

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6148671号

(P6148671)

(45) 発行日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(24) 登録日 平成29年5月26日(2017.5.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 Z N A A

C 1 2 N 5/0784 (2010.01)

C 1 2 N 1/20 E

A 6 1 K 35/74 (2015.01)

C 1 2 N 5/0784

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 K 35/74 A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 1/04

請求項の数 14 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-526493 (P2014-526493)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月22日(2012.8.22)
 (65) 公表番号 特表2014-529403 (P2014-529403A)
 (43) 公表日 平成26年11月13日(2014.11.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/066360
 (87) 国際公開番号 W02013/026887
 (87) 国際公開日 平成25年2月28日(2013.2.28)
 審査請求日 平成27年8月14日(2015.8.14)
 (31) 優先権主張番号 11178322.1
 (32) 優先日 平成23年8月22日(2011.8.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/526,054
 (32) 優先日 平成23年8月22日(2011.8.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509067887
 グリコトープ ゲーエムベーハー
 ドイツ国 1 3 1 2 5 ベルリン, ロベ
 ルト-ロスレーシュトラッセ 10
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ゴレッツ, シュテファン
 ドイツ国 1 3 1 2 5 ベルリン, ロベ
 ルト-ロスレーシュトラッセ 10, グ
 リコトープ ゲーエムベーハー 気付

微生物の受託番号 DSMZ DSM 25004

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍抗原を保有する微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つのコア-1 特異的抗体によって認識される、*Bacteroides xylanisolvens* 種のコア-1 陽性微生物またはそのコア-1 陽性溶解物もしくはそのコア-1 陽性画分であって、該コア-1 陽性微生物は、株 DSM 25004 (*Coreotics*) の微生物、株 DSM 25004 に由来する微生物または株 DSM 25004 のホモログであり、該株 DSM 25004 に由来する微生物または該株 DSM 25004 のホモログが、以下の特性：

a) *Bacteroides xylanisolvens* の種に属すること；および
 b) 該微生物の細胞培養物中で、該微生物の少なくとも50%が、株 DSM 25004 の平均コア-1 抗原発現の少なくとも50%のコア-1 抗原発現レベルを有すること；を有し、ここで、該株 DSM 25004 のホモログは、DNA 間ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、株 DSM 25004 に対して少なくとも98%のDNA 間の関連性を示し；かつ、該コア-1 陽性微生物の該コア-1 陽性画分が、細胞壁調製物、エンベロープ調製物、リポ多糖調製物、莢膜調製物、および、莢膜多糖調製物からなる群より選択される、微生物。

【請求項 2】

前記株 DSM 25004 に由来する微生物または前記株 DSM 25004 のホモログが、以下の特性：

a) DNA 間ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、株 DSM 25004 に対して

10

20

少なくとも 99% の DNA 間の関連性を示すこと；

b) 株 DSM 25004 および／または DSM 18836 として寄託された *Bacteroides xyloxydans* に対して少なくとも 98%、好ましくは少なくとも 99% もしくは少なくとも 99.5%、より好ましくは 100% の 16S rRNA 遺伝子配列類似性のレベルを示すこと；ならびに／または

c) 以下の特性：

— i) 株DSM25004の平均コア－1発現の少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の平均コア－1抗原発現を有すること；

i i) 実施例 2 に記載の E L I S A アッセイにおいて平均で少なくとも 0.3、好ましくは少なくとも 0.35 の吸光度値を実現すること；

i i i) 細胞表面に、図 4 の構造 # 1、構造 # 2、構造 # 3、構造 # 4 および構造 # 5、その類似構造、および／もしくはその反復単位からなる群から選択される少なくとも 1 つの炭水化物構造を発現していること；

i v) 該微生物の細胞培養物中で、該微生物の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、より好ましくは約１００％が、株 D S M 2 5 0 0 4 の平均コア－１抗原発現の少なくとも７５％、好ましくは少なくとも８０％のコア－１抗原発現レベルを有すること；および／もしくはは

v) 該微生物の細胞培養物中で、該微生物の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、より好ましくは約１００％が、株DSM25004の平均コア－１抗原発現の７０％から１５０％まで、好ましくは７５％から１２５％までの範囲内のコア－１抗原発現レベルを有すること
の１つもしくは複数を有するコア－１抗原発現を示すこと
の２つ以上を有する、請求項１に記載の微生物。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の微生物であって、
以下の特性：

a) 実施例 2 に記載の E L I S A アッセイにおいて平均で少なくとも 0.3、より好ましくは少なくとも 0.35 の吸光度値を有すること；

b) 短鎖脂肪酸を産生することができること；ならびに／または

c) 細胞培養物中で、該微生物が以下の特性：

i) 該細胞培養物中の該微生物の少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 80%、少なくとも 90%、もしくは少なくとも 95%、より好ましくは約 100%が、該細胞培養物中の該微生物の平均コア-1 抗原発現レベルの少なくとも 75%であるコア-1 抗原発現レベルを有すること；および／もしくは

i i) 該細胞培養物中の該微生物の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、より好ましくは約１００％が、該細胞培養物中の該微生物の平均コア－１抗原発現レベルの７０％から１５０％まで、好ましくは７５％から１２５％までの範囲内であるコア－１抗原発現レベルを有すること
の少なくとも１つを有すること
の１つまたは複数を有するコア－１抗原発現を有する、微生物。

【請求項4】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の微生物であって、
少なくとも 1 つのコアー 1 特異的抗体を適切な結合条件下で該微生物またはその溶解物もしくは画分と接触させると、該コアー 1 特異的抗体が該微生物またはその溶解物もしくは画分を認識し、したがって該微生物またはその溶解物もしくは画分に結合し、該コアー 1 特異的抗体と該微生物または該その溶解物もしくは画分との該結合が、以下の特性：

a) 該コア-1 特異的抗体が以下の抗体：

i) CDR-H1として配列番号1によるアミノ酸配列、CDR-H2として配列番号2によるアミノ酸配列、CDR-H3として配列番号3によるアミノ酸配列、CDR-

L 1として配列番号4によるアミノ酸配列、C D R－L 2として配列番号5によるアミノ酸配列およびC D R－L 3として配列番号6によるアミノ酸配列からなるC D Rのセットを有する抗体；

i i) C D R－H 1として配列番号7によるアミノ酸配列、C D R－H 2として配列番号8によるアミノ酸配列、C D R－H 3として配列番号9によるアミノ酸配列、C D R－L 1として配列番号10によるアミノ酸配列、C D R－L 2として配列番号11によるアミノ酸配列およびC D R－L 3として配列番号12によるアミノ酸配列からなるC D Rのセットを有する抗体；

i i i) 抗体N e m o d－T F 1および

i v) 抗体N e m o d－T F 2

10

の群から選択されること；

b) 該微生物または該その溶解物もしくは画分に少なくとも2つのコア－1特異的抗体が結合し、該少なくとも2つの異なる抗体が異なるエピトープを認識し、請求項4 a)において定義される抗体、特に抗体i) およびi i) または抗体i i i) およびi v) の群から好ましくは選択されること；

c) 該少なくとも1つのコア－1特異的抗体と該微生物または該その溶解物もしくは画分との結合が、過ヨウ素酸処理後に該結合が低下もしくは存在しないという点で過ヨウ素酸感受性であること；ならびに／または

d) 該微生物または該その溶解物が、該コア－1抗原を露出した形態で含み、該露出したコア－1抗原が他の構造によって、特に他の炭水化物構造によってマスクされていないこと

20

の1つまたは複数を満たす、微生物。

【請求項5】

請求項1から4までのいずれか一項に記載のコア－1陽性微生物またはそのコア－1陽性溶解物もしくはそのコア－1陽性画分を含む組成物。

【請求項6】

前記組成物中の*B a c t e r o i d e s x y l a n i s o l v e n s*種の前記コア－1陽性微生物が、請求項3および／または4で定義されるコア－1抗原発現を特徴とする、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

30

前記組成物中の前記コア－1陽性微生物の少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%、より好ましくは約100%が、

a) 該組成物中の全てのコア－1陽性微生物の平均コア－1抗原発現レベルの少なくとも75%、および／もしくは株D S M 2 5 0 0 4の平均コア－1抗原発現の少なくとも75%、ならびに／または

b) 該培養物中の全てのコア－1陽性微生物の平均コア－1抗原発現レベルの70%から150%まで、好ましくは75%から125%までの範囲内、および／もしくは株D S M 2 5 0 0 4の平均コア－1抗原発現の70%から150%まで、好ましくは75%から125%までの範囲内

40

であるコア－1抗原発現レベルを有する、請求項5または6に記載の組成物。

【請求項8】

請求項5から7までのいずれか一項に記載の組成物であって、以下の特性：

a) 該組成物が細胞培養物であること、および／または

b) 該組成物中の1つもしくは複数の前記コア－1陽性微生物が、生育可能な形態、非生殖形態、生育不能な形態または溶解された形態で存在すること
の1つまたは複数を有する、組成物。

【請求項9】

i) 請求項1から4までのいずれか一項に記載のコア－1陽性微生物またはそのコア－

50

1 陽性溶解物もしくはそのコアー 1 陽性画分
および／または

i i) 請求項 5 から 8 までのいずれか一項に記載の組成物
を含む薬学的組成物。

【請求項 10】

前記コアー 1 抗原に対する免疫応答を誘導および／または増強するための、請求項 9 に
記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

好ましくはコアー 1 陽性腫瘍、がん、胃腸障害および／またはコアー 1 陽性疾患を処置
または予防するための医薬において使用するための、請求項 1 から 4 までのいずれか一項
に記載のコアー 1 陽性微生物またはその溶解物もしくは画分、請求項 5 から 8 までのい
ずれか一項に記載の組成物、または請求項 9 もしくは 10 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 12】

in vitroにおいてコアー 1 陽性生成物を製造するための方法であって、

a) 請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載のコアー 1 陽性微生物を提供するステッ
プと、

b) 必要に応じて、該コアー 1 陽性微生物を加工して、そのコアー 1 陽性溶解物もしくは
はそのコアー 1 陽性画分を得るステップと、

c) 該コアー 1 陽性微生物および／または該そのコアー 1 陽性溶解物もしくはそのコア
ー 1 陽性画分を該コアー 1 陽性生成物の製造において使用するステップであって、該コア
ー 1 陽性生成物が抗原提示細胞である、ステップと
を含む、方法。

20

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、

前記コアー 1 陽性生成物が樹状細胞であり、ステップ c) が、前記抗原提示細胞に前記コ
アー 1 陽性微生物および／または前記そのコアー 1 陽性溶解物もしくはそのコアー 1 陽性
断片を負荷するステップを含む、方法。

【請求項 14】

コアー 1 特異的免疫応答を誘導もしくは増強するため、ならびに／またはコアー 1 に対
する抗体力価を誘導するため、ならびに／または機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状
細胞、および／もしくは活性化 T 細胞、T 細胞系もしくは T 細胞クローンまたはコアー 1
に対する抗体を生成するための、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載のコアー 1 陽
性微生物および／またはそのコアー 1 陽性溶解物および／またはそのコアー 1 陽性画分を
含む組成物であって、該組成物が in vivoまたは in vitroにおいて使用さ
れることを特徴とする、組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原提示微生物に関する。具体的には、表面にコアー 1 抗原を保有する *Ba*
cteroides xylanisolvens 種の微生物が提供される。さらに、本
発明は、医学におけるこれらの微生物の使用ならびに前記微生物を含有する生成物を提供
する。

40

【背景技術】

【0002】

異常なグリコシル化はがん細胞の典型的な特徴である。したがって、糖タンパク質およ
び糖脂質上の炭水化物腫瘍抗原は能動免疫療法および受動免疫療法の標的である。これら
の極めて豊富な抗原は、腫瘍細胞の複雑なグリコシル化器官における変化に起因して新規
に発現される、または上方制御される。種々の脂質またはタンパク質と結合した炭水化物
腫瘍抗原、例えば、GM2、GD2、GD3、フコシル化 GM1、Globo H、Le^y およびムチンコア構造 Tn、シアリルー Tn および トムソンフリーデンライヒ (Th

50

omson Friedrich) 抗原が記載されている。

【0003】

トムソンフリーデンライヒ抗原 (TF) は、一連の報告において腫瘍抗原として記載されている公知の炭水化物構造である。TF は、TF アルファおよび TF ベータの 2 つの形態で存在し、タンパク質または糖脂質と結合することができる。

【0004】

コア-1 は二糖 Gal- β 1, 3-GalNAc であり、具体的には癌細胞におけるタンパク質のヒドロキシアミノ酸であるセリンまたはトレオニンとアルファアノマー立体配置で O-グリコシド結合している。コア-1 はトムソンフリーデンライヒの TF-アルファ構造に対応し、腫瘍上のタンパク質とのみ結合する。したがって、コア-1 およびトムソンフリーデンライヒという用語は、必ずしも同一の構造を指すのではない。

10

【0005】

コア-1 は、健康な組織および良性の疾患組織では他の炭水化物構成成分によってマスクされているが、大多数の癌およびいくつかの非上皮性悪性腫瘍では覆われていない。したがって、コア-1 は、特異的な汎癌 (pan-carcinoma) 抗原である。

【0006】

コア-1 は重要な腫瘍抗原である。コア-1 は、主要な結腸癌の 60% 超および結腸がんからの肝転移の 90% 超において、ならびに、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、および他の消化器がんを含めた他の主要な適応の癌の大多数、例えば、胃癌 (gastric carcinoma) および膵癌 (pancreatic carcinoma) などにおいて発現される。コア-1 は結腸癌を有する患者についての独立した予後マーカーであり、コア-1 発現の強さが増すにしたがって、死亡率が増加し、生存期間中央値 (medium survival) が低下する。肝転移の発生はコア-1 の発現と相関する。コア-1 陽性原発癌を有する患者では、症例のほぼ 60% で肝転移が発生するが、コア-1 陰性腫瘍の肝転移の危険性は有意に低い (20% 未満)。肝臓への転移を媒介することに加えて、コア-1 は、内皮を介した転移においても役割を果たし得る。

20

【0007】

例外的に高い汎癌 (pan-carcinomic) 特異性、予後の関連性および肝転移における直接関与により、トムソンフリーデンライヒ、特にコア-1 ががん免疫療法の第一の標的となる。

30

【0008】

コア-1 が広く分布していることの結果として、例えば、がんの予防および処置において、特にワクチン接種のための医薬品として使用することができる、コア-1 に対応する細胞表面構造を有するコア-1 陽性微生物を提供することが有利である。

【0009】

トムソンフリーデンライヒに基づく治療的アプローチを提供するための試みが行われた。例えば、Shigoeka ら (1999 年) は、マウスモデルにおける、抗トムソンフリーデンライヒ特異的モノクローナル抗体による、ノイラミニダーゼ (neuramidase) 処理した結腸 26 細胞からの肝転移の阻害について記載している。しかし、高度に特異的な抗 TF 抗体を生成することが難しいことに起因して、また、単一の結合ドメインの内因性の親和性が比較的低い IgM アイソタイプとしてのそれらの特質が原因で、これまで TF 特異的抗体のさらなる開発はなされていない。さらに、いくつかの抗 TF 抗原抗体は、腫瘍細胞の望ましくない増殖を引き起こすので、臨床的に有用ではない。特許文献 1 (国際公開第 2006/012626 号) にも抗 TF 抗原抗体の治療的な使用が記載されている。TF 特異的抗体の結合により、腫瘍細胞の増殖が阻害されることが示されている (Jeschke ら (2006 年))。

40

【0010】

さらに、トムソンフリーデンライヒに基づくワクチンを開発するための試みも行われた。それらの大部分では、抗体応答を誘導することに焦点がおかれた。例えば、Livingston および Lloyd (2000 年) は、合成 TF を KLH と無作為にカップリングした非天然

50

T Fコンジュゲートを使用した。このコンジュゲートにより、合成T Fに対しては体液性免疫応答が生じたが、天然リガンド上のT Fに対しては生じなかった(Adluriら(1995年))。したがって、これらは腫瘍構造物上のT Fを認識しなかったため、T F特異的ではなかった。

【0011】

SpringerおよびDesaiは、O型赤血球由来糖タンパク質およびMN型赤血球由来糖タンパク質で構成されるT/Tnワクチンを使用したワクチン接種を用い、その結果、少量のIgMが作られただけであったが、乳がん患者の生存率が改善された。しかし、IgMが示す成熟した免疫応答は小さく、また、T F-Agに対する抗体に関する多くの以前の試験はIgM抗体を伴い、したがって、より著しい高度にT F特異的な免疫応答、好ましくはIgG応答が必要とされる。

10

【0012】

推定上T F陽性である微生物について記載されたわずかな報告が公知である。例えば、Springerら(Brit J Haematol 47巻(1981年)、453~460頁;Transfusion 19巻(1979年)、233~249頁)では、ニワトリおよびヒトにおいて、ヒト赤血球上のT Fも認識することができるポリクローナル抗体応答を生じることができる好気性微生物(E. coli O86)について報告されている。Springerは、免疫応答の特異性を大まかに決定するために、シアリダーゼ処理したT赤血球を用いた抗Tの吸着および赤血球凝集アッセイを用いた。しかし、ヒト赤血球をシアリダーゼ処理することにより、T F、特にコア-1だけに限らないが、炭水化物エピトープのうちのいくつかの炭水化物エピトープが脱マスクングされる。したがって、Springerが試験した反応では、交差反応性に起因して、T F、特にコア-1に対する特異性は示されない。それぞれの非特異的な微生物は、T Fに対して特異的に指向とする強力な免疫応答を生じないが、類似したT F様構造物に対して指向し、したがって、潜在的に、体の非腫瘍組織または細胞に対してもますます指向するので、その非特異性に起因してワクチンとして限られた適合性しか有さない。さらに、試験により、E. coli O86にはコア-1特異的抗体が結合しないので、E. coli O86はコア-1発現について陽性ではないことが示された。

20

【0013】

特許文献2(国際公開第2008/055703号)には、コア-1陽性微生物、特に、細胞表面にコア-1抗原を発現しているBacteroides ovatus種の微生物、例えば、AG6およびMU1、ならびに医薬品としてのそれらの使用が開示されている。コア-1特異的抗体と前記微生物の結合によってコア-1抗原の発現が確認された。さらに、WO2008/055703には、治療におけるそれぞれの微生物の使用が開示されている。

30

【0014】

コア-1陽性微生物を医薬品として使用する場合、コア-1陽性微生物は、コア-1特異的免疫応答を有効に刺激するために、コア-1抗原を発現するだけでなく、高いコア-1抗原発現を示すことが望ましい。さらに、医薬品として使用するために選択されるコア-1陽性微生物は、安定であり、好ましくは均一である高いコア-1抗原発現を有することが望ましい。安定な高いコア-1抗原発現により、コア-1陽性微生物を含有する生成物が、特に医薬品の分野で生成物の品質にとって重要である低い変動性を示すことが確実になる。安定な高いコア-1抗原発現は、規制要件を満たすためにも重要である。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】国際公開第2006/012626号

