(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111094596 A
(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201880040034.X

(22)申请日 2018.06.25

(30)优先权数据
10-2017-0083047 2017.06.30 KR
10-2018-0072307 2018.06.22 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2018/007144 2018.06.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/004668 KO 2019.01.03

(71)申请人 MD保健株式会社
地址 韩国首尔

(72)发明人 金润根

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
代理人 李献忠 张静

(51)Int.Cl.
C12Q 1/689(2018.01)
C12Q 1/6851(2018.01)
C12Q 1/6886(2018.01)
A61K 8/99(2017.01)
A61K 35/74(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)
A23L 33/135(2016.01)
A61P 25/24(2006.01)
A61P 11/06(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)

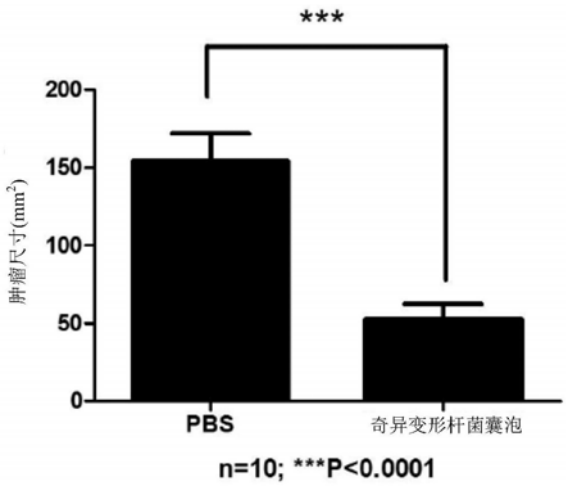
权利要求书2页 说明书18页
序列表1页 附图12页

(54)发明名称

来源于变形杆菌属的细菌的纳米囊泡和其用途

(57)摘要

本发明涉及来源于变形杆菌属的细菌的囊泡及其用途。发明人通过实验证实，与正常人相比，患有胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌或卵巢癌的癌症患者，患有哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)或特应性皮炎等过敏性呼吸道疾病，心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛或心房纤颤等心血管疾病，如糖尿病等代谢性疾病，以及帕金森氏病或抑郁症等神经精神疾病的患者的样品中的囊泡显著减少，并且所述囊泡抑制病原性囊泡引起的炎性介质的分泌，同时还显示抗癌作用。预期来源于变形杆菌属细菌的囊泡可有效地用于开发预防、治疗和/或改善癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸道疾病和炎性肠病的诊断方法和组合物。



CN 111094596 A

1.一种提供用于诊断一种或多种疾病的信息的方法,所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症,该方法包括如下过程:

(a)从来源于正常人的样品和来源于受试者的样品分离的囊泡中提取DNA;

(b)通过使用基于16S rDNA中存在的基因序列制备的成对的引物对所提取的所述DNA进行聚合酶链式反应(PCR),以获得相应的PCR产物;以及

(c)确定与正常人的相比来源于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡的数量较低的病例作为选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症中的一种或多种疾病。

2.根据权利要求1所述的方法,其中过程(a)中的样品是血液、尿液或粪便。

3.一种诊断一种或多种疾病的方法,所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症,该方法包括如下过程:

(a)从来源于正常人的样品和来源于受试者的样品分离的囊泡中提取DNA;

(b)通过使用基于16S rDNA中存在的基因序列制备的成对的引物对所提取的所述DNA进行PCR,以获得相应的PCR产物;以及

(c)通过定量分析所述PCR产物,确定与正常人的相比来源于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡的数量较低的病例作为选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症中的一种或多种疾病。

4.根据权利要求3所述的方法,其中过程(a)中的样品是血液、尿液或粪便。

5.一种用于预防或治疗一种或多种疾病的药物组合物,所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症,所述药物组合物包含来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡作为有效成分。

6.根据权利要求5所述的药物组合物,其中,所述囊泡的平均直径为10nm至200nm。

7.根据权利要求5所述的药物组合物,其中,所述囊泡是天然或人工从属于所述变形杆菌属(Proteus)的细菌中分泌的。

8.根据权利要求5所述的药物组合物,其中,来源于属于所述变形杆菌(Proteus)属的细菌的囊泡是从奇异变形杆菌(Proteus mirabilis)中分泌的。

9.用于预防或治疗一种或多种疾病的吸用组合物,所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心

绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，所述吸用组合物包含来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡作为有效成分。

10.根据权利要求9所述的吸用组合物，其中所述囊泡是天然或人工从属于所述变形杆菌属(Proteus)的细菌分泌的。

11.根据权利要求9所述的吸用组合物，其中来源于属于所述变形杆菌属(Proteus)的细菌的所述囊泡是从奇异变形杆菌(Proteus mirabilis)中分泌的。

12.用于预防或减轻一种或多种疾病的组合物，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，所述组合物包含来源于属于所述变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡作为有效成分。

13.根据权利要求12所述的组合物，其中所述组合物是食品组合物或化妆品组合物。

14.根据权利要求12所述的组合物，其中所述囊泡是天然或人工从属于所述变形杆菌属(Proteus)的细菌中分泌的。

15.根据权利要求12所述的组合物，其中来源于属于所述变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡是从奇异变形杆菌(Proteus mirabilis)中分泌的。

16.一种预防或治疗一种或多种疾病的方法，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，所述方法包括向个体施用药物组合物，该药物组合物包含来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡作为有效成分。

17.包含来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡作为有效成分的药物组合物用于预防或治疗一种或多种疾病的用途，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症。

来源于变形杆菌属的细菌的纳米囊泡和其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及来源于属于变形杆菌(Proteus)属的细菌的纳米囊泡及其用途,更具体地,涉及通过使用来源于属于变形杆菌属的细菌的纳米囊泡来诊断特征在于慢性炎症的癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎性肠病的方法,以及包含该纳米囊泡的预防或治疗性组合物。

背景技术

[0002] 在21世纪,在过去已被视为流行病的急性传染病的重要性已不那么重要。另一方面,疾病模式已经改变,使得由于人与微生物群之间的不相容性而导致的伴随免疫功能障碍的慢性疾病被认为是决定生活质量和人寿命的主要疾病。在21世纪,顽固性慢性疾病的特征在于,根据生活方式的改变,由于反复暴露于致病因素,而由免疫功能障碍引起慢性炎症反应,例如癌症、心血管疾病、代谢性疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病、炎症性肠病等正在成为公共卫生中的严重问题。

[0003] 作为对细菌源性致病因子的免疫应答,以白介素-17细胞因子分泌为特征的T辅助细胞17(Th17)免疫应答很重要,而由于细菌因子而导致的固有免疫应答(如白介素6(IL-6)的分泌)在分化为Th17细胞中起关键作用。另外,已知在暴露于细菌病因时会发生炎症,并且在此过程中,诸如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)之类的炎症介质被分泌出来,从而引起癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病、炎症性肠病等的发作。

[0004] 众所周知,在人体中共生的微生物数量为100万亿,是人类细胞数量的10倍,而微生物的基因数量也超过人类的100倍。在人体中共生的细菌和古细菌共分泌纳米大小的囊泡,以与其他细胞交换有关基因、蛋白质等的信息。粘膜形成物理屏障膜,该屏障膜不允许大小为200nm或更大的颗粒通过,因此共生于粘膜中的细菌无法通过,但来源于细菌的囊泡的大小约为100nm或更小并且因此相对自由地穿过粘膜并被吸收到上皮细胞中,从而引起炎症反应,并且还通过淋巴管被吸收到人体中。从人体中共生的细菌中局部分泌的来源于细菌的囊泡被吸收到粘膜的上皮细胞中,从而引起局部炎症反应,并且吸收到人体中的来源于病原菌的囊泡通过血液分布到各个器官,从而增加器官的炎症反应,因此加重疾病。

[0005] 属于变形杆菌属的细菌是厌氧的革兰氏阴性细菌,其通过尿液素酶将尿液素转化为氨,从而使尿液碱化。在上述细菌中,被称为致病菌的奇异变形杆菌(Proteus mirabilis)在人类感染属于变形杆菌属的细菌的病例中占90%。已知属于变形杆菌属的细菌共生地生活在人类的消化器官中,并且还广泛地生活在诸如土壤、水等环境中。

[0006] 同时,公开了涉及使用来源于属于芽孢杆菌属的细菌或乳酸菌属的细胞外囊泡治疗疾病的发明(KR 10-1862507和KR 10-1726488),但迄今为止,尚未被报道属于变形杆菌属的细菌在细胞外分泌囊泡,特别是没有关于使用属于变形杆菌属的细菌来诊断和治疗诸如癌症、心血管疾病、代谢性疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病、炎症性肠病等的报道。

[0007] 因此,在本发明中证实了与正常人相比,在患有癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经

精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎性肠病的患者的临床样品中，属于变形杆菌属的细菌的囊泡的量显著减少，因此，可以诊断出这些疾病。另外，已经证实，从属于变形杆菌属的细菌的培养液中分离的囊泡可以用作预防或治疗癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎性肠病的组合物。

[0008] 实施方案的描述

[0009] 技术问题

[0010] 通过进行深入研究以解决上述常规问题，本发明的发明人通过宏基因组学分析证实，与正常人相比，在患有癌症的患者的样品中，属于变形杆菌属的细菌的囊泡的量显著减少，所述癌症如胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤等等；心血管疾病，例如心肌梗塞、心肌病、心房纤颤、变异型心绞痛、中风等；代谢性疾病，例如糖尿病等；神经精神疾病，例如帕金森氏症、抑郁症等；过敏性呼吸系统疾病，如特应性皮炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)等；或炎性肠病，例如肠易激综合征、炎性肠炎等。

[0011] 还证实，当从奇异变形杆菌(其是属于变形杆菌属的细菌)中分离出囊泡，并且用该囊泡处理炎性细胞时，由于病原囊泡引起的TNF-α的分泌被显著抑制，并且作为评估抗癌效力的结果，当小鼠癌症疾病模型口服来源于奇异变形杆菌的囊泡时，癌症的发作被显著抑制，因此基于这些发现完成了本发明。

[0012] 因此，本发明的目的是提供一种提供用于诊断一种或多种疾病的信息的方法，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症。

[0013] 本发明的另一个目的是提供用于预防、治疗和/或减轻一种或多种疾病的组合物，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，该组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为有效成分。

[0014] 然而，通过本发明要解决的技术问题不限于上述技术问题，并且对于本领域技术人员而言，根据以下的描述，其他未提及的技术问题将变得显而易见。

[0015] 技术方案

[0016] 为了实现本发明的上述目的，本发明提供一种提供用于诊断一种或多种疾病的信息的方法，所述一种或多种疾病选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病，该方法包括以下过程：

[0017] (a)从来源于正常人的样品和来源于受试者的样品分离的囊泡中提取DNA；

[0018] (b)通过使用基于16S rDNA中存在的基因序列制备的成对的引物对提取的DNA进行聚合酶链式反应(PCR)，以获得相应的PCR产物；以及

[0019] (c)通过定量分析PCR产物，确定来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡的数量低于正常人的来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡的数量的病例作为选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病中的一种或多种疾病。

[0020] 本发明还提供了一种诊断一种或多种疾病的方法，所述一种或多种疾病选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病，该方法包括以下过程：

[0021] (a)从来源于正常人的样品和来源于受试者的样品分离的囊泡中提取DNA；

[0022] (b)通过使用基于16S rDNA中存在的基因序列制备的成对的引物对提取的DNA进行PCR，以获得相应的PCR产物；以及

[0023] (c)通过定量分析PCR产物，确定来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡的数量低于正常人的来源于属于变形杆菌属(Proteus)的细菌的囊泡的数量的病例作为选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病中的一种或多种疾病。

[0024] 在本发明的另一实施方案中，在过程(a)中，样品可以是血液、尿液或粪便。

[0025] 本发明还提供了用于预防或治疗一种或多种疾病的药物组合物，所述一种或多种疾病选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病，该药物组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为有效成分。

[0026] 本发明还提供了用于预防或治疗一种或多种疾病的吸用组合物，所述一种或多种疾病选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病，该吸用组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为有效成分。

[0027] 本发明还提供了用于预防或减轻一种或多种疾病的组合物，所述一种或多种疾病选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病，该组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为有效成分。

[0028] 在本发明的一实施方案中，用于预防或减轻上述疾病的组合物可以是食物组合物或化妆品组合物。

[0029] 在本发明的另一实施方案中，食品组合物可以是健康功能食品组合物。

[0030] 本发明还提供了一种预防或治疗一种或多种疾病的方法，所述一种或多种疾病选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病，该方法包括向个体施用药物组合物，所述药物组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为有效成分。

