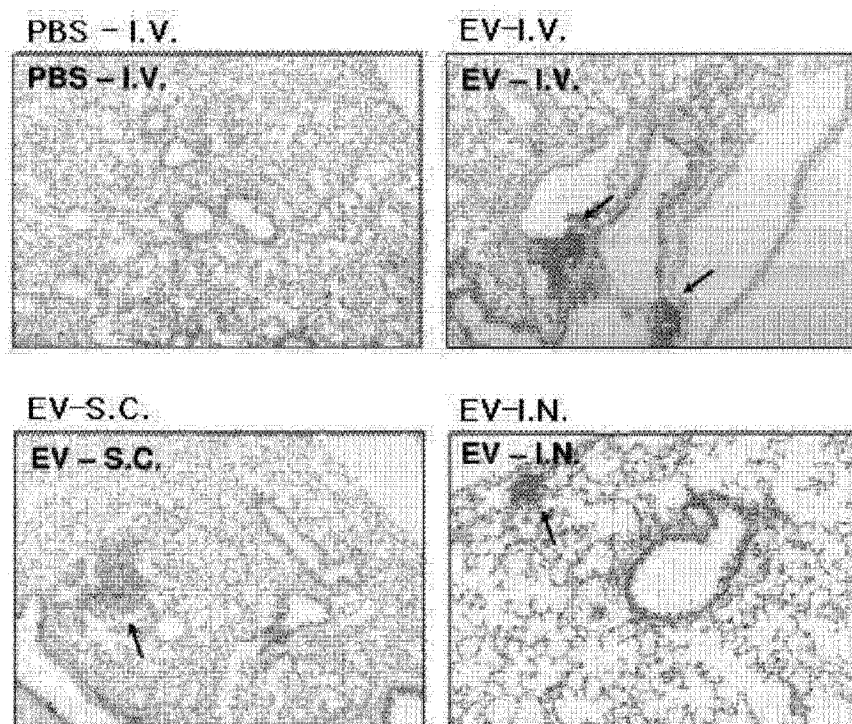


图 31

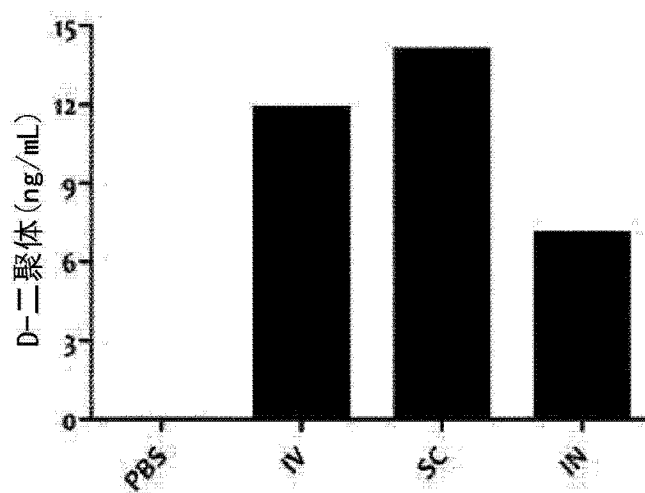


图 32

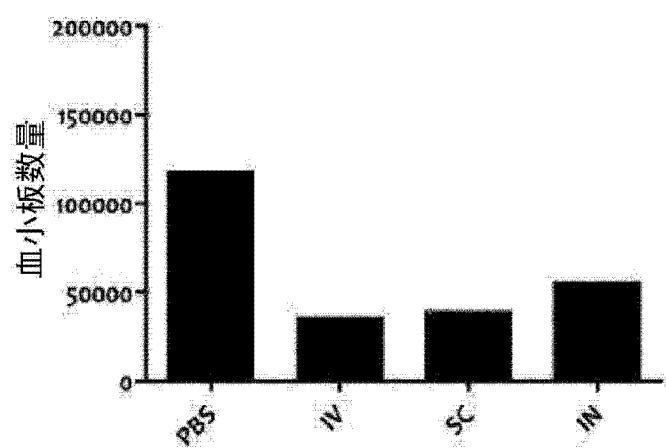


图 33

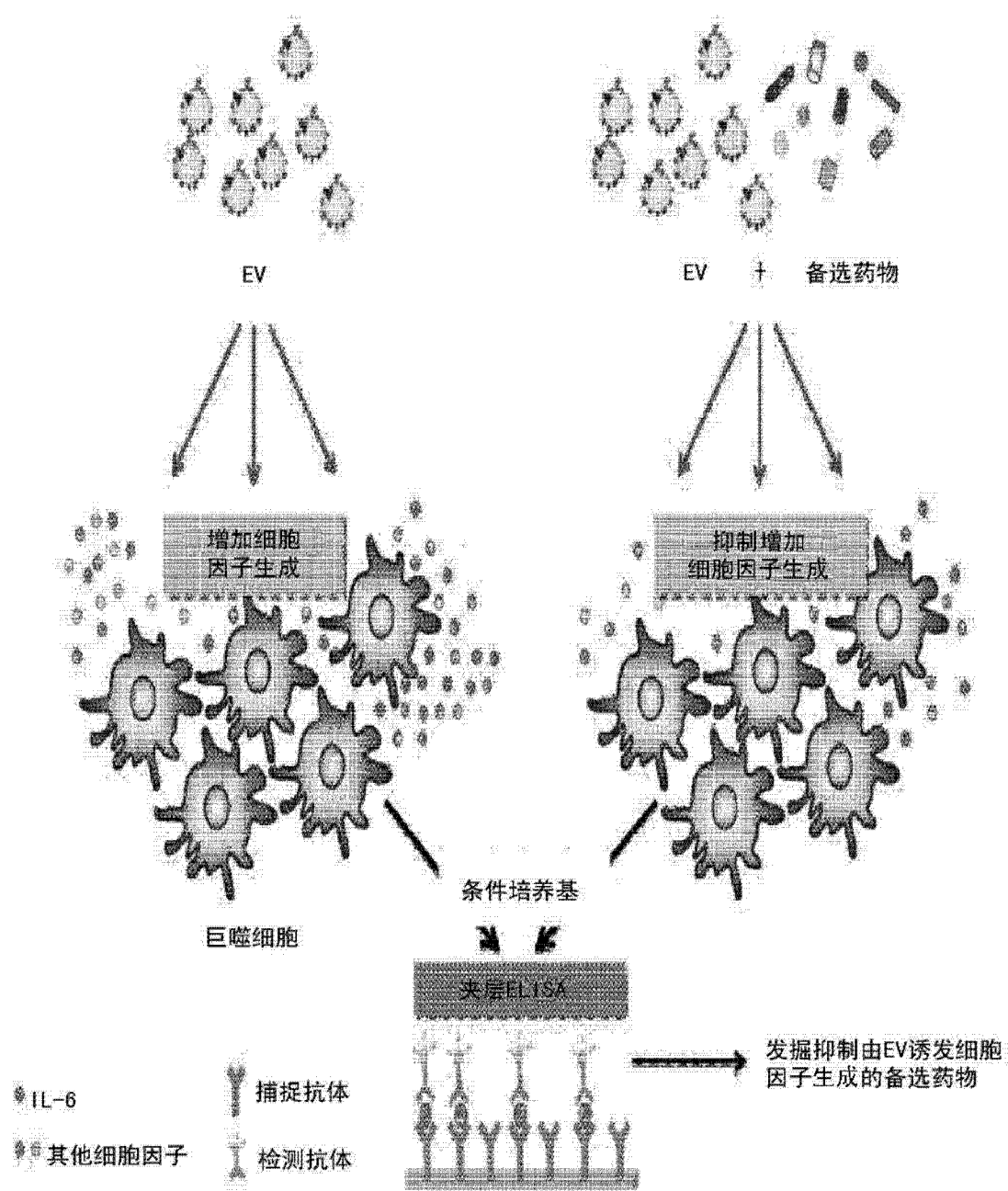


图 34



图 35

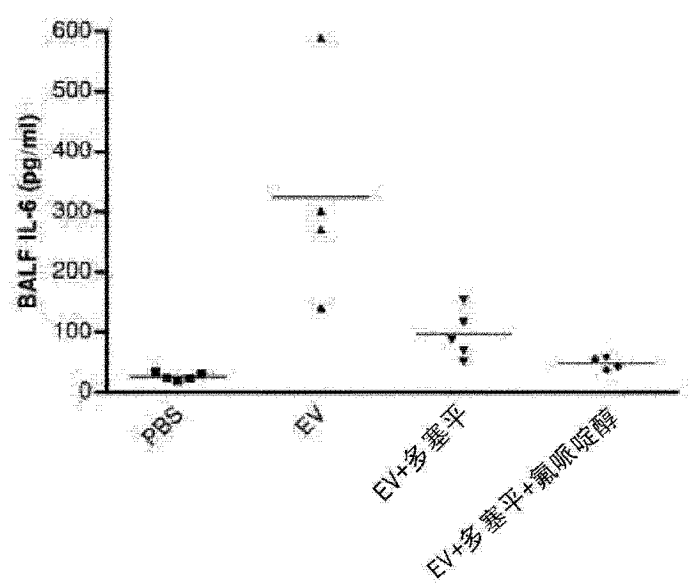


图 36