【特許文献2】国際公開第2008/055703号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0016】

したがって、本発明の目的は、代替のコアー1陽性微生物、具体的には、細胞表面に安定な高いコアー1抗原発現を有する微生物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者らは、*Bacteroides xylanisolvens* 種のコアー1陽性微生物を見いだした。微生物は、コアー1特異的抗体が、接触した際に前記微生物に特異的に結合する場合に、コアー1陽性であり、したがって、その表面にコアー1抗原を発現している。

【0018】

Bacteroides xylanisolvens は、*Bacteroides* 属の新規の種であり、Chassardら（「*Bacteroides xylanisolvens* sp. Nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces」; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2008年); 58巻、1008～1013頁）により初めて記載された。これは、ヒト糞便から単離することができるキシラン分解細菌であり、したがって、ヒト共生微生物である。これは、一般に病原性が低いグラム陰性桿菌である。*Bacteroides xylanisolvens* は、*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ)、*Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig* (DE) にDSM18836として寄託され、そこから公的に入手可能である。コアー1特異的抗体を用いた実験によって示された通り、*Bacteroides xylanisolvens* (DSM18836) はコアー1抗原を発現しない。前記コアー1特異的抗体は*Bacteroides xylanisolvens* (DSM18836) を認識せず、したがって、それに結合しなかった。これにより、*Bacteroides xylanisolvens* がコアー1抗原を発現しておらず、したがってコアー1陽性ではないことが証明される。したがって、本発明者らが*Bacteroides xylanisolvens* 種のコアー1陽性微生物を同定することができたことは非常に驚くべきことであった。さらに、本発明者らは、*Bacteroides xylanisolvens* 種のコアー1陽性微生物が、コアー1抗原が高量で発現されるだけでなく、発現が非常に安定であり、さらに均一でもあるので、有利なコアー1抗原発現プロファイルを示すことを見いだした。緒言において考察されている通り、安定な高いコアー1抗原発現は、特に医薬品の分野においてコアー1陽性微生物を使用する場合に重要な利点である。例えば、安定かつ均一な、高いコアー1発現を有する微生物を用いて製造された生成物は、一定した高いコアー1含有量を有する。したがって、所望のコアー1レベルを有する生成物を作製するために必要になる微生物は少量であり、また、これらの微生物により、一定した生成物の品質および欠陥の少ない生成物が提供される。したがって、コアー1抗原発現に関する特別な特性に起因して、本発明のコアー1陽性微生物は、医薬品の分野において使用するために特に適している。前記微生物のコアー1陽性溶解物および／またはコアー1陽性画分に同じことが当てはまる。

【0019】

したがって、本発明のコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分は、例えば、コアー1発現に関連する疾患、具体的には、例えば、腫瘍細胞などのがん細胞でコアー1が発現されているがんの予防法および処置において使用することができる。患者に投与されると、本発明のコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分は、コアー1に対する免疫応答を刺激することができ、次いで該疾患のコアー1陽性細胞にも対抗する。コアー1抗原発現プロファイルが高く安定であるので、誘導および／または増強された免疫応答は非常に強力である。本発明による微生物の安定な高いコアー1抗原発現により、同じ量の本発明によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分を使用した場合に有意なバッチ間の変動を伴わずに一定のコアー1活性／発現がさらに提供される。本発

明の微生物は安定な高いコアー１抗原発現を有し、したがって、むしろ一定の量のコアー１抗原が提供されるので、これにより最終生成物の品質も改善され、それぞれに欠陥の少ない生成物がもたらされる。本発明による微生物によってもたらされる高く均一な量のコアー１抗原により、免疫応答を引き出すために必要な微生物の量を減らすことも可能になる。

【００２０】

さらに、本発明による微生物は病原性を有さず、したがって、特に、ヒトに投与した場合に有害な副作用を引き起こす高い危険性を伴わずに投与することができる。さらに、病原性が低いので、本発明による微生物の製造、流通および市販に関する法的規制による重大な制限はなく、したがって、ほとんど労力をかけずに履行することができる。具体的には、*Bacteroides xylanisolvens* 微生物は、European Directive 2000/54/EC および German 「Biosstoffverordnung」に従って、リスク群１の生物学的製剤に分類される。リスク群１は４つのリスク群で最も低く、ヒト疾患を引き起こしそうな生物学的製剤に関する。他の *Bacteroides* の種の微生物も含めた多くの他の微生物はまたより高いリスク群に分類される（例えば、*Bacteroides ovatus* は、リスク群２の生物学的製剤である）。さらに、実施例において実証されている通り、特に、本発明による微生物は、最も重要なビルレンス因子であるプラスミド DNA 材料ならびに関連する細胞外酵素および病原性因子の大部分について陰性であり、ヒト結腸の上皮細胞に付着しない。さらに、本発明による微生物は、マウスにおける毒物学的試験で有害作用を示さず、また、３週間にわたって 8.5×10^{11} CTCU までの日用量を摂取したヒトにおいていかなる特質の有害作用も示さなかった。したがって、本発明による微生物は、非常に高い安全性基準を満たし、望ましくない副作用の危険性を伴わずにヒトが消費することができる。さらに、本発明による微生物は、種々の抗生物質に対して感受性であることが好ましく、したがって、必要であれば容易かつ有効に排除することができる。

【００２１】

さらに、本発明による微生物の安定かつ均一なコアー１発現を生成物の品質についてのマーカーとして使用することができる。天然の微生物、具体的には最終生成物中には望ましくない微生物は、一般にコアー１を発現しないので、コアー１含有量を本発明による所望の微生物についての特異的なマーカーとして使用することができる。特に、コアー１含有量を本発明による微生物を含有する微生物の培養物の均一性についてのマーカーとして使用することができ、かつ／または培養物中の本発明による微生物の量についてのマーカーとして使用することができる。さらに、他のコアー１陽性微生物と比較して、安定かつ均一な、高いコアー１発現を有する本発明による微生物の作製は改善されている。なぜなら、より短い時間およびより少ない培養ステップで十分な量のコアー１陽性微生物が得られるからである。さらに、コアー１陽性微生物を富化するための作製ステップは必要ない。具体的には、本発明によるコアー１陽性微生物の作製は、栄養補給相（feeding phase）を伴わない単純なバッチ培養を用いて、またはただ１つの栄養補給相を用いて実施することができる。

【００２２】

したがって、第１の態様では、本発明は、少なくとも１つのコアー１特異的抗体によって認識される、*Bacteroides xylanisolvens* 種のコアー１陽性微生物またはそのコアー１陽性溶解物もしくはそのコアー１陽性画分を提供する。

【００２３】

第２の態様では、本発明は、本発明の第１の態様によるコアー１陽性微生物またはそのコアー１陽性溶解物もしくはそのコアー１陽性画分を含む組成物を提供する。一実施形態によると、前記組成物は細胞培養物である。

【００２４】

第３の態様では、本発明は、医学において使用するための、本発明の第１の態様による微生物または本発明の第２の態様による組成物を提供する。

【0025】

第4の態様によると、本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分および／または本発明の第2の態様による組成物を含む薬学的組成物が提供される。

【0026】

第5の態様によると、本発明は、

- a) 本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物を提供するステップと、
- b) 必要に応じて、前記コアー1陽性微生物を加工して、そのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分を得るステップと、
- c) 前記コアー1陽性微生物および／または前記そのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分をコアー1陽性生成物の製造において使用するステップとを含む、コアー1陽性生成物を製造するための方法を提供する。

10

【0027】

以下の記載および添付の特許請求の範囲から、本発明の他の目的、特徴、利点および態様が当業者に明らかになる。しかし、適用の好ましい実施形態が示されている以下の記載、添付の特許請求の範囲、および特定の実施例は、単に例示として示されていることが理解されるべきである。以下を読むことにより、開示されている本発明の主旨および範囲に入る種々の変化および改変が当業者には容易に明らかになる。

特定の実施形態では、以下が提供される：

(項目1)

20

少なくとも1つのコアー1特異的抗体によって認識される、Bacteroides xylanisolvens 種のコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分。

(項目2)

Coreotics (DSM25004)、それに由来する微生物またはCoreotics ホモログである、項目1に記載の微生物。

(項目3)

Coreotics に由来する微生物または該Coreotics ホモログが、以下の特性：

- a) Bacteroides xylanisolvens の種に属すること；
- b) DNA間ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、DSM25004として寄託されたCoreotics および／またはDSM18836として寄託されたBacteroides xylanisolvens に対して少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%のDNA間の関連性を示すこと；

30

- c) DSM25004として寄託されたCoreotics および／またはDSM18836として寄託されたBacteroides xylanisolvens に対して少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%もしくは少なくとも99.5%、より好ましくは100%の16S rRNA 遺伝子配列類似性のレベルを示すこと；ならびに／または

40

d) 以下の特性：

- i) DSM25004として寄託されたCoreotics の平均コアー1発現の少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の平均コアー1抗原発現を有すること；

- ii) 実施例2に記載のELISAアッセイにおいて平均で少なくとも0.3、好ましくは少なくとも0.35の吸光度値を実現すること；

- iii) 細胞表面に、図4の構造#1、構造#2、構造#3、構造#4および構造#5、その類似構造、および／もしくはその反復単位からなる群から選択される少なくとも1つの炭水化物構造を発現していること；

- iv) 該微生物の細胞培養物中で、該微生物の少なくとも50%、好ましくは少なく

50

とも 80 %、少なくとも 90 %、もしくは少なくとも 95 %、より好ましくは約 100 % が、DSM 25004 として寄託された Coreotics の平均コアー 1 抗原発現の少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 % のコアー 1 抗原発現レベルを有すること；
 および／もしくは

v) 該微生物の細胞培養物中で、該微生物の少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、もしくは少なくとも 95 %、より好ましくは約 100 % が、DSM 25004 として寄託された Coreotics の平均コアー 1 抗原発現の 70 % から 150 % まで、好ましくは 75 % から 125 % までの範囲内のコアー 1 抗原発現レベルを有すること

の 1 つもしくは複数を有するコアー 1 抗原発現を示すこと

の 2 つ以上を有する、項目 2 に記載の微生物。

(項目 4)

項目 1 から 3 までのいずれか一項に記載の微生物であって、
 以下の特性：

a) 実施例 2 に記載の ELISA アッセイにおいて平均で少なくとも 0.3、より好ましくは少なくとも 0.35 の吸光度値を有すること；

b) DSM 25004 として寄託された Coreotics の平均コアー 1 発現の少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、もしくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 % の平均コアー 1 抗原発現を有すること；

c) 図 4 の構造 # 1、構造 # 2、構造 # 3、構造 # 4 および構造 # 5、その類似構造、および／もしくはその反復単位からなる群から選択される少なくとも 1 つの炭水化物構造を含むこと；

d) 短鎖脂肪酸を産生することができること；ならびに／または

e) 細胞培養物中で、該微生物が以下の特性：

i) 該細胞培養物中の該微生物の少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、もしくは少なくとも 95 %、より好ましくは約 100 % が、

aa) 該細胞培養物中の該微生物の平均コアー 1 抗原発現レベルの少なくとも 75 % であり、かつ／もしくは

bb) DSM 25004 として寄託された Coreotics の平均コアー 1 抗原発現の少なくとも 75 % である

コアー 1 抗原発現レベルを有すること；

ii) 該細胞培養物中の該微生物の少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、もしくは少なくとも 95 %、より好ましくは約 100 % が、

aa) 該細胞培養物中の該微生物の平均コアー 1 抗原発現レベルの 70 % から 150 % まで、好ましくは 75 % から 125 % までの範囲内であり、かつ／もしくは

bb) DSM 25004 として寄託された Coreotics の平均コアー 1 抗原発現の 70 % から 150 % まで、好ましくは 75 % から 125 % までの範囲内である

コアー 1 抗原発現レベルを有すること

の少なくとも 1 つを有すること

の 1 つまたは複数を有するコアー 1 抗原発現を有する、微生物。

(項目 5)

項目 1 から 4 までのいずれか一項に記載の微生物であって、
 少なくとも 1 つのコアー 1 特異的抗体を適切な結合条件下で該微生物またはその溶解物もしくは画分と接触させると、該コアー 1 特異的抗体が該微生物またはその溶解物もしくは画分を認識し、したがって該微生物またはその溶解物もしくは画分に結合し、該コアー 1 特異的抗体と該微生物または該その溶解物もしくは画分との該結合が、以下の特性：

a) 該コアー 1 特異的抗体が以下の抗体：

i) CDR-H1 として配列番号 1 によるアミノ酸配列、CDR-H2 として配列番号 2 によるアミノ酸配列、CDR-H3 として配列番号 3 によるアミノ酸配列、CDR-

10

20

30

40

50

L 1として配列番号4によるアミノ酸配列、C D R－L 2として配列番号5によるアミノ酸配列およびC D R－L 3として配列番号6によるアミノ酸配列からなるC D Rのセットを有する抗体；

i i) C D R－H 1として配列番号7によるアミノ酸配列、C D R－H 2として配列番号8によるアミノ酸配列、C D R－H 3として配列番号9によるアミノ酸配列、C D R－L 1として配列番号10によるアミノ酸配列、C D R－L 2として配列番号11によるアミノ酸配列およびC D R－L 3として配列番号12によるアミノ酸配列からなるC D Rのセットを有する抗体；

i i i) 抗体N e m o d－T F 1および

i v) 抗体N e m o d－T F 2

の群から選択されること；

b) 該微生物または該その溶解物もしくは画分に少なくとも2つのコア－1特異的抗体が結合し、該少なくとも2つの異なる抗体が異なるエピトープを認識し、項目5 a)において定義される抗体、特に抗体i) およびi i) または抗体i i i) およびi v) の群から好ましくは選択されること；

c) 該少なくとも1つのコア－1特異的抗体と該微生物または該その溶解物もしくは画分との結合が、過ヨウ素酸処理後に該結合が低下もしくは存在しないという点で過ヨウ素酸感受性であること；ならびに／または

d) 該微生物または該その溶解物が、該コア－1抗原を露出した形態で含み、該露出したコア－1抗原が他の構造によって、特に他の炭水化物構造によってマスクされていないこと

の1つまたは複数を満たす、微生物。

(項目6)

項目1から5までのいずれか一項に記載のコア－1陽性微生物またはそのコア－1陽性溶解物もしくはそのコア－1陽性画分を含む組成物。

(項目7)

前記組成物中のB a c t e r o i d e s x y l a n i s o l v e n s種の前記コア－1陽性微生物が、項目4および／または5で定義されるコア－1抗原発現を特徴とする、項目6に記載の組成物。

(項目8)

前記組成物中の前記コア－1陽性微生物の少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%、より好ましくは約100%が、

a) 該組成物中の全てのコア－1陽性微生物の平均コア－1抗原発現レベルの少なくとも75%、および／もしくはD S M 2 5 0 0 4として寄託されたC o r e o t i c sの平均コア－1抗原発現の少なくとも75%、ならびに／または

b) 該培養物中の全てのコア－1陽性微生物の平均コア－1抗原発現レベルの70%から150%まで、好ましくは75%から125%までの範囲内、および／もしくはD S M 2 5 0 0 4として寄託されたC o r e o t i c sの平均コア－1抗原発現の70%から150%まで、好ましくは75%から125%までの範囲内

であるコア－1抗原発現レベルを有する、項目6または7に記載の組成物。

(項目9)

項目6から8までのいずれか一項に記載の組成物であって、

以下の特性：

a) 該組成物が細胞培養物であること、および／または

b) 該組成物中の1つもしくは複数の前記コア－1陽性微生物が、生育可能な形態、非生殖形態、生育不能な形態または溶解された形態で存在すること

の1つまたは複数を有する、組成物。

(項目10)

i) 項目1から5までのいずれか一項に記載のコア－1陽性微生物またはそのコア－1

10

20

30

40

50

陽性溶解物もしくはそのコアー１陽性画分
および／または

i i) 項目６から９までのいずれか一項に記載の組成物
を含む薬学的組成物。

(項目１１)

前記コアー１抗原に対する免疫応答を誘導および／または増強するための、項目１０に
記載の薬学的組成物。

(項目１２)

好ましくはコアー１陽性腫瘍、がん、胃腸障害および／またはコアー１陽性疾患を処置
または予防するための医薬において使用するための、項目１から５までのいずれか一項に
記載のコアー１陽性微生物またはその溶解物もしくは画分、項目６から９までのいずれか
一項に記載の組成物、または項目１０もしくは１１に記載の薬学的組成物。

(項目１３)

コアー１陽性生成物を製造するための方法であって、

a) 項目１から５までのいずれか一項に記載のコアー１陽性微生物を提供するステップ
と、

b) 必要に応じて、該コアー１陽性微生物を加工して、そのコアー１陽性溶解物もしくは
はそのコアー１陽性画分を得るステップと、

c) 該コアー１陽性微生物および／または該そのコアー１陽性溶解物もしくはそのコア
ー１陽性画分を該コアー１陽性生成物の製造において使用するステップと
を含む、方法。

(項目１４)

項目１３に記載の方法であって、

前記コアー１陽性生成物が抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞であり、ステップc) が、
該抗原提示細胞に前記コアー１陽性微生物および／または前記そのコアー１陽性溶解物も
しくはそのコアー１陽性断片を負荷するステップを含む、方法。

(項目１５)

コアー１特異的免疫応答を誘導もしくは増強するため、ならびに／またはコアー１に対
する抗体力価を誘導するため、ならびに／または機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状
細胞、および／もしくは活性化T細胞、T細胞系もしくはT細胞クローンまたはコアー１
に対する抗体を生成するための、項目１から５までのいずれか一項に記載のコアー１陽性
微生物および／またはそのコアー１陽性溶解物および／またはそのコアー１陽性画分の i
n v i v o または i n v i t r o における使用。

【発明を実施するための形態】

【００２８】

発明の詳細な説明

本発明者らは、*Bacteroides xylanisolvens* 種のコアー１陽性微生物を見いだした。したがって、第１の態様では、本発明は、少なくとも１つのコアー１特異的抗体によって認識される、*Bacteroides xylanisolvens* 種のコアー１陽性微生物またはそのコアー１陽性溶解物もしくはそのコアー１陽性画分を対象とする。上記の通り、驚いたことに、コアー１抗原を発現する *Bacteroides xylanisolvens* 種の微生物が存在すること、さらに、これらの微生物は、例えば、*Bacteroides ovatus* などの他の *Bacteroides* 種のコアー１陽性微生物によっては実現されない安定な高いコアー１抗原発現を示すという点で有利なコアー１抗原発現プロファイルを示すことが見いだされた。

