



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0719005-0 A2



(22) Data de Depósito: 12/11/2007
(43) Data da Publicação: 17/12/2013
(RPI 2241)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/02
A61K 39/40
G01N 33/53
A61P 35/00
A23L 1/30

(54) Título: MICRO-ORGANISMOS INDUTORES DE
IMUNIDADE CELULAR ESPECÍFICA PARA
CARBOIDRATOS E FRAÇÕES DOS MESMOS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 10/11/2006 EP 06 090208.7,
10/11/2006 EP 06 090209.5

(73) Titular(es): Glycotope GMBH

(72) Inventor(es): Anja Löffler, Philippe Ulsemer, Steffen Goletz

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007009765 de
12/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/055702de
15/05/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MICRO-ORGANISMOS INDUTORES DE IMUNIDADE CELULAR ESPECÍFICA PARA CARBOIDRATOS E FRAÇÕES DOS MESMOS"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se ao campo da prevenção e do tratamento de doenças caracterizadas pela ocorrência de certos epitopos de carboidratos. A invenção proporciona nutracêuticos e composições farmacêuticas compreendendo um micro-organismo positivo para o epitopo de carboidrato e frações dos mesmos que induzem uma resposta imunocelular

10 carboidrato-específica eficaz contra células e doenças carboidrato-positivas. Ademais, ela proporciona métodos para a seleção, o isolamento e a identificação de micro-organismos carboidrato-positivos apropriados como parte eficaz do nutracêutico ou da composição farmacêutica. Ela proporciona métodos para a geração de células dendríticas e linhagens de células dendríticas

15 carboidrato-específicas assim como células T, clones de células T e linhagens de células T carboidrato-específicas. A invenção proporciona ainda formulações e métodos para a profilaxia e tratamento de doenças associadas a certos epitopos de carboidratos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

20 Antígenos de carboidratos ocorrem com frequência em combinação com doenças humanas. Por exemplo, a glicosilação aberrante é uma característica distintiva das células cancerosas, criadora assim de novas estruturas de carboidrato que estão ausentes ou raramente presentes em células humanas normais. Acreditava-se que essas estruturas de carboidratos

25 eram candidatas adequadas para a geração de vacinas tumorais, mas os carboidratos são por si mesmos estruturas pobremente imunogênicas classificadas como antígenos independentes das células T. Portanto, o desenvolvimento de vacinas focou a geração de vacinas antitumorais sintéticas baseadas em carboidratos nas quais os epitopos de carboidratos são acoplados

30 a estruturas transportadorasas potencializadoras de imunidade, proteínas naturais ou oligopeptídeos (tais como a MUC1) e combinados com adjuvantes adicionais para a indução de uma resposta imune e especialmente para

a indução de uma resposta imunocelular. Os polissacarídeos são ligados a polipeptídeos imunogênicos tais como o toxioide tetânico ou diftérico, KLH ou epitopos T auxiliares de maneira a alterar a resposta imune de células de T-independente para T-dependente, gerando assim memória imunológica. A
5 produção de tais vacinas é extraordinariamente difícil e dispendiosa. Além disso, tais vacinas representam antígenos não-naturais ou artificiais com efeitos colaterais desconhecidos ou adversos.

Até recentemente, acreditava-se que os carboidratos não eram apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (por exemplo, célu-
10 las dendríticas) às células imunes efectoras e que eles não mediavam respostas imunes das células T.

Hoje, alguns relatos mostram que carboidratos complexos não são removidos durante o processamento de glicoproteínas pelas células apresentadoras de antígenos e podem ser apresentados a células restritas ao
15 complexo principal de histocompatibilidade II junto com o peptídeo.

No caso do antígeno MUC1, puderam ser demonstradas a internalização, o processamento e a apresentação de glicopeptídeos em células dendríticas. MUC1 carregando carboidratos curtos sialilados induziu a ativação e a maturação de células dendríticas fenotipicamente similares àquelas
20 induzidas por LPS bacteriano, não tendo, assim, especificidade, mas essas DCs não foram capazes de induzir uma resposta imune do tipo Th1 após cocultivo com células T CD4+ alogênicas ou respostas citotóxicas CD8 (Carlos et al. (2005) J Immunol 175: 1628-1635).

Peptídeos derivados da MUC1 O-glicosilados com um epitopo
25 Tn induzem imunogenicidade celular em camundongos, mas a imunização com células dendríticas carregadas com glicopeptídeos não apresentou efeito imunoterapêutico, nenhuma lise seletiva de linhagens celulares murinas expressando MUC1 humana e os LTCs apresentaram reatividade cruzada entre formas glicosiladas e não-glicosiladas dos mesmos peptídeos, não
30 sendo portanto a resposta imune nem eficaz, nem CH-específica (Stepensky et al. (2005) Clin Exp Immunol 143:139-149).

A MUC1 associada ao câncer que carrega curtas porções de

açúcares de mono a tetrassacarídeos (tais como os antígenos tumorais Tn, TF, S-Tn e S-TF) pode até mesmo induzir a supressão da resposta das células T humanas (Agrawal et al. Nat Med 1998 Jan; 4(1):43-9).

A glicosilação bacteriana é completamente diferente da glicosilação eucariótica devido a um diferente perfil de enzimas envolvido no mecanismo de glicosilação. A maioria dos polissacarídeos das bactérias são polissacarídeos negativamente carregados que claramente falham em ativar as células T e, portanto, são geralmente classificados como antígenos de tipo 2 independentes das células T. Mais recentemente, relatou-se que polissacarídeos zwitteriônicos capsulares de algumas bactérias possuem a capacidade de ativar células T CD4+. Entretanto, a restrição a MHCII dos polissacarídeos zwitteriônicos não está esclarecida e as células T são ativadas de uma maneira policlonal que não é antígeno-específica ou epitopo-específica, mas demonstra um uso amplo de V β e reatividade cruzada, aparentemente semelhante à ativação ampla induzida por mitógenos (Cobb e Kasper, Cell Microbiol 2005; Eyon, Zenewicz, Flavell, Cell, 2005).

Ademais, carboidratos e antígenos carboidratos são em geral reconhecidos como imunogênicos fracos.

A imunidade do tipo Th1 é considerada importante e necessária na rejeição de tumores e para elicitar respostas imunes potentes em várias doenças (Kobayashi et al., 1998, J Immunol. 160: 5869-5873). Foi demonstrado que alguns carboidratos de tumores curtos podem ser apresentados e reorganizados junto com certos aminoácidos como motivos de ligação necessários combinados (as combined necessary binding motifs). Entretanto, isso não leva a uma resposta imune do tipo Th1. Em contraste, no caso da MUC1, a MUC1 desialilada (que apresenta porções de açúcares curtas tais como Tn ou TF) falha em induzir a produção de citocinas pelas células T e, assim, não há ativação das células T; no caso de açúcares sialilados, ocorre a indução da secreção de citocinas tais como a alfa-TNF junto com IL-6, que estão ligadas à metástase tumoral, à progressão tumoral e a um prognóstico ruim, assim, há falha na ativação da resposta Th1 necessária e acredita-se haver uma conexão com o fato de o tumor escapar às respostas imunes

(Carlos et al., J. Immunol.).

Este estado atual da técnica nos ensina que moléculas naturais que compreendem antígenos tumorais carboidratos humanos não são capazes de induzir uma imunidade celular tipo Th1 e citotóxica potente dirigida
5 contra epitopos de carboidratos e que polissacarídeos de bactérias, particularmente os polissacarídeos capsulares, não são capazes de induzir respostas imunes antígeno-específicas.

Portanto, o uso dessas moléculas de carboidratos não seria adequado em abordagens com vacinas tumorais usando (i) células dendríticas para a apresentação dos antígenos carboidratos que não induziriam
10 uma resposta imune citotóxica potente quando administradas em seres humanos e não seriam adequadas em abordagens com vacinas tumorais usando (ii) APCs tais como DCs para a apresentação dos antígenos carboidratos para a geração de células T antígeno-específicas em uma resposta
15 tipo Th1 em uma terapia adotiva com células T nos pacientes.

Contudo, devido à importância dos antígenos carboidratos no desenvolvimento de doenças patológicas tais como o câncer, seria vantajoso obter meios de induzir uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz.

20 O objetivo da presente invenção é proporcionar os meios respectivos.

DESCRIÇÃO

De maneira a superar as desvantagens supramencionadas da técnica, a presente invenção proporciona os meios para a indução de uma
25 resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra um epitopo ou epitopos de carboidrato presente(s) em uma molécula de uma célula humana ou animal associada a uma doença do respectivo ser humano ou animal.

Até onde se sabe, essa surpreendente descoberta é o primeiro relato sobre a indução de uma resposta imune de tipo Th1 carboidrato-específica induzida por uma molécula natural.
30

De maneira ainda mais surpreendente, demonstrou-se pela primeira vez que uma resposta imune de tipo Th1 carboidrato-específica e uma

resposta imune citotóxica das células T podem ser induzidas pela administração de quantidades adequadas de pelo menos um micro-organismo que expresse um epitopo de carboidrato (ou pelo menos uma fração do mesmo) associado com uma doença humana ou animal.

5 O uso de bactérias que em geral habitam o trato gastrointestinal de seres humanos resulta em um agente profilático e terapêutico que não causa efeitos colaterais indesejados. A natureza de carboidrato é responsável pela ausência de tolerogenicidade relevante e por não se apresentarem reações alérgicas relevantes.

10 Uma vez que a glicosilação em micro-organismos é completamente diferente da glicosilação em seres humanos ou animais, foi surpreendente que os micro-organismos proporcionados e obteníveis pela presente invenção tenham expressado um epitopo de carboidrato "humano" (ou parte dele) como ocorre na superfície de uma célula humana ou como é produzida
15 em uma célula humana e que este antígeno humano ou parte dele seja apresentado por células dendríticas após carregamento com os micro-organismos mencionados e induza uma resposta imunocelular eficaz contra o antígeno carboidrato mencionado que pode, no sentido da invenção, também ser ou compreender uma resposta imunocelular eficaz contra estruturas
20 de carboidratos, conjugados de carboidratos ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato. Essas células dendríticas carregadas são funcionalmente ativas e estimulam e ativam células T.

 Mais surpreendentemente, essa resposta imune também é carboidrato-específica e é, por exemplo, não predominantemente disparada
25 pela sequência de peptídeos subjacente.

 Um aspecto importante da presente invenção é que o micro-organismo carboidrato-positivo é reconhecido por pelo menos uma molécula de ligação carboidrato, tal como, por exemplo, um anticorpo específico para o epitopo de carboidrato. Portanto, o micro-organismo carboidrato-positivo
30 sofre ligação especificamente por um anticorpo específico para o epitopo de carboidrato quando posto em contato com o anticorpo mencionado. A estrutura de carboidrato é assim acessível para o anticorpo específico para o dito

epitopo de carboidrato no micro-organismo carboidrato-positivo da presente invenção e não é "ocultado" por outras estruturas. Essa importante característica, que pode ser determinada por meio de teste — testes adequados são descritos abaixo — garante que o micro-organismo carboidrato-positivo, e/ou a fração ou lisado carboidrato-positivo do mesmo, carrega o epitopo de carboidrato de interesse e é, assim, pelo menos imunoquimicamente quase idêntico ao epitopo de carboidrato de interesse e não um epitopo meramente similar ao epitopo de carboidrato de interesse. Essa característica é importante para garantir que uma resposta imune seja disparada pelo micro-organismo carboidrato-positivo mencionado seja suficientemente específica para o epitopo de carboidrato de interesse. Tais anticorpos específicos para epitopos de carboidratos, que podem ser usados para determinar que um micro-organismo carrega o epitopo de carboidrato de interesse, reconhecem especificamente o epitopo de carboidrato em uma área com tumor relevante, por exemplo, e, portanto, de ocorrência natural. Isso garante ainda mais que o micro-organismo carrega o epitopo de carboidrato de interesse em uma forma que dispara a resposta imune desejada.

Os anticorpos específicos para epitopos de carboidratos podem, de acordo com isso, ser usados para determinar que os micro-organismos carboidrato-positivos da presente invenção carregam estruturas de carboidratos que mimetizam o epitopo de carboidrato de interesse como presente em tumores, por exemplo. Essa característica — especificidade para epitopos de carboidratos — é decisiva para a capacidade do micro-organismo da presente invenção de disparar a resposta imune desejada.

Devido ao fato dos micro-organismos da presente invenção serem realmente carboidrato-positivos e serem selecionados de acordo com isso — o que pode ser determinado/realizado mediante o uso de anticorpos específicos para epitopos de carboidratos — a invenção proporciona micro-organismos carboidrato-positivos que induzem ou aumentam uma resposta imune específica e, assim, potente, contra o epitopo de carboidrato de interesse. Como indicado acima, o dito epitopo de carboidrato é preferivelmente um epitopo de carboidrato humano e, portanto, um epitopo de carboidrato

encontrado em ou apresentado por uma célula humana. A formulação da presente invenção ativa o sistema imune em uma maneira tumor-específica mediante a indução de altos níveis de anticorpos contra epitopos de carboidratos específicos. Até onde se sabe, a presente invenção é o primeiro aditivo alimentar/nutracêutico ou farmacêutico capaz de ativar um escudo imuno específico contra tumores e o primeiro aditivo alimentar capaz de induzir uma resposta imuno específica a um carboidrato e, em particular, uma resposta imuno específica para o antígeno tumoral Core-1.

De acordo com uma modalidade, a invenção proporciona um método para identificar um micro-organismo carboidrato-positivo de acordo com a presente invenção, micro-organismo o qual é assim capaz de disparar uma resposta imuno específica.

Portanto, um método para isolar uma mistura de micro-organismos um micro-organismo carboidrato-positivo que carrega um epítipo de carboidrato de interesse preferivelmente humano, compreendendo:

(a) colocação em contato entre uma molécula de ligação carboidrato específica para o epítipo de carboidrato de interesse e uma mistura de micro-organismos, e

(b) isolamento, da mistura mencionada, de pelo menos um micro-organismo ligado à molécula de ligação carboidrato mencionada,

(c) opcionalmente, testagem para demonstrar que o micro-organismo isolado é um micro-organismo carboidrato-positivo mediante testagem do micro-organismo isolado para ligação específica à molécula de ligação carboidrato mencionada.

Este método de seleção permite a identificação de micro-organismos que carregam o epítipo de carboidrato de interesse e são, assim, componentes apropriados para as formulações de acordo com a presente invenção. Como delineado acima, o dito epítipo de carboidrato é preferivelmente um epítipo de carboidrato humano tal como, por exemplo, um marcador tumoral.

Como torna-se claro através dos exemplos, existem diversos epitopos de carboidrato que estão associados a doenças e em particular ao

câncer (ver, por exemplo, a tabela 1). Além disso, há também moléculas de ligação conhecidas que se ligam especificamente aos epitopos de carboidratos mencionados de interesse (ver tabela 2). Ademais, métodos para a geração de moléculas de ligação a carboidratos específicos para o epitopo de carboidrato de interesse também são descritos aqui.

De acordo com uma modalidade preferida, o método mencionado compreende adicionalmente a testagem da indução de uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e/ou resposta imune-humoral eficaz contra o dito epitopo de carboidrato pelo micro-organismo mencionado e/ou fração e/ou lisado do mesmo *in vivo* ou *in vitro*. De acordo com essa modalidade preferida, o micro-organismo carboidrato-positivo mencionado induz ou aumenta uma resposta imune contra o epitopo de carboidrato de interesse em pelo menos um ser humano ou animal que reconhece o epitopo de carboidrato de interesse e/ou a célula tumoral positiva para o dito epitopo de carboidrato. Devido ao fato de que o micro-organismo é positivo para o epitopo de carboidrato de interesse, uma resposta imune contra o epitopo de carboidrato de interesse é induzida/aumentada após administração do micro-organismo identificado. Assim, estabelece-se um mecanismo de vigilância imune que pode, por exemplo, eliminar células tumorais recém-surgidas que carregam o epitopo de carboidrato de interesse, impedindo assim o crescimento tumoral primário e/ou fortalece o sistema imune e/ou melhora uma resposta imune.

Portanto, de acordo com uma modalidade preferida, a etapa (d) compreende a testagem da indução de uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato pelo micro-organismo carboidrato-positivo e/ou fração e/ou lisado do mesmo para a ativação de células T de tipo Th1 CD4-positivas e/ou para a ativação de células T CD8-positivas citotóxicas, preferivelmente em pelo menos um animal ou humano e/ou *in vitro*.

De acordo com uma modalidade, o teste de resposta imunocelular mencionado realizado na etapa (d) compreende

i) Carregamento de pelo menos uma célula dendrítica com a cé-

lula carboidrato-positiva identificada nas etapas (a) a (c);

ii) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica mencionada carregada com o micro-organismo carboidrato-positivo mencionado e de quantidade adequada de células imunes que podem ser ativadas ou inibidas por uma célula dendrítica;

iii) cultivo de maneira a permitir a interação das células imunes mencionadas com as células dendríticas carregadas mencionadas;

iv) adição de uma quantidade apropriada de células apresentadoras de antígenos (APCs) carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos um segundo composto veículo do mesmo epítipo de carboidrato que o micro-organismo carboidrato-positivo, sendo o segundo composto mencionado diferente do micro-organismo carboidrato-positivo;

v) cultivo para re-estimulação das células imunes mencionadas;

vi) confirmação da ocorrência da re-estimulação das células imunes.

Mediante a realização desse teste de resposta celular é possível confirmar se um determinado epítipo de carboidrato presente no micro-organismo carboidrato-positivo mencionado é capaz de disparar uma resposta imunocelular. Até agora, a técnica anterior assumia que os carboidratos eram incapazes de disparar uma resposta imunocelular. Contudo, agora descobriu-se que certos epítipos de carboidratos são capazes de disparar uma resposta imunocelular. É, assim, importante proporcionar sistemas de teste para se determinar se um micro-organismo carboidrato-positivo identificado pelo método da presente invenção é de fato capaz de disparar uma resposta celular respectiva, confirmando-se desta maneira se o dito micro-organismo é apropriado, por exemplo, para uma terapia. O teste mencionado usa células dendríticas uma vez que as células dendríticas são capazes de iniciar e, assim, estimular células imunes tais como as células T. As células dendríticas processam os compostos que encontram e apresentam os compostos/antígenos processados em sua superfície. Entretanto, células de MHC tais como as células dendríticas podem apresentar apenas certos tipos

de antígenos e é importante determinar se o antígeno/epitopo de interesse pode ser apresentado pelas células dendríticas, uma vez que apenas tais antígenos/epitopos são capazes de disparar uma resposta imunocelular.

5 As células dendríticas são, portanto, carregadas com o micro-organismo carboidrato-positivo identificado nas etapas (a) a (c). Condições apropriadas para o carregamento são aqui descritas.

10 As células dendríticas carregadas mencionadas são então postas em contato com células imunes, em particular linfócitos tais como as células T. As células imunes podem ser obtidas, por exemplo, de doadores humanos. As células dendríticas que apresentam antígenos correspondentes aos receptores das células imunes ativam e assim estimulam os linfócitos, permitindo, dessa maneira, que eles proliferem e sobrevivam. Os linfócitos que não correspondem aos antígenos apresentados pelas células dendríticas não são ativados e morrem.

15 A primeira rodada de estimulação proporciona linfócitos ativados que são específicos para qualquer antígeno correspondente apresentado pelas células dendríticas carregadas mencionadas. Entretanto, o objetivo da presente etapa é identificar se o micro-organismo carboidrato-positivo pode estimular uma resposta celular específica para o epitopo de carboidrato.

20 Uma etapa de seleção é portanto realizada na qual os linfócitos são re-estimulados de maneira a se determinar se o epitopo de carboidrato do micro-organismo carboidrato-positivo estimula os linfócitos e, assim, dispara uma resposta celular. Na etapa de seleção mencionada, células apresentadoras de antígenos tais como, por exemplo, células dendríticas, são
25 carregadas com um segundo composto que também carrega o carboidrato de interesse. Contudo, o segundo composto mencionado é diferente do micro-organismo carboidrato-positivo. Esse segundo composto também é processado pelas APCs e os antígenos são apresentados pelas APCs mencionadas. Uma vez que o segundo composto é diferente do micro-organismo
30 carboidrato-positivo, a maioria dos antígenos apresentados, preferivelmente todos os antígenos — além do carboidrato de interesse — são diferentes dos antígenos apresentados na primeira rodada. Isso tem o efeito de fazer

com que sobrevivam à segunda rodada de re-estimulação apenas aqueles linfócitos que encontram um antígeno correspondente apresentado pelas APCs. Caso as células dendríticas da primeira rodada assim como as APCs da segunda rodada apresentem ambas um antígeno compreendendo ou
5 consistindo do epitopo de carboidrato de interesse, os linfócitos que reconhecem o antígeno mencionado são estimulados e assim sobrevivem à medida que também são re-estimulados. Os linfócitos que não encontram um parceiro correspondente quando em contato com as APCs mencionadas carregadas com o segundo composto veículo do epitopo de carboidrato de
10 interesse morrem devido à falta de re-estimulação. Esta etapa de seleção garante que uma resposta celular contra o carboidrato de interesse seja detectada.

Modalidades adicionais no que se refere aos sistemas de teste proporcionados que podem ser usados em conjunção com a presente inven-
15 ção são descritas nas reivindicações e no que segue.

Os micro-organismos carboidrato-positivos identificados pelo método mencionado que possuem as características e vantagens descritas e podem se usados na formulação de acordo com a presente invenção. A for-
20 mulação de acordo com a presente invenção pode ser usada para fins profiláticos e/ou terapêuticos e/ou no suporte às atividades imunológicas.

A invenção também proporciona formulações que podem ser usadas como composições farmacêuticas e como nutracêuticos e podem induzir as respostas imunes contra os epitopos de carboidrato em células humanas e de animais ou contra uma doença por uma série de diferentes
25 vias de administração, incluindo a administração sistêmica tal como, sem limitação a, administração intraperitoneal, intravenosa, intradermal, subcutânea mas, ainda mais surpreendentemente, por administração por via oral, mediando uma resposta imune sistêmica mesmo quando administrando os micro-organismo ou frações do mesmo por via oral.

30 Uma formulação da invenção é uma nutracêutico ou composição farmacêutica que compreende pelo menos um micro-organismo que sofre ligação especificamente de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato

que se liga a um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal, ou a uma fração ou lisado da mesma, sendo que o dito micro-organismo (ou uma fração ou lisado do mesmo) da formulação mencionada, ou do nutracêutico mencionado ou da composição farmacêutica mencionada, induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o antígeno carboidrato mencionado em pelo menos um animal ou humano, preferivelmente uma resposta citotóxica das células T.

Em uma modalidade da invenção, a formulação da presente invenção pode ser um nutracêutico e proporciona os meios para a indução de um escudo imuno específico contra doenças associadas a certos epitopos de carboidratos ou antígenos carboidratos. Isso ocorre em contraste com probióticos e pré-bióticos convencionais, que resultam não em respostas imunes antígeno-específicas, mas em uma indução inespecífica e geral do sistema imune. O uso da formulação da presente invenção como um nutracêutico apresenta diversas vantagens em comparação com as estratégias de vacinação convencionais. Uma delas é a conveniência para o paciente ou para a pessoa que a utiliza. A imunoestimulação é específica para o epitopo de carboidrato ou para o antígeno e pode até mesmo ser induzida bem antes do estabelecimento da doença ou tumor, formando um escudo imuno específico de maneira a prevenir, inibir ou reduzir o desenvolvimento de tais doenças ou para ser usada em combinação com outras terapias da doença. Assim, terapias agressivas (tais como quimioterapia, radioterapia ou cirurgia) com efeitos colaterais graves podem ser evitadas. Em uma modalidade preferida, o indivíduo não precisa necessariamente ir a um médico para seguir ativamente a profilaxia da doença, mas pode obter a formulação necessária incorporada em um alimento, diminuindo assim a barreira psicológica contra outras possibilidades de prevenção.

As composições farmacêuticas da invenção também têm a vantagem de poderem ser direcionadas contra doenças que representam importantes necessidades médicas nas quais carboidratos ou marcadores de carboidratos possuem importante papel.

Sem pretender ser limitadores, exemplos de tais doenças e os

epitopos de carboidratos associados estão listados na tabela 1.

Doença	Epitopo de carboidrato
Melanoma	GM2, GD2, GDL3, GD3, 9-0-acetil GD2, 9-O-acetil GD3
Linfoma de células B	GM2, GD2
Câncer de pequenas células do pulmão	GM2, GM1 fucosila, Globo H, ácido polissialico, sLe a (sialil-Lewis a)
Câncer de mama	GM2, Globo H, TF, Core-1, Galbeta1-3GalNAc-, Le y (Lewis-Y)
Câncer de próstata	GM2, Globo H, Tn, sTn, Le y, sLe a, Core-1
Câncer de pulmão	GM2 Globo H, Le y, Core-1
Câncer de cólon	GM2, sTn, TF, Le y, Core-1
Câncer de ovário	GM2, Globo H, sTn, TF, Le y, Core-1
Câncer de estômago	GM2, Le y, Le a, sLe a, Core-1
Neuroblastoma	GM2, GD2, GD3L, ácido polissialico
Sarcoma	GM2, GD2, GD3L, GD3
Câncer de pâncreas	sLe a, sLe x (sialil Lewis x)
Cânceres gastrointestinais	sLe a, sLe x
Neoplasia Cd4+ DC 56+	sLe x (CD15)

- Contudo, o epitopo de carboidrato pode também ser apropriado para outras indicações, tais como, sem limitação a, TF para o câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer de rim, câncer de próstata e Core-1 para câncer de rim e de fígado.

Surpreendentemente, a formulação da presente invenção age como um mecanismo de vigilância imune contra doenças ou células tumorais carboidrato-positivas após administração em um ser humano ou animal. Ela induz ou aumenta uma resposta imune epitopo carboidrato-específica em seres humanos ou animais que previne ou reduz a ocorrência de doenças ou células tumorais caracterizadas pela expressão do antígeno carboi-

drato aplicado no humano ou animal.

A formulação da presente invenção induz altas titulações de anticorpos anticarboidratos específicos e/ou, ainda mais surpreendentemente, uma resposta imune celular carboidrato-específica eficaz que reconhece o antígeno carboidrato ou as estruturas de carboidrato, conjugados de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato. Micro-organismos carboidrato-positivos apropriados podem ser identificados com os métodos de seleção e sistemas de teste aqui descritos.

Devido à natureza biológica da formulação, sua produção é menos dispendiosa e requer menos tempo do que a produção de formulações imunoterapêuticas convencionais.

Surpreendentemente, a formulação da presente invenção tem propriedades adjuvantes internas. Assim, adjuvantes adicionais ou veículos imunopotenciadores não são necessários em todos os casos.

A) Nutracêuticos e composições farmacêuticas

A presente invenção proporciona uma formulação selecionada do grupo compreendendo composições nutracêuticas e farmacêuticas, compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo reconhecido e que assim sofre ligação quando em contato com pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconhece especificamente um epítipo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal, ou uma fração ou um lisado da mesma, sendo que o dito micro-organismo, a fração mencionada ou o lisado mencionado ou a formulação mencionada que os compreende induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficiente contra o dito epítipo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato.

Um importante aspecto da presente invenção é que o micro-organismo carboidrato-positivo e/ou o lisado ou fração carboidrato-positiva do mesmo é reconhecido por pelo menos uma molécula de ligação carboidrato, preferivelmente um anticorpo específico para o epítipo de carboidrato. Assim, o o micro-organismo carboidrato-positivo e/ou o lisado ou fração car-

boidrato-positiva do mesmo é sofre ligação especificamente da molécula de ligação carboidrato quando posto em contato com a molécula de ligação carboidrato mencionada. Desta maneira, uma estrutura de carboidrato similar ou idêntica ao epitopo de carboidrato de interesse, que é preferencialmente um epitopo de carboidrato humano, é assim acessível para a molécula de ligação carboidrato mencionada no micro-organismo carboidrato-positivo da presente invenção e não é "ocultada" por outras estruturas. Essa importante característica, que pode ser determinada mediante testagem— testes apropriados são descritos abaixo — garante que o micro-organismo carboidrato-positivo e/ou o lisado ou fração carboidrato-positiva do mesmo carrega o epitopo de carboidrato de interesse e é, dessa forma, pelo menos imunoquimicamente quase idêntico ao epitopo de carboidrato de interesse e não um epitopo meramente similar ao epitopo de carboidrato de interesse. Essa característica é importante para garantir que uma resposta imune disparada pelo micro-organismo carboidrato-positivo mencionado seja suficientemente específica para o epitopo de carboidrato de interesse. Tal molécula de ligação carboidrato, que pode ser usada para determinar que um micro-organismo carrega o epitopo de carboidrato de interesse, reconhece especificamente o epitopo de carboidrato, por exemplo, em uma área com tumor relevante. Também compreendidos estão micro-organismos que não são naturalmente carboidrato-positivos, mas podem ser convertidos em micro-organismos carboidrato-positivos mediante tratamento químico, tal como, por exemplo, um tratamento com periodato. Os micro-organismos respectivos podem ser usados, por exemplo, após o tratamento com periodato (revelando o Core-1), como componentes das formulações da presente invenção se forem, devido ao tratamento químico, então reconhecidos pelas moléculas de ligação a carboidratos e forem, assim, convertidos em micro-organismos carboidrato-positivos.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a indução mencionada da resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada ocorre em pelo menos um ser humano ou animal.

Em outra modalidade preferida da invenção, a indução mencio-

nada da resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada é realizada *in vitro*.

Em uma modalidade preferida da invenção, a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada compreende a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e/ou a ativação de células T citotóxicas CD8-positivas direcionadas contra o dito epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida da invenção, a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada compreende a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e a ativação de células T citotóxicas CD8-positivas direcionadas contra o dito epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato.

A presente invenção proporciona formulações compreendendo micro-organismos que apresentam epítopos de carboidratos humanos ou animais e/ou lisados e/ou frações dos mesmos que induzem uma resposta imune epítipo carboidrato-específica eficaz, mais preferivelmente uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e, ainda mais preferivelmente, a resposta imunocelular mencionada compreende a ativação de células T auxiliares Th1 e células T citotóxicas.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção proporciona uma formulação selecionada do grupo compreendendo um nutracêutico e uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo que sofre ligação especificamente de uma molécula de ligação carboidrato que se liga a um epítipo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal ou uma fração ou um lisado da mesma, sendo que o dito micro-organismo ou uma fração ou um lisado do mesmo, ou a formulação mencionada, o nutracêutico mencionado, ou a composição farmacêutica mencionada, induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero com-

preendendo o dito epitopo de carboidrato.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um nutracêutico compreendendo pelo menos um micro-organismo que carrega ou apresenta pelo menos um epitopo de carboidrato humano ou animal e/ou
5 lisados e/ou frações do mesmo que induzem uma resposta imune epitopo carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato; ainda mais preferivelmente a resposta imunocelular mencionada compreende a ativação de células T
10 auxiliares Th1 e células T citotóxicas.

Preferivelmente, a composição farmacêutica da presente invenção é usada para impedir ou reduzir a ocorrência de células patológicas que expressam o epitopo de carboidrato humano ou animal e/ou prevenir ou reduzir a disseminação ou metástase das células mencionadas, tais como,
15 sem limitação a, células tumorais ou células cancerosas que expressam ou compreendem o epitopo de carboidrato humano ou animal.

Em outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica é usada para tratar uma doença ou tumor que expressa o epitopo de carboidrato humano ou animal.

Em uma modalidade preferida da invenção, o nutracêutico ou a composição farmacêutica da presente invenção é usada como uma vacina contra células ou doenças caracterizadas pela ocorrência do epitopo de carboidrato ou uma parte do mesmo que medeia a especificidade.

As doenças ou tumores mencionados que estão associados com expressam o epitopo de carboidrato estão listados em outra parte deste.
25

A formulação farmacêutica da invenção compreende pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo e um veículo farmacêuticamente aceitável. A preparação e a administração de uma formulação desta invenção (por exemplo, um fármaco compreendendo um micro-organismo carboidrato-positivo) está em concordância com as técnicas conhecidas. Por
30 exemplo, a formulação pode ser combinada com adjuvantes galênicos convencionais para formar uma composição apropriada para o método desejado

de aplicação. Por exemplo, os compostos desta invenção podem ser empregados em mistura com excipientes convencionais, isto é, substâncias veiculares orgânicas ou inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis apropriadas para aplicação parenteral ou enteral que não reajam de maneira deletéria com os compostos ativos. Veículos farmaceuticamente aceitáveis apropriados incluem, sem limitação a, água, soluções salinas, álcoois, óleos vegetais, polietilenoglicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, parafina viscosa, óleo aromatizante, monoglicerídeos e diglicerídeos de ácidos graxos, pentaeritrol, ésteres de ácidos graxos, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona, talco, etc.

