

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 955**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/00** (2006.01)

**C12P 1/04** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2010 PCT/KR2010/005721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11027990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2010 E 10813899 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2484752**

54 Título: **Vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**04.09.2009 KR 20090083621**  
**23.03.2010 WO PCT/KR2010/001787**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.04.2017**

73 Titular/es:

**YUNGJIN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)**  
**1057, Cheonho-daero, Gangdong-gu**  
**Seoul 134-721, KR**

72 Inventor/es:

**GHO, YONG SONG;**  
**KIM, YOON KEUN;**  
**LEE, EUN YOUNG;**  
**HONG, SUNG WOOK;**  
**KIM, JI HYUN y**  
**CHOI, SENG JIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 607 955 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas y uso de las mismas

**Campo de la técnica**

5 La presente invención se refiere a vesículas extracelulares (VE) derivadas de bacterias grampositivas y a los usos de las mismas en un modelo animal de enfermedad, a un procedimiento para detección selectiva de un candidato a fármaco, a una vacuna y a un procedimiento para diagnosticar un factor patogénico de una enfermedad.

**Técnica anterior**

10 Las bacterias grampositivas son aquellas que se tiñen de color violeta mediante la tinción de Gram y carecen de una membrana externa a diferencia de las bacterias gramnegativas. En la filogenia, las bacterias grampositivas pertenecen a los filos Firmicutes, Actinobacteria y Tenericutes. Tanto Firmicutes como Actinobacteria se caracterizan por la alta cantidad de peptidoglicano en sus paredes celulares. El primero, Firmicutes, son bacterias grampositivas con cantidad baja de G + C, mientras que el segundo, Actinobacteria, son bacterias grampositivas con un contenido alto en G + C. El filo Tenericutes carece de una pared celular.

15 La mayoría de los agentes patógenos en seres humanos se conocen como bacterias grampositivas. Representante entre ellos son Streptococcus y Staphylococcus, ambos cocos (bacterias con forma de esfera). Otros patógenos grampositivos son bacilos (bacterias con forma de varilla) y pueden subdividirse en base a su capacidad para formar esporas. Los que no forman esporas son Corynebacterium y Listeria, mientras que Bacillus y Clostridium producen esporas.

20 Recientemente, se ha prestado mayor atención a la correlación entre las vesículas extracelulares liberadas por las bacterias gramnegativas y las enfermedades causadas por bacterias gramnegativas [Kuehn, M. J., Kesty, N. C., Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. Genes Dev. 2005, 19, 2645-2655]. Se sabe que las vesículas extracelulares derivadas de bacterias gramnegativas salen por gemación de la membrana externa. Dado que las bacterias grampositivas carecen de la membrana externa, con la membrana plasmática encerrada por la pared celular, se conoce poco sobre la liberación de vesículas extracelulares de bacterias grampositivas, así como sobre la patogenicidad de las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

25 Eda, T. et al., Extracellular Membranous Structures in a Stable L-form of *Staphylococcus aureus*. J. General Microbiology 1977, 103, 189 to 191, informan sobre la existencia de estructuras de membrana tubulares extracelulares y vesículas en las preparaciones de la forma L estable de *Staphylococcus aureus* por medio de microscopía electrónica. Sin embargo, los autores no divulgan el aislamiento de vesículas extracelulares de *Staphylococcus aureus*.

30 Dorward, D. W. y Garon, C. F., DNA is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56, 1960 a 1962, analiza 18 especies de eubacterias gramnegativas y grampositivas para el ADN protegido de la nucleasa asociado a vesículas de membrana extracelulares. Las vesículas de bacterias sólo el Gramnegativas contenían lineales nucleasa protegido o ADN superenrollado o ambos. El documento revela que no hay vesículas en los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sanguis*.

35 Kuehn, M. J. and Kesty, N. C., Bacterial outer membrane vesicles and the host pathogen interaction. Genes Dev. 2005, 19, 2645 a 2655 hacen referencia a vesículas liberadas de la cubierta de las bacterias en crecimiento que sirven como vehículos de secreción para proteínas y lípidos de las bacterias gramnegativas. El documento se refiere a estafilococos con respecto al efecto de vesículas de *P. Gingivalis*.

40 El documento EP 1 602 360 A1 tiene por objeto la obtención de estructuras cocleares de vesículas que se encuentran en las membranas externas de los microorganismos, con el fin de emplearlas en la preparación de adyuvantes y vacunas. La invención también describe un procedimiento para la obtención de estructuras cocleares.

**Divulgación**

45 **Problema técnico**

Es un objeto de la presente invención proporcionar vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la preparación de vesículas extracelulares de bacterias grampositivas.

50 Es un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un modelo animal de enfermedad, construido mediante la administración de vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas a un animal de ensayo.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para la detección selectiva de un candidato a fármaco preventivo o terapéutico de una enfermedad, utilizando un modelo animal de enfermedad o un

sistema de detección selectiva *ex vivo*. Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar una vacuna para la profilaxis o terapia de una enfermedad causada por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas, que comprende vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

5 Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar una vacuna para la profilaxis o terapia de una infección producida por bacterias grampositivas usando vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

Es todavía un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para determinar un factor patogénico de las bacterias grampositivas, usando las vesículas extracelulares separadas.

10 Los objetos de la presente invención no están limitados a los mencionados anteriormente y los expertos en la técnica comprenderán claramente otros objetos, ventajas y características de la presente a partir de la descripción siguiente.

### **Solución de la técnica**

15 De acuerdo con un primer aspecto de la misma, la presente invención proporciona vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular, siendo las bacterias grampositivas *Staphylococcus*, en el que las vesículas extracelulares se aíslan de una secreción del cuerpo interno de un animal o un cultivo de dicha dichas bacterias grampositivas.

De acuerdo con la presente divulgación, las bacterias grampositivas incluyen bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, pero no están limitadas a las mismas.

El filo Firmicutes incluye, pero no se limita a, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Croynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Listeria*.

20 De acuerdo con la presente divulgación, las bacterias grampositivas incluyen bacterias pertenecientes al filo Mollicutes, pero no están limitadas a las mismas.

La clase Mollicutes incluye, pero no se limita a, *Mycoplasma*.

De acuerdo con la presente descripción, las bacterias grampositivas comprenden *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*.

25 En otra realización, las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas son las secretadas por las bacterias grampositivas que viven dentro de un animal. A continuación, las vesículas extracelulares se aíslan de una secreción del cuerpo interno de los animales. Las secreciones incluyen fluido del lavado de la piel, lágrimas, flemas, heces, sangre, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y ascitis.

30 De acuerdo con la presente divulgación, las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas incluyen secreciones de bacterias grampositivas que viven en el medio ambiente circundante. El entorno circundante incluye aire interior, aire exterior, la tierra y el mar.

De acuerdo con la presente descripción, las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas se pueden aislar de un cultivo de bacterias grampositivas, pero no se limita a ellos.

35 De acuerdo con la presente descripción, las vesículas extracelulares son aquellas que se forman de manera espontánea o se forman de manera artificial.

En relación con la presente invención se divulga un procedimiento para preparar vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

En una divulgación de este procedimiento, comprende la centrifugación de un cultivo de bacterias grampositivas para dar un sobrenadante y la filtración del sobrenadante.

40 En otra divulgación, el procedimiento comprende las siguientes etapas de: centrifugar un cultivo de bacterias grampositivas para dar un sobrenadante; filtrar el sobrenadante a través de un primer filtro, para dar un primer filtrado; filtrar el filtrado a través de un segundo filtro, para dar un segundo filtrado; y ultracentrifugar el segundo filtrado, para dar vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas como un sedimento.

45 En otra divulgación, el procedimiento puede comprender, además, la concentración del primer filtrado después de la filtración a través del primer filtro.

En otra divulgación, el procedimiento puede comprender, además, suspender el sedimento después de la suspensión.

50 También se contempla de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención un modelo animal de enfermedad establecido usando vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular.

En este contexto, las bacterias grampositivas y las vesículas extracelulares son como se ha descrito respectivamente anteriormente.

5 En otra realización, la enfermedad puede ser una enfermedad localizada, incluyendo, pero sin limitaciones, una enfermedad cutánea, tal como atopia, una enfermedad respiratoria, tal como rinitis, sinusitis, cáncer nasofaríngeo, bronquitis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasia, neumonía y cáncer de pulmón, una enfermedad digestiva, tal como estomatitis, cáncer de la cavidad oral, esofagitis, cáncer de esófago, gastritis, cáncer de estómago, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal, y una enfermedad genital, tal como vaginitis, cervicitis, y cáncer de cuello uterino.

10 En otra realización, la enfermedad puede ser una enfermedad sistémica, incluyendo, pero sin limitaciones, una enfermedad vascular, tal como sepsis, trombosis/embolia, arteriosclerosis, accidente cerebrovascular, síndrome coronario agudo y enfermedad vascular isquémica, una enfermedad metabólica, tal como diabetes y obesidad, una enfermedad pulmonar, tal como enfisema y síndrome de dificultad respiratoria aguda, una enfermedad ósea, tal como artritis y osteoporosis, y una enfermedad de los pares craneales, tal como demencia, enfermedades neurodegenerativas, y depresión.

15 En otra realización, el animal puede ser un ratón, pero no están limitados al mismo.

De acuerdo con aún un aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona un procedimiento para establecer un modelo animal de enfermedad, que comprende administrar a un animal vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular.

20 A este respecto, las bacterias grampositivas, las vesículas extracelulares y la enfermedad son como se ha descrito respectivamente anteriormente.

La administración incluye administración transdérmica, intranasal, intratraqueal, oral, subcutánea, intraperitoneal, intravascular y rectal.

25 De acuerdo con aún otro aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona un procedimiento para descubrir un biomarcador usando un modelo animal de enfermedad, establecido con las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular.

30 De acuerdo con aún un aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona un procedimiento para la detección selectiva de un candidato a fármaco preventivo o terapéutico de una enfermedad causada por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular, en el que el procedimiento comprende la administración de las vesículas extracelulares a las células junto con un fármaco candidato, y determinar el nivel del mediador relacionado con la inflamación o evaluar una vía de señalización relacionada con la inflamación.

A este respecto, las bacterias grampositivas, las vesículas extracelulares y la enfermedad son como se ha descrito respectivamente anteriormente.

35 De acuerdo con una realización de este aspecto, el procedimiento de detección selectiva comprende el tratamiento de células con las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas. Las células pueden incluir células inflamatorias, células epiteliales, células endoteliales vasculares, células fibroblastos, y células madre. Las células inflamatorias incluyen monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células diferenciadas a partir de los monocitos en los tejidos. Las células madre pueden derivar de, pero sin limitaciones, médula ósea o tejido adiposo.

40 De acuerdo con aún otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona una vacuna para la profilaxis o terapia de la infección producida por bacterias grampositivas, que comprende vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular, en el que hay bacterias grampositivas en la vacuna y en el que las vesículas extracelulares se aísla y secreción del cuerpo interno de un animal o un cultivo de dichas bacterias grampositivas.

En este contexto, las bacterias grampositivas y las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas son como se ha descrito respectivamente anteriormente.

45 De acuerdo con una realización de este aspecto, la infección producida por bacterias grampositivas puede incluir, pero no se limita a, infección de la piel, infección respiratoria, infección urogenital, infección ósea, infección del sistema nervioso central y sepsis.

50 De acuerdo con otra realización de este aspecto, la vacuna puede modificarse para mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios. La modificación se puede conseguir mediante el uso de bacterias transformadas o mediante el tratamiento de las bacterias con un compuesto. Este compuesto puede incluir un fármaco.

En otra realización, las vesículas extracelulares pueden modificarse mediante tratamiento con un compuesto con el fin de mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios, incluyendo dicho compuesto un fármaco.

- En una realización adicional, la vacuna se puede usar en combinación con un fármaco o un inmunoestimulante para mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios, pero la presente invención no está limitada por esto.
- De acuerdo con otra realización, la vacuna puede modificarse para mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios. La modificación se puede conseguir mediante el uso de bacterias transformadas o mediante el tratamiento de las bacterias con un compuesto. Este compuesto puede incluir un fármaco.
- 5 En otra realización, las vesículas extracelulares pueden modificarse mediante tratamiento con un compuesto con el fin de mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios, incluyendo dicho compuesto un fármaco.
- En una realización adicional, la vacuna se puede usar en combinación con un fármaco o un inmunoestimulante para mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios, pero la presente invención no está limitada por esto.
- 10 Se da a conocer de acuerdo con la presente invención un procedimiento para prevenir o tratar una enfermedad que comprende la administración a un mamífero vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas a una dosis subletal.
- En este contexto, las bacterias grampositivas y las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas son como se ha descrito anteriormente.
- 15 De acuerdo con una realización, la enfermedad incluye una enfermedad que está causada o agravada por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.
- En otra realización, la enfermedad puede ser una enfermedad localizada, incluyendo, pero sin limitaciones, una enfermedad cutánea, tal como atopia, una enfermedad respiratoria, tal como rinitis, sinusitis, cáncer nasofaríngeo, bronquitis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasia, neumonía y cáncer de pulmón, una enfermedad digestiva, tal como estomatitis, cáncer de la cavidad oral, esofagitis, cáncer de esófago, gastritis, cáncer de estómago, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal, y una enfermedad genital, tal como vaginitis, cervicitis, y cáncer de cuello uterino.
- 20 En otra realización, la enfermedad causada o agravada por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas puede ser una enfermedad sistémica, incluyendo, pero sin limitaciones, una enfermedad vascular, tal como sepsis, trombosis/embolia, arteriosclerosis, accidente cerebrovascular, síndrome coronario agudo y enfermedad vascular isquémica, una enfermedad metabólica, tal como diabetes y obesidad, una enfermedad pulmonar, tal como enfisema y síndrome de dificultad respiratoria aguda, una enfermedad ósea, tal como artritis y osteoporosis, y una enfermedad de los pares craneales, tal como demencia, enfermedades neurodegenerativas y depresión.
- 25 De acuerdo con una realización adicional, la enfermedad incluye infecciones producidas por bacterias grampositivas.
- Las infecciones producidas por bacterias grampositivas de la presente invención pueden incluir infecciones de la piel, infecciones respiratorias, infecciones urogenitales, infecciones óseas, infecciones del sistema nervioso central y sepsis, pero no se limita a las mismas.
- 30 En otra realización, la administración incluye la inyección subcutánea, aplicación dérmica, inyección intravenosa, administración intranasal, administración sublingual, inhalación intratraqueal, administración oral y administración intrarrectal.
- 35 En otra realización, las vesículas extracelulares pueden modificarse para mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios. La modificación se puede conseguir mediante el uso de bacterias transformadas o mediante el tratamiento de las bacterias o vesículas extracelulares con un compuesto. Este compuesto puede incluir un fármaco.
- 40 En una realización adicional, las vesículas extracelulares pueden usarse en combinación con un fármaco o un inmunoestimulante para mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios, pero la presente invención no está limitada por esto.
- Asimismo, se contempla de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención un procedimiento para diagnosticar un factor causal de una enfermedad mediante la aplicación de vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular.
- 45 En este contexto, las bacterias grampositivas y las vesículas extracelulares son como se ha descrito anteriormente, respectivamente.
- En una realización de este aspecto, la enfermedad incluye una enfermedad que está causada o agravada por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas. La enfermedad causada o agravada por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas es tal como se ha mencionado anteriormente.
- 50 De acuerdo con otra realización adicional, la enfermedad incluye infecciones producidas por bacterias grampositivas. Las infecciones producidas por bacterias grampositivas de la presente invención pueden incluir infecciones de la

piel, infecciones respiratorias, infecciones urogenitales, infecciones óseas, infecciones del sistema nervioso central y sepsis, pero no se limita a las mismas.

5 De acuerdo con otra realización, la aplicación puede comprender el análisis de las secuencias de bases de un material genético contenido en las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas. El material genético puede ser ARNr de 16S, pero no se limita al mismo.

10 De acuerdo con otra realización, la aplicación puede incluir la determinación del nivel de proteínas en las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas o la determinación de una respuesta inmunitaria a las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas, pero no se limita a ello. La determinación de una respuesta inmunitaria puede incluir la determinación cuantitativa de anticuerpos frente a las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas, pero no se limita a la misma.

En otra realización, el diagnóstico se puede determinar con una muestra seleccionada del grupo que consiste en, pero no limitado a, sangre, flemas, lágrimas, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido pleural, y ascitis.

### **Efectos ventajosos**

15 Basándose en el hallazgo de que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, una bacteria grampositiva que coloniza el tracto digestivo o vive en los ambientes circundantes, causan enfermedades locales caracterizadas por inflamación dérmica y mucosa, así como enfermedad sistémica, tal como sepsis, que se caracteriza por respuestas inflamatorias sistémicas tras la introducción en la sangre, y trombosis/embolia inducida por coagulación intravascular, la presente invención utiliza vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas en el establecimiento de un modelo de enfermedad, un procedimiento para la detección selectiva de fármacos candidatos preventivos o terapéuticos de enfermedades, una vacuna para la profilaxis o terapia de enfermedades y un procedimiento para el diagnóstico de un factor patogénico de una enfermedad.

25 En la presente invención, se encontró que, cuando las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas se aplicaron a las células, indujeron la secreción de un factor inflamatorio de las células y, cuando se administran por vía tópica, causadas por inflamación dérmica o mucosa, y enfermedades sistémicas, incluyendo sepsis, trombosis/embolia inducida por coagulación sanguínea intravascular cuando se inyectan por vía intraperitoneal. Por tanto, la presente invención se puede utilizar para construir un modelo animal de enfermedad y un procedimiento para la detección selectiva eficaz de candidatos a fármacos. Además, el modelo de enfermedad o el procedimiento de detección selectiva utilizando vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas permite la excavación eficaz de fármacos preventivos o terapéuticos de enfermedades causadas por las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas. Adicionalmente, las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas o sus modificaciones se pueden aplicar al desarrollo de una vacuna preventiva o terapéutica de infecciones producidas por bacterias grampositivas o una enfermedad causada por las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas, ya que pueden inducir respuestas inmunitarias controladas cuando se administran. Por otra parte, las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas también se utilizan para desarrollar una tecnología utilizada para diagnosticar un factor patogénico de las infecciones producidas por bacterias grampositivas o las enfermedades causadas por las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

### **Descripción de los dibujos**

40 La figura 1 son imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestra *Staphylococcus aureus* de gemación de vesículas extracelulares.

La figura 2 son imágenes de microscopía electrónica de barrido que muestra *Staphylococcus aureus* de gemación de vesículas extracelulares.

45 La figura 3 es una imagen de microscopio electrónico de transmisión (a) y una imagen de microscopio electrónico de barrido (b) que muestra vesículas extracelulares aisladas de *Staphylococcus aureus*.

La figura 4 es un gráfico que muestra una distribución de tamaño de las vesículas extracelulares aisladas de *Staphylococcus aureus*.

50 La figura 5 es una fotografía que muestra los resultados de SDS-PAGE de proteínas de *Staphylococcus* la célula entera (WC), la pared celular (CW), la membrana plasmática (MP), el citoplasma (CY) y las vesículas extracelulares (EV), teñidas con azul de Coomassie.

La figura 6 son imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestra *Staphylococcus epidermis* de gemación de vesículas extracelulares.

La figura 7 son imágenes de microscopía electrónica de barrido que muestra *Staphylococcus epidermis* de gemación de vesículas extracelulares.

- La figura 8 es una imagen de microscopio electrónico de transmisión (a) y una imagen de microscopio electrónico de barrido (b) que muestra vesículas extracelulares aisladas de *Staphylococcus epidermis*.
- La figura 9 es un gráfico que muestra una distribución de tamaño de las vesículas extracelulares aisladas de *Staphylococcus epidermis*.
- 5 La figura 10 son imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestra *Bacillus subtilis* de gemación de vesículas extracelulares.
- La figura 11 son imágenes de microscopía electrónica de barrido que muestra *Bacillus subtilis* de gemación de vesículas extracelulares.
- 10 La figura 12 es una imagen de microscopio electrónico de transmisión (a) y una imagen de microscopio electrónico de barrido (b) que muestra vesículas extracelulares aisladas de *Bacillus subtilis*.
- La figura 13 es un gráfico que muestra una distribución de tamaño de las vesículas extracelulares aisladas de *Bacillus subtilis*.
- La figura 14 es un diagrama de Venn que muestra la identificación de 90 proteínas de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* por análisis proteómico, en el que 41 y 84 proteínas se detectan a través digestión con tripsina en gel y digestión con tripsina en solución, respectivamente, con 35 proteínas solapantes entre las dos digestiones con tripsina.
- 15 La figura 15 corresponde a gráficos que muestran que los niveles de expresión de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$  y IL-6 aumentan con un incremento de la concentración de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* aplicadas a macrófagos de ratón.
- 20 La figura 16 corresponde a gráficos que muestran los niveles de expresión de diversos mediadores inflamatorios en las células fibroblastos de ratón tratados con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- La figura 17 es un diagrama que muestra un protocolo experimental para causar un síntoma similar a la dermatitis atópica en el que se aplican vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* tres veces a la semana durante 4 semanas a una piel de ratón y se evalúan diversos índices 48 horas después de la última aplicación.
- 25 La figura 18 muestra síntomas similares a la dermatitis atópica que incluyen engrosamiento de la epidermis (círculos rojos) e infiltración de neutrófilos (cabezas de flecha) después de aplicar vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* a una piel de ratón de acuerdo con el protocolo de la figura 17.
- La figura 19 corresponde a gráficos que muestran evaluaciones numéricas de los síntomas observados en la figura 18, en las que el espesor de la epidermis y los recuentos de la infiltración de los mastocitos y los neutrófilos se incrementan mediante vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- 30 La figura 20 corresponde a gráficos que muestran los niveles de citocinas inflamatorias en la piel de ratón tratada con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con la figura 17, en los que los niveles de citocinas inflamatorias aumentan con un aumento de la concentración de las vesículas.
- La figura 21 es un gráfico que muestra la presencia de antígenos característicos de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en un líquido de lavado de la piel de pacientes con dermatitis atópica, medida mediante ELISA.
- 35 La figura 22 es un gráfico que muestra que el nivel de anticuerpos de tipo IgE específicos de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* estaba significativamente elevado en el suero de los pacientes con dermatitis atópica sobre el de los controles sanos.
- 40 La figura 23 es un diagrama que muestra un protocolo para la evaluación de la inmunidad innata inducida tras la administración intranasal de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- La figura 24 corresponde a gráficos que muestran que los niveles de las células inflamatorias y la citocina IL-6 estaban significativamente elevados en el fluido de lavado broncoalveolar de los ratones que han inhalado vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con el protocolo de la figura 13 sobre los de los controles.
- 45 La figura 25 es un diagrama que muestra un protocolo para la evaluación de la inmunidad adaptativa inducida tras la aplicación intranasal de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- La figura 26 corresponde a gráficos que muestran la inducción de inmunidad mediada por Th17 en el moco traqueal, en los que los niveles de las células inflamatorias y la citocina IL-7 estaban elevados en el fluido de lavado broncoalveolar de los ratones que han inhalado vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con el protocolo de la figura 25 sobre los de los controles.
- 50

- La figura 27 es un diagrama que muestra un protocolo experimental para confirmar la dosis letal de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en ratones.
- La figura 28 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia de los ratones tratados con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- 5 La figura 29 es un gráfico que muestra la inducción de hipotermia, un índice para la inflamación sistémica, por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- La figura 30 es un diagrama que muestra un protocolo para el establecimiento de un modelo animal de coagulación intravascular diseminada con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- 10 La figura 31 corresponde a fotografías que muestran tejidos pulmonares teñidos con H & E extirpados después de la aplicación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con el protocolo de la figura 30.
- La figura 32 es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos del dímero-D medidos después de la aplicación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con el protocolo de la figura 30.
- 15 La figura 33 muestra los niveles plasmáticos de plaquetas medidos después de la aplicación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con el protocolo de la figura 30.
- La figura 34 es un diagrama esquemático que muestra el descubrimiento de fármacos candidatos utilizando vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- La figura 35 es un gráfico que muestra los niveles de IL-6 de los cultivos de macrófagos de ratón como porcentajes de los del control positivo cuando los macrófagos de ratón fueron tratados con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y profármacos.
- 20 La figura 36 es un gráfico que muestra los niveles de IL-6 en los líquidos de lavado broncoalveolar obtenidos después de inyectar por vía intraperitoneal los profármacos Doxepina y haloperidol en ratones inmunizados con las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* por inyección intranasal.
- 25 La figura corresponde a imágenes del microscopio de fluorescencia que muestra la absorción de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* por las células dendríticas de ratón.
- La figura 38 es un gráfico que muestra que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* indujeron la secreción de la citocina IL-12p40 a partir de células dendríticas de ratón de una manera dependiente de la dosis.
- 30 La figura 39 corresponde a gráficos que muestran que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* indujeron la expresión de CD40 y MHCII en la superficie de las células dendríticas de ratón de una manera dependiente de la dosis.
- La figura 40 es un diagrama que muestra un protocolo para medir el nivel de los anticuerpos inducidos por las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.
- 35 La figura 41 es un gráfico que muestra aumento de los niveles de anticuerpos IgG específicos de las vesículas extracelulares en los sueros de ratón obtenidos de acuerdo con el protocolo de la figura 40.
- La figura 42 es un diagrama que muestra un protocolo para la medición de los índices inmunológicos inducidos en los ratones inmunizados con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* como una vacuna.
- La figura 43 corresponde a gráficos que muestran niveles elevados de IFN- $\gamma$  IL-17 en los esplenocitos de ratón obtenidos después de llevar a cabo la inmunización según el protocolo de la figura 42.
- 40 La figura 44 es un diagrama que muestra un protocolo para la aplicación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* una vez a la semana durante cuatro semanas a través de un parche en la piel del ratón a la que se ha aplicado y retirado cinta adhesiva.
- La figura 45 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgG en suero después de la administración por vía transdérmica de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con el protocolo de la figura 42, en el que la administración transdérmica de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* indujo en gran medida la producción de anticuerpos IgG específicos de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, en comparación con el control.
- 45 La figura 46 corresponde a fotografías que muestran que los niveles de las citocinas de Th1 y Th17 en los esplenocitos aumentaron en respuesta a la estimulación de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* después de tratar a ratones con las vesículas de acuerdo con el protocolo de la figura 42.
- 50

La figura 47 es un diagrama que muestra un protocolo para la evaluación de los índices inmunológicos en los ratones estimulados con *Staphylococcus* después de la inmunización con una combinación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y polyI: C.