[0031] 本发明还提供了来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡在预防或治疗一种或多种疾病中的用途，所述一种或多种疾病选自癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎症性肠病。

[0032] 在本发明的一实施方案中，所述癌症可以是胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤或脑瘤。

[0033] 在本发明的另一实施方案中，心血管疾病可以是心肌梗塞、心肌病、心房纤颤，变异型心绞痛或中风。

[0034] 在本发明的另一实施方案中，代谢疾病可以是糖尿病。

[0035] 在本发明的另一实施方案中，神经精神疾病可以是帕金森氏病或抑郁症。

[0036] 在本发明的另一实施方案中，过敏性呼吸系统疾病可以是特应性皮炎、哮喘或慢性阻塞性肺疾病。

[0037] 在本发明的另一实施方案中，炎性肠病可以是肠易激综合征或炎性肠炎。

[0038] 在本发明的另一实施方案中，囊泡可具有10nm至200nm的平均直径。

[0039] 在本发明的另一实施方案中，囊泡可以天然地或人工地从属于变形杆菌属的细菌中分泌。

[0040] 在本发明的另一实施方案中，来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡可以从奇异变形杆菌中分泌。

[0041] 发明的有益效果

[0042] 本发明的发明人证实，尽管肠细菌不会被吸收到体内，但是来源于细菌的囊泡通过上皮细胞被吸收到体内并全身分布，且通过肾脏、肝脏和肺部排出体外，并通过宏基因组分析对存在于患者的血液、尿液、粪便等中的来源于细菌的囊泡证实，与正常人的相比，来源于存在于患有癌症的患者的血液、尿液或粪便中的属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少，所述癌症如胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤等等；心血管疾病，例如心肌梗塞、心肌病、心房纤颤、变异型心绞痛、中风等；代谢性疾病，例如糖尿病等；神经精神疾病，例如帕金森氏症、抑郁症等；过敏性呼吸系统疾病，如特应性皮炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)等；炎性肠病，例如肠易激综合征、炎性肠炎等。此外，观察到，当体外培养奇异变形杆菌(其是属于变形杆菌属的一种细菌)并囊泡从中分离并施用于体外炎症细胞时，由于病原体囊泡而引起炎症介质的分泌被显著抑制，并且当将囊泡口服施用于小鼠时，癌症的发作被显著抑制，因此可以预期，根据本发明的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡可有效地用于诊断癌症的方法，所述癌症如胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤等等；心血管疾病，例如心肌梗塞、心肌病、心房纤颤、变异型心绞痛、中风等；代谢性疾病，例如糖尿病等；神经精神疾病，例如帕金森氏症、抑郁症等；过敏性呼吸系统疾病，如特应性皮炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等；炎性肠病，例如肠易激综合征、炎性肠炎等，以及用于预防，治疗和/或减轻的组合物，例如食物、吸入剂、化妆品、药物等。

附图说明

[0043] 图1A示出了根据在将细菌和来源于细菌的囊泡(EV)让小鼠口服之后的时间显示细菌和囊泡的分布模式的图像。

[0044] 图1B示出了通过评估在让小鼠口服细菌和来源于细菌的囊泡(EV)后12小时提取的在血液、肾脏、肝脏和各种器官中的细菌和囊泡的体内分布模式而获得的图像。

[0045] 图2示出了对患有胃癌的患者和正常人的粪便、血液和尿液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后，比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0046] 图3示出了对患有结直肠癌的患者和正常人的粪便和尿液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后，比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0047] 图4示出了对患有肝癌、胆管癌或胰腺癌的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后，比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0048] 图5示出了对患有肺癌的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进

行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0049] 图6示出了对患有乳腺癌或卵巢癌的患者以及正常人的尿液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0050] 图7示出了对患有膀胱癌的患者和正常人的血液和尿液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0051] 图8示出了对患有前列腺癌的患者和正常人的尿液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0052] 图9示出了对患有淋巴瘤或脑肿瘤的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0053] 图10示出了对患有糖尿病的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0054] 图11示出了对患有心肌梗塞、心肌病、心房纤颤或变异型心绞痛的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0055] 图12示出了对患有中风的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0056] 图13示出了对患有帕金森氏病或抑郁症的患者和正常人的尿液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0057] 图14示出了对患有特应性皮炎的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0058] 图15示出了对患有哮喘或慢性阻塞性肺疾病(COPD)的患者和正常人的血液样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0059] 图16示出了对患有肠易激综合征、炎性肠炎的患者和正常人的粪便样品中存在的来源于细菌的囊泡进行了宏基因组分析之后,比较来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的分布模式的结果。

[0060] 图17A示出了显微镜图像,其示出了从在体外培养奇异变形杆菌之后获得的培养液中分离的囊泡的观察结果。

[0061] 图17B示出了通过动态光散射测量从奇异变形杆菌培养液中分离的囊泡的大小的结果。

[0062] 图18A和图18B示出了在用作为病原性囊泡的大肠杆菌囊泡处理之前,用来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡进行预处理,以评估来源于变形杆菌的囊泡的抗炎作用的情况

下，评估大肠杆菌囊泡(E.coli EV)对IL-6(图18A)和TNF-α(图18B)的分泌的效果的结果，所述IL-6和TNF-α是炎性介质。

[0063] 图19示出了在用作为病原性囊泡的大肠杆菌囊泡处理之前，用来源于奇异变形杆菌(PMR)的囊泡进行预处理以比较来源于不同菌株的囊泡的效果与来源于奇异变形杆菌的囊泡的抗炎效果的情况下，评估大肠杆菌囊泡(E.coli EV)对TNF-α的分泌的效果的结果(NC:阴性对照;PC:阳性对照;L.plantarum:植物乳杆菌)。

[0064] 图20示出了在用作为病原性囊泡的大肠杆菌囊泡(E.coli EV)处理之前，用经热处理或经酸处理的来源于奇异变形杆菌(PMR)的囊泡进行预处理以评估热处理或酸处理对来源于奇异变形杆菌的囊泡的抗炎效果的情况下，评估大肠杆菌囊泡对TNF-α的分泌的效果的结果(NC:阴性对照;PC:阳性对照;L.plantarum:植物乳杆菌)。

[0065] 图21A示出了方案，通过该方案将来源于奇异变形杆菌的囊泡施用至小鼠，以评估来源于奇异变形杆菌的囊泡的抗癌功效。

[0066] 图21B示出了评估来源于奇异变形杆菌的囊泡当口服施用于小鼠时对由于癌细胞引起的肿瘤发生的作用的结果。

[0067] 最佳模式

[0068] 本发明涉及来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡及其用途。

[0069] 本发明的发明人通过宏基因组学分析证实，与正常人相比，在患有癌症的患者的样品中，属于变形杆菌属的细菌的囊泡的量显著减少，所述癌症如胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤等等;心血管疾病，例如心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风等;代谢性疾病，例如糖尿病等;神经精神疾病，例如帕金森氏症、抑郁症等;过敏性呼吸系统疾病，如特应性皮炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等;或炎性肠病，例如肠易激综合征、炎性肠炎等，并且因此基于这些发现完成本发明。

[0070] 因此，本发明提供了一种提供用于诊断一种或多种疾病的信息的方法，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，该方法包括以下过程：

[0071] (a)从来源于正常人的样品和来源于受试者的样品分离的囊泡中提取DNA;

[0072] (b)通过使用基于16S rDNA中存在的基因序列制备的成对的引物对提取的DNA进行PCR，以获得相应的PCR产物;以及

[0073] (c)通过对PCR产物进行定量分析，确定来源于属于变形杆菌(Proteus)属的细菌的囊泡的数量低于正常人的囊泡的数量的病例作为选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症中的一种或多种疾病。

[0074] 如本文所用，术语“诊断”在广义上是指在所有方面确定患者的疾病状况。确定的内容包括疾病名称、疾病病因、疾病类型、疾病的严重程度、综合征的详细方面、是否存在并发症、预后等。在本发明中，诊断是指确定是否存在癌症的发作、心血管疾病、代谢疾病、神

经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病或炎性肠病、疾病的严重性等。

[0075] 属于本发明的诊断目标疾病的术语“癌症”是指恶性肿瘤，其在渗入周围组织中的同时迅速生长并扩散或转移到身体的每个部位，因此威胁生命。属于人体的最小单位的细胞，通常通过细胞自身的调节功能进行分裂和生长，并且当细胞寿命终止或细胞受损时，它们自身就会死亡，因此可以维持细胞总数的平衡。但是，当由于各种原因，细胞的这种调节功能具有问题时，通常会死亡的异常细胞过度增殖并渗入周围组织和器官，从而形成肿块导致现有结构的破坏或修饰。在本发明中，癌症可以优选为胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤，但是目前本发明不受限于此。

[0076] 如本文所使用的术语“心血管疾病”是指哺乳动物的心血管系统中疾病的发作，并且其实例包括心脏病，例如心肌梗塞、心肌病、心绞痛、心律不齐等；血管炎；脑血管疾病，例如痴呆、中风等；等等。在本发明中，心血管疾病优选包括但不限于心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤或中风。

[0077] 本文所使用的术语“代谢性疾病”是指其中由于哺乳动物体内代谢紊乱而在各个器官中发生并发症的疾病，并且其实例包括诸如高脂血症、糖尿病等代谢紊乱，其并发症，等等。在本发明中，代谢疾病优选包括但不限于糖尿病。

[0078] 如本文所使用的术语“神经精神疾病”是指发生在哺乳动物的神经系统和大脑中的疾病，其实例包括脑疾病，例如帕金森氏病、痴呆等；精神疾病，例如抑郁症、强迫症、精神分裂症等；等等。在本发明中，神经精神疾病优选包括但不限于帕金森氏病和抑郁症。

[0079] 如本文所使用的术语“变应性疾病”是指由哺乳动物中的变应性机制引起的疾病，其实例包括皮肤疾病，例如特应性皮炎，呼吸系统疾病，例如变应性鼻炎和哮喘等。在本发明中，变应性疾病优选包括但不限于特应性皮炎和哮喘。

[0080] 如本文所使用的术语“呼吸系统疾病”是指发生在哺乳动物的呼吸系统中的疾病，其实例包括鼻炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等。在本发明中，呼吸系统疾病优选包括但不限于哮喘和慢性阻塞性肺疾病。

[0081] 如本文所使用的术语“炎症性肠病”是指在肠道中发生的原因不明的慢性炎症，并且从广义上讲，可能包括肠道中发生的所有炎性疾病，例如传染性肠炎和缺血性肠病，例如细菌性肠炎、病毒性肠炎、阿米巴肠炎或结核性肠炎等；放射性肠炎；等等。在本发明中，炎性肠病优选包括但不限于肠易激综合征和炎性肠炎。

[0082] 如本文所使用的术语“小囊泡”或“囊泡”是指由各种细菌分泌的纳米尺寸的膜组成的结构。来源于革兰氏阴性细菌的囊泡或外膜囊泡(OMV)包含脂多糖、有毒蛋白、细菌DNA和RNA以及各种代谢产物，并且除了蛋白质和核酸外，来源于革兰氏阳性细菌的囊泡还包含肽聚糖和脂蛋白酸，它们是细菌的细胞壁成分。在本发明中，纳米囊泡或囊泡在属于变形杆菌属的细菌中自然分泌或人工产生，并且平均直径为10nm至200nm。

[0083] 可通过使用选自离心、超速离心、挤压、超声降解、细胞裂解、匀浆、冻融、电穿孔、机械降解、化学处理、使用过滤器进行过滤、凝胶过滤色谱法、自由流动电泳和毛细管电泳，囊泡可以从含有属于变形杆菌属的细菌的培养液中分离出来。另外，分离方法可以进一步包括洗涤以去除杂质、浓缩所获得的囊泡等。

[0084] 本文所用的术语“宏基因组”(″metagenome″)涉及包括在诸如土壤、动物肠等分离

的区域中的所有病毒、细菌、真菌等的全部基因组，并且主要用作基因组的概念，其解释了使用测序仪一次鉴定许多微生物以分析非培养的微生物。特别地，宏基因组不是指一种物种的基因组，而是指基因组的混合物，包括环境单位的所有物种的基因组。这个术语源于这样一种观点：当在生物学发展到组学(omics)的过程中定义一个物种时，各种物种以及现有的物种在功能上相互作用以形成完整的物种。在技术上，它是使用快速测序以识别一个环境中的所有物种并验证相互作用和代谢来分析所有DNA和RNA的技术的主题，无论物种如何都如此。

[0085] 在本发明中，样品可以是但不限于血液、尿液或粪便。

[0086] 根据本发明的另一实施方案，提供了用于预防或治疗一种或多种疾病的药物组合物，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，该药物组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为活性成分。

