



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107635571 B

(45) 授权公告日 2021. 09. 28

(21) 申请号 201680011779.4
(22) 申请日 2016.02.19
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107635571 A
(43) 申请公布日 2018.01.26
(30) 优先权数据
10-2015-0025381 2015.02.23 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.08.23
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2016/001665 2016.02.19
(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/137164 KO 2016.09.01
(73) 专利权人 MD保健株式会社
地址 韩国首尔
(72) 发明人 金润根 金英珠 池永求 卢美娜
文炳仁 金民惠
(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
代理人 李献忠 张华
(51) Int.Cl.
C12Q 1/6883 (2018.01)
A61K 35/742 (2015.01)

A61P 15/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(56) 对比文件
US 2015337356 A1,2015.11.26
CN 103954770 A,2014.07.30
US 9086412 B2,2015.07.21
CN 1265038 A,2000.08.30
Bence György 等.Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions.《Annual review of pharmacology and toxicology》.2014,第55卷第439-464页.
Dionne Tannetta 等.Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy.《cellular and molecular immunology》.2014,第11卷(第6期),第548-563页.
Theobald smith, M.D等.Further data on the effect of vaccination against bovine infectious abortion.《The journal of experimental medicine》.1926,第43卷(第3期),第327-330页.

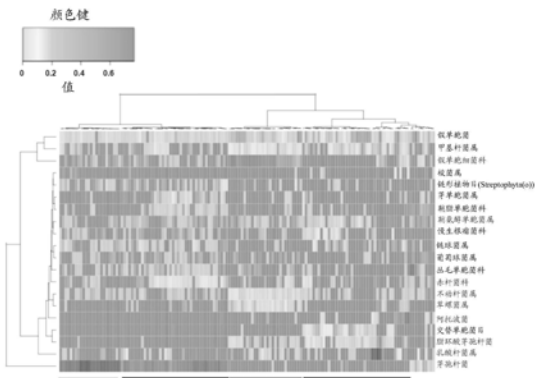
审查员 隋亚平

权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图8页

(54) 发明名称
含来源于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡
的治疗妊娠相关疾病的组合物

(57) 摘要
本发明涉及用于治疗妊娠相关疾病的组合物,更具体地,涉及用于预防或治疗早产或乳腺癌的药物组合物,其包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡,以及涉及诊断早产的方法.包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的药物组合物可以诱导怀孕或预防孕妇早产,也可用于预防或治疗妊娠相关疾病,如乳腺癌,以及可以有效地用于通过测量来源于孕妇的属于芽孢杆菌属

的细菌的细胞外囊泡的量来诊断早产的风险。



CN 107635571 B

1. 来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡在制备用于诊断孕妇早产的药物中的用途,其中所述孕妇早产的诊断包含以下步骤:

(A) 从孕妇尿液样本中分离的细胞外囊泡中提取16s rDNA;

(B) 对16s rDNA使用具有序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的引物对进行聚合酶链式反应(PCR);和

(C) 通过对所述PCR的产物进行测序确定相比于正常孕妇,在病例中来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的分布低至少两倍,则该病例具有高的早产风险。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,在步骤(A)中,所述细胞外囊泡的分离包括以下步骤:

(a) 将每个尿液样品煮沸10分钟至30分钟,然后冷却煮沸的所述尿液样品;

(b) 将冷却的产物离心以获得上清液;

(c) 依次通过0.45 μ m过滤器和0.22 μ m过滤器过滤所述上清液。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述细胞外囊泡具有20nm至300nm的平均直径。

含来源于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的治疗妊娠相关疾病的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗妊娠相关疾病的组合物,更具体地,涉及用于预防或治疗早产或乳腺癌的药物组合物,其包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡,以及涉及诊断早产的方法。

背景技术

[0002] 细菌将纳米级的细胞外囊泡 (EV) 分泌到胞外环境中以进行细胞间信息交换。来源于革兰氏阴性细菌的EV或外膜囊泡 (OMV) 是球形双层蛋白脂质,通常称为纳米囊泡,并且含有脂多糖、有毒蛋白质、以及属于细菌核酸的DNA和RNA。除了有毒的蛋白质和核酸之外,来源于革兰氏阳性细菌的EV还含有肽聚糖和脂磷壁酸,它们是细菌的细胞壁组分。据最近的研究,已报道,这种来源于细菌的EV在被认为是非传染性的炎症疾病发生时发挥重要作用。

[0003] 同时,众所周知,每年全世界有近1500万新生儿作为早产儿出生,占世界新生儿数的十分之一或以上。已知这种早产是由感染(尿道感染和阴道感染)、子宫和子宫颈畸形、体外受精、孕妇营养和遗传因素引起的。此外,许多研究人员认为子宫内感染是解释25%至40%早产的重要机制。孕妇由于激素和身体的变化而经历解剖、生理和生物化学变化。例如,嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 增加,结果阴道分泌物增加,并且阴道pH降低。因此,通过怀孕相关微生物的研究,可以获得怀孕和非怀孕妇女的阴道和羊水的有关细胞因子程度、pH变化、易感染方面的差异等方面的信息。

[0004] 乳腺癌是韩国妇女中发生的第二大癌症,在1999年至2002年期间,以15%左右的年均癌症发病率排在第二位。在全球范围内,生活在美国、欧洲和澳大利亚的西方人的乳腺癌发病率远高于亚洲人。虽然韩国的女性乳腺癌水平远远低于西方人,但生活在所谓西方化的大城市环境中的妇女有高的发病率和流行病学现象(其中与过去相比,更趋向于不断增加乳腺癌的发生率)的事实可能意味着导致乳腺癌发生的因素在韩国女性人口中是持续固有的并且正在加速癌症的发生。众所周知,月经初潮的较早年龄或更年期的较晚年龄导致根据正常月经周期的血液雌激素浓度维持较高,因此乳腺癌的风险变高。此外,众所周知,在早期年龄第一次足月分娩的妇女在分娩后10年内乳腺癌风险降低,生育率高的女性乳腺癌风险也较低。相反,据了解,从未分娩过的女性患乳腺癌的风险最高,但尚未发现怀孕对预防乳腺癌影响的准确机制。预防乳腺癌发生本身的主要预防措施包含抑制致癌环境以及改变个体健康行为和习惯。例如,也可以考虑通过抑制肥胖来尽可能晚地延迟初潮的年龄的方法或使用激素等药物的积极的预防方法。

[0005] 宏基因组学(也称为环境基因组学)是针对从环境中收集的样品获得的宏基因组数据的分析学。最近,已经使用基于16s核糖体RNA (16s rRNA) 碱基序列的方法列出了人类微生物群的细菌组成,并使用454FLX钛平台分析了16s核糖体RNA碱基序列。已经对孕妇的粪便、阴道分泌物和羊水中分析的宏基因组进行了研究,但是由于尿被认为是无细菌的,因此从未对怀孕期间在尿液中的细菌宏基因组分析进行研究。

[0006] 此外,迄今为止,还没有使用来源于细菌的EV诱导妊娠或预防早产,以及预防或治疗乳腺癌的情况。

发明内容

[0007] 【技术问题】

[0008] 本发明的发明人使用来自非孕妇和孕妇尿液的细胞外囊泡的DNA进行宏基因组分析,结果证实了来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡在孕妇中尤其是经过正常分娩的妇女中显著增加,从而完成了本发明。

[0009] 因此,本发明的目的是提供一种用于预防或治疗诸如早产或乳腺癌等妊娠相关疾病的药物组合物,所述药物组合物包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡。

[0010] 本发明的另一个目的是提供一种诊断早产的方法。

[0011] 然而,本发明的技术目标不限于上述目标,本领域普通技术人员根据下面的描述将清楚地了解其它未提及的技术目标。

[0012] 【技术方案】

[0013] 为了实现本发明的上述技术目的,本发明提供了预防或治疗妊娠相关疾病的药物组合物,所述药物组合物包含作为活性成分来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡。

[0014] 在本发明的一实施方式中,所述细胞外囊泡可以是属于所述芽孢杆菌属的细菌的培养物或从用属于所述芽孢杆菌属的细菌发酵的食物中分离出的。

[0015] 在本发明的另一实施方式中,所述细胞外囊泡是天然或人为地从属于芽孢杆菌属的细菌分泌的。

[0016] 在本发明的另一实施方式中,所述细胞外囊泡具有20nm至300nm的平均直径。

[0017] 在本发明的另一实施方式中,妊娠相关疾病可能是早产。

[0018] 在本发明的另一实施方式中,妊娠相关疾病可能是乳腺癌。

[0019] 本发明还提供了一种用于诱导正常妊娠的组合物,所述组合物包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡。