【００２９】

本発明によるコアー１陽性微生物はコアー１抗原を保有する。「コアー１抗原」という用語は、本明細書で使用される場合、特に、コアー１特異的抗体が認識し、したがって特異的に結合する抗原を指す。コアー１特異的抗体による結合は、コアー１特異的抗体を適切な結合条件下でコアー１抗原、それぞれコアー１抗原を保有する微生物および／または

10

20

30

40

50

コアー１抗原を保有するその溶解物もしくは画分と接触させることによって試験することができる。適切なコアー１特異的抗体は先行技術において公知であり（例えば、WO 2008/055703を参照されたい）、本明細書にも記載されている。本発明による微生物のコアー１抗原に、それぞれがコアー１抗原の別のエピトープを認識する少なくとも２つのコアー１特異的抗体が結合することが好ましい。コアー１抗原は本発明による微生物の表面に、露出した形態で存在することが好ましい。露出したとは、具体的には、コアー１抗原に周囲の媒体が接近することができ、したがって、接触させるとコアー１特異的抗体が結合することができることを意味する。露出したコアー１抗原は、例えば、他の構造、特に他の炭水化物構造に埋もれていない、したがって、それにマスクされていない。本発明によるコアー１陽性微生物に存在するコアー１抗原は、腫瘍上のタンパク質に見いだされる天然のコアー１と必ずしも同一ではない（天然のコアー１に関する記載については上記を参照されたい）。本発明に関して、本発明による微生物のコアー１抗原にはコアー１特異的抗体が結合することにより、前記コアー１抗原は、コアー１構造を模倣することができ、それにより、コアー１特異的免疫応答を刺激することができることが確実になるので、本発明による微生物のコアー１抗原にはコアー１特異的抗体が結合することだけが決定的である。本発明による微生物のコアー１抗原は炭水化物構造である、または炭水化物構造を含むことが好ましい。好ましい実施形態によると、本発明による微生物によって発現されるコアー１抗原は、コアー１二糖構造Gal-β-1,3-GalNAcを含む。コアー１抗原は、通常、骨格構造、好ましくは糖類構造、特にオリゴ糖構造または多糖構造と結合している。コアー１二糖構造Gal-β-1,3-GalNAcと骨格構造との間の結合はアルファアノマー型であることが好ましい。ベータアノマー型は別の選択肢である。この結合はグリコシド結合であることが好ましい。（好ましくはアルファアノマー型）グリコシド結合は、例えば、コアー１抗原のGal-β-1,3-GalNAc構造と骨格構造のGalNAc分子との間に確立することができる。好ましい実施形態によると、コアー１抗原は本発明による微生物の莢膜多糖の分岐構造内に存在する。

【0030】

本発明によると、*Bacteroides xylanisolvens*種の微生物とは、具体的には、*Bacteroides*属に属し、好ましくは以下の特性：

a) DNA間ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、DSM18836またはDSM25004として寄託された*Bacteroides xylanisolvens*に対して少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%もしくは少なくとも99%のDNA間の関連性を示すこと；

b) DSM18836またはDSM25004として寄託された*Bacteroides xylanisolvens*に対して少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.5%の16S rRNA遺伝子配列類似性のレベルを示すこと；

c) 以下の特性：

i) DSM18836として寄託された*Bacteroides xylanisolvens*と同様に、デンプンを分解することができないこと；

ii) マンニトール、特にD-マンニトール、メレジトースおよび／もしくはソルビトール、特にD-ソルビトールを使用および／もしくは代謝する能力、ならびに／またはグリセロールから酸を産生する能力を有すること；

iii) グルタミルグルタミン酸アリールアミダーゼ活性を発現すること；

iv) インドールを産生することができないこと；

v) カタラーゼ活性を示さないこと

の1つもしくは複数を有すること；ならびに／または

d) 以下の特性：

i) 嫌気性微生物であること；

- i i) 非孢子形成性であること；
- i i i) 非運動性であること；および／もしくは
- i v) グラム陰性であること

の1つもしくは複数を有すること

の1つまたは複数を有する微生物を指す。

【0031】

上で定義されている基準 a) ～ d) の少なくとも2つまたは少なくとも3つ、より好ましくは全てが満たされることが好ましい。

【0032】

「DNA間の関連性」という用語は、具体的には、De Leyら（1970年）Eur. J . Biochem. 12巻、133～142頁またはHussら（1983年）Syst. Appl. Microbiol. 4巻、184～192頁によるDNA間ハイブリダイゼーション／復元アッセイによって測定される、2つの微生物のゲノムDNAまたはDNA全体の類似性の百分率を指す。具体的には、DNA間ハイブリダイゼーションアッセイをDSMZ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany）Identification Serviceによって実施することが好ましい。一実施形態では、DNA間ハイブリダイゼーションアッセイを下の実施例1.3に記載の通り実施する。

【0033】

「16S rRNA遺伝子配列類似性」という用語は、具体的には、第1の微生物の16SリボソームRNA（rRNA）遺伝子の核酸配列の領域と第2の微生物の16S rRNA遺伝子の核酸配列の対応する領域との間の、同一のヌクレオチドの百分率を指す。領域は、少なくとも100個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも200個の連続したヌクレオチド、少なくとも300個の連続したヌクレオチドまたは少なくとも400個の連続したヌクレオチド、最も好ましくは約480個の連続したヌクレオチドを含むことが好ましい。一実施形態では、16S rRNA遺伝子の核酸配列の領域は、それぞれ配列番号20および配列番号21またはそれらの相補配列の配列と隣接している。

【0034】

「コアー1発現レベル」という用語は、本明細書で使用される場合、具体的には、本発明による微生物に存在するコアー1抗原の量を指し、具体的には、前記微生物の表面のコアー1抗原の量を指す。コアー1抗原発現は、例えば、具体的にはELISA法、例えば、本明細書の実施例2に記載の方法を用いて、コアー1特異的抗体（例えば、Nemod-TF1および／またはNemod-TF2（Glycotope GmbH, Berlin）など；他の適切なコアー1特異的抗体は下に記載されている）を結合させ、結合した抗体の量を測定することによって決定することができる。コアー1特異的抗体が多く結合するほど、コアー1発現が高度である。一般に、コアー1抗原発現レベルは、定義済みの数の細胞／微生物を用いて決定される。具体的には、2つ以上の発現レベルを互いと比較する場合、各発現レベルを決定するために同様の数の細胞／微生物を使用する、または発現レベルを数学的に同じ数の細胞／微生物に調整する。さらに、異なる試料のコアー1発現レベルを比較する場合、これらの試料中の微生物を同様の条件、特に同一の条件下で培養することが好ましい。例えば、Bacteroides xylanisolvensなどのBacteroides微生物、具体的には本発明による微生物をWilkins-Chalgren（WC）培地（Oxoid Ltd.、UK）中、嫌気条件下、37℃で一晩培養（cultivate）する。

【0035】

平均コアー1抗原発現レベルは、培養物の試料をプレーティングし、インキュベートした後に単一のコロニーを選び取り、選び取ったコロニーのコアー1抗原発現レベルを決定することによって決定することが好ましい。例えば、平均コアー1抗原発現は、プレーテ

10

20

30

40

50

ィングした培養物のコロニー10個を無作為に選び取り、各コロニーについてコアー1発現レベルを決定し（上記を参照されたい）、得られた値を足し、足された値を10で割ることによって決定することができる。平均コアー1発現レベルはまた、前もってのプレーティングや単一コロニーの選び取りをすることなく、1つまたは複数の培養物の1つまたは複数の試料の発現レベルを測定することによって相応して決定することができる。この場合、例えば、ほぼ同じ数の細胞／微生物を含有するべきである、分析される微生物を含む1つの培養物のいくつかの試料、またはいくつかの培養物のそれぞれの1つの試料を分析し、これらの試料のコアー1抗原発現レベルを、例えば、本明細書に記載のELISAアッセイを用いることによって決定する。得られた個々の値から平均値を決定する。コアー1抗原発現レベルは、ELISAアッセイを用いることによって決定することが好ましい。コアー1抗原発現を決定するための適切なELISA試験は実施例2に記載されている。一実施形態によると、本発明によるコアー1陽性微生物は、下の実施例2に記載の通りELISAアッセイを実施した場合、少なくとも1つのコアー1特異的抗体を使用したELISAアッセイにおいて、平均で少なくとも0.2、少なくとも0.25、好ましくは少なくとも0.3、より好ましくは少なくとも0.35の吸光度値を実現することが好ましい。それぞれ高いコアー1抗原発現レベルを有するコアー1陽性微生物は、強力な免疫応答を誘導することができるので有利である。

【0036】

さらに、本発明による微生物は、同じ条件で培養した場合、Coreotics (DSM 25004) の平均コアー1発現の少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の平均コアー1抗原発現をその表面で示すことが好ましい。

【0037】

上記の通り、本発明による微生物は、特に安定なコアー1抗原発現を特徴とする。以下の安定性の程度が実現されることが好ましい。一実施形態によると、本発明による微生物の培養物中で、本発明による微生物の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%が、前記細胞培養物中の全ての本発明による微生物の平均コアー1発現レベルの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも80%のコアー1抗原発現レベルを有する。培養物中の本発明による微生物の少なくとも95%が、培養物中の全ての本発明による微生物の平均コアー1発現レベルの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%のコアー1発現レベルを有することが好ましい。本質的に、有意なコアー1抗原発現を示さない培養物中の微生物はほんの少数である。一実施形態によると、培養物中の本発明による微生物の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%が、DSM 25004として寄託されたCoreoticsの平均コアー1発現レベルの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%のコアー1抗原発現レベルを有する。培養物中の本発明による微生物の少なくとも95%が、DSM 25004として寄託されたCoreoticsの平均コアー1発現レベルの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%のコアー1発現レベルを有することが好ましい。培養物中の微生物のコアー1発現レベル、コアー1発現の安定性はそれぞれ、例えば、培養物の試料をプレーティングし、インキュベートした後に単一のコロニーを選び取り、選び取ったコロニーのコアー1発現レベルを決定することによって決定することができる。具体的には、例えば、培養物の微生物の少なくとも90%が、特定の発現レベルを有するものとする場合、上記の通り分析されたコロニー10個のうち少なくとも9個が特定された発現レベルを有することになる。異なるクローンまたは培養物のコアー1発現レベルは、同様の条件下で、より好ましくは同一の条件下で決定することが好ましい。特に、異なるクローンま

たは培養物は、同様または同一の条件下で、例えば、上記の通り培養することが好ましい。

【0038】

さらに、本発明による微生物は、均一なコアー1抗原の発現も特徴とする。以下の均一性の程度が実現されることが好ましい。細胞培養物中で、前記細胞培養物中の本発明による微生物の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%が、前記細胞培養物中の全ての本発明による微生物の平均コアー1抗原発現レベルの60%から150%まで、70%から140%まで、好ましくは70%から130%まで、75%から125%まで、80%から120%まで、または85%から115%まで、最も好ましくは90%から110%までの範囲内のコアー1抗原発現レベルを有することが好ましい。具体的には、前記細胞培養物中の本発明による微生物の少なくとも95%が、培養物中の全ての本発明による微生物の平均コアー1発現レベルの75%から125%まで、好ましくは80%から125%までの範囲内であるコアー1発現レベルを有する。本質的に、培養物中の平均コアー1発現から著しく変動するコアー1抗原発現を示す培養物中の微生物はほんの少数である。一実施形態によると、前記培養物中の本発明による微生物の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%が、DSM25004として寄託されたCoreoticsの平均コアー1抗原発現の60%から150%まで、70%から140%まで、好ましくは70%から130%まで、75%から125%まで、80%から120%まで、または85%から115%まで、最も好ましくは90%から110%までの範囲内のコアー1抗原発現レベルを有する。前記細胞培養物中の本発明による微生物の少なくとも95%が、DSM25004として寄託されたCoreoticsの平均コアー1発現レベルの75%から125%まで、好ましくは80%から125%までの範囲内であるコアー1発現レベルを有することが好ましい。均一性は、安定なコアー1抗原発現に関して上記の通り決定されることが好ましい。

【0039】

コアー1抗原発現レベルは、上記の通り決定されることが好ましい。

【0040】

一実施形態によると、本発明による微生物のコアー1抗原は、図4の構造#1、構造#2、構造#3、構造#4および構造#5、その類似構造、および／またはその反復単位からなる群から選択される少なくとも1つの炭水化物構造を含む。前記類似構造は、コアー1炭水化物構造Galβ1, 3-GalNAcを含み、図4の構造#1、構造#2、構造#3、構造#4および構造#5の単糖単位と同じ数、特に同じ種類および／または位置からなることが好ましい。しかし、類似構造は具体的には、単糖単位の結合（アルファアノマー型結合またはベータアノマー型結合、結合の位置）および修飾（メチル化、アセチル化）が図4の構造#1、構造#2、構造#3、構造#4および構造#5と異なっている。これらの類似構造は、具体的には、Galβ1, 3-GalNAc二糖がアルファ結合もしくはベータ結合を介して残りの糖類構造の単糖単位の3位もしくは4位と結合していること、および／またはフコース単位の1つまたは複数がメチル化されていてよいこと（必ずしも図4に示されている第3のフコース単位ではない）以外は図4の構造と同一の構造を含む。好ましくは、図4の構造の類似構造は次式：

$$L-Fuc\alpha 1 \rightarrow (3/4) - L-Fuc\alpha 1 \rightarrow (3/4) - L-Fuc\alpha 1 \rightarrow (3/4) - (D-Gal\beta 1 \rightarrow 3 - D-GalNAc(\alpha/\beta) 1 \rightarrow (3/4)) - D-HexNAc\beta 1 \rightarrow (3/4) - D-Hex$$

を有し、式中、ヘキソース単位(HexおよびHexNAc)は好ましくはガラクトース単位(それぞれGalおよびGalNAc)であり、また、フコース単位の1つまたは複数はメチル化されていてよい。

【0041】

一実施形態によると、前記コアー１抗原はコアー１炭水化物構造Galベータ１，３-GalNAcを含み、これは、骨格構造、好ましくは炭水化物構造とアルファアノマー立体配置で結合していることが好ましい。しかし、構造Galベータ１，３-GalNAcは、その代わりに骨格構造とベータアノマー立体配置で結合してよい。コアー１炭水化物構造Galベータ１，３-GalNAcはオリゴ糖または多糖の反復単位内の分岐構成成分として存在していることが好ましい。本発明による微生物のコアー１抗原のこの露出した提示には、誘導される免疫応答に対して有利な効果がある。

【0042】

本発明による微生物はコアー１抗原をその細胞表面で発現するので、したがって、少なくとも１つのコアー１特異的抗体を適切な結合条件下でコアー１陽性微生物と接触させると、前記コアー１特異的抗体によって認識され、したがって、それが結合する。結合は、例えば、ELISA試験を用いることによって試験することができる。適切な結合条件は、例えば、実施例２に記載されている。

【0043】

コアー１特異的抗体は、参照により本明細書に組み込まれるWO2008/055703およびWO2004/050707において記載され、定義されている。コアー１特異的抗体は、具体的には、特に癌細胞におけるタンパク質のヒドロキシアミノ酸であるセリンまたはトレオニンとアルファアノマー立体配置でOグリコシド結合している二糖Gal-β１，３-GalNAcであるコアー１に特異的に結合する。コアー１特異的抗体という用語は、具体的には、コアー１のみを認識する抗体、または、あまり好ましくないが、コアー１およびコアー２（Galベータ１－３（GlcNAcベータ１－６）GalNAcアルファ）を認識する抗体を指す。コアー１特異的抗体は、WO2004/050707の実施例７に示されているものなどの前記炭水化物構造の他の誘導体およびアノマーと、そこに記載されている結合条件下で、いかなる交差反応性も示さないことが好ましい。コアー１特異的抗体は、本明細書で使用される場合、具体的には、Galβ１－３GalNAcα１－ポリアクリルアミド（TFα-PAA、TFα-PAA、TFアルファ-PAA、コアー１-PAA）に特異的に結合するが、一覧番号１の物質のいずれにも結合しない：

一覧番号１

- － GlcNAcβ１－２Galβ１－３GalNAcα-PAA（GlcNAcβ１－２' TF）
- － Fucα１－２Galβ１－３GalNAcα-PAA（H型３）
- － GalNAcα１－３Galβ-PAA（A_{di}）
- － Galα１－３-GalNAcβ-PAA（T_{アルファβ}）

これは、例えばLectinity holdings, Inc. から入手することができる。あるいは、全ての構造を当業者が生成することができ、当業者は、コンジュゲートするための別の適切なポリアクリルアミド、または別の適切なキャリア分子、ならびに一致した炭水化物構造をカップリングするための適切なコンジュゲーション方法および必要な中間体の合成を選択することもできる。

【0044】

前記コアー１特異的抗体は、以下の特性：

a) アシアログリコホリン（コアー１を保有する）には結合するが、グリコホリン（コアー１を保有しない）には結合せず、この結合が好ましくは過ヨウ素酸感受性であること；

b) TFアルファ-PAAに結合し、TFベータ-PAA（Galベータ１－３GalNAcベータ１－ポリアクリルアミド）にはほとんど、もしくは全く結合せず、アシアログリコホリンに結合し、グリコホリンには結合せず、この結合が好ましくは過ヨウ素酸感受性であること；

c) TFアルファ-PAAに結合し、TFベータ-PAAにはほとんど、もしくは全く結合せず、アシアログリコホリンに結合し、グリコホリンには結合せず、NM-D4 [D

10

20

30

40

50

SM ACC 2605]、NM-F9 [DSM ACC 2606]のうちの少なくとも1つのヒト腫瘍細胞系に結合し、結合が好ましくは過ヨウ素酸感受性であること；および／または

d) 結合特性a)～c)の1つもしくは複数を有するが、例えば、NEMOD-TF1などのPAAとカップリングした三糖コア-2には結合しない、
のうちの1つまたは複数を有することが好ましい。

【0045】

上で定義されている基準a)～d)の少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、最も好ましくは全てが満たされることが好ましい。

【0046】

前記コア-1特異的抗体は、例えば、これだけに限定されないが、IgM、IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgDなどの異なる抗体クラス、任意の動物またはヒト、例えば、マウス、ラット、ヒト、ラクダ由来の全抗体、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体、または、コア-1に対する結合特異性を含む限りは、任意の抗体の断片、例えば、Fab、F(ab)2、単鎖Fv、または単ドメイン抗体であってよい。これらの抗体は、少なくとも1つの追加的なアミノ酸または変異またはポリペプチド配列、例えば、タグ、リンカーまたは多量体形成ドメインなども含有してよく、また、植物など、および、合成抗体ライブラリーから、例えば、ファージディスプレイまたはリボソームディスプレイを用いて選択されたものまたは組換え構築によるものなどの、動物とは別の供給源が起源であってよい。「抗体」という用語は、重鎖抗体、すなわち、1つまたは複数、特に2つの重鎖のみで構成される抗体、およびナノボディ、すなわち、単一の単量体可変ドメインのみで構成される抗体、ならびに抗体の断片または誘導体などの抗体も包含する。