[0087] 根据本发明的另一实施方案，提供了用于预防或治疗一种或多种疾病的吸用组合物，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，该吸用组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为活性成分。

[0088] 根据本发明的另一实施方案，提供了用于预防或治疗一种或多种疾病的组合物，所述一种或多种疾病选自胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤、慢性阻塞性肺疾病、特应性皮炎、肠易激综合征、炎性肠炎、哮喘、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤、中风、糖尿病、帕金森氏病和抑郁症，该组合物包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡作为活性成分。该组合物包括食物组合物和化妆品组合物。

[0089] 如本文所使用的术语“预防”是指通过施用根据本发明的药物组合物来抑制癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎性肠病或延迟其发作的所有行为。

[0090] 如本文所使用的术语“治疗”是指通过施用根据本发明的药物组合物来减轻或有益地改变由于癌症、心血管疾病、代谢疾病、神经精神疾病、过敏性呼吸系统疾病和炎性肠病引起的症状的所有行为。

[0091] 如本文所使用的术语“减轻”是指至少降低与所治疗的病症有关的参数(例如症状)的程度的所有行为。

[0092] 在本发明的一实施方案中，证实了通过评估在向小鼠口服施用细菌和来源于细菌的囊泡后细菌和来源于细菌的囊泡的体内吸收、分布和排泄模式，细菌没有通过肠粘膜吸收，而囊泡在施用后5分钟内被吸收并全身分布，并且通过肾脏、肝脏等排泄(参见实施例1)。

[0093] 在本发明的另一实施方案中，使用从患有胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤或脑瘤的患者以及年龄与患者年龄相匹配的正常对照的血液、尿液或粪便样品中分离的囊泡进行细菌宏基因组学分析。结果证

实，与正常人的样品相比，在患有胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤或脑瘤的患者的样品中，来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(参见实施例3)。

[0094] 在本发明的另一实施方案中，使用从患有糖尿病、心肌梗塞、心肌病、心房纤颤、变异型心绞痛或中风的患者的样品以及年龄与患者年龄相匹配的正常人的样品中分离的囊泡进行细菌宏基因组分析。结果证实，与正常人的样品相比，在患有糖尿病、心肌梗塞、心肌病、变异型心绞痛、心房纤颤或中风的患者的样品中，来自属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(参见示例4)。

[0095] 在本发明的另一实施方案中，使用从患有帕金森氏病或抑郁症的患者的样品以及年龄与患者年龄相匹配的正常人的样品中分离的囊泡进行细菌宏基因组分析。结果证实，与正常人的样品相比，在患有帕金森氏病或抑郁症的患者的样品中，来自属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(参见示例5)。

[0096] 在本发明的另一实施方案中，使用从患有特应性皮炎、哮喘或慢性阻塞性肺疾病的患者的样品以及年龄和性别与患者年龄和性别相匹配的正常人的样品中分离的囊泡进行细菌宏基因组分析。结果证实，与正常人的样品相比，在患有特应性皮炎、哮喘或慢性阻塞性肺疾病的患者的样品中，来自属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(参见示例6)。

[0097] 在本发明的另一实施方案中，使用从患有肠易激综合征或炎性肠炎的患者的样品以及年龄与患者年龄相匹配的正常人的样品中分离的囊泡进行细菌宏基因组分析。结果证实，与正常人的样品相比，在患有肠易激综合征或炎性肠炎的患者的样品中，来自属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(参见示例7)。

[0098] 在本发明的另一实施方案中，基于上述实施例的结果，通过进一步进行了研究以分析来源于属于变形杆菌(即奇异变形杆菌)属的细菌的囊泡的特征，证实囊泡的平均直径小于200nm，优选41.40±5.03nm，并且是球形的(参见实施例8)。

[0099] 在本发明的另一实施方案中，通过在培养从人分离的奇异变形杆菌菌株后，评估炎症介质的分泌，然后将巨噬细胞用不同浓度的来源于奇异变形杆菌的囊泡处理，并用来源于大肠杆菌的囊泡处理，其是炎性疾病、代谢性疾病和癌症的致病因素，以检查从奇异变形杆菌菌株的培养液中分泌的囊泡是否具有抗炎作用，这证实由于来源于大肠杆菌的囊泡而导致的TNF-α的分泌在来源于奇异变形杆菌的囊泡的所有情况下均有效地被抑制，无论奇异变形杆菌的起源如何(参见实施例9)。

[0100] 在本发明的另一实施方案中，为了评估奇异变形杆菌的显示出抗炎作用的活性物质是囊泡中包含的低分子量化合物或蛋白质，对来源于奇异变形杆菌的囊泡进行了热处理或酸处理。随后，通过评估经热处理的或酸处理的囊泡施用于巨噬细胞，然后用来源于大肠杆菌的囊泡处理而对TNF-α分泌的影响，证实了由于来源于大肠杆菌的囊泡而导致的TNF-α的分泌在来源于奇异变形杆菌的囊泡经热处理或酸处理这两种情况下均被有效地抑制(参见实施例10)。

[0101] 在本发明的另一实施方案中，为了评估从奇异变形杆菌菌株的培养液中分泌的囊泡是否表现出抗癌治疗作用，通过皮下注射癌细胞系来制备癌症疾病模型，并通过测量从处理前4天开始对小鼠口服施用来源于奇异变形杆菌的囊泡后20天的癌组织的尺寸，证实与对照相比，在施用囊泡的情况下癌组织的尺寸显著减小(参见实施例11)。

[0102] 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变形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，但本发明不受限于此，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、口服剂等形式。

[0103] 根据目标方法，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、皮内给药、鼻内给药和气道内给药)，并且其合适剂量可以根据患者的疾病状况和体重、疾病的严重程度、药物类型、给药途径和给药时间不同而变化，且可以由本领域普通技术人员适当选择。

[0104] 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其他因素来确定。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。

[0105] 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。

[0106] 在本发明的食品组合物中，活性成分可以原样添加或与其他食品或食品成分组合使用，并且其可以根据一般方法适当使用。活性成分的混合量可以根据使用目的(预防或减轻)适当确定。通常，当制备食品或饮料时，相对于原料的量，本发明的组合物的添加量为15重量％或以下，优选为10重量％或以下。然而，在出于健康和卫生目的或健康控制的目的长期施用的情况下，可以使用小于上述范围的量。

[0107] 除了以指定的比例包含在本发明的食品组合物中作为必需成分的活性成分之外，食品组合物的其他成分没有特别限制，并且食品组合物可以包括各种调味剂、天然碳水化合物等等作为其他成分，如普通饮料。上述天然碳水化合物的实例包括普通糖，例如单糖，例如葡萄糖、果糖等；二糖，例如麦芽糖、蔗糖等；多糖，例如糊精、环糊精等，以及糖醇，例如木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等。除了上述碳水化合物以外的甜味剂的实例可以包括天然甜味剂，如索马甜和甜菊提取物(例如莱鲍迪甙A、甘草甜素等)，以及合成甜味剂，如糖精、阿斯巴甜等。天然碳水化合物的比例可以由本领域普通技术人员适当地确定。

[0108] 另外，本发明的食品组合物可以包括各种营养补品，维生素，矿物质(电解质)，香料，诸如合成香料、天然香料等，着色剂和增强剂(奶酪、巧克力等)，果胶酸及其盐，藻酸及其盐，有机酸，保护性胶体增稠剂，pH调节剂，稳定剂，防腐剂，甘油，醇，碳酸化饮料中使用

的碳酸化剂等。这些成分可以单独使用或组合使用。这些添加剂的比例也可以由本领域普通技术人员适当地选择。

[0109] 本发明的化妆品组合物不仅可以包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡，而且可以包括化妆品组合物中常用的成分，并且可以包括例如一般的佐剂，例如抗氧化剂、稳定剂、增溶剂、维生素、颜料和染料以及载体。

[0110] 另外，本发明的组合物除了包含来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡以外，还可以包含在不会通过与来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡发生反应而对皮肤的保护效果产生不良影响的范围内长期使用的有机紫外线阻隔剂。有机紫外线阻隔剂可以选自甘油基PABA，苯并三唑基甲基苯酚三硅氧烷，苯并三唑基甲基苯酚，二没食子酰三油酸酯(digalloyl trioleate)，苯基二苯并咪唑四磺酸二钠，二乙基己基丁酰胺基三嗪酮(diethyl hexyl butamidotriazone)，二乙基氨基羟基苯甲酰基己基苯甲酸酯(diethyl amino hydroxyl benzoyl hexyl benzoate)，DEA-甲氧基肉桂酸酯，指甲花醌和二羟基丙酮的混合物，亚甲基双-苯并三唑基四甲基丁基苯酚，4-甲基亚苄基樟脑，邻氨基苯甲酸薄荷酯(menthyl anthranilate)，二苯甲酮-3(氧苯甲酮)，二苯甲酮-4，二苯甲酮-8(二氧苯甲酮)，丁基甲氧基二苯甲酰基甲烷，双乙基己基氧基苯酚甲氧基苯基三嗪，对甲氧肉桂酸乙氧乙酯(cinoxate)，乙基二羟丙基PABA，奥克立林(Octocrylene)，乙基己基二甲基PABA，乙基己基甲氧基肉桂酸酯，乙基己基水杨酸酯，乙基己基三氮唑，异戊基对甲氧基肉桂酸酯，多晶硅15(二甲基共二乙基苯亚甲基丙二酸酯(dimethicodiethylbenzal malonate))，对苯二亚甲基双樟脑磺酸(terephthalylidene dicamphor sulfonic acid)及其盐，TEA-水杨酸酯和氨基苯甲酸(PABA)。

[0111] 可以添加本发明的化妆品组合物的产品的实例包括化妆品，例如收敛剂，皮肤柔软剂，滋养调色剂，各种乳膏，香精，填塞物，粉底等，清洁剂，洗面奶，肥皂，护理剂，美容剂液体等。本发明的化妆品组合物的特定制剂包括皮肤乳液，皮肤柔软剂，皮肤调色剂，收敛剂，乳液，乳霜，保湿乳液，营养乳液，按摩霜，营养霜，保湿霜，护手霜，香精，滋养香精，填塞物，肥皂，洗发水，清洁泡沫，清洁乳液，清洁霜，润肤露，沐浴露，乳液，唇膏，化妆底料，粉底，压粉，散粉，眼影等。

[0112] 根据本发明的示例性实施方案，相对于组合物的总重量，来源于属于本发明的变形杆菌属的细菌的囊泡的量的范围为0.00001重量％至30重量％，优选0.5重量％至20重量％，并且更优选1.0重量％至10重量％。

[0113] 在本发明的吸用组合物中，可以将活性成分直接添加到吸入剂中，或者可以与其他成分组合使用，并且可以根据通用方法适当地使用。活性成分的混合量可以根据使用目的(预防或治疗)适当确定。

[0114] 在下文中，将描述示例性实施方案以帮助理解本发明。然而，提供以下实施例仅是为了促进对本发明的理解，而无意于限制本发明的范围。

发明方式

[0115] [实施例]

[0116] 实施例1.肠道细菌和来源于细菌的囊泡的体内吸收、分布和排泄模式分析

[0117] 使用以下方法进行实验以评估肠道细菌和来源于细菌的囊泡是否通过胃肠道被系统吸收。将经荧光标记的肠道细菌和来源于肠道细菌的囊泡以50μg的剂量施用于小鼠的

胃肠道，并在0分钟、5分钟、3小时、6小时和12小时后测量荧光。

[0118] 通过观察小鼠的整体图像，如图1A所示，虽然细菌未被全身吸收，但是在给药后5分钟全身吸收来源于细菌的囊泡，在给药后3小时在膀胱中观察到强荧光，从而证实囊泡被排泄到尿道中。另外，证实了囊泡存在于体内直到12小时(见图1A)。

[0119] 为了评估被全身吸收后的肠道细菌和来源于肠道细菌的囊泡向各个器官的浸润模式，使用上述方法施用50μg用荧光标记的细菌和来源于细菌的囊泡，然后，在给药后12小时提取血液、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、脂肪和肌肉。

[0120] 通过观察在收集的组织中的荧光，如图1B所示，可见来源于细菌的囊泡分布在血液、心脏、肺、肝脏、肾脏、脾脏、脂肪和肌肉中，而细菌没有被吸收(见图1B)。