[0020] 在本发明的一实施方式中,所述细胞外囊泡可以是属于所述芽孢杆菌属的细菌的培养物或从用属于所述芽孢杆菌属的细菌发酵的食物中分离出的。

[0021] 在本发明的另一实施方式中,所述细胞外囊泡是天然或人为地从属于所述芽孢杆菌属的细菌分泌的。

[0022] 在本发明的另一实施方式中,所述细胞外囊泡具有20nm至300nm的平均直径。

[0023] 本发明还提供了一种诊断早产的方法,该方法包含以下过程:

[0024] (A) 从分离自孕妇尿液样品中的细胞外囊泡中提取16s rDNA;

[0025] (B) 对16s rDNA使用具有序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的引物对进行聚合酶链式反应(PCR);以及

[0026] (C) 通过对所述PCR的产物进行测序确定相比于正常孕妇,在病例中来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的分布低至少两倍,则该病例具有高的早产风险。

[0027] 在本发明的一实施方式中,在过程(A)中,所述细胞外囊泡的分离包含以下过程:

[0028] (a) 煮沸每个尿液样品持续10分钟至30分钟,然后冷却煮沸的所述尿液样品;

- [0029] (b) 离心冷却的产物以获得上清液;以及
- [0030] (c) 通过0.45 μ m过滤器和0.22 μ m过滤器依次过滤所述上清液。
- [0031] 在本发明的另一实施方式中,所述细胞外囊泡具有20nm至300nm的平均直径。
- [0032] 本发明还提供了一种预防或治疗妊娠相关疾病的方法,所述方法包含向个体施用包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的组合物。
- [0033] 本发明还提供了来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的用途,其用于预防或治疗妊娠相关疾病。
- [0034] 本发明还提供了来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的用途,其用于诊断早产。
- [0035] **【有益效果】**
- [0036] 根据本发明,包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的药物组合物可以诱导怀孕或预防孕妇早产,可用于预防或治疗妊娠相关疾病,如乳腺癌,并且可以有效地用于通过测量来源于孕妇的属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的量来诊断早产的风险。

附图说明

- [0037] 图1A和1B是所获得的用以确认来来源于作为革兰氏阴性细菌的大肠杆菌(*Escherichia coli*)和作为革兰氏阳性细菌的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞外囊泡在通过肌肉注射给小鼠施用后是否通过尿液排泄的图像,并分别显示在使用所述细胞外囊泡后21小时,小鼠的全身体内荧光图像和提取的小鼠器官的特异性体内荧光图像。
- [0038] 图2示出了从孕妇(左侧)和作为正常对照的非怀孕妇女(右侧)的尿液分离的来源于细菌的细胞外囊泡的多种分类组。
- [0039] 图3A至图3D分别示出了从作为正常对照的非怀孕妇女(蓝色下划线,右侧)和孕妇(红色下划线,右侧)的尿液中分离的来源于细菌的细胞外囊泡的组成成分的门级分析结果、纲级分析结果、目级分析结果和科级分析结果。
- [0040] 图4示出了从正常分娩组和早产组的尿液中分离的来源于细菌的细胞外囊泡的分布结果。
- [0041] 图5示出了从正常分娩组和早产组的尿液中分离的来源于细菌的细胞外囊泡的分布的总结结果。
- [0042] 图6A至6D分别示出了从正常分娩组(绿色下划线,左侧)和早产组(紫色下划线,右侧)的尿液中分离的来源于细菌的细胞外囊泡的分布的门级分析结果、纲级分析结果、目级分析结果和科级分析结果。

具体实施方式

- [0043] 本发明提供了用于预防或治疗妊娠相关疾病的药物组合物,其包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡。
- [0044] 本文所用的术语“预防”是指通过施用根据本发明所述的药物组合物来抑制妊娠相关疾病或延迟其发作的所有行为。

[0045] 本文所用的术语“治疗”是指通过施用根据本发明所述的药物组合物减轻或有益地改变由于妊娠相关疾病引起的症状的所有行为。

[0046] 来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡包含天然或人为地分泌的细胞外囊泡,并且可以从属于芽孢杆菌属的细菌的培养物或者从用属于芽孢杆菌属的细菌发酵的食物中分离。从细菌培养物或加入细菌的发酵食品中分离细胞外囊泡的方法没有特别限制,只要细胞外囊泡被分离即可,并且例如可以通过使用选自离心、超速离心、使用过滤器的过滤、凝胶过滤色谱法、自由流动电泳、毛细管电泳等或其组合中的一种方法从培养物或发酵食物中分离出细胞外囊泡。此外,分离方法还可以包含洗涤以去除杂质、浓缩所获得的细胞外囊泡等等。

[0047] 使用这些方法分离的细胞外囊泡可以具有20nm至300nm的平均直径,优选为50nm至200nm的平均直径,但是本发明不受限于此。

[0048] 本发明的妊娠相关疾病总体涉及怀孕期间或之后发生的妊娠相关疾病或由于妊娠而被抑制的疾病。怀孕期间发生的疾病的代表性的示例是早产,并且其发生被怀孕抑制的疾病可能是乳腺癌,但是本发明不受限于此。

[0049] 本发明还提供了用于诱导正常分娩的组合物,其包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡。

[0050] 在本发明中,评价用于研究的受试者组的一般特征,即正常分娩的孕妇、早产的孕妇和作为正常对照的非孕妇的一般特征,并对其统计学意义进行分析。在本发明的一实施方式中,证实作为评价用于研究的受试者组的特征的结果,正常分娩组和早产组在胎龄中显示出显著差异,并且阿普加(apgar)新生儿评分在早产组中显著较低(见实施例1)。

[0051] 本文使用的术语“阿普加新生儿评分”是指由麻醉师弗吉尼亚阿普加博士于1952年开发的并用于快速评估新生儿的身体状况的评分系统。也就是说,阿普加新生儿评分是用于在分娩过程中量化麻醉对新生儿的效果的分数,测试通常在出生后一分钟和五分钟进行,并根据五个标准进行评分:皮肤颜色;脉搏率;反射和应激性;肌张力;和呼吸。出生后1分钟进行的测试得分低,表明新生儿需要医疗照顾,但并不一定表示长期存在的问题。

[0052] 在本发明的另一实施方式中,为了确认通过尿液排出来源于细菌的细胞外囊泡,通过肌肉注射给小鼠施用来源于作为革兰氏阴性细菌的大肠杆菌和作为革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌的细胞外囊泡。注射后3小时和6小时,证实通过尿液排出了细胞外囊泡。此外,从小鼠中提取器官,作为分析的结果,证实在肝脏和肾脏中存在两种类型的来源于细菌的细胞外囊泡(参见实施例2)。

[0053] 在本发明的另一实施方式中,基于实施例2的结果,收集正常分娩组、早产组和非孕妇的尿液样品,并从尿液样品中的细胞外囊泡中提取DNA,然后在其上进行宏基因组学分析(参见实施例3)。

[0054] 作为分析从由非怀孕妇女组成的正常对照和孕妇的尿液样品中分离出的细胞外囊泡的分布差异的结果,证实了大量来源于属于假单胞菌(*Pseudomonas*)属的细菌的细胞外囊泡是分布在正常对照中,并且相比于在正常对照中,在孕妇中分布了数量大得多的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡(参见实施例4)。

[0055] 在本发明的另一实施方式中,分析了从正常分娩组的尿液样品分离的细胞外囊泡的分布和从早产组的尿液样品分离的细胞外囊泡的分布之间的差异。结果,证实在早产的

孕妇的尿液样品中,来源于甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、脲原体属 (*Ureaplasma*)、和韦荣氏球菌属 (*Veillonella*) 的细菌的细胞外囊泡增加,而在正常分娩的孕妇的尿液样品分布大量来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡 (见实施例5)。