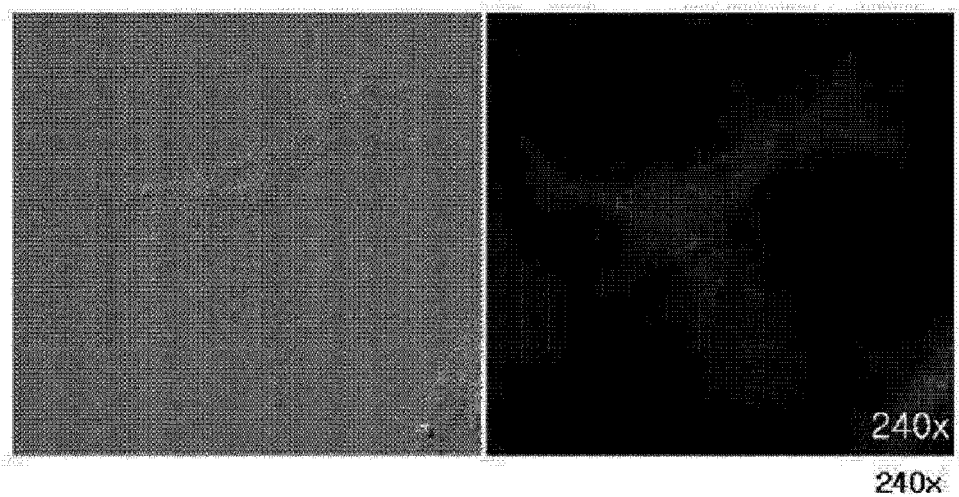


图 37

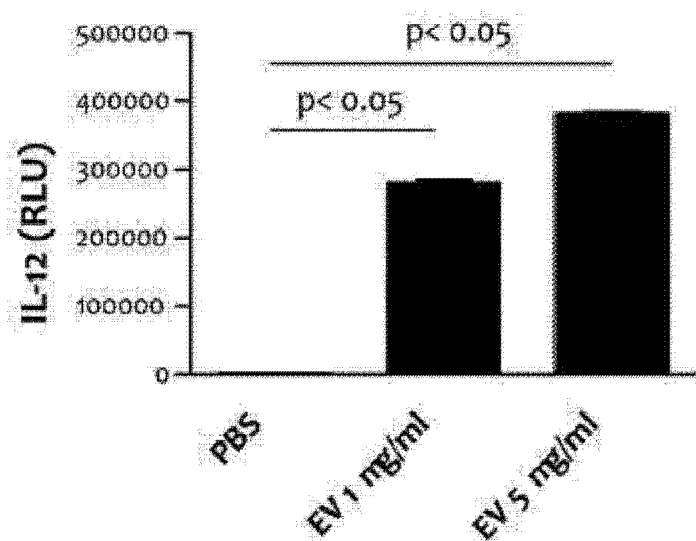


图 38

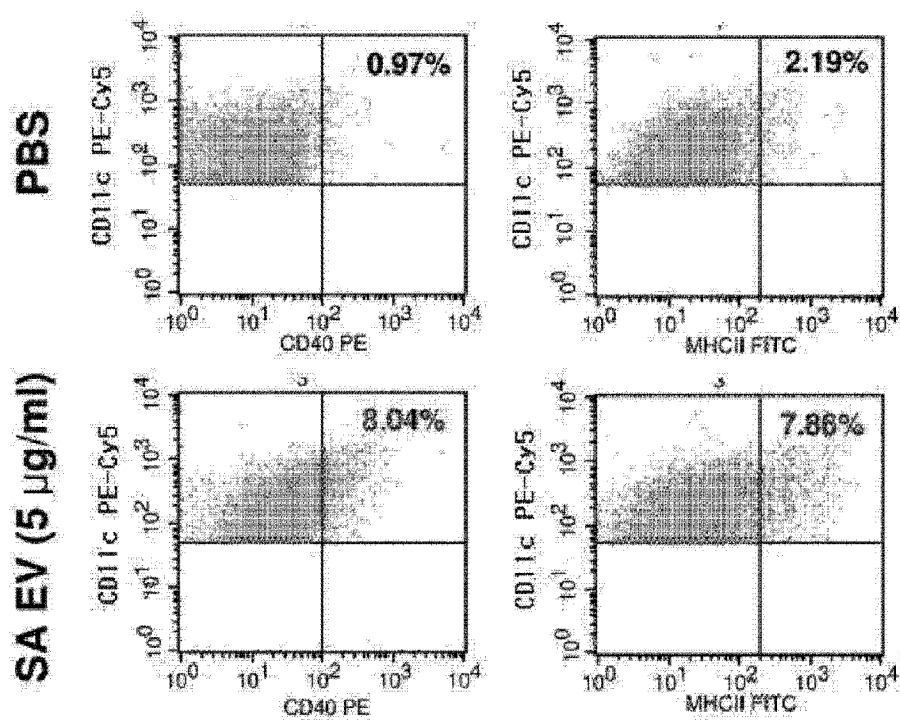


图 39

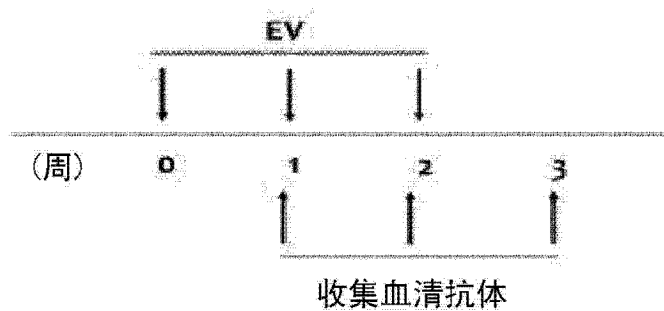


图 40

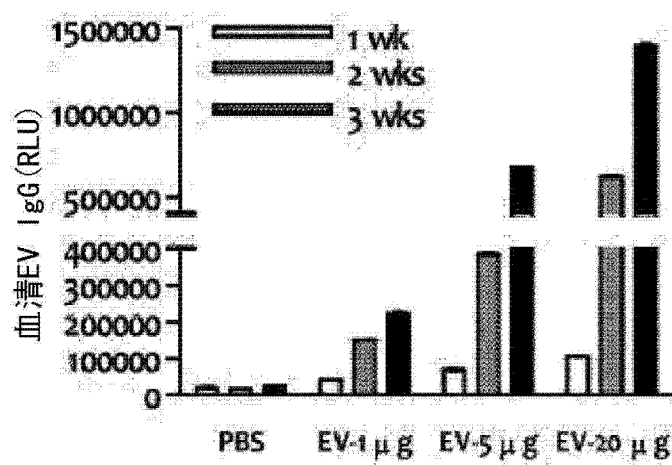


图 41

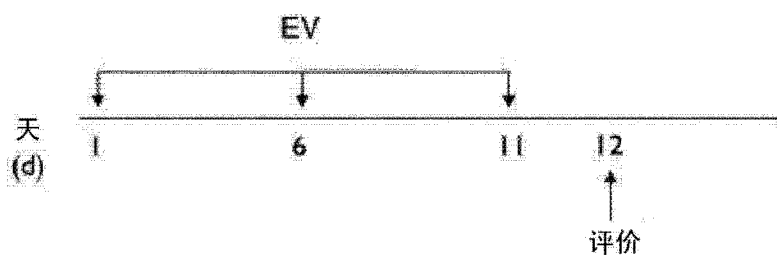