[0121] 实施例2.临床样品中来源于细菌的囊泡的宏基因组分析

[0122] 首先，将临床样品(例如血液、尿液、粪便等)在10毫升试管中离心(3,500×g，10分钟，4℃)以沉淀出漂浮物，并且只有上清液转移到新的10毫升试管中。使用0.22μm过滤器除去细菌和杂质，然后将所得上清液转移至离心过滤器(50kD)中，在1,500×g和4℃下离心15分钟以去除尺寸小于50kD的物质，并且浓缩至10毫升。使用0.22μm过滤器再次从其去除细菌和杂质，然后使用90ti型转子在150,000×g和4℃下进行超高速离心3小时，以去除上清液，并将团聚的沉淀物用磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶解。

[0123] 将通过上述方法分离的100μl囊泡在100℃煮沸以从脂质中释放内部DNA，然后在冰上冷却5分钟。然后，为了除去残留的漂浮物，将得到的样品在10,000×g和4℃下离心30分钟以仅收集上清液。然后使用Nanodrop定量DNA的量，然后使用下表1中所示的成对的16S rDNA引物对提取的DNA进行PCR，以确认是否存在来源于细菌的DNA，从而确认存在细菌-提取的DNA中的衍生基因。

[0124] [表1]

引物		序列	SEQ ID NO.
16S rDNA	16S_V3_F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'	1
	16S_V4_R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC -3'	2

[0125] 使用成对的16S rDNA引物对通过上述方法提取的DNA进行扩增，然后进行测序(Illumina MiSeq测序仪)，结果以标准流程图格式(SFF)文件的形式输出，并通过使用GS FLX软件(v2.9)将SFF文件转换为序列文件(.fasta)和核苷酸质量评分文件，然后识别读数的可靠性估计，并且已删除窗口(20bps)平均碱基检出准确性低于99％(Phred得分<20)的部分。为了进行操作分类单位(OTU)分析，使用UCLUST和USEARCH根据序列相似性进行聚类，分别基于94％、90％、85％、80％和75％的序列相似性，对属、科、目、纲和门进行聚类，对各个OTU的门、纲、目、科和属的水平进行分类，并使用BLASTN和GreenGenes 16S RNA序列数据库对在该属级上具有97％或更高的序列相似性的细菌进行分析RNA(108,453个序列)(QIIME)。

[0126] 实施例3.癌症患者临床样品中来源于细菌的囊泡的宏基因组分析

[0127] 通过使用实施例2的方法，从55例胃癌患者和作为对照的99名正常人的粪便样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的

细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的粪便样品相比，胃癌患者的粪便样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对胃癌患者:1.1％对0.05％，p<0.001)(见图2)。

[0128] 另外，从67例胃癌患者和作为对照的198名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，胃癌患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对胃癌患者:1.3％对0.2％，p＝<0.001)(见图2)。

[0129] 另外，从61例胃癌患者和作为对照的120名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，胃癌患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对胃癌患者:1.8％对0.1％，p<0.0001)(见图2)。

[0130] 另外，通过使用实施例2的方法，从38例结肠直肠癌患者和作为对照的55名正常人的粪便样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的粪便样品相比，结肠直肠患者的粪便样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对结肠直肠患者:1.2％对0.05％，p<0.001)(见图3)。

[0131] 另外，从38例结肠直肠癌患者和作为对照的性别与年龄与所述患者相匹配的38名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，结肠直肠患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对结肠直肠患者:1.3％对0.06％，p<0.001)(见图3)。

[0132] 另外，通过使用实施例2的方法，从94例肝癌患者和作为对照的152名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，肝癌患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对肝癌患者:0.7％对0.01％，p<0.001)(见图4)。

[0133] 另外，从84例胆管癌患者和作为对照的132名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，胆管癌患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对胆管癌患者:0.7％对0.06％，p<0.001)(见图4)。

[0134] 另外，从191例胰腺癌患者和作为对照的291名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，胰腺癌患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对胰腺癌患者:0.7％对0.06％，p<0.001)(见图4)。

[0135] 另外，通过使用实施例2的方法，从318例肺癌患者和作为对照的234名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，肺癌患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对肺癌患者:0.7％对0.1％，p<0.001)(见图5)。

[0136] 另外，通过使用实施例2的方法，从127例乳腺癌患者和作为对照的220名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，乳腺癌患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对乳腺癌患者:1.4%对0.3%，$p<0.001$)(见图6)。

[0137] 另外，从136例卵巢癌患者和作为对照的136名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，卵巢癌患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对卵巢癌患者:1.1%对0.1%，$p<0.001$)(见图6)。

[0138] 另外，通过使用实施例2的方法，从96例膀胱癌患者和作为对照的184名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，膀胱癌患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对膀胱癌患者:0.8%对0.1%，$p<0.001$)(见图7)。

[0139] 另外，从95例膀胱癌患者和作为对照的157名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，膀胱癌患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对膀胱癌患者:1.9%对0.1%，$p<0.000001$)(见图7)。

[0140] 另外，通过使用实施例2的方法，从53例前列腺癌患者和作为对照的159名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，前列腺癌患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对前列腺癌患者:1.1%对0.09%，$p<0.000001$)(见图8)。

[0141] 另外，通过使用实施例2的方法，从93例淋巴瘤患者和作为对照的109名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，淋巴瘤患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对淋巴瘤患者:0.09%对0.00%，$p<0.001$)(见图9)。

[0142] 另外，从84例脑肿瘤患者和作为对照的92名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，脑肿瘤患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对脑肿瘤患者:0.09%对0.01%，$p<0.01$)(见图9)。

[0143] 实施例4.糖尿病和心血管疾病患者临床样品中来源于细菌的囊泡的宏基因组分析

[0144] 通过使用实施例2的方法，从73例糖尿病患者和作为对照的146名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，糖尿病患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对糖尿病患者:0.4%对0.01%，$p<0.01$)(见图10)。

[0145] 另外，通过使用实施例2的方法，从57例心肌梗塞患者和作为对照的163名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，心肌梗塞患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对心肌梗塞患者:0.4％对0.07％，p<0.01)(见图11)。

[0146] 另外，从72例心肌病患者和作为对照的163名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，心肌病患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对心肌病患者:0.4％对0.08％，p<0.01)(见图11)。

[0147] 另外，从69例心房纤颤患者和作为对照的103名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，心房纤颤患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对心房纤颤患者:0.1％对0.01％，p<0.01)(见图11)。

[0148] 另外，从32例变异型心绞痛患者和作为对照的32名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，变异型心绞痛患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对变异型心绞痛患者:0.6％对0.1％，p<0.05)(见图11)。

[0149] 另外，从87例中风患者和作为对照的92名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，中风患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对中风患者:0.3％对0.00％，p<0.05)(见图12)。

[0150] 实施例5.神经精神疾病患者临床样品中来源于细菌的囊泡的宏基因组分析

[0151] 通过使用实施例2的方法，从39例帕金森氏病患者和作为对照的79名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，帕金森氏病患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对帕金森氏病患者:0.6％对0.02％，p<0.0001)(见图13)。

[0152] 此外，通过使用实施例2的方法，从20例抑郁症患者和作为对照的20名正常人的尿液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的尿液样品相比，抑郁症患者的尿液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对抑郁症患者:1.7％对0.06％，p<0.01)(见图13)。

[0153] 实施例6.变应性或呼吸道疾病患者临床样品中来源于细菌的囊泡的宏基因组分析

[0154] 通过使用实施例2的方法，从27例特应性皮炎患者和作为对照的138名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因，对其进行了宏基因组分析，然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果，证实与正常人的血液样品相比，特应性皮炎患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对特应性皮炎患者:2.0％对

0.06%,p<0.00001)(见图14)。

[0155] 另外,通过使用实施例2的方法,从291名哮喘患者、207名慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者和作为对照的291名正常人的血液样品中存在的囊泡中提取基因,对其进行了宏基因组分析,然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果,证实与正常人的血液样品相比,哮喘或慢性阻塞性肺疾病患者的血液样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对哮喘患者:0.7%对0.08%,p<0.01;正常人对慢性阻塞性肺疾病患者:0.7%对0.07%,p<0.01)(见图15)。

[0156] 实施例7.炎性肠病患者临床样品中来源于细菌的囊泡的宏基因组分析

[0157] 通过使用实施例2的方法,从57例肠易激综合征(IBS)患者和作为对照的58名正常人的粪便样品中存在的囊泡中提取基因,对其进行了宏基因组分析,然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果,证实与正常人的粪便样品相比,肠易激综合征患者的粪便样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对肠易激综合征患者:1.9%对0.00%,p<0.00001)(见图16)。

[0158] 另外,通过使用实施例2的方法,从91例炎性肠病患者和作为对照的99名正常人的粪便样品中存在的囊泡中提取基因,对其进行了宏基因组分析,然后评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡分布。结果,证实与正常人的粪便样品相比,炎性肠病患者的粪便样品中的来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡显著减少(正常人对炎性肠病患者:1.9%对0.00%,p<0.00001)(见图16)。

[0159] 实施例8.从奇异变形杆菌培养液中分离囊泡及其特性分析

[0160] 基于实施例2至7的结果,为了评估来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡的功能,对属于变形杆菌属的一种细菌的奇异变形杆菌菌株进行培养,然后从中分离出囊泡,并分析了囊泡的特征。

[0161] 从人的临床样品中分离出的奇异变形杆菌菌株在37℃下,在厌氧室内的脑心浸液(BHI)培养基中培养,直到吸光度(OD_{600})达到1.0至1.5,然后再进行亚培养。随后,收集无奇异变形杆菌菌株的培养基上清液,并在10,000×g和4℃下离心15分钟,并且使用0.45μm过滤器过滤所得的上清液,然后经由使用QuixStand台式系统(GE Healthcare,英国)通过100kDa中空滤膜浓缩至200ml的体积。之后,再用0.22μm的过滤器过滤浓缩的上清液。然后,使用BCA测定法对蛋白质进行定量,对得到的囊泡进行以下实验,从按照上述方法培养的奇异变形杆菌的培养液中分离囊泡,然后使用电子显微镜评估其形状和大小。

[0162] 结果,如图17A所示,证实了,从奇异变形杆菌培养液中分离出的囊泡是球形的,尺寸小于200nm,并且通过图17B所示的动态光散射测定结果证实,囊泡的大小为37.8±13.5nm。

[0163] 实施例9.来源于奇异变形杆菌的囊泡的抗炎作用

[0164] 为了检查来源于奇异变形杆菌的囊泡对炎性细胞中炎性介质分泌的作用,用不同浓度(0.1μg/ml、1μg/ml或10μg/ml)的来源于奇异变形杆菌的囊泡(P.mirabilis EV)处理了作为小鼠巨噬细胞系的Raw 264.7细胞,然后用属于致病性囊泡的来源于大肠杆菌的囊泡(E.coli EV)处理,并且测量炎性介质(IL-6、TNF-α等)。

[0165] 更具体地,将Raw 264.7细胞以1×10^5细胞/孔的密度分配到24孔细胞培养板中,然后在杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)完全培养基中培养24小时。随后,将培养物上清

液收集在1.5ml管中，并以3,000×g离心5分钟，并且收集上清液并在4℃下保存，然后进行ELISA分析。

[0166] 为了进行ELISA分析，将捕获抗体用磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释，并将稀释后的溶液根据工作浓度按50μl等分试样分配到96孔聚苯乙烯板中，然后在4℃下反应过夜。随后，将样品用100μl的PBST(含0.05％Tween-20的PBS)溶液洗涤两次，然后将RD(含1％牛血清白蛋白(BSA)的PBST)溶液以100μl等份分配到所述板中，随后于室温下封闭1小时，再用100μl的PBST洗涤两次，然后将样品和标准品按照浓度以50μl等分试样分配，并使其在室温下反应2小时。将样品和标准品再次用100μl的PBST洗涤两次，然后用RD稀释检测抗体，并根据工作浓度将稀释的溶液分装成50μl等分试样，并使其在室温下反应2小时。将样品和标准品再次用100μl的PBST洗涤两次，然后将链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP)在RD中稀释至1/200，并将稀释的溶液按50μl等分试样分配，并使其在室温下反应30分钟。最后，将样品和标准品用100μl的PBST洗涤3次，然后将3,3,5,5-四甲基联苯胺(TMB)底物和0.04％的含氧水(oxygenated water)按1:1的比例混合制成的溶液以50μl等分试样分配。此后，等待显色，并在5分钟至20分钟后显色时，将1M硫酸溶液以50μl等分试样分配，终止反应，并使用Synergy™ HT多-检测酶标仪(BioTek，美国)测量450nm处的吸光度。

[0167] 结果，证实了在用来源于奇异变形杆菌的囊泡进行预处理的情况下，来源于大肠杆菌的囊泡引起的IL-6和TNF-α的分泌被显著抑制了(见图18A和18B)。