[0056] 根据本发明的药物组合物包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡,并且可以包含药学上可接受的载体。药学上可接受的载体包含通常用于制剂的载体,例如盐水、灭菌水、林格氏溶液 (Ringer's solution)、缓冲盐水、环糊精、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇、脂质体等,但本发明不局限于此,并且如果需要,还可以包含其它一般添加剂,例如抗氧化剂、缓冲溶液等。此外,可以通过另外添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂、润滑剂或其它来配制注射用制剂,例如水溶液、悬浮液、乳液等,丸剂,胶囊,颗粒剂或片剂。关于合适的药学上可接受的载体和制剂,制剂可优选根据Remington's标准 (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA) 中公开的方法根据每种成分进行配制。本发明的药物组合物的制备没有特别限制,但是药物组合物可以配制成注射剂、吸入剂、皮肤外用剂等形式。

[0057] 根据使用目的,本发明的药物组合物可以口服或肠胃外给药 (例如,静脉内给药、皮下给药、腹膜内给药或局部给药),并且其合适的剂量可以根据患者的病症和体重、疾病的严重程度、药物类型、给药途径和给药时间而变化,但可以由本领域普通技术人员适当选择。

[0058] 根据本发明的组合物以药学有效量给药。本文使用的术语“药学有效量”是指足以以适用于医疗治疗的合理利益/风险比治疗疾病的量,并且有效剂量水平可以根据包含患者疾病类型、疾病严重程度、药物活性、对药物的敏感性、给药时间、给药途径、排泄率、治疗期和同时使用的药物、以及在医疗领域中众所周知的因素来确定。根据本发明的组合物可以作为单独的治疗剂或与其它治疗剂组合施用,可以与现有治疗剂连续或同时施用,并且可以以单一剂量或多剂量施用。考虑所有上述因素,以最小量施用所述组合物以实现最大效果而无副作用,这是重要的,并且这可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0059] 特别地,根据本发明的组合物的有效量可以根据患者的年龄、性别和体重而变化。通常,药物组合物可以每 (kg) 体重每天或每隔一天0.001mg至150mg,优选0.01mg至100mg的量施用,或可以每日一次或三次施用。然而,该剂量可以根据给药途径、肥胖的严重程度、性别、体重、年龄等而增加或减少,因此该剂量不意图以任何方式限制本发明的范围。

[0060] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供了一种预防或治疗妊娠相关疾病的方法,所述方法包含向个体施用包含作为活性成分的来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的药物组合物。

[0061] 本文所使用的术语“个体”是指患有需要治疗的疾病的受试者,更具体地,包括哺乳动物,例如人,或非人灵长类动物,例如小鼠、大鼠、狗、猫、马、母牛等。

[0062] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供了一种诊断早产的方法,包含:从孕妇尿液样品中分离出的细胞外囊泡中提取16s rDNA;对16s rDNA使用具有序列SEQ ID NO:1和序列SEQ ID NO:2的引物对进行聚合酶链式反应 (PCR);并且在通过对PCR产物进行测序,确定在病例中来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的分布比正常孕妇的该分布低至少两倍,则该病例具有高的早产风险。

[0063] 在本发明中,从分离自孕妇尿液样品中的细胞外囊泡中提取16s rDNA包括:将该

尿液样品煮沸持续10分钟至30分钟,然后冷却煮沸的尿液样品;离心冷却的产品以获得上清液;并依次通过0.45 μ m过滤器和0.22 μ m过滤器过滤上清液,但本发明不受限于此。

[0064] 在下文中,将描述示例性实施方式以有助于理解本发明。然而,提供以下实施例以更容易理解本发明,但并不意图限制本发明的范围。

[0065] [实施例]

[0066] 实施例1.用于研究的受试者组的一般特征

[0067] 在本发明的实施方式中,从2006年到2008年,对在檀国大学(Dankook University)和梨花女子大学(Ewha Womans University)梨花医学中心入院的73名非孕妇和74名孕妇(39名正常分娩妇女和35名早产妇女)进行了研究。在檀国大学医院接受体格检查的非孕妇被确定为正常对照组,并且以37周为基础,将作为实验组的74名孕妇分为正常分娩组和早产组。将在医院不到37周就生了婴儿的早产妇女作为一个集合,而正常分娩组由在医院接受产前检查并在37周或以上的胎龄生了婴儿的妇女组成。孕妇入院标准为单胎出生并且胎龄25周至42周以下,入院排除标准为多胎、死胎、先天性畸形、慢性高血压、胎盘前置和胎盘早剥。

[0068] 参加研究之前,非怀孕妇女和孕妇签署了同意书,熟练的研究人员收集了参与者的流行病学和临床资料。根据标准指南收集体重、身高和血液,按体重除以身高的平方(kg/m^2)来计算身体质量指数(BMI)。另外在晚上和空腹状态下,从中间肘静脉采血,将血置于EDTA管或血清管中,并且使用自动分析仪(Model 7180;Hitachi,日本东京)测量胆固醇水平、白细胞水平、血红蛋白水平、天冬氨酸氨基转移酶水平、丙氨酸氨基转移酶水平、高密度脂蛋白水平、空腹血糖水平以及肌酐水平。将清洁中段尿用作尿液样品,并储存在无菌尿袋中。在孕妇中,当最后一次月经周期不清楚时,根据第一次超声测量结果来测量胎龄,并对病历进行分析以获取出生信息。

[0069] 非孕妇和孕妇的一般特征如下表1所示。在孕妇中,正常分娩组和早产组在胎龄(39.73周比33.57周, $p=0.0000$)方面显示出显著差异,早产儿组的新生婴儿在出生时的体重显著较低(3342.13g比2179.17g, $p=0.000$)。另外,早产组的阿普加新生儿评分明显低于正常对照组($p<0.05$)。然而,两组间胎龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

[0070] <表1>

	正常对照 (n=72)	孕妇		p 值 [†]
		正常分娩 (n=47)	早产 (n=36)	
特征				
年龄	32.2 (12.3)	31.96(3.99)	33.11(3.75)	0.797*
胎龄		39.73(1.88)	33.57(2.76)	0.000
未产妇 (n, %)		28(59.57)	15(41.67)	0.106**

[0072]	分娩结果				
	出生体重(g)		3342.13(314.80)	2179.17(624.21)	0.000
	阿普加新生儿评分, 1 分钟		9.66(0.700)	7.67(2.12)	0.000
	阿普加新生儿评分, 5 分钟		9.98(0.15)	8.86(1.57)	0.000
	子宫内生长限制 (n, %)		0(0.00)	4(2.78)	-

[0073] 实施例2. 确认来源于细菌的细胞外囊泡的排出

[0074] 为了确认通过尿液排出来源于细菌的细胞外囊泡, 通过肌肉注射向小鼠施用来自作为革兰氏阴性细菌的大肠杆菌和作为革兰氏阳性细菌的金黄色葡萄球菌的细胞外囊泡, 并且每小时拍摄一次。

[0075] 为了从细菌培养物中分离出细胞外囊泡, 首先在30℃下在Luria-Bertani培养基上培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。随后, 将每个培养物以5,000xg离心30分钟, 并将上清液通过0.45μm过滤器过滤, 并使用QuixStand™(GE Healthcare Bio-Sciences AB)浓缩。将浓缩的样品再次通过0.22μm过滤器过滤以分离细胞外囊泡, 然后通过BCA测定(Thermo Scientific)测量细胞外囊泡的蛋白质浓度。来源于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞外囊泡在室温下用cy7 (GE Healthcare)标记1小时, 然后通过肌肉注射以20μg/小鼠的浓度施用于小鼠。使用IVIS Φ c 光谱CT(SelectScience Φ c)在780nm至800nm的波长下以预定时间对小鼠进行筛选。从小鼠中提取器官, 并使用IVIS Φ c 光谱CT测量其荧光。

[0076] 结果, 如图1A所示, 两种来源于细菌的细胞外囊泡在注射后3小时和6小时通过尿液排出。另外, 如图1B所示, 证实当注射后12小时提取器官时, 来源于大肠杆菌的细胞外囊泡和来自金黄色葡萄球菌的细胞外囊泡都存在于肝脏和肾脏中。总而言之, 从上述结果可以确认, 来源于细菌的细胞外囊泡部分地通过尿液排出。