O nutracêutico ou composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrado a um ser humano ou animal por diferentes vias de aplicação ou administração. As vias preferidas de administração no sentido da invenção estão descritas em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida da invenção, o nutracêutico ou composição farmacêutica é aplicado oralmente em um ser humano ou animal.

A invenção proporciona uma formulação selecionada do grupo compreendendo um nutracêutico e uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo que sofreu ligação de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconhece especificamente um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal, ou uma fração ou um lisado da mesma, sendo que o dito micro-organismo ou a fração ou lisado mencionado ou a formulação mencionada que os compreende induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato em pelo menos num animal ou humano. Assim, em qualquer outra parte deste, uma resposta imune contra um epitopo de carboidrato também significa uma resposta imune contra uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida, a formulação mencionada induz ou aumenta uma resposta imune específica contra o dito epitopo de carboi-

drato em um ser humano ou animal.

Em uma modalidade preferida, a formulação mencionada induz ou aumenta uma resposta imuno específica contra o dito epitopo de carboidrato em um ser humano ou animal, sendo o epitopo de carboidrato associado a uma doença em seres humanos ou animais.

Em outra modalidade preferida, a resposta imuno específica mencionada contra o dito epitopo de carboidrato compreende uma resposta imune-humoral contra tal epitopo de carboidrato.

A resposta imune-humoral mencionada contra tal epitopo de carboidrato resulta na produção de anticorpos específicos contra carboidratos no humano ou animal e pode ser determinada pelos testes de resposta imunes humoral, como descrito abaixo. O aumento da resposta imune-humoral significa o aumento de uma titulação de anticorpos já presente contra o dito epitopo de carboidrato após a administração da formulação da invenção.

Em outra modalidade preferida, a resposta imuno específica mencionada contra o dito epitopo de carboidrato compreende uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato.

Em outra modalidade preferida, a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada compreende ativação de células T CD4-positivas do tipo Th1 e a ativação de células T citotóxicas CD8-positivas direcionadas contra o dito epitopo de carboidrato.

Em outra modalidade preferida, a resposta imuno específica mencionada contra o dito epitopo de carboidrato compreende uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e uma resposta imune-humoral contra o dito epitopo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida da invenção, o epitopo de carboidrato é selecionado do grupo compreendendo TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil-Lewis-A, sialil-Lewis-X, ácido polissialico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, 9-O-acetil GD2, GD3L, GM1 fucosil, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis B, sLac, cadeia sialilada tipo 1, antígeno CA

19-9, antígeno CA 72-4 e antígeno CA-50.

Em uma modalidade preferida da invenção, a molécula de ligação carboidrato é selecionada do grupo compreendendo pelo menos uma lectina, pelo menos uma selectina e/ou pelo menos um anticorpo e/ou pelo menos uma molécula derivada do mesmo que se liga a TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil -Lewis-A, sialil -Lewis-X, ácido polissialílico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, 9-O-acetil GD2, GDL3, fucosil GM1, Lewis-A, Lewis-B, sLac, cadeia sialilada tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno CA 72-4 ou CA-50 ou a um epitopo compreendendo qualquer uma dessas estruturas ou partes das mesmas.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona uma formulação selecionada do grupo compreendendo composições nutracêuticas e farmacêuticas compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo que sofre ligação de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconhece especificamente um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal ou uma fração ou um lisado da mesma, sendo que o dito micro-organismo, a fração mencionada ou o lisado mencionado ou a formulação mencionada que os compreende, induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato em pelo menos um animal ou humano, sendo que

(i) a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz compreende a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e/ou a ativação de células T CD8-positivas citotóxicas direcionadas contra o dito epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato, e

(ii) o epitopo de carboidrato é selecionado do grupo compreendendo TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil-Lewis-A, sialil-Lewis-X, ácido polissialílico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, GD3L, fucosil GM1, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis-B, sLac, cadeia sialilada tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno CA 72-4 e antígeno CA-50, e

- (iii) a molécula de ligação carboidrato é selecionada do grupo compreendendo lectinas, selectinas e/ou anticorpos e/ou moléculas derivadas que se ligam a TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil-Lewis-A, sialil-Lewis-X, ácido polissialico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, GD3L, fucosil GM1, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis-B, sLac, cadeia sialilada tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno CA 72-4 ou antígeno CA-50 ou a uma estrutura de carboidrato compreendendo qualquer um desses epitopos de carboidrato ou partes dos mesmos.

- Sem pretender ser limitadores, exemplos de estruturas de carboidrato e as moléculas de ligação a carboidrato correspondentes estão listadas na tabela 2.

Tabela 2

Epitopo de carboidrato	Molécula de ligação carboidrato	
	<i>lectina</i>	<i>anticorpo monoclonal</i>
TF ou Core-1	galectina, lectinas tipo C de macrófagos, sialoadesina, PNA ³ , Jacalin ³ , MAL ³ , EEL ³ , ECL ³	Nemod-TF1 ² , Nemod-TF2 ² , A78-G/A7 ² , HBT1 ¹¹ , HH8 ¹⁴ , A68-B/A11 ²
Tn	lectinas tipo C de macrófagos, sialoadesina, BPL ³ , DBA ³ , GSL I ³ , MPL ³ , RCA ³ , SJS ³ , SBA ³	HB-Tn1 ¹¹
sialil-Tn		CA 72-4 ¹ , TKH2 ¹ , HBSTn1 ¹¹
Globo-H		A69-A/E8 ² , VK9 ¹³
Lewis-Y		A46-B/B10 ² , A63-D/B12 ² , A51-B/A6 ² , A70-C/C8 ² , A70-A/A9 ²
sialil-Lewis-A	E-selectina	CA 195 ¹ , CA 50 ¹ , 121SLE ¹²
sialil-Lewis-X	E-selectina	CA19-9 ¹ , KM931 ¹⁰ , T174 ¹⁰
Lewis-X		73-30 ⁴ , BG-7 (P12) ⁴
Lewis-A		CA 195 ¹ , MAB2108(7LE) ⁴ , BG-5 (T174) ⁴ , PR5C5 ¹²
Lewis-B		MAB2102 (2.25LE) ⁴ , BG-6 (T218) ⁴
cadeia sialilada de tipo 1		CA 242 ¹
sLac		CA 50 ¹ , DU-PAN-2 ¹
ácido polissialico	MAL II ³ , SNA ³	Mab735 ⁹ , 5A5 ¹³

fucosil GM1		F12 ¹³
GM2		BP283 ⁵ , PGNX ¹³
GD2		Mab 126 ¹ , 3F8 ⁸ , ME 36.1 ¹
GD3		R24 ⁶ , MAB2053 ⁷ , ME 36.1 ¹
9-O-acetil GD2		3F8 ⁸
9-O-acetil GD3		ME3.11 ¹

¹ Orntoft et al. Electrophoresis 1999, 20, 362-371

² Glycotope GmbH, Berlim, www.glycotope.com

³ Vector Laboratories, www.vectorlabs.com

⁴ Amano et al. Clin Diagn Lab Immunol 1997 (Sep), 540-544

5 ⁵ Acris Antibodies GmbH, www.acris-antibodies.com

⁶ Reaman et al. Cancer Res 1990 50 (1): 202-5

⁷ CHEMICON International, Inc. www.chemicon.com

⁸ Ye et al. 1992; 50(2): 197-201

⁹ Hussmann et al. J Histochem Cytochem 1990; 38 (2):209-15

10 ¹⁰ Calbiochem, www.calbiochem.com

¹¹ DakoCytomation Dako Deutschland GmbH, Alemanha, www.dakogmbh.de

¹² Dianova, Hamburgo, Alemanha

¹³ Livingston et al. Cancer Immunol Immunother (2005) 54: 1018-1025

¹⁴ Clausen et al. Mol Immunol (1988) 25: 199-204

15 O micro-organismo carboidrato-positivo e frações e lisados do micro-organismo carboidrato-positivo e as combinações dos mesmos estão descritas em detalhe em Definições e em outras partes deste, assim como métodos para a identificação e isolamento dos micro-organismos mencionados e ou frações dos mesmos.

20 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração ou lisado do mesmo que induz ou aumenta uma resposta imune epitopo carboidrato-específica contra o epitopo de carboidrato em pelo menos um ser humano ou animal,

25 funcionando como um escudo contra células cancerosas positivas para o epitopo de carboidrato por ter o potencial de destruir células cancerosas que carregam ou compreendem o dito epitopo de carboidrato.

Células cancerosas positivas para o epítipo de carboidrato no sentido da invenção significam células cancerosas que expressam, carregam ou compreendem o dito epítipo de carboidrato ou que produzem o dito epítipo de carboidrato ou que se associam ao epítipo de carboidrato.

5 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração ou lisado do mesmo que induz ou aumenta uma resposta imune epítipo carboidrato-específica em pelo menos um ser humano ou animal, funcionando como um escudo contra
10 células de uma doença associada com o dito epítipo de carboidrato por ter o potencial de destruir as células mencionadas.

 Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o nutracêutico é usado para construir a resposta imune epítipo carboidrato-específica mencionada, que funciona como um escudo contra as células
15 contendo o carboidrato e que tem o potencial de destruir essas células, como descrito acima, mediante administração oral do nutracêutico em (pelo menos um) indivíduo saudável.

 Em uma modalidade preferida adicional, o nutracêutico da invenção é usado para reduzir ou, de maneira ainda mais preferida, prevenir a
20 ocorrência de uma doença ou tumor carboidrato-positivo mediante administração oral do nutracêutico em pelo menos um indivíduo saudável.

 Em uma modalidade preferida da invenção, a composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração ou lisado do mesmo é usado para construir uma resposta
25 imune epítipo carboidrato-específica que funciona como um escudo contra células cancerosas positivas para o epítipo de carboidrato por ter o potencial de destruir essas células, como mostrado aqui, por exemplo, pela indução de anticorpos específicos para o epítipo de carboidrato, da citotoxicidade dependente de complemento específica para o epítipo de carboidrato dos
30 anticorpos para o epítipo de carboidrato contra células tumorais positivas para o epítipo de carboidrato, destruindo-as eficientemente, ou mediante secreção de TNF-alfa e/ou INF-gama por respostas de células T específicas

para o epítipo de carboidrato, que são marcadores substitutos reconhecidos cientificamente por aqueles versados na técnica, para a destruição específica, mediada por células T citotóxicas, das células tumorais que carregam o epítipo de carboidrato, como mostrado e descrito nos exemplos deste.

5 O nutracêutico ou a composição farmacêutica da invenção é usado para tratar uma doença ou tumor carboidrato-positivo em pelo menos um ser humano ou animal.

10 Em uma modalidade preferida da invenção, o nutracêutico compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo é usado para tratar uma doença ou tumor carboidrato-positivo mediante administração oral do nutracêutico em pacientes que sofrem dessa doença.

15 Em uma modalidade preferida da invenção, a composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo é usada para tratar uma doença ou tumor carboidrato-positivo em pacientes que sofrem dessa doença.

20 Em uma modalidade preferida adicional, o nutracêutico ou composição farmacêutica da invenção é usado para reduzir ou, mais preferivelmente, prevenir, a ocorrência de uma doença, tumor ou metástase carboidrato-positiva.

25 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo que reduz ou previne a disseminação ou a metástase de uma doença ou tumor carboidrato-positivo em pelo menos um ser humano ou animal quando administrado.

30 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona uma formulação selecionada do grupo compreendendo um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo que é usado para profilaxia e tratamento de uma doença humana ou animal associada com um epítipo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona uma composição farmacêutica usada para prevenir ou reduzir a disseminação do tumor ou metástase ou a disseminação de metástase ou do tempo de reincidência de um tumor ou de células tumorais carboidrato-positivas, para
5 melhorar a qualidade de vida ou sobrevivência média ou taxa de tempo de reincidência, ou para tratar um paciente de tumor que tem ou teve um tumor positivo para epitopo de carboidrato mediante administração da composição farmacêutica em pacientes sofrendo dessa doença.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o nutracêutico ou composição farmacêutica compreende pelo menos dois micro-
10 organismos carboidrato-positivos ou frações dos mesmos.

Em outra modalidade preferida da invenção, o nutracêutico ou composição farmacêutica compreende pelo menos dois micro-organismos carboidrato-positivos ou frações dos mesmos sendo os micro-organismos
15 carboidrato-positivos ou frações são positivos para o mesmo carboidrato.

Em outra modalidade preferida da invenção, o nutracêutico ou composição farmacêutica compreende pelo menos dois diferentes micro-organismos carboidrato-positivos ou frações dos mesmos sendo os micro-organismos carboidrato-positivos ou frações são positivos para carboidratos
20 diferentes.

Em outra modalidade preferida da invenção, o nutracêutico ou composição farmacêutica supracitada da invenção compreende pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo e pelo menos uma fração de um micro-organismo carboidrato-positivo, preferencialmente de mais de um mi-
25 cro-organismo carboidrato-positivo, sendo que o micro-organismo carboidrato-positivo e a fração de um micro-organismo carboidrato-positivo são positivos para o mesmo carboidrato ou para carboidratos diferentes.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o nutracêutico ou formulação farmacêutica compreende pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo combinado com pelo
30 menos um outro micro-organismo benéfico.

O micro-organismo benéfico mencionado é preferivelmente se-

lecionado do grupo compreendendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Em outra modalidade preferida, o nutracêutico ou composição farmacêutica da invenção compreende pelo menos uma fração do micro-organismo carboidrato-positivo e pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo.

Em uma modalidade preferida adicional, o nutracêutico ou composição farmacêutica da invenção compreende pelo menos uma fração do micro-organismo carboidrato-positivo combinada com pelo menos um outro micro-organismo benéfico, tal como, mas sem limitação a, um *lactobacillus* e/ou *bifidobacterium*, ainda mais preferivelmente uma combinação de frações de micro-organismos carboidrato-positivos de diferentes cepas combinados com outros micro-organismos benéficos.

A formulação da presente invenção selecionada do grupo compreendendo um nutracêutico e uma composição farmacêutica pode consistir apenas em um micro-organismo ou fração do mesmo ou compreender ingredientes ou componentes adicionais tais como, mas sem limitação a, mais de um micro-organismo ou fração do mesmo ou outros micro-organismos ou frações dos mesmos ou soluções-tampão ou veículos farmaceuticamente aceitáveis ou alimento como descrito em outra parte deste.

O nutracêutico mencionado da invenção pode consistir apenas em pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo, tal como, mas sem limitação a, um micro-organismo vivo ou morto, liofilizado, ou pasteurizado, ou lisados, ou componentes, ou frações dos mesmos, ou em uma forma pelo menos parcialmente solubilizada em um líquido, ou ele pode consistir em componentes adicionais tais como, mas sem limitação a, outros nutrientes, aditivos nutricionais ou aditivos alimentares ou para bebidas, soluções ou emulsões conhecidas daqueles versados na técnica. O nutracêutico mencionado pode ser aplicado oralmente sob diferentes formas, tais como cápsulas, comprimidos, emulsões, pós, líquidos. O nutracêutico pode ser dado sozinho ou misturado com alimentos ou bebidas. O nutracêutico mencionado pode também ser qualquer alimento, bebida, componente de uma bebida ou alimento, um aditivo alimentar, ou ser um nutracêutico

independente.

Em uma modalidade preferida, o nutracêutico é usado como uma cápsula ou um comprimido. Em outra modalidade preferida, o nutracêutico é misturado em um alimento ou bebidas tais como, mas sem limitação a, aquelas listadas em outra parte deste.

A presente invenção refere-se também a um nutracêutico compreendendo pelo menos um micro-organismo que sofreu ligação de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconhece especificamente um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal, ou uma fração ou um lisado da mesma, sendo que o dito micro-organismo, a fração mencionada ou o lisado mencionado ou a formulação mencionada que os compreende, induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato em pelo menos um animal ou humano.

Em uma modalidade preferida da invenção, o nutracêutico mencionado é aplicado em um ser humano ou animal como um alimento ou aditivo alimentar.

Alimento, no contexto da invenção, é qualquer substância consumida por organismos vivos, incluindo bebidas líquidas. O alimento é a principal fonte de energia e de nutrição para animais/humanos e é geralmente de origem animal ou vegetal. O alimento é, de preferência alimento vegetariano, o que compreende geralmente todos os tipos de alimentos livres de produtos animais, tais como carne, leite ou ovos. O alimento no contexto da invenção também preferivelmente o alimento não-vegetariano contendo produtos animais. Alimento no contexto da invenção é:

(i) qualquer substância ou produto, seja processado, parcialmente processado ou não processado, que se destina a ser, ou que se espera razoavelmente que seja, ingerido por humanos, seja de valor nutricional ou não;

(ii) água e outras bebidas;

(iii) chiclete ou produtos doces; e/ou

(iv) artigos e substâncias usadas como ingredientes ou compo-

nentes na preparação de um alimento.

O alimento no contexto da invenção é tradicionalmente obtido mediante agricultura, criação e pesca, com caça, coleta e outros métodos de subsistência localmente importantes para algumas populações, mas de menor relevância para outras. Na era moderna, em nações desenvolvidas, o fornecimento de alimentos é cada vez mais dependente da agricultura, da agricultura industrial, de técnicas de aquacultura e de cultivo de peixes que têm o objetivo de maximizar a quantidade de alimento produzida ao mesmo tempo que minimiza os custos. Essas técnicas incluem uma dependência de ferramentas mecânicas que foram desenvolvidas, desde a debulhadora e a semeadora até o trator e a máquina de ceifar e debulhar, etc. Estas ferramentas foram combinadas com os pesticidas para promover alta produção e combater os insetos e mamíferos que reduzem a produção. Mais recentemente, tem havido um movimento crescente no sentido de práticas agrícolas mais sustentáveis. Essa abordagem — que é parcialmente alimentada pela demanda do consumidor — encoraja a biodiversidade, a dependência de recursos locais e métodos de cultivo orgânicos.

Tipos de alimentos manufaturados (alimentos que contêm pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo) no contexto da invenção são:

Bebidas: cerveja, suco, refrigerante, refresco, vinho, bebidas contendo leite, produtos do leite ou outras bebidas alcoólicas ou não-alcoólicas, por exemplo água, incluindo apenas água com gás, sucos de fruta e sucos de vegetais, refrigerantes, águas frescas, limonada, coca-cola, cerveja de gengibre, irn bru, bebida não alcoólica de raízes, salsaparilha, sorvete com club soda, dente-de-leão e bardana, refresco, um xarope com aroma de fruta diluído em água, bebidas esportivas, infusões, café, chá, bebidas lácteas, por exemplo, leite, bebida de iogurte, leite achocolatado, milkshake, gemada, leite de amêndoa, horchata, bebidas alcoólicas, coquetéis — bebidas misturadas, bebidas quentes, por exemplo chocolate quente, sidra quente, cappuccino ou chá de tapioca.

O pão é um alimento fundamental para muitas nações, é feito

com massa fermentada de trigo ou outro cereal, por exemplo, farinha de centeio, pão de torrada (pão branco), integral, pão branco, multigrão, centeio, semente de girassol, semente de abóbora, pizza, chapatis, tortilhas, baguetes, pitas, lavash, biscoitos, pretzels, naan, pão judeu, puris, bolo, pão de centeio integral, pão integral, pão de germe de trigo, integral, pão de farinha *granary* e muitas outras variações.

Bolos e cookies, por exemplo pão-de-ló, bolo de maçã, babka, buccellato, bolo de Bundt, bolo de manteiga, bolo borboleta, bolo de cenoura, queijada, bolo de chocolate, bolo de natal, bolo chiffon, croquembouche, bolinho, bolo de chocolate escuro, bolo de groselha, bolo das fadas, bolo de frutas, bolo de chocolate alemão, bolo génoise, pão de mel, massa, bolo de manteiga, bolo de leite quente, bolo de sorvete, bolos de laranja jaffa, bolo fermentado, torta lunar, panetone, bolo de abacaxi, pound cake, *bolo rainha* Elizabeth, "mizuyokan", bolo veludo vermelho, torta Sacher, bolo de frutas e marzipan, bolo de especiarias, bolo de pão-de-ló, "suncake", bolinhos servidos com chá, "tarte tatin", bolo de mil folhas ou bolo de casamento.

O queijo é um produto de leite coalhado do qual existem muitas variedades, por exemplo, queijo sardo, queijo testouri, queijo bokmakiri, queijo kwaito, queijo wookie, queijo ackawi, queijo basket, labneh, queijo jibneh arabieh, queijo kenafa, queijo naboulsi, queijo paneer, queijo affineur, queijo montanhês, queijo brimsen, queijo dachsteiner, queijo tyrolean grey, queijo luneberg, queijo beauvoorde, queijo brussel's, hervé, queijo limburguer, queijo maredsous, queijo passendale, queijo plateau de herve, queijo postel, queijo remedou, queijo dinamarquês azul, queijo dinamarquês tilsit ou queijo tilsit havarti, queijo allgäu emmental, queijo cambozola, queijo harzer, queijo limburguer, queijo spundekäs, queijo feta, queijo halloumi ou queijo muçarela.

A sobremesa é um prato, em geral doce, e geralmente servido após o prato principal, por exemplo, sorvete, por exemplo, biscoitos ou cookies, bolos, *crumbles*, cremes, frutas, sobremesas de gelatina, sorvetes, meringues, artigos de pastelaria, tortas ou pastéizinhos de fruta, pudins, sorbets, suflês ou bolo com creme.

Batatas fritas, chips, por exemplo, chips de batatas ou "*crisps*",

chips de tortilla ou chips de milho.

O alimento funcional (alimentos funcionais são denominados nutracêuticos, um misto de nutrição e farmacêutico, e pode incluir alimento que foi modificado geneticamente; a categoria geral inclui alimentos processados

5 feitos de ingredientes alimentares funcionais, ou fortificados com aditivos promotores da saúde, como produtos "enriquecidos com vitaminas" e também alimentos frescos (por exemplo, vegetais) que aos quais se ligam reivindicações específicas.

Geléia e gelatina, por exemplo, de groselha, de groselha vermelha, de groselha preta, de frutas cítricas, de maçã, de framboesa, de morango e ou geléia real.

10

Massa, por exemplo, massa moldada, campanelle, casarecci, cavatelli, conchiglie, conchiglioni, farfalle, fiori, fusili, fusili bucati, gemelli, gigli, gramigna, lumache, lumaconi, maltagliati, orecchiette, pipe, quadrefiore,

15 radiatori, ricciolini, rotelle, rotini, spiralini, strozzapreti, torchio ou trofie.

Torta, por exemplo, de torta de bacon e ovos, torta de galinha e cogumelos, torta de carne em conserva, cornish pasty, torta de peixe, kala-kukko, torta de pizza, torta de porco, pastelão de carne, torta escocesa, torta do pastor, torta *stargazy*, torta de stake, torta de steake e rim, torta de maçã,

20 torta de banana e creme, torta de amora preta, torta de vacínio, torta de cereja, torta de creme de chocolate, torta de creme de coco, torta de creme, torta de maçã holandesa, torta de uva, torta de lima branca, torta de limão com merengue, torta de amoras mistas, torta de laranja, torta de pêssego, torta de ruibarbo, torta de morango com ruibarbo, torta de morango ou torta

25 com vinagre.

Pizzas, por exemplo, os tipos clássicos e seus respectivos complementos, incluindo marinara ou napolitana: tomate, azeite de oliva, orégano e alho; marguerita: tomate, azeite de oliva, folhas de manjeriço frescas e muçarela de leite de vaca ou muçarela de leite de búfala; formaggio e pomodoro: tomate, azeite de oliva e queijo parmesão gratinado sendo folhas de

30 manjeriço opcionais; ripieno ou calzone: muçarela de leite de vaca ou muçarela de leite de búfala, às vezes também ricota, azeite de oliva e salame,

outras carnes, vegetais, etc. ou stromboli: muçarela, carne, vegetais, etc.

Carnes processadas, por exemplo carne de anfíbios, rã, carne artificial, imitação de carne, carne *in vitro*, carne bovina, de búfalo, bife, vitela (bezerros), iaque, aves domésticas (pássaros), de galinha, de pato, de pássaros de caça, de peru, canídeos, frutos do mar, peixe, de tubarão, de crustáceos, de caranguejo, de coelho, carne de carneiro, de ovelha, de porco, presunto (lombo), bacon (fatias de carne curada) ou insetos.

Sanduíches, por exemplo, *aram sandwich*, baguete recheada, sanduíche de bacon, pãozinho, hambúguer, burrito, sanduíche de batata frita, club sandwich, sanduíche de queijo grelhado, kebab, "*georgia hots*", misto quente: misto quente com atum, etc., panini, sanduíche de carne, taco, sanduíche para o chá, sanduíche tostado ou enroladinho.

Salada, por exemplo caesar salad, salada do chef, salada cobb, salada grega, salada italiana, salada mesclun, salada niçoise, saladas de grãos tais como salada de vagem, salada sete grãos, salada de galinha, salada de ovos, salada de frutas (frutas cortadas e descascadas servidas nos seus próprios sucos ou com tempero), salada *larb*, salada de macarrão, salada de babata, salada somen, *som tam*, tabule, salada waldorf, *watergate salad*.

Molho, por exemplo molhos brancos, molho de cogumelo, molho allemande, molho americano, molho suprême, molhos elouté Brown (elouté Brown sauces), molho bordelaise, molho chateaubriand, molho africano, molho robert, molho bechamel, molho holandês, maionese, molho tártaro, creme para salada, molho de manteiga, beurre blanc, café de paris, molhos doces, molho de peixe, molho sambal, molho barbecue, mole, molho de tomate ou tzatziki.

Lanches: confeitados, chips de batatas, chocolate, *hardtacks*, doce em barra, comida de baixo valor nutritivo, por exemplo, amendoim cozido, doces em barra, cheetos, "*chex mix*", cookies, bolachas, combinações, rodadas de fudge, *hula hoops*, sorvete, saque do pirata "*moonpies*", *pirate's booty*, pipoca, pele de porco, chips de batatas, pretzels, *smart puffs*, refrigerantes, *snowballs*, "comida de estudante", rocamboles, "*tings*", *twinkies*,

"veggie booty" ou bolos zebra.

Sopas, por exemplo, sopas de sobremesa (*ginataan*, sopa filipina feita com leite de coco, leite, frutas e grãos de tapioca); *oshiruko*, uma sopa japonesa de feijão azuki ou sopas de frutas, sopa de cabaça, sopa de miso, *pho*, *ramen*, *saimin*, sopa de batatas romena, avgolemono, borscht, bouillabaisse, *callaloo*, *cock-a-leekie*, fanesca, gazpacho, sopa de lentilhas, minestrone, sopa mulligatawny, caldo escocês, sopa de ervilha, *solyanka*, *tarator*, *waterzooi*.

Açúcar ou produtos com açúcar, por exemplo, xarope dourado, doces ou chocolates.

logurte, coalhadas, creme amargo, creme batido, por exemplo *lassi*, *kefir*, *ayran*, *doogh* ou *tarator*.

Bebidas em pó ou pastilhas, por exemplo, bebidas de vitaminas ou de minerais.

Cápsulas ou comprimidos.

Alimentos terapêuticos (alimentos terapêuticos são alimentos destinados a fins específicos, em geral nutricionais, terapêuticos), alimentos funcionais, alimentos medicinais, alimentos enterais, alimentos parenterais, alimentos para uso medicinal específico.

Exemplos são Ensure, uma bebida de milkshake destinada primariamente para a alimentação de idosos, e Plumpy'nut, um alimento baseado em amendoim para a alimentação emergencial de crianças gravemente desnutridas.

Em outra modalidade preferida, a formulação da invenção é produzida como medicamento para venda sem receita médica.

A resposta imune-humoral contra o epitopo de carboidrato mencionada é uma resposta dos anticorpos contra o epitopo de carboidrato que pode ser detectada por pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Os testes respectivos também são úteis em conjunto com o método de identificação de um micro-organismocarboidrato positivo apropriado de acordo com a presente invenção.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um teste

de resposta imune-humoral (teste de resposta imune-humoral 1) contra o epitopo de carboidrato compreendendo a testagem da ligação de um anticorpo, de anticorpos no soro, de anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes em um ELISA para compostos tais como proteínas ou peptídeos veículos o epitopo de carboidrato, sendo que a resposta imune-humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior dos anticorpos ao composto carreando um dito epitopo de carboidrato (tal como uma proteína ou peptídeo) do que ao composto mencionado (tal como uma proteína ou peptídeo) sem o epitopo de carboidrato ou ao composto mencionado (por exemplo, uma proteína ou peptídeo) após um tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato. Em uma modalidade preferida, a ligação do anticorpo ou anticorpos mencionado(s) é significativamente maior após a administração do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou de formulações compreendendo os mesmos do que a ligação do anticorpo correspondente, dos anticorpos no soro ou dos anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, ganhos após a administração mencionada.

O tratamento enzimático ou químico mencionado do epitopo de carboidrato destrói a estrutura de carboidrato do epitopo de carboidrato. O tratamento enzimático ou químico mencionado do epitopo de carboidrato pode ser realizado usando-se técnicas conhecidas daqueles versados na técnica tais como, sem se limitar a, tratamento com neuraminidase, sialidase, glicosidase, galactosidase, glicosidase, exoglicosidase, fucosidase, HexNAcase ou ácido periódico (oxidação branda com periodato/tratamento com periodato, como descrito nos exemplos).

Por exemplo, os epitopos de carboidrato Core-1 e Tn são destruídos pelo tratamento com ácido periódico, como descrito nos exemplos.

Um exemplo de uma modalidade preferida do teste de resposta imune-humoral 1 está descrito com detalhe no exemplo 11. O exemplo 11 descreve a testagem da resposta imune-humoral contra o epitopo de carboidrato Core-1 em ELISA contra a asialoglicoforina, uma proteína que carrega o epitopo de carboidrato, contra a glicoforina, que é a mesma proteína, mas

com o Core-1 mascarado pelo ácido siálico e contra a asialoglicoforina tratada com ácido periódico, sendo que o tratamento com ácido periódico destrói a estrutura do Core-1.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um teste de resposta imune-humoral (teste de resposta imune-humoral 2) contra um epitopo de carboidrato compreendendo a testagem da ligação de um anticorpo, dos anticorpos no soro, dos anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, em um ELISA para estruturas de carboidrato conjugadas com poliacrilamida (conjugados PAA), sendo que uma resposta imune-humoral positiva contra um epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior do anticorpo ou dos anticorpos aos conjugados de PAA compreendendo o epitopo de carboidrato do que ao mesmo conjugado de PAA após tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato e/ou uma maior ligação do anticorpo ou dos anticorpos a um conjugado de PAA compreendendo o epitopo de carboidrato em comparação com um conjugado de PAA que não compreende o epitopo de carboidrato, preferivelmente ambos. Em uma modalidade preferida, a ligação do anticorpo ou dos anticorpos mencionados a um conjugado de PAA compreendendo o epitopo de carboidrato é significativamente maior após a administração do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo do que a ligação dos anticorpo correspondente, anticorpos no soro, ou dos anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, ganhos antes da administração mencionada.

Uma modalidade preferida do teste de resposta imune-humoral 2 está descrita em detalha no exemplo 11.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um teste de resposta imune-humoral (teste de resposta imune-humoral 3) contra o epitopo de carboidrato compreendendo a testagem da ligação de um anticorpo, de anticorpos no soro, ou de anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes em um teste por citometria de fluxo para determinar a sua ligação a células compreendendo o epitopo de carboidrato e a células não compreendendo o epitopo de carboidrato, sendo que uma resposta imune-

humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior dos anticorpos a células compreendendo o epitopo de carboidrato do que a células negativas para o o epitopo de carboidrato. Em uma modalidade preferida, a ligação do anticorpo ou dos anticorpos mencionados a células que compreendem o epitopo de carboidrato é significativamente maior após a administração do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou formulações que os compreendem do que a ligação do anticorpo correspondente, dos anticorpos no soro, ou dos anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, ganhos antes da administração. Uma modalidade preferida do teste de resposta imune-humoral 3 é descrita em detalhe no exemplo 11.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um teste de resposta imune-humoral (teste de resposta imune-humoral 4) contra o epitopo de carboidrato compreendendo a testagem da ligação de um anticorpo, de anticorpos no soro, ou de anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, em um teste de imunofluorescência para determinar a sua ligação a células compreendendo o epitopo de carboidrato e a células negativas para o epitopo de carboidrato, sendo que uma resposta imune-humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior do anticorpo ou dos anticorpos a células compreendendo o epitopo de carboidrato do que a células não compreendendo o epitopo de carboidrato e/ou a células compreendendo o epitopo de carboidrato após tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato. Em uma modalidade preferida, a ligação a células compreendendo o epitopo de carboidrato é significativamente maior após administração do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou de formulações compreendendo os mesmos do que a ligação do anticorpo correspondente, dos anticorpos no soro, ou dos anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, ganhos antes da administração mencionada. O teste de imunofluorescência pode ser tornado mais quantitativo mediante diluições séricas dos antissoros e/ou mediante fotografias feitas em condições de exposição idênticas.