[0168] 此外，为评估奇异变形杆菌的同种型对来源于奇异变形杆菌的囊泡的抗炎作用的效果，可采用各种浓度的来源于从人类分离的5种奇异变形杆菌菌株(PMR201，PMR202，PMR203，PMR204和PMR205)的囊泡进行预处理执行12小时，然后用1μg/ml的属于致病性囊泡的来源于大肠杆菌的囊泡处理12小时。将培养上清液收集在1.5ml管中，并以3,000×g离心5分钟，收集上清液并保存在4℃下，然后进行ELISA分析。

[0169] 结果，证实了与来源于奇异变形杆菌参考菌株(PMR101)的囊泡的情况相似，在用来源于分离的奇异变形杆菌菌株的囊泡进行预处理的情况下，由于来源于大肠杆菌的囊泡引起的TNF-α的分泌被显著抑制(参见图19)。特别地，已经证实，相比于来源于作为有效的微生物对照的植物乳杆菌的囊泡的情况，在用来源于奇异变形杆菌的囊泡预处理的情况下，对来自TNF-α的分泌的抑制作用要强(见图19)。

[0170] 这表明，来源于分离的奇异变形杆菌菌株的囊泡能够有效地抑制由病原囊泡(例如来源于大肠杆菌的囊泡)诱导的炎症反应，而不论其同种型如何。

[0171] 实施例10.经热处理或酸处理的来源于奇异变形杆菌的囊泡对抗炎活性的作用

[0172] 通过实施例9，证实了来源于奇异变形杆菌参考菌株和分离的奇异变形杆菌菌株的囊泡的抗炎作用，并且进一步具体研究了囊泡的稳定性和活性成分的性质。为此，巨噬细胞(Raw 264.7)用三种类型的在100℃下煮沸10分钟或经过酸处理(pH 2.0)10分钟的来源于奇异变形杆菌的囊泡(PMR101，PMR202和PMR205)进行了预处理，以评估其抗炎作用。

[0173] 结果，证实即使在100℃下煮沸或酸处理后，来源于奇异变形杆菌的囊泡的抗炎作用仍然得以维持(参见图20)。这表明来源于奇异变形杆菌的囊泡在高温和高酸水平下是稳定的，并且这还表明表现出抗炎作用的来源于奇异变形杆菌的囊泡的组分不是蛋白质。

[0174] 实施例11.来源于变形杆菌的囊泡的抗癌作用

[0175] 通过以上实施例，与正常人的相比，在癌症患者的临床样品中的来源于属于变形

杆菌属的细菌的囊泡显著减少，并且进一步具体研究了囊泡的抗癌作用。为此，如图21A中所述，通过将来源于奇异变形杆菌的囊泡口服施用于6周龄的雄性C57BL/6小鼠并在施用后第4天将皮下注射癌细胞系(CT26细胞)来制备癌症模型。直到施用癌细胞系后的第20天，才测量癌症组织的大小以评估癌症的治疗效果。结果，与口服施用生理盐水的组相比，口服施用囊泡的小鼠中癌组织的大小显著减小(参见图21B)。

[0176] 提供本发明的上述描述仅出于说明目的，并且本发明所属领域的普通技术人员应理解，在不改变本发明的技术精神或基本特征的情况下，可以容易地将本发明修改为其他特定形式。因此，上述实施方案应被解释为仅出于说明的目的而提供，而不是出于限制的目的。

[0177] 工业适用性

[0178] 根据本发明，来源于属于变形杆菌属的细菌的囊泡可用于诊断各种疾病的方法中，所述疾病如胃癌、结肠直肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、脑瘤等等；心血管疾病，例如心肌梗塞、心肌病、心房纤颤、变异型心绞痛、中风等；代谢性疾病，例如糖尿病等；神经精神疾病，例如帕金森氏症、抑郁症等；过敏性呼吸系统疾病，如特应性皮炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等；或炎性肠病，例如肠易激综合征、炎性肠炎等，并且因此是经济的，并且预期该囊泡可用于多种应用，例如用于预防、治疗和/或减轻的组合物，例如食品、吸入剂、化妆品、药品等。因此，囊泡可有效地用于各种工业领域，例如医疗、功能食品和化妆品行业。

<110> MD保健株式会社
<120> 来源于变形杆菌属的细菌的纳米囊泡和其用途
<130> MPO18-080CN
<150> KR 10-2017-0083047
<151> 2017-06-30
<150> KR 10-2018-0072307
<151> 2018-06-22
<160> 2
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 16S_V3_F
<400> 1
tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcctacgg gnggcwgcag 50
<210> 2
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 16S_V4_R
<400> 2
gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acaggactac hvgggtatct aatcc 55

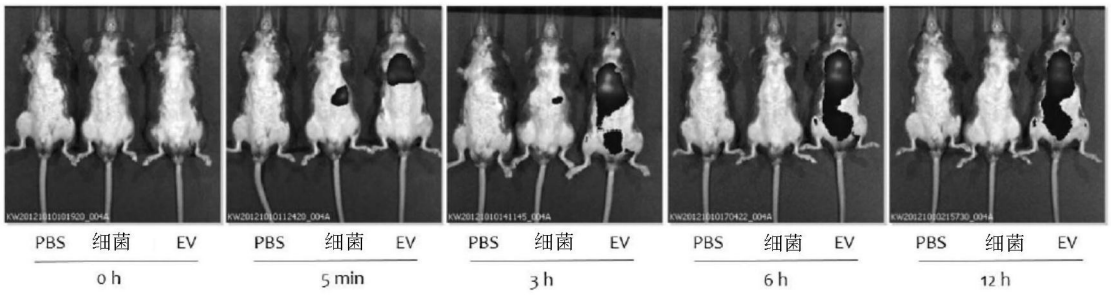

PBS 细菌 EV
0 h
PBS 细菌 EV
5 min
PBS 细菌 EV
3 h
PBS 细菌 EV
6 h
PBS 细菌 EV
12 h

图1A

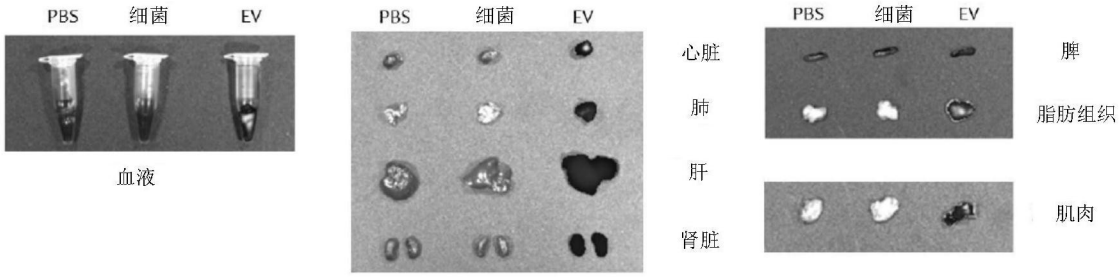

PBS 细菌 EV
血液
PBS 细菌 EV
心脏
肺
肝
肾脏
PBS 细菌 EV
脾
脂肪组织
肌肉

图1B

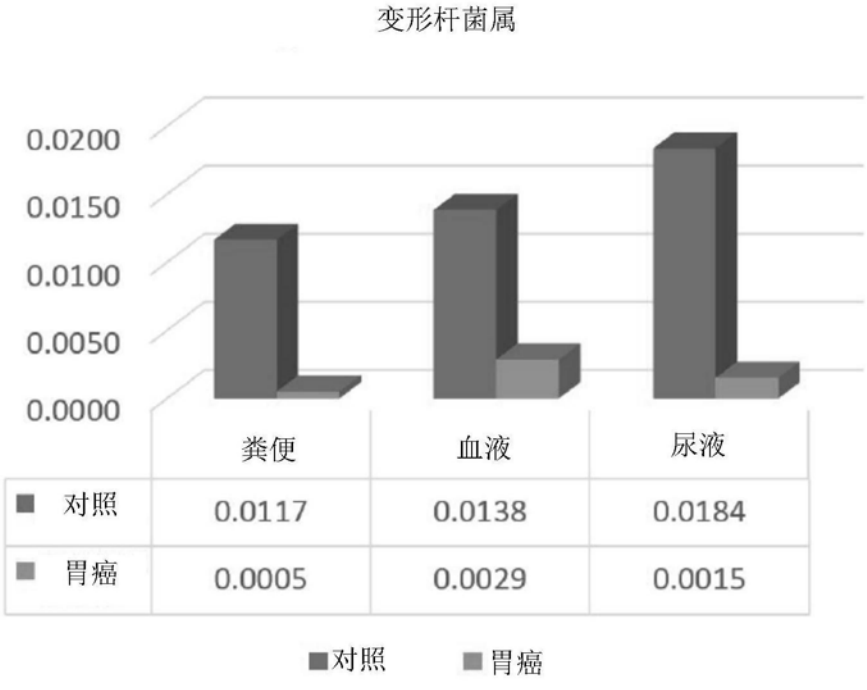

变形杆菌属
0.0200
0.0150
0.0100
0.0050
0.0000
粪便
血液
尿液
对照 0.0117 0.0138 0.0184
胃癌 0.0005 0.0029 0.0015
对照
胃癌

图2

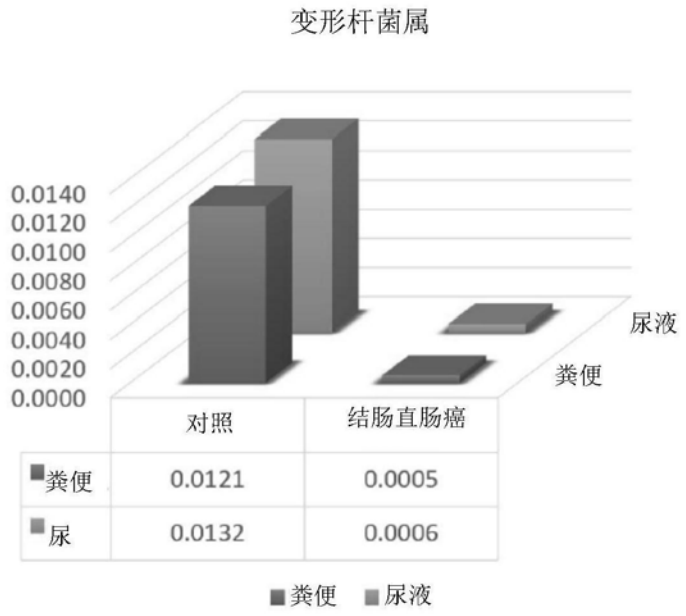

变形杆菌属
0.0140
0.0120
0.0100
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
尿液
粪便
对照
结肠直肠癌
粪便 0.0121 0.0005
尿 0.0132 0.0006
粪便 尿液

图3

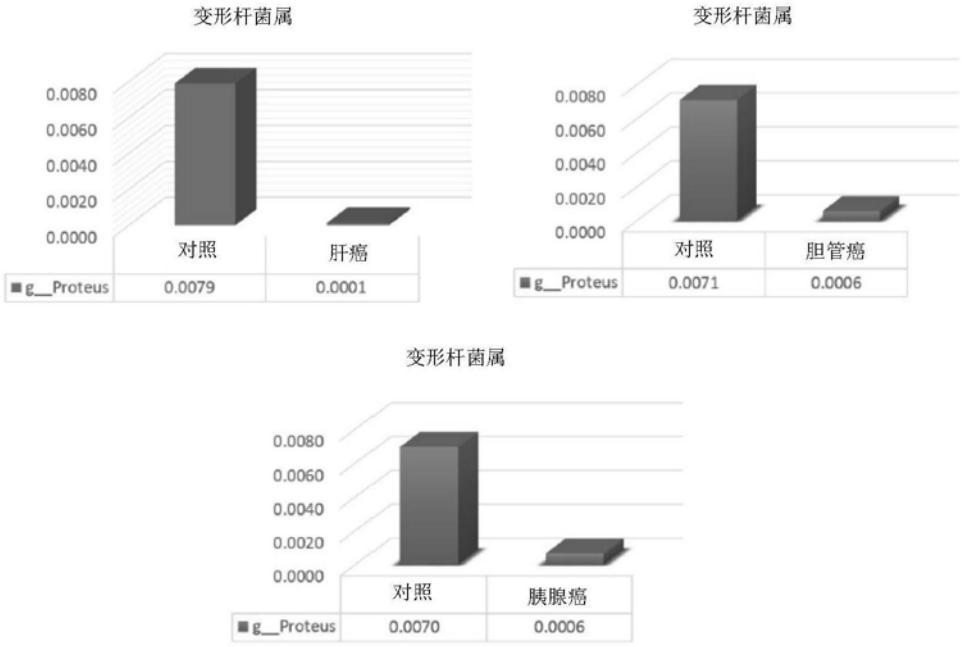

变形杆菌属
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
肝癌
g__Proteus 0.0079 0.0001
变形杆菌属
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
胆管癌
g__Proteus 0.0071 0.0006
变形杆菌属
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
胰腺癌
g__Proteus 0.0070 0.0006