【0047】

「特異的な結合」とは、好ましくは、抗体が、特異的なエピトープ（本発明ではコア-1）などの標的に、別の標的との結合と比較してより強力に結合することを意味する。作用剤(agent)は、第1の標的に、第2の標的に対する解離定数(K_d)よりも低い解離定数で結合する場合、第1の標的に、第2の標的と比較してより強力に結合する。作用剤が特異的に結合する標的に対する解離定数は、作用剤が特異的に結合しない標的に対する解離定数の2倍超、好ましくは5倍超、より好ましくは10倍超、なおより好ましくは20倍超、50倍超、100倍超、200倍超、500倍超または1000倍超低いことが好ましい。標的、本発明ではコア-1に対する解離定数は、 μ MまたはnMの範囲であることが好ましい。好ましい実施形態では、抗体とその特異的な標的、本発明ではコア-1との結合の解離定数は、10 μ M以下、好ましくは5 μ M以下、2 μ M以下、または1 μ M以下、より好ましくは500nM以下、200nM以下、100nM以下、50nM以下、または20nM以下、最も好ましくは10nM以下である。解離定数は、標準の条件、例えば、20℃または室温、および生理的緩衝液条件、例えば、食塩水または150mMのNaClおよび10mMのトリス/HClを含有するpH7の水性溶液において決定されることが好ましい。

【0048】

適切なコア-1結合抗体は、例えば、WO2004/050707およびWO2008/055703に記載されている。例はHB-T1(IgM) [DakoCytomation GmbH, Hamburg; Giuffre G, Vitarelli E, Tuccari G, Ponz de Leon M, Barresi G: Detection of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Virchows Arch 429巻: 345～352頁(1996年)から得られる]、HH8(IgM) [Clausen H, Stroud M, Parker J, Springer G, Hakomori S: Monoclonal antibodies directed to the blood group A associated structure, galactosyl-A: specificity and relation to the Thomsen-Friedenreich antigen. Mol Immunol 25巻: 199～204頁(1988年)]、Nemod-TF1 [Glycotope GmbH, Berlin; Goletz S, Cao Y, Danielczyk A, Ravn P

10

20

30

40

50

、Schoeber U、Karsten U. Thomsen-Friedenreich antigen: the "hidden" tumor antigen. Adv Exp Med Biol. 2003年; 535巻: 147～62頁]、および Nemod-TF2 [Glycotope GmbH、Berlin; Goletz S、Cao Y、Danielczyk A、Ravn P、Schoeber U、Karsten U: Thomsen-Friedenreich antigen: the "hidden" tumor antigen. Adv Exp Med Biol. 2003年; 535巻: 147～62頁]である。

【0049】

微生物がコア-1陽性であることを決定するため、および／またはコア-1抗原発現のレベルを決定するためには、参照により本明細書に組み込まれるWO2004/050707の16～18頁の配列表に開示されている抗体mIgM-Karo2、mIgM-Karo4、cIgG-Karo4および／もしくはcIgM-Karo4の使用、または対応する結合特異性および親和性を有する抗体の使用が特に適している。

10

【0050】

一実施形態によると、本発明によるコア-1陽性微生物またはそのコア-1陽性溶解物もしくはそのコア-1陽性画分には、以下の相補性決定領域(CDR)のセットのうちの1つを含むコア-1特異的抗体が結合する：

セット1：

重鎖CDR：配列番号1(CDR-H1)；配列番号2(CDR-H2)；配列番号3(CDR-H3)；および

軽鎖CDR：配列番号4(CDR-L1)；配列番号5(CDR-L2)；配列番号6(CDR-L3)

20

セット2：

重鎖CDR：配列番号7(CDR-H1)；配列番号8(CDR-H2)；配列番号9(CDR-H3)；および

軽鎖CDR：配列番号10(CDR-L1)；配列番号11(CDR-L2)；配列番号12(CDR-L3)。

【0051】

上で定義されているCDRのセット1を有する抗体は、配列番号13によるアミノ酸配列を含む重鎖および／または配列番号16によるアミノ酸配列を含む軽鎖、または配列番号14または配列番号15によるアミノ酸配列を含む重鎖および／または配列番号17によるアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことが好ましい。上で定義されているCDRのセット2を有する抗体は、配列番号18によるアミノ酸配列を含む重鎖および／または配列番号19によるアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことが好ましい。

30

【0052】

市販の特に適切なコア-1特異的抗体は、例えば、Nemod-TF1およびNemod-TF2である(Glycotope GmbH、Berlinから入手可能)。これらの抗体は、コア-1に対して高度に特異的である。

【0053】

CDRセット1を含む抗体およびCDRセット2を含む抗体はどちらもコア-1に特異的であるが、これらの抗体は、2つの異なる角度からコア-1に結合し、したがって、異なるエピトープに結合する。同様に、Nemod-TF1およびNemod-TF2も、どちらもコア-1炭水化物構造に特異的に結合するが、異なるエピトープに結合する。本発明によるコア-1陽性微生物またはそのコア-1陽性溶解物もしくはそのコア-1陽性画分に、コア-1炭水化物構造上の異なるエピトープを認識する少なくとも2つの異なるコア-1特異的抗体が結合することにより、コア-1抗原が、細胞表面に、露出して接近できる形態で存在することが確実になる。したがって、一実施形態によると、本発明によるコア-1陽性微生物またはそのコア-1陽性溶解物もしくはそのコア-1陽性画分には、上で定義されているCDRのセット1を有する抗体ならびに上で定義されているCDRのセット2を有する抗体が結合し、かつ／または本発明によるコア-1陽性微生物またはそのコア-1陽性溶解物もしくはそのコア-1陽性画分には、Nemod-TF1および

40

50

Nemod-TF2が結合する。

【0054】

一実施形態によると、本発明による微生物には、TFベータに結合する抗体A68-B/A11 (Glycotope、Berlin)は結合しない。

【0055】

一実施形態によると、少なくとも1つのコア-1特異的抗体と本発明によるコア-1陽性微生物またはそのコア-1陽性溶解物もしくはそのコア-1陽性画分の結合は、過ヨウ素酸処理後にコア-1特異的抗体の結合が低下したまたは存在さえしないという点で過ヨウ素酸感受性である。過ヨウ素酸処理により、表面の炭水化物部分が部分的に分解される。したがって、コア-1抗原を露出して、したがって、隠れていない（それぞれマスクされてい
10
ない）形態で保有するコア-1陽性微生物を用いると、過ヨウ素酸処理により細胞表面に存在するコア-1抗原の構造が破壊され、その結果、過ヨウ素酸処理後には、コア-1抗原がもはや存在せず、それぞれインタクトではないので、コア-1特異的抗体はもはや結合することができなくなる。他方では、コア-1抗原、特にコア-1炭水化物抗原を保有しないが、単にコア-1様炭水化物抗原を保有し、コア-1抗原が例えばさらなる糖
20
類単位でマスクされており、したがって、前処理なしではコア-1特異的抗体が結合しない微生物では、過ヨウ素酸処理後にコア-1抗原が現れ得る。少なくとも1つのコア-1特異的抗体と本発明による微生物の結合は過ヨウ素酸感受性である、すなわち、過ヨウ素酸で処理することにより、コア-1特異的抗体が過ヨウ素酸処理した微生物にもはや結合しなくなる、または過ヨウ素酸処理後に少なくとも結合の低下を示すことが好ましい。一
30
実施形態によると、本発明による微生物の溶解物もしくは画分は同じ特性を有する。

【0056】

本発明による過ヨウ素酸処理とは、具体的には、処理される材料を、過ヨウ素酸を糖類単位の少なくとも部分的な酸化に有効な濃度で含有する溶液に曝露させることを指す。例えば、過ヨウ素酸処理は、処理される材料を50mMの酢酸ナトリウム緩衝液の溶液中で5分間インキュベートした後、10mMの過ヨウ素酸ナトリウムの溶液中で1時間インキュベートすることによって実施することができる。50mMの酢酸ナトリウム緩衝液の溶液で再度洗浄した後、過ヨウ素酸の作用を、暗所において、50mMの水酸化ホウ素ナトリウムの溶液中で30分間インキュベートすることによって停止させる。

【0057】

さらに、本発明による微生物またはその溶解物もしくは画分の表面のコア-1抗原は、周囲の媒体が接近できること、特に、周囲の媒体中のコア-1特異的抗体が接近できること、したがって、細胞表面に露出していることが好ましい。

【0058】

本発明による微生物は、特に、その天然の環境に存在していないことが好ましい単離された微生物である。特に、微生物はヒトの体内に存在しておらず、ヒトまたは動物の体内に存在していないことが好ましい。一実施形態によると、本発明による微生物は、コア-1陽性ではなく、かつ/または*Bacteroides xylanisolvens*種に属さない微生物を含む組成物から単離されたものである。一実施形態によると、本発明による微生物は、本発明による微生物の少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも
40
90%、好ましくは少なくとも95%、97%、99%、最も好ましくは約100%を含む培養物中に存在するまたはそれから得られる。

【0059】

「a（ある）微生物」という用語は、本明細書で使用される場合、ただ1つの単細胞生物ならびに多数の単一の単細胞生物を指す場合がある。例えば、「a（ある）*Bacteroides xylanisolvens*種の微生物」という用語は、1つの単一の*Bacteroides xylanisolvens*種の*Bacteroides xylanisolvens*細菌細胞ならびに複数の*Bacteroides xylanisolvens*種の細菌細胞を指す場合がある。「a（ある）*Bacteroides xylanisolvens*種の微生物」および「a（ある）*Bacteroides*
50

xylanisolvens 微生物」という用語は本明細書では同義に使用される。「a (ある) 微生物」という用語は、多数の細菌細胞を指すことが好ましい。具体的には、前記用語は、少なくとも 10^3 個の細菌細胞、好ましくは少なくとも 10^4 個の細菌細胞、少なくとも 10^5 個または少なくとも 10^6 個の細菌細胞を指す。

【0060】

本発明による *Bacteroides xylanisolvens* 微生物は、短鎖脂肪酸 (SCFA) を産生することができることが好ましい。微生物の炭水化物発酵の最終産物として産生される短鎖脂肪酸 (SCFA) は健康促進性を有する。例として、プロピオン酸は、潜在的なコレステロール低下効果および抗脂質生成効果を有することが報告された。プロピオン酸は、満腹をさらに刺激し得、また、酢酸および酪酸と一緒に抗発がん効果を示す。好ましい実施形態では、本発明による微生物は、プロピオン酸、酢酸、コハク酸、ギ酸および乳酸からなる群から選択される1種または複数種のSCFAを産生することができる。本発明による微生物はプロピオン酸および／または酢酸を産生することができることが好ましい。好ましい実施形態では、これらのSCFAは本発明による微生物またはその溶解物もしくは画分を含有する本発明による組成物にも存在する。本発明による微生物を生育可能な形態で患者に投与するある特定の実施形態では、前記微生物は、投与された後に患者の体内で前記SCFAをなお産生することができる。

【0061】

好ましい実施形態では、本発明による *Bacteroides xylanisolvens* 微生物は、特に胃を経由する通過の条件で、および好ましくは特に摂取後のヒトの腸の少なくとも一部を経由する通過の条件でも生存することができる。具体的には、ヒトの胃内の条件で生存するとは、胃液中で、微生物を含む組成物における本発明による *Bacteroides xylanisolvens* 微生物の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも85%が少なくとも180分にわたって生存することを指す。さらに、ヒトの腸内の条件で生存するとは、腸液中で、微生物を含む組成物における本発明による *Bacteroides xylanisolvens* 微生物の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%が少なくとも240分にわたって生存することを指す。好ましい実施形態では、本発明による微生物は、前記処置後、なおその表面に少なくとも1つのコアー1抗原を含む。本発明による微生物は、なおその表面に、処置の開始時にその表面にあったコアー1抗原の量の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%である量のコアー1抗原を含むことがより好ましい。さらに、本発明による微生物は、具体的には本明細書に記載の通り、上記の処置後に、その表面にコアー1を発現することができる。したがって、本発明による微生物のコアー1発現は、ヒト胃腸管内の条件の影響を受けず、前記微生物は、なおその表面に高く安定なコアー1抗原密度を含み、生育可能な形態で使用する場合、経口投与された後になおコアー1を発現することができる。したがって、本発明による微生物は、経口製剤での治療剤として使用するために特に有利である。

【0062】

好ましい実施形態では、本発明による *Bacteroides xylanisolvens* 微生物は、以下の安全特性：

(i) 抗生物質であるメトロニダゾール、メロペネムおよび／もしくはクリンダマイシンに対して感受性であること；

(ii) プラスミドRP4 (DSM3876) および／もしくはプラスミドpSC101 (DSM6202) を含有しないこと；

(iii) β -ラクタマーゼ遺伝子である *cfiA* および／もしくは *cfxA* を含有しないこと；

(iv) ビルレンス因子である *Bacteroides fragilis* の多糖Aおよび／もしくは *Bacteroides fragilis* のエンテロトキシンBftお

10

20

30

40

50

よび／もしくは遺伝子ompWによりコードされる「Ton B-結合外膜タンパク質」を含有しないこと；

(v) 細胞外デオキシリボヌクレアーゼ活性、細胞外コンドロイチナーゼ活性、細胞外ヒアルロニダーゼ活性および／もしくは細胞外ノイラミニダーゼ活性のいずれも示さないこと；ならびに／または

(vi) ヒト結腸の上皮細胞に付着しないことの1つまたは複数を有する。

【0063】

好ましい実施形態では、本発明による *Bacteroides xylanisolvens* 微生物は、

a) 2011年7月12日に、Glycotope GmbH、Robert-Rössle-Str. 10、13125 Berlin (DE) によって、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)、Inhoffenstrasse 7B、38124 Braunschweig (DE) においてブタペスト条約の必要条件に従って受託番号DSMZ 25004の下で寄託された *Coreotics* (DSMZ 25004)、

b) *Coreotics* に由来する微生物、または

c) *Coreotics* ホモログである。

【0064】

Coreotics (DSMZ 25004) は、*Bacteroides xylanisolvens* 種に属する。*Coreotics* は、幅0.4~0.5 μmであり、一般に長さ1~2 μmであり、特に、Wilkins-Chalgren寒天でコロニーが成長し、18時間後に環状の乳白色の隆起した凸状の表面を有して直径2~3 mmになる、絶対嫌気性、非孢子形成性、非運動性かつグラム陰性の桿状細菌であることが好ましい。*Coreotics* は、その細胞表面で高度に安定な均一の強力なコア-1発現を示す。実施例2に示されている通り、*Coreotics* の10個の異なるコロニーについて決定されたコア-1抗原発現値は、それらのコア-1抗原発現の変動性がわずかである、ELISAアッセイのOD値を示す(実施例2を参照されたい)。それにより、例えば、薬学的組成物に*Coreotics* を使用した場合、一定の均一かつ高い量のコア-1抗原が提供される。この発現プロファイルは独特であり、*Coreotics* が、例えば*Coreotics* よりも高いコア-1発現の変動性を示す他のコア-1抗原発現微生物、例えば、*Bacteroides ovatus* AG6 DSM18726 (WO2008/055703に開示されている) などに対してかなりの利点を有することも示す。*Coreotics* のコア-1陽性溶解物およびそのコア-1陽性画分も包含される。

【0065】

Coreotics に由来する微生物および／または*Coreotics* ホモログは以下の特性：

a) 上で定義された *Bacteroides xylanisolvens* の種に属すること；

b) DNA間ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、DSMZ 25004として寄託された *Coreotics* および／またはDSMZ 18836として寄託された *Bacteroides xylanisolvens* に対して少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%もしくは少なくとも99%のDNA間の関連性を示すこと；

c) DSMZ 25004として寄託された *Coreotics* および／またはDSMZ 18836として寄託された *Bacteroides xylanisolvens* に対して少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.5%、最も好ましくは約100%の16S

10

20

30

40

50

r R N A 遺伝子配列類似性のレベルを示すこと；

d) 以下の特性：

i) D S M 2 5 0 0 4 として寄託された *C o r e o t i c s* の平均コアー 1 発現の少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、もしくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 % の平均コアー 1 抗原発現を有すること；

i i) 実施例 2 に記載の E L I S A アッセイにおいて平均で少なくとも 0 . 2 5、好ましくは少なくとも 0 . 3、より好ましくは少なくとも 0 . 3 5 の吸光度値を実現すること；

i i i) 細胞表面に、図 4 の構造 # 1、構造 # 2、構造 # 3、構造 # 4 および構造 # 5、その類似構造、および／もしくはその反復単位からなる群から選択される少なくとも 1 つの炭水化物構造を発現していること；

i v) 細胞培養物中で、前記微生物の少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、もしくは少なくとも 9 5 %、より好ましくは約 1 0 0 % が、D S M 2 5 0 0 4 として寄託された *C o r e o t i c s* の平均コアー 1 抗原発現の少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 % のコアー 1 抗原発現レベルを有すること；および／もしくは

v) 細胞培養物中で、前記微生物の少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、もしくは少なくとも 9 5 %、より好ましくは約 1 0 0 % が、D S M 2 5 0 0 4 として寄託された *C o r e o t i c s* の平均コアー 1 抗原発現の 7 0 % から 1 5 0 % まで、7 5 % から 1 2 5 % まで、好ましくは 8 0 % から 1 1 5 % まで、最も好ましくは 9 0 % から 1 1 0 % までの範囲内のコアー 1 抗原発現レベルを有すること

の 1 つ、2 つ、好ましくは 3 つ、より好ましくは 4 つ、最も好ましくは全てを有するコアー 1 抗原発現を示すこと；

e) 上に開示されている安全特性のうちの 1 つもしくは複数を有すること；

f) ヒトの胃内および／もしくは腸内の条件で生存し、特に、前記条件で生存後にコアー 1 を発現することができる；ならびに／または

g) 短鎖脂肪酸、特にプロピオン酸を産生することができること
の 1 つまたは複数を有することが好ましい。

【0066】

上で定義されている基準 a) ～ f) の少なくとも 2 つ、より好ましくは少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つまたは少なくとも 6 つ、最も好ましくは全てが満たされることが好ましい。

【0067】

第 2 の態様では、本発明は、本発明の第 1 の態様によるコアー 1 陽性微生物またはそのコアー 1 陽性溶解物もしくはそのコアー 1 陽性画分を含む組成物を提供する。含まれる本発明によるコアー 1 陽性微生物は同一であっても異なってもよい。本発明の第 1 の態様による *B a c t e r o i d e s x y l a n i s o l v e n s* 種のコアー 1 陽性微生物の特性に関しては、上記の開示を参照されたい。コアー 1 陽性溶解物、コアー 1 陽性画分および／またはコアー 1 陽性断片に関して同じことが当てはまる。