[0077] 实施例3. 尿液样品中的细胞外囊泡的DNA宏基因组学分析

[0078] 3-1. 从尿液中分离出DNA

[0079] 从存在于正常分娩的妇女、早产妇和非孕妇的尿液样品中的细胞外囊泡中分离出DNA。

[0080] 收集每个正常对照组和实验组的1ml尿液, 并在100℃煮沸15分钟。将煮沸的尿液样品在冰上保持5分钟, 然后在4℃下以10,000xg离心20分钟。每个上清液在4℃下保存, 在宏基因组学分析之前通过NanoDrop测量分离出的DNA的数量和质量。

[0081] 3-2. 从尿液中的细胞外囊泡分离出的DNA的宏基因组学分析

[0082] 对从实施例3-1的尿液样品分离出的细胞外囊泡的DNA进行宏基因组学分析。

[0083] 首先, 通过使用用于扩增V1-V3区域的16s rDNA融合引物和FastStart高保真PCRPCR系统(罗氏, 瑞士巴塞尔), 对每个克隆进行聚合酶链式反应(PCR)以便进行DNA分析。16s rDNA融合引物的序列如下表2所示。

[0084] <表2>

[0085]	引物		序列	SED ID NO.
	27F	正向	5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	1
	518R	反向	5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	2

[0086] *M:A或C

[0087] *W:A或T

[0088] 通过PCR进行的扩增反应在乳化状态中进行(油和扩增子的混合状态),并且使用GS-FLX plus emPCR试剂盒(454Life Sciences),使用Tissue Lyser II (Qiagen)制备包含扩增混合物和单个颗粒的微反应器。将乳液分布在96孔板中,按照制造商的方案进行PCR(在94℃持续3分钟,接着进行35个循环,每个循环包括在94℃持续15秒,在55℃持续45秒,在72℃持续1分钟,并且在最后步骤中在72℃持续8分钟)。在50μl PCR中使用每种DNA样品20ng。对其进行乳化PCR(emPCR)以扩增每种DNA,然后使用AMPure Bead试剂盒(Beckman Coulter,Brea,美国加州)纯化扩增子,并使用Picogreen方法(Invitrogen,Carlsbad,美国加州)定量。然后将扩增子稀释和用GS-FLX Titanium测序仪(罗氏,瑞士巴塞尔)分析扩增子。PCR扩增后,将乳化液化学分解,通过过滤洗涤具有经扩增的DNA文库的珠子。阳性珠子使用生物素化引物A(与连接物A互补)纯化并与链霉亲和素包被的磁珠连接。然后将DNA文库珠子与该磁珠连接的双螺旋结构被裂解以与磁珠分离,并且使单链DNA流动。碱基序列引物再次扩增成单链DNA。最后,使用粒子计数器(Beckman Coulter)对具有扩增的单链DNA的珠子数进行计数。通过Genome Sequencer FLX钛(454 Life Sciences)进行测序,并将每个样品加载到每个70mm-75mm的Pico Titer滴定板(454 Life Sciences)上。

[0089] 检查质量评分(平均Phred评分>20)和读取长度(>300bp)以通过生物信息学进行宏基因组分析,并且收集高质量序列。使用UCLUST和USEARCH(Edgar,2010)分析操作分类单元(OUT),并使用QIIME(Lozupone等人,2006)分析系统发育分类。基于相似性,根据以下系统发育步骤对所有16S RNA序列进行分类:种>97%的相似性;属>94%的相似性;科>90%的相似性;目>85%的相似性;纲>80%的相似性;门>75%的相似性。如果孕妇和正常对照之间的细菌组合物有2倍或以上的显著差异,则采用热图绘制属阶段的该组合物。当孕妇和正常对照之间的组合物有两倍或以上的显著差异并且平均组合物为1%或以上时,则在属阶段进行分层聚类。

[0090] 实施例4.通过宏基因组分析对来源于细菌的细胞外囊泡的分布的差异进行分析

[0091] 通过使用上述实施例3-2中使用的方法,从作为正常对照的非孕妇和作为实验组的正常分娩妇女和早产妇的尿液样品中的细胞外囊泡分离出DNA,并对其进行宏基因组学分析。

[0092] 结果,如图2所示,样本分为第一组和第二组,第一组为孕妇尿液样品组(左侧),第二组主要为正常对照的尿液样品组(右侧)。右侧图像示出了分类组,其显示了孕妇和正常对照之间的2倍或更多的差异,并且显示出1%或以上的平均组合物。另外,在没有属名的分类的情况下,使用了科(f)名称或目(o)名称。此外,如下表3所示,在细菌组合物中观察到13种分类差异。第一组(孕妇)组成两组,第二组(正常对照)组成三组。第一组主要由芽孢杆菌属细菌和其细胞外囊泡组成。

[0093] <表3>

[0094]

类别	对照的平均值	怀孕的平均值	倍数变化	P 值
芽孢杆菌(<i>Bacillus</i>)	0.1218%	45.6146%	374.3878	1.21E-36
赤杆菌科 (<i>Erythrobacteraceae(f)</i>)	0.9847%	2.8276%	2.8716	8.47E-05
不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>)	2.8650%	1.1649%	0.4066	1.05E-04
鞘氨醇单胞菌属 (<i>Sphingomonas</i>)	1.5396%	0.6007%	0.3902	1.57E-03
假单胞菌(<i>Pseudomonas</i>)	14.2252%	4.0889%	0.2874	1.21E-16
慢生根瘤菌科 (<i>Bradyrhizobiaceae(f)</i>)	1.5951%	0.4560%	0.2859	4.14E-03
甲基杆菌属 (<i>Methylobacterium</i>)	7.2819%	1.5022%	0.2063	6.79E-11
乳酸杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	8.4385%	1.6068%	0.1904	3.11E-03
草螺菌属(<i>Herbaspirillum</i>)	1.9899%	0.1409%	0.0708	1.77E-07
假单胞细菌科 (<i>Pseudomonadaceae(f)</i>)	15.4593%	0.6549%	0.0424	9.58E-10
阿托波菌属(<i>Atopobium</i>)	3.8597%	0.1017%	0.0264	4.39E-03
脂环酸芽孢杆菌 (<i>Alicyclobacillus</i>)	3.1655%	0.0325%	0.0103	7.55E-11
交替单胞菌目 (<i>Alteromonadales (o)</i>)	5.4748%	0.0022%	0.0004	1.16E-08

[0095] 根据上述表3的结果证实,与正常对照(平均组合物=0.12%)相比,来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡在孕妇(平均组合物=45.61%)中是最常见的来源于细菌的细胞外囊泡,而与孕妇(平均组合物=4.09%)相比,来源于属于假单胞菌(*Pseudomonas*)属的细菌的细胞外囊泡在非孕妇(平均组合物=14.23%)中是最常见的来源于细菌的细胞外囊泡。

[0096] 图3A至图3D分别示出了从孕妇(红色下划线)和正常对照(蓝色下划线)的尿液样品中分离的来源于细菌的细胞外囊泡的分布的门级分析结果、纲级分析结果、目级分析结果和科级分析结果。

[0097] 实施例5.正常分娩组的尿液样品和早产组的尿液样品之间的来源于细菌的细胞外囊泡的分布差异的分析

[0098] 通过使用实施例3-2中使用的方法,对从实施例3-1的正常分娩组和早产组的尿液样品分离出的来源于细菌的细胞外囊泡的DNA进行宏基因组学分析。图4示出了从正常分娩组和早产组的尿液样品中分离出的来源于细菌的细胞外囊泡的分布。图5显示细胞外囊泡分布的总结结果。另外,图6A至6D分别示出了从正常分娩组(绿色下划线,左侧)和早产组

(紫色下划线,右侧)的尿液中分离出的来源于细菌的细胞外囊泡的分布的门级分析结果、纲级分析结果、目级分析结果和科级分析结果。

[0099] 通过对图4至图6的结果的集中分析,证实了在正常分娩组和早产组中的尿液样品中存在多种来源于细菌的细胞外囊泡。在非孕妇和早产妇的尿液样品中,来源于甲基杆菌属的细胞外囊泡大量存在,而来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡减少。相比之下,在正常分娩的妇女中几乎没有发现来源于甲基杆菌属的细胞外囊泡。此外,来源于脲原体属(*Ureaplasma*)细菌和韦荣氏球菌属(*Veillonella*)细菌的细胞外囊泡在早产妇女中也比在正常分娩的妇女中更常见。

[0100] 根据上述结果,证实与来源于其他细菌的细胞外囊泡的情况不同,来源于属于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡在正常分娩的妇女中存在的量大于在早产妇中存在的量。