Aqueles versados na técnica são capazes de identificar moléculas veículo apropriadas e de acoplar estruturas apropriadas para obter a estrutura de carboidrato adequada acoplada às moléculas veículo com ou sem reticulador. Aqueles versados na técnica são capazes também de selecionar as células ou antígenos com ou sem tratamento enzimático ou químico e de selecionar e modificar os métodos apropriados para testar a resposta imune-humoral ao epitopo de carboidrato. Entretanto, os testes de resposta imune-humoral 1 a 4 supramencionados e especialmente as combinações preferidas dos mesmos proporcionadas pela presente invenção são claramente preferíveis e possuem claras vantagens no que diz respeito à especificidade como também é deixado claro pelos exemplos.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um teste de resposta imune-humoral (teste de resposta imune-humoral 5) contra o epitopo de carboidrato compreendendo

a) incubação de uma quantidade adequada de células compreendendo o epitopo de carboidrato marcadas com uma quantidade adequada de um marcador tal como o európio ou o cromo 51, com uma quantidade adequada de um anticorpo, de anticorpos em soro, ou de anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, com uma quantidade adequada de complemento por um período adequado (normalmente entre 3 a 5 horas ou durante a noite);

b) medição da lise celular pela determinação da liberação do marcador tal como o európio ou o cromo 51 após incubação sob (a) sendo que uma resposta imune-humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma lise significativamente maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que de células não compreendendo o epitopo de carboidrato e/ou ela mostra uma lise maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que uma lise sem complemento e/ou uma lise sem o anticorpo e/ou uma lise com um anticorpo ou anticorpos que não se ligam ou que se ligam menos a células compreendendo o epitopo de carboidrato.

O teste de resposta imune-humoral 5 mencionado testa a citotoxicidade complemento-dependente (CDC) específica para o carboidrato,

um mecanismo efetor mediado por certos anticorpos, da resposta imune-humoral induzida ou anticorpos carboidrato-específicos em um teste de lise de células-alvo. O teste compreende a incubação de uma quantidade adequada de células compreendendo o epítipo de carboidrato marcadas com uma quantidade apropriada de um marcador tal como o európio ou o cromo 51 com uma quantidade adequada de um anticorpo, ou de anticorpos no soro, ou de anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, com uma quantidade adequada de complemento por um período apropriado (normalmente entre 3 a 5 horas ou durante a noite). As células compreendendo o epítipo de carboidrato são marcadas com o marcador mencionado, tal como o európio ou o cromo 51, o que permite a medida das células que são lisadas. A quantidade de células lisadas é determinada preferivelmente pela medição da liberação do marcador (por exemplo, európio ou cromo 51) após a incubação. Um controle adequado pode ser determinado por aqueles versados na técnica tal como células carboidrato-negativas, um anticorpo ou uma mistura de anticorpos que não se liguem à célula-alvo e/ou sem complemento. O teste pode ser otimizado no que diz respeito às quantidades adequadas de anticorpos, número de células tumorais marcadas, concentração do complemento e tempo de incubação por aqueles versados na técnica para o seu uso na invenção e como descrito.

A citotoxicidade complemento-dependente (CDC) da invenção é determinada preferivelmente usando-se uma análise de liberação de európio. As células-alvo são incubadas por 10 minutos a 4°C em 800 µl de tampão de európio (50 mM de HEPES, pH 7,4, 93 mM de NaCl, 5mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de ácido dietilenotriamina penta-acético, 2 mM de acetato de európio (III), eletroporadas (710 V, 1 pulso, 30 µs) em um multiporador (Eppendorf) e subsequentemente incubadas em gelo por outros 10 minutos. Em seguida, as células são lavadas 5 vezes em RPMI/SFB a 5% e semeadas em uma placa de fundo redondo com 96 cavidades (Nunc; 5 x 10³/cavidade). Após a adição de 20 µl de solução contendo anticorpos em várias diluições dos controles correspondentes (meio, IgM humana de controle de isótipo), as amostras são incubadas por 20 minutos a temperatura

ambiente. 10 µl de complemento diluído a 1:10 (complemento Baby rabbit) são adicionados aos cavidades correspondentes. Nas cavidades de controle, 10 µl de RPMI/SFB a 5% são acrescentados em vez da solução de complemento. Para determinação da liberação espontânea, as células-alvo são incubadas apenas com meio e a liberação máxima é determinada pela lise completa do alvo com etanol. Após incubação a 37°C por 4 horas, a placa é centrifugada a 500 x g por 5 minutos e 20 µl de sobrenadante livre de células de cada placa são pipetados em 200 µl por cavidade de solução intensificadora (Perkin-Elmer Wallac) na placa de fundo chato previamente preparada (Nunc-Immunoplate Maxisorp). Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, a fluorescência é determinada (fluorômetro Victor², Perkin-Elmer Wallac). A citotoxicidade específica é obtida mediante a equação (lise experimental – lise espontânea) / (lise máxima – lise espontânea) x 100%.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um teste de resposta imune-humoral (teste de resposta humoral 6) contra o epitopo de carboidrato compreendendo

a) incubação de uma quantidade apropriada de células compreendendo o epitopo de carboidrato e/ou de células não compreendendo o epitopo de carboidrato marcadas com uma quantidade apropriada de um marcador tal como európio ou cromo 51, com uma quantidade apropriada de um anticorpo, de anticorpos no soro, ou de anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, com uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula imuneefetora ou mistura de células compreendendo células imunes efetoras ou células mononucleares do sangue periférico por um tempo adequado, normalmente entre 3 a 5 horas ou durante a noite, e

b) medição da lise das células pela determinação da liberação do marcador tal como európio ou cromo 51 após incubação sob (a) sendo que uma resposta imune-humoral contra o epitopo de carboidrato mostra uma lise significativamente maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que de células negativas para o epitopo de carboidrato do que uma lise sem o anticorpo e/ou do que uma lise com um anticorpo ou anticorpos que não se ligam ou que se ligam menos a células compreen-

dendo o epitopo de carboidrato.

O teste de resposta imune-humoral 6 mencionado testa a citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC), um mecanismo efetor mediado por certos anticorpos, da resposta imune-humoral induzida ou os anticorpos específicos para o epitopo de carboidrato em um teste da lise das células-alvo em combinação com células imunes efetoras. O teste compreende a incubação de quantidades adequadas de células-alvo positivas para o epitopo de carboidrato marcadas com quantidades adequadas de anticorpos em soro ou anticorpos ganhos do soro ou de um anticorpo para o epitopo de carboidrato isolado com quantidades adequadas de células imunes efetoras tais como aquelas presentes nas PBMC (células mononucleares do sangue periférico) por um período adequado, normalmente entre 3 a 5 horas ou durante a noite. As células compreendendo o epitopo de carboidrato são marcadas com európio ou cromo 51, o que permite a medição das células que são lisadas. A quantidade de células lisadas é determinada preferivelmente pela medição da liberação de európio ou cromo 51 após a incubação. Um controle adequado pode ser determinado por aqueles versados na técnica, tal como células negativas para o epitopo de carboidrato, um anticorpo ou uma mistura de anticorpos que não se ligue à célula-alvo e/ou sem células imunes efetoras (por exemplo, PBMCs). O teste pode ser otimizado para uso nesta invenção no que diz respeito às quantidades apropriadas de anticorpos, números de células tumorais marcadas, números de células imunes efetoras e tempo de incubação por aqueles versados na técnica.

A citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC) da invenção é preferencialmente determinada usando-se uma análise de liberação de európio. As células-alvo são incubadas por 10 minutos a 4°C em 800 µl de tampão de európio (50 mM de HEPES, pH 7,4, 93 mM de NaCl, 5mM de KCl, 2 mM de MgCL₂, 10 mM de ácido dietilenotriamina penta-acético, 2 mM de acetato de európio (III), eletroporadas (710 V, 1 pulso, 30 µs) em um multiporador (Eppendorf) e subsequentemente incubadas em gelo por outros 10 minutos. Em seguida, as células são lavadas 5 vezes em RPMI/FCD a 5% e semeadas em placa de fundo redondo com 96 cavidades (Nunc; 5 x

10³/cavidade). Após adição de 20 µl de anticorpos específicos para o Core-1 em concentrações variadas (concentração final de 0,05 a 50 µg/ml em 200 µl de volume de incubação) ou dos controles correspondentes (meio, IgG de controle de isótipo), PBMCs (células mononucleares do sangue periférico, 80 µl) são adicionadas como células efetoras usando-se diferentes proporções células efetoras/células-alvo entre 100:1 e 10:1, preferencialmente de 50:1. Para determinar a liberação espontânea, 80 µl de RPMI/FCS a 5% sem células efetoras são adicionados. A liberação máxima é determinada após lise completa das células-alvo com etanol.

10 Após incubação a 37°C por 4 horas, a placa é centrifugada a 500 x g por 5 minutos e 20 µl de sobrenadante livre de células de cada placa são pipetados em 200 µl por cavidade de solução intensificadora (Perkin-Elmer Wallac) na placa de fundo chato previamente preparada (Nunc-Immunoplate Maxisorp). Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, a fluorescência é determinada (fluorômetro Victor², Perkin-Elmer Wallac). A citotoxicidade específica é obtida mediante a equação (lise experimental – lise espontânea) / (lise máxima – lise espontânea) x 100%.

Em uma modalidade preferida, os testes de resposta imune-humoral 1 a 6 compreendem ainda, antes do teste,

- 20 a. administração do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração ou lisado do mesmo ou de formulações compreendendo os mesmos a um ser humano ou animal;
- b. isolamento do anticorpo, dos anticorpos no soro ou dos anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes.

25 Em uma modalidade preferida adicional da invenção, um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração ou lisado do mesmo induz uma resposta imune-humoral contra o epitopo de carboidrato que é positiva para pelo menos dois testes de resposta imune-humoral dentre os testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e, mais preferivelmente, positivo para os testes de resposta imune-humoral 1 e 3 e, mais preferivelmente, para os testes de resposta imune-humoral 1, 2 e 3 e, mais preferivelmente, para os tes-

tes de resposta imune-humoral 1, 2, 3 e 4 e, mais preferivelmente, para os testes de resposta imune-humoral 1, 2, 3, 4 e 6 e, ainda mais preferivelmente, para os testes de resposta imune-humoral 1, 2, 3, 4 e 5 e, da maneira mais preferível, positivo para todos os 6 testes de resposta imune-humoral.

5 Também são proporcionados testes de resposta imunocelular. A resposta imunocelular mencionada contra o epitopo de carboidrato é uma resposta das células T contra o epitopo de carboidrato que pode ser detectada por pelo menos um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5. Mais preferivelmente, ela é uma resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato que é uma resposta citotóxica das células T ou uma resposta das células T auxiliares de tipo Th1 contra o epitopo de carboidrato. Mais preferivelmente, ela é uma resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato que é uma resposta citotóxica das células T e uma resposta das células T auxiliares de tipo Th1 contra o epitopo de carboidrato que pode ser detectada pelos testes de resposta imunocelular 1, 2, 3, 4 e 5. Os testes mencionados também podem ser usados em conjunto com os métodos de identificação de um micro-organismo carboidrato positivo adequados descritos aqui de maneira a se testar/analisar quais micro-organismos carboidrato positivos são também capazes de disparar uma resposta imunocelular.

20 Os testes de resposta imunocelular mencionados compreendem a colocação em contato entre células dendríticas carregadas com um micro-organismo carboidrato positivo junto com células imunes e cultivo por períodos apropriados e sob condições apropriadas e subsequente adição, para fins de re-estimulação, de células dendríticas carregadas com pelo menos uma molécula veículo do epitopo de carboidrato e cultivo por períodos apropriados e sob condições apropriadas e subsequente medição da quantidade de GM-CSF, TNF-alfa ou INF-gama secretados, ou da medição da proliferação das células T, ou da inibição da secreção de GM-CSF, TNF-alfa ou INF-gama, ou da proliferação por anticorpos contra o epitopo de carboidrato, ou a medição da apresentação do epitopo de carboidrato nas células dendríticas ou a medição da lise das células positivas para o epitopo de carboidrato pelas células imunes ativadas, preferencialmente células T ativadas.

As células dendríticas mencionadas, aqui também denominadas DCs, podem ser qualquer célula dendrítica ou uma mistura de células dendríticas ou uma mistura compreendendo células dendríticas ou pelo menos uma célula dendrítica. Elas podem derivar de doadores humanos saudáveis ou que têm uma doença tal como, sem limitação a, uma doença tumoral, ou a doença de Crohn, ou uma doença positiva para o epítipo de carboidrato ou uma das doenças listadas em outra parte deste, ou podem derivar de animais. As DCs mencionadas podem ser obtidas e carregadas como conhecido daqueles versados na técnica e são normalmente obtidas de células precursoras CD34 ou células monocíticas CD14-positivas do sangue humano ou da medula óssea diferenciadas em células dendríticas imaturas (iDC) usando-se determinada combinação de moléculas apropriadas conhecidas daqueles versados na técnica. As iDCs são carregadas com o micro-organismo carboidrato-positivo ou com a molécula veículo do epítipo de carboidrato, ou com os controles apropriados e são adicionalmente amadurecidas usando-se determinada combinação de moléculas apropriadas conhecidas daqueles versados na técnica para a obtenção de células dendríticas carregadas correspondentes a células dendríticas maduras carregadas (MDCs) capazes de ativar células T. Essas DCs podem também ser do tipo Langerhans.

Em uma modalidade preferida, as DCs mencionadas se originam de uma linhagem de células dendríticas tal como, sem limitação a, a linhagem de células dendríticas humanas NEMOD-DC (obtenível da Glycotope GmbH, Berlim, Alemanha; www.glycotope.com) ou MUTZ-3.

O carregamento das células dendríticas mencionado significa que as células dendríticas são incubadas no estado apropriado de diferenciação e maturação com quantidades apropriadas de um micro-organismo carboidrato-positivo, ou frações ou lisados do mesmo ou pelo menos uma molécula veículo do epítipo de carboidrato por um período apropriado; normalmente isso ocorre durante a etapa de amadurecimento descrita acima em combinação com moléculas adequadas, normalmente por 24 a 48 horas, o que leva a células dendríticas carregadas capazes de ativar células imu-

nes, preferivelmente células T, compreendendo células T carboidrato-específicas.

AS células imunes mencionadas podem ser PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) ou outras populações celulares compreendendo células T CD4+ e/ou CD8+, preferivelmente células T CD4+ e CD8+. Aqueles versados na técnica sabem como obter essas células de um ser humano ou um animal e a geração dessas células pode compreender preparações por gradiente de ficoll do sangue humano ou de células sanguíneas de leucaférese e podem compreender no caso enriquecimento posterior por tecnologias de seleção magnética específicas para células T.

Em uma modalidade preferida, as células dendríticas são combinadas em pelo menos uma molécula de MHC com as células imunes, preferivelmente em uma molécula de MHC de classe I ou molécula de MHC de classe II, mais preferivelmente em pelo menos uma molécula de MHC de classe I molécula de MHC de classe II, mais preferivelmente em mais moléculas de MHC e de maneira mais preferível em todas as moléculas de MHC. Essa última condição pode ser alcançada mediante obtenção das células dendríticas e das células imunes do mesmo indivíduo.

Os períodos e condições apropriados mencionados para o cultivo das células imunes com as células dendríticas carregadas e para a subsequente adição das células dendríticas carregadas são conhecidos daqueles versados na técnica e podem ser otimizados pela consideração das condições nas quais as células se encontram. Normalmente, o tempo de incubação é de 7 a 10 dias para cada uma das duas etapas (ativação primária e re-estimulação).

A molécula veículo do epitopo de carboidrato mencionada, no sentido dos testes de resposta imunocelular descritos, significa quantidades suficientes de uma célula ou célula tumoral veículo do epitopo de carboidrato, uma proteína veículo do epitopo de carboidrato, ou um polipeptídeo veículo do epitopo de carboidrato. A célula ou célula tumoral mencionada veículo do epitopo de carboidrato pode estar viva ou morta, ou ser um lisado dessas células ou uma fração das mesmas, mais preferivelmente um lisado.

Uma proteína veículo do epitopo de carboidrato pode ser qualquer proteína veículo do epitopo de carboidrato, tal como proteínas carregadoras nas quais o epitopo de carboidrato se liga em tumores. Um polipeptídeo veículo do epitopo de carboidrato pode ser qualquer polipeptídeo veículo do epitopo de carboidrato, preferivelmente aqueles que podem ser apresentados com epitopo de carboidrato na CDm.

O micro-organismo carboidrato-positivo mencionado no sentido dos testes de resposta imunocelular descritos significa quantidades suficientes do micro-organismo carboidrato-positivo particular que pode estar vivo ou morto, ou ser um lisado daquelas células ou fração das mesmas, mais preferivelmente um lisado ou fração das mesmas.

Controles são usados para confirmar adicionalmente a positividade da resposta imune. Aqueles versados na técnica são capazes de usar controles apropriados tais como aqueles descritos em maior detalhe abaixo e no **exemplo 12**. Exemplos são o uso de controles que são carregados nas DCs como descrito para as moléculas veículo do epitopo de carboidrato e usados para re-estimulação e que podem compreender (i) células que são negativas para o epitopo de carboidrato ou que não o compreendem, preferivelmente aquelas que estão relacionadas com ou se assemelham tanto quanto possível às células positivas para o epitopo de carboidrato, no formato correspondente tal como vivas ou mortas, ou um lisado daquelas células ou uma fração das mesmas; (ii) uma proteína não veículo do epitopo de carboidrato, preferivelmente a mesma proteína que aquela usada como a molécula veículo do epitopo de carboidrato, mas sem o epitopo de carboidrato, preferivelmente sem qualquer glicosilação ou com uma estrutura de carboidrato alongada ou encurtada não compreendendo o epitopo de carboidrato, (iii) um polipeptídeo não veículo do epitopo de carboidrato, preferivelmente o mesmo polipeptídeo que aquele usado como a molécula veículo do epitopo de carboidrato, mas sem o epitopo de carboidrato, preferivelmente sem qualquer glicosilação ou com uma estrutura de carboidrato alongada ou encurtada não compreendendo o epitopo de carboidrato. Controles adicionais podem ser (iv) MDCs não carregadas tratadas da mesma maneira que

MDCs carregadas com as moléculas veículo do epitopo de carboidrato incluindo as moléculas necessárias e condições de maturação mas sem qualquer molécula adicional correspondendo à molécula veículo do epitopo de carboidrato ou aos controles supramencionados (i-iii). Os exemplos e as modalidades preferidas descrevem em detalhe os controles mais adequados, enquanto outros mais adequados podem ser selecionados por aqueles versados na técnica.

Em uma modalidade preferida da invenção, as células dendríticas são células dendríticas funcionais obtidas da linhagem celular da leucemia MUTZ-3 [como descrito em DE10139428 A1, WO2003/023023 A1, EP01419240, US20040265998, CA2457287, 10139428.4 (DE), PCT/EP02/09260, 02758474.7 (EP), US10/486.966, CA2.547.287)] ou células derivadas da MUTZ-3 tais como NEMOD-DC (por exemplo, NMD-100 ou NMD-200 obteníveis da Glycotope GmbH, Berlim, Alemanha [www.glycotope.com]). Essas células dendríticas são células dendríticas ativas plenamente capazes de ativar células T e processar e/ou apresentar antígenos em sua superfície, incluindo em moléculas de classe MHC. Em uma modalidade preferida adicional da invenção, as células dendríticas são células dendríticas funcionais obtidas da MUTZ-3 ou células derivadas da MUTZ-3, tais como NMD-100 ou NMD-200 e as células imunes são combinadas na molécula de MHC de classe I tal como HLA-A2 ou HLA-B44, preferivelmente HLA-A2 e HLA-B44. Em uma modalidade preferida adicional, um lisado de células compreendendo o epitopo de carboidrato é usado como molécula veículo do epitopo de carboidrato.

Devido a variações de experimento a experimento, algo particularmente comum no caso de métodos imunológicos celulares conhecidos daqueles versados na técnica, os controles precisam ser determinados em paralelo ao teste, como é de conhecimento daqueles versados na técnica.

De acordo com uma modalidade, a invenção proporciona um teste *in vitro* da resposta imunocelular contra um epitopo de carboidrato de interesse compreendendo

a) o carregamento de pelo menos uma célula dendrítica com um

primeiro composto carboidrato-positivo, sendo que tal composto carboidrato-positivo carrega o epítipo de carboidrato de interesse;

b) a colocação em contato entre uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica mencionada carregada com o composto carboidrato-positivo mencionado com uma quantidade apropriada de células imunes que podem ser ativadas ou inibidas por uma célula dendrítica;

c) o cultivo de maneira a permitir a interação de tais células imunes com as células dendríticas carregadas mencionadas;

d) a adição de uma quantidade apropriada de células apresentadoras de antígenos (APCs) carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos um segundo composto carregando o mesmo epítipo de carboidrato que o primeiro composto mencionado, sendo que o segundo composto mencionado é diferente do primeiro composto carboidrato-positivo mencionado;

e) cultivo para re-estimulação das células imunes mencionadas;

f) determinação da quantidade de células imunes re-estimuladas.

A invenção proporciona um método para determinar se certo epítipo de carboidrato é capaz de disparar uma resposta imunocelular. Até agora, a técnica anterior assumia que carboidratos são incapazes de disparar respostas imunes celulares. Entretanto, descobriu-se agora que certos epítipos de carboidrato são capazes de disparar uma resposta imunocelular. É, assim, importante proporcionar sistemas de teste para determinar se um determinado epítipo de carboidrato é de fato capaz de disparar uma resposta correspondente, determinando assim se tal epítipo de carboidrato é um ponto de atuação adequado, por exemplo para terapia. A invenção usa, assim, células dendríticas uma vez que as células dendríticas são capazes de iniciar e, dessa maneira, estimular células imunes tais como células T. As células dendríticas processam os compostos que encontram e apresentam os compostos/antígenos processados em sua superfície. Entretanto, células de MHC tais como as células dendríticas podem apresentar apenas certos tipos de antígenos e é importante determinar se o o antígeno/epítipo de inte-

resse pode ser apresentado por células dendríticas, uma vez que apenas tais antígenos/epitopos são capazes de disparar uma resposta imunocelular. Os princípios desse teste de resposta imunocelular também estão ilustrados na Figura 22.

5 As células dendríticas são, portanto, carregadas com o composto de interesse que se acredita carregar ou carrega a estrutura de carboidrato/epitopo de interesse. O composto mencionado pode, por exemplo, ser um micro-organismo que carrega o epitopo de carboidrato de interesse como aqui descrito, uma célula tumoral ou qualquer outro composto que carrega o
10 epitopo de carboidrato de interesse. Condições adequadas para o carregamento e compostos adequados veículos das estruturas de carboidrato são descritos aqui.

 As células dendríticas carregadas mencionadas são então postas em contato com células imunes, particularmente linfócitos como as células T. As células imunes podem ser obtidas, por exemplo, de doadores humanos. Células dendríticas apresentadoras de antígenos que combinam
15 com os receptores das células imunes ativam e assim estimulam os linfócitos, permitindo, dessa maneira, que estes proliferem e sobrevivam. Os linfócitos que não combinam com os antígenos apresentados pelas células dendríticas não são ativados e morrem.
20

 A primeira rodada de estimulação proporciona linfócitos ativados específicos para qualquer antígeno correspondente apresentado por tais células dendríticas carregadas. Contudo, o objetivo do presente método é identificar se o epitopo de carboidrato/antígeno de interesse pode estimular
25 uma resposta celular.

 Portanto, uma etapa de seleção é realizada na qual os linfócitos são re-estimulados de maneira a se determinar se o carboidrato de interesse estimula os linfócitos e, assim, dispara uma resposta celular. Na etapa de seleção mencionada, células apresentadoras de antígenos tais como, por
30 exemplo, células dendríticas, são carregadas com um segundo composto que também carrega o carboidrato de interesse. Tal segundo composto, contudo, é diferente do primeiro composto. Este segundo composto também é

processado pelas APCs e os antígenos são apresentados por tais APCs. À medida que o segundo composto é diferente do primeiro composto, a maior parte dos antígenos apresentados, preferivelmente todos os antígenos — além do epitopo de carboidrato de interesse — são diferentes dos antígenos apresentados na primeira rodada. Isso tem o efeito de fazer com que sobrevivam à segunda rodada de re-estimulação apenas aqueles linfócitos que encontram um antígeno correspondente apresentado pelas APCs mencionadas. Caso as células dendríticas da primeira rodada assim como as APCs da segunda rodada apresentem ambas um antígeno compreendendo ou consistindo no epitopo de carboidrato de interesse, os linfócitos que reconhecem tal antígeno são estimulados e, assim, sobrevivem, à medida que são também re-estimulados. Os linfócitos que não encontram um parceiro correspondente quando em contato com as APCs mencionadas carregadas com o segundo composto mencionado que carrega o epitopo de carboidrato de interesse morrem devido à falta de re-estimulação. Essa etapa de seleção garante que uma resposta celular contra o carboidrato de interesse seja detectada.

Na última etapa, determina-se se os linfócitos foram de fato re-estimulados. Isso pode ser feito, por exemplo, determinando-se

- os produtos de secreção dos linfócitos que são secretados quando tais linfócitos são (re)estimulados, tais como interferon-alfa, interferon-gama ou GM-CSF

- a proliferação das células T.

Testes adequados para se determinar a ocorrência da re-estimulação são descritos aqui.

A especificidade do teste mencionado pode ser aumentada usando-se uma estrutura de ligação a carboidrato que reconheça especificamente tal epitopo de carboidrato de interesse quando apresentada pelas células dendríticas/APCs. De acordo com tal modalidade, pelo menos uma porção de tais linfócitos estimulados de acordo com a etapa c) são postos em contato com uma quantidade apropriada de células apresentadoras de antígeno (APCs) carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos

um segundo composto veículo do mesmo epítipo de carboidrato que o primeiro composto, sendo que tal segundo composto é diferente do composto carboidrato-positivo mencionado, na presença de uma molécula de ligação carboidrato que reconheça o epítipo de carboidrato de interesse. A molécula de ligação carboidrato mencionada que reconhece o epítipo de carboidrato de interesse mencionado bloqueia a interação das APCs com os linfócitos mencionados, impedindo assim a re-estimulação e, conseqüentemente, a sobrevivência das células. Essa etapa adicional garante adicionalmente que o carboidrato de interesse estimule os linfócitos de maneira específica e desapare, assim, uma resposta imunocelular específica. Essa etapa de aumento/confirmação da especificidade pode ser feita seja em paralelo — dividindo-se os linfócitos estimulados de acordo com a etapa c — ou realizando-se tal etapa de aumento/confirmação adicionalmente e, portanto, posteriormente.

De acordo com uma primeira modalidade (teste de resposta imunocelular 1) a quantidade/grau de linfócitos re-estimulados é determinada pela medição da secreção de GM-CSF. Por exemplo, a quantidade de GM-CSF secretada pode ser medida por ELISA ou ELISPOT.

De acordo com uma modalidade preferida, um teste de resposta imunocelular (modalidade de um teste de resposta imunocelular 1) contra o epítipo de carboidrato é proporcionado que compreende

a) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de células dendríticas compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, carregadas com uma quantidade adequada do micro-organismo carboidrato-positivo, um lisado ou fração do mesmo, formulações compreendendo os mesmos, o nutracêutico ou a composição farmacêutica da invenção junto com uma quantidade apropriada de células imunes compreendendo pelo menos uma célula imune, célula T CD4+, célula T CD8+, uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T ou células mononucleares do sangue periférico, que podem ser ativadas ou inibidas por uma célula dendrítica

b) cultivo por um período apropriado e sob condições apropriadas

c) adição de uma quantidade apropriada de células dendríticas compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, células dendríticas ou
5 uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica carregada com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epitopo de carboidrato

d) cultivo por um período apropriado e sob condições apropriadas para re-estimulação

10 e) medição da quantidade secretada de GM-CSF por ELISA ou ELISPOT, sendo que uma resposta imunocelular positiva contra o epitopo de carboidrato mostra (i) uma secreção significativamente maior de GM-CSF pelas células imunes re-estimuladas mencionadas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma molécula veículo do epitopo de car-
15 boidrato do que a secreção de GM-CSF pelas células imunes correspondentes re-estimuladas com células dendríticas não carregadas correspondentes e/ou maior do que a secreção de GM-CSF pelas células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com uma molécula que não carrega ou compreende o epitopo de car-
20 boidrato e/ou (ii) uma secreção de GM-CSF pelas células imunes mencionadas re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma proteína, peptídeo ou molécula que carrega ou compreende o epitopo de carboidrato significativamente maior do que a secreção de GM-CSF pelas células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas
25 correspondentes carregadas com a proteína, peptídeo ou molécula correspondente que não carrega ou compreende o epitopo de carboidrato, e/ou (iii) uma secreção de GM-CSF pelas células imunes re-estimuladas mencionadas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma proteína, peptídeo ou molécula que carrega ou compreende o epitopo de carboidrato
30 significativamente maior do que a secreção de GM-CSF das células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com a proteína, peptídeo ou molécula correspondente que car-

rega ou compreende o epitopo de carboidrato mas quimicamente ou enzimaticamente tratadas para a destruição do epitopo de carboidrato, e/ou (iv) uma secreção de GM-CSF pelas células imunes mencionadas re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com um lisado ou frações de células compreendendo o epitopo de carboidrato significativamente maior do que a secreção de GM-CSF pelas células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com uma lisado de células negativas para o epitopo de carboidrato ou não o compreendendo.

10 "Células imunes correspondentes" significa que as mesmas células imunes, que são ou compreendem pelo menos uma célula imune, célula T CD4+, célula T CD8+, uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T, ou células mononucleares do sangue periférico ou outras células e misturas de células descritas em outra parte, que podem ser ativas ou inibidas por uma célula dendrítica, são usadas como controle ou teste comparativo com uma molécula de controle ou de teste, ou mistura de moléculas, células, lisados ou frações de células, micro-organismo ou frações do mesmo, do que aquelas que são usadas no lugar das células imunes mencionadas de maneira a permitir uma comparação.

20 "Células dendríticas correspondentes" significa que as mesmas células dendríticas que são ou compreendem pelo menos uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica ou outras células e misturas de células descritas em outra parte, são capazes de ativar células T carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epitopo de carboidrato, são usadas para o controle ou teste comparativo com uma molécula de teste ou controle, mistura de moléculas, células, lisados de células ou frações, micro-organismo ou frações do mesmo ou sem qualquer, que aquelas usadas como células dendríticas de maneira a permitir uma comparação.

30 Isso é conhecido daqueles versados na técnica e elas podem ser selecionadas por aqueles versados na técnica. Isso é mostrado em mai-

or detalhe nos exemplos. Para esclarecer: por exemplo, a mesma quantidade de células imunes da mesma preparação é colocada em contato com a mesma quantidade de células dendríticas da mesma preparação carregadas com a mesma quantidade de asialoglicoforina e em paralelo com a mesma
5 quantidade de glicoforina ou asialoglicoforina tratada com periodato e usada no teste para permitir condições ótimas de comparabilidade.

Variações são conhecidas daqueles versados na técnica e podem ser determinadas por eles ou estão descritas em maior detalhe nos exemplos.