【0068】

組成物中の微生物の 8 0 % 以上、より好ましくは 8 5 % 以上、9 0 % 以上、9 5 % 以上、9 8 % 以上または 9 9 % 以上、最も好ましくは約 1 0 0 % が本発明の第 1 の態様による *B a c t e r o i d e s x y l a n i s o l v e n s* 種のコアー 1 陽性微生物であることが好ましい。

【0069】

好ましい実施形態では、本発明による組成物中のコアー 1 陽性微生物は、安定なコアー 1 抗原発現を特徴とする。以下の安定性の程度が得られることが好ましい。一実施形態によると、組成物中のコアー 1 陽性微生物の少なくとも 3 0 %、好ましくは少なくとも 5 0

10

20

30

40

50

%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%が、前記組成物中の全てのコアー1陽性微生物の平均コアー1発現レベルの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、少なくとも80%のコアー1抗原発現レベルを有する。組成物中のコアー1陽性微生物の少なくとも95%が、組成物中の全てのコアー1陽性微生物の平均コアー1発現レベルの少なくとも75%のコアー1発現レベルを有することが好ましい。一実施形態によると、組成物中のコアー1陽性微生物の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%が、DSM25004として寄託された*Coreotics*の平均コアー1発現レベルの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%のコアー1抗原発現レベルを有する。組成物中のコアー1陽性微生物の少なくとも95%が、DSM25004として寄託された*Coreotics*の平均コアー1発現レベルの少なくとも75%のコアー1発現レベルを有することが好ましい。前記コアー1陽性微生物は*Bacteroides xylanisolvens*種のものであることが好ましい。

10

【0070】

好ましい実施形態によると、本発明による組成物中のコアー1陽性微生物は、均一なコアー1抗原の発現を特徴とする。以下の均一性の程度が実現されることが好ましい。組成物中のコアー1陽性微生物の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%が、組成物中の全てのコアー1陽性微生物の平均コアー1抗原発現の60%から150%まで、70%から140%まで、好ましくは70%から130%まで、75%から125%まで、80%から120%まで、または85%から115%まで、最も好ましくは90%から110%までの範囲内のコアー1抗原発現レベルを有することが好ましい。特に、組成物中のコアー1陽性微生物の少なくとも95%が、組成物中の全てのコアー1陽性微生物の平均コアー1発現レベルの75%から125%までの範囲内であるコアー1発現レベルを有する。一実施形態によると、組成物中のコアー1陽性微生物の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%がDSM25004として寄託された*Coreotics*の平均コアー1抗原発現の60%から150%まで、70%から140%まで、好ましくは70%から130%まで、75%から125%まで、80%から120%まで、または85%から115%まで、最も好ましくは90%から110%までの範囲内のコアー1抗原発現レベルを有する。特に、組成物中の本発明によるコアー1陽性微生物の少なくとも95%が、DSM25004として寄託された*Coreotics*の平均コアー1発現レベルの75%から125%までの範囲内であるコアー1発現レベルを有する。前記コアー1陽性微生物は*Bacteroides xylanisolvens*種のものであることが好ましい。

20

30

【0071】

コアー1抗原発現レベルならびに安定性および均一性を決定するための手段は上に記載されている。

40

【0072】

一実施形態によると、第2の態様による組成物は細胞培養物である。本発明によるコアー1陽性微生物を含む細胞培養物についての好ましい値は、本発明による第1の態様と併せて上に記載されている。

【0073】

一実施形態によると、組成物中の単数の微生物または複数の微生物は、生育可能な形態、非生殖形態、生育不能な形態または溶解された形態で存在する。一実施形態によると、本発明の第2の態様による前記組成物には前記微生物のコアー1陽性画分のみが使用されている。

50

【0074】

組成物は、少なくとも 10^3 個の本発明による微生物、より好ましくは少なくとも 10^4 個、少なくとも 10^5 個または少なくとも 10^6 個の本発明による微生物、またはこの量の本発明による微生物の、コアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分を含むことが好ましい。

【0075】

第3の態様では、本発明は、医学において使用するための、本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分または本発明の第2の態様による組成物を提供する。本発明によるコアー1陽性微生物、その溶解物もしくは画分および／または組成物を、コアー1に対する免疫応答を誘導および／または増強するために使用することが好ましい。誘導または増強された免疫応答は、体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答であってよく、特にコアー1に対する抗体力価の誘導を伴う。それにより、コアー1陽性腫瘍、がん、胃腸障害および／またはコアー1陽性疾患を処置および／または予防することができる。誘導および／または増強されたコアー1特異的免疫応答は、例えば、コアー1陽性がん細胞に対する防御として、具体的には、コアー1陽性腫瘍または転移の予防、低減のためまたは拡散に対して機能する。本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分または本発明の第2の態様による組成物は、がんに対するワクチンとしても使用することができる。コアー1陽性微生物の他の適切な治療的使用は参照により本明細書に組み込まれるWO 2008/055703にも記載されている。

【0076】

具体的には、本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分または本発明の第2の態様による組成物を、がんを有するまたはがんを発症する危険性がある患者に投与することができる。一実施形態によると、表面にコアー1抗原を発現している本発明によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分は、患者においてコアー1抗原に対する特異的な免疫応答を引き出すことができる。免疫応答は、体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答であってよく、細胞性免疫応答、特に、好ましくは免疫系の記憶細胞の形成を含めた適応免疫系の応答を含むことが好ましい。

【0077】

がんは、表面にコアー1炭水化物 (carbohydrate) 抗原を保有する腫瘍細胞を含むがん (コアー1陽性がん) であることが好ましい。がんは、結腸癌または結腸癌の転移であることが好ましい。

【0078】

「患者」という用語は、本明細書で使用される場合、具体的には、ヒト、非ヒト霊長類または別の動物、特に哺乳動物、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、またはマウスおよびラットなどのげっ歯類を指す。患者はヒトであることが好ましい。

【0079】

「がん」という用語は、本発明によると、具体的には、白血病、精上皮腫、黒色腫、奇形腫、リンパ腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、直腸がん、子宮体がん、腎がん、副腎がん、甲状腺がん、血液がん、皮膚がん、脳がん、子宮頸がん、腸がん (intestinal cancer)、肝がん、結腸がん、胃がん、腸がん (intestine cancer)、頭頸部がん、消化器がん、リンパ節がん、食道がん、結腸直腸がん、膀胱がん、耳鼻咽喉 (ENT) がん、乳がん、前立腺がん、子宮がん、卵巣がんおよび肺がんならびにその転移を含む。その例は、結腸癌、結腸直腸癌、および上記のがんの種類または腫瘍の転移である。がんという用語は、本発明によると、がん転移も含む。「腫瘍」という用語は、具体的には、誤調節された細胞増殖によって形成された細胞の一群または組織を指す。腫瘍は、構造的な組織化および正常な組織との機能的な協調の部分的なまたは完全な欠乏を示し得、通常、良性か悪性のいずれかであり得る識別可能な組織の塊を形成する。「転移」という用語は、具体的には、がん細胞がその元の部位から体の別の部分に拡散する

ことを指す。転移の形成は、非常に複雑なプロセスであり、通常、がん細胞が原発腫瘍から脱離し、体循環に進入し、体内の他の場所の正常組織内に位置して成長することを伴う。腫瘍細胞が転移した場合、新しい腫瘍は二次腫瘍または転移性腫瘍と称され、その細胞は通常、元の腫瘍における細胞と似ている。これは、例えば、乳がんが肺に転移した場合、二次腫瘍は、異常な肺細胞ではなく、異常な乳房細胞で構成されることを意味する。それで、肺における腫瘍は肺がんではなく転移性乳がんと呼ばれる。

【0080】

本発明によると、「コアー1陽性疾患」という用語は、具体的には、コアー1腫瘍抗原の出現を特徴とする真核細胞、腫瘍細胞、がんまたは他の生物材料に関連する任意の疾患を指す（上記を参照されたい）。

10

【0081】

本発明は、第4の態様において、

i) 本発明による第1の態様によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分（本発明によるコアー1陽性微生物の詳細は、上に記載されている；上記の開示を参照されたい）

および／または

ii) 本発明の第2の態様による組成物（それぞれの組成物の詳細は、上に記載されている；上記の開示を参照されたい）

を含む薬学的組成物も提供する。

20

【0082】

「薬学的組成物」という用語は、具体的には、ヒトまたは動物に投与するために適した組成物、すなわち、薬学的に許容される構成成分を含有する組成物を指す。薬学的組成物は、活性化化合物として第1の態様によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分および／またはその第2の態様による組成物を、キャリア、希釈剤または薬学的賦形剤、例えば、緩衝剤、防腐剤および張度修飾物質と一緒に含むことが好ましい。適切な医薬用途は、上に記載されている；上記の開示を参照されたい。薬学的組成物は経口的に投与することができるが、任意の他の適切な投与経路によって投与することもできる。

【0083】

本発明による薬学的組成物は、患者に微生物約 10^4 ～約 10^{13} 個の日用量をもたらし量または濃度でコアー1陽性微生物を含むことが好ましい。日用量は、微生物 2.8×10^{12} 個、好ましくは微生物 2.3×10^{12} 個を超えないこと、および／または微生物少なくとも 10^7 個、好ましくは少なくとも微生物 10^9 個であることが好ましい。具体的には、日用量は、微生物約 10^{10} ～約 10^{12} 個の範囲である。薬学的組成物は、それぞれが上記のコアー1陽性微生物の日用量を含む単回単位用量の形態であることが好ましい。コアー1陽性微生物のコアー1陽性溶解物もしくはコアー1陽性画分を含む薬学的組成物に関しては、組成物中のコアー1陽性溶解物もしくはコアー1陽性画分の量または濃度は上記の組成物中のコアー1陽性微生物の量または濃度と同等である。具体的には、組成物中のコアー1陽性溶解物もしくはコアー1陽性画分は、上記のコアー1陽性微生物の量または濃度から得られる。

30

40

【0084】

本発明によるコアー1陽性微生物および本発明による組成物中のコアー1陽性微生物は、生育可能な形態、非生殖形態、生育不能な形態または溶解された形態で使用するができる。ある特定の実施形態では、コアー1陽性微生物は生育可能な形態で使用される。具体的には、生育可能な形態で使用される場合、微生物は、患者の体内でなおプロピオン酸などの短鎖脂肪酸を産生することができ、それにより、上記の通りさらなる健康利益がもたらされる。微生物は、非病原性の形態、非生殖形態、生育不能な形態または溶解された形態で使用するができる。さらに、前記微生物のコアー1陽性画分も使用することができる。本発明によると、微生物のコアー1陽性溶解物もしくはコアー1陽性画分は、上記の通りコアー1特異的抗体が接近できるおよび／または上記の通り過ヨウ素酸感受

50

性であることが好ましい少なくとも1つのコアー1抗原を含む。

【0085】

本発明によるコアー1陽性微生物および薬学的組成物の1つの具体的な利点は、ヒトまたは動物の体内でコアー1に対する抗体力価を誘導することができることである。このコアー1抗体力価により、特に、コアー1陽性疾患、特にコアー1陽性腫瘍細胞またはコアー1陽性がん細胞を含むがんからの全身の保護が提供される。したがって、好ましい実施形態では、本発明によるコアー1陽性微生物またはそのコアー1陽性溶解物もしくはコアー1陽性断片もしくはコアー1陽性画分または本発明による薬学的組成物は、投与されると、ヒトまたは動物の体内でコアー1抗原に対する抗体力価を誘導することができる。誘導された抗体力価は、少なくとも一般的な検出方法で検出可能であることが好ましく、コアー1陽性疾患、特にコアー1陽性腫瘍細胞またはコアー1陽性がん細胞を含むがんにかかる危険性を低減するのに十分であることが好ましい。

10

【0086】

第5の態様によると、本発明は、

- a) 本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物を提供するステップと、
- b) 必要に応じて、前記コアー1陽性微生物を加工して、そのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分を得るステップと、
- c) 前記コアー1陽性微生物および／または前記そのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分をコアー1陽性生成物の製造において使用するステップとを含む、コアー1陽性生成物を製造するための方法を提供する。

20

【0087】

生成物は任意の生成物であってよく、これだけに限定されないが、医薬生成物を含む。それぞれの生成物の製造および本発明によるコアー1陽性微生物の詳細に関しては、上記の開示も参照されたい。本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物は、生育可能な形態または生育不能な形態で 사용할ことができる。製造された生成物をさらに加工することもできる。

【0088】

「コアー1陽性微生物の画分」という用語および同様の用語は、本明細書で使用される場合、具体的には、前記微生物のより小さな部分の調製物または精製物、例えば、本発明による前記コアー1陽性微生物のコアー1陽性構成成分の細胞壁調製物、エンベロープ調製物、溶解物、リポ多糖調製物、莢膜の調製物、または莢膜多糖調製物などを指す。前記画分は、所望の免疫応答を引き出すことができるためには、前記コアー1陽性微生物の少なくとも1つのコアー1陽性構成成分を含むべきである。これらは、少なくとも1つの本発明によるコアー1陽性微生物由来の調製物または精製物から得ることができる。前記調製物および精製物は、単回のもしくは逐次的な細胞分画（複数可）、フェノール水抽出、エーテル抽出、リゾチームを用いた消化などの酵素消化、またはクロマトグラフィー法などの当業者に公知の方法によって得ることができる。さらに、コアー1陽性微生物の画分という用語は、人工的に作製された、本発明のコアー1陽性微生物にも見出されるコアー1陽性構成成分も含む。

30

【0089】

一実施形態によると、第5の態様による方法に従って作製されるコアー1陽性生成物は、抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞である。この場合、本発明の第5の態様による方法のステップc)は、前記抗原提示細胞に本発明によるコアー1陽性微生物および／またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分を負荷するステップを含むことが好ましい。抗原提示細胞はヒトのものであることが好ましい。抗原提示細胞は白血病細胞系MUTZ-3 (DSM ACC 295) から得た樹状細胞またはMUTZ-3に由来する細胞、例えば、NEMOD-DC (WO 2003/023023を参照されたい) であることが好ましい。

40

【0090】

WO 2008/055703では、コアー1陽性微生物ならびにその溶解物および／ま

50

たは画分は、*in vitro*において機能的な抗原提示細胞、特に樹状細胞により提示されると、ヒトT細胞をコアー1特異的様式で活性化することができ、それにより、新しい治療機会が開かれることが記載されている（参照により本明細書に組み込まれるWO 2008/055703、特に77頁、26行目～85頁、20行目を参照されたい）。

【0091】

したがって、本発明の第6の態様によると、コアー1に対する機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞を製造する方法であって、

a) 本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物を提供するステップと、（請求項1から5も参照されたい）

b) 必要に応じて、前記コアー1陽性微生物を加工して、そのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分を得るステップと、

c) 適量の少なくとも1つの抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞を、適量の、

i) 前記コアー1陽性微生物および／または

i i) 前記そのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分

と接触させ、それにより、コアー1に対する機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞を得るステップと

を含む方法が提供される。

【0092】

ステップc)の接触は、コアー1に対する少なくとも1つの機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞を生成するために適した時間にわたり、そのために適した条件下で行う。ステップc)でコアー1陽性化合物と接触させる抗原提示細胞は、未成熟の抗原提示細胞、例えば、未成熟の樹状細胞であり、それをその後成熟させてコアー1に対する機能的な抗原提示細胞を得ることが好ましい。前記接触させるステップc)の詳細は、WO 2008/055703にも記載されている；それぞれの開示を参照されたい。

【0093】

得られた、コアー1に対する機能的な抗原提示細胞は、上記の通りコアー1特異的抗体を使用することによって試験することができる。コアー1に対する機能的な抗原提示細胞に、使用する本発明によるコアー1陽性微生物（またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分、上記を参照されたい）のコアー1抗原を負荷する。したがって、コアー1抗原は、それぞれに負荷された抗原提示細胞上のコアー1特異的抗体によって検出することができる。得られた、コアー1に対する機能的な抗原提示細胞（抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞の混合物であってもよい）は、特異的にコアー1に対するT細胞、特にヒト一次T細胞を活性化することができ、したがって、コアー1に対する特異的な細胞性免疫応答を刺激することができる。T細胞活性化は、例えば、WO 2008/055703に記載の通り細胞性免疫応答試験によって試験することができる。

【0094】

第7の態様によると、コアー1に対する活性化T細胞、T細胞、T細胞クローンまたはT細胞系を作製する方法であって、

a) 本発明の第6の態様による方法を用いて、コアー1に対する少なくとも1つの機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞を得るステップと、

b) コアー1に対する適量の機能的な抗原提示細胞を、適量の、少なくとも1つのT細胞またはT細胞の混合物または少なくとも1つのT細胞を含む細胞の混合物と接触させるステップと、

c) 前記T細胞またはT細胞の混合物を、コアー1に対する前記負荷された機能的な抗原提示細胞と一緒に培養して、コアー1に対する1つまたは複数のT細胞を活性化および／または初回刺激するステップと

を含む方法が提供される。

【0095】

本発明と併せて使用することもできる対応する作製方法の詳細は、WO 2008/055703にも記載されている；それぞれの開示を参照されたい。

【0096】

本発明による第6の態様または第7の態様による方法によって作製される、コアー1陽性細胞および／または疾患に対する体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答を誘導する、コアー1に対する機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞、コアー1に対する1つまたは複数の活性化T細胞、コアー1に対するT細胞を含む細胞組成物、コアー1に対するT細胞系、またはコアー1に対するT細胞クローンも提供される。それぞれの細胞は、特にコアー1陽性腫瘍などのコアー1陽性疾患の予防または治療のための薬剤を製造するのに適している。

【0097】

本発明は、コアー1特異的免疫応答を誘導または増強するため、および／または機能的な抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞、および／または活性化T細胞、T細胞系もしくはT細胞クローンまたはコアー1に対する抗体を生成するための、本発明の第1の態様によるコアー1陽性微生物および／またはそのコアー1陽性溶解物もしくはそのコアー1陽性画分の *in vivo* または *in vitro* における使用にも関する。

【0098】

「含む (comprise)」という表現は、本明細書で使用される場合、その文字通りの意味に加えて、「から本質的になる (consist essentially of)」および「からなる (consist of)」という表現も包含し、明確にそれを指す。したがって、「含む (comprise)」という表現は、明確に列挙されている要素を「含む (comprises)」主題が、別の要素を含まない実施形態、ならびに明確に列挙されている要素を「含む (comprises)」主題が、別の要素を包含する可能性がある、および／または実際に包含する実施形態を指す。同様に、「有する (have)」という表現は、「含む (comprise)」という表現と、「から本質的になる (consist essentially of)」および「からなる (consist of)」という表現も包含し、明確にそれを指すと理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図1】図1は、本発明による微生物 *Coreotics* および種々の参照微生物の制限分析を示す図である。結果により、*Coreotics* が *Bacteroides xylinisolvans* 種であることが支持される。