5 La figura 48 es un gráfico que muestra niveles incrementados de anticuerpos IgG específicos de las vesículas extracelulares en los sueros de ratón obtenidos de acuerdo con el protocolo de la figura 47.

La figura 49 es un gráfico que muestra niveles incrementados de IFN- $\gamma$  and IL-17 de las vesículas extracelulares en esplenocitos de ratón obtenidos de acuerdo con el protocolo de la figura 47.

La figura 50 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia de los ratones a los que se han administrado por vía intranasal dos dosis diferentes de *Staphylococcus aureus*.

10 La figura 51 es un gráfico que muestra una tasa de supervivencia elevada de los ratones en los que se generó neumonía por *Staphylococcus* después de que inmunizarlos con una combinación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y polyI: C.

La figura 52 es un gráfico que muestra niveles elevados de anticuerpos IgG específicos de las vesículas en sueros obtenidos después de administrar a los ratones vesículas extracelulares derivadas de *Enterococcus faecalis*.

15 La figura 53 es un gráfico que muestra niveles elevados de IFN- $\gamma$  en los esplenocitos obtenidos después de administrar a los ratones vesículas extracelulares derivadas de *Enterococcus faecalis*.

La figura 54 es una fotografía que muestra la presencia de ARNr 16S y ADN dentro de las vesículas extracelulares tal como se analizó mediante RT-PCR y PCR, respectivamente.

### **Mejor modo**

20 Tal como se utiliza en el presente documento, con el término "bacterias grampositivas" se pretende abarcar aquellas que pertenecen al filo Firmicutes y al filo Actinobacteria, ambos caracterizados por la falta de la membrana externa y la presencia de una pared celular gruesa, y la clase Mollicutes, que carece de paredes celulares y no se puede teñir con la tinción de Gram, pero parecen haber derivado evolutivamente del filo Firmicutes. Entre las bacterias grampositivas con la pared celular se encuentran *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*,  
25 *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Actinobacteria*, y *Listeria*. El micoplasma es representativo de bacterias grampositivas desprovistas de pared celular.

Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término "cuerpo interno" abarque las superficies de la piel y los lúmenes y revestimientos de estructuras tubulares internas en los animales. Por el término "estructuras tubulares internas" se quiere decir las relacionadas con los tractos, incluyendo el tracto digestivo, el tracto respiratorio y el tracto urogenital. Por ejemplo, "tracto digestivo" incluye la cavidad oral, el esófago, el estómago, el  
30 intestino delgado, el intestino grueso, el recto, el ano, el conducto biliar, el conducto cístico y el conducto pancreático. El "tracto respiratorio" incluye la conjuntiva, la cavidad nasal, los senos paranasales, la nasofaringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los alvéolos. El "tracto urogenital" incluye el riñón, el uréter, la vejiga, la uretra, la vagina, el cuello uterino y el útero. No obstante, la presente invención no está limitada por estos ejemplos.

35 Por el término "ambiente circundante" se quiere decir todos los entornos, a excepción del cuerpo interno, incluyendo, pero sin limitaciones, el aire interior, el aire exterior, el suelo y el mar.

La expresión "vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas", tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a las que se forman de manera espontánea o se secretan de forma artificial por las bacterias grampositivas que viven en el cuerpo interno. Típicamente, las vesículas tienen un tamaño más pequeño que sus células de origen, pero esto no limita el alcance de la presente invención de ninguna manera.  
40

Bacterias grampositivas hacen referencia a las bacterias que se tiñen de color violeta mediante tinción de Gram y carecen de membrana externa y contienen cantidades altas de peptidoglicano en sus paredes celulares en oposición a las bacterias gramnegativas.

45 Filogenéticamente, las bacterias grampositivas se clasifican en el filo Firmicutes, caracterizado por una pared celular gruesa y un contenido bajo de G + C, que puede tener forma de esfera (cocos), tal como en *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, o forma de bastón (bacilos), tal como en *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Listeria*.

La clase Mollicutes, aunque carecen de pared celular, parecen haber derivado evolutivamente desde el filo Firmicutes y, por lo tanto, se clasifican como bacterias grampositivas. Es típico *Mycoplasma*.

50 La mayoría de los agentes patógenos en seres humanos son bacterias grampositivas. Entre ellas son representativas *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Bacillus* y *Clostridium*.

En la década de 1960, la microscopia electrónica reveló que las células gramnegativas liberan vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares liberadas de las bacterias gramnegativas son esféricas con un tamaño de 20-200 nm y consisten en bicapas de fosfolípidos. Las vesículas extracelulares de bacterias gramnegativas tienen varias proteínas de membrana externa, así como LPS. Recientemente, los presentes inventores informaron por primera vez que las vesículas extracelulares derivadas de la flora intestinal, cuando se absorben por vía sistémica en el cuerpo, causan enfermedades sistémicas, tales como sepsis, coagulación de la sangre, enfisema, etc.

El conocimiento perjudicial de que las vesículas extracelulares se liberan en su mayoría de la membrana externa como en las bacterias gramnegativas ha bloqueado el descubrimiento de las vesículas extracelulares liberadas de las bacterias grampositivas, porque las bacterias grampositivas carecen de membrana externa y están rodeadas por una pared celular gruesa.

En la presente invención, se informó por primera vez que las bacterias cocos grampositivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* liberan vesículas extracelulares que se descubre que son esféricas en un microscopio electrónico y que varían de tamaño de 10 a 100 nm, medido por un procedimiento de dispersión dinámica de la luz.

Asimismo, los presentes inventores informaron por primera vez las vesículas extracelulares derivadas de las bacterias grampositivas con forma de bastón *Bacillus subtilis* que se ha observado que son esféricas en un microscopio electrónico, con un tamaño de 10~100 nm medido por un procedimiento de dispersión dinámica de la luz.

En la presente invención, se realizó un análisis proteómico en vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* mediante digestión con tripsina en gel y digestión con tripsina en solución, que dio como resultado la identificación de 41 y 84 proteínas, respectivamente. De ellas, 35 proteínas se solapaban entre las dos digestiones con tripsina, de manera que se detectó un total de 90 proteínas de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.

Se identificaron diversas proteínas asociadas con enfermedades a partir de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. En las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* existen los superantígenos enterotoxina Q de staphylococcus y antígenos secretores de staphylococcus (ssaA1 ssaA2) que actúan como proteínas virulentas responsables de la aparición de la sepsis o de síndrome de shock tóxico. Las vesículas también contienen toxinas, tales como alfa-hemolisina y gamma-hemolisina, que destruyen los eritrocitos y degradan la hemoglobina. Las proteasas estafopaina A y ECM extracelular y la proteína de unión plasmática, que están directamente involucradas en la invasión y la penetración de las bacterias en los tejidos del huésped, también se encontraron en las vesículas. Asimismo, se identificaron proteínas relacionadas con la coagulación de la sangre, tales como estafilocagulasa y proteínas de unión al factor de von Willebrand. Estas proteínas están implicadas en la aparición de sepsis y síndrome de choque tóxico, que se caracteriza por coagulación intravascular de la sangre, así como enfermedades vasculares, incluyendo síndrome coronario agudo y accidente cerebrovascular, causados por la formación de trombos dentro de una arteria coronaria, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar. En las vesículas extracelulares también se encuentran la proteína de unión a IgG de *S. aureus* (SBI) que puede dotar a las bacterias de la función de evasión inmunitaria mediante la inhibición de la fagocitosis de las células inmunitarias del huésped que están implicadas en la aparición de dermatitis atópica mediante la inducción de la expresión de SIL-18 en células de la epidermis y el aumento de los niveles de IgE en suero.

Sobre la base de la presencia de proteínas responsables de diversas enfermedades en vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* como se identifica mediante análisis de proteómica, se administraron vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus ex vivo* a macrófagos de ratón para examinar la secreción de citocinas inflamatorias. Las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* indujeron la secreción de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e interleucina-6 (IL-6) de una manera dependiente de la dosis.

La capacidad de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* para inducir la secreción de mediadores de la inflamación también se examinó en células fibroblastos de ratón. Las células fibroblastos tratadas con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* secretaron linfopoyetina estromal tímica (TSLP), eotaxina y proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  así como TNF (factor de necrosis tumoral)- $\alpha$  e IL-6.

*Staphylococcus aureus* vive en la piel y casi el 100 %, particularmente en la piel de pacientes con dermatitis atópica. Se realizó una prueba cutánea para examinar si las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* causan inflamación local, tal como dermatitis atópica. Se observó una inflamación, tal como en pacientes con dermatitis atópica cuando se aplicaron vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* tres veces a la semana durante 4 semanas para hacer observaciones tras la aplicación y retirada de cintas adhesivas. Además, se descubrió que las vesículas extracelulares aisladas del líquido de lavado de la piel de los pacientes con dermatitis atópica se originaban de *Staphylococcus aureus*, tal como se mide mediante un anticuerpo específico de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. Además, los sueros de los pacientes con dermatitis atópica contenían un nivel significativamente más alto de anticuerpos IgE específicos de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* que los de las personas normales. A partir de estos resultados, es evidente que

las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* actúan como factor importante en la generación o la exacerbación de la dermatitis atópica.

*Staphylococcus aureus* se transmite a través del aire e infecta la mucosa del tracto respiratorio superior. En la presente invención, se realizó un examen para ver si las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* inducían inflamación local en la mucosa del tracto respiratorio. Cuando las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* se administraron por vía intranasal una vez, la población de células inflamatorias en fluido de lavado broncoalveolar aumentó con un aumento de la concentración de las vesículas. El nivel de IL-6, que desempeña un papel importante en la diferenciación de Th17 (T colaborador de tipo 17), se incrementó también. Cuando las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* se administraron por vía intranasal dos veces a la semana durante tres semanas, el recuento total de células inflamatorias y, en particular, el recuento de neutrófilos se incrementaron en el fluido de lavado broncoalveolar, con una producción alta concomitante de IL-17 de Th17. Estos resultados indican que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* actúan como un factor patogénico de la inflamación neutrofílica mediada por IL-17 en la mucosa.

La sepsis se caracteriza por inflamación sistémica y la presencia de una sustancia patógena en sangre después de una infección bacteriana local. En la presente invención, se examinó la inducción de sepsis mediante inyección intravenosa de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. Aproximadamente el 40 % de los ratones a los que se ha inyectado por vía intravenosa una dosis alta de vesículas extracelulares estaban muertos. Asimismo se observó hipotermia, un criterio de sepsis, después de la inyección de las vesículas extracelulares, lo que demuestra que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* pueden causar sepsis cuando se introducen en los vasos sanguíneos.

Según se identificó anteriormente en el análisis proteómico, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* contienen proteínas relacionadas con la coagulación de la sangre. En la presente invención, se realizó un examen para ver si las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* causan coagulación de la sangre y, por lo tanto, forman trombos. Cuando se administran por vía intravenosa, subcutánea o intranasal, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* elevaron el nivel de dímero D, un índice para la coagulación intravascular, en suero y redujeron el recuento de plaquetas, otro índice, en la sangre periférica. Además, se observaron trombos en los vasos sanguíneos pulmonares tras la administración intravenosa, subcutánea o intranasal de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. Por tanto, estos resultados sugieren que cuando se introducen en los vasos sanguíneos, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* pueden inducir trombosis o embolia a través de coagulación intravascular.

Es muy importante aclarar los factores causales exactos de una enfermedad para desarrollar fármacos para la prevención o el tratamiento de la misma. Por ejemplo, se puede realizar una detección selectiva de los fármacos candidatos para determinar la eficacia farmacéutica, ya sea en el curso del tratamiento *ex vivo* de las células con el factor causal o cuando se administran al modelo animal. La presente invención incluye el desarrollo de un procedimiento para la detección selectiva de fármacos candidatos utilizando vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y utilizando el procedimiento o fármacos útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades causadas por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas. Por ejemplo, de 102 profármacos diferentes, la eficacia farmacéutica de 19 fármacos candidatos se seleccionó y se evaluó en el modelo animal de enfermedad. Es decir, el procedimiento de detección selectiva de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para descubrir fármacos preventivos o terapéuticos de las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

Además, los adyuvantes inmunológicos, incluyendo el ácido lipoteicoico (LTA) y peptidoglicanos, así como diversas proteínas, incluyendo las proteínas toxinas (enterotoxina estafilocócica Q, K) se encuentran en vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. Durante el curso del desarrollo de la presente invención, se analizaron los marcadores inmunológicos en los ratones con el fin de evaluar la utilidad del uso de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* como vacuna para la profilaxis y terapia de infecciones bacterianas. La presente invención también proporciona un procedimiento para mejorar la eficacia de las vesículas extracelulares o aliviar los efectos secundarios de las vesículas extracelulares. Cuando las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* se inyectaron por vía subcutánea, junto con el ácido sintético ARNdc poliinosínico-policitidílico (polyI: C), a ratones, los niveles de IgG en sangre se elevaron junto con las citocinas de esplenocitos IFN (interferón)- $\gamma$  e IL-17. Por lo tanto, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, cuando se inyectan por vía subcutánea, pueden inducir eficazmente respuestas inmunitarias de Th1 (células T colaboradoras de tipo  $\gamma$ ) y Th17, así como reacciones de anticuerpos.

Se evaluaron las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* para determinar la eficacia farmacéutica como vacuna contra la neumonía causada por *Staphylococcus aureus*. Cuando se indujo neumonía en ratones, ninguno de los ratones expuestos a la vacuna de vesículas murió, mientras que aproximadamente el 60 % de los ratones no inmunizados murió de neumonía. Este resultado implica que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* pueden ser útiles como vacuna que previene las infecciones bacterianas.

Como se ha descrito anteriormente, se pueden generar diversas enfermedades mediante vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus*, lo que indica que las vesículas extracelulares sirven como agente patógeno importante para las enfermedades cuyas causas han permanecido poco claras. Para proporcionar un procedimiento para el diagnóstico de un agente patógeno, se examinaron las vesículas extracelulares bacterianas para ver si contienen un material genético. Como resultado, se detectaron ARNr de 16S y ADN medido por PCR. Basándose en esta observación, el examen de los materiales genéticos en una muestra tal como sangre, que se pueden obtener con facilidad, permite identificar fácilmente el agente patógeno de una enfermedad, lo que permite que la enfermedad que se va a diagnosticar.

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención mediante los ejemplos siguientes que se exponen para ilustrar pero que no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

#### EJEMPLO 1: Observación en microscopio electrónico de *Staphylococcus aureus*

Se cultivó *Staphylococcus aureus* (ATCC14458) a una D.O. a 600 nm de 1 en caldo nutriente. Después de la centrifugación del caldo a 10.000 x g durante 20 minutos, el sedimento de *Staphylococcus aureus* se fijó durante 2 horas en 2,5 % de glutaraldehído y se fijó después durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio. A la deshidratación con una serie de solución de etanol graduada le siguió inclusión en resina epoxi. El bloque resultante se seccionó en láminas ultrafinas de 70 nm de espesor. Las secciones de células se adsorbieron durante 3 minutos en una rejilla de cobre recubierta de carbono con descarga luminiscente y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo. Se realizaron observaciones con microscopio electrónico de transmisión (TEM) (JEM101, Jeol, Japón) de la célula. Como se puede ver en las imágenes de TEM de la figura 1, se observaron vesículas extracelulares con un tamaño de 20 a 100 nm en gemación desde *Staphylococcus aureus*.

Del mismo modo, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM). En este sentido, se centrifugó el mismo cultivo de *Staphylococcus aureus* como se ha mencionado anteriormente, después de lo cual el sedimento de células se fijó durante 1 hora en 2,5 % de glutaraldehído, después de la fijación durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio y se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol graduado antes de un procedimiento de secado en el punto crítico utilizando un sistema de CO<sub>2</sub> (secador en el punto crítico HCP-2, HITACH, Japón). La muestra bacteriana se montó sobre una punta y se recubrió con platino (Pt) para la observación en un microscopio electrónico de barrido JSM-7401F (Jeol, Japón).

Como se puede ver en las imágenes SEM de la figura 2, *Staphylococcus aureus* liberaron vesículas extracelulares.

#### Ejemplo 2: Preparación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*

##### [Aislamiento de vesículas extracelulares generales]

Se inoculó *Staphylococcus aureus* en 3 ml de caldo nutriente en un tubo de ensayo y se cultivó a 37 °C durante 6 horas. Del cultivo, se transfirieron 5 µl a 500 ml de caldo nutritivo en un matraz Erlenmeyer de 2 l y se incubaron a 37 °C durante 4 horas a una D.O. (600 nm) de 1,0. Todo el cultivo se asignó igualmente a tubos de ultracentrífuga de 500 ml y se centrifugó a 4 °C y 10.000 x g durante 20 minutos. Se dejó pasar el sobrenadante una vez a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm y el filtrado se concentró 25 veces utilizando el sistema Quixstand con 100 kDa de corte. Después de un pase del concentrado a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm, el filtrado resultante se ultracentrifugó a 4 °C y 150.000 x g durante 3 horas en tubos de ultracentrífuga de 70 ml. Los sedimentos formados de este modo se resuspendieron en PBS (solución salina tamponada con fosfato) para separar las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.

##### [Aislamiento de vesículas extracelulares para su uso en análisis proteómico]

El mismo concentrado como se obtuvo en el aislamiento general de las vesículas extracelulares se dejó pasar una vez a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm, seguido de ultracentrifugación a 4 °C y 150.000 x g durante 3 horas en tubos de ultracentrífuga de 70 ml. El sedimento se suspendió en 2,2 ml de solución Optiprep al 50 %. La suspensión se colocó en un tubo de ultracentrífuga de 5 ml, seguido de la adición de 2 ml de una solución Optiprep al 40 % y 0,8 ml de una solución Optiprep al 10 % a la suspensión en ese orden. La ultracentrifugación a 4 °C y 200.000 xg durante 2 horas formó una capa de vesículas extracelulares entre la solución Optiprep al 40 % y la solución Optiprep al 10 %.

#### EJEMPLO 3: Características de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*

Las vesículas extracelulares que se aislaron a partir de *Staphylococcus aureus* como en el Ejemplo 2 se adsorbieron durante 3 minutos en una rejilla de cobre recubierta de carbono con descarga luminiscente, que después se lavaron con agua destilada y se tiñeron con 2 % de acetato de uranilo antes de la observación con un microscopio electrónico de transmisión JEM101.

Como se muestra en la imagen de TEM de la figura 3a, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* son esferas cerradas con un tamaño de 20-100 nm. Las vesículas extracelulares aisladas se fijaron sobre cubreobjetos de vidrio, se fijaron durante 1 hora en 2,5 % de glutaraldehído, se posfijaron durante 1 hora en 1 % de

tetróxido de osmio, se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol graduado y , después, se sometieron a secado de punto crítico usando un sistema de CO<sub>2</sub>. Las vesículas extracelulares fijadas al cubreobjetos de vidrio se montaron en la punta y se observaron con un microscopio electrónico de barrido JSM-7401F.

5 Como se entiende a partir de la imagen de SEM de la figura 3b, las vesículas extracelulares son esféricas con tamaños relativamente uniformes (20-100 nm).

Las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* que se aislaron como en el Ejemplo 2 se diluyeron hasta 1 µg/ml en 1 ml de PBS. Esta PBS se colocó en una cubeta que después se sometió a análisis de tamaño de partícula usando dispersión de luz dinámica. El resultado se representa en la figura 4.

10 Como se muestra en la figura 4, las vesículas extracelulares varían de tamaño de 20 a 100 nm, con un tamaño medio de partícula de 28,3 nm.

Las proteínas de células enteras, las proteínas de la pared celular, las proteínas de membrana y las proteínas citosólicas se obtuvieron del siguiente modo. Se cultivó *Staphylococcus aureus* a una D.O. (600 nm) de 1,0 en 3 ml de caldo nutriente, seguido de centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos. El sedimento celular formado de este tipo se incubó con 20 µg/ml de tampón de lisostafina ml (Tris-EDTA) a 37 °C durante 15 minutos. A continuación, se rompieron completamente las células con sonicación y se centrifugaron a 8000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante exento de materiales insolubles se usó como una proteína de células enteras. Con el fin de formar un protoplasto, por separado, el sedimento celular de *Staphylococcus aureus* se incubó con 20 µg/ml de tampón lisostafina ml (Tris-EDTA) y sacarosa 1,1 M a 37 °C durante 15 minutos. Después de centrifugara 10.000 x g durante 20, el sobrenadante se utilizó como proteínas de la pared celular. El sedimento resultante se resuspendió en tampón hipotónico y se ultracentrifugó a 40.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante se utilizó para las proteínas citosólicas, mientras que el sedimento se suspendió en tampón Tris (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) y se utilizó para las proteínas de membrana. A 7 µg de cada una de las proteínas celulares enteras, la proteína de la pared celular, la proteína citoplasmática y la proteína de la vesícula extracelular aisladas en el Ejemplo 2 se añadió una cantidad de colorante de carga (Tris-HCl 250 mM, 10 % de SDS, 0,5 %, de azul de bromofenol, 50 % de glicerol) que el colorante de carga se diluyó a 1x antes de ebullición a 100 °C durante 10 minutos. Las muestras de proteína se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y se pasaron a 80 V durante 2 horas por electroforesis. El gel se tiñó durante 2 horas con 0,25 % de azul brillante de Coomassie, seguido de incubación durante 6 horas en una solución decolorante (metanol: DDW : ácido acético: 5 : 4 : 1).

30 La figura 5 muestra los patrones de distribución de las proteínas para las proteínas de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en la célula entera (WC), la pared celular (CW), la membrana plasmática (MP), el citoplasma (CY) y las vesículas extracelulares (EV), teñidos con azul de Coomassie. Como puede verse, las proteínas específicas se clasificaron dentro de las vesículas extracelulares (EV).