[0101] 提供本公开的前述描述仅用于说明性目的,并且本公开所属技术领域的普通技术人员应理解,本发明可以以各种修改形式实施,而不脱离本发明的精神或必要的特点。因此,本文描述的实施方式应仅在说明性意义上被考虑,而不是用于限制的目的。

<210> 1

<211> 19

[0102]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 16s rDNA 的正向引物

<400> 1

gagtttgatc mtggctcag

19

<210> 2

[0103] <211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 16s rDNA 的反向引物

<400> 2

wtaccgcgg ctgctgg

17

[0001]	序列表	
[0002]	<110> MD保健株式會社	
[0003]	<120> 含来源于芽孢杆菌属的细菌的细胞外囊泡的治疗妊娠相关疾病的组合物	
[0004]	<130> MP017-054CN	
[0005]	<150> KR 10-2015-0025381	
[0006]	<151> 2015-02-23	
[0007]	<150> PCT/KR 2016/001665	
[0008]	<151> 2016-02-19	
[0009]	<160> 2	
[0010]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0011]	<210> 1	
[0012]	<211> 19	
[0013]	<212> DNA	
[0014]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0015]	<220>	
[0016]	<221> misc_feature	
[0017]	<222> (1) .. (19)	
[0018]	<223> 用于 16s rDNA的正向引物	
[0019]	<400> 1	
[0020]	gagtttgatc mtggctcag	19
[0021]	<210> 2	
[0022]	<211> 17	
[0023]	<212> DNA	
[0024]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0025]	<220>	
[0026]	<221> misc_feature	
[0027]	<222> (1) .. (17)	
[0028]	<223> 用于 16s rDNA的反向引物	
[0029]	<400> 2	
[0030]	wttaccgcgg ctgctgg	17