图4

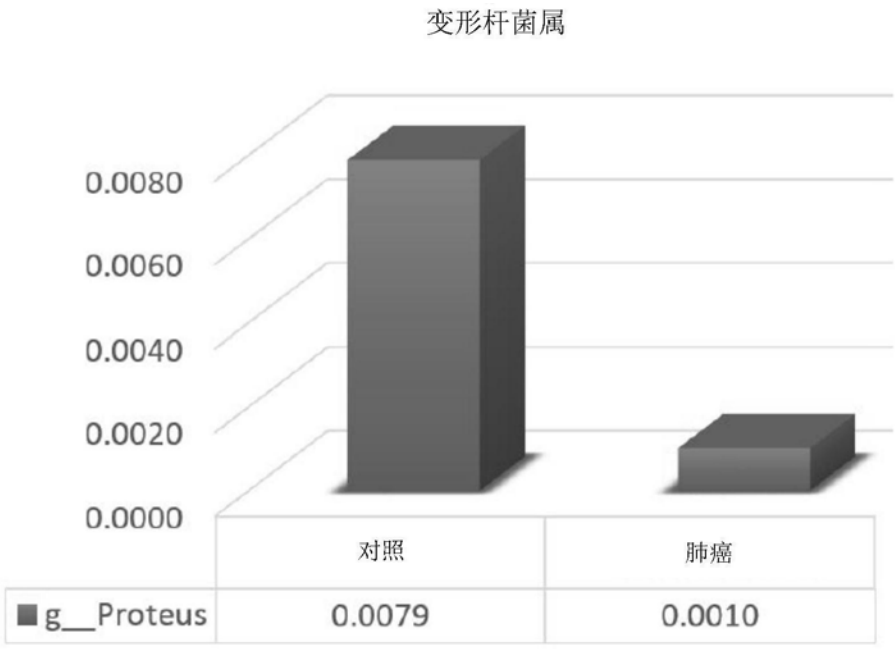

变形杆菌属
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
肺癌
g__Proteus
0.0079
0.0010

图5

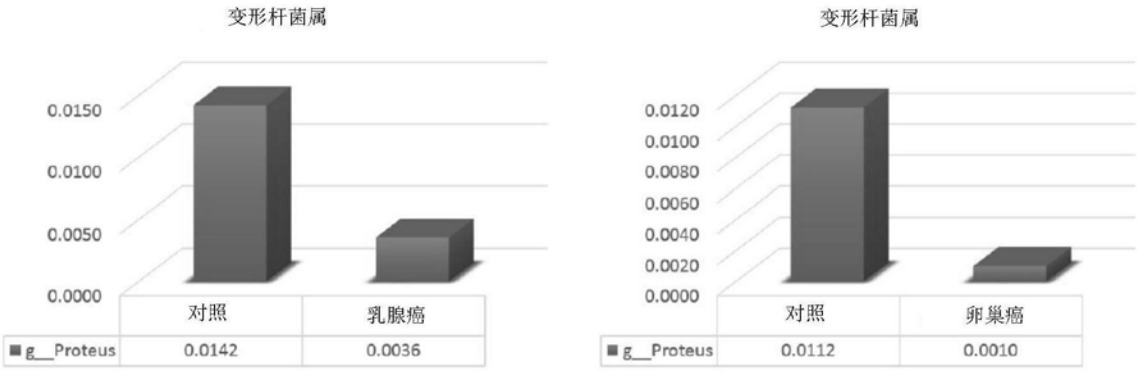

变形杆菌属
0.0150
0.0100
0.0050
0.0000
对照
乳腺癌
g__Proteus
0.0142
0.0036
变形杆菌属
0.0120
0.0100
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
卵巢癌
g__Proteus
0.0112
0.0010

图6

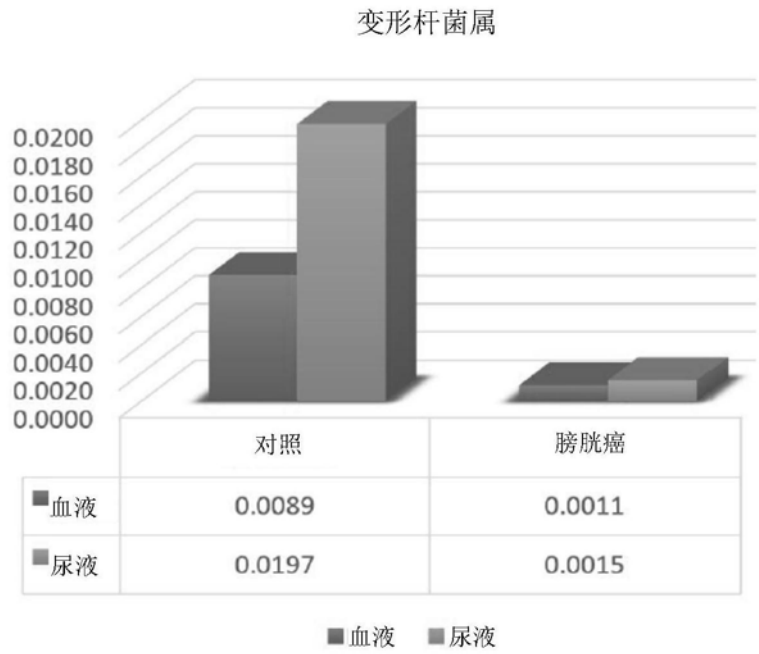

变形杆菌属
0.0200
0.0180
0.0160
0.0140
0.0120
0.0100
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
膀胱癌
血液
0.0089
0.0011
尿液
0.0197
0.0015
血液
尿液

图7

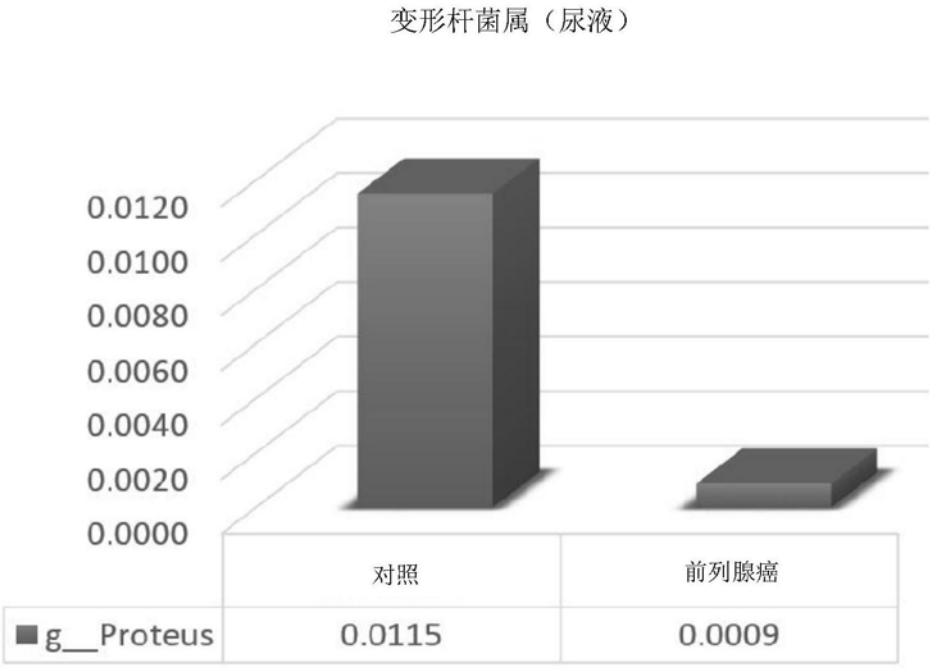

变形杆菌属（尿液）
0.0120
0.0100
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
前列腺癌
g__Proteus
0.0115
0.0009

图8

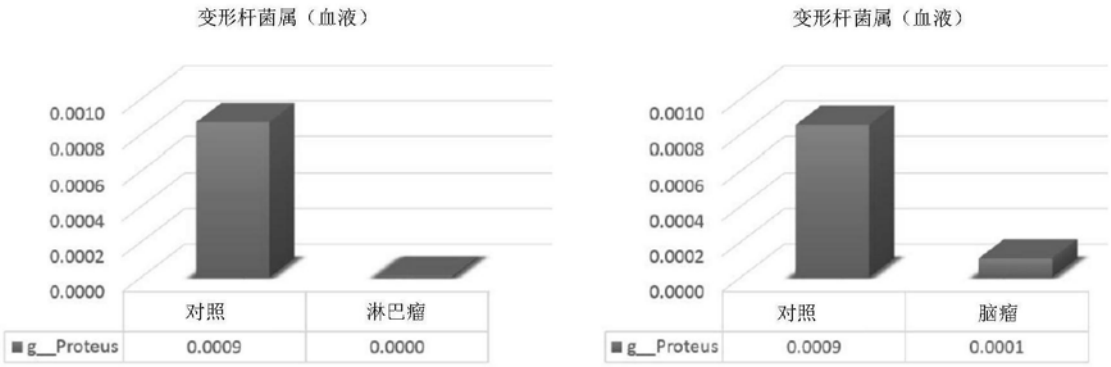

变形杆菌属（血液）
0.0010
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
对照
淋巴瘤
g__Proteus
0.0009
0.0000
变形杆菌属（血液）
0.0010
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
对照
脑瘤
g__Proteus
0.0009
0.0001

图9

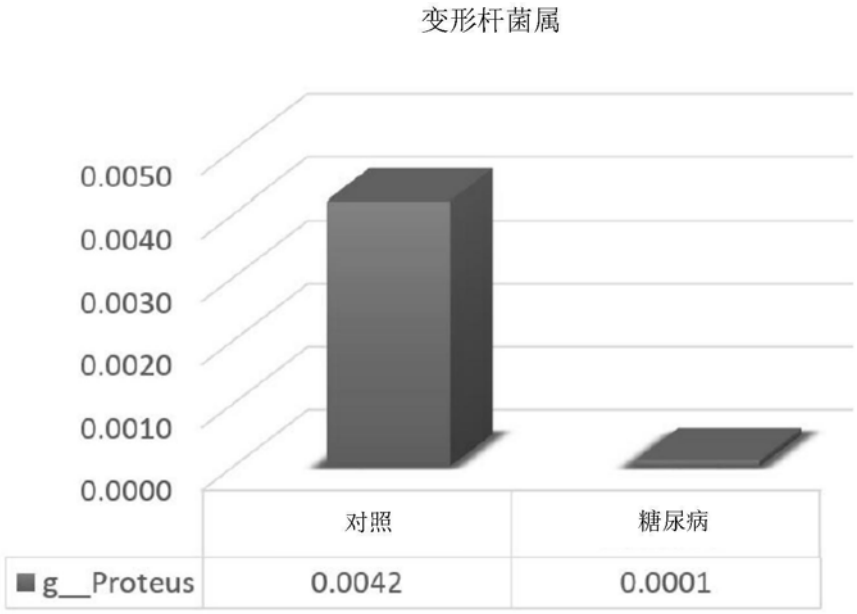

变形杆菌属
0.0050
0.0040
0.0030
0.0020
0.0010
0.0000
对照
糖尿病
g__Proteus
0.0042
0.0001

图10

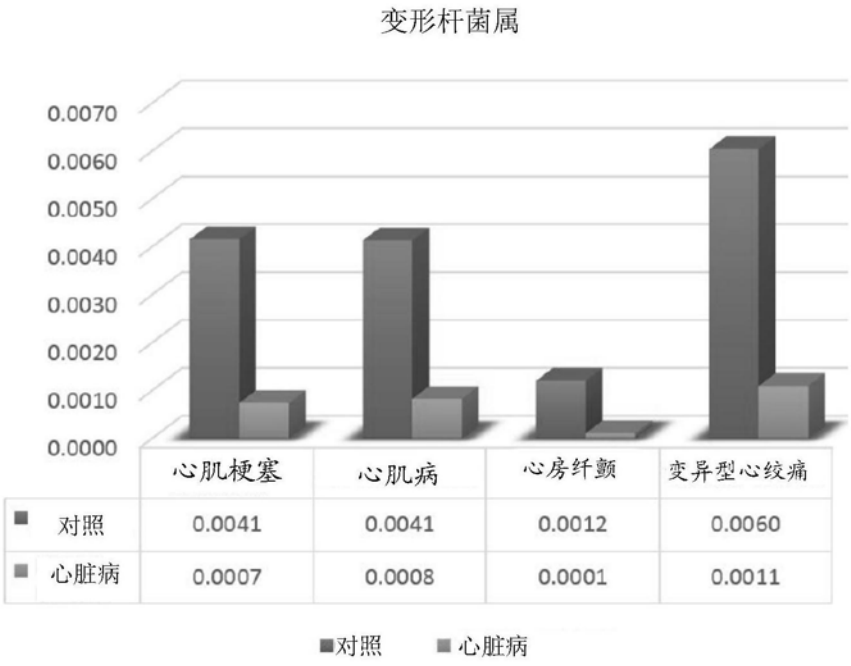

变形杆菌属
0.0070
0.0060
0.0050
0.0040
0.0030
0.0020
0.0010
0.0000
心肌梗塞
心肌病
心房纤颤
变异型心绞痛
对照 0.0041 0.0041 0.0012 0.0060
心脏病 0.0007 0.0008 0.0001 0.0011
对照
心脏病