EJEMPLO 4: Observación en microscopio electrónico de *Staphylococcus epidermis*

35 Se cultivó *Staphylococcus epidermis* (ATCC12228) a una D.O. a 600 nm de 1 en caldo nutriente. Después de la centrifugación del caldo a 10.000 x g durante 20 minutos, el sedimento de *Staphylococcus epidermis* se fijó durante 2 horas en 2,5 % de glutaraldehído y se fijó después durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio. A la deshidratación con una serie de solución de etanol graduada le siguió inclusión en resina epoxi. El bloque resultante se seccionó en láminas ultrafinas de 70 nm de espesor. Las secciones de células se adsorbieron durante 3 minutos en una rejilla de cobre recubierta de carbono con descarga luminiscente y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo. Se realizaron observaciones con microscopio electrónico de transmisión (Jeol, Japón) de la célula. Como se puede ver en las imágenes de TEM de la figura 6, se observaron vesículas extracelulares con un tamaño de 20-100 nm en gemación desde *Staphylococcus epidermis*.

45 Del mismo modo, se realizó microscopia electrónica de barrido (SEM). En este sentido, se centrifugó el mismo cultivo de *Staphylococcus epidermis* como se ha mencionado anteriormente a 10.000 x g durante 20 minutos, después de lo cual el sedimento de células se fijó durante 1 hora en 2,5 % de glutaraldehído, después de la fijación durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio y se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol graduado antes de un procedimiento de secado en el punto crítico utilizando un sistema de CO<sub>2</sub>. La muestra bacteriana se montó sobre una punta y se recubrió con platino para la observación en un microscopio electrónico de barrido. Como se puede ver en las imágenes de SEM de la figura 7, brotaban vesículas extracelulares de *Staphylococcus epidermis*.

#### **Ejemplo 5: Preparación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus epidermis***

55 Se inoculó *Staphylococcus epidermis* en 3 ml de caldo nutriente en un tubo de ensayo y se cultivó a 37 °C durante 6 horas. Del cultivo, se transfirieron 5 µl a 500 ml de caldo nutritivo en un matraz Erlenmeyer de 2 l y se incubaron a 37 °C durante 4 horas a una D.O. (600 nm) de 1,0. Todo el cultivo se asignó igualmente a tubos de ultracentrifuga de 500 ml y se centrifugó a 4 °C y 10.000 x g durante 20 minutos. Se dejó pasar el sobrenadante desprovisto de células una vez a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm y el filtrado se concentró 25 veces utilizando el sistema Quixstand con 100 kDa de corte. Después de un pase del concentrado a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm, el filtrado resultante se ultracentrifugó a 4 °C y 150.000 x g durante 3

horas en tubos de ultracentrífuga de 70 ml. Los sedimentos formados de este modo se resuspendieron en PBS para separar las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus epidermis*.

**Ejemplo 6: Características de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus epidermis***

5 Las vesículas extracelulares que se aislaron a partir de *Staphylococcus epidermis* como en el Ejemplo 5 se adsorbieron durante 3 minutos en una rejilla de cobre recubierta de carbono con descarga luminiscente, que después se lavaron con agua destilada y se tiñeron con 2 % de acetato de uranilo antes de la observación con un microscopio electrónico de transmisión JEM101.

Como se muestra en la imagen de TEM de la figura 8a, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus epidermis* son esferas cerradas con un tamaño de 20-100 nm.

10 Las vesículas extracelulares aisladas se fijaron sobre cubreobjetos de vidrio, se fijaron durante 1 hora en 2,5 % de glutaraldehído, se posfijaron durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio, se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol graduado y , después, se sometieron a secado de punto crítico usando un sistema de CO<sub>2</sub>. Las vesículas extracelulares fijadas al cubreobjetos de vidrio se montaron en la punta y se observaron con un microscopio electrónico de barrido JSM-7401F.

15 Como se entiende a partir de la imagen de SEM de la figura 8b, las vesículas extracelulares son esféricas con tamaños relativamente uniformes (20-100 nm).

Las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus epidermis* que se aislaron como en el Ejemplo 2 se diluyeron hasta 1 µg/ml en 1 ml de PBS. Esta PBS se colocó en una cubeta que después se sometió a análisis de tamaño de partícula usando dispersión de luz dinámica. El resultado se representa en la figura 9.

20 Como se muestra en la figura 9, las vesículas extracelulares varían de tamaño de 20 a 100 nm, con un tamaño medio de partícula de 34 nm.

**EJEMPLO 7: Observación en microscopio electrónico de *Bacillus subtilis***

25 Se cultivó *Bacillus subtilis* (KCTC3729) a una D.O. a 600 nm de 1 en caldo nutriente. Después de la centrifugación del caldo a 6.000 x g durante 15 minutos, el sedimento de *Bacillus subtilis* se fijó durante 2 horas en 2,5 % de glutaraldehído y se posfijó durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio. A la deshidratación con una serie de soluciones de etanol graduado le siguió inclusión en resina epoxi. El bloque resultante se seccionó en láminas ultrafinas de 70 nm de espesor. Las secciones de células se adsorbieron durante 3 minutos en una rejilla de cobre recubierta de carbono con descarga luminiscente y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo. Se realizaron observaciones con microscopio electrónico de transmisión (Jeol, Japón) de la célula.

30 Como se puede ver en las imágenes de TEM de la figura 10, se observaron vesículas extracelulares con un tamaño de 20~100 nm en gemación desde *Bacillus subtilis*.

35 Del mismo modo, se realizó microscopia electrónica de barrido (SEM). En este sentido, se centrifugó el mismo cultivo de *Bacillus subtilis* como se ha mencionado anteriormente a 6.000 x g durante 15 minutos, después de lo cual el sedimento de células se fijó durante 1 hora en 2,5 % de glutaraldehído, después de la fijación durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio y se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol graduado antes de un procedimiento de secado en el punto crítico utilizando un sistema de CO<sub>2</sub>. La muestra bacteriana se montó sobre una punta y se recubrió con platino para la observación en un microscopio electrónico de barrido. Como se puede ver en las imágenes de SEM de la figura 11, brotaban vesículas extracelulares de *Staphylococcus epidermis*.

**EJEMPLO 8: Preparación de vesículas extracelulares derivadas de *Bacillus subtilis***

40 Se inoculó *Bacillus subtilis* en 3 ml de caldo nutriente en un tubo de ensayo y se cultivó a 37 °C durante 6 horas. Del cultivo, se transfirieron 5 µl a 500 ml de caldo nutritivo en un matraz Erlenmeyer de 2 l y se incubaron a 37 °C durante 4 horas a una D.O. (600 nm) de 1,0. Todo el cultivo se asignó igualmente a tubos de ultracentrífuga de 500 ml y se centrifugó a 4 °C y 6.000 x g durante 20 minutos. Se dejó pasar el sobrenadante desprovisto de células una vez a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm y el filtrado se concentró 25 veces  
45 utilizando el sistema Quixstand con 100 kDa de corte. Después de un pase del concentrado a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm, el filtrado resultante se ultracentrifugó a 4 °C y 150.000 x g durante 3 horas en tubos de ultracentrífuga de 70 ml. Los sedimentos formados de este modo se resuspendieron en PBS para separar las vesículas extracelulares derivadas de *Bacillus subtilis*.

**EJEMPLO 9: Características de vesículas extracelulares derivadas de *Bacillus subtilis***

50 Las vesículas extracelulares que se aislaron a partir de *Bacillus subtilis* como en el Ejemplo 8 se adsorbieron durante 3 minutos en una rejilla de cobre recubierta de carbono con descarga luminiscente, que después se lavaron con agua destilada y se tiñeron con 2 % de acetato de uranilo antes de la observación con un microscopio electrónico de transmisión JEM101.

Como se muestra en la imagen de TEM de la figura 12a, las vesículas extracelulares derivadas de *Bacillus subtilis* son esferas cerradas con un tamaño de 20-100 nm.

5 Las vesículas extracelulares aisladas se fijaron sobre cubreobjetos de vidrio, se fijaron durante 1 hora en 2,5 % de glutaraldehído, se posfijaron durante 1 hora en 1 % de tetróxido de osmio, se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol graduado y, después, se sometieron a secado de punto crítico usando un sistema de CO<sub>2</sub>. Las vesículas extracelulares fijadas al cubreobjetos de vidrio se montaron en la punta y se observaron con un microscopio electrónico de barrido JSM-7401F.

Como se entiende a partir de la imagen de SEM de la figura 12b, las vesículas extracelulares son esféricas con tamaños relativamente uniformes (20-100 nm).

10 Las vesículas extracelulares derivadas de *Bacillus subtilis* que se aislaron como en el Ejemplo 8 se diluyeron hasta 1 µg/ml en 1 ml de PBS. Esta PBS se colocó en una cubeta que después se sometió a análisis de tamaño de partícula usando dispersión de luz dinámica. El resultado se representa en la figura 13.

Como se muestra en la figura 13, las vesículas extracelulares varían de tamaño de 20 a 100 nm, con un tamaño medio de partícula de 30 nm.

15 En estos ejemplos, se divulga primero la secreción espontánea de vesículas extracelulares de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Bacillus subtilis*, todas representativas de las bacterias grampositivas, durante su crecimiento, junto con diversos caracteres de la vesícula extracelular aislada. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que las bacterias que se pueden usar como fuente para las vesículas extracelulares de la presente invención no se limitan únicamente a las mencionadas en los ejemplos anteriores, pero se puede extender a todas las bacterias grampositivas. Además, debe ser evidente que los modelos animales de enfermedad, aunque establecidos solamente con *Staphylococcus aureus* en los Ejemplos, se pueden construir utilizando cualquier bacteria grampositiva patogénica.

20

#### **EJEMPLO 10: Análisis proteómico de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

[Digestión triptica en gel]

25 A 50 µg de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* aisladas para el análisis proteómico en el Ejemplo 2 se añadió de tal forma que una cantidad de colorante de carga 5x que el colorante de carga se diluyó a 1x, seguido de ebullición a 100 °C durante 10 minutos. Estas muestras se cargaron a gel al 4-20 % de Tris-glicina Novex (Invitrogen) y se pasó a 90 V durante 2 horas mediante electroforesis. Después de tefir con GelCode Blue Stain Reagent (Pierce), el gel se cortó en 11 piezas de gel iguales que, a su vez, se trataron con 13 ng/µl de tripsina (Promega) a 37 °C durante 16 horas.

30

[Digestión con tripsina en solución]

A 100 µg de la muestra de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* preparadas para el análisis proteómico en el Ejemplo 2 se añadieron cuatro volúmenes de metanol, seguido de centrifugación a 9.000 x g durante 10 segundos. A continuación, esta mezcla se mezcló con un volumen igual de cloroformo y se centrifugó a 9.000 x g durante 10 segundos. Se añadió agua de calidad de HPLC en una cantidad tres veces mayor que el volumen de la muestra y se centrifugó a 16.000 x g durante 1,5 minutos. De las dos capas separadas formadas de este modo, se retiró la capa superior, mientras que el metanol se añadió a la capa restante en una cantidad tres veces mayor que el volumen de la muestra y se centrifugó a 16.000 x g durante 3 minutos. El sedimento formado de esta manera se suspendió en tampón de lisis (urea 6M, bicarbonato de amonio 40 mM), seguido de reducción mediante Tris 5 mM hidrocloreuro de (2-carboxietil)fosfina a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la muestra se incubó con yodoacetamida 25 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos en un estado oscuro a las proteínas de alquilato. Finalmente, la muestra se trató con 5 ng/µl de tripsina a 37 °C durante 16 horas. Los péptidos degradados de este modo se han separado con el sistema de fraccionadores OFFGEL (Agilent). Para empezar, una tira de IPG de 24 cm de largo (pH 3-10) fue hidratado con rehidratación con IPG. Los péptidos degradados se disolvieron en 2,8 ml de tampón fuera del gel y la solución se cargó en una cantidad de 150 µl por carril. La electroforesis a 50 µA, 8000 V durante 47 horas separó los péptidos de acuerdo con el punto isoelectrico (pI). Las muestras se desalaron utilizando una columna de centrifugación PepClean C18.

35

40

45

#### **[Espectrometría de Masas con nanoionización (Nano-LC-ESI-MS/MS)]**

El análisis de masas se realizó usando Nano-LC-ESI-MS/MS. Los péptidos degradados de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* preparadas mediante la digestión con tripsina en gel o en solución se cargaron en una columna (75 m x 12 cm) rellena con resina C18 y después se separaron del siguiente modo: 3-30 % de tampón A, 70 minutos; 30-40 % de tampón B, 5 minutos; 40-90 % de tampón B, 20 minutos; caudal 0,2 µl/min (composición del tampón A: 0,1% de ácido fórmico en H<sub>2</sub>O, composición del tampón B: 0,1 % de ácido fórmico en ACN). Los péptidos eluidos se introdujeron en un espectrómetro de masas LTQ-ion-trap (Thermo Finnigan) con una tensión de electropulverización de 2,0 kV bajo una energía de colisión normalizada ajustada a 35 % de MS/MS. Todos los espectros MS/MS se adquirieron mediante barridos dependientes de los datos en los que

50

55

se seleccionaron los cinco picos más intensos de los barridos de MS completos para la fragmentación. El número de repeticiones para la exclusión dinámica se estableció en 1, la duración de la repetición a 30 segundos y la duración de la exclusión dinámica a 180 segundos, la anchura de la masa de exclusión de  $\pm 1,5$  Da, y el tamaño de la lista dinámica de exclusión a 50.

5 **[Análisis de datos]**

Se construyó una base de datos NCBI a partir de 9 bases de datos personalizadas que contenían secuencias de aminoácidos y de bases de *Staphylococcus aureus* mediante la concatenación de las combinaciones de secuencias de bases objetivo (directa) y señuelo (inversa). Todos los espectros de masas en bruto se presentaron a la herramienta de motor SEQUEST para las búsquedas contra la base de datos del NCBI. Solo se seleccionaron las proteínas para las que coincidieron dos péptidos únicos, con las tasas de falsos positivos de los péptidos identificados fijadas en 1 %.

**[Resultados]**

El análisis proteómico identificó un total de 90 proteínas de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, con 35 solapadas entre 41 proteínas identificadas por digestión con tripsina en gel y 84 proteínas identificadas por digestión con tripsina solución, como se muestra en la figura 14. La Tabla 1 resume las 90 proteínas que se identificaron.

Diversas proteínas relacionadas con la enfermedad estaban entre la proteína de la vesícula extracelular identificada. En las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* existen los superantígenos enterotoxina Q de staphylococcus y antígenos secretores de staphylococcus (ssaA1 ssaA2) que actúan como proteínas virulentas responsables de la aparición de la sepsis o de síndrome de shock tóxico. También se encontraron en las vesículas toxinas, tales como alfa-hemolisina y gamma-hemolisina, que destruyen los eritrocitos y degradan la hemoglobina. Las proteasas estafopaina A y ECM extracelular y la proteína de unión plasmática, que están directamente involucradas en la invasión y la penetración de las bacterias en los tejidos del huésped, se detectaron en las vesículas. Asimismo, se identificaron las proteínas relacionadas con la coagulación de la sangre, tales como estafilocoaagulasa y proteínas de unión al factor de von Willebrand. Estas proteínas están implicadas en la aparición de sepsis y síndrome de choque tóxico, que se caracteriza por coagulación intravascular de la sangre, así como enfermedades vasculares, incluyendo síndrome coronario agudo y accidente cerebrovascular, causados por la formación de trombos dentro de una arteria coronaria, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar. En las vesículas extracelulares también se encuentran la proteína de unión a IgG de *S. aureus* (SBI) que puede dotar a las bacterias de la función de evasión inmunitaria mediante la inhibición de la fagocitosis de las células inmunitarias del huésped que están implicadas en la aparición de dermatitis atópica mediante la inducción de la expresión de SIL-18 en células de la epidermis y el aumento de los niveles de IgE en suero.

TABLA 1. Proteoma de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*

N.º Gi	Proteína	Función	Función específica	Detección selectiva en el método en gel	Detección selectiva en el método en solución
<b>Proteína de secreción extracelular</b>					
150375723	Beta-lactamasa	Respuesta al estímulo	Actividad Beta-lactamasa	√	√
21282496	ECM extracelular y proteína de unión plasmática	Proceso de múltiples organismos	Adhesina		√
21282773			Alfa-hemolisina	Citólisis de células de otro organismo	√
81704164	Gamma-hemolisina componente C		Hemólisis por simbionte de eritrocitos del huésped		√
57650962	Proteína de unión a IgG Sbl		Patogenia	√	

(continuación)

81704132	Antígeno secretor estafilococos ssaA2 de		Patogenia	√	
81762108	Antígeno secretor estafilococos ssaA2 de		Patogenia	√	
21281935	Precursor de la estafilocoagulasa		Coagulación	√	
57652487	Precursor de la estafilocoagulasa		Coagulación	√	
37488995	Estafopaina A		Proteolisis		√
21284294	N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa	<b>Procesos celulares</b>	Organización de la pared celular	√	√
21282322	Proteína hipotética MW0593		Organización de la pared celular		√
81762626	Autolisina bifuncional		Organización de la pared celular	√	√
21284065	Proteína hipotética MW2336	<b>Localización</b>	Transporte		√
21283931	Lipoproteína de unión a hidroxamato sideróforo		Transporte de iones de hierro de alta afinidad	√	√
38604669	Lipasa 2	<b>Metabolismo</b>	Proceso catabólico de lípidos		√
57651231	5'-nucleotidasa	<b>Mal caracterizada</b>	N.A. <sup>e)</sup>	√	√
21282013	Proteína hipotética MW0284		N.A.	√	√
57651320	Proteína hipotética SACL0479		N.A.		√
21282306	Proteína hipotética MW0577		N.A.		√
21283609	Proteína truncada de la superficie celular map-w		N.A.	√	√
<b>Proteína de membrana</b>					
21282793	Proteína de unión a penicilina 1	<b>Respuesta estímulo</b>	<b>al</b>	Respuesta a antibióticos Biogénesis de la pared celular basada en peptidoglicanos	√
21283069	PBP2	<b>Procesos celulares</b>	<b>al</b>	Respuesta a antibióticos Biogénesis de la pared celular basada en peptidoglicanos	√
21283233	Proteína de unión a penicilina 3	<b>Respuesta estímulo</b>	<b>al</b>	Respuesta a antibióticos Biogénesis de la pared celular basada en peptidoglicanos	√

(continuación)

21282494	Proteína VWbp de unión al factor de von Willebrand secretada truncada	<b>Proceso de múltiples organismos</b>	Coagulación		√
21282495	Proteína VWbp de unión al factor de von Willebrand secretada truncada		Coagulación		√
21283671	Proteína hipotética MW1942		Citólisis de células de otro organismo	√	√
21283666	Enterotoxina SeQ de estafilococos		Patogenia		√
61213890	Proteína de membrana de 77 kDa		Patogenia	√	
81704700	N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa sle1; precursor	<b>Procesos celulares</b>	Biogénesis/degradación de la pared celular	√	√
81704612	Glicerol fosfato ácido lipoteicoico sintasa		Biogénesis/degradación de la pared celular	√	√
21283316	Subunidad SecD/SecF de la preproteína translocasa bifuncional	<b>Localización</b>	Transporte de proteínas	√	√
60392183	Complejo de proteínas del ribosoma unido a la membrana, subunidad de 50 kDa	<b>Metabolismo</b>	Glicólisis	√	√
21284194	Proteína hipotética MW2465	<b>Mal caracterizada</b>	N.A.		√
21284271	Proteína hipotética MW2542		N.A.	√	
73621231	Proteína reguladora msrR		N.A.		√
<b>Proteína citosólica</b>					
21283575	ADN helicasa dependiente de ATP	<b>Respuesta al estímulo</b>	Reparación del ADN		√
81762575	ARN ribosoma Subunidad grande de metiltransferasa N	<b>Procesos celulares</b>	Respuesta a antibióticos procesamiento del ARNr	√	
50402228	Enoilpiruvato transferasa 1		Biogénesis de la pared celular basada en peptidoglicano		√
38604895	Subunidad A de la ADN girasa	<b>Respuesta al estímulo Metabolismo</b>	Respuesta al estímulo Proceso metabólico del ADN		√
54036785	Subunidad beta de la ATP sintasa		Proceso de biosíntesis de ATP		√
59799526	Glutamina sintetasa		Proceso de biosíntesis de glutamina		√
54037697	Ribosa fosfato pirofosfocinasa		Proceso de biosíntesis de nucleótidos		√

ES 2 607 955 T3

(continuación)

21283340	Glutamato-1-semialdehído aminotransferasa		Proceso de biosíntesis de porfirina		√
60392318	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1		Glicólisis	√	√
21282096	Proteína GMP sintasa/glutamina amidotransferasa bifuncional		Proceso de biosíntesis de GMP		√
21282838	Proteína hipotética MW1109		Proceso metabólico del glicerol		√
21283766	Serina hidroximetiltransferasa		Proceso metabólico del glicina	√	√
21283370	Piruvato cinasa		Glicólisis		√
21283383	Acetato cinasa		Fosforilación	√	√
21283307	Proteína hipotética MW1578		Proceso metabólico		√
81832404	Glutamato deshidrogenasa específica de NAD		Proceso metabólico de aminoácido		√
54038961	CTP sintasa		Proceso metabólico de glutamina		√
38604707	Subunidad alfa del componente E1 de piruvato deshidrogenasa		Glicólisis	√	√
38604917	Componente de resto dihidrolipolisina acetiltransferasa del complejo piruvato deshidrogenasa		Glicólisis	√	√
60392857	Subunidad beta del componente E de piruvato deshidrogenasa		Glicólisis	√	√
119390865	Pirimidina-nucleósido fosforilasa		Proceso metabólico de base pirimidínica	√	
21282878	Factor de elongación de la transcripción NusA	<b>Almacenamiento y procesamiento de información</b>	Regulación de la terminación de la transcripción		√
21282422	Subunidad alfa de ribonucleótido disfosfato reductasa		Replicación del ADN		√
21283872	Subunidad alfa de la ARN polimerasa dirigida por ADN		Transcripción	√	
21282226	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN		Transcripción	√	√
21282227	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN		Transcripción	√	√

ES 2 607 955 T3

(continuación)

21282201	Lisil-ARNt sintetasa		Aminoacilación de Lisil-ARNt	√	
38258392	Treonil-ARNt sintetasa		Aminoacilación de treonil-ARNt		√
21282875	Prolil-ARNt sintetasa		Aminoacilación de Prolil-ARNt		√
21283246	Glicil-ARNt sintetasa		Aminoacilación de Glicil-ARNt		√
21283570	Subunidad A de glutamil-ARNtGln amidotransferasa		Traducción		√
21282868	Proteína ribosómica 30S	S2	Traducción		√
54039504	Proteína ribosómica 34S	S3	Traducción	√	√
21283391	Proteína ribosómica 34S	S4	Traducción	√	√
54039545	Proteína ribosómica 30S	S7	Traducción		√
54039108	Proteína ribosómica 50S	L1	Traducción	√	√
21283895	Proteína ribosómica 50S	L2	Traducción	√	√
21283897	Proteína ribosómica 50S	L4	Traducción		√
50401243	Proteína ribosómica 50S	L5	Traducción		√
21283883	Proteína ribosómica 50S	L6	Traducción		√
21283866	Proteína ribosómica 50S	L23	Traducción		√
21283879	Proteína ribosómica 50S	L15	Traducción		√
81704219	Proteína ribosómica 50S	L16	Traducción	√	√
21282853	Proteína ribosómica 50S	L19	Traducción		√
21282326	Proteína ribosómica 50S	L21	Traducción		√
23821722	Factor de iniciación de la traducción IF-2		Traducción		√
21282231	Factor de elongación G		Traducción	√	√
54037028	Factor de elongación Tu		Traducción	√	√
21282409	Proteína hipotética MW0680	<b>Mal caracterizada</b>	N.A.		√
81704520	Ribonucleasa J 1		N.A.		√
150392829	Proteína hipotética		N.A.	√	√

(continuación)

Proteína cuya localización en la célula no está determinada					
24638020	Probable malato:quinona oxidoreductasa 2	<b>Metabolismo</b>	Ciclo del ácido tricarbóxico		√
81847838	Proteína de tipo NADH deshidrogenasa		Oxidación reducción	√	√
81704263	Probable caja DEAD ARN helicasa dependiente de ATP	<b>Mal caracterizada</b>	N.A.	√	√

**EJEMPLO 11: Respuesta inmunitaria innata ex vivo de macrófagos a vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

5 Se sembraron macrófagos de ratón (RAW 264.7) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 24 pocillos y se mantuvieron durante 24 horas. Las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 15 horas con 1, 10, 100, 1.000 y 10.000 ng/ml de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* aisladas como en el Ejemplo 2 en 10 % de FBS/RPMI en cada pocillo. Se recogieron los medios de cultivo y se centrifugaron a 4 °C y 500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 3.000 x g durante 20 minutos. Las citocinas presentes en el sobrenadante resultante se analizaron cuantitativamente mediante ELISA (ensayo de enzima de inmunoabsorción ligada a enzimas).