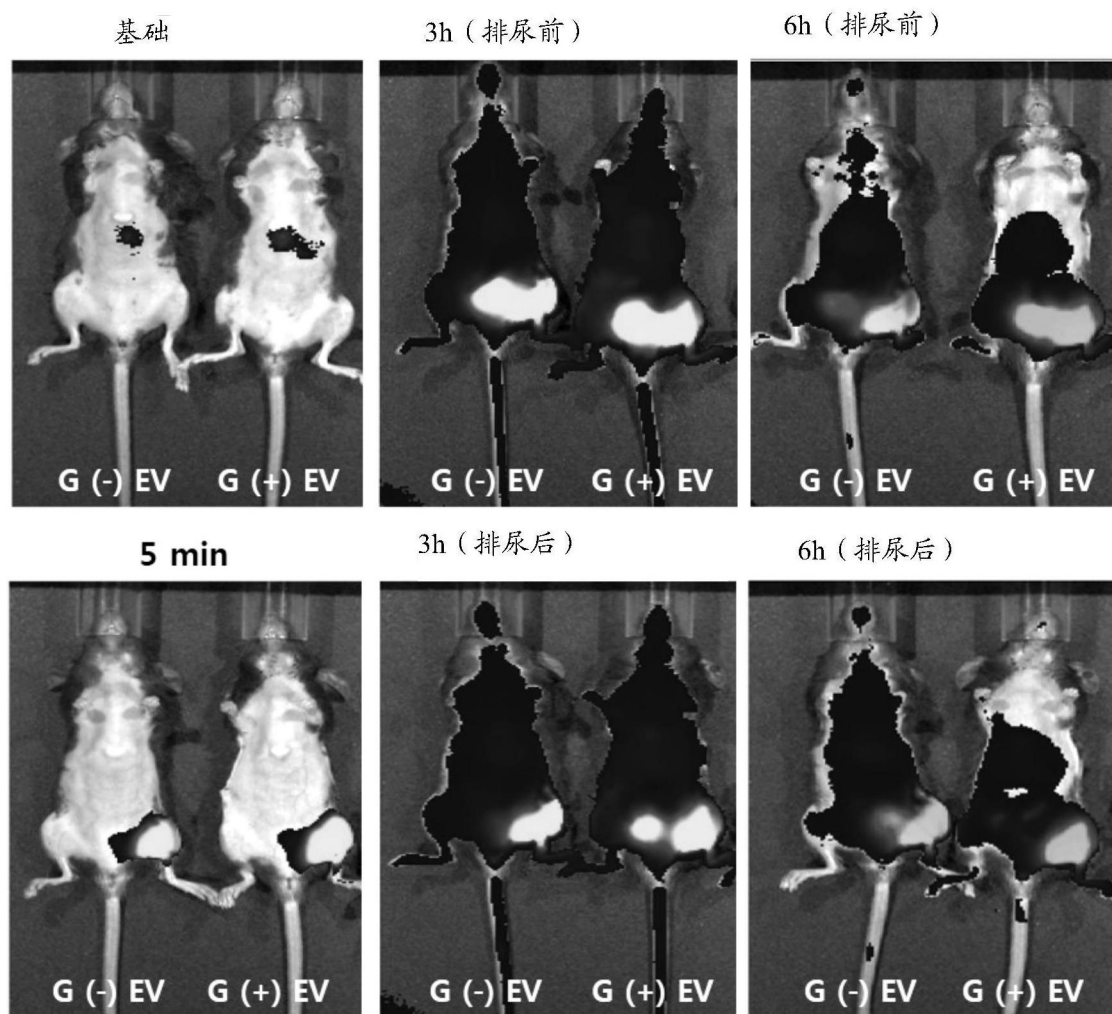


图1A

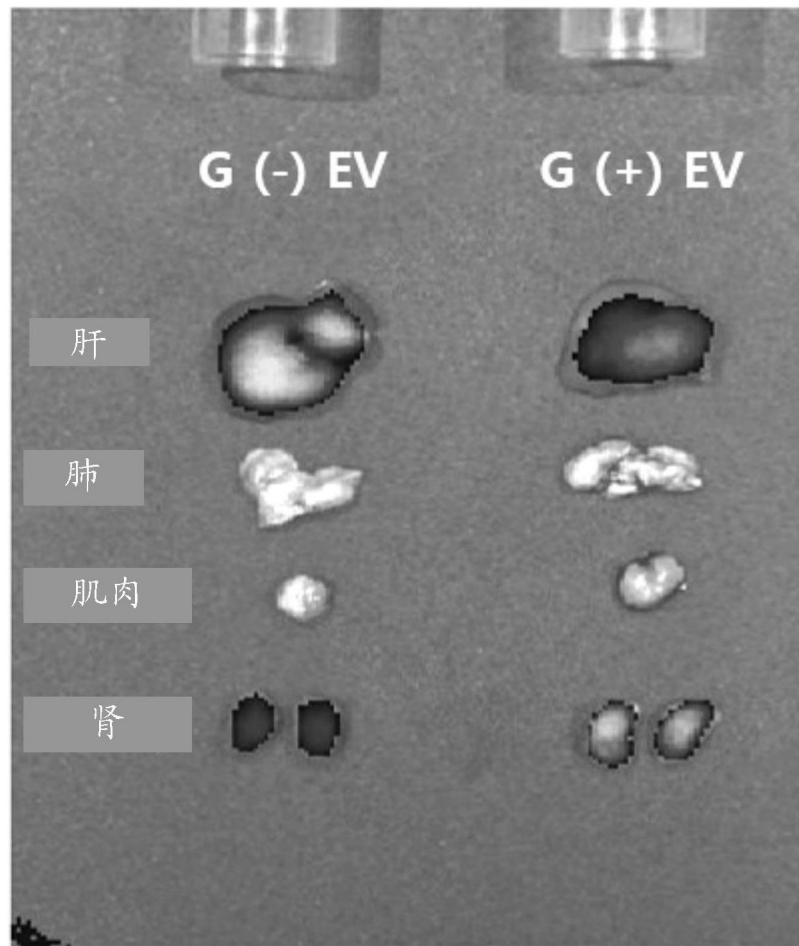


图1B

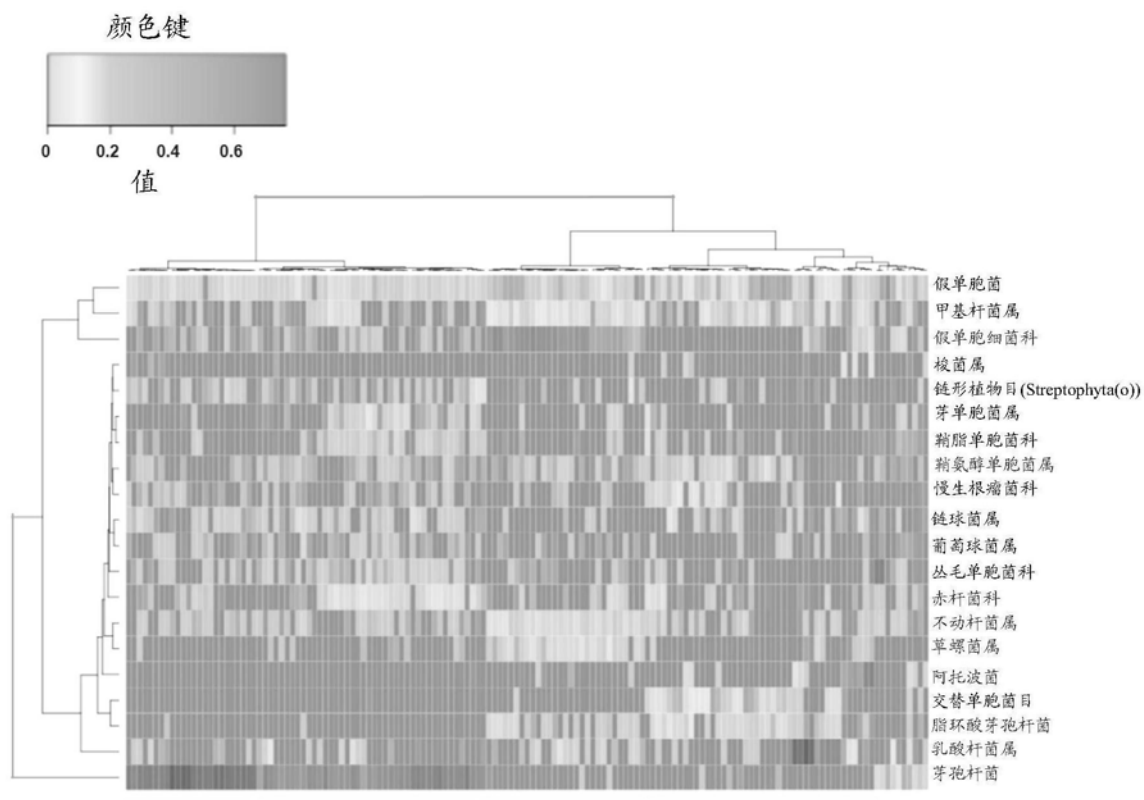


图2

门

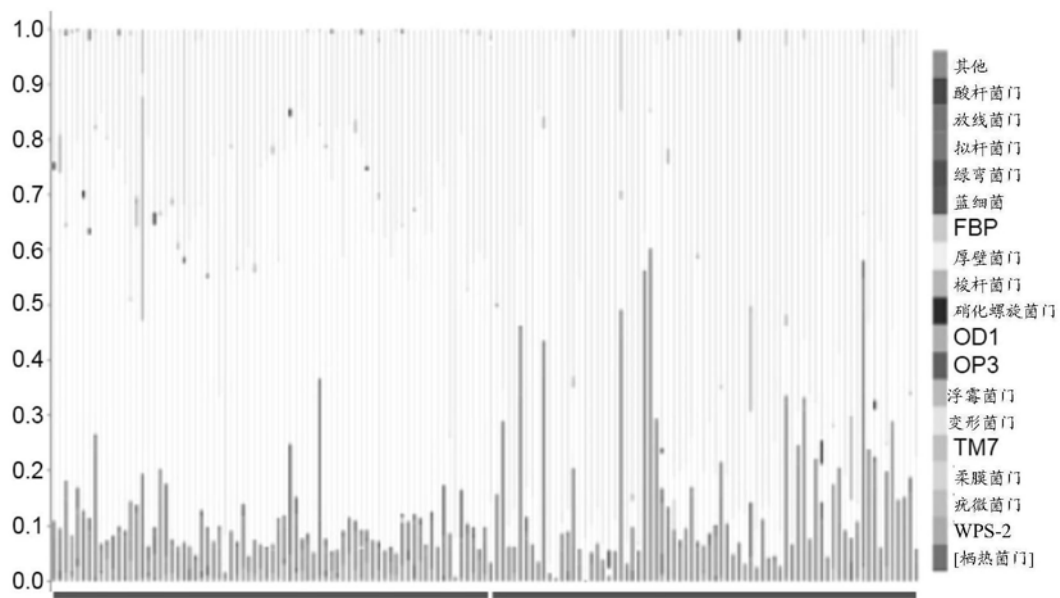


图3A