10 O teste de resposta imunocelular 1 mencionado testa a ativação de células T CD4+ e/ou CD8+ específicas para o epítipo de carboidrato por um micro-organismo carboidrato-positivo pela medição da secreção específica induzida de GM-CSF compreendendo: colocação em contato entre células dendríticas carregadas com um micro-organismo carboidrato-positivo,
15 lisado ou fração do mesmo e células imune e cultivo por períodos apropriados em condições apropriadas e subsequente adição de células dendríticas carregadas com uma molécula veículo do epítipo de carboidrato para re-estimulação e cultivo por períodos apropriados em condições apropriadas e subsequente medição da quantidade de GM-CSF secretada em resposta a
20 esta re-estimulação. A medição mencionada da quantidade de GM-CSF secretada é realizada preferivelmente mediante ELISA ou ELISPOT, mais preferivelmente ELISA, e é conhecida daqueles versados na técnica. Na modalidade mais preferida da invenção, o teste de resposta imunocelular 1 compreende a colocação em contato entre células dendríticas funcionais obtidas
25 de células derivadas da MUTZ-3, NMD-100 ou NMD-200 carregadas com um micro-organismo carboidrato-positivo junto com PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) combinadas pelo menos no MHC de classe I (HLA-A2) e (HLA-B44) e cultivo dessas células por tempos apropriados e em condições apropriadas, normalmente de 7 a 10 dias, e subsequente adição
30 para re-estimulação de células dendríticas obtidas de células derivadas da MUTZ-3 carregadas com lisado de células compreendendo o epítipo de carboidrato, ou com uma molécula veículo do carboidrato e cultivo por perío-

dos apropriados em condições apropriadas, normalmente de 7 a 9 dias, e subsequente medição da quantidade de GM-CSF secretada em uma análise ELISA ou ELISPOT. A análise ELISA e ELISPOT da liberação de GM-CSF são conhecidas daqueles versados na técnica e estão descritas em detalhe nos exemplos. Uma resposta imunocelular positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma secreção de GM-CSF mais alta pelas células imunes re-estimuladas com DCs carregadas com um lisado de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que a secreção das células imunes re-estimuladas com DCs carregadas com um lisado de células negativas para o epitopo de carboidrato e/ou mostra uma secreção de GM-CSF maior pelas células imunes re-estimuladas com DCs carregadas com uma molécula veículo do epitopo de carboidrato do que as células imunes re-estimuladas com DCs carregadas com uma molécula negativa para o epitopo de carboidrato. Uma modalidade preferida do teste de resposta imunocelular 1 está descrita em detalhe no exemplo 12.

De acordo com uma segunda modalidade (teste de resposta imunocelular 2) a quantidade/grau de linfócitos re-estimulados é determinada pela medição da quantidade de secreção de INF-gama ou TNF-alfa. Em uma modalidade preferida, o teste de resposta imunocelular 2 mencionado contra o epitopo de carboidrato compreende

a) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de células dendríticas compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, carregadas com uma quantidade apropriada do microorganismo carboidrato-positivo, um lisado ou uma fração do mesmo, formulações que os compreendem, o nutracêutico ou a composição farmacêutica da invenção junto com uma quantidade adequada de células imunes compreendendo pelo menos uma célula imune, célula T CD4+, célula CD8+, uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T, ou células mononucleares do sangue periférico, que podem ser ativadas ou inibidas por uma célula dendrítica.

b) cultivo por um período apropriado e sob condições apropria-

das

c) adição de uma quantidade apropriada de células dendríticas compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epitopo de carboidrato

d) cultivo por um período apropriado e sob condições apropriadas para re-estimulação e

e) medição da quantidade de INF-gama e/ou TNF-alfa secretada por ELISA ou ELISPOT, sendo que uma resposta imunocelular positiva contra o epitopo de carboidrato mostra (i) secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma molécula que carrega ou compreende o epitopo de carboidrato significativamente maior do que a secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes mencionadas não carregadas e/ou uma secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes mencionadas re-estimuladas com células dendríticas mencionadas carregadas com uma molécula que carrega ou compreende o epitopo de carboidrato maior do que a secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com uma molécula que não carrega ou não compreende o epitopo de carboidrato e/ou (ii) uma secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes mencionadas re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma proteína, um peptídeo, uma molécula que carrega ou compreende o epitopo de carboidrato significativamente maior do que a secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com proteína, peptídeo ou molécula correspondente que não carrega ou compreende o epitopo de carboidrato e/ou (iii) uma secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma proteína, peptídeo ou molécula que car-

rega ou compreende o epítipo de carboidrato significativamente maior do que a secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa das células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com a correspondente proteína, peptídeo ou molécula que carrega ou

5 compreende o epítipo de carboidrato mas enzimaticamente ou quimicamente tratada para a destruição do epítipo de carboidrato e/ou (iv) uma secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa pelas células imunes re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com um lisado ou frações de células compreendendo o epítipo de carboidrato significativamente maior

10 do que a secreção de INF-gama e/ou TNF-alfa das células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com um lisado de células negativo para o epítipo de carboidrato ou que não o compreendem.

O teste de resposta imunocelular 2 mencionado testa a ativação

15 de células T citotóxicas tais como os CTLs (linfócitos T citotóxicos) e/ou células T auxiliares de tipo Th1 para células T citotóxicas ativadas epítipo-específicas por um micro-organismo carboidrato-positivo. A medição mencionada da quantidade de IFN-gama e/ou TNF-alfa secretada é feita preferivelmente por ELISA ou ELISPOT, mais preferencialmente ELISPOT e é conhecida daqueles versados na técnica. Na modalidade mais preferida da

20 invenção, o teste de resposta imunocelular 2 compreende a colocação em contato entre células dendríticas funcionais obtidas de células derivadas da MUTZ-3 ou NMD-100 ou NDM-200 carregadas com um micro-organismo carboidrato-positivo junto com PBMCs (células mononucleares do sangue

25 periférico) combinadas pelo menos no MHC de classe I (HLA-A2 e HLA-B44) e cultivo dessas células por períodos apropriados e sob condições apropriadas, normalmente de 7 a 10 dias, e subsequente adição para re-estimulação de células dendríticas funcionais obtidas de células derivadas da MUTZ-3, NMD-100 ou NMD-200 carregadas com lisado de células compreendendo o

30 epítipo de carboidrato ou uma molécula veículo do epítipo de carboidrato e cultivo por períodos apropriados e sob condições apropriadas, normalmente de 7 a 9 dias, e subsequente medição da quantidade da IFN-gama secreta-

da mediante análise por ELISPOT e/ou da TNF-alfa secretada mediante análise por ELISA. A análise por ELISA e ELISPOT da TNF-alfa e da INF-gama é conhecida daqueles versados na técnica e é descrita em detalhes nos exemplos. Uma modalidade preferida do teste de resposta imunocelular 2 está descrita em detalhe no **exemplo 12**.

De acordo com uma terceira modalidade (teste de resposta imunocelular 3) a quantidade/grau de linfócitos re-estimulados é determinada pela medição da proliferação e/ou indução de proliferação. Em uma modalidade preferida, o teste de resposta imunocelular 3 mencionado contra o epitopo de carboidrato compreende

a) promoção de contato entre uma quantidade adequada de células dendríticas compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula, carregadas com uma quantidade adequada do micro-organismo carboidrato-positivo, um lisado ou uma fração do mesmo, formulações que os compreendam, o nutracêutico ou a composição farmacêutica da invenção junto com uma quantidade adequada de células imunes compreendendo pelo menos uma célula imune, célula T CD4+, célula T CD8+, uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T, ou células mononucleares do sangue periférico, que podem ser ativadas ou inibidas por uma célula dendrítica.

b) cultivo por um período apropriado e sob condições apropriadas

c) adição de uma quantidade apropriada de células dendríticas compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epitopo de carboidrato

d) cultivo por um período apropriado e sob condições apropriadas para re-estimulação e

e) medição da proliferação e/ou indução de proliferação, preferivelmente usando-se a reação WST em combinação com uma medição colo-

rimétrica (como descrito nos exemplos), sendo que uma resposta imunocelular positiva contra o epitopo de carboidrato mostra (i) uma proliferação significativamente maior de células imunes ou um número significativamente maior de células T após um certo período de cultivo quando re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma molécula carregando ou compreendendo o epitopo de carboidrato do que a proliferação ou número quando re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes não-carregadas e/ou do que a proliferação ou número quando re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com uma molécula que não carrega ou compreende o epitopo de carboidrato e/ou (ii) uma proliferação significativamente maior de células imunes ou um número significativamente maior de células T após um certo período de cultivo quando re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com uma proteína, peptídeo ou molécula carregando ou compreendendo o epitopo de carboidrato do que a proliferação ou o número quando re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com a proteína, peptídeo ou molécula correspondente que não carrega ou não compreende o epitopo de carboidrato e/ou (iii) uma proliferação de células imunes significativamente maior ou um número de células T significativamente maior após um certo período de cultivo quando re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com uma proteína, peptídeo ou molécula carregando ou compreendendo o epitopo de carboidrato do que a proliferação ou o número de células imunes correspondentes re-estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com a proteína, peptídeo ou molécula correspondente carregando ou compreendendo o epitopo de carboidrato mas enzimaticamente ou quimicamente tratadas para a destruição do epitopo de carboidrato e/ou (iv) uma proliferação significativamente maior de células imunes ou um número significativamente maior de células T após um certo período de cultivo quando re-estimuladas com as células dendríticas mencionadas carregadas com um lisado ou frações de células carregando ou compreendendo o epitopo de carboidrato do que a proliferação ou o número de células imunes correspondentes re-

estimuladas com as células dendríticas correspondentes carregadas com um lisado de células negativas para o epítipo de carboidrato ou não o compreendendo.

O teste de resposta imunocelular 3 mencionado testa a ativação de células T CD4+ e CD8+ para células T carboidrato-específicas ativadas por um micro-organismo carboidrato-positivo ou uma fração ou lisado do mesmo pela medição da indução da proliferação das células T compreendendo: colocação em contato entre as células dendríticas carregadas com um micro-organismo carboidrato-positivo e células imunes e cultivo por períodos apropriados e sob condições apropriadas e subsequente adição de células dendríticas carregadas com uma molécula veículo do epítipo de carboidrato para re-estimulação e cultivo por períodos apropriados e sob condições apropriadas e subsequente medição da proliferação. A medição da indução da proliferação mencionada é realizada preferencialmente usando-se a reação WST em combinação com uma medição colorimétrica e dedução apenas das DCs e apenas das células imunes não-re-estimuladas, o que é conhecido daqueles versados na técnica e que está descrito no exemplo 12. Na modalidade mais preferida da invenção, o teste de resposta imunocelular 3 compreende: colocação em contato entre células dendríticas funcionais obtidas das células derivadas da MUTZ-3 ou NMD-100 ou NMD-200 carregadas com um micro-organismo carboidrato-positivo ou um lisado ou uma fração do mesmo junto com PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) combinadas pelo menos no MHC de classe I (HLA-A2 e HLA-B44) e cultivo dessas células por períodos apropriados e sob condições apropriadas, normalmente de 7 a 10 dias e subsequente adição para re-estimulação de células dendríticas funcionais obtidas de células derivadas da MUTZ-3 ou NMD-100 ou NMD-200 carregadas com lisado de células compreendendo o epítipo de carboidrato ou a molécula veículo do epítipo de carboidrato e cultivo por períodos apropriados e sob condições apropriadas, normalmente de 7 a 9 dias, e subsequente medição da taxa de proliferação como acima descrito e como descrito em maior detalhe no exemplo 12. Uma resposta imunocelular positiva contra o epítipo de carboidrato mostra uma maior pro-

liferação de células T re-estimuladas com células dendríticas carregadas com a molécula veículo do epítipo de carboidrato do que a taxa de proliferação das DCs apenas e das células T postas em contato com MDCs não carregadas ou DCs carregadas com o controle correspondente. Uma modalidade preferida do teste de resposta imunocelular 3 está descrita em detalhe no **exemplo 12.**

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um teste de resposta imunocelular (teste de resposta imunocelular 4) contra o epítipo de carboidrato compreendendo

10 (a) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, carregadas com uma quantidade apropriada

15 (i) do micro-organismo carboidrato-positivo, um lisado ou fração do mesmo.

(ii) formulações que os compreendam,

(iii) o nutracêutico ou a composição farmacêutica da invenção ou

20 (iv) uma molécula carregando ou compreendendo o epítipo de carboidrato,

(v) uma mistura compreendendo uma molécula veículo do epítipo de carboidrato,

(vi) uma célula positiva para ou compreendendo o epítipo de carboidrato, um lisado ou fração da mesma,

25 junto com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula de ligação ao carboidrato;

(b) testagem da ligação da molécula de ligação ao carboidrato mencionada.

30 Uma apresentação positiva do epítipo de carboidrato na(s) célula(s) dendrítica(s) mencionada(s) está presente quando a ligação da molécula de ligação ao carboidrato é maior à(s) célula(s) dendrítica(s) mencionada(s) carregada(s) com uma molécula veículo do epítipo de carboidrato do

que sua ligação a uma célula ou células dendrítica(s) correspondente(s) não carregada(s) e/ou a uma célula ou células dendrítica(s) carregada(s) com uma molécula que não carrega ou compreende o epitopo de carboidrato ou a uma molécula que carrega ou compreende o epitopo de carboidrato após um tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato e/ou quando a ligação da molécula de ligação ao carboidrato é maior à célula ou célula(s) dendrítica(s) mencionada(s) carregadas com o micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo, do nutracêutico, da composição farmacêutica ou de formulações dos mesmos do que à célula ou células dendríticas não carregadas ou do que à célula ou células dendrítica(s) carregadas com um micro-organismo que não se liga a uma molécula de ligação carboidrato ou a uma célula ou células dendrítica(s) correspondentes carregada(s) com o micro-organismo carboidrato-positivo após tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato.

O teste de resposta imunocelular 4 mencionado testa a capacidade das células dendríticas de apresentar o epitopo de carboidrato em sua superfície após carregamento com um micro-organismo carboidrato-positivo ou uma fração ou lisado do mesmo, mostrando o potencial das células dendríticas carregadas para processar e apresentar o epitopo de carboidrato derivado do micro-organismo a células imunes tais como células T, compreendendo a reunião de quantidades apropriadas de um micro-organismo carboidrato-positivo ou de uma fração ou lisado do mesmo e de células dendríticas em um estado apropriado de diferenciação e de maturação, preferivelmente DCs imaturas que são então amadurecidas em MDCs usando-se um coquetel apropriado de moléculas conhecidas daqueles versados na técnica e medição da apresentação do epitopo de carboidrato pelas DCs carregadas pela testagem da ligação de uma molécula de ligação carboidrato da invenção à DC carregada mencionada. Tal testagem da ligação é realizada por métodos apropriados, preferivelmente imunocitoquímica, imunofluorescência ou citometria de fluxo, mais preferivelmente por imunocitoquímica, que são conhecidos daqueles versados na técnica e que estão descritos nos exemplos.

O teste mostra uma apresentação positiva pelas DCs carregadas quando a ligação da molécula de ligação ao carboidrato é maior às DCs carregadas com o micro-organismo carboidrato-positivo do que às DCs não carregadas, ou mais preferivelmente às DCs carregadas com um micro-organismo que não está ligado por uma molécula de ligação ao carboidrato ou às DCs carregadas com o micro-organismo carboidrato-positivo após tratamento enzimático ou químico que destrói o epítipo de carboidrato. Em uma modalidade preferida da invenção, o teste de resposta imunocelular 4 compreende a colocação em contato entre quantidades apropriadas de células dendríticas imaturas funcionais obtidas de células derivadas da MUTZ-3 ou NMD-100 ou NMD-200 com lisados de um micro-organismo carboidrato-positivo e subsequente cultivo e maturação por 24 h – 48 h usando-se um coquetel de moléculas apropriadas, tal como descrito no exemplo 12, e testagem da apresentação do epítipo de carboidrato via microscopia por imunofluorescência (imunocitoquímica) usando-se anticorpos específicos para o epítipo de carboidrato.

Uma modalidade preferida do teste de resposta imunocelular 4 está descrita em detalhe no exemplo 12.

A invenção proporciona também um teste de resposta imunocelular (teste de resposta imunocelular 5) contra o epítipo de carboidrato compreendendo

a) incubação de uma quantidade apropriada de células-alvo de uma linhagem celular compreendendo o epítipo de carboidrato marcado com uma quantidade apropriada de um marcador tal como európio ou cromo 51 com pelo menos uma célula imune direcionada contra o epítipo de carboidrato ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula imune direcionada contra o epítipo de carboidrato por um período apropriado (normalmente entre 3-6 horas ou durante a noite) e sob condições apropriadas, e

b) medição da lise das células-alvo mediante determinação da liberação do marcador tal como európio ou cromo 51, sendo que uma resposta imunocelular positiva contra o epítipo de carboidrato mostra uma lise

significativamente maior das células compreendendo o epitopo de carboidrato do que de células negativas para o epitopo de carboidrato e/ou mostra uma lise significativamente maior das células compreendendo o epitopo de carboidrato incubadas com células imunes direcionadas contra o epitopo de carboidrato, do que a lise das células compreendendo o epitopo de carboidrato incubadas com as células imunes de controle correspondentes não direcionadas contra o epitopo de carboidrato.

O CIRT 5 testa a citotoxicidade específica para o epitopo de carboidrato das células imunes efetoras direcionadas contra o epitopo de carboidrato, tais como, mas sem limitação a, célula T, células T, clone de células T, linhagem de célula T, células T CD4-positivas, células T CD8-positivas, células NK e/ou PBMCs.

A geração de células imunes direcionadas contra o epitopo de carboidrato está descrita em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida da invenção, as células imunes direcionadas contra o epitopo de carboidrato são obtidas mediante a administração da formulação da invenção, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração ou lisado do mesmo a um ser humano ou animal, mais preferivelmente pela administração da formulação da invenção, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração ou lisado do mesmo, a um ser humano ou animal e subsequente isolamento das células imunes do humano ou animal.

Em outra modalidade preferida da invenção, as células imunes direcionadas contra o epitopo de carboidrato são re-estimuladas pelo menos uma vez com células dendríticas carregadas com a formulação da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo ou a fração ou lisado do mesmo ou uma molécula ou célula tumoral que carrega o epitopo de carboidrato antes do seu uso no CIRT 5.

Em uma modalidade mais preferida da invenção, as células imunes direcionadas contra o epitopo de carboidrato são re-estimuladas mais de uma vez com células dendríticas carregadas com a formulação da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo ou a fração ou lisado do mesmo,

ou uma molécula ou célula tumoral que carrega o epitopo de carboidrato antes do seu uso no CIRT 5, sendo que o epitopo de carboidrato em veículos diferentes (tais como, mas sem limitação a, o epitopo de carboidrato de um micro-organismo, molécula, proteína ou célula tumoral) é usado em diferentes rodadas de re-estimulação.

O teste compreende a incubação de quantidades apropriadas de células-alvo positivas para o epitopo de carboidrato marcadas com quantidades apropriadas de células direcionadas contra o epitopo de carboidrato por um período apropriado, normalmente entre 3 a 6 horas ou durante a noite. As células positivas para o epitopo de carboidrato são marcadas com európio ou cromo 51, o que permite a medição das células que são lisadas. A quantidade de células lisadas é determinada preferivelmente pela medição da liberação de európio ou cromo 51 após a incubação. Um controle apropriado pode ser determinado por aqueles versados na técnica, tal como células negativas para o epitopo de carboidrato ou células imunes correspondentes de controle não direcionadas contra o epitopo de carboidrato. O teste pode ser otimizado para uso na invenção no que diz respeito aos números apropriados de células tumorais marcadas, números de células imunes efectoras e tempo de incubação por aqueles versados na técnica.

Em uma modalidade preferida, o CIRT 5 é realizado usando-se uma análise de liberação de európio. As células-alvo são incubadas por 10 minutos a 4°C em 800 µl de tampão de európio (50 mM de HEPES, pH 7,4, 93 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de ácido dietilenotriamina penta-acético, 2 mM de acetato de európio (III), eletroporadas (710V, 1 pulso, 30 µs) em um multiporador (Eppendorf) e subsequentemente incubadas em gelo por outros 10 minutos. Em seguida, as células são lavadas 5 vezes em RPMI/5% de SFB e semeadas em uma placa de fundo arredondado de 96 cavidades (Nunc; 5 x 10³/cavidade). Em seguida, as células imunes direcionadas contra o epitopo de carboidrato ou as células imunes correspondentes são adicionadas como células efectoras (100 µl/cavidade) usando-se diferentes proporções de células efectoras/células-alvo entre 100:1 e 5:1, preferivelmente proporções de células efectoras/células-alvo entre 50:1 e

20:1. Para determinar a liberação espontânea, 100 µl de RPMI/5% de SFB sem células efectoras são adicionados. A liberação máxima é determinada após a lise completa das células-alvo com etanol.

Após incubação a 37°C por 4 horas, a placa é centrifugada a 500 x g por 5 minutos e 20 µl de sobrenadante livre de células são pipetados em solução intensificadora (Perkin-Elmer Wallac) a 200 µl por cavidade sobre a placa de fundo chato (Nunc-Immunoplate Maxisorp) previamente preparada. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, a fluorescência é determinada (fluorômetro Victor², Perkin-Elmer Wallac). A citotoxicidade específica é obtida mediante a equação (lise experimental – lise espontânea) / (lise máxima – lise espontânea) x 100%.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou lisado ou fração do mesmo induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o epitopo de carboidrato que é positiva para pelo menos dois testes de resposta imunocelular dentre os testes de resposta imunocelular de 1 a 5.

Em ainda outra modalidade preferida da invenção, um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou lisado ou fração do mesmo induz uma resposta imune-humoral e uma resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato que é positiva para pelo menos um teste de resposta imune-humoral e pelo menos um teste de resposta imunocelular.

Em ainda outra modalidade preferida da invenção, um nutracêutico ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou lisado ou fração do mesmo induz uma resposta imune-humoral e uma resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato que é positiva para pelo menos dois testes de resposta imune-humoral e dois testes de resposta imunocelular, preferivelmente positiva para os testes de resposta imune-humoral 1 e 3 e para os testes de resposta imunocelular 1 e 3 e, mais preferivelmente, para os testes de resposta imune-humoral 1, 2 e 3 e para os testes de resposta imunocelular 1, 2 e 3 e,

ainda mais preferivelmente, para os testes de resposta imune-humoral 1, 2, 3 e 4 e para os testes de resposta imunocelular 1, 2, 3 e 4 e, ainda mais preferivelmente, para os testes de resposta imune-humoral 1, 2, 3, 4 e 6 e para todos os 5 testes de resposta imunocelular e, ainda mais preferivelmente, para os testes de resposta imune-humoral 1, 2, 3, 4 e 5 e para todos os 5 testes de resposta imunocelular e, da maneira mais preferível, positiva para todos os 6 testes de resposta imune-humoral e todos os 5 testes de resposta imunocelular.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona os testes de resposta imunocelular 1 a 5, nos quais a célula dendrítica, células dendríticas ou uma mistura de células compreendendo células dendríticas compreende pelo menos uma célula dendrítica que é uma célula dendrítica madura quando posta em contato com as células imunes mencionadas.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona os testes de resposta imunocelular 1 a 5, nos quais a célula dendrítica, células dendríticas ou uma mistura de células compreende células dendríticas funcionais obtidas de células derivadas da MUTZ-3.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona os testes de resposta imunocelular 1 a 5, nos quais as células imunes mencionadas são combinadas com as células dendríticas mencionadas em pelo menos uma molécula de MHC de classe I.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona os testes de resposta imunocelular 1 a 5, nos quais a molécula carreadora do epítipo de carboidrato é um lisado ou fração de células compreendendo o epítipo de carboidrato.

Em outra modalidade preferida, a invenção refere-se ao uso de qualquer um dos testes de resposta imune como descritos acima para se determinar a resposta imune contra o epítipo de carboidrato induzida ou aumentada pelo nutracêutico, pela composição farmacêutica, pelo micro-organismo carboidrato-positivo ou pela fração do mesmo ou por formulações que os compreendam de acordo com esta invenção em pelo menos um ser humano ou animal.

Em outra modalidade preferida, a invenção refere-se ao uso de qualquer um dos testes de resposta imune como descritos acima para a testagem da resposta imune natural existente em um ser humano ou animal sem ou antes da administração do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou de formulações que os compreendam em pelo menos um ser humano ou animal.

Em outra modalidade preferida, a invenção refere-se ao uso de qualquer um dos testes de resposta imune como descritos acima para se determinar e otimizar a quantidade eficaz, a quantidade eficaz máxima, a dose, o regime de dosagem, a via de administração, a composição, a formulação, os veículos e outras moléculas usadas com eles do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou das formulações que os compreendam de acordo com a invenção.

B) Provisão de micro-organismos carboidrato-positivos e métodos para a testagem do potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo para induzir respostas imunes, método para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo, métodos para identificar micro-organismos carboidrato-positivos apropriados para nutracêuticos e composições farmacêuticas.

A invenção proporciona um micro-organismo carboidrato-positivo que é reconhecido/ligado por pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que também reconhece especificamente um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula de humano ou animal, sendo que o dito micro-organismo induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato em pelo menos um animal ou humano.

As características e vantagens dos micro-organismos carboidrato-positivos respectivos e dos métodos para sua obtenção estão descritas acima e abaixo. À medida que o micro-organismo carboidrato-positivo sofre ligação e é, assim, reconhecido por pelo menos uma molécula de ligação

carboidrato que também reconhece especificamente o epitopo de carboidrato de interesse em seu ambiente "natural" (por exemplo, em uma célula humana ou animal, como, por exemplo, uma célula tumoral), garante-se que o micro-organismo carboidrato-positivo e/ou a fração ou lisado carboidrato-positivo do mesmo carregue uma estrutura de carboidrato que é pelo menos em termos imunoquímicos virtualmente idêntica ao epitopo de carboidrato de interesse. Essa característica é importante para garantir que uma resposta imune disparada pelo micro-organismo carboidrato-positivo mencionado seja suficientemente específica para o epitopo de carboidrato de interesse. Tais moléculas de ligação a carboidrato, preferivelmente anticorpos, que podem ser usadas para determinar que um micro-organismo carrega o epitopo de carboidrato de interesse, reconhecem especificamente o epitopo de carboidrato, por exemplo, em um ambiente com tumor relevante.

A invenção proporciona um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração ou lisado do mesmo que é reconhecido e, assim, sofre ligação quando em contato com pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconheça especificamente um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de um ser humano ou animal, o que induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e/ou uma resposta imune-humoral eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato, em pelo menos um animal ou humano.

Em uma modalidade preferida, o micro-organismo carboidrato-positivo induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato em pelo menos um animal ou humano, compreendendo preferivelmente a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e/ou ativação de células T citotóxicas CD8-positivas.

A invenção proporciona um micro-organismo carboidrato-positivo apropriado para uso em uma formulação de acordo com a invenção selecionada do grupo compreendendo um nutracêutico e uma formulação

farmacêutica da invenção no qual o micro-organismo carboidrato-positivo sofre ligação de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconhece especificamente um epítipo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal, sendo que o dito micro-organismo induz
 5 uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epítipo de carboidrato, preferivelmente em pelo menos um animal ou humano.

Em outra modalidade preferida, a resposta imune mencionada é induzida *in vitro*.

A invenção proporciona um micro-organismo carboidrato-positivo que induz um resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz
 10 contra o dito epítipo de carboidrato, células tumorais positivas para o epítipo de carboidrato ou doenças positivas para o epítipo de carboidrato, preferivelmente em pelo menos um ser humano ou animal e/ou *in vitro*.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona ou usa o
 15 (i) micro-organismo carboidrato-positivo da invenção ou,
 (ii) o nutracêutico ou a formulação farmacêutica compreendendo um micro-organismo carboidrato-positivo

que é selecionado do grupo compreendendo

Escherichia coli, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Rhuminococcus*,
 20 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Johnsonella*, *Atopobium*, *Staphylococcus*, *Eubacterium*, *Finnegoldia*, *Clostridium*, *Eggerthella*, *Butyribacterium*, *Citrobacter*, *Helicobacter*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium*.

e mais preferivelmente selecionado do grupo compreendendo
 25 *Escherichia coli*, *Bacteroides*, tais como *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides acidophilus*, *Bacteroides caccae*;

e ainda mais preferivelmente selecionado do grupo compreendendo a nova cepa de *Bacteroides ovatus* AG6 (DSM 18726), a nova cepa de *Bacteroides ovatus* MU1 (DSM 18728) e a nova cepa de *Escherichia coli*
 30 LH2 (DSM 18727) depositadas na "DSZM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha), pela Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125, Berlim (Alemanha) em 20

de outubro de 2006, e da maneira mais preferível as novas cepas AG6 e MU1.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo do nutracêutico ou da formulação farmacêutica é uma combinação de micro-organismos carboidrato-positivos de diferentes cepas.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo da formulação de acordo com a invenção é uma combinação de micro-organismos carboidrato-positivos de diferentes cepas selecionados dentre as cepas AG6, MU1 e LH2.

Em uma modalidade preferida adicional, o nutracêutico ou composição farmacêutica da invenção compreende pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo combinado com pelo menos um outro micro-organismo benéfico, tal como, mas sem limitação a, um *lactobacillus* e/ou *bifidobacterium*, ainda mais preferivelmente uma combinação de micro-organismos carboidrato-positivos de diferentes cepas combinados com outros micro-organismos benéficos.

Em uma modalidade preferida da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo é um micro-organismo não-patogênico.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo é isolado de um doador saudável.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo pode ser isolado de um doador saudável.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo é usado no nutracêutico ou a composição farmacêutica como um organismo vivo.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo é usado como um organismo vivo e é administrado oralmente.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo usado no nutracêutico ou na composição farmacêutica é sensível a pelo menos um antibiótico.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo usado no nutracêutico ou na composição farmacêutica pode colonizar as vísceras.

Em outra modalidade preferida da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo usado no nutracêutico ou na composição farmacêutica está morto.

Em ainda outra modalidade preferida da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo usado no nutracêutico ou na composição farmacêutica está pasteurizado.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo é usado no nutracêutico ou na composição farmacêutica como um organismo vivo e foi isolado de um doador humano saudável, pode colonizar as vísceras humanas e é sensível a antibióticos.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo é usado no nutracêutico em forma pasteurizada, foi isolado das vísceras de um doador humano e é sensível a antibióticos.

Em outra modalidade preferida da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo usado na composição farmacêutica está morto ou lizado.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, o micro-organismo carboidrato-positivo usado no nutracêutico ou na composição farmacêutica é liofilizado.

A invenção proporciona ainda um método para testar o potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo para induzir uma resposta imune-humoral contra o epitopo de carboidrato compreendendo

a) administração de uma quantidade apropriada do micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo a pelo menos um ser humano ou animal

b) testagem da resposta imune em pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1-6 contra o epitopo de carboidrato.

A invenção proporciona adicionalmente um método para a testagem do potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo para induzir uma resposta imunocelular carboidrato-positiva eficaz contra o epitopo de carboidrato compreendendo

5 a) administração de uma quantidade apropriada do micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo a pelo menos um ser humano ou animal e

b) testagem da resposta imune em pelo menos um dos testes de resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato.

10 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para a testagem do potencial de qualquer um dos nutracêuticos, das composições farmacêuticas, dos micro-organismos carboidrato-positivos ou das frações dos mesmos, ou das formulações que os compreendam, para induzir uma resposta imune e para determinar qual resposta imune é induzi-
15 da.

E outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para determinar a dose, o regime de dosagem, a via de administração, a formulação, os veículos ou outros componentes usados nos ou com os nutracêuticos, composições farmacêuticas, micro-organismos carboidrato-positivos ou frações dos mesmos ou as formulações que os compreendam.
20

A invenção proporciona ainda um método para testar o potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo para induzir uma resposta imune-humoral compreendendo pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1-6, preferivelmente pelo menos dois, mais preferivelmente três,
25 mais preferivelmente 4, mais preferivelmente 5 e, da maneira mais preferível, todos os 6 testes de resposta imune-humoral, sendo que pelo menos um animal ou humano tenha recebido quantidades apropriadas do micro-organismo a ser testado, seja oralmente, seja sistemicamente (com ou sem adjuvantes adicionais), e que os anticorpos no soro ou os anticorpos ganhos
30 do soro, do plasma ou das fezes sejam testados preferivelmente em comparação com os anticorpos no soro ou os anticorpos ganhos do sangue, do plasma ou das fezes antes de os micro-organismos serem administrados.

Aqueles versados na técnica são capazes de determinar quantidades adequadas do micro-organismo e maneiras de ganhar os anticorpos do sangue e os controles adequados. Os testes estão descritos em detalhe neste e/ou no exemplo 11.

5 A invenção proporciona ainda um método para testar o potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo para induzir uma resposta imunocelular compreendendo pelo menos um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5, preferivelmente pelo menos dois, mais preferivelmente três e, da maneira mais preferível, todos os 5 testes de resposta imunocelular.