10 La figura 15 muestra los niveles de citocinas. Como se puede ver, los niveles de expresión de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 aumentaron con un aumento de la concentración de las vesículas extracelulares, lo que indica que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* provocan la respuesta inmunitaria innata de los macrófagos y, por lo tanto, causa inflamación en el huésped.

**EJEMPLO 12: Respuesta inmunitaria innata ex vivo de fibroblastos dérmicos vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

20 Después de la retirada de la epidermis de tejidos dérmicos de ratón, los fibroblastos se liberaron de la dermis restantes mediante tratamiento enzimático con tripsina. Se sembraron los fibroblastos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 24 pocillos y se mantuvieron durante 24 horas. A continuación, se incubaron las células durante 24 horas con 1 y 10  $\mu$ g/ml de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en DMEM. Los medios de cultivo se recogieron y se centrifugaron. Se realizó un ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) con el sobrenadante para determinar los niveles de citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6) y las citocinas (TSLP) y quimiocinas (MIP-1a, eotaxina) que afectan a la inmunidad adaptativa. Los resultados se representan en la figura 16.

25 La figura 16 muestra que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* estimulan la expresión de citocinas inmunes e inflamatorias. Como se entiende a partir de los datos de la figura 16, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* actúan sobre los fibroblastos dérmicos para inducir la expresión de citocinas inflamatorias y la atracción de diversas células inmunes, lo que provoca inflamación.

**EJEMPLO 13: Establecimiento de un modelo animal de dermatitis atópica con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

30 La piel dorsal de ratones (SKH-HR1, mujer) se raspó de cuatro a seis veces usando cinta Durapore (3M). A continuación, sobre la piel raspada se colocó una gasa (2 cm x 2 cm) empapada con 0,1  $\mu$ g, 5  $\mu$ g y 10  $\mu$ g de vesículas extracelulares derivadas de *S. aureus* en 100  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con cinta bio-oclusiva Tegaderm (3M). Este procedimiento se repitió tres veces a la semana durante cuatro semanas. Se sacrificó a los ratones 24 horas después de la exposición final y se extirparon los tejidos dérmicos (Figura 17). El análisis histológico mostró que la aplicación de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* a la piel sometida a la aplicación y retirada de la cinta indujo inflamación de tipo dermatitis atópica, incluyendo engrosamiento epidérmico e infiltración de la dermis por las células inflamatorias. Al igual que con la infiltración dérmica por las células inflamatorias, se encontró un número significativamente mayor de eosinófilos y de mastocitos en la dermis de los ratones tratados con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, en comparación con los controles tratados con solución salina. En conjunto, estos datos sugieren que la aplicación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* a piel sometida a aplicación y retirada de cinta induce inflamación similar a la enfermedad atópica (Figuras 18 y 19). Además, el análisis de las respuestas inmunitarias de las células T colaboradoras de tipo 2 (Th2), responsables de la dermatitis atópica, en los tejidos dérmicos mostró que la estimulación *in vitro* de los fibroblastos con EV de *S. aureus* aumentó

la secreción de las citocinas de tipo Th2, tales como IL-4 e IL-5, así como la quimiocina eotóxina, inducida por las citocinas (Figura 20).

**EJEMPLO 14: Cuantificación de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en el fluido de lavado de la piel de pacientes con dermatitis atópica**

5 Se obtuvieron fluidos de lavado de la piel mediante aclarado de lesiones cutáneas de pacientes con dermatitis atópica varias veces con PBS estéril. Para eliminar las bacterias y otros residuos, se centrifugaron 40 ml del fluido de lavado de la piel a 5.000 x g y 10 000 x g. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se filtraron a través de 0,45 µm y 0,22 µm en serie. A continuación, los fluidos de lavado se concentraron a 1 ml utilizando Centriprep con corte de 100 kDa. Parte del concentrado (fluido de lavado) se almacenó, mientras que el resto se mezcló con el mismo volumen de solución salina estéril y se ultracentrifugó a 150.000 x g para dar vesículas extracelulares (fracción EV) como un sedimento.

15 Con el fin de examinar si existen vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* (SA\_EV) en el fluido de lavado de la piel y en la fracción EV, se analizaron las proteínas características de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* mediante ELISA utilizando anticuerpos específicos de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. En este sentido, las placas de ELISA de 96 pocillos se revistieron con anticuerpos policlonales específicos anti-vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y se bloquearon con 1 % de BSA (seroalbúmina bovina). Los fluidos de lavado concentrados y la fracción EV se añadieron a cada pocillo. Después de la incubación durante 2 horas, los pocillos se lavaron con Tween 20 en PBS. A continuación se añadieron anticuerpos policlonales específicos de EV anti-S. aureus a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. Después del tratamiento con peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (HRP), los sustratos de quimioluminiscencia (BM-POD) se añadieron para reaccionar con HRP. La luminiscencia se midió y se expresó como ULR.

20 La figura 21 es un gráfico que muestra la presencia de antígenos característicos de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en el fluido de lavado de la piel del paciente. Asimismo, los datos obtenidos con la fracción de EV del fluido de lavado confirmaron la presencia de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en las lesiones de los pacientes con dermatitis atópica.

**EJEMPLO 15: Nivel sérico de anticuerpos (IgE) específicos de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en pacientes con dermatitis atópica**

25 Se tomaron muestras de sangre de un grupo de pacientes con dermatitis atópica y un grupo de control sanos de edad equivalente, cada uno compuesto por 20 personas de 0-10 años de edad y se centrifugaron a 4 °C y 3.500 x g durante 10 minutos, para dar sueros.

30 La figura 22 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgG1 e IgE contra las vesículas extracelulares en el suero, medidos mediante ELISA. Como se puede ver, el nivel de anticuerpos de tipo IgE específicos de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* estaba significativamente elevado en el suero de los pacientes con dermatitis atópica sobre el de los controles sanos.

**EJEMPLO 16: Inducción de la inflamación mediada por Th17 de la mucosa mediante vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

35 Se anestesió a los ratones con ketamina y Rompun y se les administró 1 µg y 10 µg de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* en 30 µl de PBS a través de la vía nasal. Para examinar el efecto de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* sobre la inmunidad innata, los fluidos de BAL se obtuvieron mediante lavado de las vías respiratorias con 1 ml de PBS 24 horas después de la administración (Figura 23). Los análisis cuantitativos mostraron que los niveles de las células inflamatorias (especialmente neutrófilos) y de IL-6, que es una citocina inflamatoria que induce una respuesta inmunitaria Th17, en el fluido de lavado broncoalveolar aumentó con un aumento de la concentración de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* (figura 24), lo que indica que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* induce inflamación mediada por Th17 en el moco de las vías respiratorias.

40 Para examinar la inmunidad adaptativa inducida por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, se administró a los ratones 1 µg de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* dos veces a la semana durante tres semanas por inhalación intranasal. Los fluidos de lavado broncoalveolar se obtuvieron 24 horas después de la inhalación final y se analizó la inflamación (Figura 25).

45 Como se entiende a partir de los datos de la Figura 26, se encontró un gran aumento del nivel de las células inflamatorias, especialmente neutrófilos, en los fluidos de lavado broncoalveolar del grupo que inhaló vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, en comparación con el grupo de control (Figura 26a). Asimismo, inflamación de la mucosa de las vías respiratorias se determinó midiendo los niveles de citocinas en los fluidos de lavado broncoalveolar, IL-17, que es una citocina liberada por las células Th17 y se observó que aumentaba significativamente en el grupo que ha inhalado las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* (Figura 26b).

A partir de los datos, se puede deducir que cuando se inhalan de forma repetitiva, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* actúan localmente induciendo inflamación neutrofílica caracterizada por la respuesta inmunitaria Th17 sobre el moco de las vías respiratorias.

#### **EJEMPLO 17: Inducción de sepsis por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

5 Las vesículas extracelulares aisladas como en Ejemplo 2, se inyectaron por vía intravenosa a una dosis de 15, 25 o 50 µg en ratones (C57B6, machos), y ratones muertos se contaron cada 12 horas (Figura 27).

Como se puede ver en el gráfico de la supervivencia de la figura 28, la tasa de supervivencia se redujo a 66,6 % en los grupos de ratones a los que se ha administrado 25 µg y 50 µg de las vesículas extracelulares. Es decir, una cierta dosis de las vesículas extracelulares es letal para ratones.

10 La figura 29 muestra un cambio en la temperatura corporal durante 12 horas después de la inyección de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* (5 µg) en ratones (C57B6, macho). Las temperaturas corporales se registraron cada dos horas en la pantalla digital de un termómetro rectal aplicado a los ratones. Como puede verse, se detectaron temperaturas más bajas del cuerpo (hipotermia), un índice para SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) en los ratones a los que se ha administrado 15, 25, y 50 µg de las vesículas extracelulares.

#### **EJEMPLO 18: Coagulación intravascular y trombosis mediante vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

A los ratones (C57B6, macho) se administró tres veces a intervalos regulares de 8 horas 5 µg de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* aisladas en el Ejemplo 2 a través de diversas rutas, y fueron sacrificados 6 horas después de la administración final, seguido de neumonectomía (Figura 30). Los ratones a los que se inyectó (i.v.) PBS a través de la vena de la cola (i.v.) se utilizaron como control negativo. Los pulmones extirpados se tiñeron con H & E (hematoxilina-eosina) de modo que los núcleos celulares y el citoplasma se tiñeron de color azul (hematoxilina) y rojo (eosina), respectivamente.

25 Las fotografías de la figura 31 son de tejidos teñidos con H & E, que muestran la formación de un trombo en la vena después de inyección i.v. de las vesículas extracelulares, la infiltración de células inflamatorias alrededor de los vasos sanguíneos después de la inyección subcutánea (s.c.), y la formación de trombos en los vasos pulmonares después de la administración intranasal (i.n.).

Se examinaron los niveles de índice de la coagulación intravascular diseminada. En este sentido, las muestras de sangre tomadas del corazón de ratón se mezclaron en una proporción de 9:1 con el agente anticoagulante citrato de sodio agente para dar plasma. La figura 32 muestra los niveles de D-dímero, un índice para la coagulación intravascular diseminada, medida por un kit de diagnóstico con D-dímero. Se observó que el nivel de dímero D aumentaba en todos los ratones a los que se administraron las vesículas con independencia de la ruta, en comparación con el control, pero fue mucho más alto en la inyección i.v. o s.c.. Además, se contaron las plaquetas, otro índice para la coagulación intravascular diseminada. En este sentido, se diluyó 1 µl de la muestra de sangre en 199 µl de oxalato de amonio al 1 % y se dejaron reposar durante 10 minutos antes de contar las plaquetas. Los resultados se representan en la figura 33.

La figura 33 muestra la aparición de trombocitopenia en todos los ratones a los que se han administrado vesículas extracelulares independientemente de la vía de administración.

#### **EJEMPLO 19: Establecimiento de un sistema de detección selectiva *in vitro* para fármacos candidatos para la prevención o el tratamiento de enfermedad inducida por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

Los ejemplos anteriores demuestran que las citocinas inflamatorias inducidas por las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de ratón tienen una gran participación en la generación de diversas enfermedades. Basándose en este hecho, se estableció un sistema de detección selectiva *in vitro* por el que las sustancias inhibitoras de la actividad de citocinas inflamatorias podían descubrirse. La figura 34 es un diagrama esquemático que muestra el descubrimiento de sustancias inhibitoras de la liberación inducida por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* de citocinas inflamatorias. Los macrófagos de ratón (RAW 264.7) mediante el procedimiento del Ejemplo 11, se trataron con las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* (1 µg/ml) por sí solas, por separado mediante el procedimiento del Ejemplo 2 o en combinación con un candidato a fármaco (10 µM), durante 15 horas en una incubadora a 37 °C. continuación, se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a 4 °C y 500 x g durante 10 minutos y, posteriormente, a 4 °C y 3.000 x g durante 20 minutos. La IL-6 en el sobrenadante se analizó cuantitativamente mediante ELISA. Estos procedimientos representan, al menos en parte, para un procedimiento para la detección selectiva *in vitro* de candidatos fármaco inhibitoras de la secreción de IL-6 inducida por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, por el cual se pueden proporcionar fármacos candidatos preventivos o terapéuticos de enfermedades causadas por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.

**EJEMPLO 20. Evaluación de la eficacia farmacéutica *in vivo* de profármacos descubiertos por el sistema de detección selectiva *in vitro***

La figura 35 muestra los niveles de IL-6 de los cultivos celulares como porcentajes de los del control positivo cuando los cultivos celulares se trataron con cada uno de 102 profármacos diferentes (acetaminógeno, acetilcisteína, alopurinol, HCl alprenolol, HCl amitriptilina, atropina, tosilato de bretilio, bromfeniramina, budesonida, buspirona HCl, cefuroxima, hidrato de cloral, clorpromazina HCl, cimetidina, clomipramina HCl, clotrimazol, ciclobenzaprina, desipramina HCl, diclofenaco, diflunisal, diltiazem, difenhidramina HCl, disopiramida, disulfiram, D-manitol, doxepina, doxiciclina hidrato, doxilamina succinato, cloruro de edrofonio, maleato de enalapril, famotidina, fenbufeno, fenofibrato, fenopropeno hidrato de sal de calcio, dihidrocloruro flunarizina, dicloruro de flufenazina, flurbiprofeno, furosemida, gemfibrozilo, gliclazida, glipizida, haloperidol, hidrocortizida, hidroflumetazida, HCl de hidroxizina, ibuprofeno, HCl imipramina, indapamida, indol -2-carboxílico, indometacina, ipratropio, ketoprofeno, ketorolaco sal tris, maprotilina HCl, ácido meclofenámico, melatonina, metformina, HCl metapirileno, metimazol, metocarbamol, metoclopramida HCl, metronidazol, nabumetona, naproxeno, neostigmina Br, niacina, nicardipina HCl, nifedipina, nitrofurantoina, nizatidina, noretindrona, nortriptilina, HCl orfenadrina, oxibutinina, HCl fenformina, fenilbutazona, fenitoína, piroxicam, prednisona, probenecid, HCl propranolol, piridostigmina, Br, HCl ranitidina, espironolactona, sulfamet, sulpirida, tenoxicam, terfenadina, teofilina, ticlopidina HCl, tolazamida, tolazolina, tolbutamida, ácido tolfenámico, tramadol HCl, tranilcipromina, trazodona HCl, triamtereno, triclormetiazida, tripelenamina HCl, verapamilo, warfarina) como en el Ejemplo 19. De ellos, 19 (acetaminógeno, HCl amitriptilina, atropina, tosilato de bretilio, bromfeniramina, HCl de clorpromazina, HCl clomipramina, ciclobenzaprina, HCl desipramina, disulfiram, doxepina, doxiciclina hidrato, succinato de doxilamina, haloperidol, HCl imipramina, HCl nicardipina, nortriptilina, HCl Propranolol, tenoxicam) se descubrieron como candidatos a fármacos, ya que reducía el nivel de IL-6 por debajo del 50 % del control positivo.

La figura 36 es un gráfico que muestra los niveles de IL-6, medida por ELISA, en los fluidos de lavado broncoalveolar que se obtuvieron 12 horas después de los profármacos (10 mg/kg) revelados anteriormente se inyectaron por vía intraperitoneal en grupos de ratones C57BL/6 (macho, 6 semanas de edad, 4 ratones en cada grupo) inmunizados con 1 µg de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* mediante inyección intranasal. Se identificó que la doxepina, descubierta por el sistema de detección selectiva *in vitro*, suprimía la actividad de IL-6 y ejercía un efecto sinérgico, junto con el haloperidol, también descubierta por el sistema de detección selectiva *in vitro*.

A partir de estos resultados, es evidente que el sistema de detección selectiva de fármacos *in vitro* utilizando las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, establecido en el Ejemplo 19, es un procedimiento muy útil por el se pueden seleccionar con eficacia para la prevención o tratamiento de enfermedades inducidas por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.

**EJEMPLO 21: Respuesta inmunitaria *in vitro* inducida por vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

A partir de los resultados del Ejemplo 11 se entiende que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* provocan respuestas inmunitarias en células huésped mediante la estimulación de células inflamatorias porque los macrófagos de ratón (RAW 264.7) tratados con las IL-6 secretaban por las vesículas, que estimula la diferenciación de Th17. La microscopia de fluorescencia demostró que seis horas después de tratarse con vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* marcadas con Dil (1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato), células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) en volvieron a las vesículas en la misma (Figura 37).

Además, después incubar las células dendríticas con las vesículas extracelulares durante 24 horas, las citocinas liberadas al medio de cultivo se analizaron cuantitativamente mediante ELISA. Como resultado, se detectaron niveles elevados de IL-12, una citocina que estimula la diferenciación Th1 (Fig. 38) y para CD40 y MHCII, indicativo de la activación de células dendríticas (Fig. 39). En conjunto, estos resultados sugieren que las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* no solo actúan sobre las células presentadoras de anticuerpos para mejorar la inmunidad adaptativa, sino que también inducen las células T a diferenciarse en células Th1 y Th1.

**EJEMPLO 22: Inducción de la producción de anticuerpos y respuesta inmunitaria de células T mediante inyección subcutánea de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

Para evaluar las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* como vacuna para inducir la producción de anticuerpos, se inyectaron las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* preparadas en el Ejemplo 2 por vía subcutánea a una dosis de 1,5 o 20 µg en ratones (C57B6, machos) tres veces a intervalos regulares de una semana. Se tomaron muestras de sangre de los vasos sanguíneos oculares las semanas 1, 2 y 3 (Figura 40). Las muestras de sangre se coagulan a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron a 4 °C y 3.500 x g durante 10 minutos para tomar el suero como sobrenadante.

La figura 41 es un gráfico en el que se representan los niveles mediante ELISA de los anticuerpos IgG, un índice para la respuesta inmunitaria a las vesículas extracelulares, frente a la dosis de vacuna, que demuestra que se

produjeron anticuerpos específicos para las proteínas vesiculares de una manera dependiente de la dosis, con el título de anticuerpos amplificado desde la segunda inyección. Así, dos o más inyecciones subcutáneas de vesículas extracelulares inducen la producción de anticuerpos específicos para las proteínas de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.

- 5 Para evaluar las respuestas inmunitarias de células T inducidas por las extracelulares de *Staphylococcus aureus* se inyectaron, vesículas extracelulares de *Staphylococcus aureus* por vía subcutánea a una dosis de 2, 5 o 10 µg en ratones (C57B6, macho) tres veces a intervalos regulares de cinco días. Las respuestas inmunitarias en esplenocitos se examinaron 24 horas después de la inyección final (Figura 42).

10 La figura 43 muestra la inducción de respuestas inmunitarias de células T por las vesículas extracelulares. A este respecto, las células inmunitarias aisladas del bazo se cultivaron *in vitro* durante 72 horas y los medios de cultivo se analizaron para determinar el contenido de citocinas. Como puede verse, el IFN-γ y la IL-17 que son secretados, respectivamente, por las células Th1 y Th17, se detectaron a niveles significativamente aumentados en el grupo al que se administraron vesículas extracelulares (10 µg).

15 A partir de los datos, se puede entender que las vesículas extracelulares de *Staphylococcus aureus* se pueden usar como vacuna para inducir defensa mediada por Th1 y contra infecciones bacterianas, así como la producción de anticuerpos IgG, esenciales para la inmunidad humoral, con lo que se previenen de un modo eficaz las enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus* y las vesículas extracelulares bacterianas.

**EJEMPLO 23: Inducción de la producción de anticuerpos y respuesta inmunitaria de células T tras administración transdérmica (parche) de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

20 Se evaluó la inducción de inmunidad mediante la administración transdérmica de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. Con este fin, se administraron 5 µg de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* preparadas en el Ejemplo 13 durante 4 semanas utilizando un parche (Figura 44). La figura 45 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgG en suero después de la administración transdérmica de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. Como se muestra en el gráfico, la administración transdérmica de las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* indujo en gran medida la producción de anticuerpos IgG específicos de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, en comparación con PBS.

30 Para evaluar las respuestas inmunitarias de células T inducidas por las vesículas extracelulares de *Staphylococcus aureus*, se separaron las células inmunes del bazo y se incubaron *in vitro* durante 24 horas con 0,1 µg /ml de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y se analizaron los medios de cultivo para determinar el contenido de citocinas. Los resultados se representan en la figura 46.

Como se desprende de los datos de la figura 46, los niveles de IFN-γ e IL-17 que son secretados, respectivamente, por las células Th1 y Th17 aumentaron considerablemente sobre los del grupo al que se administró PBS.

35 Por lo tanto, la inmunidad mediada por Th1 y Th17 contra las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* puede inducirse mediante la administración de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*, incluso cuando se administran por vía transdérmica, provocan inmunidad mediada por células T, así como la producción de anticuerpos, de modo que se pueden utilizar para prevenir o tratar infecciones y enfermedades producidas por *Staphylococcus aureus* causadas por las vesículas extracelulares derivadas de las bacterias.

40 **EJEMPLO 24: Inducción de la producción de anticuerpos y respuesta inmunitaria de células T mediante la administración combinada de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* (polyI:C)**

45 Las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* preparadas en el Ejemplo 2 se inyectaron por vía intraperitoneal a una dosis de 5 µg solas o en combinación con 20 µg del ácido poliinosínico-policitidílico de ARNdc sintético (polyI: C) tres veces a intervalos regulares de una semana a ratones (C57B6, machos). Los días 7 y 9 después de la inmunización final, se infectó a los ratones con *Staphylococcus aureus* ( $2,4 \times 10^8$  células) mediante inyección intraperitoneal (Figura 47). Se tomaron muestras de sangre, se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron a 4 °C y 3.500 x g durante 10 minutos para obtener los sueros como sobrenadantes.

50 La figura 48 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgG, un índice de la respuesta inmunitaria a las vesículas extracelulares, medidos mediante ELISA. Como puede verse, la inyección combinada de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y polyI: C indujo niveles más altos de anticuerpos específicos para las proteínas presentes en *Staphylococcus aureus* o sus vesículas.

55 Para evaluar las respuestas inmunitarias de células T inducidas por la administración combinada de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y polyI:C, las células inmunitarias se separaron del bazo y se incubaron *in vitro* durante 72 horas, y los medios de cultivo se analizaron para determinar el contenido de citocinas. Los resultados se representan en la figura 49. Como se desprende de los datos de la figura 49, los niveles de IFN-γ

e IL-17 secretados, respectivamente, por las células Th1 y Th17 se incrementaron en gran medida en el grupo al que se administró de forma conjunta vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y polyI:C, en comparación con los otros grupos.

5 A partir de estos resultados, puede deducirse que la administración de vesículas extracelulares de *Staphylococcus aureus* en combinación con un inmunoestimulante, tal como polyI:C induce más eficazmente la producción de anticuerpos IgG para la inmunidad humoral así como respuestas inmunitarias mediadas por Th1 y Th17 contra las infecciones bacterianas con respecto a la vacuna vesicular por sí solo, por lo que la vacuna vesicular en combinación con un inmunoestimulante puede usarse para la prevención de infecciones y enfermedades producidas por *Staphylococcus aureus* causadas por vesículas extracelulares bacterianas.

10 **EJEMPLO 25: Eficacia farmacéutica de una combinación de una vacuna de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y polyI en un modelo animal de neumonía inducida por *Staphylococcus aureus***

15 Para establecer modelos animales de neumonía inducida por *Staphylococcus aureus*, se administró *Staphylococcus aureus* a una dosis de  $4 \times 10^8$  o  $2 \times 10^8$  UFC a los ratones por inhalación intranasal y se examinaron las tasas de supervivencia. Todos los ratones habían muerto 24 horas después de la administración de  $4 \times 10^8$  UFC, mientras que la tasa de supervivencia de los ratones a los que se administraron  $2 \times 10^8$  UFC fue del 40 % (Figura 50).