图 42

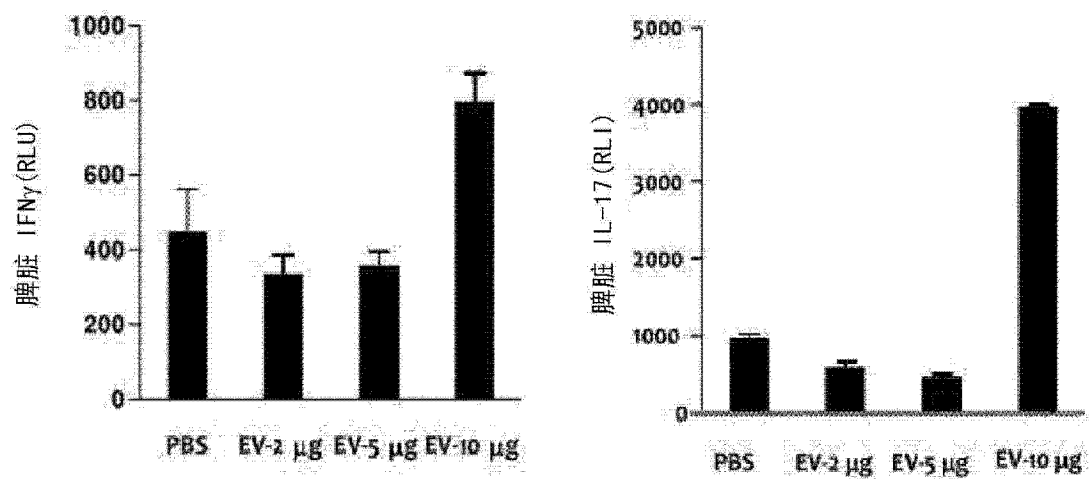


图 43

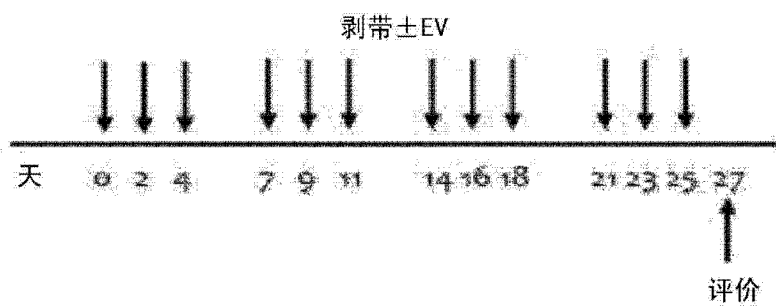


图 44

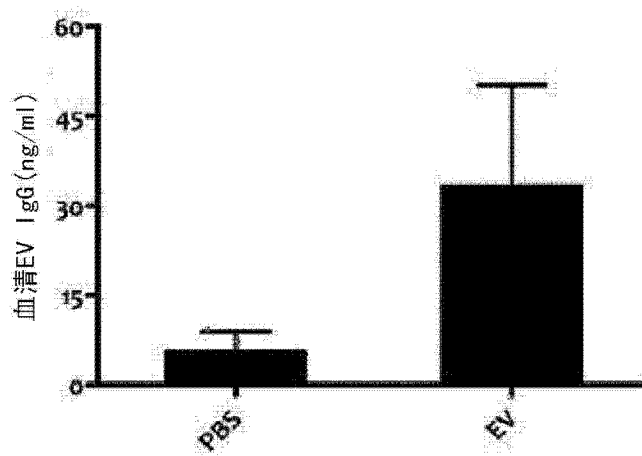


图 45

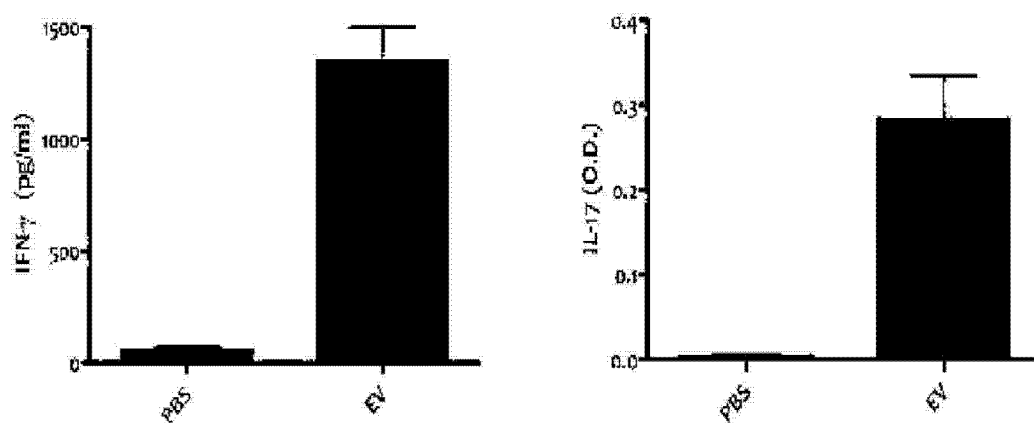


图 46

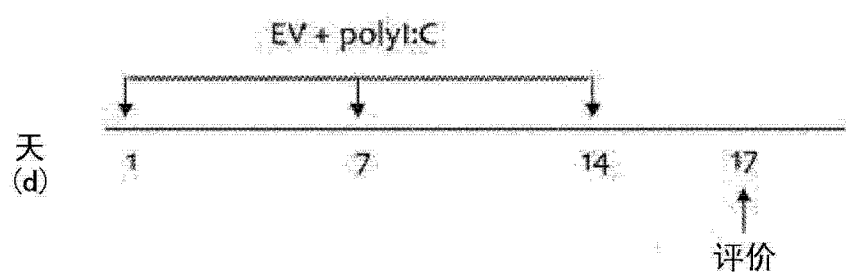


图 47