【図2】図2は、*Coreotics* (DSM25004) および AG6 (DSM18726) の、コアー1特異的抗体を使用した抗原 ELISA 結合試験を示すグラフである。種々の *Coreotics* または AG6 のコロニーを、マイクロタイターウェルにプレーティングし、コアー1特異的抗体を結合させた。ペルオキシダーゼとカップリングした二次抗体を使用して結合を可視化した。ELISA アッセイにより、*Coreotics* は安定かつ均一なコアー1抗原の発現を有するが、AG6 はそれよりも安定ではなく、したがって、それよりも均一でないコアー1発現を有することが示されている。AG6 の平均コアー1抗原発現も *Coreotics* の平均コアー1抗原発現より低かった。

【図3】図3は、ELISA アッセイを用いた抗コアー1抗体と *Coreotics* (DSM25004) の結合を示すグラフである。先行する過ヨウ素酸処理により、抗体結合性が消失した。コアー1陽性対照 (PK) について同じ結果が得られた。参照菌株 *Bacteroides xylinisolvans* DSM18836 ではいかなる抗コアー1抗体結合も示されなかった。

【図4】図4は、*Coreotics* 微生物の細胞表面に存在し得るコアー1様二糖モチーフを保有する種々の炭水化物構造を示す図である。

【図5】図5は、プラスミドおよび β -ラクタマーゼ遺伝子である *cfiA*、*cfxA* および *cepA* の決定を示す図である。(A) プラスミド：単離されたプラスミド DNA それぞれ 20 μ g をローディングした。レーン：1、1 kb の DNA ラダー；2、*E. coli* DSM3876；3、*E. coli* DSM6202；4、*Bacteroides xylinisolvans* DSM25004。(B) *cfiA* 遺伝子：レーン：

10

20

30

40

50

1、100bpのDNAラダー；2、*Bacteroides fragilis* TAL3636；3、*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004；4、陰性対照。(C) *cfxA*遺伝子：レーン：1および6、1kbのDNAラダー；2、*Bacteroides ovatus* MN7；3、*Bacteroides ovatus* MN23；4、*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004；5、陰性対照。(D) *cepA*遺伝子：レーン：1および6、100bpのDNAラダー；2、*Bacteroides fragilis* DSM1396；3、*Bacteroides ovatus* MN23；4、*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004；レーン5、陰性対照。

【図6】図6は、ビルレンスコード遺伝子である**bft**、**wcfR**、**wcfS**、および**ompW**の決定を示す図である。(A) **bft**遺伝子：レーン：1、100bpのDNAラダー；2、*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004；3、*Bacteroides fragilis* ATCC43858；4、陰性対照。(B) **wcfR**遺伝子：レーン：1、1kbのDNAラダー；2、*Bacteroides fragilis* DSM1396；3、*Bacteroides fragilis* ATCC43858；4、*Bacteroides fragilis* DSM2151；5、*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004；6、*Bacteroides fragilis* TAL3636；7、陰性対照。(C) **wcfS**遺伝子：レーン：レーン：1、1kbのDNAラダー；2、*Bacteroides fragilis* DSM1396；3、*Bacteroides fragilis* ATCC43858；4、*Bacteroides fragilis* DSM2151；5、*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004；6、*Bacteroides fragilis* TAL3636；7、陰性対照。(D) **ompW**遺伝子：レーン：1、100bpのDNAラダー；2、*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004；3、*Bacteroides caccae* DSM19024；4、陰性対照。

【図7】図7は、菌株DSM25004とCaco-2細胞の結合の分子分析を示す図である。(A) GAPDHおよびスクロースイソマルターゼ。レーン：1、100bpのDNAラダー(Bioline)；2、1日目；3、3日目；4、6日目；5、8日目；6、10日目；7、13日目；8、14日目、9、陰性対照。(B) 菌株DSM25004および*Bacteroides fragilis* DSM1396の検出。レーン：1、100bpのDNAラダー；2、1回目の洗浄ステップ後の菌株DSM25004；3、6回目の洗浄ステップ後の菌株DSM25004；4、菌株DSM25004+Caco-2細胞；5、1回目の洗浄ステップ後の*Bacteroides fragilis* DSM1396；6、6回目の洗浄ステップ後の*Bacteroides fragilis* DSM1396+Caco-2細胞；7、*Bacteroides fragilis* DSM1396+Caco-2細胞；8、Caco-2細胞；9、菌株DSM25004；10、*Bacteroides fragilis* DSM1396；11、陰性対照。(C) *Lactobacillus acidophilus*の検出。レーン：1、1回目の洗浄ステップ後の*Lactobacillus acidophilus* DSM9126；2、6回目の洗浄ステップ後の*Lactobacillus acidophilus* DSM9126；3、*Lactobacillus acidophilus* DSM9126+Caco-2細胞；4、Caco-2細胞；5、*Lactobacillus acidophilus* DSM9126；6、陰性対照；7、100bpのDNAラダー。

【図8-1】図8は、90日間の経口毒性試験中のマウスの体重および摂食量を示すグラフである。(A) 雄のCrl:NMRIマウスの体重。(B) 雌のCrl:NMRIマウスの体重。(C) 雄のCrl:NMRIマウスの摂食量。(D) 雌のCrl:NMRIマウスの摂食量。群当たりの平均値：1日当たり動物当たり、群1(0)、群2(1×10^6)、群3(1×10^7)、群4(1×10^8)の*Bacteroides xylan*

isolvens DSM25004のCFU、および群5 (1×10^{11}) の低温殺菌した *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004。統計的有意性は $P \leq 0.01$ によって示された。値はダネット検定によった。

【図8-2】図8は、90日間の経口毒性試験中のマウスの体重および摂食量を示すグラフである。(A)雄のCrl:NMRIマウスの体重。(B)雌のCrl:NMRIマウスの体重。(C)雄のCrl:NMRIマウスの摂食量。(D)雌のCrl:NMRIマウスの摂食量。群当たりの平均値：1日当たり動物当たり、群1(0)、群2(1×10^6)、群3(1×10^7)、群4(1×10^8)の *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004のCFU、および群5 (1×10^{11}) の低温殺菌した *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004。統計的有意性は $P \leq 0.01$ によって示された。値はダネット検定によった。

【図9】図9は、マルチプレックス種特異的PCRによる、注射溶液中のコンタミネーションの検出を示す図である。レーン：1、陽性対照 (*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004)；2、溶液2 (1ml当たり *Bacteroides fragilis* RMA6791、 1×10^9 個)；3、溶液3 (1ml当たり *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004、 1×10^9 個)；4、溶液4 (1ml当たり *Bacteroides fragilis* RMA6791、 1.5×10^8 個)；5、溶液5 (1ml当たり *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004、 1.5×10^8 個)；6、溶液6 (1ml当たり *Bacteroides fragilis* RMA6791、 5×10^6 個)；7、溶液7 (1ml当たり *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004、 5×10^6 個)、8、陽性対照 (*Bacteroides fragilis* RMA6791)；9、溶液1 (対照群)。コンタミネーション対照：レーン10、90%の *Bacteroides fragilis* RMA6791と10%の *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004の混合物；レーン11、10%の *Bacteroides fragilis* RMA6791と90%の *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004の混合物。レーン12、1kbのDNAラダー (Fermentas)。

【図10】図10は、穿刺した膿瘍から単離したDNAの種特異的PCRを示す図である。(A) *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004を注射した動物の膿瘍における *Bacteroides xylanisolvens* の検出。レーン：1、100bpのDNAラダー (Fermentas)；2～3、群3 (体重1kg当たり *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004、 4.6×10^9 個)；4～5、群5 (体重1kg当たり *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004、 6.9×10^8 個)；6～7、群7 (体重1kg当たり *Bacteroides xylanisolvens* DSM25004、 2.3×10^7 個)；8、陽性対照 (*Bacteroides xylanisolvens* DSM25004)；9、陰性対照 (水)。(B) *Bacteroides fragilis* RMA6791を注射した動物の膿瘍における *Bacteroides fragilis* の検出。レーン：1、100bpのDNAラダー (Fermentas)；2～3、群2 (体重1kg当たり *Bacteroides fragilis* RMA6791、 4.6×10^9 個)；4～5、群4 (体重1kg当たり *Bacteroides fragilis* RMA6791、 6.9×10^8 個)；6～7、群6 (体重1kg当たり *Bacteroides fragilis* RMA6791、 2.3×10^7 個)、8、陽性対照 (*Bacteroides fragilis* RMA6791)；9、陰性対照 (水)；10、1kbのDNAラダー (fermentas)。

【実施例】

【0100】

(実施例1)

コア-1陽性微生物は、*Bacteroides xylanisolvens* 種の別

個の菌株である

【0101】

1. 1 ヒト糞便試料からの細菌の選択的な富化および単離

【0102】

ヒト糞便試料からコアー1陽性細菌を富化するために、コアー1に特異的なモノクローナル抗体でコーティングした磁気ビーズを製造者の推奨に従って調製した (Dynal Biotech ASA、Oslo、Norway)。過去3カ月の間に抗生物質を摂取していない健康なヒト被験体由来の糞便試料をこの試験に使用した。糞便試料を還元PBS (PBS_{red}: 1 L当たり8.5 gのNaCl、0.3 gのKH₂PO₄、0.6 gのNa₂HPO₄、0.1 gのペプトンおよび0.25 gのシステインHCl、pH 7.0) に希釈し、ホモジナイズし、遠心分離した (300×g、1分、21℃)。上清を1回洗浄し (8000×g、5分、21℃)、PBS_{red}に再懸濁させた。体積20 μlの細菌懸濁液をPBS_{red} 180 μlおよび抗体をコーティングした磁気ビーズ5 μlに加え、混合物を室温で30分間インキュベートした。その後、ビーズをPBS_{red}

1 mlに懸濁させ、3回洗浄した。一定分量 (100 μl) を選択寒天プレートおよび非選択寒天プレート上に広げた。コロニーをマクファーランド濁度標準3~5 (SmibertおよびKrieg 1994年) までPBS_{red}に懸濁させ、この懸濁液の一定分量20 μlを、抗コアー1抗体をコーティングしたビーズに再度加えた。コロニーを寒天プレートから無作為に収集し、非選択培地上に数回再画線した。コロニーを、適切なブロス培地において、適切な条件下で培養した。培養物を一部凍結させ、一部固定した。固定培養物を使用して、抗体NM-TF1、NM-TF2およびB/A11-68と各菌株の結合性をアッセイした。菌株Coreoticsのみが、NM-TF1およびNM-TF2が強力かつ過ヨウ素酸感受性に結合し、B/A11-68は結合しない、免疫的に接近可能なヒトコアー1構造と同様の抗体結合プロファイルを示した。Coreoticsの細菌種へのほぼ確実な分類学的所属を、生化学的アッセイ (迅速ID32AおよびAPI20A生化学キット (Biomerieux、Marcy l'Etoile、France)) を用いて特徴付けた。結果として、Coreoticsを、Bacteroidesの種の群に属すると分類することができた。さらなる分類学的分析を行うために、Coreoticsの培養物を選択培地でプレーティングし、その後、

ステップ1: 顕微鏡下で、均一な細胞集団を示すコロニーを選択するステップ、
ステップ2: ステップ1から: 適切なコアー1発現 (上記のプロファイル) を示すコロニーを選択するステップ、
ステップ3: ステップ2で選択されたコロニーから: 一晚培養し、その後、200~500コロニー形成単位 (cfu) をプレーティングするステップ、
ステップ4: コロニーの均一な集団を示すプレートを選択するステップ
によってCoreoticsの純粋な培養物を得た。

【0103】

選択プロセス (ステップ1~4) を数回反復した。数回の精製ラウンドの後、純粋なCoreotics菌株を分類学的分析にかけた。

【0104】

1. 2 分類学的分析1: 16S rRNA配列類似性

【0105】

菌株Coreoticsの16S rRNA遺伝子配列 (480塩基) を、ユニバーサルプライマーである27f (5' -AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3' (配列番号20)) および519r (5' -GWATTACCGCGGCKGCTG-3' (配列番号21)) を使用したPCRによって増幅した。PCR産物を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche、Indianapolis、USA) を使用することによって精製し、DNA濃度および産物のサイズを、Low DNA Mass Ladder (Invitrogen、Carlsbad、USA) を使用することによって推定した。PCR産物について、DYEn

amic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience) および ABI PRISM 3100 キャピラリーシーケンサー (Applied Biosystems) を製造者の仕様に従って使用して配列決定した。BLAST プログラム (Altschul ら、1997 年) および megaBLAST プログラム (Zhang ら、2000 年) によって、有効に (validly) 公開された原核生物の名称を伴う標準菌株のデータベース (Chun ら、2007 年) に対して系統発生の近隣 (phylogenetic neighbor) の同定を最初に行った。次いで、EzTaxon サーバー (<http://www.eztaxon.org/>; Chun ら、2007 年) で実行するグローバルアラインメントアルゴリズムを使用してペアワイズ配列類似性を算出するために、最高スコアの 50 配列を選択した。得られた複数の配列アラインメントを、プログラム MEGA バージョン 5 (Tamura、2007 年) を使用することによって手動で補正して、アラインメントギャップおよび不明確な塩基を取り除き、プログラム MEGA バージョン 5 (Tamura、2007 年) を用い、近隣結合法 (Saitou & Nei、1987 年) に従って系統樹を構築した。

【0106】

菌株 Coreotics の 16S rRNA 配列解析により、この菌株が *Bacteroides xylanisolvens* DSM18836 (16S rRNA 配列類似性 100%) と共に、*Bacteroides ovatus* ATCC8483 (97.5%) と共に、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29148 (94.2%) と共に、および *Bacteroides finegoldii* DSM17565 (92.2%) と共にクラスターを形成することが示された。16S rRNA 遺伝子配列の相違 (divergence) において類似性値が $\geq 97\%$ であることが種を正確に説明するために有意であることが一般に認識されている (Stackebrandt & Goebel、1994 年)。しかし、Stackebrandt & Ebers (2006 年) は、この値は、「種」の説明の質および精度を犠牲にすることなく 98.7~99% まで増加させることが可能であること、かつこの値が分類学者の助けとなり得ると推奨した。

【0107】

1. 3 分類学的分析 2: 全ゲノムの DNA 間ハイブリダイゼーション

【0108】

DNA 間ハイブリダイゼーションは、分類学におけるゴールドスタンダードであると考えられている。Coreotics 菌株の全ゲノムを、*Bacteroides xylanisolvens* DSM18836、*Bacteroides ovatus* DSM1896、*Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079 および *Bacteroides finegoldii* DSM17565 の全ゲノムとのハイブリダイゼーションにかけた (これらの分析は、DMSZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) において、DMSZ によって実行された。簡単に述べると、比較しようとする各菌株のバイオマテリアル 3 g を DNA 調製のために使用した。単離された DNA の純度を分析し、DNA を、フレンチプレスを使用してせん断し、高温で変性させた (100°C、10 分)。DNA は、200 kDa から 600 kDa の間のサイズを有し、主要な画分が約 450+/-100 kDa である断片にせん断することが好ましい。各菌株の DNA ならびに両方の菌株の DNA の等濃度の混合物 (試料中の最終的な DNA 濃度は基本的に同一であり、好ましくは約 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間、特に約 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である) の復元を、260 nm における吸光度を用いて分光光度的に測定した。溶液を DNA の融解温度を下回る温度 25°C まで直ちに冷却することによって復元を開始し、測定を 30 分にわたって実施した。DNA 関連性を、単一の細菌株および両方の菌株の DNA の混合物のそれぞれの DNA の復元曲線の種々の傾きから算出した。具体的には、復元速度 v' を 1 分当たりの吸光度の減少 ($\Delta A/t$) として決定し、結合の程度 (D)、すなわち DNA 関連性を De Ley ら (上記を参照されたい) によって示された式に従って算出した:

10

20

30

40

50

【数1】

$$D = \frac{4v'_m - (v'_A + v'_B)}{2\sqrt{v'_A v'_B}} 100$$

式中、Dは結合の程度（％）であり、 v'_m は混合物の復元速度であり、 v'_A は第1の菌株のDNAの復元速度であり、 v'_B は第2の菌株のDNAの復元速度である。

【0109】

全ゲノムのハイブリダイゼーションの結果が表1に示されている：

【0110】

【表1】

表1

参照菌株	CoreoticsとのDNA関連性
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> DSM 18836	98.65 %
<i>Bacteroides ovatus</i> DSM 1896	26.9 %
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079	28.65 %
<i>Bacteroides finegoldii</i> DSM 17565	25.2 %

【0111】

1. 4 分類学的分析3：微生物学的な特徴付けおよび生化学的な特徴付け

【0112】

菌株DSM25004は、絶対嫌気性、非孢子形成性、非運動性かつグラム陰性であると同定することができた。短桿状細胞または桿状細胞は幅0.4～0.5 μmであり、長さは一般に1～2 μmの範囲で様々であった。18時間後にWilkins-Chalgren寒天（Oxoid）で成長したコロニーは直径2～3 mmであり、環状の乳白色の隆起した凸状の表面を有した。最初の生化学的分析により、*Bacteroides ovatus*種（Datbank BioMerieux）に対して91%の類似性が示された。*Bacteroides ovatus*とは対照的に、菌株DSM23964はデンプンを利用することや、インドールを産生することができず、また、カタラーゼ活性を示さなかった。単離された細菌およびそれらの構成的な酵素および基質利用プロファイルの生化学的同定を、迅速ID32AおよびAPI20A生化学キット（Biomérieux、Marcy l'Etoile、France）を製造者の指示に従って使用することによって実施した。菌株*Bacteroides xylanisolvens* Coreotics、*Bacteroides xylanisolvens* DSM18836、*Bacteroides finegoldii* DSM17565、*Bacteroides ovatus* DSM1896、*Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079および*Bacteroides fragilis* DSM1396の化学分類学的分析の結果が表2に要約されている。菌株*Bacteroides xylanisolvens* Coreoticsおよび*Bacteroides xylanisolvens* DSM18836はどちらも同一の生化学プロファイルを有した。*Bacteroides xylanisolvens* Coreoticsは、グリセロール、D-ソルビトール、D-マンニトールおよびD-メレイトースの利用により、*Bacteroides ovatus* DSM1896とは区別し得た。さらに、*Bacteroides xylanisolvens* Coreoticsは、*Bacteroides ovatus* DSM1896についての結果とは対照的に、グルタミルグルタミン酸アリールアミダーゼ活性を示した。他の部分では、*Bacteroides ovatus* DSM1896はロイシンアリールアミダーゼ活性を発現することができたが、*Bacteroides xylanisolvens* Coreoticsはそれができなかった。したがって、*Bacteroides xy*