20 Para confirmar el efecto de la vacuna vascular en el modelo animal de neumonía inducida por *Staphylococcus aureus*, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal tres veces 5 µg de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* y 20 µg de polyI:C juntos como en el Ejemplo 23 y después se expusieron a con  $2 \times 10^8$  UFC de *Staphylococcus aureus* por inhalación intranasal, y se controlaron sus tasas de supervivencia. Veinticuatro horas después de la exposición, se observó que la tasa de supervivencia de los ratones era del 100 % cuando fueron inmunizados con la vacuna vesicular, pero la tasa de supervivencia se redujo a 40 % en los ratones que no habían sido inmunizados (Figura 51).

25 Estos datos demuestran que la vacuna vesicular puede prevenir de manera muy eficaz la neumonía inducida por *Staphylococcus aureus* y la muerte.

EJEMPLO 26: Inducción de la producción de anticuerpos y respuesta inmunitaria de células T mediante inyección intraperitoneal de vesículas extracelulares derivadas de *Enterococcus faecalis*

30 Se aislaron vesículas extracelulares de *Enterococcus faecalis* como se describe en el Ejemplo 2. Para evaluar las vesículas extracelulares derivadas de *Enterococcus faecalis* como vacuna para inducir respuestas inmunitarias, las vesículas extracelulares derivadas de *Enterococcus faecalis* se inyectaron por vía intraperitoneal a una dosis de 5 o 10 µg en ratones (C57B6, machos) dos veces a intervalos regulares de una semana. Las respuestas inmunitarias se evaluaron 72 horas después de la inyección final.

35 Se tomaron muestras de sangre, se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron a 4 °C y 3.500 x g durante 10 minutos para tomar el suero como sobrenadante. La figura 52 es un gráfico en el que los niveles mediante ELISA de anticuerpos IgG, un índice de la respuesta inmunitaria a las vesículas extracelulares, se representan frente a dosis de la vacuna, que muestra que los anticuerpos específicos de las proteínas vesiculares se produjeron mediante dos inyecciones intraperitoneales de las vesículas extracelulares.

40 Para evaluar las respuestas inmunitarias de células T inducidas mediante la administración de *Enterococcus faecalis*, se separaron las células inmunitarias del bazo tras la inyección de las vesículas y se incubaron in vitro durante 72 horas, y los medios de cultivo se analizaron para determinar el contenido de citocinas. Los resultados se representan en la figura 53.

Como se desprende de los datos de la figura 53, los niveles de IFN-γ que son secretados de las células Th1 se incrementaron en gran medida en el grupo al que se administraron las vesículas extracelulares (10 µg), en comparación con los otros grupos.

45 A partir de los datos, se puede entender que las vesículas extracelulares de *Enterococcus faecalis* se pueden usar como vacuna para inducir defensa mediada por Th1 y contra infecciones bacterianas, así como la producción de anticuerpos IgG, esenciales para la inmunidad humoral, con lo que se previenen de un modo eficaz las infecciones causadas por *Enterococcus faecalis* y las enfermedades causadas por las vesículas extracelulares bacterianas.

50 **EJEMPLO 27: Análisis genético de ARNr 16S y ADN de vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus***

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó sobre *Staphylococcus aureus* y vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus* (0,2, 0,5, 1,0 µg) usando cebadores para ARNr 16S de *Staphylococcus* (directo: AGCTTGCTTCTCTGATGTTA, inverso: TTTCACCTTTTGAACCATGCG) [95 °C, 5 minutos - (94 °C, 30 segundos - 46 °C, 30 segundos, 72 °C, 20 segundos) x 35 ciclos - 72 °C, 7 minutos - 4 °C]. Se usó *E. coli* como

control negativo en las mismas condiciones. Los productos de la PCR con transcripción inversa y de la PCR se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El resultado se representa en la figura 54.

Como se muestra en la figura 54, las bandas se leyeron a 120 pb, lo que demuestra la presencia de ARN y ADN en las vesículas extracelulares derivadas de *Staphylococcus aureus*.

- 5 Aunque las realizaciones preferentes de la presente invención se han divulgado con fines ilustrativos, los expertos en la técnica apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance de la invención como se divulga en las reivindicaciones adjuntas.

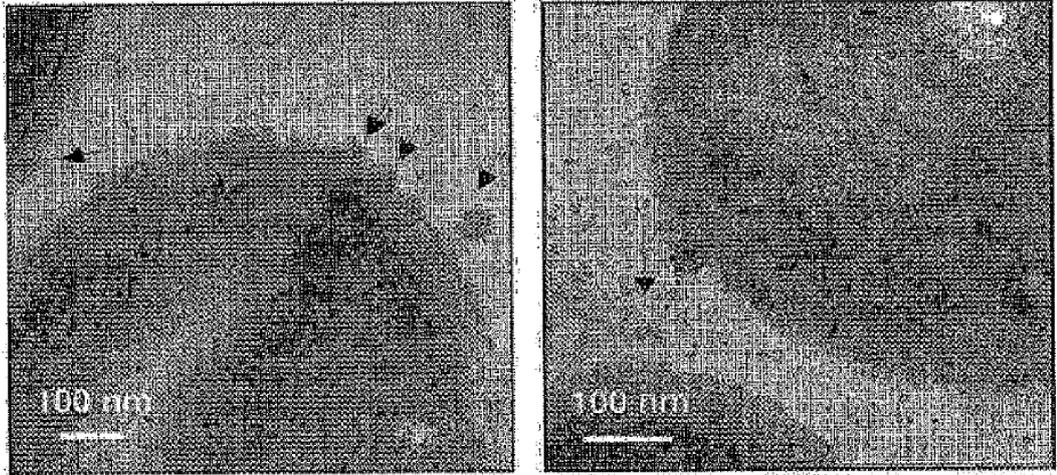
**Aplicabilidad industrial**

- 10 Las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas de la presente invención se pueden usar para establecer modelos animales de enfermedad que permitan el descubrimiento eficaz de fármacos preventivos o terapéuticos de enfermedades inducidas por vesículas extracelulares derivadas por bacterias grampositivas. Asimismo, las propias vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas o sus modificaciones se pueden usar para desarrollar vacunas contra infecciones por bacterias grampositivas o enfermedades causadas por vesículas extracelulares derivadas por bacterias grampositivas. Además, las vesículas extracelulares derivadas de
- 15 bacterias grampositivas pueden aplicarse al desarrollo de un procedimiento para el diagnóstico de los factores patogénicos responsables de la aparición de enfermedades causadas por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.

**REIVINDICACIONES**

1. Vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular, siendo las bacterias grampositivas *Staphylococcus*, en el que las vesículas extracelulares se aíslan de una secreción del cuerpo interno de un animal o un cultivo de dichas bacterias grampositivas.
- 5 2. Un modelo animal de enfermedad establecido utilizando vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular.
3. El modelo animal de enfermedad de la reivindicación 2, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad dérmica, una enfermedad respiratoria, una enfermedad digestiva, una enfermedad genital, una enfermedad vascular, una enfermedad metabólica, una enfermedad pulmonar, una enfermedad ósea y  
10 una enfermedad de los nervios craneales.
4. Un procedimiento para el establecimiento de un modelo animal de enfermedad, que comprende administrar vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular a un animal.
5. Un procedimiento para el descubrimiento de un biomarcador mediante el uso de un modelo animal de enfermedad establecido con vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular.
- 15 6. Un procedimiento para la detección selectiva de un candidato a fármaco preventivo o terapéutico de una enfermedad causada por vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular, en el que el procedimiento comprende la administración de las vesículas extracelulares a las células junto con un fármaco candidato, y determinar el nivel del mediador relacionado con la inflamación o evaluar una vía de señalización relacionada con la inflamación.
- 20 7. Una vacuna para prevenir o tratar una infección por bacterias grampositivas, que comprende vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas que tienen pared celular, en la que no hay bacterias grampositivas en la vacuna y en la que las vesículas extracelulares se aíslan de una secreción del cuerpo interno de un animal o un cultivo de dichas bacterias grampositivas.
8. La vacuna de la reivindicación 7, en la que la vacuna se modifica utilizando bacterias transformadas o mediante el  
25 tratamiento de las bacterias con un compuesto.
9. La vacuna de la reivindicación 7, en la que la vacuna se modifica mediante el tratamiento de las vesículas extracelulares con un compuesto.
10. La vacuna de la reivindicación 7, en la que la vacuna se usa en combinación con un fármaco para mejorar la eficacia medicinal o aliviar los efectos secundarios.
- 30 11. Un procedimiento para diagnosticar la presencia de un factor patogénico de bacterias grampositivas que tienen pared celular en una muestra, mediante el uso de la detección de las vesículas extracelulares separadas de las mismas.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende analizar una secuencia de bases de una sustancia genética presente dentro de las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.
- 35 13. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende analizar una proteína presente en las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.
14. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende analizar una respuesta inmunitaria frente a las vesículas extracelulares derivadas de bacterias grampositivas.
- 40 15. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el factor patógeno se obtiene de una selección de secreción del grupo que consiste en fluido de lavado de la piel, lágrimas, flema, heces, sangre, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y ascitis.

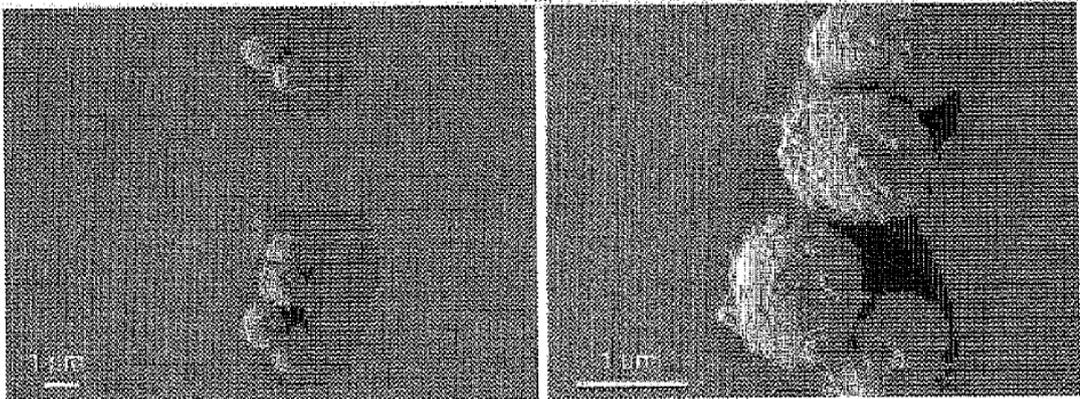
FIG. 1



Barra de escala = 100 nm

Barra de escala = 100 nm

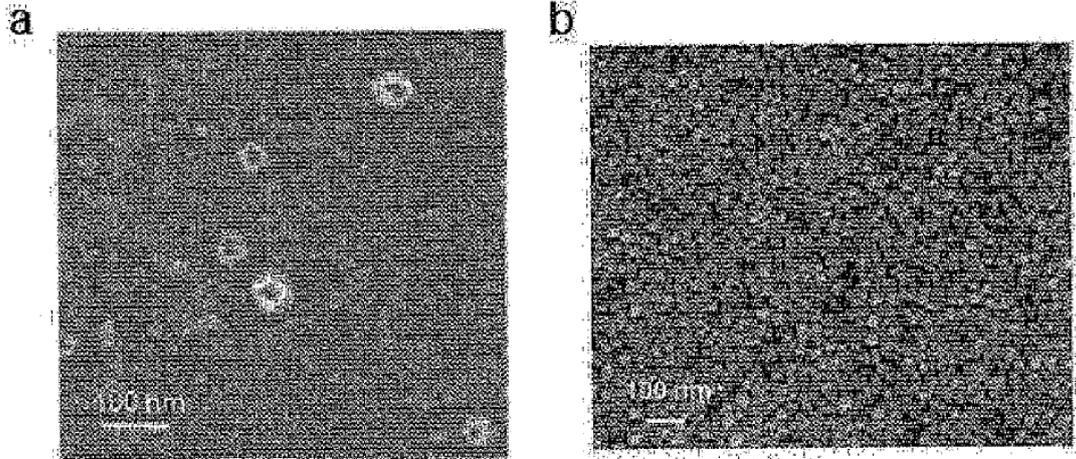
FIG. 2



Barra de escala = 1μm

Barra de escala = 1μm

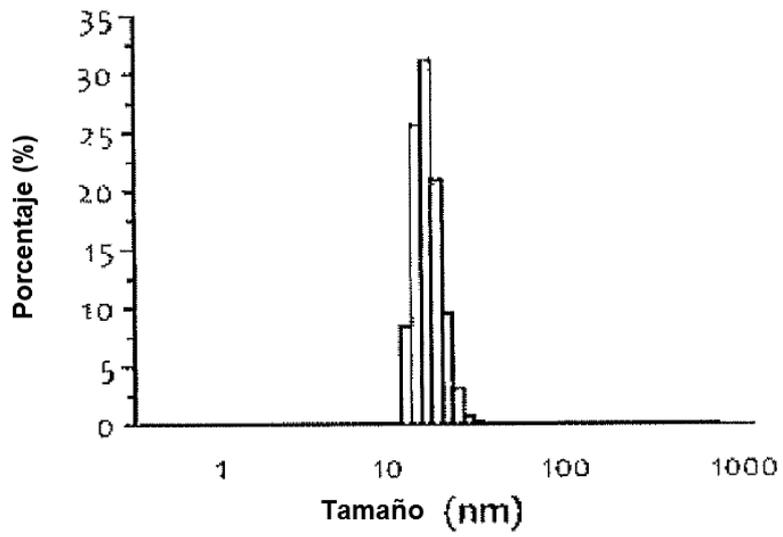
FIG. 3



Barra de escala = 100 nm

Barra de escala = 100 nm

FIG. 4



**Promedio 28,3**

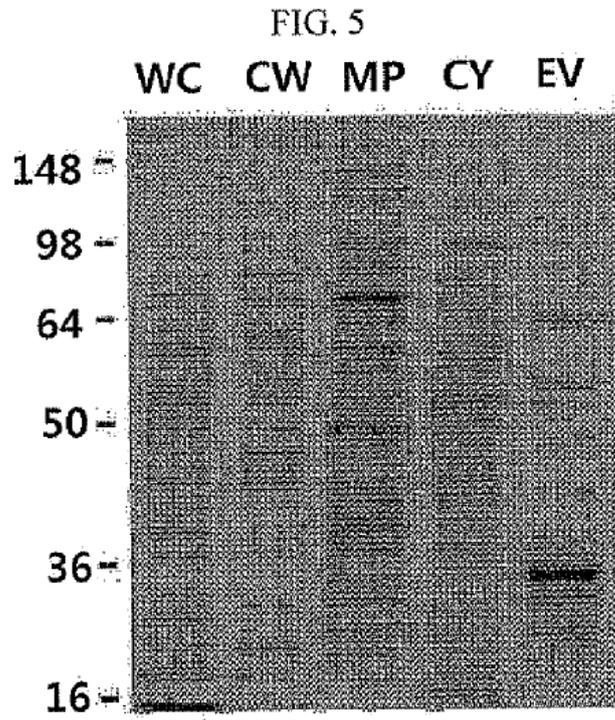
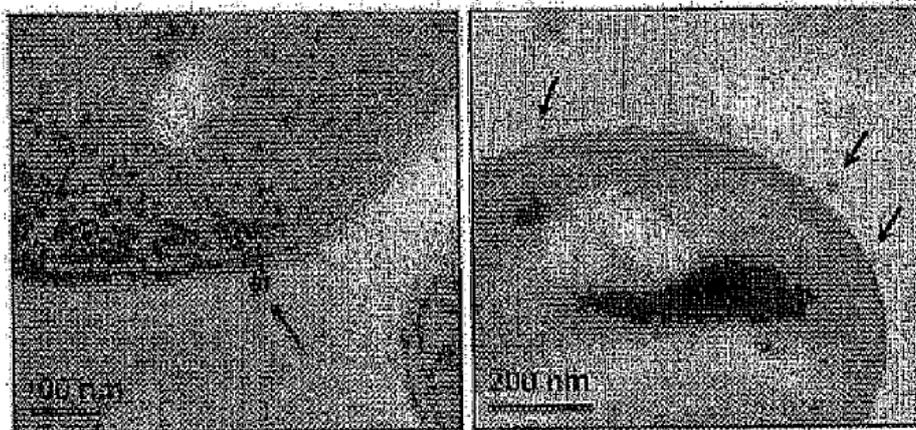
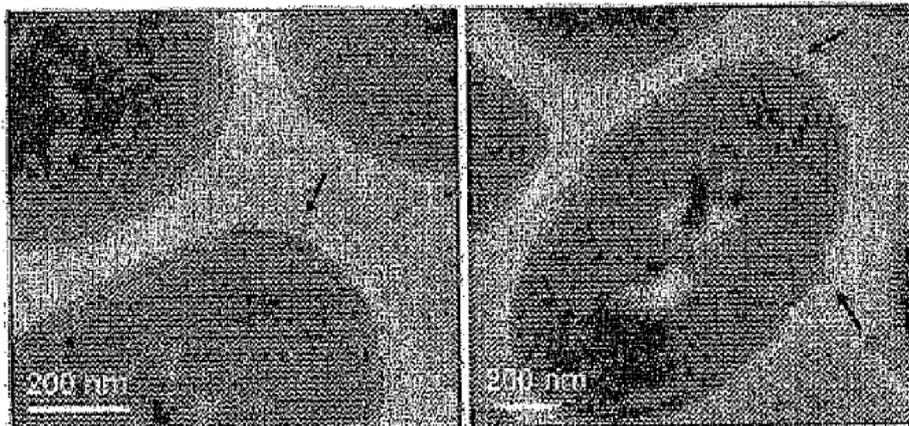


FIG. 6



Barra de escala = 100 nm Barra de escala = 200 nm



Barra de escala = 200 nm Barra de escala = 200 nm

FIG. 7



FIG. 8

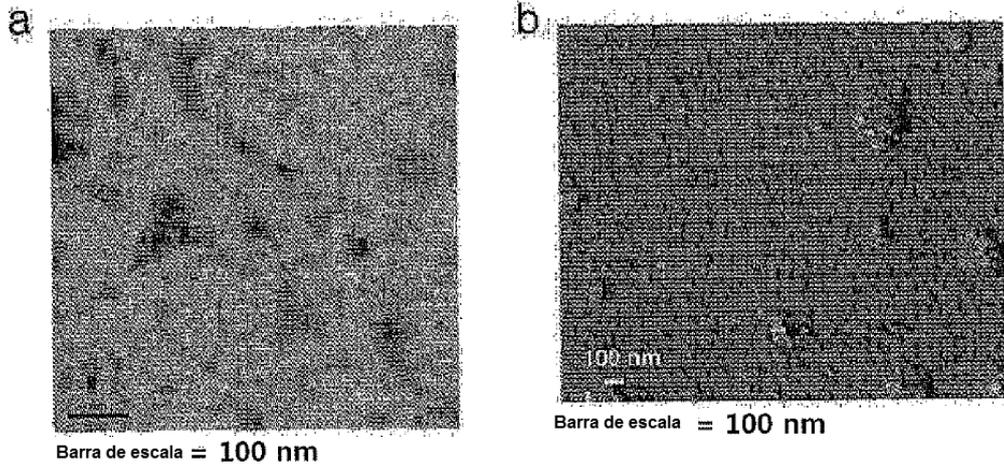


FIG. 9

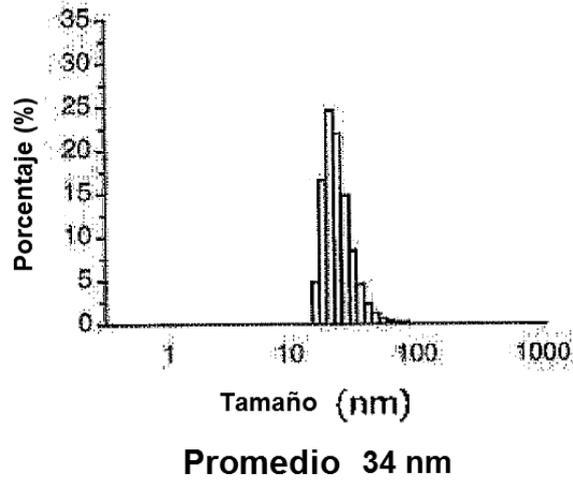


FIG. 10

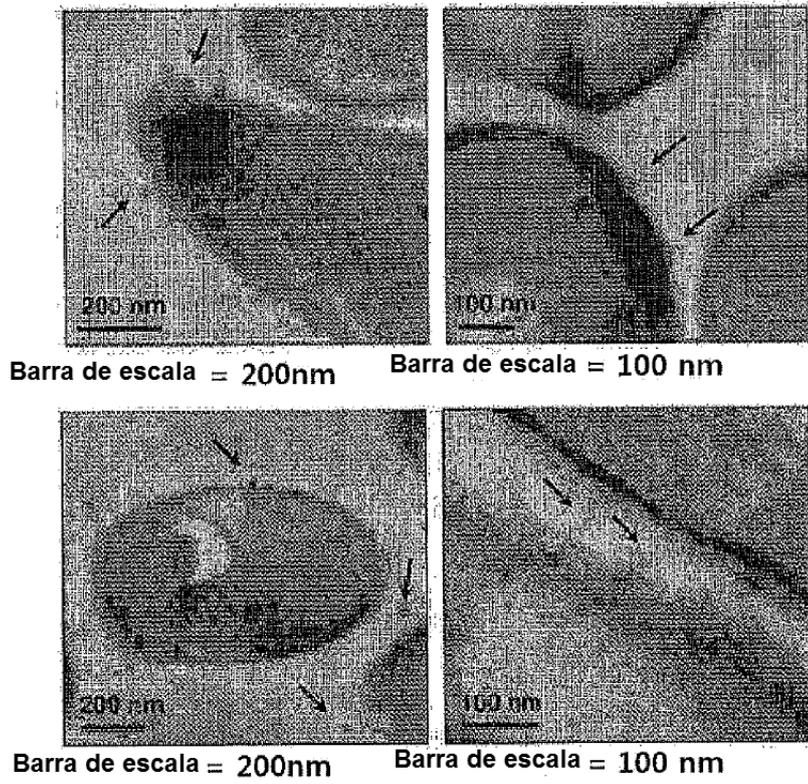


FIG. 11

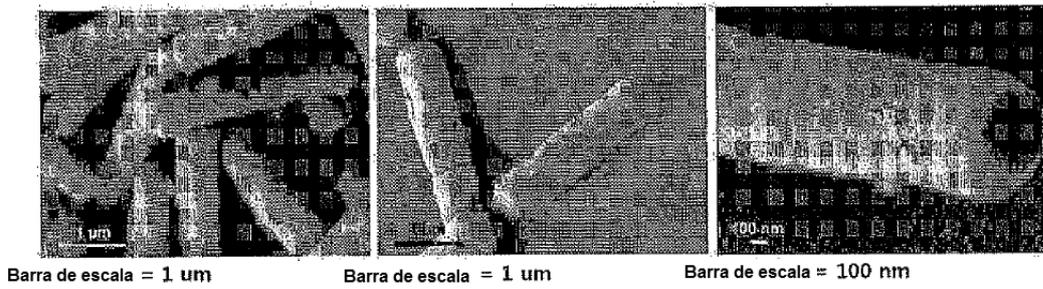
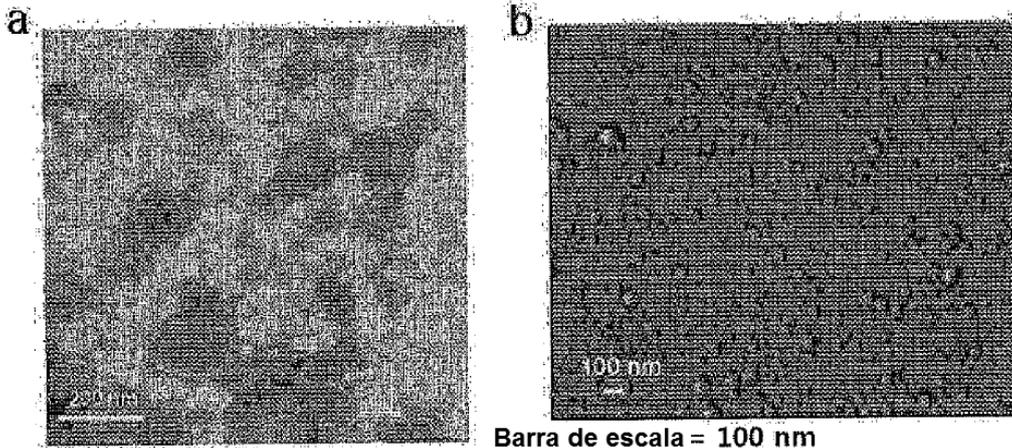