图11

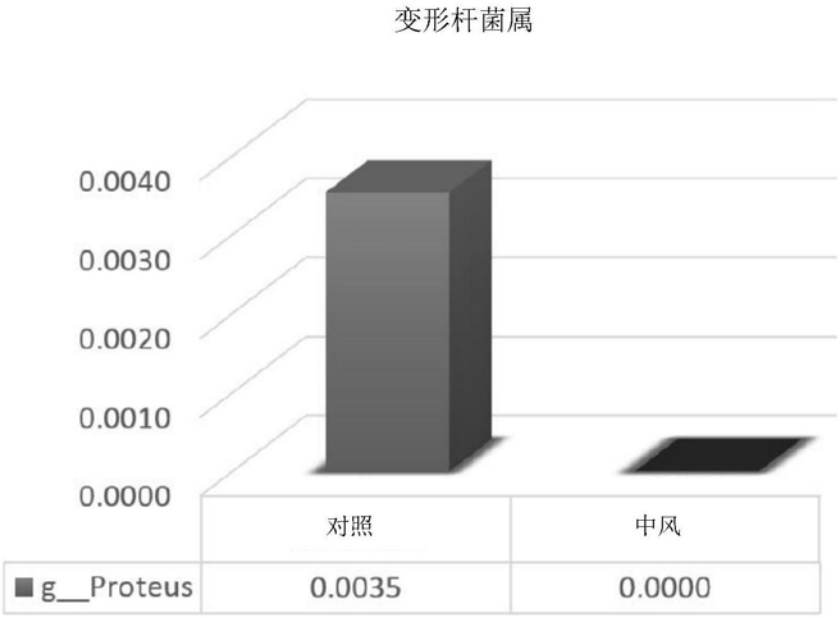

变形杆菌属
0.0040
0.0030
0.0020
0.0010
0.0000
对照
中风
g__Proteus 0.0035 0.0000

图12

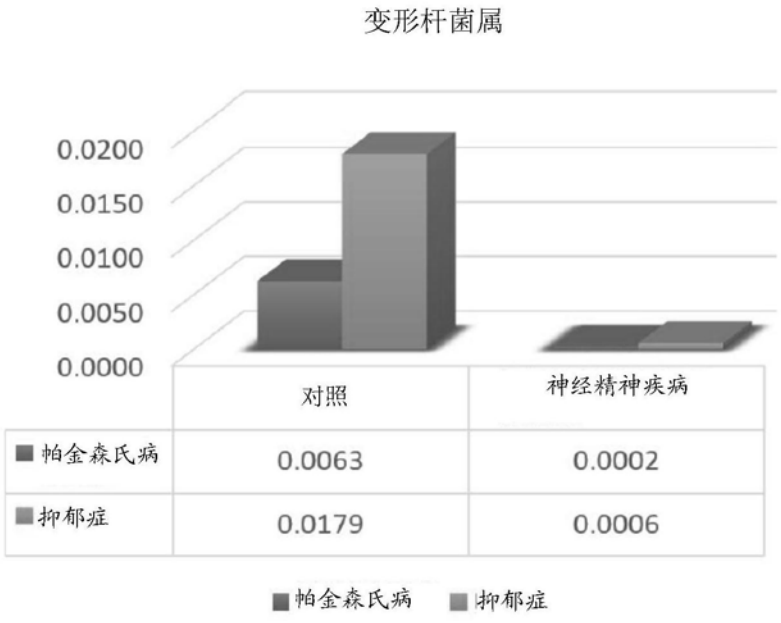

变形杆菌属
0.0200
0.0150
0.0100
0.0050
0.0000
对照
神经精神疾病
帕金森氏病
0.0063
0.0002
抑郁症
0.0179
0.0006
帕金森氏病
抑郁症

图13

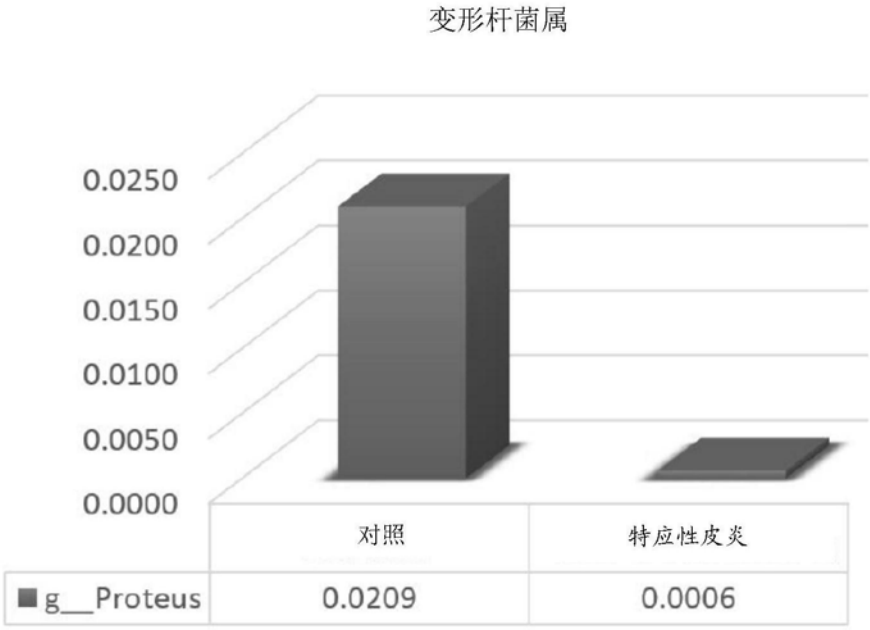

变形杆菌属
0.0250
0.0200
0.0150
0.0100
0.0050
0.0000
对照
特应性皮炎
g__Proteus
0.0209
0.0006

图14

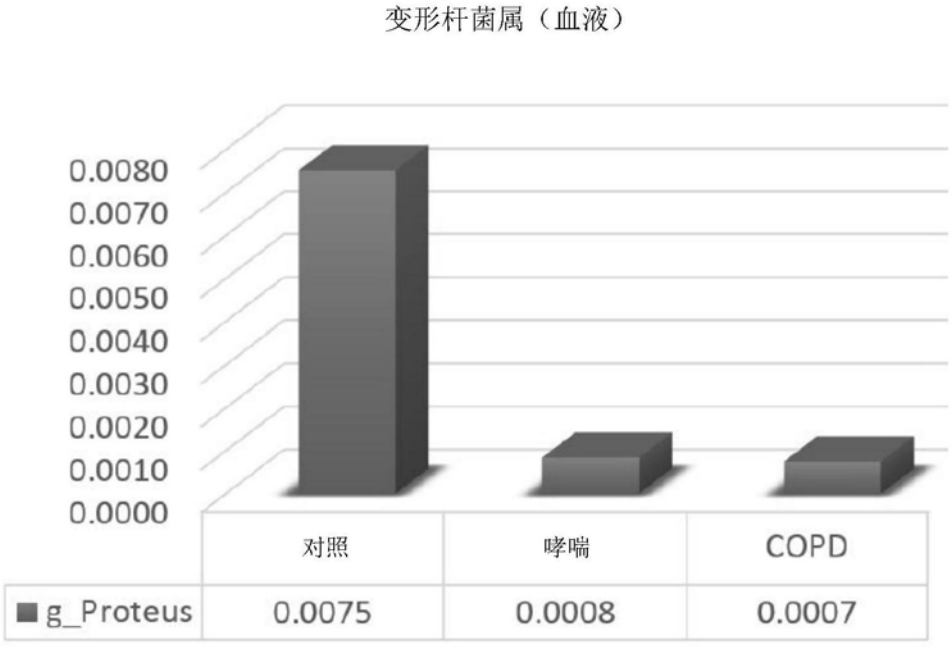

变形杆菌属（血液）
0.0080
0.0070
0.0060
0.0050
0.0040
0.0030
0.0020
0.0010
0.0000
对照
哮喘
COPD
g_Proteus
0.0075
0.0008
0.0007

图15

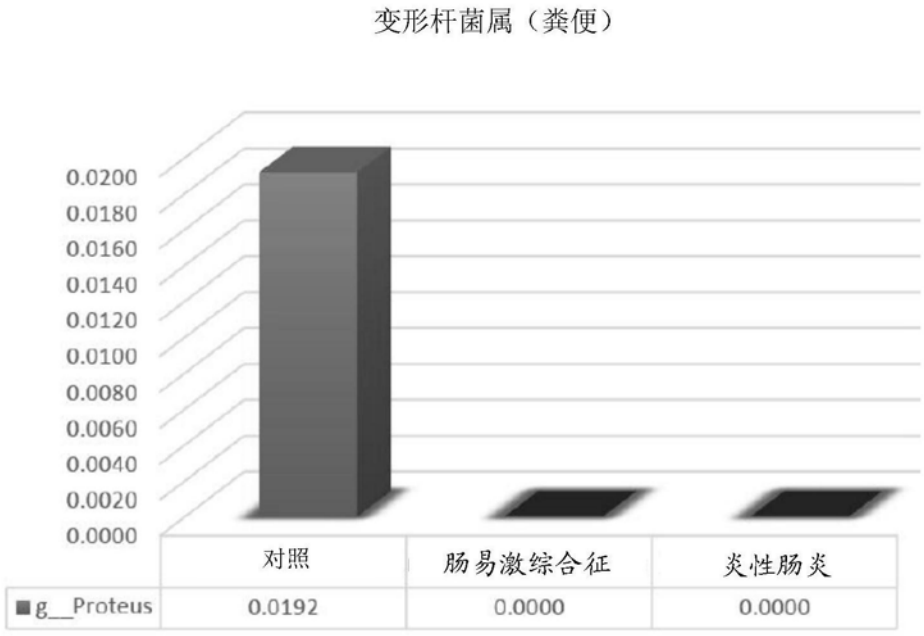

变形杆菌属（粪便）
0.0200
0.0180
0.0160
0.0140
0.0120
0.0100
0.0080
0.0060
0.0040
0.0020
0.0000
对照
肠易激综合征
炎性肠炎
g__Proteus
0.0192
0.0000
0.0000