10 A invenção proporciona ainda um método para testar o potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo para induzir uma resposta imunocelular citotóxica compreendendo pelo menos o teste de resposta imunocelular 2, preferivelmente 2 e 1, mais preferivelmente 2, 3 e, da maneira mais preferível, todos os 5 testes de resposta imunocelular.

15 Em ambas as modalidades da invenção, os testes são ou realizados como descrito acima *in vitro*, ou os testes de resposta imunocelular de 1 a 3 e 5 foram realizados mediante a administração a pelo menos um animal ou humano de quantidades apropriadas do micro-organismo a ser testado, seja oralmente, seja sistemicamente (com ou sem adjuvantes adicionais), e as células imunes foram ganhas do sangue e (i) testadas de acordo com os testes celulares de 1 a 3 ou 5 como descrito acima ou (ii) testados de acordo com os testes celulares de 1 a 3 ou 5 como descrito acima com a diferença de que as células imunes não são postas em contato com as células dendríticas carregadas com um micro-organismo carboidrato-positivo e apenas as células dendríticas carregadas com a molécula veículo do epítopo de carboidrato foram adicionadas para re-estimulação. Usa-se (i) preferivelmente para aumentar o efeito *in vitro* e para melhorar a leitura no caso de respostas mais fracas e usa-se (ii) preferivelmente no caso de respostas intensas. Aqueles versados na técnica são capazes de determinar quantidades apropriadas do micro-organismo e os controles adequados. Os testes
25
30 estão descritos em detalhe no exemplo 12.

A invenção proporciona ainda em uma modalidade preferida um

método para testar o potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo para induzir uma resposta imune-humoral e uma resposta imunocelular que

corresponde a uma combinação dos métodos acima descritos, compreendendo pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e pelo menos um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5, preferivelmente pelo menos dois dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e pelo menos um, mais preferivelmente pelo menos dois, dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5, mais preferivelmente pelo menos três dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6, mais preferivelmente pelo menos 4 dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e todos os testes de resposta imunocelular de 1 a 5, mais preferivelmente pelo menos 5 dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e todos os testes de resposta imunocelular de 1 a 5 e, da maneira mais preferida, todos os 6 testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e todos os 5 testes de resposta imunocelular de 1 a 5.

A invenção também proporciona métodos para identificar um micro-organismo carboidrato-positivo no sentido da invenção e métodos para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo de uma mistura de micro-organismos de epitopo de carboidrato-positivos e -negativos.

A invenção proporciona ainda um método para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo veículo da estrutura de carboidrato de interesse de uma mistura de micro-organismos compreendendo

(a) colocação em contato entre a molécula de ligação de carboidrato específica para a estrutura de carboidrato de interesse em contato com uma mistura de micro-organismos e

(b) isolamento de pelo menos um micro-organismo ligado à molécula de ligação carboidrato mencionada da dita mistura,

(c) testagem para verificar que o micro-organismo isolado é um micro-organismo carboidrato-positivo e que ele carrega a estrutura de carboidrato de interesse.

Os detalhes do método respectivo também foram descritos acima.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona ainda um

método para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo de uma mistura de micro-organismos em cuja etapa (b) partículas magnéticas são usadas para a separação/enriquecimento de micro-organismos ligados à dita molécula de ligação carboidrato.

5 Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para isolar o micro-organismo como descrito em outra parte deste, compreendendo:

(a) colocação da dita molécula de ligação carboidrato em contato com uma mistura de micro-organismos; e

10 (b) isolamento de pelo menos um micro-organismo ligado à dita molécula de ligação carboidrato ; e

(c) testagem do micro-organismo isolado para ligação específica isolado à molécula de ligação carboidrato e

15 (d) testagem da indução de uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e/ou resposta imune-humoral contra dito epitopo de carboidrato.

O dito epitopo de carboidrato pode, por exemplo, ser parte de uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou de uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato. Preferivelmente, uma resposta imune-humoral ou celular respectiva é disparada em pelo menos um animal ou humano pelo micro-organismo mencionado e/ou fração e/ou lisado do mesmo.

20 Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para isolar o micro-organismo como descrito em outra parte deste, compreendendo:

(a) colocação em contato entre a molécula de ligação carboidrato e uma mistura de micro-organismos; e

(b) isolamento de pelo menos um micro-organismo ligado à molécula de ligação carboidrato mencionada; e

30 (c) testagem da ligação específica do micro-organismo isolado à molécula de ligação carboidrato e

(d) testagem da indução de uma resposta imunocelular carboi-

drato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato pelo micro-organismo mencionado e/ou fração e/ou lisado do mesmo, preferivelmente para a ativação de células T de tipo Th1 CD4-positivas e/ou para a ativação de células T CD8-positivas citotóxicas, preferivelmente em pelo menos um animal ou humano e/ou *in vitro*.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona ainda um método para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo de uma mistura de micro-organismos, sendo que tal mistura de micro-organismos é uma mistura de pelo menos dois micro-organismos selecionados do grupo compreendendo micro-organismos de um ser humano saudável e/ou paciente, de um animal, do solo, de alimento e/ou plantas.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona ainda um método para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo de uma mistura de micro-organismos, sendo que tal mistura de micro-organismos é uma mistura compreendendo micro-organismos do trato gastrointestinal humano, das fezes humanas, do sangue humano, de tecido humano, de fluidos do corpo humano de indivíduos saudáveis ou pacientes.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona ainda um método para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo de uma mistura de micro-organismos que é realizado sob condições anaeróbicas que permitem o isolamento de micro-organismos carboidrato-positivos anaeróbicos.

A mistura de micro-organismos mencionada pode ser qualquer mistura de pelo menos dois diferentes micro-organismos, tais como, mas sem limitação a, aqueles ocorrendo na natureza, tais como, mas sem limitação a, no solo, em alimentos, plantas, animais no trato gastrointestinal humano, no sangue humano, em tecidos humanos, em fluidos corporais humanos de indivíduos saudáveis ou pacientes, mais preferivelmente uma mistura de micro-organismos de um indivíduo saudável. Os micro-organismos são preferivelmente colocados em uma solução adequada antes de a mistura ser posta em contato com uma molécula de ligação carboidrato. A molécula de

ligação carboidrato é preferivelmente acoplada a um veículo, tal como contas magnéticas, que permite a separação do micro-organismo ligado a tal veículo. E após a colocação em contato entre a molécula de ligação carboidratos e a mistura de micro-organismos, aqueles micro-organismos ligados à molécula de ligação carboidrato são separados daqueles não ligados ao anticorpo. Em uma modalidade alternativa, a molécula de ligação carboidrato não é acoplada a um veículo e o micro-organismo carboidrato-positivo é isolado junto com a molécula de ligação carboidrato por métodos que isolam especificamente o anticorpo, tais como proteína a, proteína G, proteína I ou anticorpos anti-IgM ou anticorpos anti-IgG que são eles mesmos acoplados a um veículo tal como material de leito cromatográfico de conta. Em uma modalidade preferida da invenção, micro-organismos carboidrato-positivos ligados à molécula de ligação carboidrato são inteiramente lavados com um tampão apropriado (tal como o PBS-a) e distribuídos em placa em meios seletivos e não-seletivos tais como, mas sem limitação a, MRS, BSM, KF, N, S, WC, BHI, CBA e ST (para detalhes, ver tabela 3). As colônias resultantes são raspadas das placas e submetidas a rodadas adicionais de enriquecimento por afinidade com moléculas carboidrato-específicas. As colônias são selecionadas, redistribuídas e sua expressão de carboidratos é analisada por ELISA e imunofluorescência (mais detalhes nos exemplos 1 a 9). Dessas descrições e dos exemplos, aqueles versados na técnica são capazes de ajustar ou otimizar os métodos para várias bactérias de várias fontes.

Em uma modalidade preferida especial, o método é realizado sob condições anaeróbicas que permitem o isolamento de micro-organismos carboidrato-positivos anaeróbicos, o que é importante, por exemplo, para a maioria dos micro-organismos das vísceras humanas.

O método está descrito em detalhe nos exemplos 1 a 9.

Em outra modalidade preferida, os micro-organismos são isolados de um alimento. Em uma modalidade ainda mais preferida, os micro-organismos são isolados do sistema gastrointestinal e, de maneira ainda mais preferível, das fezes humanas.

O método está descrito em detalhe nos exemplos 1 a 9.

A invenção proporciona ainda um método para identificar um micro-organismo carboidrato-positivo apropriado para uso como componente dos nutracêuticos e composições farmacêuticas da invenção compreendendo

5 a) testagem de um micro-organismo para sua ligação a pelo menos uma molécula de ligação carboidratos e

b) identificação deste micro-organismo carboidrato-positivo que está ligado a pelo menos uma molécula de ligação carboidratos, como aqui descrito.

10 Em uma modalidade preferida da invenção, a testagem da ligação de um micro-organismos a pelo menos uma molécula de ligação carboidratos é feita por ELISA, sendo que um micro-organismo carboidrato-positivo mostra um sinal de ELISA com pelo menos uma molécula de ligação carboidratos de pelo menos 3 vezes, de maneira mais preferível 5 vezes e, de maneira ainda mais preferível, pelo menos 10 vezes o sinal de fundo.

15 São preferidos os micro-organismos carboidrato-positivos que mostram uma ligação reduzida da molécula de ligação carboidratos após o tratamento do micro-organismo carboidrato-positivo com enzimas ou químicos que destroem o epítipo de carboidrato, como descrito em outra parte deste.

20 Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para identificar o micro-organismo carboidrato-positivo como descrito em outra parte deste, compreendendo:

25 a) colocação em contato entre a molécula de ligação carboidratos e um micro-organismo ou uma mistura de micro-organismos; e

b) identificação do micro-organismo que está especificamente ligado à molécula de ligação carboidratos mencionada; e

30 c) testagem da indução de uma resposta imunocelular e/ou humoral pelo micro-organismo mencionado e/ou frações e/ou lisados do mesmo,

sendo que o dito micro-organismo induz uma resposta imunocelular e/ou humoral carboidrato-específica eficaz contra o dito epítipo de car-

boidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato, preferivelmente em pelo menos um animal ou humano e/ou *in vitro*.

5 Em outra modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para identificar o micro-organismo, como descrito em outra parte deste, compreendendo:

a) colocação em contato entre a molécula de ligação carboidrato mencionada e um micro-organismo ou uma mistura de micro-organismos; e

10 b) identificação do micro-organismo que está especificamente ligado à molécula de ligação carboidratos mencionada; e

c) testagem da indução de uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz pelo micro-organismo mencionado e/ou frações e/ou lisados do mesmo,

15 sendo que o dito micro-organismo induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato, preferivelmente em pelo menos um animal ou humano e/ou *in vitro*.

20 A indução de tal resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato pode ser medida pelos testes de resposta celular imunocelular como descritos neste ou por métodos conhecidos daqueles versados na técnica.

25 Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para identificar um micro-organismo carboidrato-positivo adequado para uso nos nutracêuticos e composições farmacêuticas da invenção compreendendo

30 a) testagem da ligação de um micro-organismo carboidrato-positivo a pelo menos uma molécula de ligação carboidratos e

b) testagem da sua capacidade de induzir uma resposta imune em seres humanos ou animais que reconhecem o epitopo de carboidrato

e/ou uma célula ou célula tumoral positiva para o epitopo de carboidrato e

- c) identificação deste micro-organismo que está ligado a pelo menos uma molécula de ligação carboidrato, como descrito neste, e que induz uma reação imune em seres humanos ou animais que reconhecem o epitopo de carboidrato e/ou uma célula ou célula tumoral carboidrato-positiva sendo positivo para pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 ou pelo menos um testes de resposta imunocelular de 1 a 5, como descrito neste.

- Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para identificar um micro-organismo carboidrato-positivo apropriado para uso como um componente dos nutracêuticos e composições farmacêuticas da invenção nas quais a resposta imune induzida após administração de uma formulação de acordo com a invenção em um ser humano ou um animal é uma resposta imune positiva para pelo menos um teste de resposta imune-humoral contra o epitopo de carboidrato e pelo menos uma resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato, como descrito em outra parte deste.

- Os métodos para identificar um micro-organismo carboidrato-positivo apropriado para uso como um componente dos nutracêuticos e composições farmacêuticas da invenção podem ser usados para identificar um micro-organismo apropriado de cepas existentes, tais como as encontradas na DSMZ, ou outras coleções de micro-organismos ou dos micro-organismos carboidrato-positivos isolados por um método de isolamento de um micro-organismo carboidrato-positivo de uma mistura de micro-organismos de acordo com a invenção.

A invenção refere-se também a um método para isolar e identificar bactérias carboidrato-positivas compreendendo

- a) isolar bactérias inteiras de amostras de fezes,
b) realização de enriquecimentos por afinidade de bactérias positivas para o epitopo de carboidrato usando uma ou mais das moléculas de ligação a carboidratos sob condições aeróbicas ou anaeróbicas,
c) plaqueamento das bactérias enriquecidas em diferentes mei-

os seletivos e seleção das bactérias de acordo com a ligação a moléculas de ligação a carboidrato.

Em outra modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para isolar e identificar uma bactéria carboidrato-positiva, compreendendo

a) isolar uma mistura de microorganismos compreendendo bactérias inteiras de amostras de fezes

b) colocação em contato entre uma molécula de ligação carboidrato e uma mistura de micro-organismos

c) isolar o micro-organismo que se liga à molécula de ligação carboidratos sob condições aeróbicas ou anaeróbicas usando separação por partículas magnéticas.

d) plaqueamento das bactérias enriquecidas em pelo menos um meio seletivo

e) identificação do micro-organismo que está ligado a pelo menos uma molécula de ligação carboidratos.

Em outra modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para isolar e identificar bactérias carboidrato-positivas compreendendo

a) geração de uma cepa bacteriana pura que sofre ligação de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato; e/ou

b) testagem da capacidade da dita cepa bacteriana pura mencionada de induzir ou aumentar uma resposta imune contra o epítipo de carboidrato em pelo menos um ser humano ou animal.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para testar o potencial de um micro-organismo carboidrato-positivo para induzir uma resposta imune epítipo carboidrato-específica compreendendo as seguintes etapas:

1) identificação de micro-organismos carboidrato-positivos e produção em culturas puras;

2) identificação de cepas bacterianas das vísceras eficazes em termos imunes;

3) geração de uma preparação carboidrato-positiva imunologi-

camente e toxicologicamente testada como um aditivo nutricional pronto para testes em seres humanos;

4) indução ou aumento de uma resposta imune epitopo carboidrato-específica em seres humanos; e, caso necessário,

5) isolamento, identificação e testagem de uma fração ou componente do micro-organismo mencionado carboidrato-positiva definida como eficaz em termos imunes.

Em uma modalidade preferida da invenção, a molécula de ligação carboidrato dos métodos descritos acima é selecionada do grupo compreendendo anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, lectinas e/ou selectinas e/ou moléculas derivadas.

Em uma modalidade preferida da invenção, o epitopo de carboidrato dos métodos acima descritos é selecionado do grupo compreendendo TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-H, sialil-Lewis-A, sialil-Lewis-X, ácido polissialico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, 9-O-acetil GD2, GD3L, fucosil GM1, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis B, slac, cadeia sialilada de tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno 72-4 e/ou antígeno CA-50.

O método está descrito em detalhe nos exemplos 1-10.

A invenção refere-se também a um método para gerar micro-organismos carboidrato-positivos compreendendo

a) contato de um micro-organismo e um agente para a indução de mutações por mutagênicos químicos e/ou físicos tais como, mas sem limitação a, EMS, UV, metotrexato, micro-ondas, substâncias cancerogênicas, carcinogênicos, mutagênicos ou radiação sob condições que matam a maioria dos micro-organismos e

b) cultivo dos micro-organismos sobreviventes sob condições apropriadas

c) enriquecimento, isolamento e/ou identificação dos micro-organismos carboidrato-positivos como descrito em outra parte deste

d) testagem da capacidade do micro-organismo mencionado para induzir ou aumentar uma resposta imune contra o epitopo de carboidrato em pelo menos um ser humano ou animal.

A invenção refere-se também a um método para gerar micro-organismos carboidrato-positivos por engenharia genética compreendendo

a) introdução, desativação e/ou silenciamento dos genes, partes dos genes, DNA, RNA, RNA antissenso, oligonucleotídeos, oligopeptídeos ou proteínas em um micro-organismo, afetando assim a biossíntese dos epitopos de carboidrato, a degradação dos epitopos de carboidrato ou a biossíntese ou a degradação dos carboidratos flanqueadores e

b) enriquecimento, isolamento, identificação e/ou testagem dos micro-organismos carboidrato-positivos como descrito em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida, o dito micro-organismo é um micro-organismo negativo para o epitopo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida adicional, o dito micro-organismo é um micro-organismo benéfico para o trato intestinal, tal como, mas sem limitação a *Lactobacillus* ou a *Bifidobacterium*.

Em uma modalidade preferida adicional, o dito micro-organismo é um micro-organismo usado para a produção de um alimento convencional tal como, mas sem limitação a, o *Lactobacillus* ou a *Bifidobacterium*.

Em outra modalidade, o dito micro-organismo já é positivo para o epitopo de carboidrato e o método é usado para aumentar a quantidade de epitopos de carboidrato expressados na superfície celular.

Em uma modalidade preferida, o micro-organismo carboidrato-positivo isolado ou identificado por qualquer um dos métodos mencionados acima ou uma fração ou lisado do mesmo é usado para fabricar um medicamento ou um nutracêutico para a profilaxia e/ou terapia de uma doença associada ao dito epitopo de carboidrato, sendo que o micro-organismo e/ou fração e/ou lisado induz uma resposta imunocelular e/ou humoral carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato, em pelo menos um animal ou humano.

Em outra modalidade preferida, o micro-organismo carboidrato-positivo isolado ou identificado por qualquer um dos métodos mencionados

acima ou fração ou lisado do mesmo é usado para fabricação um fármaco ou um nutracêutico para a profilaxia e/ou terapia de uma doença associada ao dito epitopo de carboidrato, em que o micro-organismo e/ou fração e/ou lisado mencionado induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato, em pelo menos um animal ou humano, preferivelmente a resposta imune compreende a ativação de células T de tipo Th1 CD4-positivas e/ou a ativação de células T citotóxicas CD8-positivas.

Procedimentos e condições apropriados para fabricação são conhecidos daqueles versados na técnica ou podem ser ajustados por aqueles versados na técnica.

C) Provisão de frações do micro-organismo carboidrato-positivo

A invenção proporciona uma fração do micro-organismo carboidrato-positivo da invenção, em que o micro-organismo carboidrato-positivo presente em uma molécula de uma célula de um ser humano ou animal, em que a dita fração do micro-organismo carboidrato-positivo induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato em pelo menos um animal ou humano sofre ligação de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconhece especificamente um carboidrato.

A invenção proporciona uma fração adequada do micro-organismo carboidrato-positivo da invenção para uso em uma formulação da invenção selecionada do grupo compreendendo um nutracêutico ou uma composição farmacêutica.

A invenção proporciona uma fração adequada do micro-organismo carboidrato-positivo da invenção que induz uma resposta imune epitopo carboidrato-específica contra o epitopo de carboidrato ou células tumorais ou células positivas de epitopo de carboidrato em seres humanos ou animais.

A dita fração do micro-organismo carboidrato-positivo mencionada significa preparações ou purificações de partes menores dos ditos mi-

cro-organismos tais como preparações de parede celular, preparações de envelope, lisados, preparações de lipopolissacarídeo, preparado de cápsulas ou preparados de polissacarídeos capsulares, que são descritas nos exemplos (exemplo 10) ou em que aquele versado na técnica é capaz de otimizar e seleccionar um método adequado ou uma combinação de métodos adequados. Eles compreendem preferivelmente pelo menos um componente carboidrato-positivo do dito micro-organismo carboidrato-positivo mencionado. Eles podem ser obtidos por preparações ou purificações de pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo. Tais preparações e purificações podem ser obtidas pelos métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como aqueles descritos acima, ou fracionamento celular individual ou sequencial, extração de água por fenol, extrações de éter digestões de lisossoma ou métodos cromatográficos. O componente carboidrato-positivo ou a fração contendo o componente carboidrato-positivo é detectado pela ligação da fração a pelo menos uma molécula de ligação carboidrato em sistemas de teste tais como, mas sem limitação a, ELISA ou dot blots que são conhecidos daqueles versados na técnica. Em uma modalidade preferida da invenção, a fração compreendendo um componente carboidrato-positivo é obtida por cromatografia de afinidade usando-se pelo menos uma molécula de ligação carboidratos.

Em uma modalidade preferida, uma única etapa de preparação ou purificação é usada. Em outra modalidade preferida, uma combinação de pelo menos etapas de preparação e de purificação são usadas.

Em uma modalidade preferida adicional, o componente carboidrato-positivo é enriquecido na dita dita fração quando comparado ao micro-organismo completo, como pode ser determinado mediante uma ligação maior de pelo menos uma molécula de ligação carboidratos à fração em comparação com o micro-organismo, por exemplo por ELISA, e preferivelmente, quando o peso do material biológico contido no mesmo volume é igual.

O dito componente carboidrato-positivo significa qualquer componente de um micro-organismo carboidrato-positivo que é ligado por pelo

menos uma molécula de ligação carboidrato. O dito componente carboidrato-positivo compreende pelo menos uma estrutura de carboidrato ou estrutura que mimetiza um carboidrato que pode estar disponível sob a forma da sua molécula natural, onde ela é parte de um micro-organismo, tal como um pep-
5 tídeo, oligopeptídeo, polipeptídeo, lipídio, ceramida, carboidrato, lipoproteína, polissacarídeo, oligossacarídeo, polissacarídeo, proteoglicano, lipopolissacarídeo ou glicoproteína, ou como uma parte da dita molécula natural, ou sozinho. O componente carboidrato-positivo pode ser usado no sentido da invenção como uma fração do micro-organismo carboidrato-positivo como tal
10 ou acoplado a outras estruturas-veículos não-naturais tais como proteínas, lipídeos, moléculas químicas tais como a poliacrilamida. Preferivelmente, ele é usado em sua forma natural. O componente carboidrato-positivo pode compreender uma única epitopoeestrutura de carboidrato ou um estrutura que mimetiza um carboidrato ou unidades repetidas das ditas estruturas e pode
15 conter estruturas ou unidades de carboidrato adicionais ou outras estruturas biomoleculares. A dita estrutura mimetizadora de carboidrato é uma estrutura que é ligada por pelo menos uma molécula de ligação carboidrato e induz uma resposta imune contra o epitopo de carboidrato, preferivelmente uma resposta imunocelular humoral ou resposta imunecelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e, mais preferivelmen-
20 te, uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e uma resposta imune-humoral eficaz contra o dito epitopo de carboidrato e/ou células associadas ao dito epitopo de carboidrato.

O micro-organismo carboidrato-positivo do qual a fração carboi-
25 drato-positiva é derivada está descrito em outra parte desta invenção.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, a fração do micro-organismo carboidrato-positivo (componente ativo) do nutracêutico ou da formulação farmacêutica compreende uma combinação de frações de um micro-organismo carboidrato-positivo ou, preferencialmente, de diferen-
30 tes micro-organismos carboidrato-positivos de diferentes cepas. As frações podem ser do mesmo tipo ou de tipos diferentes de preparação ou purificação, preferencialmente é uma combinação de componentes carboidrato-

positivos que possuem diferentes veículos moleculares ou estruturas mime-
tizantes tais como, mas sem limitação a, um peptídeo, oligopeptídeo, poli-
peptídeo, lipídio, ceramida, carboidrato, lipoproteína, polissacarídeo, oligos-
sacarídeo, polissacarídeo, proteoglicano ou glicoproteína outra uma parte de
5 ou molécula natural ou sintética.

Em outra modalidade preferida da invenção, o componente car-
boidrato-positivo não é parte do lipopolissacarídeo bacteriano.

Em uma modalidade preferida adicional, a dita fração do micro-
organismo carboidrato-positivo compreende uma combinação de componen-
tes carboidrato-positivos de micro-organismos carboidrato-positivos de pelo
10 menos duas cepas diferentes.

Em outra modalidade preferida da invenção, a dita estrutura de
carboidrato ou as ditas unidades repetidas mencionadas da mesma são ob-
tidas por enriquecimento e/ou purificação e/ou isolamento de um micro-
15 organismo carboidrato-positivo.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, a dita es-
trutura de carboidrato ou as ditas unidades repetidas mencionadas são obti-
das por síntese química, uma técnica, portanto, conhecida daqueles versa-
dos na técnica.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, a dita es-
trutura de carboidrato ou as ditas unidades repetidas mencionadas da mes-
ma são obtidas por enriquecimento e/ou purificação e/ou isolamento da cepa
20 AG6.

Os detalhes são mostrados no exemplo 10.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, a dita es-
trutura de carboidrato ou as ditas unidades repetidas mencionadas da mes-
ma são obtidas, portanto, por síntese química.

Aqueles versados na técnica são capazes de determinar condi-
ções e métodos apropriados para sintetizar quimicamente a estrutura de
carboidrato de acordo com a figura 8 ou unidades repetidas da mesma.
30

*D) Métodos para a geração de células imunes direcionadas con-
tra o epitopo de carboidrato*

A invenção proporciona um método para a geração de uma célula dendrítica funcional contra o dito epítipo de carboidrato compreendendo a colocação em contato entre uma quantidade apropriada de uma célula dendrítica ou de uma mistura de células dendríticas ou de uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica e uma quantidade apropriada da formulação, como descrito em outra parte deste, por um período apropriado e sob condições apropriadas para gerar pelo menos uma célula dendrítica funcional contra o dito epítipo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato. Como delineado acima, o dito epítipo de carboidrato é preferivelmente um epítipo humano e preferivelmente não-carregado. Preferivelmente, tais células dendríticas não estão carregadas com peptídeos veículos do epítipo de carboidrato de interesse.

A invenção proporciona um método para a geração de uma célula dendrítica funcional contra o epítipo de carboidrato compreendendo a colocação em contato entre uma quantidade apropriada de uma célula dendrítica ou uma mistura de células dendríticas ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica e uma quantidade apropriada de pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo, como descrito em outra parte deste, por um período apropriado e sob condições apropriadas para gerar pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada ao epítipo de carboidrato.

A invenção proporciona um método para a geração de uma célula dendrítica funcional contra o epítipo de carboidrato compreendendo a colocação em contato entre uma quantidade apropriada de uma célula dendrítica ou uma mistura de células dendríticas ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica e uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epítipo de carboidrato ou pelo menos uma célula de patologia associada ao epítipo de carboidrato ou pelo menos uma célula tumoral positiva de epítipo de carboidrato ou um lisado ou uma fração da mesma, como descrito em outra parte deste, por um período apropriado e sob condições apropriadas para gerar pelo menos uma

célula dendrítica funcional carregada com o epitopo de carboidrato.

A célula dendrítica funcional contra o epitopo de carboidrato mencionada é uma célula dendrítica ou uma mistura de células dendríticas que ativam pelo menos uma célula T contra o epitopo de carboidrato que podem ser preferencialmente testadas mediante um teste de resposta imunocelular da invenção e é positiva contra o epitopo de carboidrato em pelo menos um dos testes de resposta imunocelular descritos em outra parte deste. Em uma modalidade preferida, a célula dendrítica funcional apresenta o epitopo de carboidrato em sua superfície e pode ser detectada por um anticorpo específico de epitopo de carboidrato ou uma molécula de ligação a carboidrato, como descrito, por exemplo, no teste de resposta imunocelular 4. Em uma modalidade preferida da invenção, a célula dendrítica funcional contra o epitopo de carboidrato é obtida mediante colocação em contato entre uma célula dendrítica imatura ou uma mistura de células dendríticas imaturas ou uma mistura de células dendríticas compreendendo pelo menos uma célula dendrítica imatura e uma quantidade apropriada de pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo, como descrito em outra parte deste, por um período apropriado e sob condições apropriadas para amadurecer a célula dendrítica mencionada usando-se condições apropriadas, como descrito em outra parte deste, e, como é do conhecimento daqueles versados na técnica, compreendendo, por exemplo, as moléculas TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa), LPS (lipopolissacárideo) ou BCG (bacilo Calmette-Guerin), INF-gama (interferon gama), dexametasona e/ou TGF-beta (fator de crescimento transformador beta), em uma célula dendrítica funcional carregada com o epitopo de carboidrato. Em uma modalidade preferida da invenção, a célula dendrítica é derivada da MUTZ-3 ou NemodDC (obtenível da Glycotope GmbH, Berlim, Alemanha; www.glycotope.com) e células dendríticas imaturas preferidas adicionais foram geradas a partir de células MUTZ-3 ou NemodDC sob condições apropriadas compreendendo o uso de IL-4 e GM-CSF, normalmente por cerca de uma semana, as células dendríticas imaturas resultantes ou iNMDc são postas em contato com a dita quantidade adequada mencionada de pelo menos

um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou ou fração do mesmo, as células são amadurecidas usando-se condições apropriadas compreendendo, por exemplo, TNF-alfa, LPS, BCG, INF-gama, dexametasona ou TGF-beta, preferivelmente TNF-alfa, normalmente por cerca de um a dois dias, resultando em células dendríticas maduras carregadas com o epítipo de carboidrato correspondente à célula dendrítica funcional contra o epítipo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona uma célula dendrítica funcional produzida pelos métodos descritos acima, em que a célula dendrítica funcional é direcionada contra o epítipo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona uma célula dendrítica funcional produzida pelos métodos descritos acima, em que a célula dendrítica funcional é direcionada contra o dito antígeno carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito antígeno carboidrato e induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e/ou uma resposta imune-humoral eficaz contra células e/ou doenças que expressam o dito epítipo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para a geração de uma célula T ativada, células T ativadas, clone de célula T ou linhagem de células T contra o epítipo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato compreendendo

(a) colocação em contato de uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional, como acima descrito, com uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula T ou uma mistura de células T ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T, cultivo da dita célula T ou mistura de células T junto com as ditas células dendríticas funcionais carregadas por um período apropriado e sob condições apropriadas para ativar ou inicializar uma célula T ou células T contra o dito epítipo de carboidrato, e

(b) re-estimulação de tais células T com uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma célula ou molécula humana ou animal veículo do dito epítipo de carboidrato.

5 A invenção proporciona um método para gerar uma célula T ativada ou células T contra o epítipo de carboidrato compreendendo

(a) colocação em contato de uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional ou uma mistura de células contendo pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com quantidades apropriadas do micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo e pelo menos uma célula T ou células T

(b) cultivo da dita célula T ativada ou células T junto com as ditas células dendríticas funcionais carregadas por um período apropriado e sob condições apropriadas para ativar ou inicializar a célula T ou as células T contra o epítipo de carboidrato.

15 A invenção proporciona um método para gerar uma célula T ativada ou células T contra o epítipo de carboidrato compreendendo

(a) colocação em contato de uma quantidade apropriada de células dendríticas funcionais ou uma mistura de células contendo pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com quantidades apropriadas da molécula veículo do epítipo de carboidrato, uma célula tumoral positiva de epítipo de carboidrato ou uma célula compreendendo dito o epítipo de carboidrato, ou um lisado ou uma fração dos mesmos e uma célula T ou células T ou uma mistura de células contendo pelo menos uma célula T

25 (b) cultivo da dita célula T ou células T ou mistura de células contendo pelo menos uma célula T junto com as ditas células dendríticas funcionais carregadas por um período apropriado e sob condições apropriadas para ativar ou inicializar uma célula T ou células T contra o epítipo de carboidrato.

30 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para gerar uma célula T ativada ou células T contra o epítipo de carboidrato compreendendo

(a) colocação em contato de quantidades apropriadaa de células dendríticas funcionais carregadas com quantidades apropriadas do micro-organismo carboidrato-positivo ou um lisado ou fração do mesmo e uma célula T ou células T

5 (b) cultivo da dita célula T ou células T junto com as células dendríticas funcionais carregadas mencionadas por um período apropriado e sob condições apropriadas para ativar ou inicializar uma célula T ou células T contra o epitopo de carboidrato

10 (c) adição de células dendríticas funcionais carregadas com uma molécula veículo do epitopo de carboidrato ou célula tumoral positiva de epitopo de carboidrato ou uma célula compreendendo o epitopo de carboidrato ou um lisado ou fração da mesma para re-estimulação

(d) cultivo por período apropriado e em condições apropriadas.