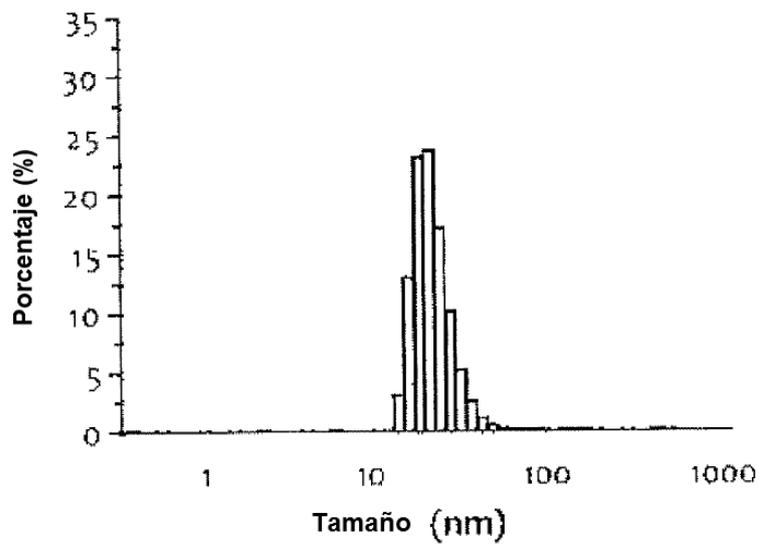
FIG. 12



Barra de escala = 200nm

Barra de escala = 100 nm

FIG. 13



Promedio 30 nm

FIG. 14

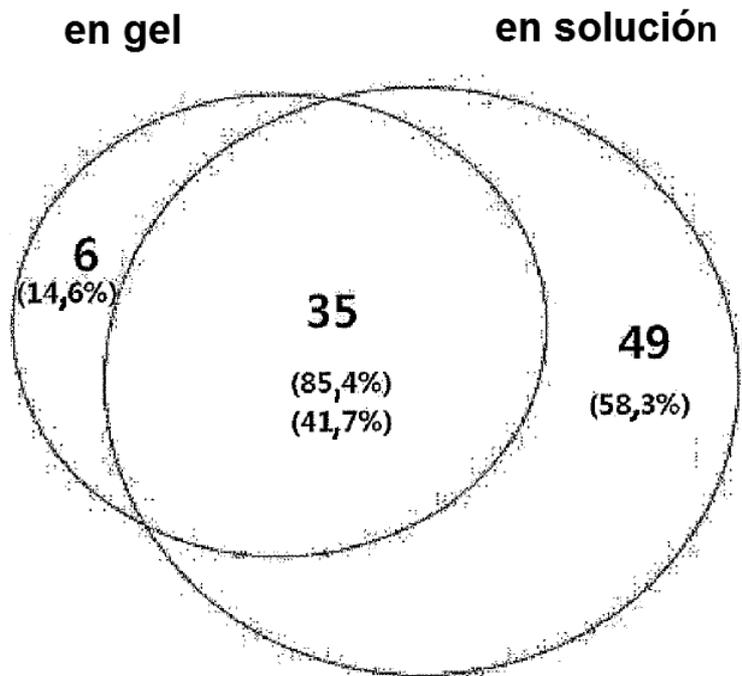


FIG. 15

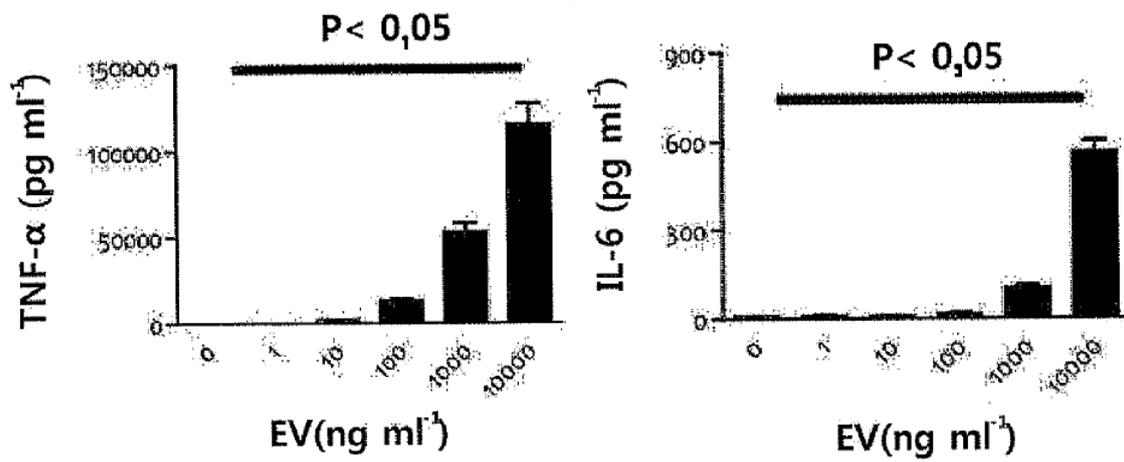


FIG. 16

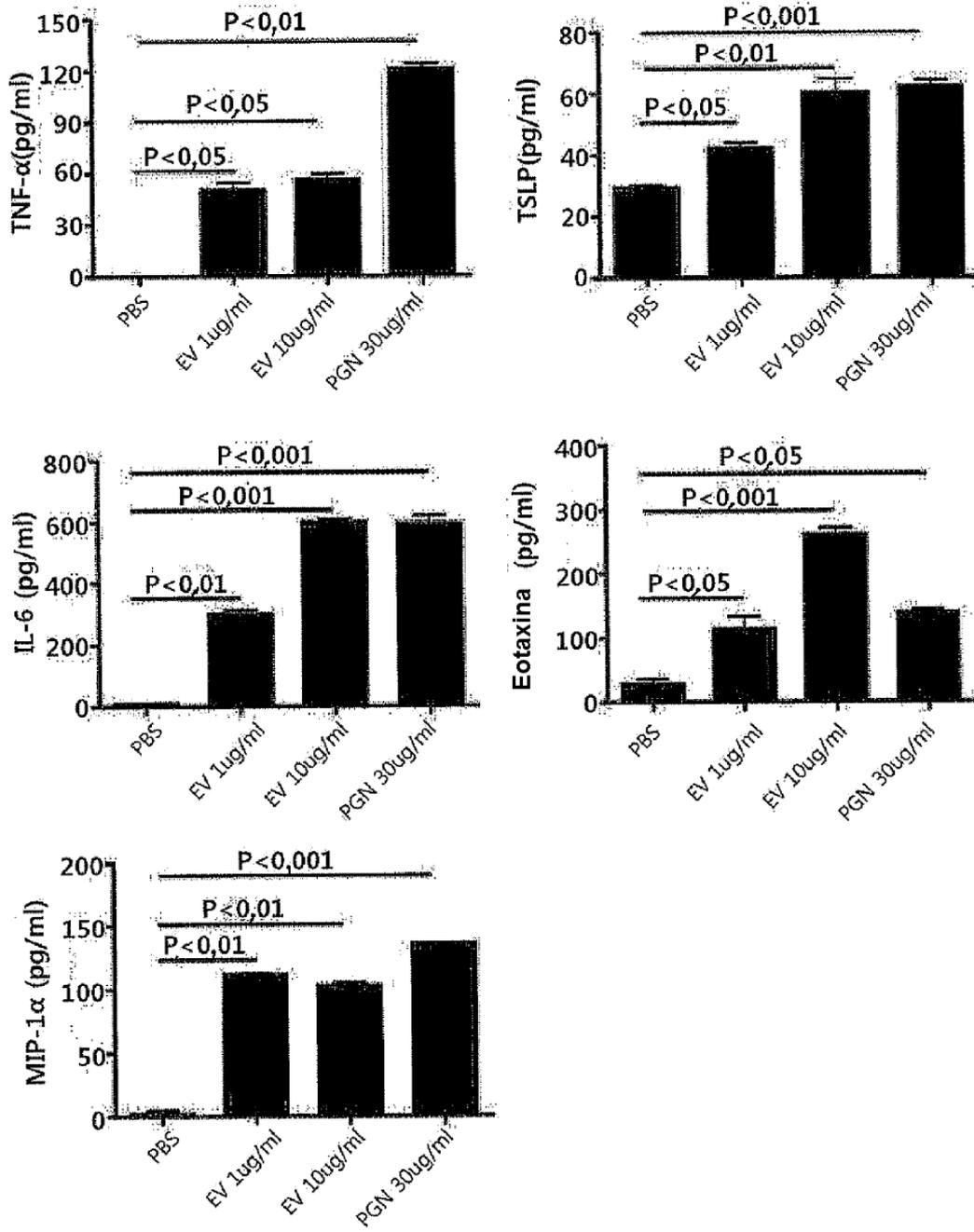


FIG. 17

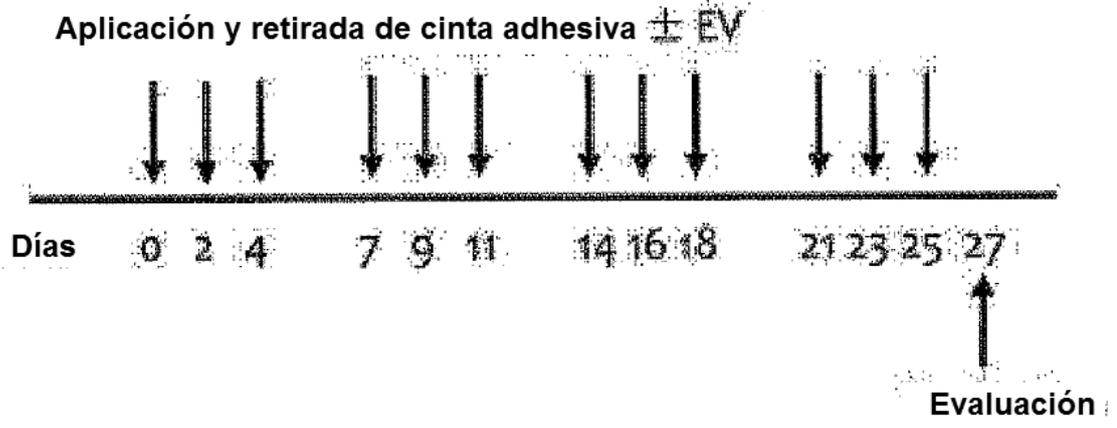
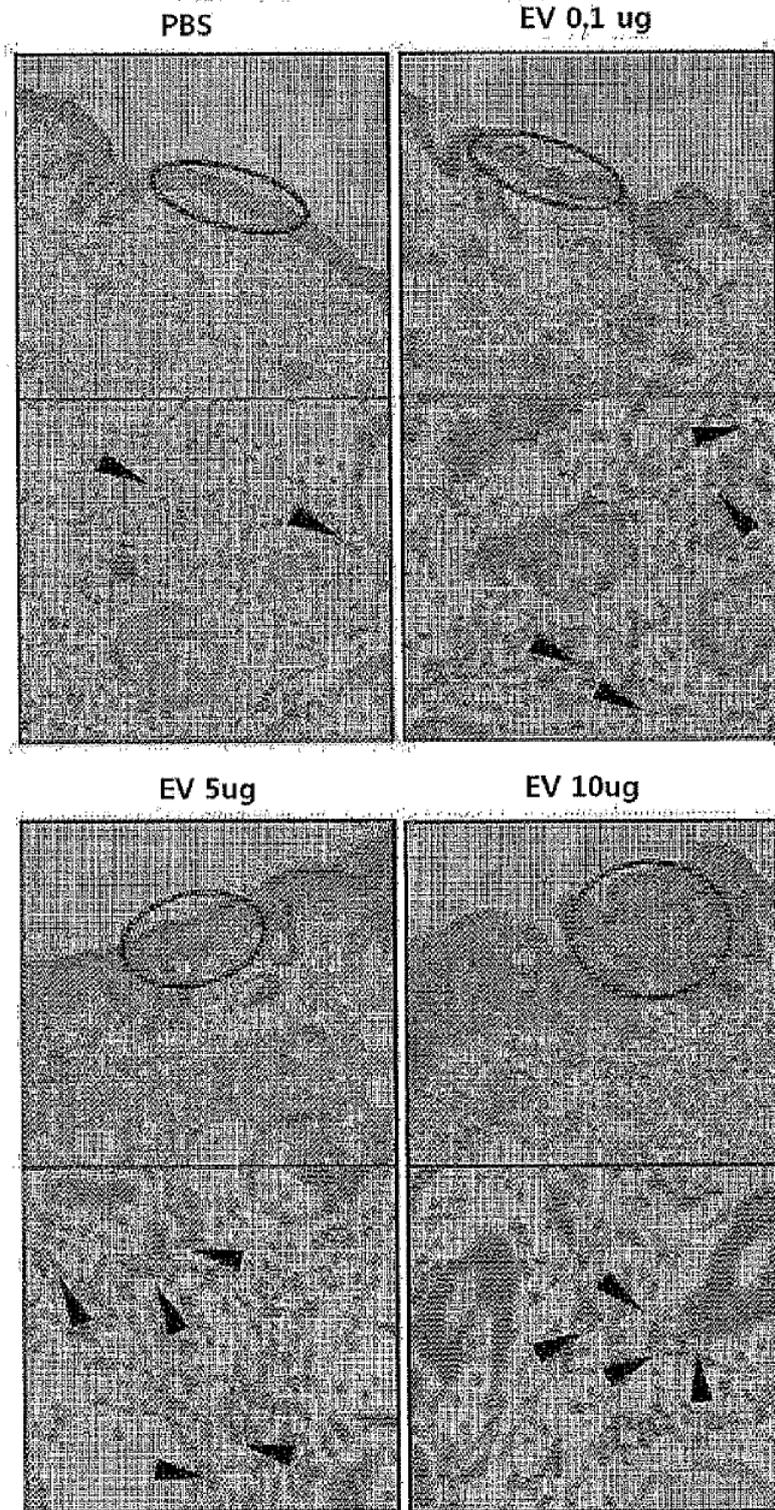
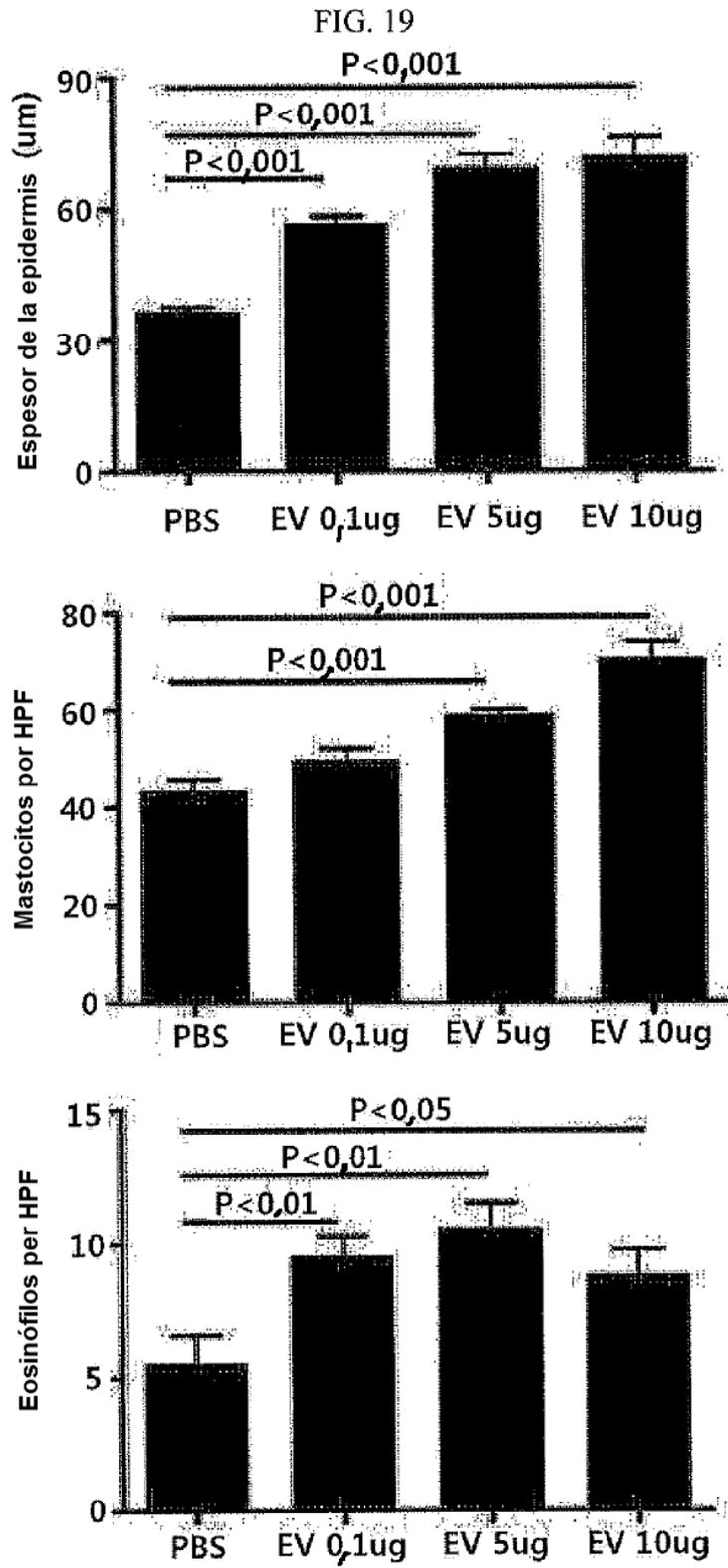