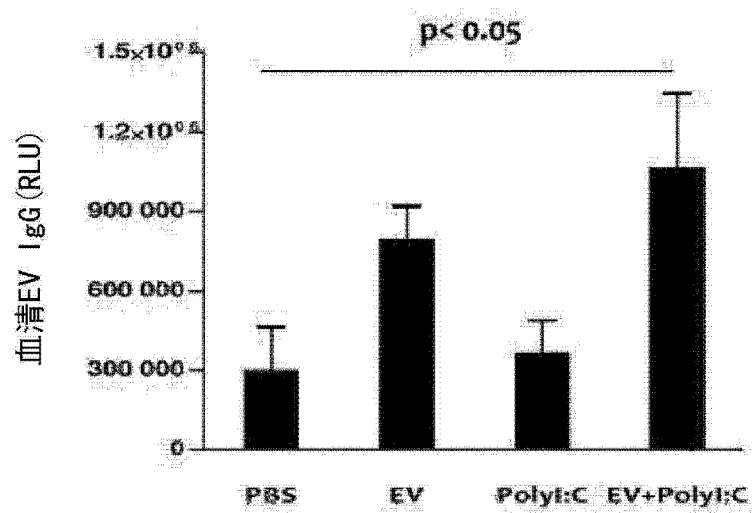


图 48

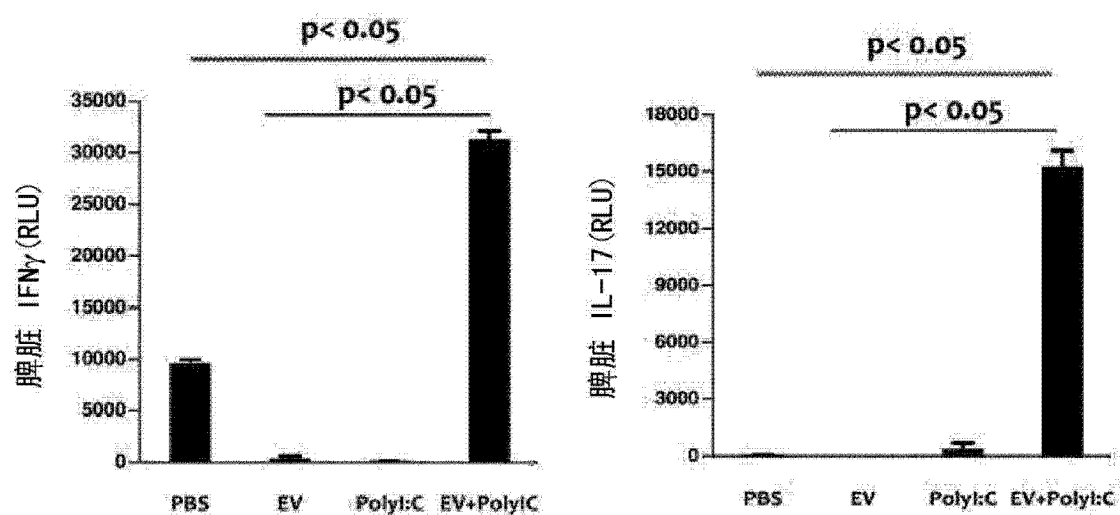


图 49

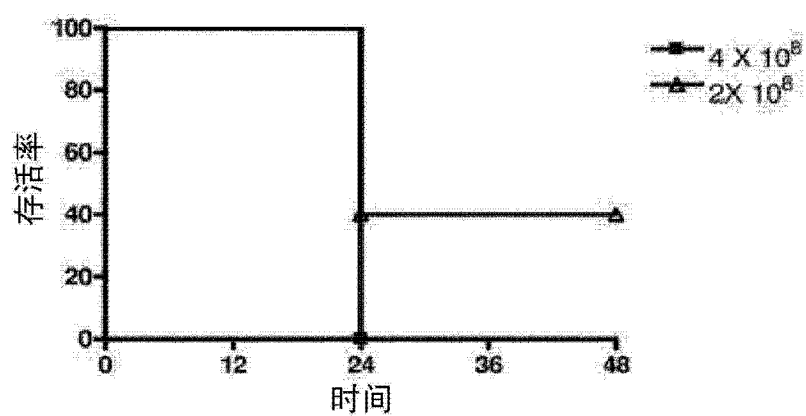


图 50

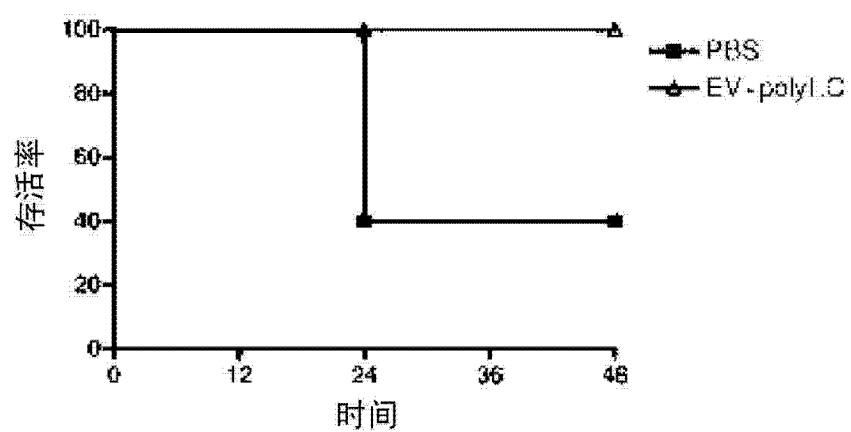


图 51

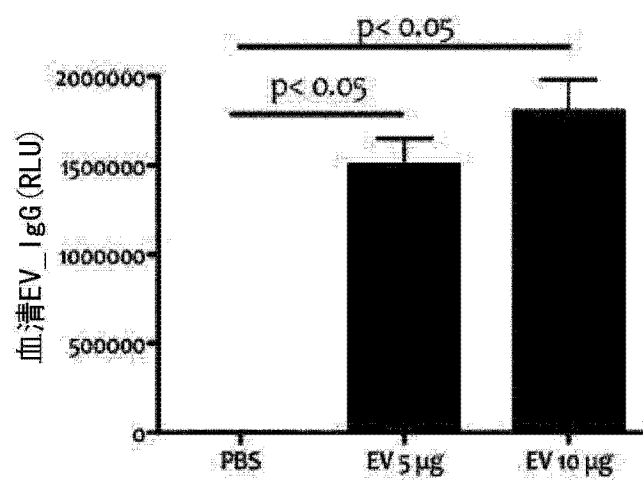


图 52

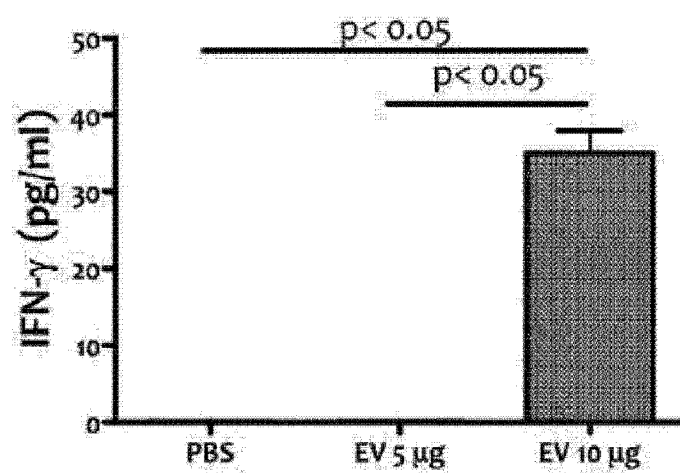