15 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para geração de uma célula T ou células T ativada(s) contra o epitopo de carboidrato compreendendo

20 (a) colocação em contato de uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma quantidade apropriada de pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou um lisado ou fração do mesmo e uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula T ou uma mistura de células T ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T

25 (b) cultivo da dita célula T ou mistura de células T ou mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T com as células dendríticas funcionais carregadas por um período apropriado e sob condições apropriadas para ativar ou inicializar uma célula T ou células T contra o epitopo de carboidrato.

30 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para a geração de uma célula T ativada ou células T contra o epitopo de carboidrato compreendendo

(a) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma quantidade

apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epítipo de carboidrato ou célula tumoral positiva de epítipo de carboidrato, ou uma célula compreendendo o epítipo de carboidrato ou um lisado ou fração da mesma com uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula ativada T ou uma
 5 mistura de células T ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T.

(b) cultivo da dita célula T ou mistura de células T ou mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T com as células dendríticas funcionais carregadas por um período apropriado e sob condições apropriadas para ativar ou inicializar uma célula T ou células T contra o epítipo de carboidrato.
 10

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para gerar uma célula T ou células T ativada(s) contra o epítipo de carboidrato compreendendo as etapas (a) e (b) dos métodos precedentes e subsequentemente compreendendo,
 15

(c) adição de uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epítipo de carboidrato ou célula tumoral positiva de epítipo de carboidrato ou um lisado ou fração do mesmo para re-estimulação;
 20

ou adição de uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma quantidade apropriada de pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo para re-estimulação; e

(d) cultivo por um período apropriado ou e sob condições apropriadas.
 25

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para a geração de uma linhagem de células T contra o epítipo de carboidrato compreendendo as etapas (a), (b), (c) e (d) do método precedente e subsequentemente compreendendo pelo menos uma rodada adicional de re-estimulação, em que uma rodada de re-estimulação compreende seja as
 30 etapas (e) e (f) ou as etapas (g) e (h), com

(e) adição de uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula veículo do epitopo de carboidrato ou célula tumoral positiva de epitopo de carboidrato, ou célula compreendendo o epitopo de carboidrato ou lisado ou fração da mesma para re-estimulação;

(f) cultivo por um período apropriado e sob condições apropriadas

(g) adição de uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma quantidade apropriada de pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo, ou lisado ou fração do mesmo para re-estimulação

(h) cultivo por um período apropriado e sob condições apropriadas

Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um método para a geração de uma linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato compreendendo adicionalmente duas rodadas adicionais da rodada de re-estimulação mencionada.

Em uma modalidade mais preferida, a invenção proporciona um método para a geração de uma linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato compreendendo três rodadas adicionais da rodada de re-estimulação.

Em uma modalidade ainda mais preferida, a invenção proporciona um método para a geração de uma linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato compreendendo cinco rodadas adicionais da rodada de re-estimulação.

Em uma modalidade mais preferida adicional, a invenção proporciona um método para a geração de uma linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato na qual é realizada pelo menos uma vez uma etapa adicional de clonagem das células antes de uma rodada das ditas rodadas de re-estimulação.

Em uma modalidade preferida, a célula T ativada ou células T são uma linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato, em que pre-

ferivelmente (c) e (d), que correspondem a uma rodada de re-estimulação, são realizadas duas vezes, mais preferivelmente três vezes, mais preferivelmente 4 vezes e, da maneira mais preferível, uma linhagem de células T para a qual mais do que 4 rodadas de re-estimulação são realizadas.

5 Em uma modalidade preferida, a célula T ativada ou células T são um clone de célula T contra o epítipo de carboidrato, em que preferivelmente (c) e (d), que correspondem a uma rodada de re-estimulação, são realizadas duas vezes, mais preferivelmente três vezes, mais preferivelmente 4 vezes e, da maneira mais preferida, uma linhagem de células T para a
10 qual mais de 4 rodadas de re-estimulação são realizadas e as células são clonadas pelo menos uma vez, por exemplo por diluição celular única, antes da re-estimulação.

 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um método para a geração de um clone de célula T contra o epítipo de carboidrato, em que a célula dendrítica funcional mencionada é uma célula
15 dendrítica madura.

 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um método para a geração de um clone de célula T contra o epítipo de carboidrato, em que a célula dendrítica funcional mencionada e a célula T ou
20 células T são células humanas.

 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um método para a geração de uma célula T ativada, um clone de célula T ou uma linhagem de células T contra o epítipo de carboidrato, em que a célula dendrítica funcional mencionada é uma célula derivada da MUTZ-3 [pedidos
25 de patente 10139428.4 (DE), PCT/EP02/09260, 02758474.7 (EP), US 10/486.966, CA 2.457.287, DE 10139428A1, WO 2003/023023A1, EP 01419240, US 20040265998, CA2457287], tal como, mas sem limitação a, Nemod-DC (obtenível da Glycotope GmbH, Berlim, Alemanha, www.glycotope.com).

30 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um método para a geração de uma célula T ativada, um clone de célula T ou uma linhagem de células T, ativadas contra o epítipo de carboidrato, em que

a célula dendrítica funcional e a célula T ou células T são combinadas em pelo menos uma molécula de MHC.

5 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona uma célula T, células T, clone de célula T ou linhagem de células T ativadas produzidas por qualquer um dos métodos acima descritos, em que a célula T, células T, clone de célula T ou linhagem de células T é direcionada contra o epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato.

10 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona uma célula T, células T, clone de célula T ou linhagem de células T ativadas produzidas por qualquer um dos métodos acima descritos, em que a célula T, células T, clone de célula T ou linhagem de células T direcionada contra o epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato e induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o epitopo de carboidrato e/ou células e/ou doenças associadas com o dito epitopo de carboidrato.

20 Em uma modalidade preferida da invenção, a indução mencionada da resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada ocorre em pelo menos um ser humano ou animal.

Em outra modalidade preferida da invenção, a indução mencionada da resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada é realizada *in vitro*.

25 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona a célula T ou células T ativada(s) contra o epitopo de carboidrato, a composição celular compreendendo células T contra o epitopo de carboidrato, a linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato ou o clone de célula T contra o epitopo de carboidrato obtido por um método como acima descrito.

30 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona a célula T ou células T ativada(s) contra o epitopo de carboidrato, a composição celular compreendendo células T contra o epitopo de carboidrato, a

linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato ou o clone de célula T contra o epitopo de carboidrato como descrito acima compreendendo pelo menos uma célula T auxiliar CD4+ contra o epitopo de carboidrato.

5 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona a célula T ou células T ativada(s) contra o epitopo de carboidrato, a composição celular compreendendo pelo menos uma célula T contra o epitopo de carboidrato, a linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato ou o clone de célula T contra o epitopo de carboidrato como descrito acima compreendendo pelo menos uma célula T citotóxica contra o epitopo de carboidrato.

10 Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona a célula T ou células T ativada(s) contra o epitopo de carboidrato, a composição celular compreendendo pelo menos uma célula T contra o epitopo de carboidrato, a linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato ou o clone de célula T contra o epitopo de carboidrato como descrito acima que
15 mata pelo menos uma célula tumoral carboidrato-positiva ou uma célula de patologia associada com o epitopo de carboidrato ou secreta moléculas que medeiam a destruição de pelo menos uma célula tumoral.

A célula T ou células T ativada(s) contra o epitopo de carboidrato, a composição celular compreendendo células T contra o epitopo de carboidrato, a linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato ou o clone de célula T contra o epitopo de carboidrato da invenção que destroem pelo menos uma célula tumoral positiva ou célula de patologia de epitopo de carboidrato ou secretam moléculas que medeiam a destruição de pelo menos uma célula tumoral ou célula de patologia significam que a célula T ativada
20 ou células T citotóxica(s) mencionada(s) ou células contra o epitopo de carboidrato destroem uma célula tumoral ou célula de patologia positiva de epitopo de carboidrato que pode ser determinada mediante o uso do teste de resposta celular imune correspondente descrito em outro lugar deste medindo-se a secreção de INF-gama ou TNF-alfa ou mediante um teste de citotoxicidade (tal como o teste de resposta imunocelular 5) no qual pelo menos
25 uma célula tumoral positiva ou célula de patologia de epitopo de carboidrato marcada é lisada pelas células T mencionadas como é de conhecimento,

principalmente, daqueles versados na técnica mediante o uso das células T da invenção, por exemplo, células LTCs ou Th1, ou mediante a indução de uma resposta específica das células T auxiliares CD4 que medeiam a ativação de respostas imunes humorais e celulares correspondentes que resul-

5 tam na destruição de pelo menos uma célula tumoral positiva de epítipo de carboidrato.

Aqueles versados na técnica são capazes de realizar a tarefa descrita usando os métodos e materiais aqui descritos. Eles podem determi-

10 nar as melhores condições para obter as células dendríticas ou células T funcionais, a melhor via de administração e/ou composições adequadas compreendendo-as e/ou que são descritas em maior detalhe nas modalidades preferidas para geração e uso nos pedidos de patente DE 10139428A1, WO 2003/023023A1, EP 01419240, US 20040265998, CA 2457287.

A célula T ou células T ativada(s) mencionada(s) contra o epítipo de carboidrato significam que a célula T, células T ou composição celular compreendendo células T são positivas para pelo menos um dos testes imunes celulares da invenção, preferivelmente para dois, mais preferivelmente para três e, da maneira mais preferível, para todos os 4. Preferivelmente, eles compreendem pelo menos uma célula auxiliadora CD4+ e, ainda mais

15 20 preferivelmente, pelo menos uma célula T citotóxica capaz de destruir pelo menos uma célula tumoral positiva de epítipo de carboidrato.

A célula ou célula(s) T mencionadas usadas para colocação em contato são ou pelo menos uma célula T CD4+ e/ou uma célula T CD8+ que foi previamente isolada ou enriquecida pelos métodos padrão conhecidos daqueles versados na técnica ou são uma composição celular que compre-

25 ende pelo menos uma célula T CD4+ e/ou células CD8+.

O lisado mencionado pode ser qualquer lisado de um micro-organismo carboidrato-positivo ou de uma célula tumoral positiva de epítipo de carboidrato, respectivamente, tal como, mas sem limitação a, um lisado gerado por repetidos congelamentos-descongelamentos, por sonicação, por

30 força mecânica ou por indução de temperatura.

Para detalhes sobre a geração das células T específicas de epi-

topo de carboidrato, vide exemplo 12.

Uma célula dendrítica funcional é uma célula que pode ativar uma célula T.

A ativação de uma célula T significa estimulação da proliferação e/ou conversão de uma célula virgem para uma célula ativa. Uma célula T ativa secreta moléculas que induzem ou auxiliam uma resposta imune contra o alvo, o epitopo de carboidrato ou células tumorais ou células de patologia que carregam o epitopo de carboidrato, preferivelmente aquelas células T citotóxicas que medeiam a destruição de uma célula tumoral ou célula de patologia positiva de epitopo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida, a célula dendrítica funcional mencionada é uma célula dendrítica madura. Mais preferivelmente, o precursor da célula dendrítica do qual a célula madura se deriva é obtido de um ser humano, mais preferivelmente de um ser humano do qual a célula T ativada ou células T foram também obtidas ou que são combinadas em pelos menos uma molécula de classe MHC. Em uma modalidade mais preferida, a célula dendrítica funcional é derivada da MUTZ-3, e, de maneira ainda mais preferível, a célula ou células MUTZ-3 delas derivadas foram diferenciadas usando-se IL-4 e GM-CSF, carregada(s) com quantidades apropriadas do micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo ou a molécula veículo do epitopo de carboidrato ou célula tumoral positiva de epitopo de carboidrato, lisado ou fração da mesma e adicionalmente amadurecida usando-se, por exemplo, quantidades apropriadas de TNF-alfa para amadurecer as células dendríticas correspondentes às células dendríticas funcionais da invenção. Em uma modalidade ainda mais preferida, células dendríticas funcionais carregadas são usadas junto com PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) combinadas pelos menos em MHC de classe I (HLA-A2) e (HLA-B44).

Aqueles versados na técnica são capazes de determinar as condições apropriadas para gerar células dendríticas funcionais carregadas com o micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo ou com a molécula veículo do epitopo de carboidrato ou com a célula tumoral ou célula

da patologia positiva de epitopo de carboidrato, ou com o lisado ou fração da mesma, assim como com quantidades apropriadas e procedimentos de enriquecimento ou purificação de uma célula T ou células T e condições apropriadas para o cultivo de ambas as células juntas, compreendendo tempo de cultivo, meios, condições de cultura e fatores adicionais necessários. As células dendríticas funcionais são normalmente diferenciadas das células precursoras dentro de 6-10 dias e carregadas e amadurecidas por outros 1 a 2 dias. O cultivo da célula T ativada ou células T mencionadas junto com as células dendríticas funcionais carregadas mencionadas é normalmente realizado por 7 a 10 dias e a adição e cultivo de células dendríticas funcionais para re-estimulação normalmente por 7 a 9 dias para cada rodada de re-estimulação. Detalhes adicionais são mostrados no exemplo 12.

Em outra modalidade preferida, células dendríticas diferentes ou células dendríticas funcionais de fontes diferentes, tais como células dendríticas derivadas da MUTZ-3 e células dendríticas derivadas de doares de um ser humano são usadas nas diferentes etapas de inicialização e re-estimulação. Aqueles versados na técnica são capazes de selecionar os melhores detalhes de combinação.

A geração bem-sucedida de uma célula T, células T ou composições celulares compreendendo uma célula T, células T, células T CD4+ e/ou CD8+ contra o epitopo de carboidrato pode ser testada mediante o uso de pelo menos um teste de resposta imunocelular da invenção. Detalhes adicionais estão descritos em outra parte deste. Preferivelmente, pelo menos dois testes de resposta imunocelular são positivos, mais preferivelmente três, mais preferivelmente quatro e, da maneira mais preferível, todos os cinco.

A descrição usada aqui para as células dendríticas, seu uso e condições apropriadas e moléculas para o seu uso também é válida para os testes de resposta imunocelular descritos em outra parte deste e vice-versa, e será válida para todas as outras partes da invenção.

Em outra modalidade, a invenção proporciona uma célula T ativada contra o epitopo de carboidrato.

Em outra modalidade, da invenção proporciona células T compreendendo pelo menos uma célula T ativada contra o epítipo de carboidrato.

5 Em outra modalidade, da invenção proporciona uma linhagem de células T contra o epítipo de carboidrato.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um clone de célula T contra o epítipo de carboidrato.

10 Em uma modalidade preferida, a linhagem de células T ou o clone de célula T foi gerado usando-se células dendríticas funcionais derivadas da MUTZ-3 (tais como Nemo-DC) carregadas com o micro-organismo carboidrato-positivo, o lisado ou fração do mesmo em combinação com pelo menos uma rodada de re-estimulação com células dendríticas funcionais derivadas da MUTZ-3 carregadas com pelo menos uma molécula veículo do epítipo de carboidrato ou célula tumoral ou célula de patologia positiva de
15 epítipo de carboidrato, ou lisado ou fração da mesma de um doador saudável e, de maneira ainda mais preferível, de um paciente, e de maneira ainda mais preferível, de um paciente cuja doença ou tumor é positivo para a ligação com uma molécula de ligação carboidrato, preferivelmente com um anticorpo específico de epítipo de carboidrato.

20 A invenção proporciona ainda um método para a geração de pelo menos uma célula T ativada para uso como uma terapia tumoral compreendendo a administração das células T ativadas contra as células tumorais positivas de epítipo de carboidrato em um paciente.

25 *E) Métodos para induzir um escudo imune contra doenças associadas ao epítipo de carboidrato e métodos para prevenir e/ou tratar doenças associadas ao epítipo de carboidrato*

30 A invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e/ou resposta imune-humoral eficaz contra o dito epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato, em pelo menos um animal ou humano, compreendendo a administração em um ser humano ou em um animal

de uma quantidade eficaz da formulação, como descrito em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato, em pelo menos um animal ou humano, compreendendo a administração em um ser humano ou em um animal de uma quantidade eficaz da formulação, como descrito em outra parte deste, sendo preferível que a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada compreenda a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e/ou células T citotóxicas CD8-positivas; mais preferivelmente, a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada compreende a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e a ativação de células T citotóxicas CD8-positivas.

A indução da resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada é medida preferivelmente pelos testes de resposta imunocelular como descritos em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epítipo de carboidrato compreendendo a administração de qualquer um dentre: a célula T ativada ou células T ativada(s) contra o epítipo de carboidrato, a composição celular compreendendo pelo menos uma célula T contra o o epítipo de carboidrato, a linhagem de células T contra o o epítipo de carboidrato ou o clone de célula T contra o o epítipo de carboidrato como descrito acima ou uma composição compreendendo-os.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epítipo de carboidrato compreendendo a administração de uma quantidade apropriada de pelo menos uma das células dendríticas funcionais contra o epítipo de carboidrato, tal como descrito acima, ou uma composição que as compreenda.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para tratar um paciente de câncer em que o paciente tem ou teve uma célula de câncer positiva de epitopo de carboidrato.

5 Em uma modalidade mais preferida, a invenção proporciona um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epitopo de carboidrato no qual a célula dendrítica funcional é autóloga.

10 Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epitopo de carboidrato no qual a célula dendrítica funcional é alogênica, originando-se de um doador.

15 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epitopo de carboidrato no qual a célula dendrítica funcional é derivada da MUTZ-3.

20 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epitopo de carboidrato no qual a célula dendrítica funcional partilha pelo menos uma molécula de classe MHC com o paciente mencionado.

25 A invenção proporciona ainda um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epitopo de carboidrato compreendendo a administração de qualquer um dentre: a célula T ativada ou células T ativada(s) contra o epitopo de carboidrato, a composição celular compreendendo pelo menos uma célula T contra o epitopo de carboidrato, uma linhagem de células T contra o epitopo de carboidrato ou o clone de célula T contra o epitopo de carboidrato descritos em outra parte deste ou uma composição compreendendo pelo menos um deles.

30 A invenção proporciona ainda um método para tratar um paciente de câncer ou um paciente sofrendo de uma doença associada ao epitopo de carboidrato compreendendo a administração de uma quantidade apropri-

ada de pelo menos uma das células dendríticas funcionais contra o epítipo de carboidrato descritas em outra parte deste ou uma composição que as compreenda.

5 Em uma modalidade preferida da invenção, pelo menos um dos métodos mencionados é usado para um paciente que tem ou teve uma célula cancerosa positiva de epítipo de carboidrato que é detectável por pelo menos uma molécula de ligação carboidrato ou anticorpo específico de epítipo de carboidrato e é descrito em sua modalidade preferida em outra parte deste.

10 Adicionalmente preferidos são os métodos mencionados nos quais a célula dendrítica funcional é autóloga, adicionalmente preferidos quando a célula dendrítica funcional é alogênica, adicionalmente preferidos quando a célula dendrítica funcional se origina de um doador, sendo ainda mais preferidos quando a célula dendrítica funcional é derivada da MUTZ-3,
15 ainda mais preferida quando qualquer uma das células dendríticas funcionais partilha pelo menos uma molécula de classe MHC com o indivíduo ao qual é administrada.

A invenção proporciona um método para a indução ou aumento de uma resposta imune-humoral e/ou celular específica contra o epítipo de carboidrato, contra a molécula veículo do epítipo de carboidrato ou contra
20 células tumorais positivas de epítipo de carboidrato ou células de patologia positivas de epítipo de carboidrato compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da composição farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da
25 fração do mesmo que estão descritas em outra parte deste, ou de formulações que os compreendam.

A invenção proporciona um método para induzir uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o epítipo de carboidrato, contra a molécula veículo do epítipo de carboidrato, contra as células tumorais positivas de epítipo de carboidrato ou contra as células de patologia
30 positivas de epítipo de carboidrato compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da

composição farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou formulações que os compreendam.

5 Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para induzir uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o epítipo de carboidrato em pelo menos um indivíduo compreendendo a ativação de células T auxiliares CD4-positivas de tipo Th1 e células T citotóxicas CD8-positivas contra o o epítipo de carboidrato, detectável por pelo menos um dos testes de resposta imune descritos em outra parte deste.

10 Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imune-humoral e celular específica contra o epítipo de carboidrato, contra a molécula veículo do epítipo de carboidrato ou contra as células tumorais positivas de epítipo de carboidrato ou contra as células de patologia positivas de epítipo de carboidrato compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, da composição farmacêutica ou do micro-
15 organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou formulações que os compreendem.

20 A invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imune epítipo carboidrato-específica que funciona como um escudo contra células de câncer ou de patologia positivas de epítipo de carboidrato por ter o potencial de destruir pelo menos uma célula de câncer ou de patologia positiva de epítipo de carboidrato.

25 Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para induzir uma resposta imune epítipo carboidrato-específica que funciona como um escudo contra células cancerosas positivas de epítipo de carboidrato por ter o potencial de destruir essas células como mostrado aqui, por exemplo, pela indução de anticorpos específicos de epítipo de carboidrato, pela indução de uma citotoxicidade complemento-dependente carboidrato-específica de anticorpos específicos de epítipo de carboidrato contra
30 células tumorais ou de células patológicas positivas de epítipo de carboidrato, destruindo-as eficazmente, e/ou pela secreção de TNF-alfa e/ou INF-

gama por respostas de células T específicas de epitopo de carboidrato que são marcos substitutos cientificamente reconhecidos por aqueles versados na técnica para uma destruição celular específica mediada por células T citotóxicas para aquelas células tumorais ou patológicas veículoas do epitopo de carboidrato, como mostrado nos exemplos e descrito neste, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que são descritos em outra parte deste, ou de formulações que os compreendem.

10 A invenção proporciona ainda um método para reduzir ou, ainda mais preferivelmente, para prevenir a ocorrência de um tumor, preferivelmente um tumor positivo de epitopo de carboidrato, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou de formulações que os compreendam, preferivelmente em um indivíduo saudável.

20 A invenção proporciona ainda um método para reduzir ou, ainda mais preferivelmente, para prevenir a ocorrência de uma doença, preferivelmente de uma doença positiva de epitopo de carboidrato, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou de formulações que os compreendam, preferivelmente em um indivíduo saudável.

25 A invenção proporciona ainda um método para reduzir ou, ainda mais preferivelmente, para prevenir a disseminação ou metástase de um tumor, preferivelmente de um tumor positivo de epitopo de carboidrato, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou de formulações que os compreendam.

A invenção proporciona ainda um método para tratar um tumor, preferivelmente um tumor positivo de epitopo de carboidrato, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou de formulações que os compreendam.

A invenção proporciona ainda um método para tratar uma doença, preferivelmente uma doença associada com o epitopo de carboidrato, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou de formulações que os compreendam.

A invenção proporciona ainda um método para reduzir ou, ainda mais preferivelmente, para prevenir a ocorrência de uma doença ou tumor positivo de epitopo de carboidrato, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico, ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, que estão descritos em outra parte deste, ou de formulações que os compreendam, preferivelmente em um indivíduo sadio.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção proporciona um método para a imunização ou vacinação de um ser humano ou um animal contra um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal compreendendo

(i) administração em um ser humano ou a um animal de uma quantidade eficaz de células imunes ou de um mistura de células compreendendo pelo menos uma célula imune direcionada contra o epitopo de carboidrato, como descrito em outra parte deste, e a indução de uma resposta imune pela célula imune mencionada no humano ou animal (inicialização) e

(ii) intensificação da resposta imune pela administração de uma quantidade eficaz de uma formulação como descrita em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção proporciona um método para a imunização ou vacinação de um ser humano ou um ani-

mal contra o epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal compreendendo

(i) administração a um ser humano ou a um animal de uma quantidade eficaz de células imunes ou de uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula imune direcionada contra o epitopo de carboidrato pelo menos uma vez e a indução de uma resposta imune pela célula imune mencionada no humano ou animal (inicialização) e

(ii) intensificação da resposta imune pela administração de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um micro-organismo carboidrato-positivo e/ou uma fração do mesmo.

A célula imune mencionada direcionada contra o epitopo de carboidrato por ser selecionada do grupo compreendendo célula ou células dendríticas, linhagem de células dendríticas, célula T ativada ou células T, linhagem de células T ou clone de célula T ou misturas compreendendo as mesmas, em que a célula imune mencionada é direcionada contra o epitopo de carboidrato. A geração das células imunes mencionadas é descrita em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida da invenção, a administração das células imunes mencionadas e a inicialização são realizadas uma vez.

Em outra modalidade preferida da invenção, a administração das células imunes mencionadas e a inicialização são realizadas duas vezes.

Em outra modalidade preferida da invenção, a administração das células imunes mencionadas e a inicialização são realizadas pelo menos de três a cinco vezes.

Em uma modalidade preferida da invenção, a intensificação da resposta imune pela administração de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um micro-organismo carboidrato-positivo e/ou uma fração do mesmo é realizada uma vez.

Em outra modalidade preferida da invenção, a intensificação é realizada 2-10 vezes, mais preferivelmente mais de 10 vezes, mais preferivelmente até 20 vezes, da maneira mais preferida a intensificação é realiza-

da continuamente em intervalos regulares em um período de vários meses a vários anos.

Em uma modalidade preferida da invenção, a intensificação da resposta imune é realizada 1-5 vezes próximo à inicialização e, depois, em intervalos de 3 meses a 1 ano ou de 1 ano a 10 anos.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para a indução de uma resposta imune celular e/ou humoral carboidrato-específica eficaz contra um epítipo de carboidrato, preferivelmente uma resposta citotóxica das células T, presente em uma molécula de uma célula humana ou animal compreendendo

i) administração oral de um nutracêutico compreendendo um micro-organismo carboidrato-positivo ou um lisado ou fração do mesmo a um ser humano ou animal

ii) repetição da administração oral para a indução de um escudo imune contra a ocorrência de uma doença caracterizada pela presença do epítipo de carboidrato.

O nutracêutico da presente invenção pode ser qualquer alimento ou aditivo alimentar ou suplemento dietético ou alimento medicinal ou alimento para uso medicinal específico ou alimento para uso dietético especial ou alimento funcional e pode ser aplicado sob diferentes formas, como descrito em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida da invenção, o nutracêutico é administrado a intervalos irregulares.

Em uma modalidade preferida da invenção, o nutracêutico é administrado a intervalos regulares de diariamente a semanalmente, mais preferivelmente é uma aplicação inicial de pelo menos um intervalo semanal por um período de 1-6 meses com intervalos regulares subsequentes de administração repetida.

Em uma modalidade preferida da invenção, o nutracêutico é usado como um alimento clínico. Em ainda outra modalidade preferida, o nutracêutico é usado antes e/ou após a realização de uma biópsia, preferencialmente de um tumor potencial. E ainda mais preferivelmente, o nutracêutico

é usado antes e/ou após a cirurgia de um tumor, preferivelmente um tumor positivo de epítipo de carboidrato. E ainda mais preferivelmente, o nutracêutico é usado em combinação com outros tratamentos.

5 Em outra modalidade preferida, a presente invenção proporciona um método para a vacinação ou imunização de um ser humano ou um animal contra o epítipo de carboidrato e/ou doenças ou tumores positivos de epítipo de carboidrato compreendendo

(ii) administração em um ser humano ou um animal de uma quantidade eficaz de células dendríticas funcionais ou de uma mistura de
10 células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica funcional direcionada contra o epítipo de carboidrato pelo menos uma vez e a indução de uma resposta imune pelas células dendríticas funcionais mencionadas no humano ou animal e

(iii) intensificação da resposta imune pela administração de uma
15 quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo e/ou fração e/ou lisado do mesmo pelo menos uma vez.

Em outra modalidade preferida, a presente invenção proporciona um método para a vacinação de um ser humano ou um animal contra um
20 epítipo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula humana ou animal e/ou doenças ou tumores carboidrato-positivos compreendendo

(i) administração em um ser humano ou um animal de uma quantidade eficaz de células T ativadas, clone de célula T, linhagem de células T ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T
25 ativada direcionada contra o epítipo de carboidrato pelo menos uma vez e a indução de uma resposta imune pelas células T ativadas mencionadas no humano ou no animal e

(ii) intensificação da resposta imune pela administração de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo o micro-organismo carboidrato-positivo e/ou fração e/ou lisado do mesmo pelo
30 menos uma vez.

A geração de células dendríticas funcionais, células T ativadas,

linhagens de células T e clones de células T é descrita em outra parte deste.

Em uma modalidade preferida da invenção, a administração de acordo com os métodos anteriores sob (i) é realizada uma vez.

Em outra modalidade preferida da invenção, a administração de
5 acordo com os métodos anteriores sob (i) é realizada duas vezes.

Em outra modalidade preferida da invenção, a administração de acordo com os métodos anteriores sob (i) é realizada pelo menos três a cinco vezes.

Em uma modalidade preferida da invenção, a intensificação da
10 resposta imune pela administração de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica de acordo com (ii) dos métodos anteriores é realizada uma vez; em outra modalidade preferida da invenção, a intensificação é realizada 2-10 vezes, mais preferivelmente mais de 10 vezes, mais preferivelmente até 20 vezes, mais preferivelmente a intensificação é realizada conti-
15 nuamente em intervalos regulares por um período de vários meses a vários anos.

Em uma modalidade preferida da invenção, a intensificação da resposta imune é realizada 1 a 5 vezes próximo à inicialização e depois a intervalos de 3 meses a 1 ano ou de 1 a 10 anos.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença e/ou tumor positivo de epitopo de carboidrato compreendendo a administração de uma quantidade apropriada de uma formulação, um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração do mesmo, uma célula dendrítica funcional ou uma célula T ativada,
20 linhagem de células T ou clone de célula T contra o epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato, como descrito em outra parte deste, em um ser humano ou animal.

A invenção proporciona um método para a redução ou, ainda
30 mais preferivelmente, para a prevenção, da disseminação de uma doença positiva de epitopo de carboidrato compreendendo a administração em um ser humano ou em um animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico ou

da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, que são descritos em outra parte deste, ou formulações que os compreendam.

5 A invenção proporciona um método para o tratamento de uma doença positiva de epitopo de carboidrato compreendendo a administração em um ser humano ou em um animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, que são descritos em outra parte deste, ou formulações que os compreendam.

10 A invenção proporciona um método para fortalecer o sistema imune ou para melhorar uma resposta imune compreendendo a administração em um ser humano ou em um animal de uma quantidade eficaz do nutracêutico ou da formulação farmacêutica, ou do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, que são descritos em outra parte deste, ou
15 formulações que os compreendam. Isso pode ser, por exemplo, mas não se limita a, uma melhoria geral da condição do sistema imune, por exemplo contra doenças infecciosas ou tumores, uma melhoria da atividade de outros agentes estimuladores da imunidade ou probióticos ou pré-bióticos, ou uma ação como adjuvantes.

20 Em uma modalidade preferida, o nutracêutico, ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo que são descritos em outra parte deste, ou formulações que compreendem aqueles dos métodos acima descritos compreendem pelo menos um micro-organismo, lisado ou a fração selecionada do grupo compreendendo a cepa *Bacteroides ovatus* AG6 (DSM 18726), a cepa *Bacteroides*
25 *ovatus* MU1 (DSM 18728) e/ou a cepa *Escherichia coli* LH2 (DSM 18727), mais preferivelmente da cepa AG6 e/ou MU1 depositada na "DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha), pela Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10,
30 13125 Berlim (Alemanha) em 20 de outubro de 2006.

O termo "formulação" significa qualquer substância ou composição de substâncias em uma forma apropriada para administração compre-

endendo pelo menos um dentre o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo ou a fração do mesmo que pode compreender um veículo farmacêuticamente aceitável ou um veículo aceitável para aditivos alimentares e/ou nutracêutico ou o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo ou apenas a fração do mesmo.

O termo "prevenir a ocorrência" se refere ao uso do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam, a um sujeito, com o objetivo de reduzir o risco ou da taxa de probabilidade de desenvolvimento de um câncer positivo de epítipo de carboidrato ou de uma doença positiva de epítipo de carboidrato.

A expressão "reduzir ou prevenir a disseminação de um tumor ou de uma doença ou metástase positiva de epítipo de carboidrato" se refere ao uso do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam, a um sujeito, com o objetivo de reduzir o risco ou da taxa de probabilidade de metástase ou disseminação da doença a outros órgãos ou outras partes do corpo ou a outros indivíduos.

O termo "tratamento" se refere ao uso do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam, a um sujeito, com o objetivo de curar, sarar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, melhorar ou afetar o câncer, os sintomas do câncer, a predisposição ao câncer, o tempo de sobrevivência ou o tempo de progressão.