FIG. 18





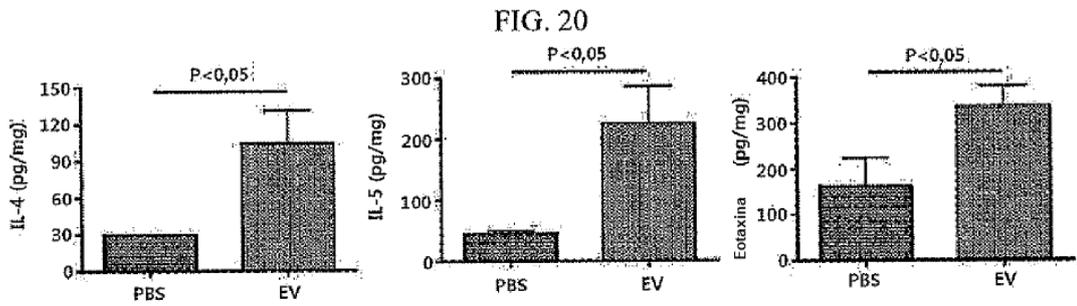


FIG. 21

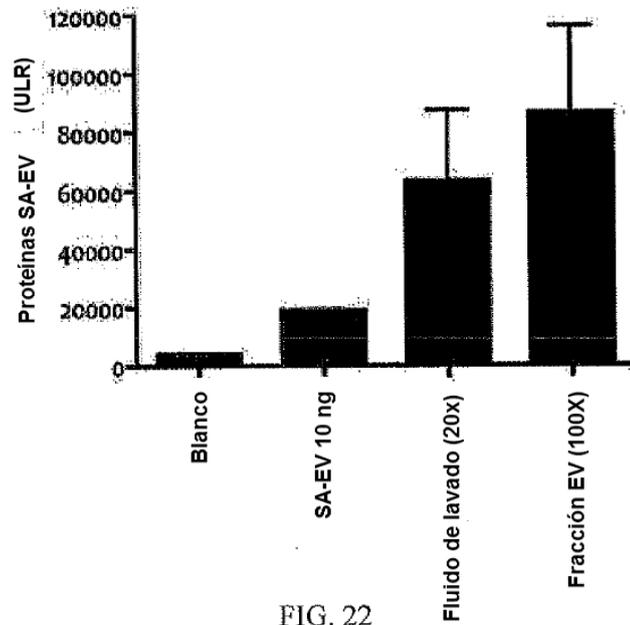


FIG. 22

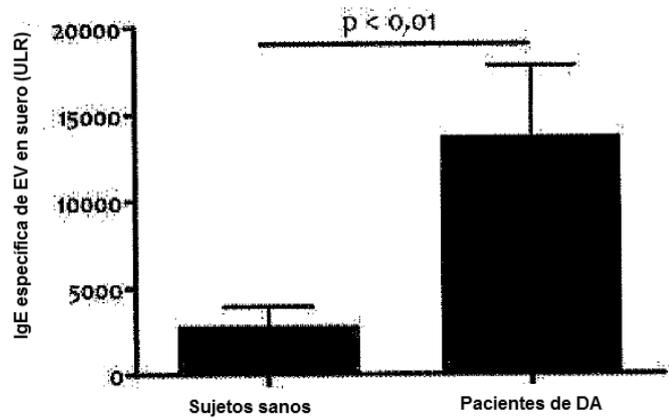


FIG. 23

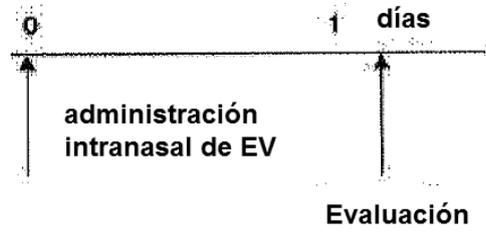


FIG. 24

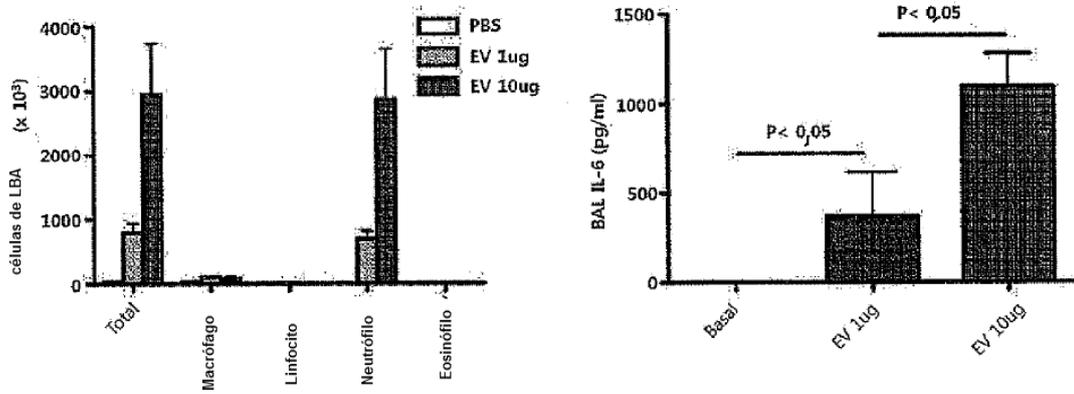


FIG. 25

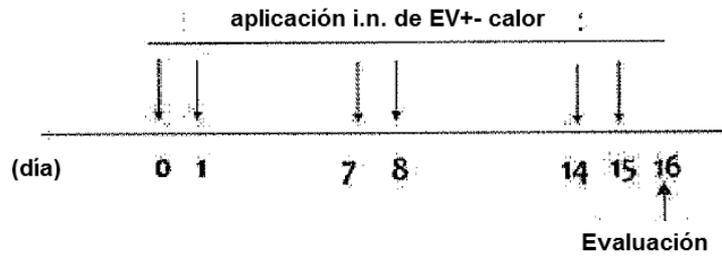


FIG. 26

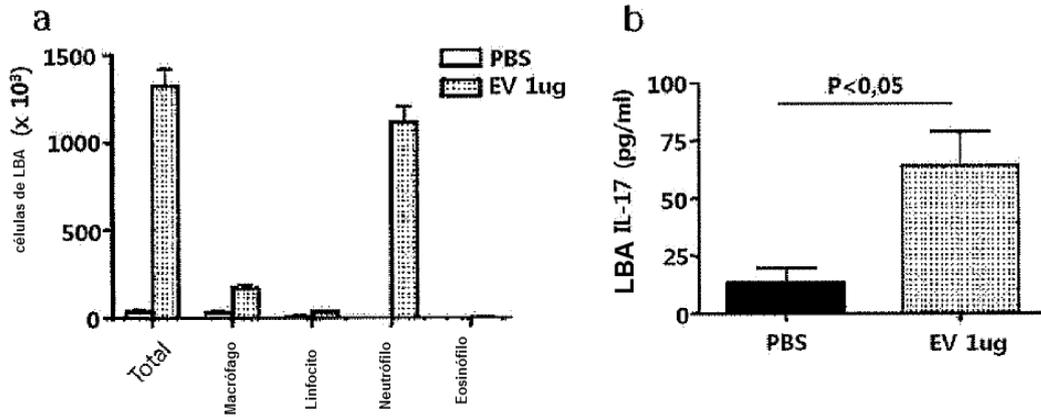


FIG. 27

*Inyección i.v. de EV*

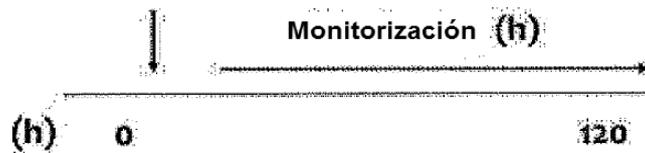


FIG. 28

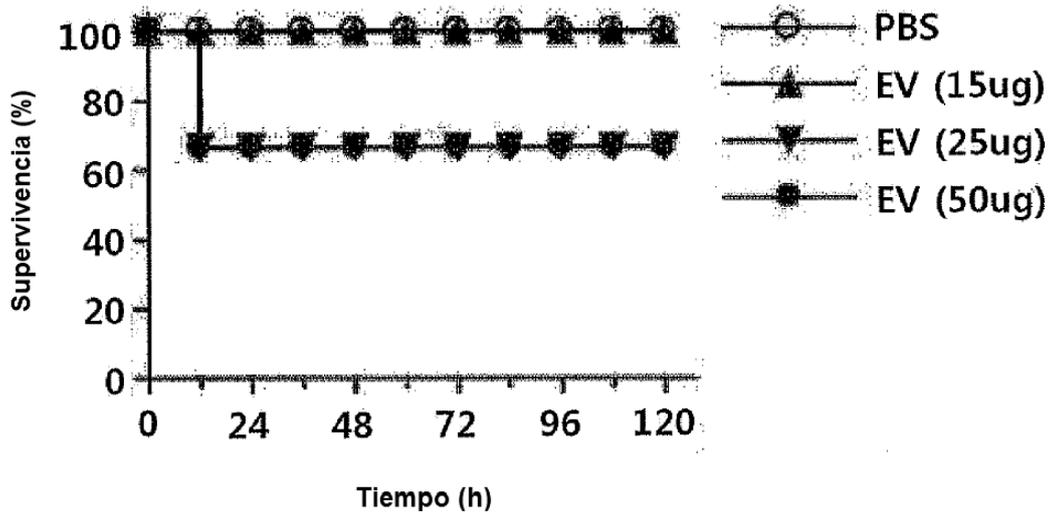


FIG. 29

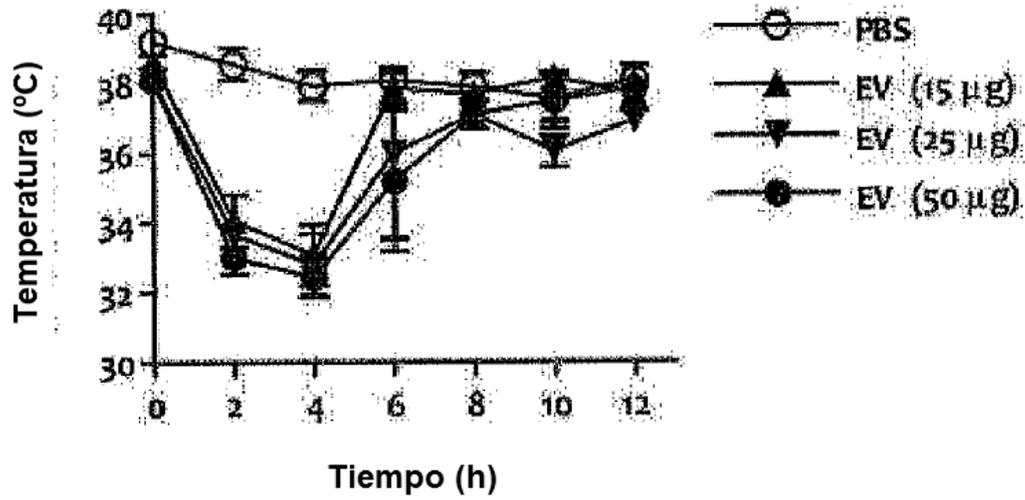


FIG. 30

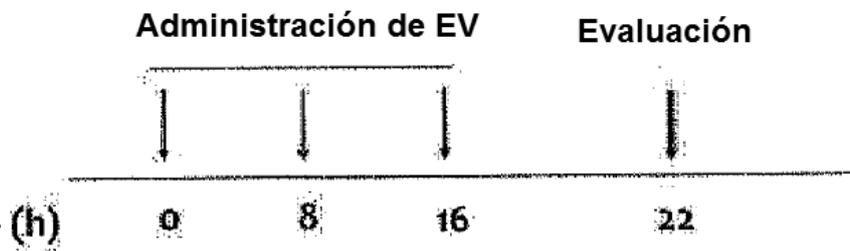


FIG. 31

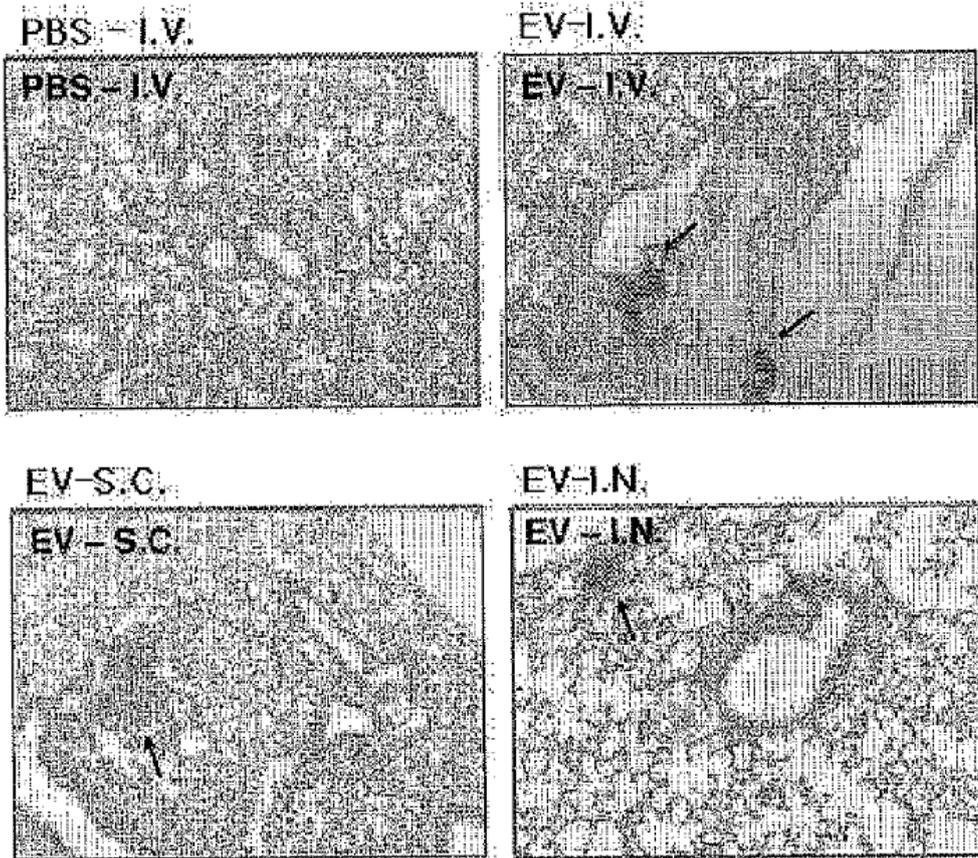


FIG. 32

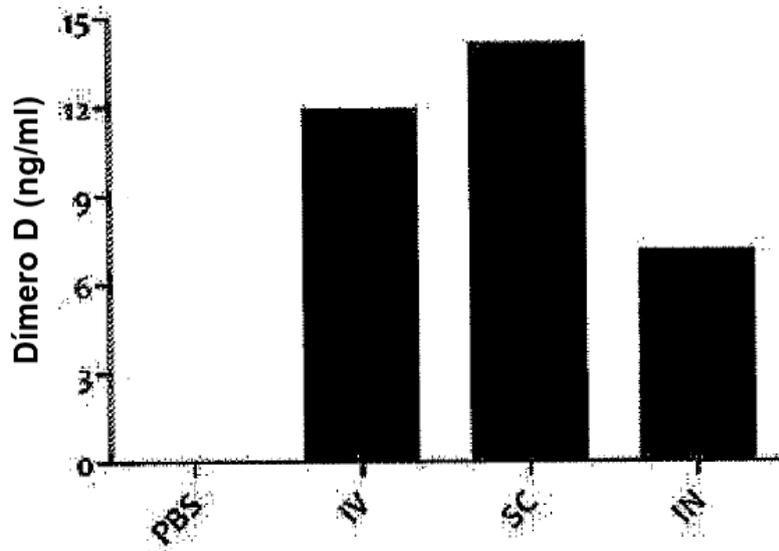


FIG. 33

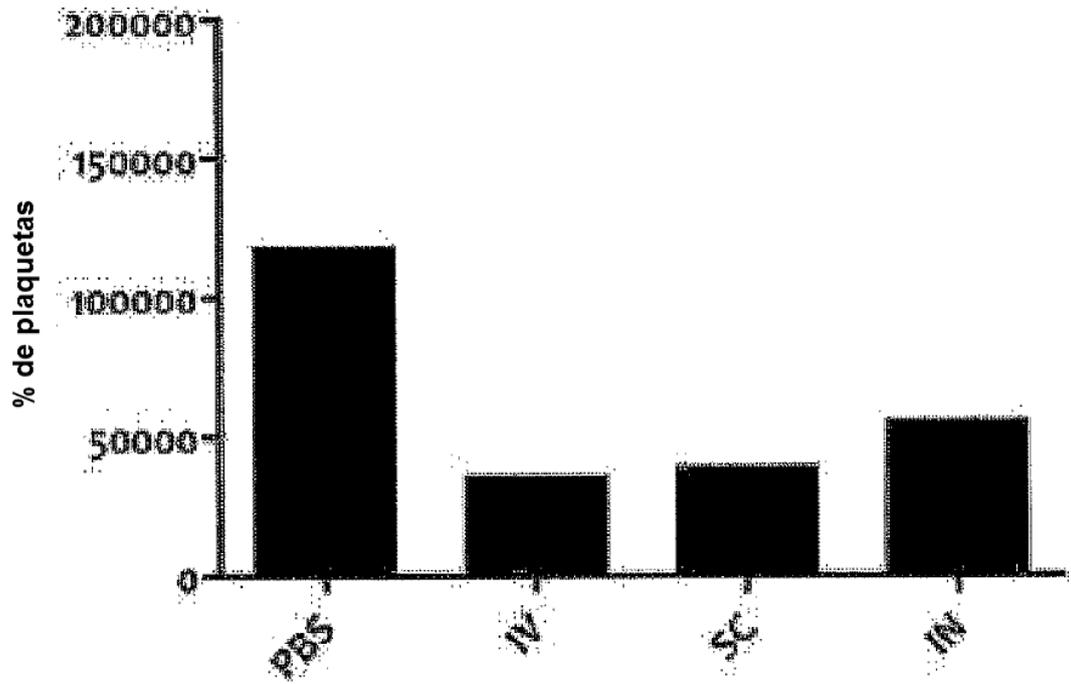


FIG. 34

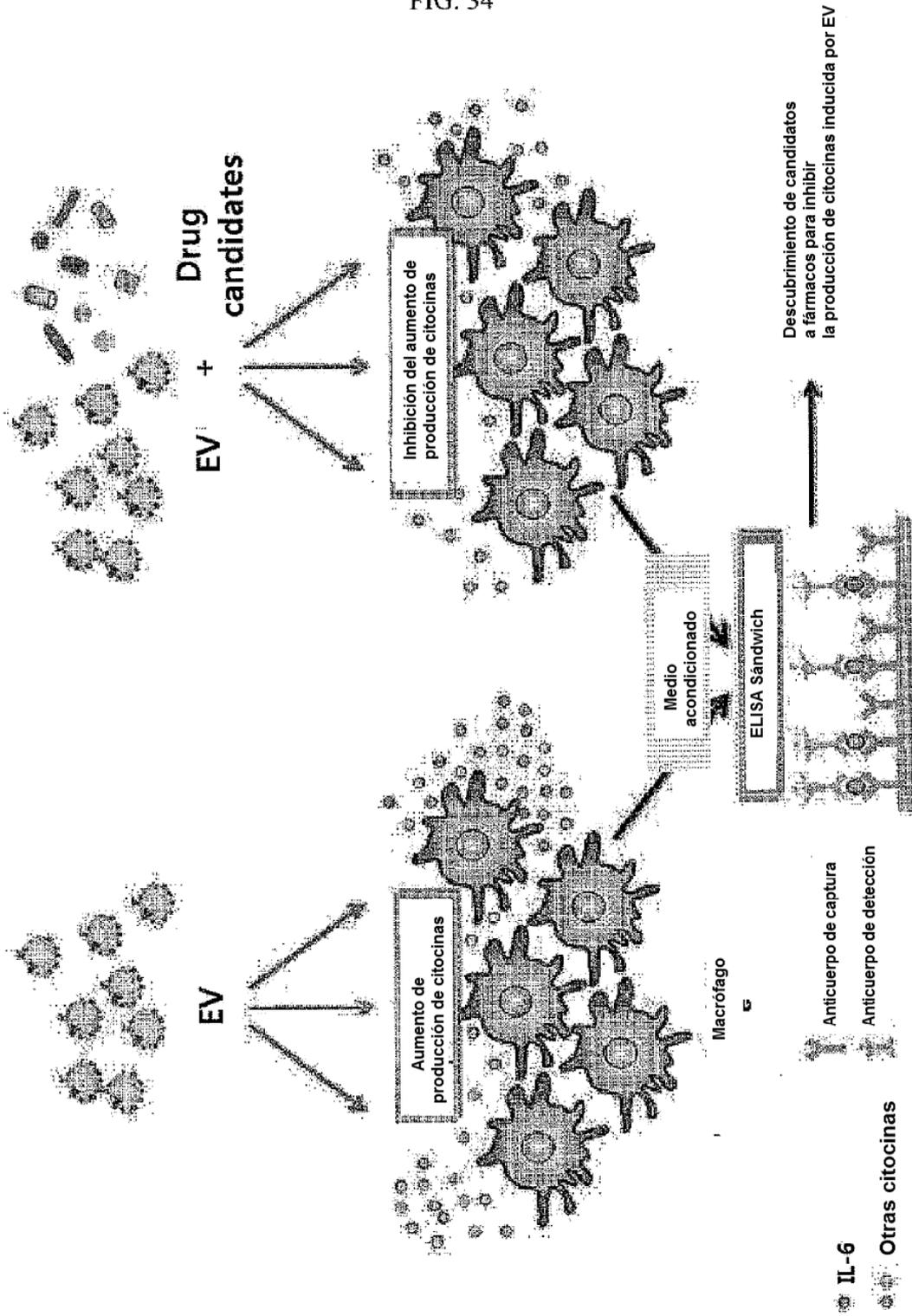


FIG. 35  
IL-6 (% del control)

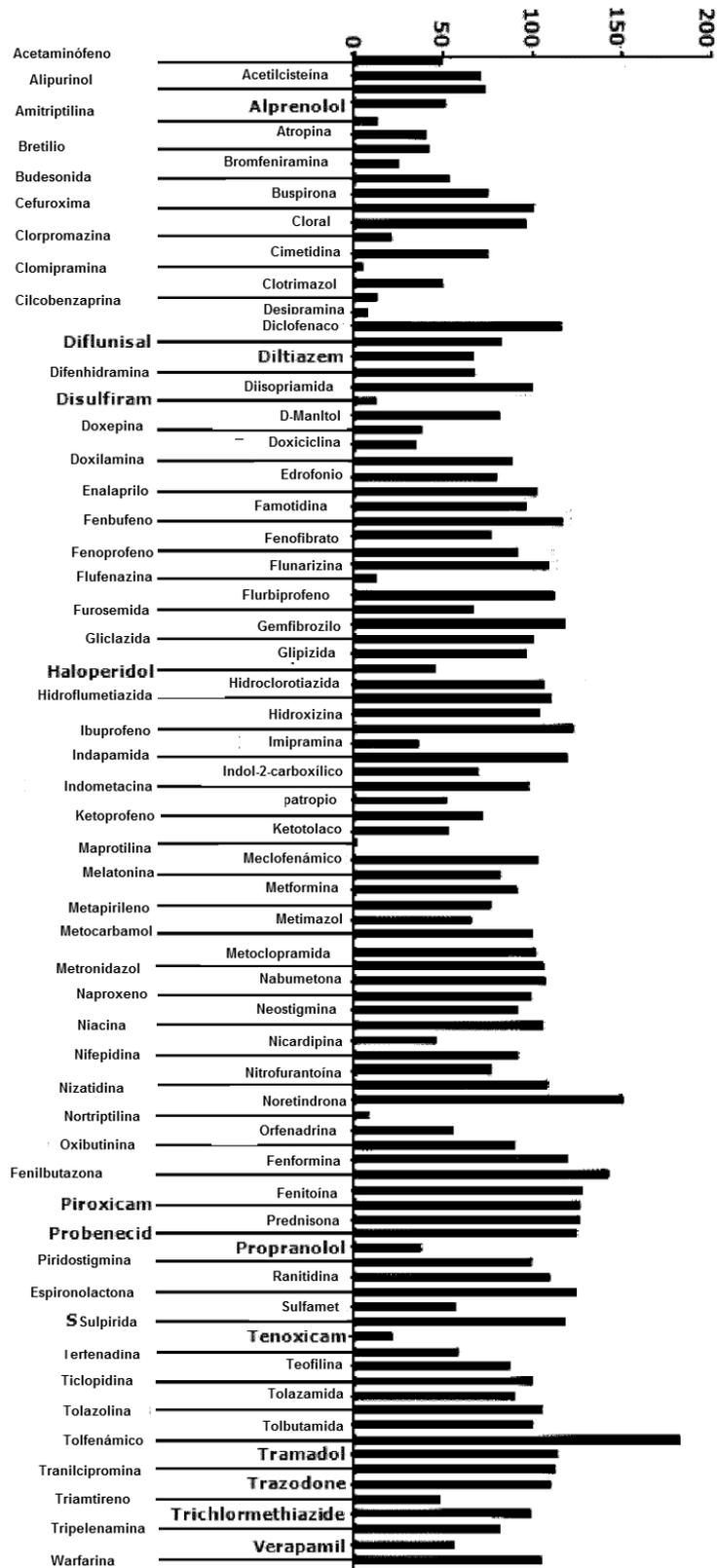


FIG. 36

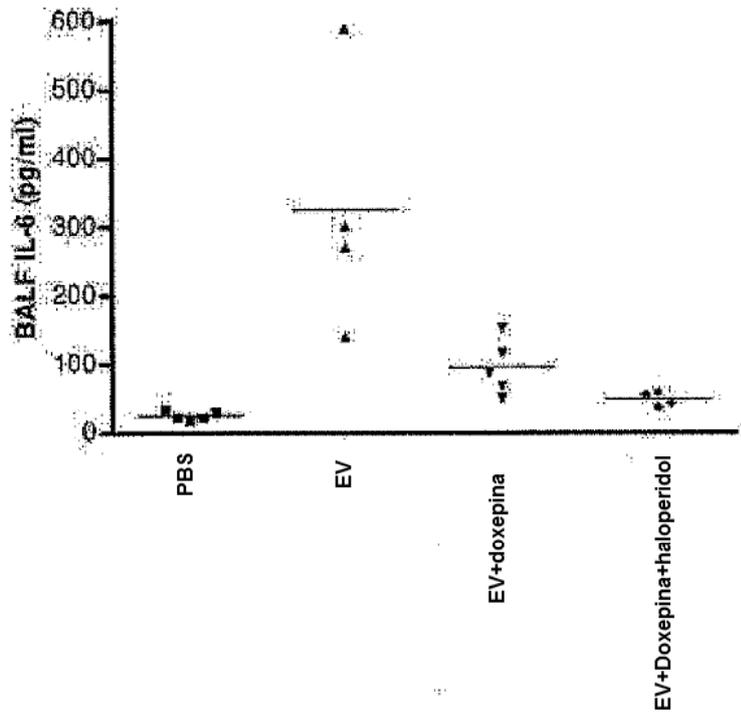


FIG. 37

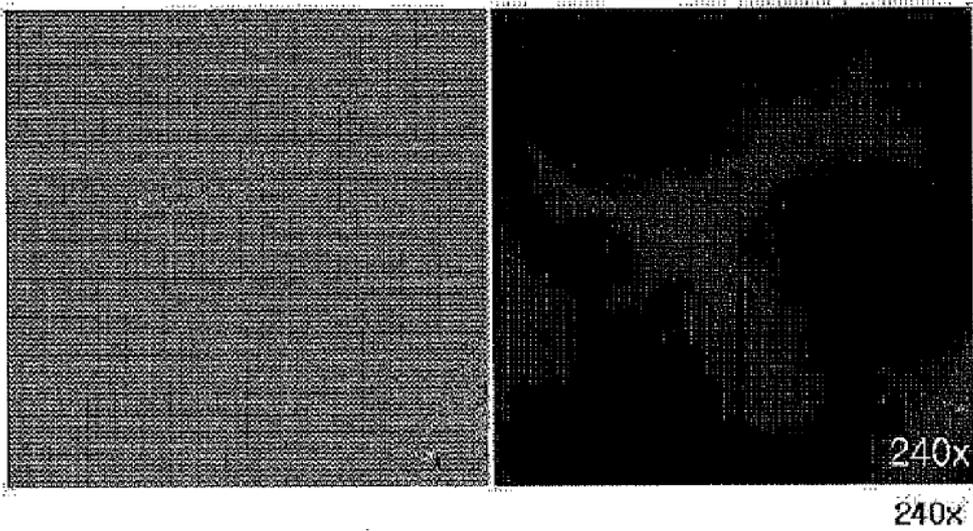


FIG. 38

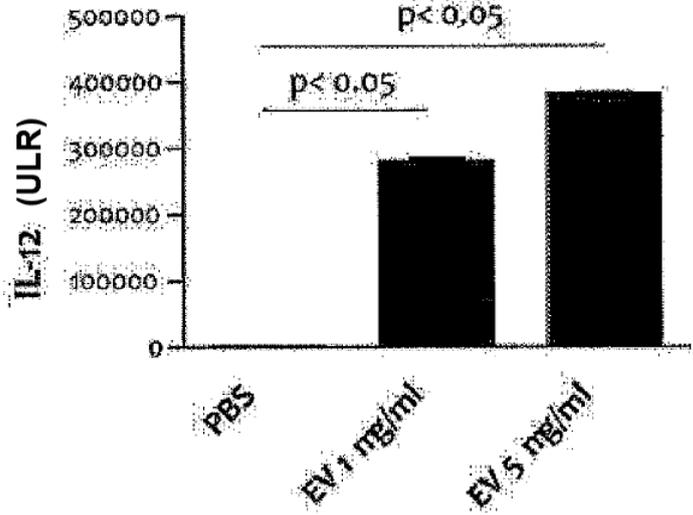
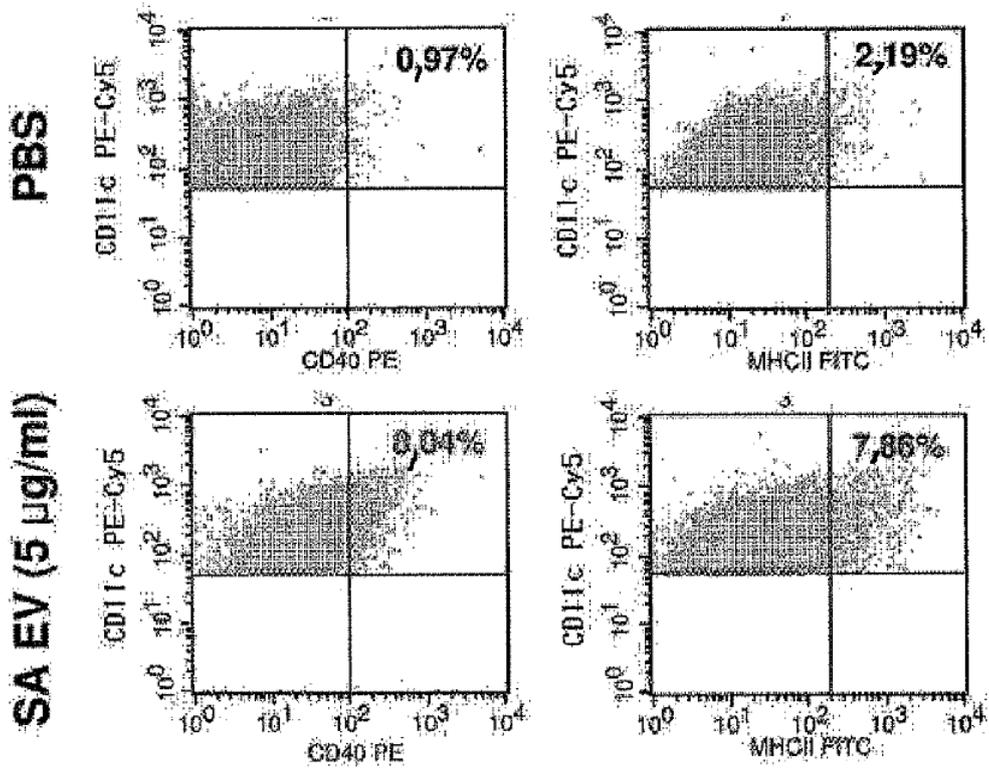