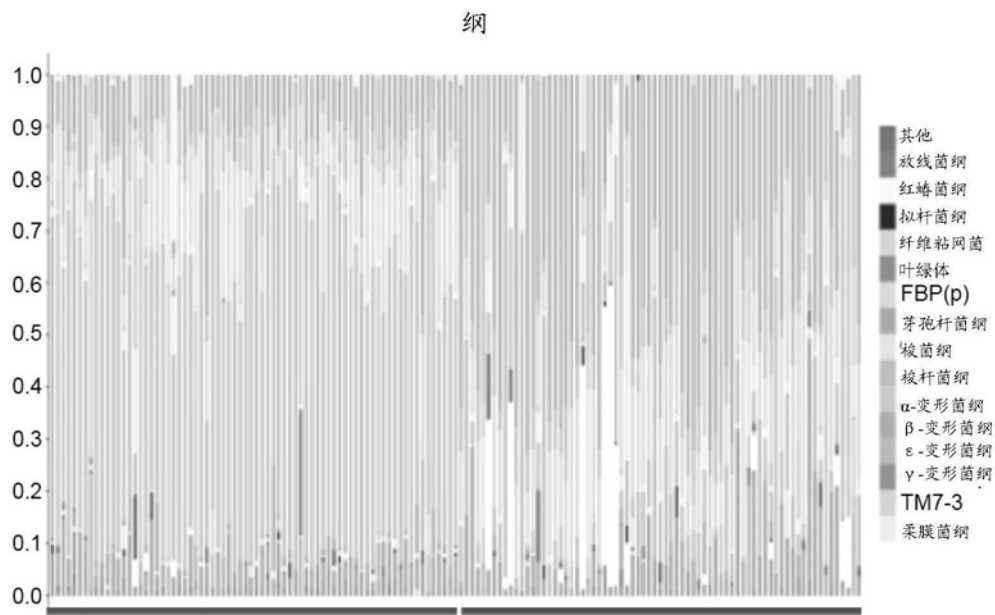


图3B

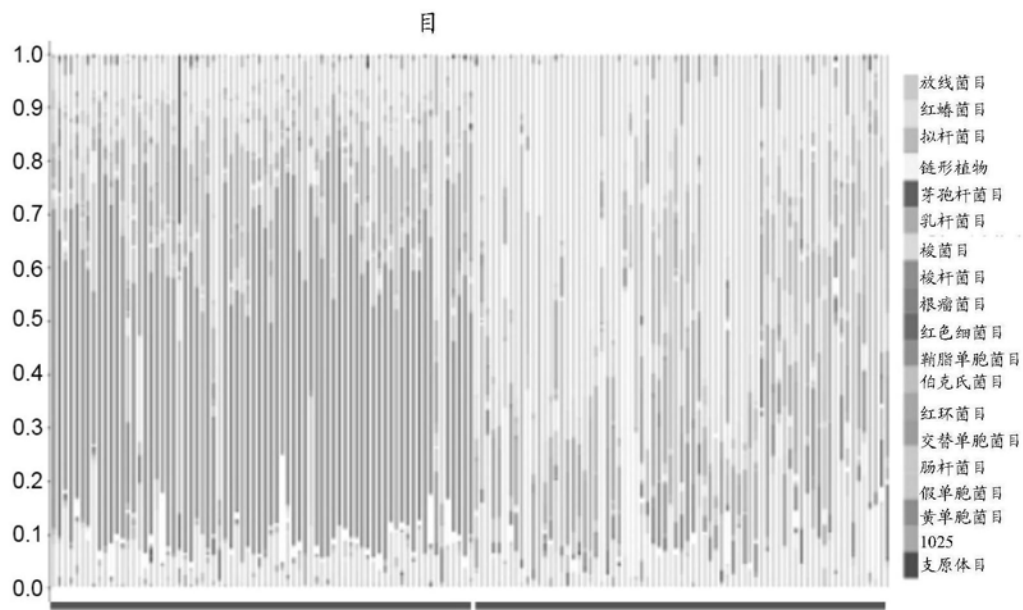


图3C

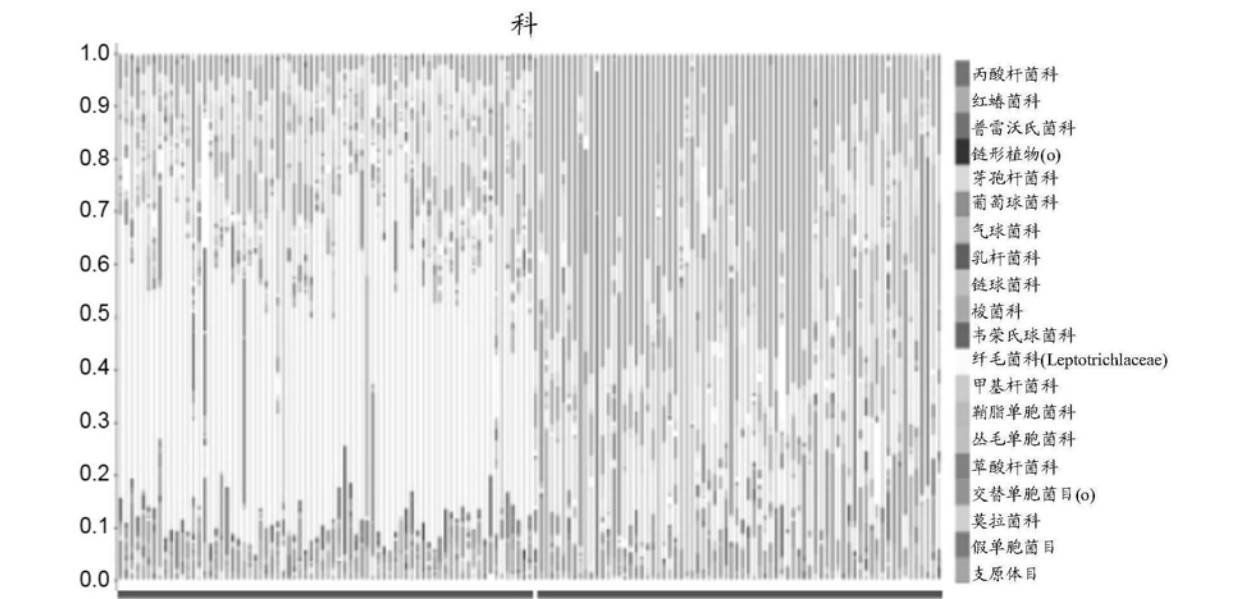


图3D

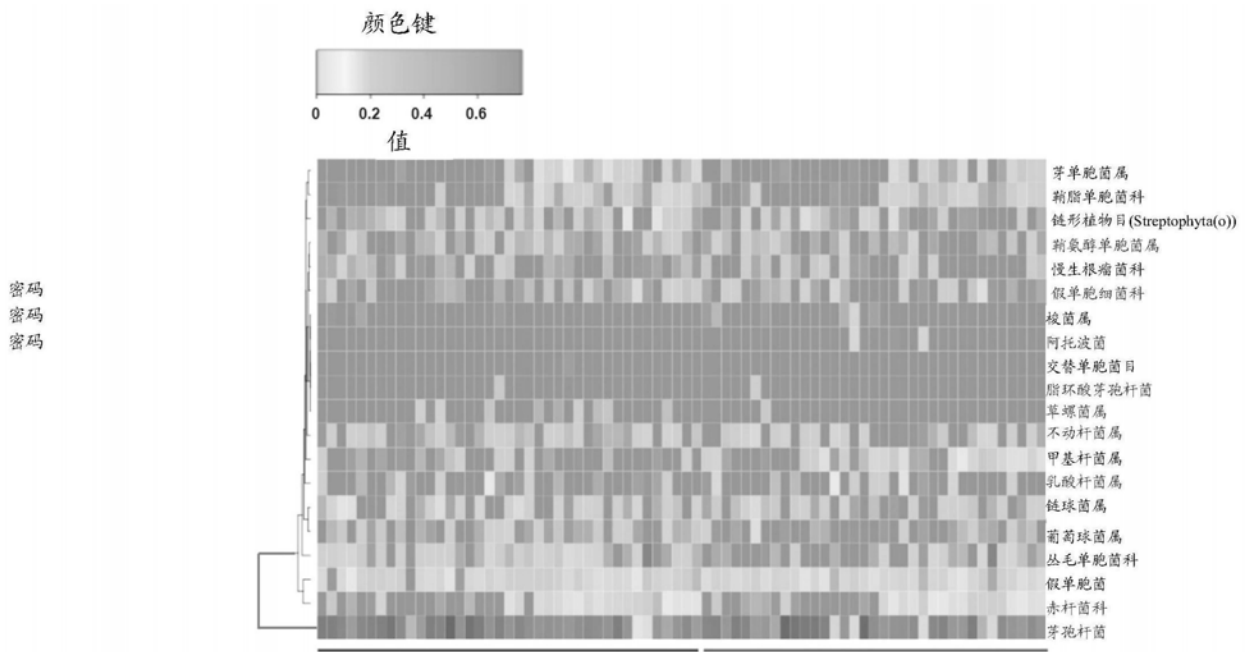


图4

密码
密码
密码

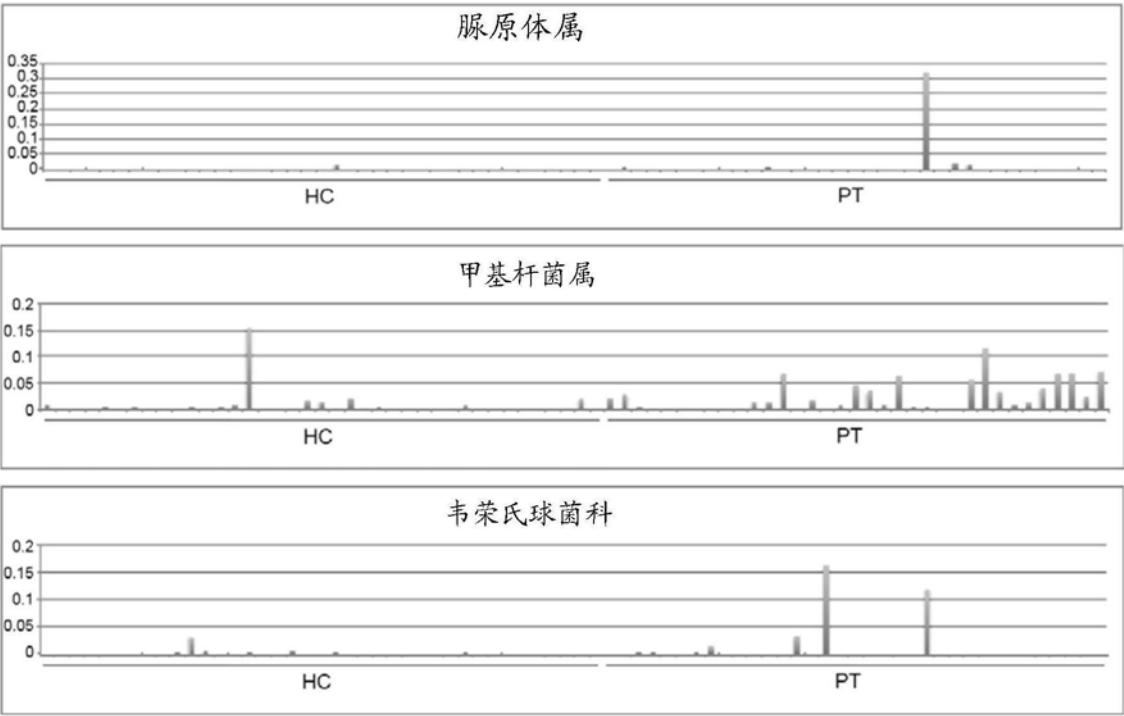