A doença positiva de epítipo de carboidrato mencionada ou doença associada com tal epítipo de carboidrato ou doença caracterizada pela presença do dito epítipo de carboidrato é qualquer doença associada a um príon, vírus, micro-organismo, bactéria ou outro material biológico que pode sofrer ligação de pelo menos uma das moléculas de ligação a carboidratos, preferivelmente por pelo menos um dos anticorpos específicos de epítipo de carboidrato ou que está associado a um componente do corpo ou que ocorre

no corpo de um ser humano ou animal, tal como, mas sem limitação a, uma célula, micro-organismo, vírus ou partícula que sofre ligação de pelo menos uma das moléculas de ligação a carboidrato, preferivelmente ligação de pelo menos um dos anticorpos específicos de epitopo de carboidrato.

5 A quantidade eficaz de qualquer um dentre o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo, ou as formulações que os compreendam, compreende micro-organismos vivos ou mortos, ou lisados ou frações desses micro-organismos que correspondem a ou são derivados de cerca de 1×10^6 ou
10 1×10^{14} UFCs por pessoa por dia (UFCs /pessoa/dia), em que a UFC é uma unidade formadora de colônias, uma medida para um micro-organismo, tal como é do conhecimento de e pode ser determinado por aqueles versados na técnica.

 Em outra modalidade da invenção, a "quantidade eficaz" é a
15 quantidade do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam que induz uma resposta imune-humoral ou celular contra o epitopo de carboidrato em pelo menos um indivíduo, preferivelmente uma resposta imune-humoral e uma resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato, detectável por pelo menos um dos testes de resposta i-
20 mune contra o epitopo de carboidrato descritos em outra parte deste. Em outra modalidade da invenção, a quantidade eficaz é a quantidade do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam,
25 que induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o epitopo de carboidrato em pelo menos um indivíduo, preferivelmente compreendendo a ativação de células T auxiliares CD4-positivas de tipo Th1 e/ou de células T citotóxicas CD8-positivas contra o epitopo de carboidrato, detectável por pelo menos um dos testes de resposta imune descritos em
30 outra parte deste.

 Em outra modalidade da invenção, a quantidade eficaz é a quantidade do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-

organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam, necessária para conferir um escudo imune contra células tumorais positivas de epitopo de carboidrato, para ter um efeito profilático contra o câncer ou para ter um efeito terapêutico contra o câncer, ou para ter um efeito profilático ou terapêutico contra qualquer doença positiva de epitopo de carboidrato, cada um em pelo menos um indivíduo.

A quantidade eficaz para um indivíduo ou grupo de indivíduos pode ser determinada e/ou otimizada por aqueles versados na técnica, preferivelmente usando-se pelo menos um dos testes de resposta imune contra o epitopo de carboidrato descritos em outra parte deste e preferivelmente aquelas combinações de testes de resposta imune contra o epitopo de carboidrato que são descritos em outra parte deste como modalidades preferidas e/ou testes de resposta clínica conhecidos daqueles versados na técnica ou descritos em outra parte deste.

Essas quantidades eficazes podem variar das quantidades ou dosagens descritas acima ou quantidades ou dosagens preferidas descritas em outra parte deste para uma pessoa dependendo, por exemplo, do sujeito, do número e da programação das dosagens, do formato ou formulação do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo, da via e da programação de administração ou do objetivo para o qual ela é usada, tal como profilaxia ou tratamento, do estado de uma doença ou câncer positivo de epitopo de carboidrato, e elas podem variar dependendo da espécie, das raças, e entre um ser humano ou animal individual que recebe o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo, ou as formulações que os compreendam. Aqueles versados na técnica são capazes de determinar a dosagem apropriada e/ou ótima, a via de administração e a programação para um indivíduo ou para um grupo de indivíduos, preferivelmente usando-se a descrição e a modalidade da invenção descrita neste.

São preferidas aquelas quantidades e dosagens eficazes do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam

que induzem ou aumentam a resposta imune mencionada contra o epitopo de carboidrato em mais do que um indivíduo, mais preferivelmente em um número significativo de indivíduos, mais preferivelmente em pelo menos 10%, mais preferivelmente em pelo menos 20%, mais preferivelmente em 5 pelo menos 30%, mais preferivelmente em pelo menos 40%, mais preferivelmente em pelo menos 50% e, da maneira mais preferível, na maioria dos indivíduos.

Em uma modalidade preferida, a quantidade eficaz é a quantidade do nutracêutico mencionado, da composição farmacêutica mencionada, do micro-organismo carboidrato-positivo mencionado, ou da fração do 10 mesmo mencionada, ou de formulações que os compreendam, conforme mencionado, que induz uma resposta imune contra o epitopo de carboidrato em pelo menos um indivíduo.

Em uma modalidade preferida, a resposta imune induzida ou 15 aumentada mencionada é uma resposta imune-humoral e uma resposta imunocelular contra o epitopo de carboidrato detectável por pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e por um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5.

Em uma modalidade preferida, a quantidade eficaz é a quantidade do nutracêutico mencionado, da composição farmacêutica mencionada, do micro-organismo carboidrato-positivo mencionado, ou da fração do 20 mesmo mencionada, ou de formulações que os compreendam, conforme mencionado, necessárias para conferir um escudo imune contra células tumorais positivas de epitopo de carboidrato, para ter um efeito profilático contra o câncer ou para ter um efeito terapêutico contra o câncer ou para ter um 25 efeito profilático ou terapêutico contra outra doença positiva de epitopo de carboidrato, cada qual em pelo menos um indivíduo. Em outra modalidade preferida, a quantidade eficaz é a quantidade do nutracêutico mencionado, da composição farmacêutica mencionada, do micro-organismo carboidrato-positivo mencionado, ou da fração do mesmo mencionada, ou de formulações que os compreendam, conforme mencionado, que induz a resposta 30 imune máxima ou próxima da máxima contra o epitopo de carboidrato em

pelo menos um indivíduo.

Em uma modalidade ainda mais preferida, a quantidade eficaz preferida é a quantidade do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam que induz as respostas imunes máximas ou próximas das máximas contra o epítipo de carboidrato conforme detectado nos testes de resposta imune contra o epítipo de carboidrato por aqueles versados na técnica, em que esta resposta imune máxima não precisa ser tal que seja positiva em todos os testes de resposta imune, mas preferivelmente que dê as respostas de anticorpos máximas ou maiores titulações de anticorpos contra o epítipo de carboidrato e/ou as maiores respostas das células T contra o epítipo de carboidrato e, mais preferivelmente, contra as células tumorais positivas de epítipo de carboidrato, mais preferivelmente ambas, e, da maneira mais preferível, aquelas que aparecem pelo menos nos testes de resposta imune-humoral de 1 a 3 contra epítipo de carboidrato, as titulações de anticorpos mais altas e/ou pelo menos nos testes de resposta imunocelular 1 ou 2 ou 3 as respostas de células T mais altas contra o epítipo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida, a quantidade eficaz do nutracêutico mencionado, da composição farmacêutica mencionada, do micro-organismo carboidrato-positivo mencionado, ou da fração do mesmo mencionada, ou de formulações compreendendo micro-organismos vivos ou mortos, ou lisados ou frações desses micro-organismos que correspondem a ou são derivados de 1×10^6 a 1×10^{14} Cfu por indivíduo por dose.

Em uma modalidade mais preferida, a quantidade eficaz do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam, compreende micro-organismos vivos ou mortos, lisados ou frações desses micro-organismos que correspondem a ou são derivados de 1×10^7 a 1×10^{13} Cfu/pessoa/dia, mais preferivelmente 2×10^8 a 1×10^{12} e, mais preferivelmente, 1×10^9 - 1×10^{11} Cfu/pessoa/dia.

As quantidades eficazes ou dosagens eficazes também podem va-

riar, como é reconhecido por aqueles versados na técnica, dependendo da via de administração, do uso de excipientes e da possibilidade de combinação com outros agentes, tais como aqueles para aumento da imunidade, para indução de uma resposta imune, para formar um escudo imune ou para prevenir ou tratar o câncer.

As quantidades eficazes ou dosagens eficazes também podem variar, como é reconhecido por aqueles versados na técnica, dependendo do formato de uso, tal como uso como o nutracêutico, como a composição farmacêutica, como o micro-organismo carboidrato-positivo, como a fração do mesmo, ou como as formulações que os compreendam, assim como se compreenderem micro-organismos vivos ou mortos, lisados ou frações dos mesmos, assim como o número de doses, assim como dos intervalos temporais entre doses. Esses fatores podem ser determinados e otimizados por aqueles versados na técnica, preferivelmente mediante o uso da invenção, testes e métodos da invenção proporcionados.

Em uma modalidade preferida, o nutracêutico é administrado oralmente desde mais de uma dose diária, a uma dose diária, semanal ou mensal, de um intervalo temporal curto a uso por um ano, sendo preferível diariamente ou semanalmente por 4 semanas a dois anos.

Em outra modalidade preferida, uma única dose é administrada a um indivíduo.

Em outra modalidade preferida, doses múltiplas são administradas a um indivíduo.

Em outra modalidade preferida, a quantidade eficaz corresponde a uma dose única.

Em outra modalidade preferida, a quantidade eficaz corresponde a doses múltiplas.

Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica pode ser administrada sistemicamente começando com apenas uma dose até muitas doses, preferivelmente de semanalmente a mensalmente, até 3 doses mensais ou 6 doses mensais ou uma combinação escalonada das mesmas, e pode ser combinada com uma renovação da imunização de uma

vez a cada seis meses a anualmente, de uma vez a cada 5 anos a uma vez a cada dez anos.

Em outra modalidade preferida da invenção, a dosagem eficaz da formulação do nutracêutico compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo ou lisado ou fração do mesmo em seres se-
5 res humanos é de $0,1 \text{ mg/m}^2 - 10 \text{ g/m}^2$, mais preferivelmente de $10 \text{ mg/m}^2 - 10 \text{ g/m}^2$ e ainda mais preferivelmente de $0,1 \text{ mg/m}^2 - 10 \text{ g/m}^2$.

Em outra modalidade preferida, a formulação é administrada primeiro sistemicamente e com renovações orais subsequentes da imuniza-
10 ção.

O termo "administração" significa promover o contato entre um ser humano ou um animal e uma quantidade eficaz do nutracêutico do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo, ou da fração do mesmo, ou de formulações que os compreendam,
15 para os quais veículos adicionais podem ser usados. As vias de administração incluem qualquer via para colocar o humano ou animal em contato com o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo, ou com as formulações que os compreendam. São preferidas aquelas vias de administração tais como, mas sem limi-
20 tação a, administração oral, administração sistêmica, administração via inalação ou pelo contato com a pele ou outra epiderme, que levam a uma resposta imune contra o epítipo de carboidrato, a um escudo imune contra o epítipo de carboidrato ou contra as células tumorais positivas de epítipo de carboidrato, a um efeito profilático contra o câncer ou a um efeito terapêutico
25 contra o câncer, que pode ser determinado em suas formas preferidas como acima descrito ou em outra parte deste. Aqueles versados na técnica podem selecionar a via de administração mais apropriada.

Exemplos para vias e de vias preferidas de administração e de formulações estão descritos a seguir:

30 Os nutracêuticos são preferivelmente administrados por via oral, por exemplo seja como cápsulas, comprimidos, emulsões, pós, líquidos, sob a forma de qualquer alimento ou bebida, ou como um componente de um

alimento ou de uma bebida tal como um aditivo alimentar. O nutracêutico pode ser administrado sozinho ou misturado com pelo menos um outro ingrediente; pode ser dado sozinho ou misturado com um alimento ou bebida.

5 Uma formulação para administração oral do nutracêutico, mas também da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou de formulações que os compreendam, podem ser qualquer forma oralmente aceitável de dosagem ou quantidade eficaz do nutracêutico, da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou de formulações que os com-
10 preendam incluindo, mas sem limitação a, comprimidos, cápsulas, nanopartículas, emulsões e suspensões aquosas, dispersões e soluções. Veículos comumente usados para comprimidos incluem lactose e amido de milho. Agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, também são normalmente acrescentados a comprimidos. Para administração oral sob a for-
15 ma de cápsula, diluentes úteis incluem lactose e amido de milho seco. Quando suspensões aquosas ou emulsões são administradas oralmente, o ingrediente ativo pode ser suspenso ou dissolvido em uma fase oleosa combinada com agentes emulsificantes ou suspensores. Se desejado, certos agentes adoçantes, aromatizantes ou corantes podem ser adicionados.

20 Uma formulação para administração oral pode ser qualquer forma de dosagem oralmente aceitável ou quantidade eficaz do nutracêutico da composição farmacêutica, do micro-organismo carboidrato-positivo ou da fração do mesmo ou de formulações que os compreendam incluindo, mas sem limitação a, comprimidos, cápsulas, nanopartículas, emulsões e solu-
25 ções aquosas, dispersões e soluções. Veículos comumente usados para comprimidos incluem lactose e amido de milho. Agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, também são normalmente acrescentados a comprimidos. Para administração oral sob a forma de cápsula, diluentes úteis incluem lactose e amido de milho seco. Quando soluções aquosas ou
30 emulsões são administradas oralmente, o ingrediente ativo pode ser suspenso ou dissolvido em uma fase oleosa combinada com agentes emulsificantes ou suspensores. Se desejado, certos agentes adoçantes, aromatizan-

tes ou corantes podem ser adicionados.

A formulação da presente invenção pode ser administrada oral ou parenteralmente. A administração parenteral inclui injeções tais como infusão por soro, injeções hipodérmicas, intravenosas ou intramusculares, aplicação transdermal com ungüentos ou fármaco transdermal e aplicação retal com supositório. Quando a composição é administrada oralmente, ela pode ser preparada sob a forma de uma cápsula rígida, cápsula macia, grânulo, pó, grânulo fino, pílula, trocisco, sistema de liberação gradual do ingrediente ativo, líquido e suspensão. A preparação pode ser facilmente realizada por métodos convencionais do campo farmacêutico.

O modo de administração e as formas de dosagem afetarão, é claro, as quantidades terapêuticas dos compostos e das composições desejáveis e eficazes para a aplicação de tratamento dada. Quando a formulação da presente invenção for preparada sob a forma de administração oral, a composição pode ser preparada usando-se ingredientes farmacêuticos convencionais em um fármaco normal, tais como agente de enchimento, extensor, aglutinante, desintegrador, tensoativo, diluentes tais como lubrificantes e excipientes. Exemplos particulares dos ingredientes convencionais incluem recipientes tais como lactose, açúcar branco, cloreto de sódio, glicose, ureia, amido, carbonato de cálcio, caulim, celulose cristalina e ácido silícico; aglutinantes tais como água, etanol, xarope simples, glicose líquida, amido líquido, solução de gelatina, carboximetilcelulose, goma laca, metilcelulose, fosfato de potássio e polivinilpirrolidona; agentes desintegradores tais como amido seco, alginato de sódio, ágar em pó, laminaran em pó, bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, lauril sulfato de sódio, ácido esteárico monoglicerídeo, amido e lactose; inibidores de determinação tais como açúcar branco, ácido esteárico, manteiga de cacau e óleo hidrogenado; absorventes tais como sal de amônio quaternário, e lauril sulfato de sódio; agentes umidificantes tais como glicerina e amido; agentes absorventes tais como amido, lactose, caulim, bentonita e ácido silicilico coloidal; e lubrificantes tais como talco purificado e estearato. Caso necessário, a preparação inclui ainda corantes, conservantes, perfume, agente aro-

matizante e agente adoçante. Sais farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos daqueles versados na técnica e incluem sais básicos de ácidos inorgânicos e orgânicos, tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido fenilacético e ácido mandélico. Além disso, sais farmaceuticamente aceitáveis de compostos da presente invenção podem também ser formados com um cátion farmacêuticamente aceitável, por exemplo, caso um grupo substituto compreenda uma porção caboxila. Cátions farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica e incluem cátions alcalinos, cátions alcalinos de amônio terroso e cátions quaternários de amônio.

Em uma modalidade preferida, a via de administração da composição farmacêutica é selecionada do grupo consistindo em injeção intravenosa, injeção intraperitoneal, injeção intramuscular, injeção intracranial, injeção intratumoral, injeção intraepitelial, administração transcutânea, administração esofageal, administração intra-abdominal, administração intra-apendicular, administração intra-arterial, administração intra-articular, administração intrabrônquica, administração intrabucal, administração intracapsular, administração intracardiaca, administração intracartilaginosa, administração intracavitária, administração intracefálica, administração intracólica, administração intracutânea, administração intracística, administração intradermal, administração intraductal, administração intraduodenal, administração intrafascicular, administração no tecido adiposo, administração intrafilamentar, administração intrafissural, administração intragástrica, administração intraglandular, administração intra-hepática, administração inaintestinal, administração intramelar, administração intralesional, administração intraligamentosa, administração intralingual, administração intramamária, administração intramedular, administração intramenínica, administração intramiocárdica, administração intranasal, administração intraocular, administração intraoperatória, administração intraoral, administração intraóssea, administração intraovária, administração intrapancreática, administração intraparie-

tal, administração intrapélvica, administração pericárdica, administração intraperineal, administração intraperitoneal, administração intraplacental, administração intrapleural, administração intrapontina, administração intrapros-tática, administração intrapulmonar, administração intrarraquidiana, adminis-
 5 tração intrarretal, administração intrarrenal, administração intraescleral, ad-
 ministração intraescrotal, administração intrassegmentar, administração in-
 trasselar, administração intraespinhal, administração intraesplênica, adminis-
 tração intraesternal, administração intraestromal, administração intrassinovi-
 al, administração intratarssal, administração intratesticular, administração
 10 intratorácica, administração intratonsilar, administração intratraqueal, admi-
 nistração intratubária, administração intratimpânica, administração intraurete-
 ral, administração intrauretral, administração intrauterina, administração in-
 travaginal, administração intravascular, administração intraventricular, admi-
 nistração intravertebral, administração intravesical e administração intraví-
 15 trea.

Em uma modalidade mais preferida da invenção, exemplos de
 vias de administração (=contato) incluem administração parenteral, por e-
 xemplo, intravenosa, intradermal, subcutânea, oral, transdermal (tópica),
 transmucosal, intraperitoneal, intranasal, retoenteral e oral.

20 Uma formulação da presente invenção pode incluir sais farma-
 ceuticamente aceitáveis dos seus componentes. Sais farmaceuticamente
 aceitáveis incluem sais que são formados com ácidos orgânicos tais como,
 por exemplo, ácidos clorídricos ou fosfóricos, ou ácidos orgânicos tais como
 ácido acético, tartárico, ácido mandélico e similares. Sais formados com os
 25 grupos carboxila livres também podem ser derivados de bases inorgânicas
 tais como, por exemplo, sódio, potássio, cálcio ou hidróxidos férricos e tais
 bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, his-
 tidina, procaína e similares. Veículos fisiologicamente toleráveis tais são bem
 conhecidos na técnica. Exemplos de veículos líquidos são soluções aquosas
 30 estéreis que não contêm materiais além dos ingredientes ativos e água, ou
 contêm um tampão tal como fosfato de sódio, a um valor de pH fisiológico,
 soro fisiológico ou ambos, tais como solução salina com tampão fosfato. A-

lém disso, veículos aquosos podem conter mais que um tampão salino, assim como sais tais como cloretos de sódio e de potássio, dextrose, propilenoglicóis, polietilenoglicóis e outros solutos. Composições líquidas podem também conter fases líquidas além de e excluindo água. Exemplos de tais

5 fases líquidas são glicerina, óleos vegetais tais como óleo de semente de algodão, ésteres orgânicos tais como oleato de etila e emulsões água-óleo. Uma formulação contém um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo da presente invenção, normalmente uma quantidade pelo

10 menos 0,1 peso percentual de micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo em peso da composição total. Um peso percentual é uma proporção em peso de um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo da composição total. Assim, por exemplo, 0,1 por cento em peso é 0,1 grama de um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo por 100 gramas da composição total.

15 O termo "sal farmaceuticamente aceitável" se refere àqueles sais de compostos que retêm a efetividade biológica e as propriedades das bases livres e que são obtidos por reação com ácidos inorgânicos tais como o ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-

20 toluenossulfônico, ácido salicílico e similares. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, por exemplo, sais de metais alcalinos, tais como o sódio e potássio, sais de terras alcalinas e sais de amônia.

A formulação compreendendo como ingrediente ativo o micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo, pode estar em

25 uma forma apropriada para o uso oral, por exemplo, como comprimidos, trociscos pastilhas, suspensões aquosas ou oleosas, pós ou grânulos dispersíveis, emulsões, cápsulas rígidas ou macias, ou xaropes ou elixires. Composições destinadas a uso oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido na técnica para a fabricação de composições farmacêuti-

30 cas e tais composições podem conter um ou mais agentes selecionados do grupo consistindo em agentes adoçantes, agentes aromatizantes, agentes corantes e agentes preservantes para proporcionar preparações farmaceuti-

camente elegantes e palatáveis. Comprimidos contêm o ingrediente ativo em mistura com excipientes não-tóxicos e farmacologicamente aceitáveis que são adequados para a fabricação de comprimidos. Esses excipientes podem ser, por exemplo, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato de sódio, lactose, fosfato de cálcio ou fosfato de sódio; agentes granuladores e desintegradores, por exemplo, amido de milho ou ácido algínico; agentes aglutinantes, por exemplo, amido, gelatina ou acácia, e agentes lubrificantes, por exemplo, estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Os comprimidos podem ser não-revestidos ou podem ser revestidos por técnicas conhecidas para adiar a desintegração e absorção no trato gastrointestinal e, assim, proporcionar uma ação prolongada por um período mais extenso. Por exemplo, um material de retardo tal como o monoesterato de glicerila ou diesterato de glicerila pode ser empregado. Eles podem também ser revestidos pelas técnicas descritas nas patentes US 4.256.108, 4.166.452 e 4.265.874 para formar comprimidos terapêuticos osmóticos para o controle da liberação. A formulação de acordo com a presente invenção pode também, ou alternativamente, conter um ou mais fármacos, que podem ser ligadas a um agente modulador ou podem ficar livres dentro da composição. Virtualmente qualquer fármaco pode ser administrado em combinação com um agente modulador como aqui descrito, para uma variedade de objetivos, como descrito abaixo. Exemplos de tipos de fármacos que podem ser administrados com um agente modulador incluem analgésicos, anestésicos, antifúngicos, antibióticos, fármacos contra o câncer (por exemplo, taxol ou mitomicina C), anti-inflamatórios (por exemplo, ibuprofeno e indometacina), anti-helmínticos, antidepressivos, antídotos, antieméticos, anti-histamínicos, anti-hipertensivos, antimaláricos, agentes antimicrotúbulo (por exemplo, colchicina ou vinca alcalóides), agentes anti-ansiedade, antimicrobianos, antipsicóticos, antipiréticos, antissépticos, agentes como, p. ex., inibidores da proteína quinase C ou inibidores da mobilização do cálcio intracelular, antiartríticos, agentes antitrombina, antituberculínicos, antitussivos, antivirais, supressores do apetite, fármacos cardioativos, fármacos para dependência química, catárticos, agentes quimioterapêuticos, vasodilatadores coronarianos,

cerebrais ou periféricos, agentes contraceptivos, depressivos, diuréticos, fatores de crescimento, agentes hormonais, hipnóticos, agentes imunossuppressores, antagonistas narcóticos, parassimpatomiméticos, sedativos, estimulantes, simpatomiméticos, toxinas (por exemplo, toxina da cólera), tranquilizantes e anti-infecciosos urinários.

Formulações para uso oral podem também ser apresentadas como cápsulas rígidas de gelatina nas quais o ingrediente ativo está misturado com um diluente sólido inerte, por exemplo, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio ou caulim, ou como cápsulas de gelatina macia nas quais o ingrediente ativo está misturado com água ou um meio oleoso, como, por exemplo, óleo de amendoim, parafina líquida ou óleo de oliva. Suspensões aquosas contêm os materiais ativos em mistura com excipientes adequados para a produção de suspensões aquosas. Tais excipientes são agentes suspensores, por exemplo, carboximetilcelulose, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto e goma acácia; agentes dispersantes ou umidificantes podem ser um fosfatídeo de ocorrência natural, por exemplo lecitina, ou produtos de condensação ou um óxido de alquilenos com ácidos graxos, por exemplo, estearato de polioxietileno ou produtos de condensação de óxido de etileno com álcoois alifáticos de cadeia longa, por exemplo, heptadecaetileno oxietanol, ou produtos de condensação de óxido de etileno com ésteres parciais derivados de ácidos graxos e um hexitol tal como polioxietileno com ésteres parciais derivados de ácidos graxos e hexitol anidridos, por exemplo polioxietileno sorbitano monooleato. As suspensões aquosas podem também conter um ou mais preservantes, por exemplo p-hidroxibenzoato de etila ou n-propila, um ou mais agentes corantes, um ou mais agentes aromatizantes e um ou mais agentes adoçantes, tais como sacarose ou sacarina.

Suspensões oleosas podem ser formuladas por suspensão do ingrediente ativo em um óleo vegetal, por exemplo óleo de *arachis*, óleo de oliva ou óleo de coco, ou em um óleo mineral tal como parafina líquida. As suspensões oleosas podem conter um agente espessante, por exemplo cera de abelha, parafina dura ou álcool cetílico. Agentes adoçantes tais como a-

queles mencionados acima e agentes aromatizantes podem ser adicionados para proporcionar uma preparação oral palatável. Essas composições podem ser conservadas pela adição de uma antioxidante tal como o ácido ascórbico.

5 Pós e grânulos dispersantes apropriados para a preparação de uma suspensão aquosa pela adição de água para proporcionar o ingrediente ativo em mistura com um agente dispersante ou umidificante, agente sus-
pensor e um ou mais conservantes. Agentes dispersantes ou umidificantes
apropriados e agentes suspensores são exemplificados, por exemplo, por
10 agentes adoçantes, aromatizantes e corantes, podem também estar presen-
tes.

 A formulação da invenção também pode estar na forma de e-
mulsões de óleo-em-água. A fase oleosa pode ser um óleo vegetal, por e-
xemplo, óleo de oliva ou óleo de arachis, ou um óleo mineral, por exemplo,
15 parafina líquida, ou misturas desses. Agentes emulsificantes adequados po-
dem ser gomas de ocorrência natural, por exemplo, goma de acácia ou go-
ma de tragacanto, fosfatídeos de ocorrência natural, por exemplo, soja, leci-
tina, e ésteres ou ésteres parciais derivados de ácidos graxos e anidridos de
hexitol, por exemplo, monooleato de sorbitano e produtos de condensação
20 dos referidos ésteres parciais com óxido de etileno, por exemplo, monoolea-
to de sorbitano e polioxietileno. As emulsões podem também conter agentes
adoçantes e flavorizantes.

 Xaropes e elixires podem ser formulados com agentes adoçan-
tes, por exemplo glicerol, propilenoglicol, sorbitol e sucrose. Tais formula-
25 ções podem também conter um demulcente, um conservante e agentes a-
romatizantes e corantes. As composições farmacêuticas podem estar sob a
forma de um suspensão aquosa ou oleagenosa injetável estéril. Essa sus-
pensão pode ser formulada de acordo com a técnica conhecida usando-se
aqueles agentes dispersantes, umidificantes ou suspensores que foram
30 mencionados acima. A preparação injetável estéril pode também estar em
uma solução ou suspensão estéril injetável ou em um solvente não-tóxico
parentalmente aceitável, por exemplo como absolução em 1,3-butanodiol.

Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem estar usados estão água, solução de Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. Além disso, óleos estéreis, estáveis são convencionalmente empregados como solventes ou meios de suspensão. Para este fim, qualquer óleo estável insípido pode ser empregado, incluindo mono ou diglicerídeos sintéticos. Além disso, ácidos graxos tais como ácido oleico encontram uso na preparação de injetáveis. Níveis de dosagem da ordem de 0,01 mg a cerca de 140 mg por quilograma de peso corporal por dia são úteis no tratamento das condições indicadas acima (cerca de 2,5 mg a 7 g por paciente por dia). Por exemplo, um tumor positivo de epitopo de carboidrato pode ser eficazmente tratado pela administração de cerca de 0,01 a 50 mg do composto por quilograma de peso corporal por dia (cerca de 0,5 mg até cerca de 3,5 g por paciente por dia). A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com os materiais veículos para produzir uma única dosagem variará dependendo do hospedeiro tratado e do modo específico de administração. Por exemplo, uma formulação destinada a administração oral em seres humanos pode variar de cerca de 5 a cerca de 95% da composição total. As formas das unidades de dosagem conterão geralmente entre cerca de 1 mg a cerca de 10 g de ingrediente ativo. Será compreendido, contudo, que o nível de dosagem específico de qualquer paciente particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do composto específico empregado, da idade, do peso corporal, da saúde geral, do sexo, do tempo de administração da dieta, da via de administração, da taxa de excreção, da combinação farmacosa e da gravidade da doença particular sob terapia. A quantidade de dosagem eficaz dos compostos de acordo com a invenção variará dependendo de fatores que incluem o composto específico, a toxicidade e a atividade inibitória, da condição tratada e de se o composto é administrado sozinho ou com outras terapias. Normalmente, uma quantidade de dosagem eficaz ficará na faixa de cerca de 0,0001 mg/kg a 1500 mg/kg, mais preferivelmente de 1 a 1000 mg/kg, mais preferivelmente de 1 a 150 mg/kg de peso corporal e, da maneira mais preferida, entre 50 a 100 mg/kg de peso corporal. A invenção refere-se também a um processo ou a um método para o tratamento das

condições patológicas supramencionadas. Os compostos da presente invenção podem ser administrados profilaticamente ou terapeuticamente, de preferência em uma quantidade eficaz contra os distúrbios mencionados, em um animal de sangue quente, por exemplo um ser humano, com necessidade de tal tratamento; os compostos são usados preferivelmente sob a forma de composições farmacêuticas ou nutracêuticas.

A formulação de excipientes e soluções transportadoras farmacêuticamente aceitáveis é bem conhecida daqueles versados na técnica, assim como o desenvolvimento de regimes de dosagem e de tratamento apropriados para o uso das composições particulares aqui descritas em uma variedade de regimes de tratamento, incluindo administrações e formulações orais, parenterais, intravenosas, intranasais e intramusculares.

A. Administração oral

Em certas aplicações, as formulações aqui reveladas podem ser administradas por via oral a um ser humano ou a um animal. Como tais, essas composições podem ser formuladas com um diluente inerte ou com um veículo comestível assimilável, ou podem ser acomodadas em cápsulas de gelatina rígida ou macia, ou podem ser incorporadas diretamente com o alimento da dieta.

Os compostos ativos podem até mesmo ser incorporados com excipientes e usados sob a forma de comprimidos ingeríveis, pastilhas bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes e similares. Os comprimidos, pastilhas, pílulas, cápsulas e similares podem conter também os seguintes: um aglutinante, como goma tragacanto, acácia, amido de milho ou gelatina; excipientes, tais como fosfato dicálcico; um agente desintegrador, tal como amido, amido de batata, ácido algínico e similares; um lubrificante, tal como estearato de magnésio; e um agente adoçante, tal como sacarina, lactose ou sacarina podem ser adicionados a um agente aromatizante, tal como pimenta, óleo de gualitéria, ou aromatizante de cereja. Quando a forma de unidade de dosagem for uma cápsula, ela pode conter, além dos materiais do tipo acima, um veículo líquido. Vários outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou para modificar de outra maneira a

forma física da unidade de dosagem. Por exemplo, comprimidos, pílulas ou cápsulas podem ser revestidas com goma laca, açúcar ou ambos. Um xarope ou elixir pode conter o composto ativo sacarose como agente adoçante, metil e propilparabeno como preservantes, uma tintura e aromatizante, tal como aroma de cereja ou laranja. É claro que qualquer material usado na
5 preparação de qualquer unidade de dosagem deve ser farmacêuticamente puro e substancialmente não-tóxico nas quantidades empregadas. Além disso, os compostos ativos podem ser incorporados em preparados e formulações de liberação prolongada.

10 Normalmente, essas formulações podem conter pelo menos 0,1% do composto ativo ou mais, ainda que o percentual do(s) ingrediente(s) ativo(s) possa(m), é claro, variar ficar convenientemente entre cerca de 1 a 2% e cerca de 60% ou 70% ou mais do peso ou do volume da formulação total. Naturalmente, a quantidade do(s) composto(s) ativo(s) em cada com-
15 posição terapeuticamente útil pode(m) ser preparada(s) de tal maneira que uma dosagem apropriada seja obtida em qualquer unidade de dosagem do composto. Fatores tais como a solubilidade, biodisponibilidade, meia-vida biológica, via de administração, prazo de validade do produto, assim como outras considerações farmacológicas serão contempladas por aquele versa-
20 do na técnica de preparação de tais formulações farmacêuticas e, como tais, uma variedade de regimes de dosagem e de tratamento podem ser desejáveis.