FIG. 39



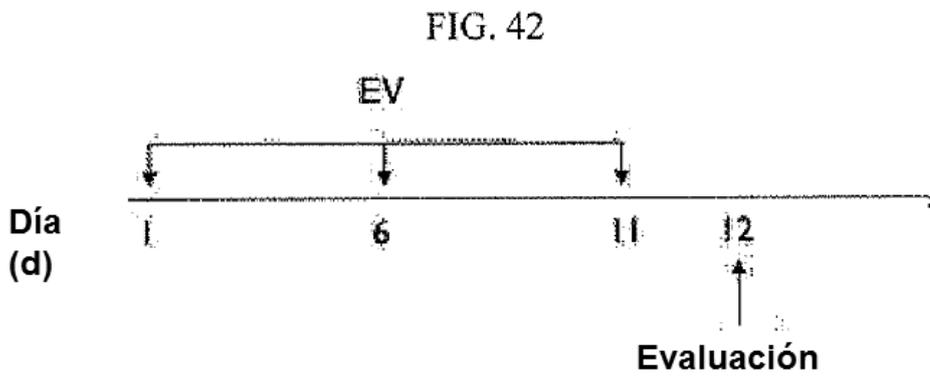
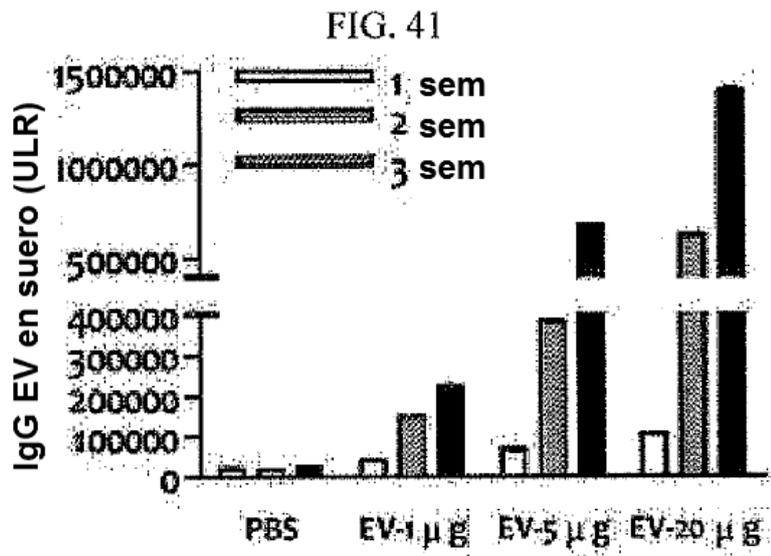
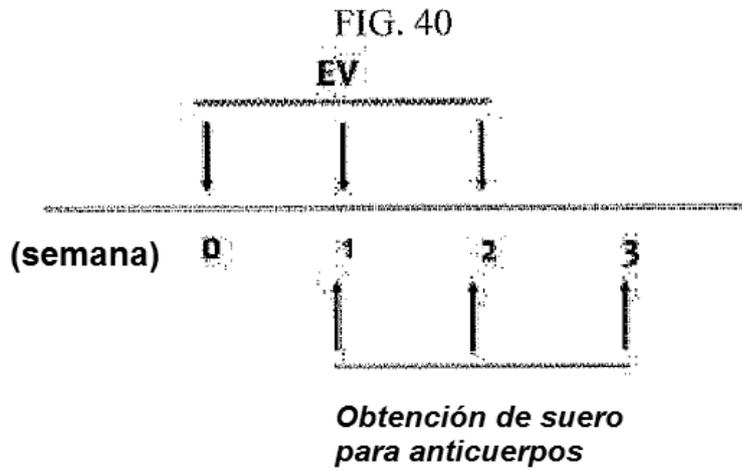


FIG. 43

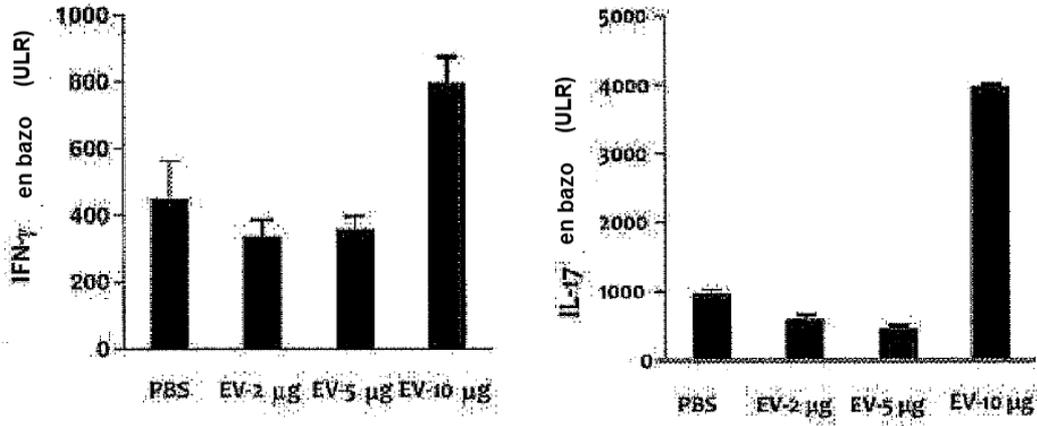


FIG. 44

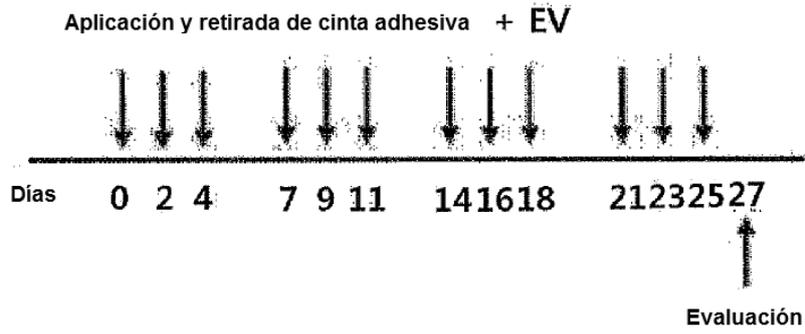


FIG. 45

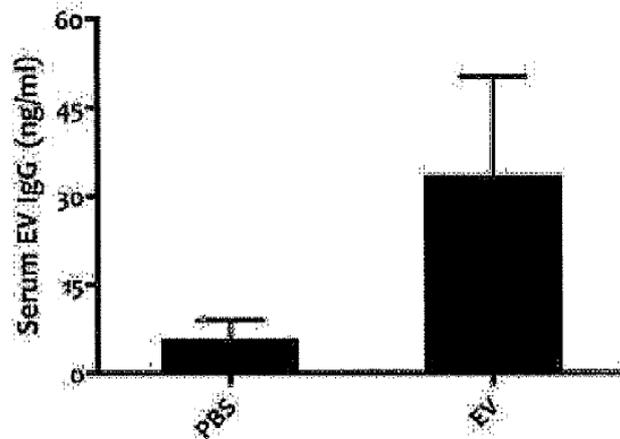


FIG. 46

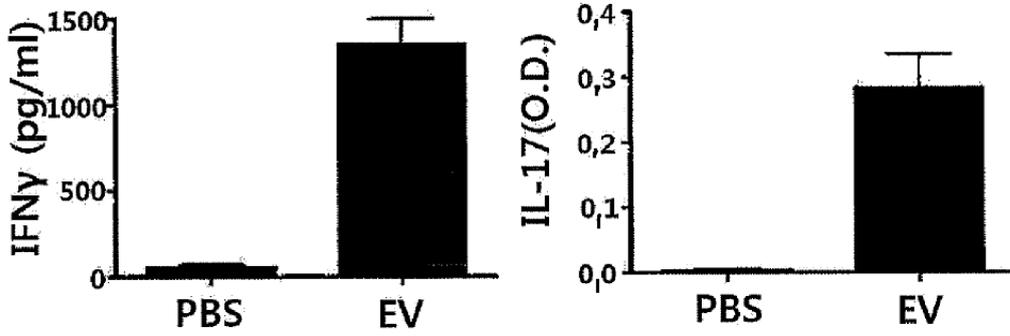


FIG. 47

EV + polyI:C

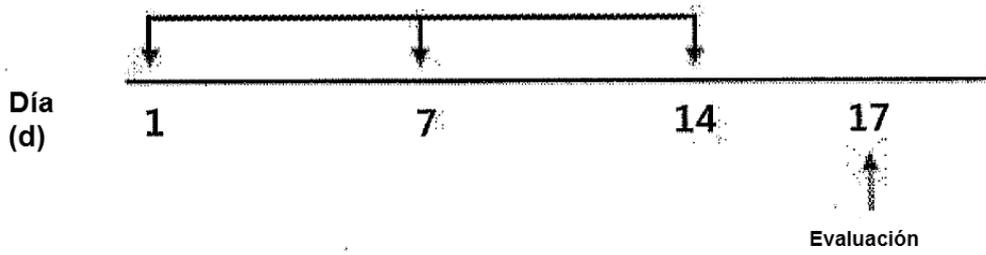


FIG. 48

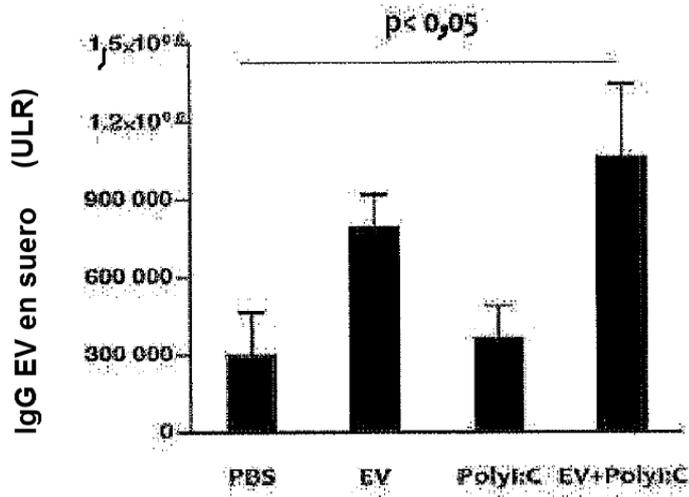


FIG. 49

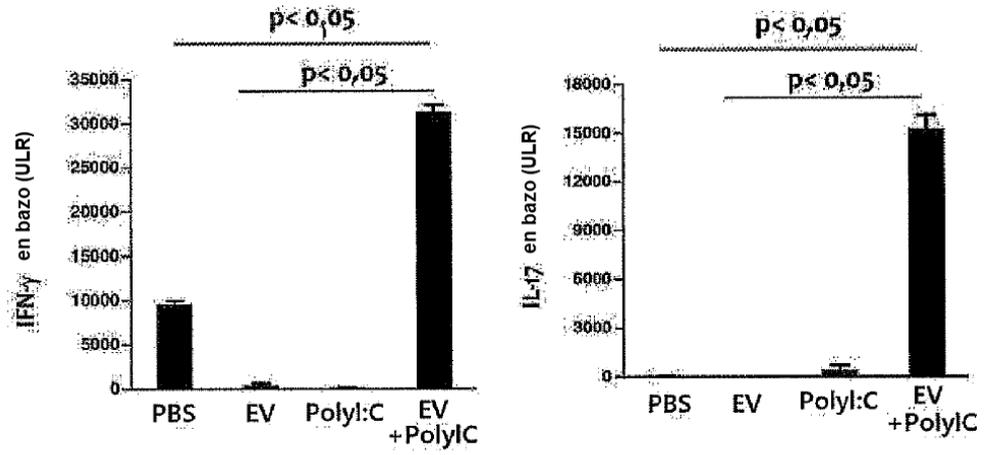


FIG. 50

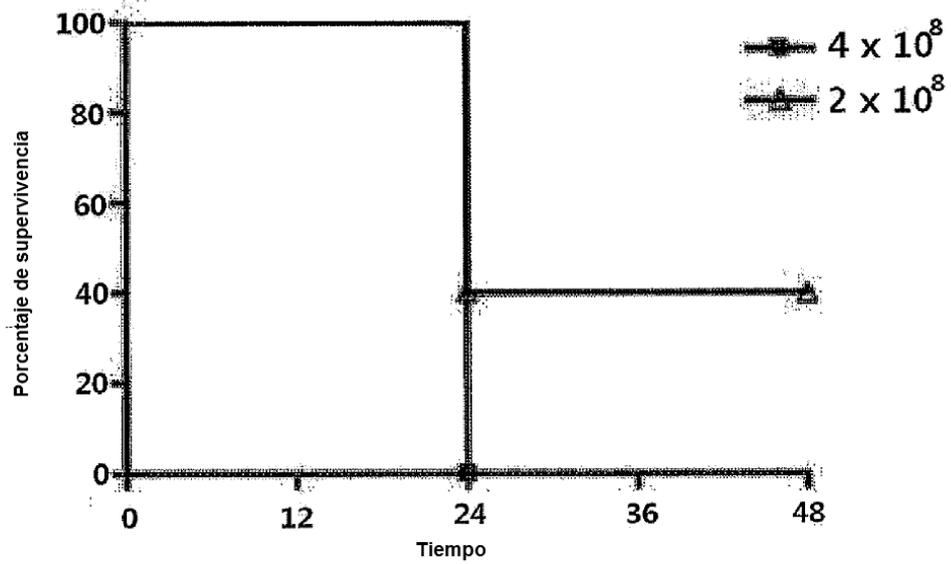


FIG. 51

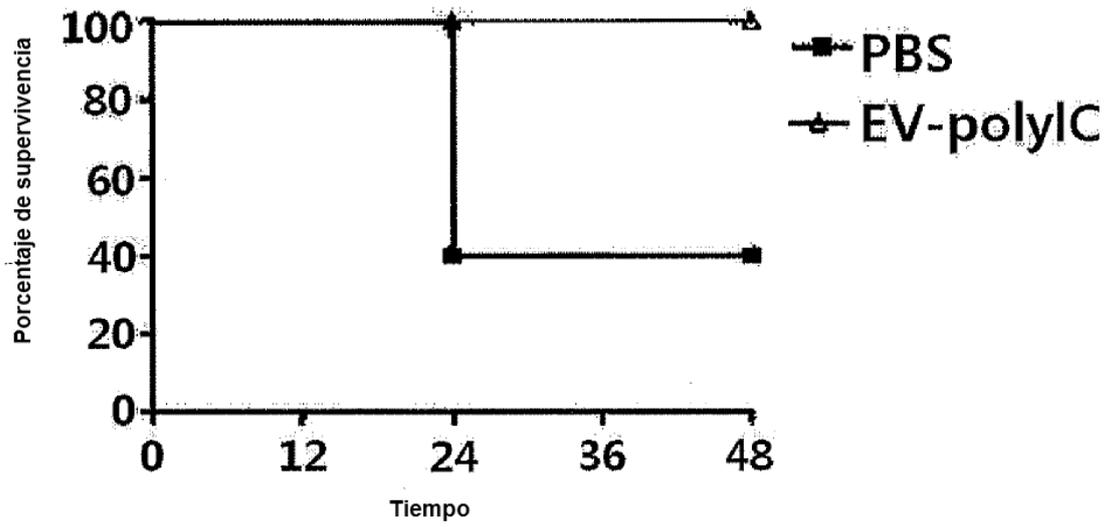


FIG. 52

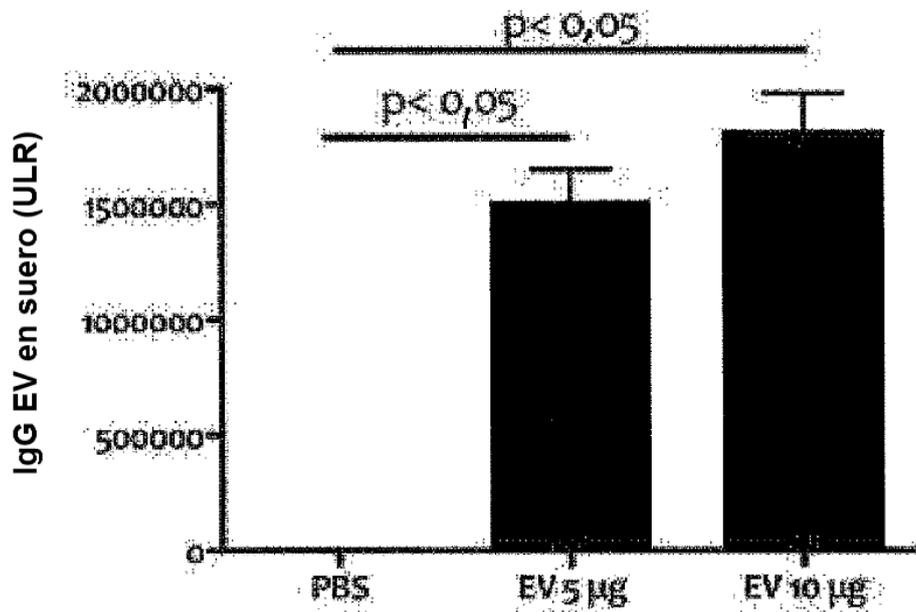
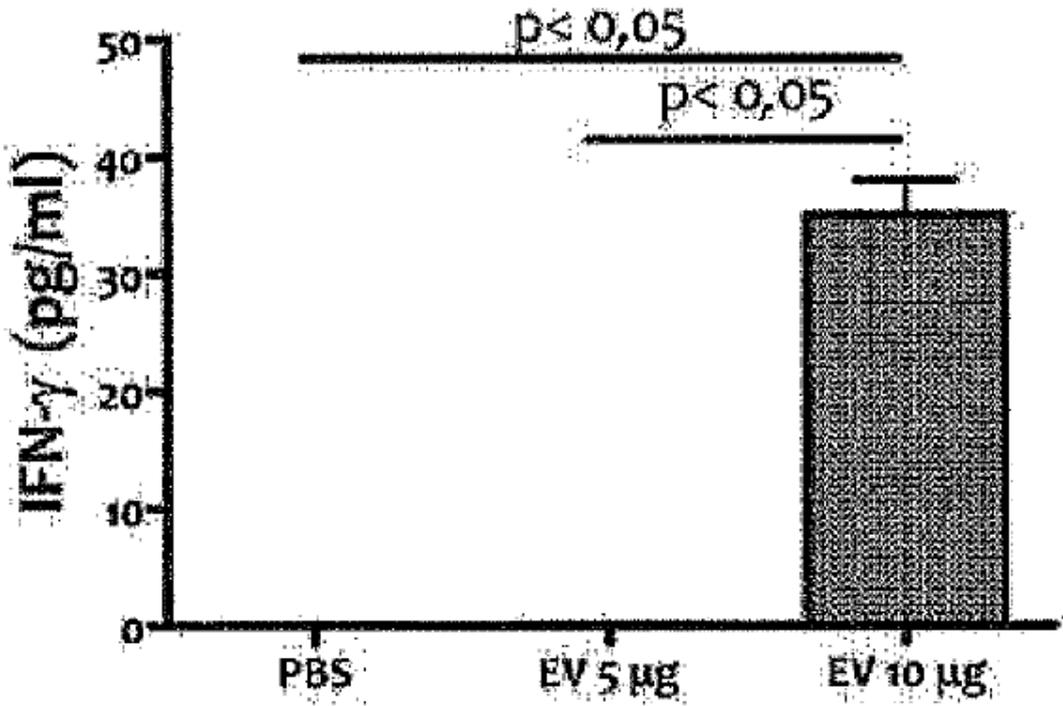


FIG. 53



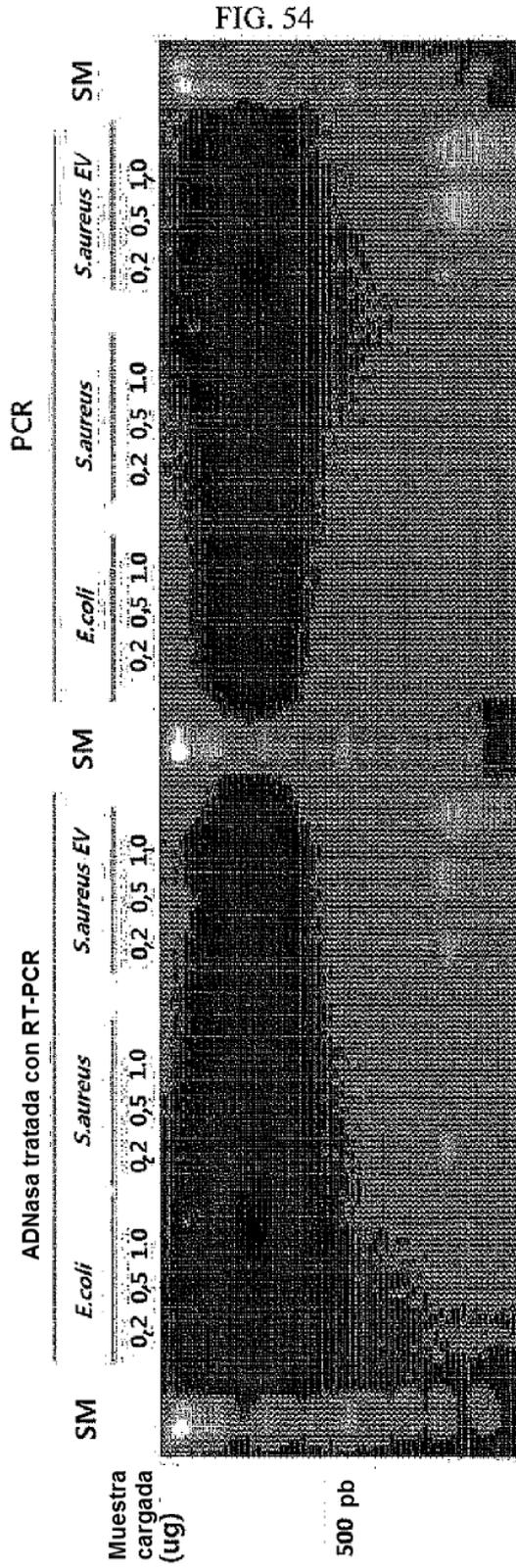


FIG. 54