图 53

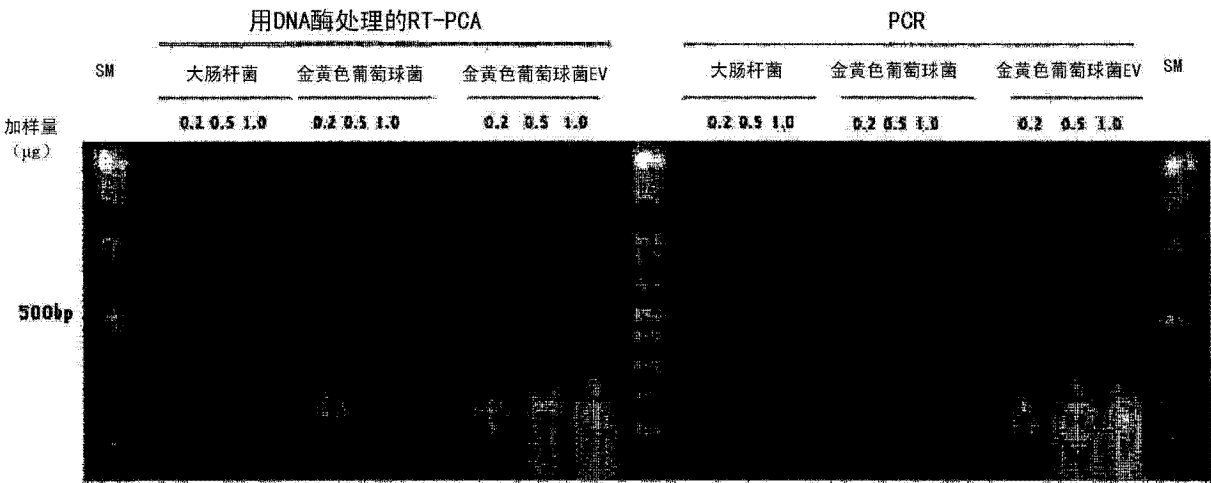
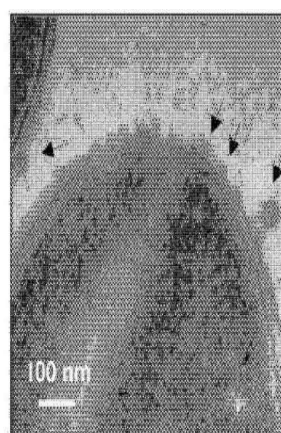


图 54

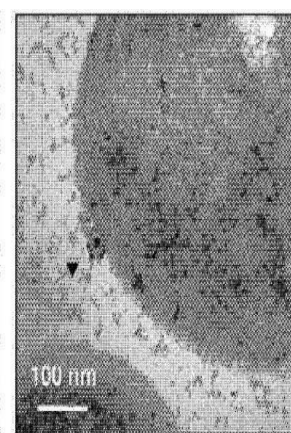
专利名称(译)	源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡及其用途		