图16

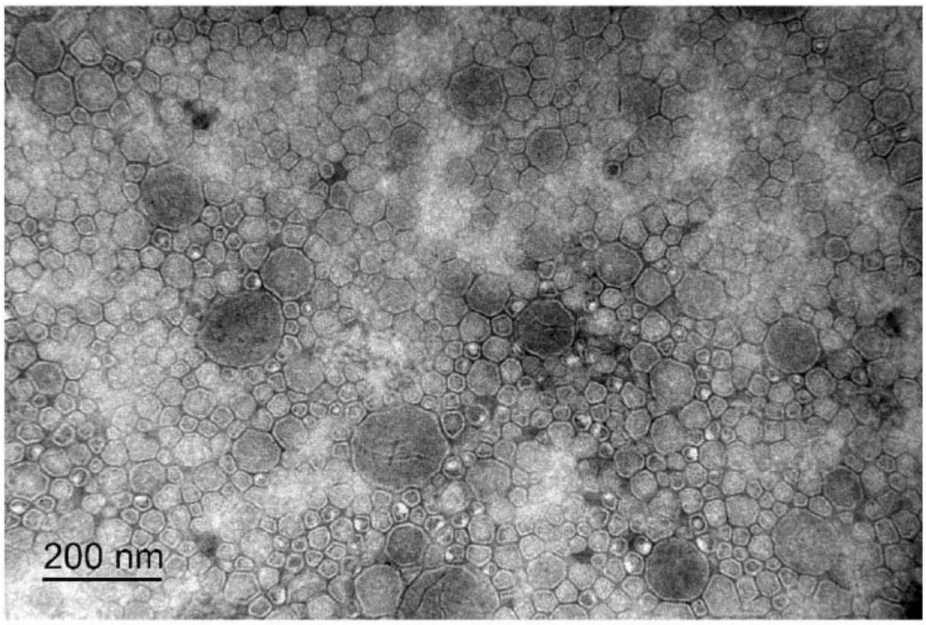

200 nm

图17A

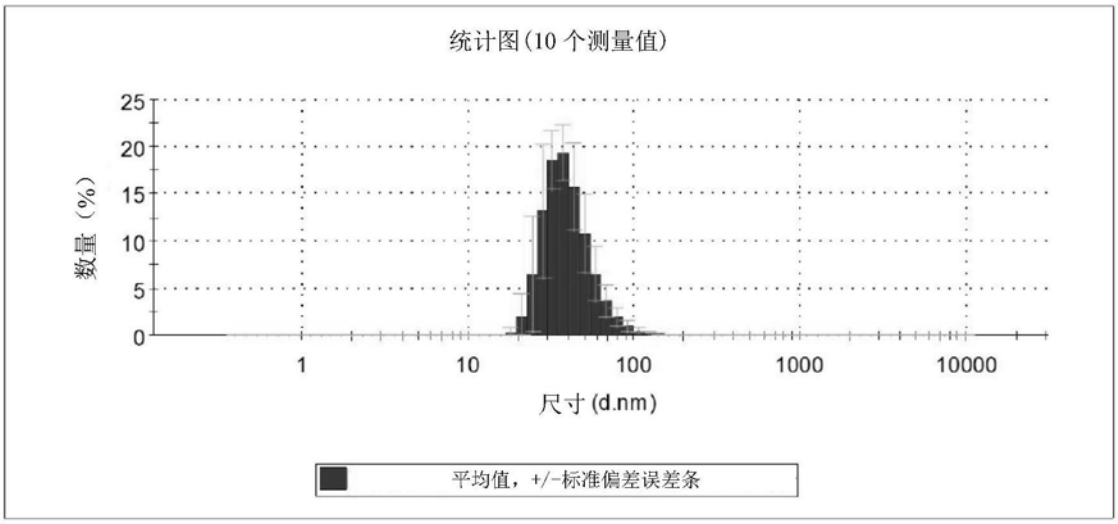

统计图(10 个测量值)
数量（%）
25
20
15
10
5
0
1
10
100
1000
10000
尺寸(d.nm)
平均值，+/-标准偏差误差条

图17B

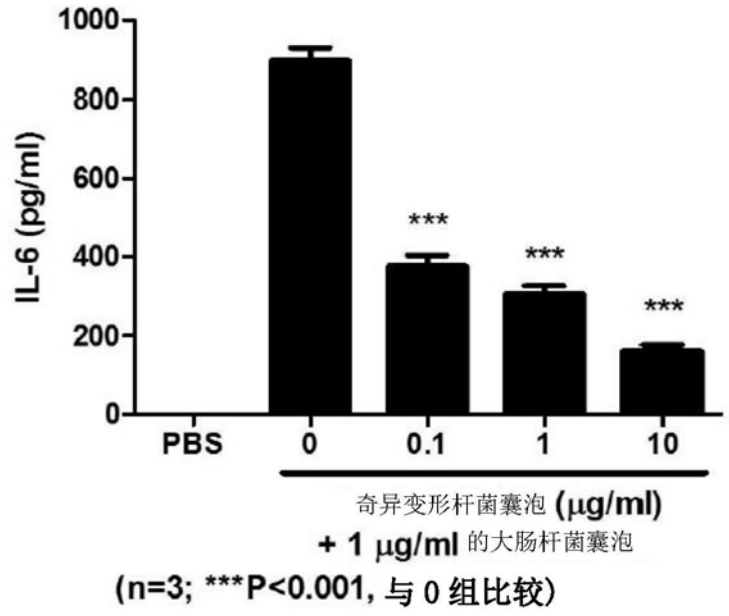

1000
800
600
400
200
0
IL-6 (pg/ml)
***
***
***
PBS
0
0.1
1
10
奇异变形杆菌囊泡 (μg/ml)
+ 1 μg/ml 的大肠杆菌囊泡
(n=3; ***P<0.001, 与 0 组比较)

图18A

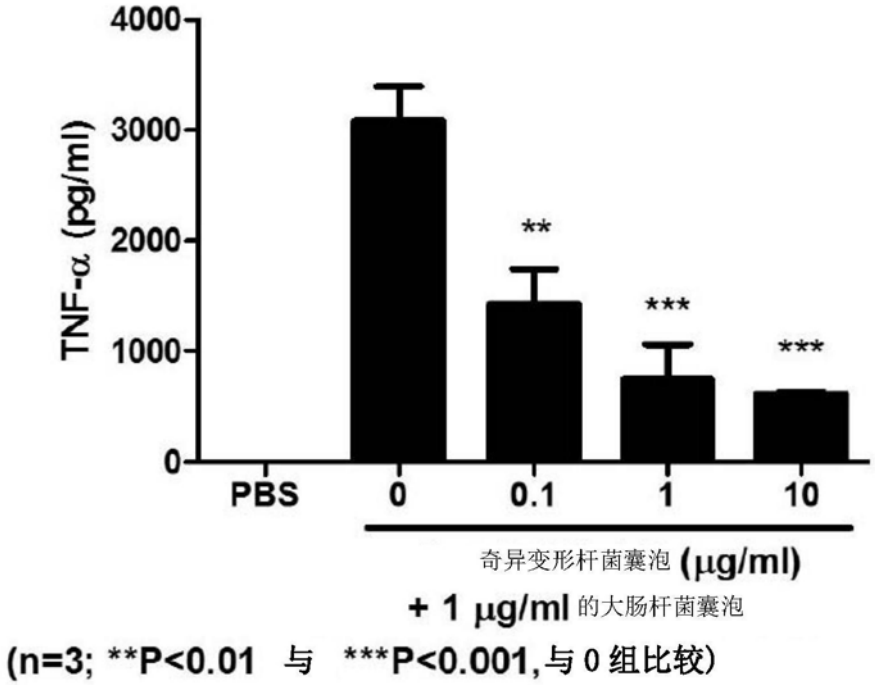

4000
3000
2000
1000
0
TNF-α (pg/ml)
**
***
***
PBS
0
0.1
1
10
奇异变形杆菌囊泡 (μg/ml)
+ 1 μg/ml 的大肠杆菌囊泡
(n=3; **P<0.01 与 ***P<0.001,与 0 组比较)

图18B

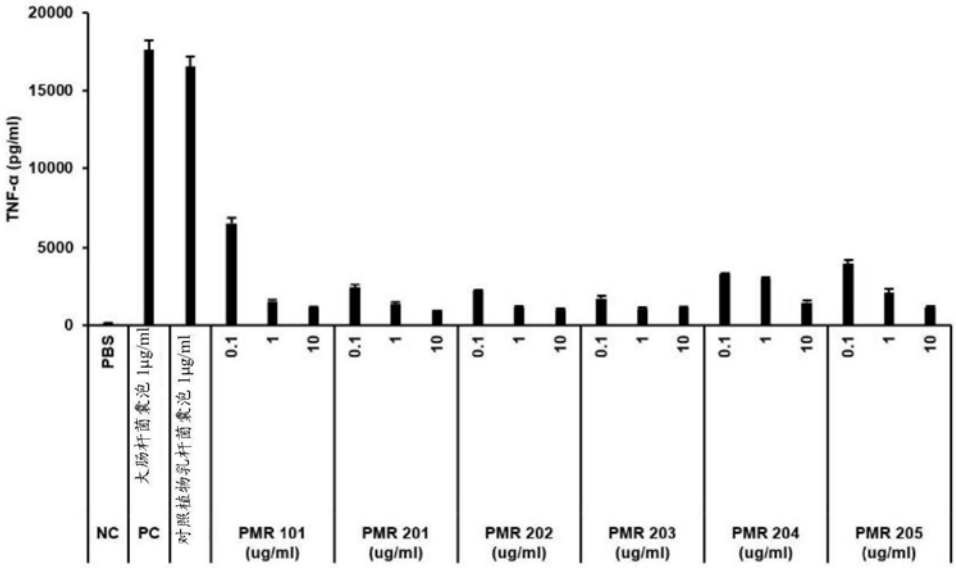
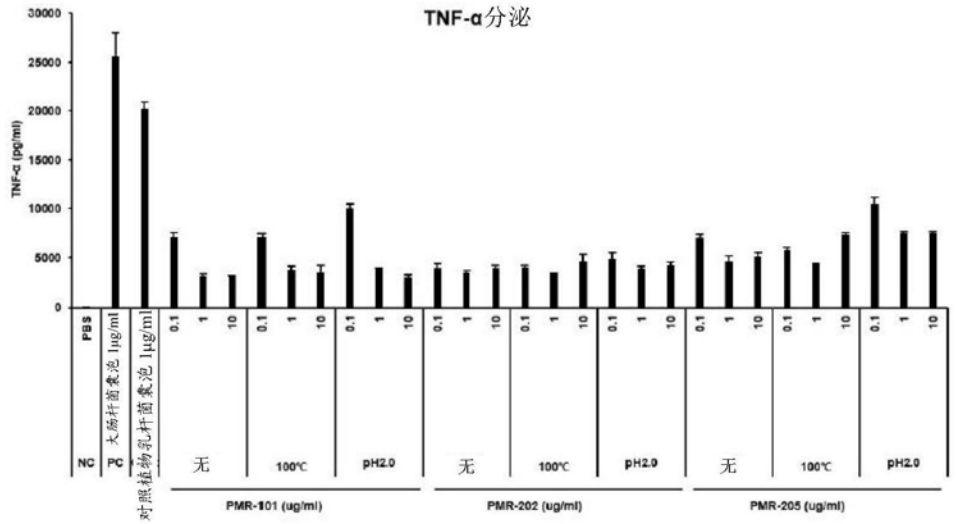


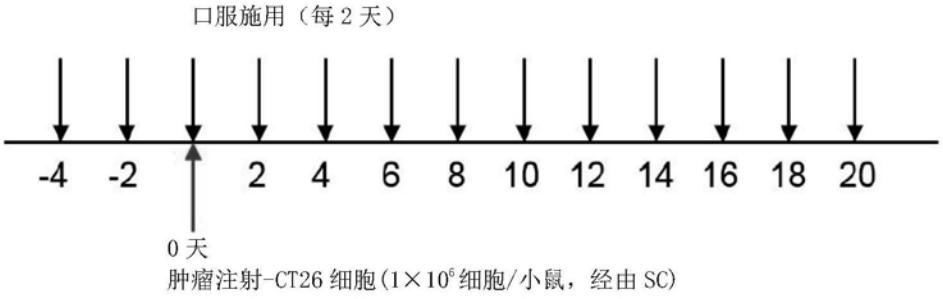
图19



囊泡暴露于 100℃或 PH2.0,随后进行预处理

PMR101: 奇异变形杆菌参考菌株的囊泡
PMR202: 分离的变形杆菌菌株(2)的囊泡
PMR205: 分离的变形杆菌菌株(5)的囊泡

图20



组	处理	剂量	数量
A	PBS		10
B	奇异变形杆菌囊泡	100 μg/天	10

图21A

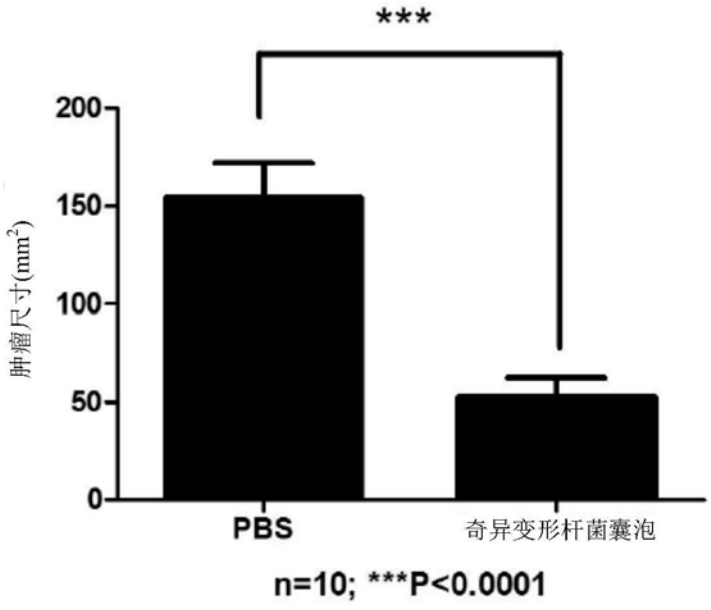


图21B