10

20

30

40

50

lanisolvens Coreoticsは、Bacteroides finegoldii DSM17565、Bacteroides thetaiotaomicron DSM2079およびBacteroides fragilis DSM1396とは区別し得た（表2）。Bacteroides xylanisolvens CoreoticsおよびBacteroides xylanisolvens DSM18836についての結果とは対照的に、Bacteroides thetaiotaomicron DSM2079は酵素活性についての試験において多数の陽性の結果を示した。

【0113】

【表2】

表 2

生化学的特性	1	2	3	4	5	6
インドール形成	-	-	-	+	+	-
酵素活性						
N-アセチル-β-グルコサミダーゼ	+	+	+	-	+	+
グルタミン酸デカルボキシラーゼ	+	+	+	-	+	+
α-フコシダーゼ	+	+	-	+	+	+
インドール産生	-	-	-	+	+	+
アルギニンアリールアミダーゼ	-	-	-	-	+	-
フェニルアラニンアリールアミダーゼ	-	-	-	-	+	+
ロイシンアリールアミダーゼ	-	-	-	+	+	+
チロシンアリールアミダーゼ	-	-	-	-	+	+
グリシンアリールアミダーゼ	-	-	-	-	+	-
ヒスチジンアリールアミダーゼ	-	-	-	-	+	+
グルタミルグルタミン酸アリールアミダーゼ	+	+	+	-	+	+
セリンアリールアミダーゼ	-	-	-	-	+	-
以下からの酸産生:						
D-マンニトール	+	+	-	-	-	-
サリシン	+	+	+	+	-	-
エスクリン加水分解	+	+	+	+	+	-
グリセロール	+	+	-	-	-	-
D-メレジトース	+	+	-	-	-	-
D-ソルビトール	+	+	-	-	+	-
D-トレハロース	+	+	-	+	+	-
カタラーゼ活性	-	-	+	+	+	+

【0114】

菌株: 1: Bacteroides xylanisolvens Coreotics; 2: Bacteroides xylanisolvens DSM18836; 3: Bacteroides finegoldii DSM17565; 4: Bacteroides ovatus DSM1896; 5: Bacteroides thetaiotaomicron DSM2079; 6: Bacteroides fragilis DSM1396。特性は、「+」: 陽性反応; 「-」: 陰性反応としてスコア化されている。

【0115】

1. 5 無作為に増幅された多型DNA (RAPD) パターンおよび遺伝子型解析

【0116】

CoreoticsがBacteroides xylanisolvens種と別個の菌株であるかどうかを試験するために、RAPDアッセイを実施した。鋳型DNAを増幅するために、4つの異なるランダムプライマーを別々の反応に使用した（各反応ではただ1つのプライマーを使用した）。PCR反応混合物（50 μl）は、Taq緩衝液（16 mMの(NH₄)₂SO₄、67 mMのトリスHCl）、2.5 mMのMgCl₂、0.25 mMの各dNTP、1 μMのプライマー、2.5単位のTaq DNAポリメラー

10

20

30

40

50

ゼおよび2 μ lの鋳型DNAを含有した。PCRプログラムは、95℃で5分、95℃で1分を35サイクル、50℃で1分および72℃で1分、最後に72℃で6分であった。全てのプライマーについてのバンドパターンを1%アガロースゲルで分析した。したがって、各鋳型DNAについて、4つの異なるバンドパターン（各プライマーについて1つ）を得た。

【0117】

コア-1陽性*Coreotics*をRAPD分析に供し、結果を参照細菌である*Bacteroides xylanisolvens*種(DSM18836)、*Bacteroides finegoldii*種(DSM17565)および*Bacteroides ovatus*種(DSM1896)の結果と比較した(1つの例示的なプライマーについては図1を参照されたい)。結果は、*Coreotics*が、公知の*Bacteroides xylanisolvens*菌株DSM18836と同一ではない別個の菌株であることを実証している。

10

【0118】

1.6 要約

【0119】

16S rRNA配列類似性、全ゲノムのDNA間ハイブリダイゼーションおよび生化学的特徴付けの結果により、単離された微生物*Coreotics*が*Bacteroides xylanisolvens*種のものであることが実証された。さらに、RAPD分析により、*Coreotics*が、公知の*Bacteroides xylanisolvens*菌株とは異なる特異的かつ別個の*Bacteroides xylanisolvens*菌株であることが示された。

20

【0120】

(実施例2)

安定かつ均一なコア-1抗原の発現

【0121】

2.1 AG6と比較した*Coreotics*のコア-1発現

【0122】

固定した細菌細胞を、PBSを用いて1ml当たり細胞 1×10^7 個の細胞濃度に調整した。50 μ lを2連でPolySorpマイクロタイタープレート(Nunc、Weissbaden、Germany)のウェルに適用し、37℃で一晩コーティングした。さらなるインキュベーションステップ全ての前に、プレートを、Tween20を含むトリス緩衝食塩水(8.78gのNaCl、1L当たり6.06gのトリス、および0.05% [v/v]のTween20、pH7.6)200 μ lを用いて3回洗浄した。さらなる方法のステップを室温で実施した。ウェルをPBS中2%ウシ血清アルブミン(BSA)200 μ lと一緒に20分間インキュベートすることによって残余の結合部位をブロッキングした。コア-1に特異的なモノクローナル抗体(Nemod-TF1)を、1%BSAを含有するPBS 50 μ l中の一次抗体として適用し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、Tween20を含むトリス緩衝食塩水200 μ lを用いて3回洗浄した後、二次抗体と一緒にインキュベートした。二次抗体(ペルオキシダーゼ-ウサギ抗マウスIgG/IgM P0260、DAKO、Hamburg、Germany)をPBS中1%BSAで1/5000に希釈し、ウェル当たり50 μ lを適用し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、再度、Tween20を含むトリス緩衝食塩水200 μ lを用いて3回洗浄し、顕色液(50 μ M酢酸ナトリウム緩衝液中の1% [v/v] DMSO中1mg/mlのテトラメチルベンジジン)100 μ lを各ウェルに加えることによって、暗所中で5~20分間顕色した。その後、2.5MのH₂SO₄ 50 μ lを加えて、反応を停止させ、ELISA Reader(Dynex Technologies Inc.、Chantilly、VA、USA)で吸光度(E_{450/630})を測定した。同様にPBSを用いて1ml当たり細胞 1×10^7 個の細胞濃度に調整した、WO2008/055703)に開示されているAG6 DSM18726の固定培

30

40

50

養物が陽性対照としての機能を果たした。あるいは、アシアログリコホリンおよびグリコホリン（PBS中1ウェル当たり100ng、Sigma-Aldrich、Taufkirchen、Germany）が、それぞれコア-1抗原に対する陽性対照および陰性対照としての機能を果たした。アッセイは、少なくとも2つの別々の場合に対して2連で実施した。

【0123】

10個の異なるCoreotics（DSM25004）コロニーおよび10個の異なるAG6（DSM18726、WO2008/055703に開示されている）コロニーのELISAアッセイにより、Coreotics（Bacteroides xylanisolvens）はそれらの細胞表面で非常に安定かつ均一な高いコア-1発現を示すが、AG6（Bacteroides ovatus）はそれよりも変動性が高く低い平均コア-1発現を示すことが明らかになった（図2を参照されたい）。

10

【0124】

2.2 B. xylanisolvens 参照菌株と比較したCoreoticsのコア-1発現

【0125】

コア-1発現を、ELISA実験においてコア-1特異的抗体Nemod-TF1（Glycotope GmbH、Germany）の結合によって分析した。陽性対照（PK）および菌株Coreoticsについて強力なTF1結合を同定することができた。これにより、その表面にコア-1構造物が存在することが明らかになった。過ヨウ素酸を用いた前処理により、抗コア-1抗体の結合が完全に消失した。参照菌株Bacteroides xylanisolvens DSM18836では、いかなるコア-1特異的抗体の結合も存在しなかった。結果が図3に示されている。

20

【0126】

（実施例3）

模擬の胃液および加熱処理のコア-1発現に対する影響

【0127】

胃腸管の通過を模倣するために、Coreotics細菌に、模擬の胃液および腸液の作用を受けさせた。Coreotics菌株の生存率は胃液中では180分後に90%超であり、腸液に240分間曝露させた後には96%超であった。興味深いことに、いずれの処理も、菌株Coreoticsの表面のコア-1抗原の露出に対していかなる影響も有さなかった。低温殺菌もコア-1抗原密度に影響を及ぼさず、室温、4℃または-20℃で保管した場合、12カ月にわたって安定のままであった。

30

【0128】

（実施例4）

短鎖脂肪酸の産生

【0129】

HPLC分析に基づいて、Bacteroides xylanisolvens 菌株CTC1が、プロピオン酸および酢酸のような短鎖脂肪酸（SCFA）ならびにコハク酸、ギ酸および乳酸のような他の物質を産生することができることが実証された。成長条件および培地組成に応じて、上清において測定された代謝産物の濃度は、それぞれ、コハク酸については2.5mMから44.7mMまで、プロピオン酸については5.8mMから29.3mMまで、酢酸については3.4mMから38.3mMまで、ギ酸については0mMから45mMまで、および乳酸については0.88mMから8.6mMまで様々であった。

40

【0130】

（実施例5）

ビルレンス因子の分析

【0131】

5.1 Coreoticsの抗生物質抵抗性

50

【0132】

いくつかの抗生物質の最小発育阻止濃度 (MIC) の分析により、*Bacteroides xylanisolvens* *Coreotics* 菌株は、ペニシリンG、アンピシリンおよびメズロシリン (meziocillin) のようなβ-ラクタム系薬物に対して抵抗性であることが明らかになった。しかし、*Bacteroides xylanisolvens* *Coreotics* 菌株はメトロニダゾール、メロペネムおよびクリンダマイシンのような通常の抗生剤に対しては感受性であり、また、β-ラクタマーゼ阻害剤を添加することによりβ-ラクタム系薬物に対する感受性が回復した。

【0133】

5.2 *Coreotics* におけるプラスミドの検出

10

【0134】

Coreotics 菌株におけるプラスミドの潜在的な存在を調査するために、*Coreotics* から、ならびに対照菌株、それぞれ低コピープラスミドRP4 (60 kb) およびpSC101 (9.4 kb) を含有する*E. coli* DSM3876、および*E. coli* DSM6202の両方からプラスミドDNA材料を単離した。260 nmにおけるプラスミドDNA濃度の測定により、*Coreotics* のプラスミド調製物中にDNAが存在しないことが明らかになった。プラスミド調製物をアガロースゲルで泳動することにより、対照菌株由来の低コピープラスミドの両方が単離されたこと、および*Bacteroides xylanisolvens* *Coreotics* 由来の検出可能なプラスミド材料が存在しないことが確認された (図5A)。

20

【0135】

5.3 *Coreotics* のゲノムにおけるβ-ラクタマーゼ遺伝子*cfxA*、*cepA* および*cfiA* の同定

【0136】

Coreotics 菌株のβ-ラクタマーゼ活性を特徴付けるために、*Bacteroides* 属に関して公知のβ-ラクタマーゼ遺伝子である*cfiA*、*cfxA*、および*cepA* のそれぞれに対して特異的なPCRアッセイを実行した。結果は、菌株*Coreotics* が排他的に*cepA* 遺伝子を含有することを示す (図5B~D)。

【0137】

5.4 *Bacteroides* 属におけるビルレンス因子をコードする遺伝子

30

【0138】

Bacteroides fragilis 多糖A (PS A) および*Bacteroides fragilis* エンテロトキシンBftは*Bacteroides* 属の最も重要なビルレンス因子である。エンテロトキシンBftの存在について調査するために、bft遺伝子に対して特異的なPCRを実施した。PS Aの場合、PS Aの生合成遺伝子の上流に位置する高度に保存されたオープンリーディングフレームであるupaY、upaZに対して、ならびに、最も重要な遺伝子である、アミノトランスフェラーゼをコードするwcfRおよびグリコシルトランスフェラーゼをコードするwcfSに対して特異的なPCRを設計した。*Bacteroides fragilis* ATCC43858とは対照的に、*Coreotics* 菌株はbft遺伝子を保有しない。遺伝子wcfR、wcfSおよびオープンリーディングフレームであるupaYとupaZの両方も検出することができなかった (図6A~C)。

40

【0139】

さらに、IBDの発生に関与する可能性があるビルレンス因子である「Ton B-結合外膜タンパク質」をコードする遺伝子ompWの存在について分析した。*Coreotics* 菌株ではompWコード遺伝子を検出することはできなかった (図6D)。

【0140】

5.5 *Coreotics* の細胞外酵素および病原性因子の決定

【0141】

ノイラミニダーゼに加えて、*Bacteroides* 属のいくつかの菌株が、感染プロ

50

セスに關与し得るコラゲナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼおよびいくつかのプロテアーゼを含めた望ましくない細胞外酵素を產生することが記載された。最も關連の深い細胞外酵素活性を、PCR（ノイラミニダーゼ）または酵素アッセイによって分析した。Coreotics 菌株は、デオキシリボヌクレアーゼ活性、コンドロイチナーゼ活性、ヒアルロニダーゼ活性、およびノイラミニダーゼ活性を示さず、弱いβ-溶血活性およびコラゲナーゼ活性のみを示す。

【0142】

5. 6 Caco-2細胞へのCoreoticsの接着

【0143】

Caco-2細胞を培養し、分化を誘導した。結果は、GAPDHの発現レベルは分化の間一定であったが、スクラーゼイソマルターゼのレベルは分化の間に増加したことを実証している。顕微鏡観察により、Caco-2細胞が14日後に単層としてよく分化したことが確認された。嫌気条件下で3時間共にインキュベーションした後の、細菌と分化したCaco-2細胞の結合を、連続的な洗浄ステップの上清に対して、および最終的にはこすり取ったCaco-2細胞に対して実施した種特異的なPCRによって分析した。陽性対照とは対照的に、第1の洗浄ステップの上清において当然検出することができたCoreotics細胞は、その後の上清でもこすり取ったCaco-2細胞でも検出することができなかった。これは、Coreotics細胞がヒト結腸の上皮細胞に付着しないことを示している（図7）。

【0144】

（実施例6）

毒物学的試験

【0145】

6. 1 生存能力アッセイ

【0146】

凍結乾燥および再水化後のBacteroides xylanisolvens Coreotics (DSM25004)の生存能力をいくつかの独立した実験で分析した。最低の同定生存率により、 4×10^9 CFU/gの生育可能な細菌の最小濃度が示された。この濃度は、「利用可能な濃度」として許容された。

【0147】

6. 2 in vitro変異原性試験（エイムス試験）

【0148】

この試験は、Coreoticsまたはそれらの発酵生成物の任意の毒性または変異原性の影響を検出するために実施した。プレート当たり細菌0.28mgから28.5mgの範囲の生育可能な細菌の5つの用量またはプレート当たり低温殺菌した細菌59mgの1つの用量を、それぞれ代謝活性化あり、およびなしで行った2つの独立した実験において使用した。代謝活性化ありおよびなしの5つの試験菌株のいずれの濃度についても、また、それぞれプレート組み込み（plate incorporation）およびプレインキュベーション様式のどちらの試験形式においても、対照のカウントと比較して細胞傷害性の徴候も復帰変異体コロニー数の増加も観察されなかった。

【0149】

6. 3 染色体異常誘発活性のin vitroにおける評価（in vitro染色体異常アッセイ）

【0150】

試験に使用したCoreoticsの最高濃度は、最大の妥当な濃度であると考えられる培養培地1ml当たり生育可能な細菌2.8mgおよび培養培地1ml当たり低温殺菌した細菌5.9mgであった。代謝活性化の不在下では、陰性対照において観察された染色体異常の平均発生率（ギャップを除いて）は4時間曝露させた後、および24時間曝露させた後に、それぞれ1.0%または0.5%であった。生育可能なCoreoticsおよび低温殺菌したCoreoticsのいずれの濃度でも、4時間曝露させた後、およ

10

20

30

40

50

び24時間曝露させた後に異常な細胞のいかなる統計的に有意な増加も生じなかった(0.5%~2.5%)。対照的に、陽性対照は、4時間曝露させた後、および24時間曝露させた後に、それぞれ10.5%および17.5%の異常な細胞の増加を示した。代謝活性化の存在下では、陰性対照において観察された染色体異常の平均発生率(ギャップを除いて)は、4時間曝露させた後に0.5%であった。さらに、生育可能なCoreoticsおよび低温殺菌したCoreoticsのいずれの濃度でも、異常な細胞のいかなる統計的に有意な増加も生じず、2つの独立した実験において、それぞれ0.0%および1.5%であった。陽性対照は、4時間後に、2つの実験においてそれぞれ13.5%および16.5%の異常な細胞を示した。代謝活性化ありまたはなしでの実験において、試験したCoreotics濃度の全てについて、品目関連の倍数性や核内倍加は認められなかった。さらに、以前の結果を確認して、代謝活性化ありまたはなしでの実験において、試験したCoreoticsの濃度のいずれにおいても細胞傷害性の徴候は認められなかった。

【0151】

6.4 マウスにおける90日経口毒性試験

【0152】

この試験の目的は、Coreoticsを経口摂取することにより何らかの毒物学的影響があるかどうかを決定することであった。Crl:NMR1マウス(雄50匹、雌50匹)を5つの試験群(群当たり雄10匹、雌10匹)に割り当て、日用量の細菌を胃管栄養法によって90日間にわたって経口投与した。1日当たり動物当たり $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ CFUまたは 1×10^{11} 個の低温殺菌したCoreoticsの作用を試験した。結果が図8に示されている。90日の試験の間、対照群の場合と同様に、生育可能なCoreoticsまたは低温殺菌したCoreoticsで処置した群のいずれにおいても死亡は認められなかった。処置したマウスおよび処置していないマウスはいずれも、その挙動または外観にいかなる変化も示さなかった。さらに、機能的な観察では、いかなる試験品目に関連する影響も示されず、運動性、糞便の硬さ、および水分消費量ならびに体重増加および摂食量に、実験期間全体を通して処置群と対照群との間で有意差は示されなかった。血液学的検査では、いずれの試験用量レベルの生育可能なCoreoticsおよび低温殺菌したCoreoticsでも、試験品目に関連する影響は示されず、対照群と処置したマウスの群との間に統計的有意差は観察されなかった。臨床的な生化学的値および眼科学的検査により、生育可能なCoreoticsおよび低温殺菌したCoreoticsの両方について、いずれの群、いずれの用量レベルにおいても試験品目に関連する変化がないことが明らかになった。さらに、肉眼での死後分析により、試験品目に関連する病変や異常がないことが明らかになった。最後に、全ての臓器の広範囲にわたる詳細な病理組織学的分析により、処置群と対照群との間に差異がないことが明らかになった。