公开(公告)号	CN102549143A	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201080039417.9	申请日	2010-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	阿昂梅迪克斯公司		
申请(专利权)人(译)	阿昂梅迪克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿昂梅迪克斯公司		
[标]发明人	高用松 金润根 李恩暎 洪成旭 金志贤 崔昇振		
发明人	高用松 金润根 李恩暎 洪成旭 金志贤 崔昇振		
IPC分类号	C12N1/00 A61K9/133 A61K35/74 A61K39/00 C12Q1/68 G01N33/53 C12R1/44		
CPC分类号	C12P1/04 A01K2207/00 A01K2267/0375 C12Q1/6883 C12Q2600/158 Y02P20/582		
优先权	1020090083621 2009-09-04 KR PCT/KR2010/001787 2010-03-23 WO		
其他公开文献	CN102549143B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡(extracellular vesicle, EV), 具体地说, 本发明提供了利用源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡构建的疾病动物模型、通过上述疾病动物模型筛选能够有效地预防或治疗疾病的备选物质的方法、能够预防或治疗由源于革兰氏阳性细菌的细胞外小泡诱发疾病的疫苗, 以及利用上述细胞外小泡诊断由革兰氏阳性细菌诱发疾病的致病因子的方法等。



比例尺=100nm



比例尺=100nm