图5

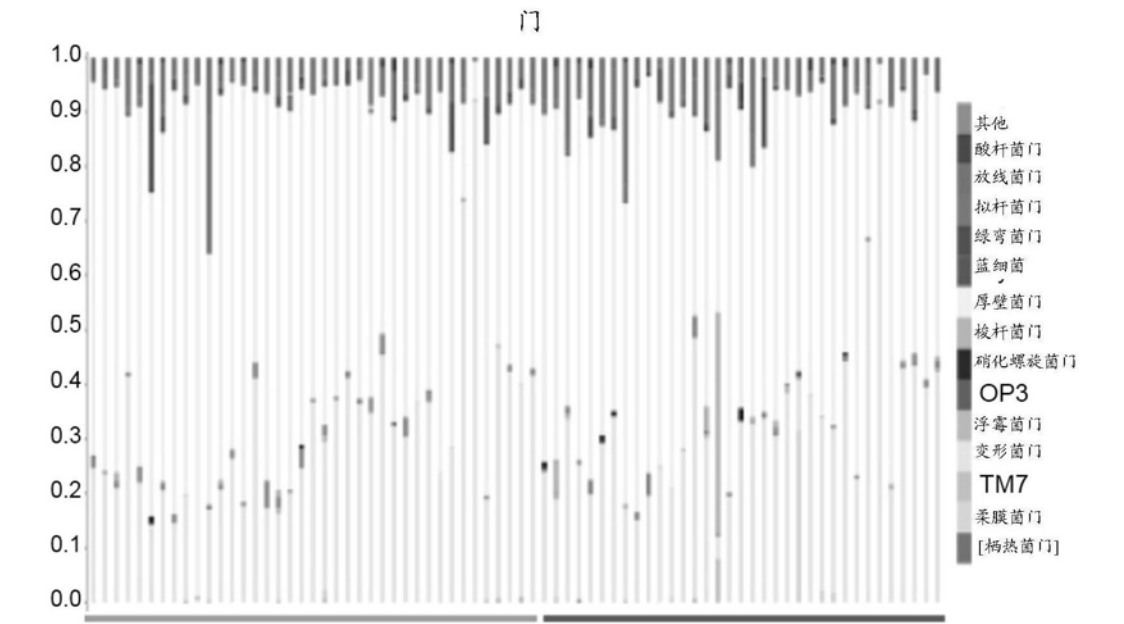


图6A

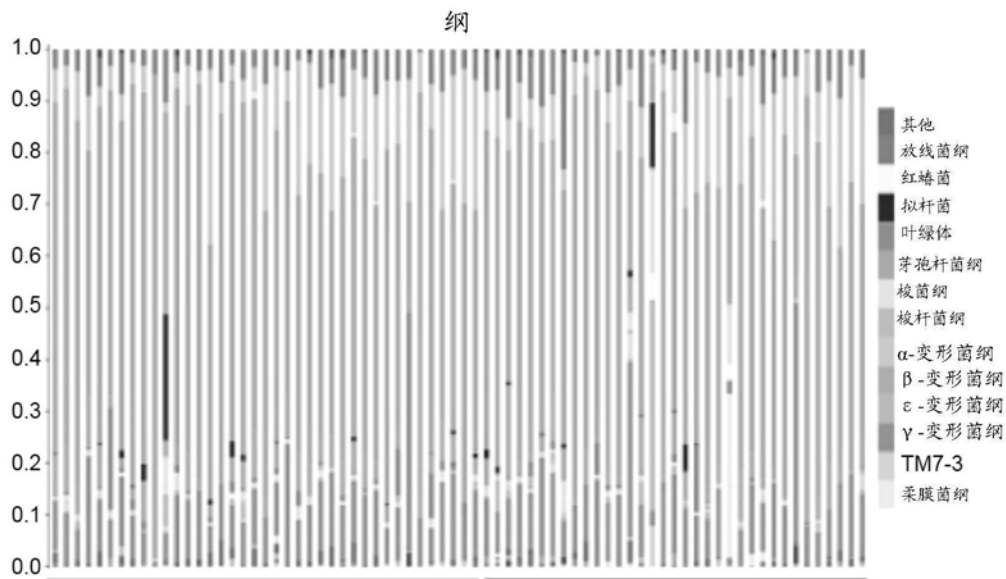


图6B

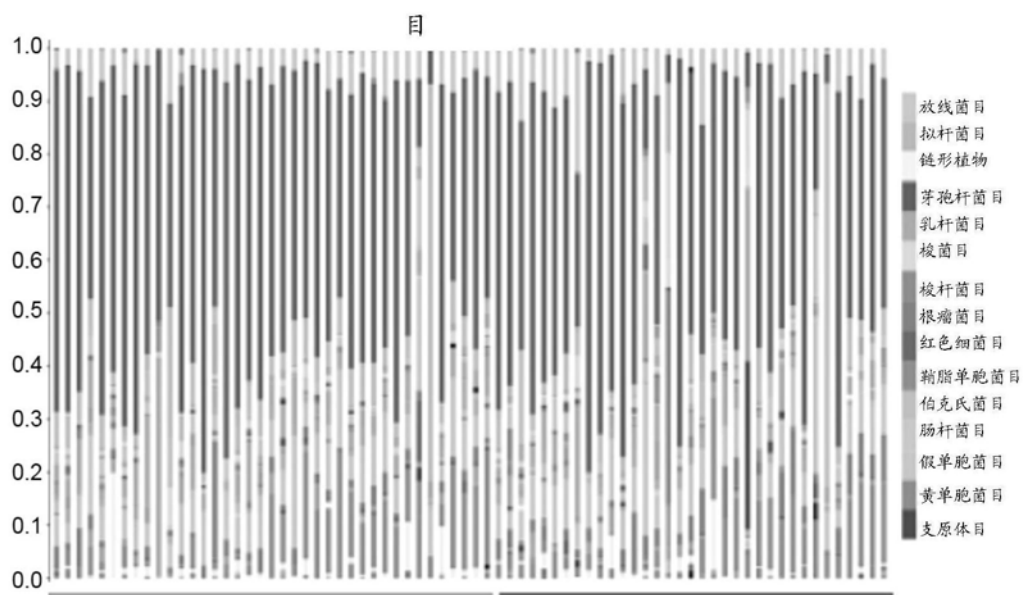


图6C

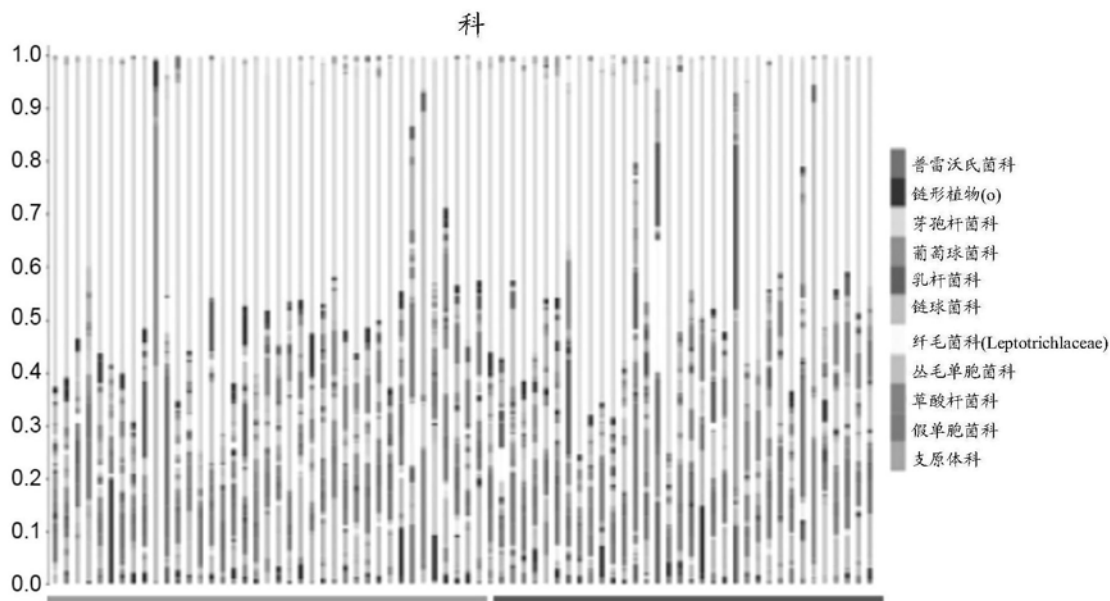


图6D