【0153】

6.5 Coreoticsのin vivoにおける病原性(膿瘍形成)

【0154】

in vivo腹腔内膿瘍形成モデルは、日和見細菌株の病理的性質を調査するために広く受け入れられているモデルである(McConvilleら、1981年; Onderdonkら、1984年; Thadepalliら、2001年)。Bacteroides fragilis RMA6971またはBacteroides xylanisolvens DSM25004(Coreotics)の新鮮な一晚細菌培養物を使用した。体重1kg当たり $2.3 \times 10^7 \sim 4.6 \times 10^9$ CFU、50%(w/w)のオートクレーブしたラット糞便、および10%(w/v)の硫酸バリウムを含有する混合物をマウスの腹腔内に注射した。注射した後、各品目の生存能力、細菌の濃度および純度を、残りの材料において適的に決定した。Bacteroides fragilisおよび/またはBacteroides xylanisolvensの存在を同定するために、Liuら(2003年)により記載されているマルチプレックス種特異的PCRを確立した。このマルチプレックスPCRにより、一方の種が非常に低い比率を占めるコンタミネーションの状況にある

種の両方を同定することも可能になった。本発明者らは、単一の試験品目のそれぞれが、求められる細菌株を含有し、他の種が混入していないことを確認した（図9参照）。それぞれの試験品目を適切な寒天上にプレーティングし、それを好気性条件下でインキュベートすることにより、さらなる潜在的なコンタミネーションを分析した。48時間インキュベートした後にはいかなる単一のコロニーも検出することはできなかった。2つの別々の実験において、高用量のCoreoticsを注射したマウスでは、陰性対照（硫酸バリウム+滅菌ラット糞便）よりも多くのまたはより大きな膿瘍の発生は誘導されなかった。対照的に、高濃度のBacteroides fragilis RMA6971では、より多くの、より大きな膿瘍の形成が誘導された。7日後に、滅菌条件下で動物当たり2つの膿瘍を取得し、内容物を穿刺し、DNA抽出に供した。本発明者らは、種特異的なPCRによって、膿瘍におけるCoreoticsまたはBacteroides fragilis RMA6971の存在を評価した（図10）。それぞれ体重1kg当たり $2.3 \times 10^7 \sim 4.6 \times 10^9$ 個のBacteroides fragilisを注射した群2、群4および群6から単離した全ての膿瘍においてBacteroides fragilis RMA6971を検出することができた。対照的に、注射した細菌の濃度とは関係なく、分析した膿瘍のいずれにおいてもCoreoticsを検出することはできなかった。Coreoticsを注射したマウスについてのこれらの結果により、この菌株が膿瘍の形成を誘導しないこと、およびこの菌株が実際にはi. p. 注射後に免疫系によって直ちに完全に根絶されることが明白に示された。

【0155】

（実施例7）

マウスモデル

【0156】

マウス血清は、炭水化物構造物と交差反応性の抗体を含有し得る。免疫した後、任意のコア-1キャリア分子または細胞において観察される結合の増大も、そのような交差反応性抗体に関連し、偽陽性シグナルがもたらされる可能性がある。コア-1特異的抗体力価を特異的に分析するために、各時点におけるコア-1特異的抗体のレベルを比率：「コア-1_R=キャリア-コア-1におけるシグナル/キャリア-参照におけるシグナル」として表した。参照構造物は、Coreoticsの表面に存在しない任意の炭水化物構造物であってよく、二糖であることが好ましい。Coreoticsを投与した後にこの比率が増加することにより、コア-1特異的抗体力価が増加したことが示される。

【0157】

7～9週齢の雄のC3Hマウスに、4週間にわたって1日に 5×10^9 個のCoreoticsを経口投与した。陰性対照として、マウス4匹をNaClで処置し、マウス4匹をコア-1陰性菌株B. ovatus DSM1896で処置した。免疫を開始する前、ならびに21日目および28日目に血清を取得した。血清を1/100希釈し、コア-1特異的IgM抗体におけるそれらの含有量を、複合糖質PAA-コア-1およびPAA-参照（Galβ1-3GlcNAc）に対して以下の通り分析した。

【0158】

複合糖質ポリアクリルアミド-Galβ1-3GalNAc（PAA-コア-1）およびポリアクリルアミド-Galβ1-3GlcNAc（PAA-参照）を、コーティング緩衝液（coating buffer）（4.2gのNaHCO₃、1.78gのNa₂CO₃、Millipore-H₂Oを用いて1L、pH9.6）中5μg/mlの濃度に調整した。各複合糖質50μlをMaxiSorpマイクロタイタープレート（Nunc、Wiesbaden、Germany）のウェルに2連で適用し、4℃で一晩コーティングした。さらなるインキュベーションステップ全ての前に、プレートを、Tween20を含むトリス緩衝食塩水（1L当たり8.78gのNaCl、6.06gのトリス、および0.05% [v/v] のTween20、pH7.6）200μlを用いて3回洗浄した。残余の結合部位を、ウェルをPBS中2%ウシ血清アルブミン（BSA）200μlとともに20分間インキュベートすることによってブロッキングした。

【0159】

動物の血清を、PBSを含有する1%BSAを用いて適切に希釈し（1/50～1/200）、50 μ lを、PAA-コア-1でコーティングしたウェルおよびPAA-参照でコーティングしたウェルに2連で適用し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、Tween 20を含むトリス緩衝食塩水200 μ lを用いて3回洗浄した後に、二次抗体（ペルオキシダーゼーヤギ抗マウスIgM 115-035-075、Jackson ImmunoResearch）のPBS中1%BSA中1/5000希釈物50 μ lとともに1時間インキュベートした。プレートを、再度、Tween 20を含むトリス緩衝食塩水200 μ lを用いて3回洗浄し、顕色液（50 μ M酢酸ナトリウム緩衝液中1% [v/v] DMSO中1mg/mlのテトラメチルベンジジン）100 μ lを各ウェルに加えることによって暗所中で5～20分顕色した。その後、2.5MのH₂SO₄ 50 μ lを加えて反応を停止させ、吸光度（E_{450/630}）を測定した。コア-1特異的抗体のレベルを比率：「PAA-コア-1におけるE_{450/630}/PAA-参照におけるE_{450/630}」として表した。免疫の前後の比率を比較することにより、コア-1特異的抗体力価の変化を特異的に分析することが可能になった。

10

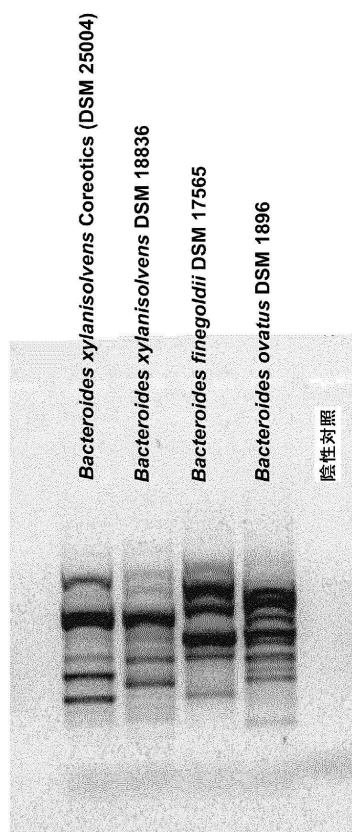
【0160】

結果として、マウスにおいて*Bacteroides xylanisolvens*菌株CTC1によりコア-1特異的抗体力価が誘導されたことを示すことができた。したがって、本発明による微生物がコア-1抗原に対する免疫応答を誘導することができることが実証された。

20

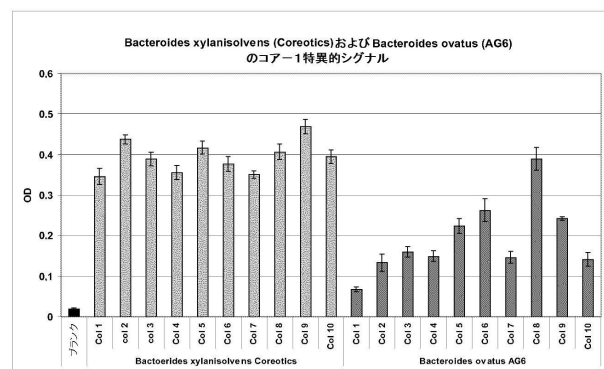
【図1】

Figure 1



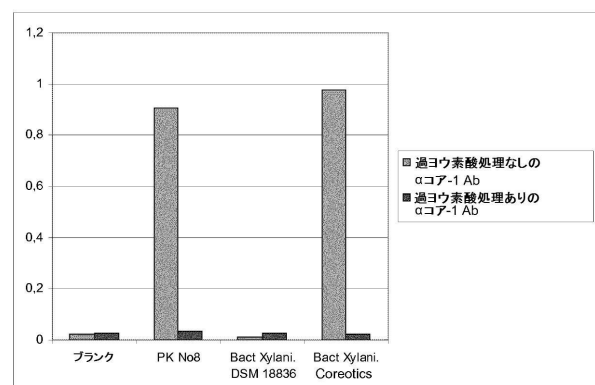
【図2】

Figure 2



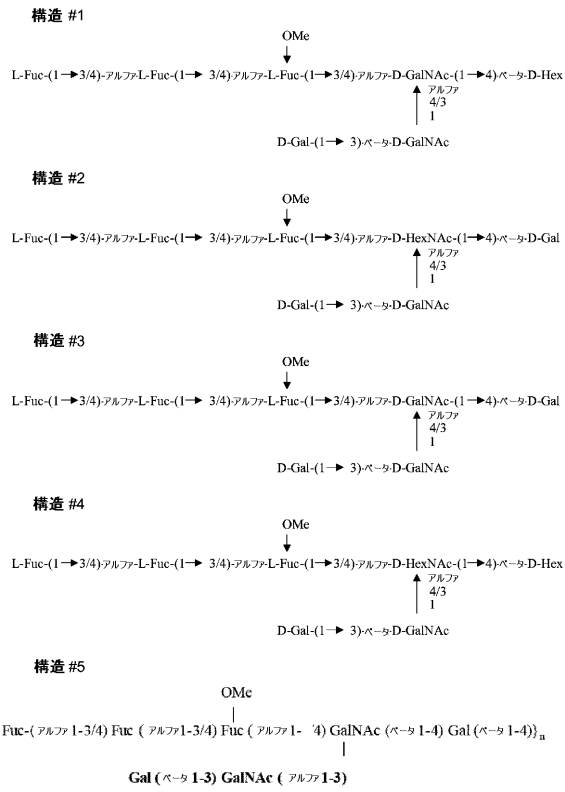
【図3】

Figure 3

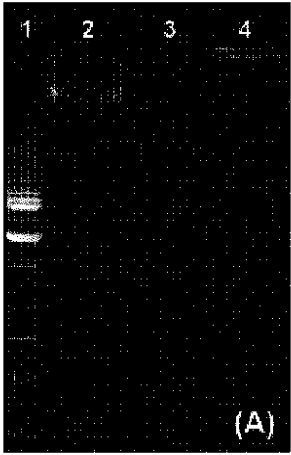


【図 4】

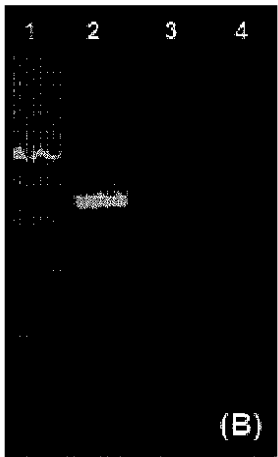
Figure 4



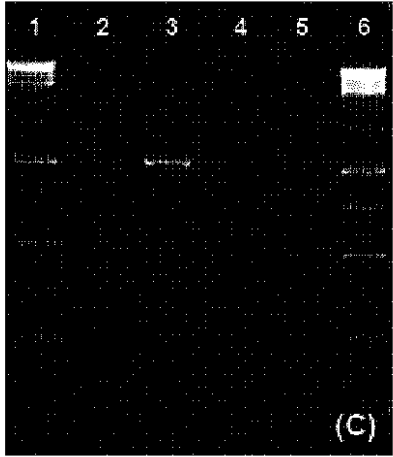
【図 5 (A)】



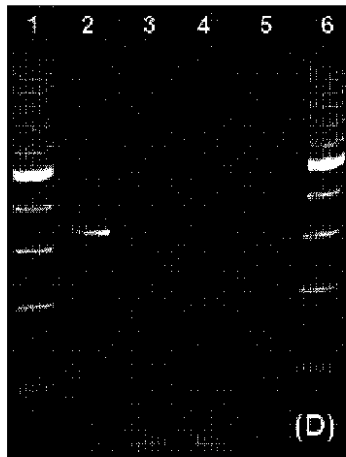
【図 5 (B)】



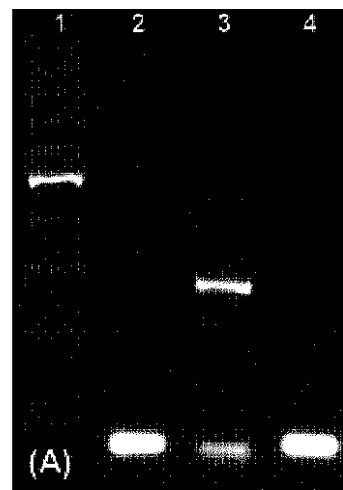
【図 5 (C)】



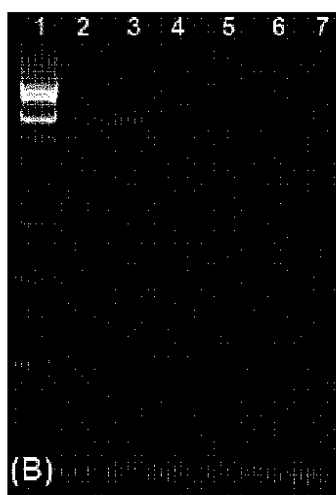
【図 5 (D)】



【図 6 (A)】



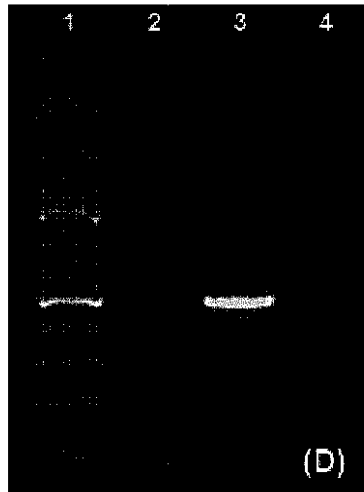
【図 6 (B)】



【図 6 (C)】

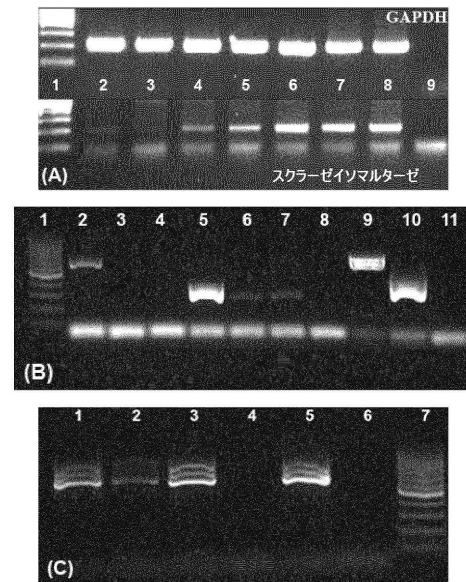


【図 6 (D)】



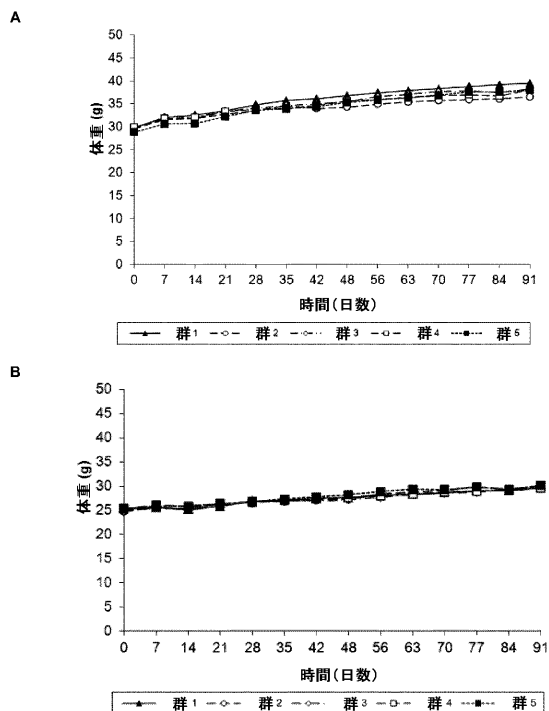
【図 7】

Figure 7



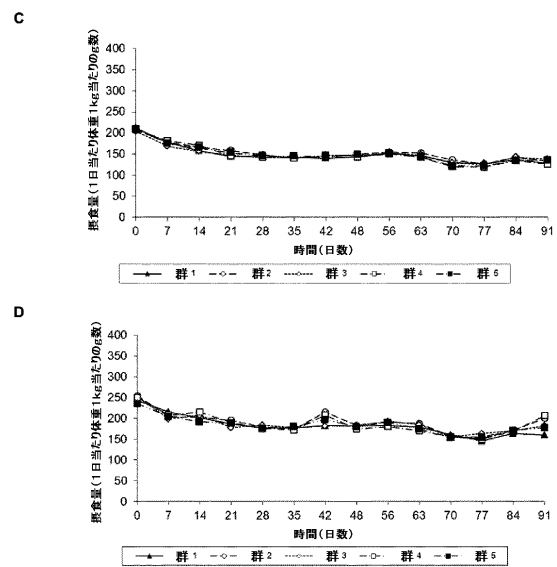
【図 8 - 1】

Figure 8



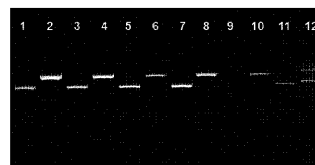
【図 8 - 2】

Figure 8 続き



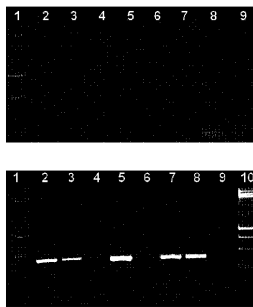
【図 9】

Figure 9



【図 10】

Figure 10



【配列表】

0006148671000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 35/74 B
A 6 1 P 37/04

微生物の受託番号 DSMZ DSM 18836

(72)発明者 ウルセマー, フィリップ
ドイツ国 1 3 1 2 5 ベルリン, ロベルトーロスレーシュトラーセ 1 0, グリコトープ
ゲーエムベーハー 気付
(72)発明者 トウトウニアン, カーヴェ
ドイツ国 1 3 1 2 5 ベルリン, ロベルトーロスレーシュトラーセ 1 0, グリコトープ
ゲーエムベーハー 気付

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 特表2 0 1 0 - 5 0 8 8 3 4 (JP, A)
中国特許出願公開第1 0 1 5 6 0 4 8 8 (CN, A)
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58, 1008-1013

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8