Para a administração oral, as composições da presente invenção podem alternativamente ser incorporadas com um ou mais excipientes
25 sob a forma de um colutório bucal, dentifrício, pastilha bucal, spray oral ou formulação de administração sublingual. Por exemplo, um colutório bucal pode ser preparado incorporando-se o ingrediente ativo na quantidade exigida em um solvente apropriado, tal como uma solução de borato de sódio (solução de Dobell). Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser incorpo-
30 rado em uma solução oral tal como uma solução contendo borato de sódio, glicerina e bicarbonato de potássio, ou dispersada em um dentifrício, ou adicionada em uma dose terapeuticamente eficaz em quantidade igualmente

eficaz a uma composição que pode incluir água, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes e umectantes. Alternativamente, as composições podem ser moldado sob a de forma de comprimido ou solução que possa ser colocada sob a língua ou de outra maneira dissolvida na boca.

5 B. Administração injetável

Em certas circunstâncias, pode ser desejável administrar as formulações aqui reveladas por via parenteral, intravenosa, intramuscular ou até mesmo intraperitoneal. Soluções dos compostos ativos sob a forma de bases livres ou sais farmacologicamente aceitáveis podem ser preparadas
10 em água apropriadamente misturada com um tensoativo tal como hidroxipropilcelulose. Dispersões podem também ser preparadas em glicerol, polietilenoglicóis líquidos e misturas dos mesmos e em óleos. Em condições normais de armazenamento e uso, esses preparados contêm um preservante para impedir o crescimento de micro-organismos.

15 As formas farmacêuticas apropriadas para uso injetável incluem soluções estéreis aquosas ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções e dispersões estéreis injetáveis. Em todos os casos, a forma deve ser estéril e deve ser fluida ao ponto de ser facilmente colocada em uma seringa. Deve ser estável sob as condições de produção e
20 armazenamento e deve ser preservada contra a ação contaminadora de micro-organismos tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um meio solvente ou dispersivo contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquidos e similares), misturas apropriadas dos mesmos e/ou óleos vegetais. Fluidez apropriada pode
25 ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula exigido no caso de uma dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser facilitada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timesoral e similares. Em mui-
30 tos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser realizada pelo uso de composições de agentes retardadores da absor-

ção, por exemplo, monoesterato de alumínio e gelatina.

Para administração parenteral em uma solução aquosa, por exemplo, a solução deve ser apropriadamente tamponada se necessário e o diluente líquido primeiro tornado isotônico com suficiente solução salina ou glicose. Essas soluções aquosas em particular são especialmente apropriadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Nesse contexto, um meio aquoso estéril que pode ser empregado será conhecido daqueles versados na técnica à luz da presente revelação. Por exemplo, uma dosagem pode ser dissolvida em 1 ml de solução isotônica de NaCl e ou adicionada a 1000 ml de fluido para hipodermóclise ou injetada no sítio proposto de infusão. Alguma variação na dosagem será necessária dependendo da condição do sujeito em tratamento. A pessoa responsável pela administração determinará, de qualquer modo, a dose apropriada para o sujeito individual. Além do mais, para administração humana, os preparados devem satisfazer os padrões de esterilidade, pirogenicidade e os padrões gerais de segurança exigidos pelos escritórios nacionais ou regionais de padrões biológicos.

Soluções estéreis injetáveis são preparadas pela incorporação dos compostos ativos na quantidade exigida no solvente apropriado com vários dos outros ingredientes enumerados acima, como necessário, e em seguida sofrer esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas pela incorporação dos vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio dispersivo básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções estéreis injetáveis, os métodos preferidos de preparação são técnicas de secagem a vácuo e que produzem um pó com o ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução estéril previamente filtrada do mesmo.

As composições reveladas neste podem ser formuladas sob uma forma neutra ou salina. Sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com o grupo amina livre da proteína) e que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácidos

hidroclóricos ou fosfóricos, ou tais ácidos orgânicos como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico e similares. Sais formados com os grupos carboxila livres podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio ou hidróxidos férricos e bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína e similares. Quando da formulação, as soluções serão administradas de uma maneira compatível com a formulação da dosagem e em tal quantidade como for terapêuticamente efetivo. As formulações são facilmente administradas em uma variedade de formas de administração, tais como soluções injetáveis, cápsulas de liberação de fármacos e similares.

Da forma como aqui utilizado, o termo "veículo" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento de absorção, tampões, soluções transportadoras, suspensões, colóides e similares. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio convencional for incompatível com o ingrediente ativo, o seu uso nas composições terapêuticas é contemplado. Ingredientes ativos suplementares podem também ser incorporados às composições.

A expressão "farmacêuticamente aceitável" se refere a entidades e composições moleculares que não produzem uma reação alérgica ou reação indesejada similar quando administrado em um ser humano. O preparado de uma composição aquosa que contém uma proteína como ingrediente ativo é bem compreendida na técnica. Normalmente, tais composições são preparadas como composições injetáveis, seja como soluções solúveis ou suspensões; formas sólidas apropriadas para solução em, ou suspensão em, um líquido antes da injeção também podem ser preparadas. O preparado pode também ser emulsificado.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imuno específica de epitopo de carboidrato e/ou impedir ou tratar uma doença positiva de epitopo de carboidrato, em que o nutracêutico mencionado, a composição farmacêutica

mencionada, o micro-organismo carboidrato-positivo mencionado ou a fração do mesmo mencionada ou as formulações mencionadas que os compreendem é administrado a um indivíduo sadio.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imune específica de epitopo de carboidrato e/ou impedir ou tratar uma doença positiva de epitopo de carboidrato, em que o nutracêutico mencionado, a composição farmacêutica mencionada, o micro-organismo carboidrato-positivo mencionado ou a fração do mesmo mencionada ou as formulações mencionadas que os compreendem é administrado a um indivíduo com uma doença associada a um epitopo de carboidrato, um câncer, um tumor, pelo menos uma célula tumoral ou cancerosa, ou pelo menos uma metástase.

Em particular, o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam podem ser usados para induzir uma resposta imune contra um câncer, tumor, célula cancerosa ou células cancerosas ou a metástase derivada das mesmas, para induzir uma resposta imune que funciona como um escudo imune contra células tumorais, um câncer, tumor célula cancerosa ou células cancerosas ou a metástase derivada das mesmas, para tratar um tumor ou células cancerosas, metástase e/ou metástases, e/ou reduzir ou impedir a ocorrência, a disseminação ou metástase de um câncer, tumor, célula cancerosa ou células cancerosas ou a metástase derivada das mesmas em indivíduos saudáveis ou pacientes, respectivamente, cada uma compreendendo preferivelmente pelo menos uma célula tumoral carboidrato-positiva, selecionada de um câncer, tumor ou doenças cancerosas ou tumorais como descrito abaixo ou em outra parte deste. Por exemplo, o tratamento é direcionado contra tumores ou cânceres primários, tumor residual mínimo ou cânceres, recorrências e/ou metástases ou partes das mesmas. O tratamento dos tumores ou cânceres podem também ser efetuado como um tratamento adjuvante. O nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendem podem também ser usados na profilaxia de

doenças tumorais, tumores ou células tumorais positivas de epitopo de carboidrato. Por exemplo, o uso profilático é direcionado à profilaxia de tumores e metástases. Esses agentes antitumorais são administrados de uma maneira apropriada de acordo com os métodos bem conhecidos ou como descrito neste. Uma variante preferida é a injeção ou a administração desses agentes antitumorais ou fármacos oralmente, intravenosamente, localmente nas cavidades corporais, por exemplo, pelas vias intraperitoneal, intrarretal, intragastrointestinal, localmente, p. exe., diretamente em um tumor, em órgãos ou vasos linfáticos (intranodais), mas também subcutâneamente, intradermicamente ou sobre a pele e intramuscularmente. De uma maneira preferida, os tipos de administração podem também ser combinados, caso no qual a administração pode ser efetuada em diferentes dias de tratamento ou em um dia de tratamento, como descrito em detalhe em outro ponto deste. De acordo com a invenção, também é possível combinar dois ou mais dos nutracêuticos da invenção, composições farmacêuticas, micro-organismos positivos de epitopo de carboidrato ou as frações dos mesmos ou formulações que os compreendem, assim como combinar uma combinação daquelas com um ou mais fármacos ou tratamentos tumorais, tais como terapias com anticorpos, quimioterapias ou radioterapias, apropriadamente administradas ou aplicadas ao mesmo tempo ou separadamente.

O câncer, tumor, células tumorais, células cancerosas ou a metástase derivada das mesmas é selecionada do grupo de doenças cancerosas ou doenças tumorais da região do ouvido, nariz e garganta, dos pulmões, mediastino, trato gastrointestinal, sistema urogenital, sistema ginecológico, seio, sistema endócrino, pele, sarcomas ósseos e dos tecidos moles, mesoteliomas, melanomas, neoplasmas do sistema nervoso central, doenças cancerosas ou doenças tumorais durante a infância, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásticas, metástases com sítio primário desconhecido, carcinomatoses peritoneais, malignidades relacionadas à imunossupressão e/ou metástases tumorais.

Mais especificamente, o câncer, tumor, células tumorais, células cancerosas ou a metástase derivada das mesmas podem compreender os

tipos seguintes de câncer: adenocarcinoma do seio, da próstata ou do cólon; todas as formas de câncer do pulmão começando no tubo brônquico; câncer da medula óssea, melanoma, hepatoma, neuroblastoma, papiloma; apudoma, coristoma, branquioma; síndrome carcinóide maligna; doença carcinóide

5 do coração, carcinoma (por exemplo, carcinoma de Walker, carcinoma das células basais, carcinoma escamobasal, carcinoma de Brown-Pearce, carcinoma ductal, tumor de Ehrlich, carcinoma *in situ*, carcinoma de câncer 2 (câncer-2 carcinoma), carcinoma de células de Merkel, câncer de mucosa, carcinoma brônquico não-parvocelular, carcinoma de células pequenas, carcinoma papilar, carcinoma cirroso, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma

10 brônquico, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células transitórias); desordem funcional histiocítica, leucemia (por exemplo, em conexão com a leucemia de células B, leucemia de células mistas, leucemia de células destruidoras naturais, leucemia de células T, leucemia crônica de células

15 T, leucemia associada ao HTLV II, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leukemia de mastócitos e leucemia mielóide); histiocitose maligna, doença de Hodgkin, linfoma de não-Hodgkin, tumor solitário de células plasmáticas; reticuloendoteliose, condroblastoma; condroma, condrossarcoma; fibroma; fibrossarcoma, tumores de células gigantes, histiocitoma; lipoma; lipossarcoma; leucossarcoma; mesotelioma; mixoma; mixossarcoma;

20 osteoma; osteossarcoma; sarcoma de Ewing; sinovioma; adenofibroma; adenolinfoma; carcinossarcoma; cordoma; craniofaringioma, disgerminoma, hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma, miossarcoma, ameloblastoma, cementoma; odontoma; teratoma; timona, corioblastoma; adenocarcinoma, adenoma; colangioma; cilindroma; cistadenocarcinoma, cistadenoma; tumor das células da granulosa; ginandroblastoma; hidradenoma; tumor das células das ilhotas; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli; tumor de célula de teca, leiomioma; leiomiossarcoma; mioblastoma; mioma; miossarcoma; rabiomioma; rabdomiossarcoma; ependimoma; ganglioneuroma, glioma; meduloblastoma, meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma não-cromafinoma, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfóide com

30

eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatose; glomangioma; hemangioendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma, hemangiossarcoma; linfangioma, linfangiomioma, linfangiossarcoma; pinealoma; cistossarcoma filóide; hemangiossarcoma; mixosarcoma, carcinoma ovariano; sarcoma (por exemplo, sarcoma de Ewing, experimentalmente, sarcoma de Kaposi e sarcoma de mastócitos); neoplasmas (por exemplo, neoplasmas ósseos, neoplasmas do seio, neoplasmas do sistema digestivo, neoplasmas colorretais, neoplasmas sanguíneos, neoplasmas do pâncreas, neoplasmas da hipófise, neoplasmas testiculares, neoplasmas orbitais, neoplasmas da cabeça e do pescoço, do sistema nervoso central, neoplasmas do órgão auditivo, da pelve, do trato respiratório e do trato urogenital); neurofibromatose e displasia cervical de células escamosas e/ou metástases derivadas de qualquer um destes.

Em uma modalidade preferida, o câncer, tumor, células tumorais, células cancerosas ou as metástases deles derivadas, é selecionado do grupo de doenças cancerosas ou doenças tumorais compreendendo pelo menos uma célula ou preferivelmente um número significativo de células ou mais preferivelmente uma maioria de células tumorais positivas de epitopo de carboidrato na definição de acordo com a invenção, selecionado do grupo de: tumores do ouvido, nariz e garganta, compreendendo tumores do nariz interno, seio nasal, nasofaringe, lábios, cavidade oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glândulas salivárias e paragnagliomas, tumores dos pulmões, compreendendo carcinomas brônquicos não-parvocelulares, carcinomas brônquicos parvocelulares, tumores do mediastino, tumores do trato gastrointestinal, compreendendo tumores do esôfago, estômago, pâncreas, fígado, vesícula biliar e trato biliar, intestino delgado, cólon e carcinomas retais e anais, tumores urogenitais compreendendo tumores dos rins, uretra, bexiga, glândula da próstata, pênis e testículos, tumores ginecológicos compreendendo tumores do colo, vagina, vulva, câncer uterino, doença maligna do trofoblasto, carcinoma ovariano, tumor do tubo uterino (tubas de falópio), tumores da cavidade abdominal, carcinomas mamários, tumores dos órgãos endócrinos, compreendendo tumores da tireóide, paratireóide, córtex adrenal, tumores

do pâncreas endócrino, tumores carcinóides, neoplasias endócrinas múltiplas, sarcomas ósseos e dos tecidos moles, mesoteliomas, tumores de pele, melanomas compreendendo melanomas cutâneos e intraoculares, tumores do sistema nervoso central, tumores durante a infância, compreendendo re-

5 tinoblastoma, tumor de Wilms, neurofibromatose, neuroblastoma, sarcomas da família de Ewing, rhabdomyosarcoma, linfomas compreendendo linfomas de não-Hodgkin, linfomas cutâneos das células T, linfomas primários do sistema nervoso central, doença de Hodgkin, leucemias compreendendo leu-

10 cemias agudas, leucemia mielóide crônica e linfática, neoplasma de células plasmáticas, síndromes mielodisplásticas, síndromes paraneoplásticas, metástases com tumor primário desconhecido, carcinomatoses peritoneais, malignidades relacionadas à imunossupressão compreendendo malignidades relacionadas à AIDS tais como sarcoma de Kaposi, linfomas associados à

15 AIDS, linfomas associados à AIDS do sistema nervoso central, doença de Hodgkin associada à AIDS e tumores anogenitais associados à AIDS, malignidades relacionadas a transplantes, tumores metastatizados compreendendo metástases cerebrais, metástases pulmonares, metástases do fígado, metástases ósseas, metástases pleurais e pericárdicas e ascite maligna e/ou metástases derivadas de qualquer um destes.

20 Em outra modalidade preferida, o câncer, tumor, células tumorais, células cancerosas ou as metástases derivadas destes é selecionado do grupo compreendendo doenças cancerosas ou doenças tumorais tais como carcinomas mamários, tumores gastrointestinais, incluindo carcinomas do cólon, carcinomas do estômago, carcinomas do pâncreas, câncer do có-

25 lon, câncer gástrico inicial, câncer do intestino delgado, carcinomas ovarianos, carcinomas cervicais, câncer de pulmão, câncer de próstata, carcinoma celular renal, melanoma maligno e/ou câncer de fígado e/ou metástases derivadas de qualquer um destes.

30 Em uma modalidade preferida adicional, o câncer, tumor, células tumorais, células cancerosas ou as metástases derivadas destes é selecionado do grupo de doenças cancerosas ou doenças tumorais compreendendo pelo menos uma célula, preferivelmente um número significativo de célu-

las ou mais preferivelmente uma maioria de células tumorais, que são positivas de epitopo de carboidrato na definição de acordo com a invenção, selecionada do grupo de carcinomas mamários, tumores gastrointestinais, incluindo carcinomas do cólon, carcinomas do estômago, carcinomas do pâncreas, câncer do cólon, câncer gástrico inicial, câncer do intestino delgado, carcinomas ovarianos, carcinomas cervicais, câncer de pulmão, câncer de próstata, carcinomas celulares renais, melanoma maligno e/ou câncer de fígado e/ou metástases derivadas de qualquer um destes.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imuno específica de epitopo de carboidrato e/ou impedir ou tratar uma doença positiva de epitopo de carboidrato, o câncer, um tumor, pelo menos um tumor ou célula tumoral ou celular, ou pelo menos uma metástase compreendendo pelo menos uma célula positiva de epitopo de carboidrato.

Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um método para induzir ou aumentar uma resposta imuno específica de epitopo de carboidrato e/ou prevenir ou tratar uma doença positiva de epitopo de carboidrato tendo o indivíduo tem um câncer, um tumor, pelo menos um tumor ou célula cancerosas, ou pelo menos uma metástase selecionada do grupo de doenças cancerosas ou doenças tumorais compreendendo carcinomas mamários, tumores gastrointestinais, incluindo carcinomas do cólon, carcinomas do estômago, carcinomas do pâncreas, carcinomas do cólon, câncer gástrico inicial, câncer do intestino delgado, carcinomas ovarianos, câncer de pulmão, câncer de próstata, carcinomas celulares renais, melanoma maligno e/ou câncer de fígado e/ou metástases derivada de qualquer um destes.

Em uma modalidade preferida da invenção, a doença associada com o epitopo ou a doença positiva de epitopo de carboidrato é selecionada do grupo compreendendo *distúrbios gastrointestinais, doença de Whipple, sarcoidose, septicemia ou osteorradionecrose*.

Os distúrbios gastrointestinais são preferivelmente selecionados do grupo compreendendo distúrbios funcionais do intestino e doenças infla-

matórias intestinais, em que as doenças inflamatórias intestinais são selecionadas do grupo compreendendo doença de Crohn, ileíte e/ou colite ulcerativa e os distúrbios funcionais do intestino são selecionados do grupo compreendendo refluxo gastroesofágico, dispepsia, síndrome do intestino irritável e/ou dor abdominal funcional. O trato gastrointestinal no contexto da invenção consiste nos seguintes componentes: boca (cavidade bucal; inclui as glândulas salivares, mucosa, dentes e língua), faringe, esôfago e cárdia, estômago, que inclui o antro e o piloro, intestino: intestino delgado, que tem três partes: duodeno, jejuno e íleo; intestino grosso, que tem três partes: ceco (o apêndice vermiforme ligado ao ceco); cólon (cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente e flexura sigmóide); reto e/ou ânus.

Doenças associadas com o epitopo de carboidrato no sentido da invenção são também doenças inteiramente ou parcialmente devidas à formação de anticorpos e seus efeitos danosos sobre o organismo ou sistemas de órgãos como um todo, isto é, devido à autoagressão. Uma classificação em termos de doenças autoimunes órgão-específicas, intermediárias ou sistêmicas pode ser feita. As doenças autoimunes órgão-específicas são tireoidite de Hashimoto, mixedema primário, tireotoxicose (doença de Basedow), anemia perniciosa, doença de Addison, miastenia grave e/ou diabetes melito juvenil. As doenças autoimunes intermediárias preferidas são síndrome de Goodpasture, anemia hemolítica autoimune, leucopenia autoimune, trombocitopenia idiopática, pênfigo vulgar, oftalmia simpática, cirrose biliar, hepatite autoimune, colite ulcerosa e/ou síndrome de Sjögren. As doenças autoimunes sistêmicas preferidas são artrite reumatóide, febre reumática, lúpus eritematoso, dermatomiosite/polimiosite, esclerose sistêmica progressiva, granulomatose de Wegener, panarterite nodosa e/ou hypersensitivity angiitis. Doenças autoimunes típicas são tireototoxicose, mixedema causado pela tireóide, tireoidite de Hashimoto, endocrinopatia generalizada, anemia perniciosa, gastrite crônica de tipo A, doenças de um único ou de todos os elementos corpusculares do sangue (por exemplo, anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia idiopática ou trombocitopenia; leucopenia idiopática ou agranulocitose), pênfigo vulgar e penfigóide, oftalmia simpática e numerosas

formas de uveíte, cirrose biliar primária e hepatite autoimune crônica agressiva, diabetes melito tipo I, doença de Crohn e colite ulcerosa, síndrome de Sjögren, doença de Addison, lúpus eritematoso disseminado e a forma discóide de tal doença, como dermatomiosite e escleroderma, artrite reumatóide (=poliartrite crônica primária), nefrite da membrana basal antiglomerular. A base é uma reação imune agressiva devido à degeneração da tolerância imune a autodeterminantes e a uma redução da atividade de células T supressoras (com o marcador de linfócitos T8) ou um excesso de células T auxiliares (com o marcador de linfócitos T4) sobre as células supressoras; além disso, a formação de antígenos é possível, por exemplo, pelo acoplamento de proteínas hospedeiras e haptenos (por exemplo, fármacos) por tecido ontogenético não se desenvolvendo até que a autotolerância tenha se desenvolvido, por componentes protéicos desmascarados como resultado de alterações conformacionais das proteínas em conexão com, por exemplo, infecção por vírus ou bactérias e por novas proteínas formadas em conexão com neoplasias.

Doenças septicêmicas no sentido da invenção são doenças devidas à invasão contínua ou periódica por bactérias patogênicas e/ou suas toxinas de um foco de doença e sua disseminação na via linfossanguínea para formar uma infecção geral ou local.

Septicemia no sentido da invenção é preferivelmente septicemia por ferimento (flegmão, tromboflebite, linfangite), septicemia puerperal (no caso de febre puerperal), septicemia otogênica (no caso da otitis media), septicemia tonsilogênica (no caso da angina, peritonsillitis), cholangitic septicemia (no caso da purulent cholecystitis, colangite), pylephlebitic septicemia (no caso da pylephlebitis), septicemia umbilical (no caso da onfalite, etc.), urossepticemia, assim como granuloma dental. A septicemia no sentido da invenção pode ser de aguda a altamente aguda (fulminante), subaguda (por exemplo, como endocardite lenta) ou crônica e, é claro, pode ser também septicemia neonatal.

Portanto, as septicemias no sentido da invenção são todas alterações patogênicas em um paciente que podem ser associadas a febre in-

5 termitente e calafrios, com tumor do baço, reações tóxicas ou dano à medula óssea ou sangue (leucocitose polinuclear, anemia, hemólise, trombocitopenia) ou com reações patogênicas no coração e nervo vasomotor (taquicardia, centralização da circulação sanguínea, edemas, oliguria, possivelmente choque) ou no trato digestivo (língua seca, saburrosa, diarreia), ou com septicopiemia (piemia com formação de infarto séptico e abscesso metastático).

No sentido da invenção, as doenças preferidas incluem: AIDS, acne, albuminúria (proteinúria), síndrome de abstinência alcoólica, alergias, alopecia (perda de cabelo), ALS (esclerose lateral amiotrófica), doença de
 10 Alzheimer, degeneração macular senil da retina, anemia, talassemia, síndrome de ansiedade, esclerose aórtica **ESCLEROSE AÓRTICA POR ANTRAZ** (Anthrax), doença arterial oclusiva, arteriosclerose, oclusão arterial, arterite temporal, fístula arteriovenosa, asma, insuficiência respiratória, doença autoimune, prolapso do disco intervertebral, inflamação do peritônio,
 15 câncer do pâncreas, distrofia muscular de Becker, hiperplasia benigna da próstata (HBP), carcinoma da bexiga, hemofilia, carcinoma brônquico, câncer de mama, BSE, infecção por clamídia, dor crônica, cirrose, commotio cerebri (concussão cerebral), doença de Creutzfeld-Jacob, carcinoma intestinal, tuberculose intestinal, diabetes insípido, diabetes melito, diabetes melito
 20 to juvenil, retinopatia diabética, distrofia muscular de Duchenne, carcinoma duodenal, distrofia muscular progressiva, ebola, disfunção erétil, obesidade, fibrose, câncer cervical, câncer do útero, hemorragia cerebral, encefalite, perda de cabelo, anemia hemolítica, incontinência urinária, alergia a animais domésticos (alergia a pelos de animais), câncer de pele, herpes zoster, infar-
 25 to cardíaco, insuficiência cardíaca, cardiovalvulite, metástase cerebral, derrame cerebral, tumor cerebral, câncer do testículo, isquemia, doença de Kahler (plasmocitoma), pólio (poliomielite), rarefação óssea, carcinoma do cólon, eczema de contato, paralisia, cirrose do fígado, fibrose pulmonar, câncer do pulmão, edema pulmonar, câncer dos nodos linfáticos (Morbus Hodgkin),
 30 linfogranulomatose, linfoma, lyssa, carcinoma gástrico, meningite, mucoviscidose (fibrose cística), esclerose múltipla (MS), infarto do miocárdio, neurodermite, neurofibromatose, tumores neuronais, câncer do rim (carcinoma das

células renais), osteoporose, carcinoma do pâncreas, pneumonia, poliartrite, polineuropatias, distúrbios da potência, esclerose progressiva sistêmica (PSS), câncer de próstata, carcinoma do reto, pleurisia, trauma craniocerebral, carcinoma vaginal, sinusite, câncer de esôfago, tremor, tuberculose, dor tumoral carbonizações, queimaduras, intoxicações, meningite viral, menopausa, sarcoma dos tecidos moles, tumor dos tecidos moles, distúrbios da circulação sanguínea cerebral, tumores do SNC.

Para testagem, um estudo com voluntários seres humanos deve ser realizado no qual são determinadas as titulações de anticorpos do soro contra Core-1 mediante o uso dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 para determinação da resposta dos anticorpos contra o Core-1 antes da aplicação do nutracêutico e, preferivelmente, voluntários sem nenhum ou com níveis baixos de anticorpos anticore-1 são selecionados para os testes em seres seres humanos. Nestes voluntários, o nutracêutico compreendendo AG6 ou MU1 ou um placebo deve ser oralmente administrado em um período de 3 a 30 semanas. Deve ser realizada aplicação oral de pelo menos duas diferentes dosagens. As respostas imunes são acompanhadas pela determinação da resposta dos anticorpos e/ou da resposta das células T contra o Core-1 usando-se pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e/ou um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5 antes de e em intervalos apropriados após o início da administração oral do nutracêutico. Caso uma formulação tenha as características desejadas, há significativa elevação da resposta dos anticorpos contra o Core-1 e/ou da resposta das células T contra o Core-1 observada em um número significativo de voluntários do grupo de voluntários que recebeu o nutracêutico em comparação a titulação antes do estudo, como testado positivamente pela testagem positiva em pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e/ou em pelo menos um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5. No grupo do placebo, a elevação da resposta dos anticorpos ou das células T contra o Core-1 deve ser menos freqüentemente observada ou ser observada em uma menor medida.

Isso demonstra a efetividade do nutracêutico em seres seres

humanos para a construção de uma resposta imune contra o Core-1 que funciona como um escudo contra células cancerosas positivas para o Core-1 para a prevenção, redução ou disseminação de tumores positivos para o Core-1 ou metástases ou o seu tratamento.

- 5 Para o teste do potencial terapêutico, um estudo deve ser realizado com pacientes de câncer seres humanos imunocompetentes com tumores positivos para o Core-1 que tenham sofrido cirurgia para remoção da maior parte do tumor. As titulações séricas de anticorpos contra o Core-1 são então determinadas pelo uso de pelo menos um dos testes de resposta
- 10 imune-humoral de 1 a 6 para a determinação da resposta imune existente contra o Core-1 antes da primeira aplicação da composição farmacêutica. A composição farmacêutica compreendendo AG6 ou MU1 ou um placebo é administrada diversas vezes oralmente, intraperitonealmente ou intravenosamente por um período de 3 a 70 semanas. A administração de pelo menos
- 15 duas diferentes dosagens apropriadas é realizada. As respostas imunes são seguidas pela determinação da resposta dos anticorpos e/ou das células T contra o Core-1 mediante a utilização de pelo menos um dos testes de resposta humoral de 1 a 6 e/ou dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5 e/ou as respostas clínicas são seguidas pela determinação do tempo para
- 20 progressão, sobrevivência sem tumor e/ou volumes e/ou sítios tumorais, cada um antes de a intervalos apropriados após o início da administração da composição farmacêutica. Há uma elevação significativa da resposta dos anticorpos contra o Core-1 e/ou das células T contra o Core-1 observada em um número significativo de voluntário do grupo que recebe a formulação da
- 25 invenção em comparação com a titulação antes do estudo, conforme positivamente testado pelo teste positivo em pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e/ou em pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 5 e/ou uma resposta clínica parcial ou completa ou um tempo prolongado para progressão ou tempo de sobrevivência em um
- 30 número significativo de pacientes recebedores da formulação. No grupo do placebo a elevação da resposta dos anticorpos contra o Core-1 é menos frequentemente observada ou é observada em uma menor medida e/ou uma

resposta clínica significativamente menor é observada.

Isto pode mostrar a efetividade da composição farmacêutica em seres humanos para construir uma resposta imune contra Core-1, a qual funciona como um defensora contra células cancerosas positivas para Core-1, para a prevenção, redução ou afastamento da ocorrência de tumores positivos para Core-1, ou metástase, ou seu tratamento.

O contato entre o micro-organismo positivo para o Core-1 ou fração do mesmo dentro do corpo do organismo vivo (humano/animal) pode iniciar a produção de anticorpos que se ligam à Core-1, ao antígeno do Core-1, às células tumorais positivas à Core-1 em um número significativo de seres humanos ou animais.

Surpreendentemente, anticorpos contra o Core-1 podem funcionar como um mecanismo de vigilância imune contra células cancerosas recém-surgidas. De maneira ainda mais surpreendente, uma resposta imunocelular específica para o Core-1 compreendendo a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e/ou ativação de células T citotóxicas CD8-positivas direcionadas contra o Core-1 e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula mamífera compreendendo o dito epitopo de carboidrato pode ser alcançada em um número significativo de seres humanos ou animais.

Em um estudo com titulações de anticorpos séricos de voluntários seres humanos saudáveis contra Tn ou Lewis ou Lewis-Y pode ser determinado mediante o uso de pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6, determinando-se a resposta imune existente contra Tn ou Lewis antes da primeira aplicação do nutracêutico e preferencialmente voluntários com nenhum ou baixos níveis de anticorpos para Tn ou Lewis Y são selecionados para o teste com seres humanos. Nestes voluntários, o nutracêutico compreendendo um micro-organismo positivo para a Tn, ou um micro-organismo positivo para a Lewis-Y ou um placebo são administrados oralmente por um período de 3 a 30 semanas. A aplicação oral de pelo menos duas diferentes dosagens é realizada. As respostas imunes são seguidas pela determinação da resposta dos anticorpos e das células T contra a

Tn ou a Lewis Y mediante o uso de pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e pelo menos um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5 antes de e a intervalos apropriados após o início da administração oral do nutracêutico. Para formulações apropriadas uma elevação significativa da resposta dos anticorpos contra a Tn ou Lewis Y e/ou da resposta T celular contra a Tn ou Lewis Y, respectivamente, deve ser observada em um número significativo de voluntários do grupo de voluntários que recebe o nutracêutico em comparação à titulação antes do estudo como positivamente testado pela positividade em pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 e/ou em pelo menos um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5. No grupo do placebo a elevação da resposta dos anticorpos ou das células T contra a Tn ou a Lewis Y é menos frequentemente observada ou é observada em uma menor medida. A indução da resposta imunocelular é caracterizada pela ativação de células T específicas para a Tn ou Lewis Y, tais como células Th1 CD4-positivas e/ou células T citotóxicas CD8-positivas, indicando a indução de uma resposta imunocelular eficaz para a Tn ou Lewis Y eficaz, respectivamente.

Isso pode demonstrar a efetividade do nutracêutico em seres humanos para a construção de uma resposta imune contra a Tn ou Lewis Y que funciona como um escudo contra células cancerosas positivas para a Tn ou Lewis Y para a prevenção, redução ou disseminação de tumores positivos para a Tn ou Lewis Y ou metástases ou o seu tratamento.

Antes da primeira aplicação da composição farmacêutica em um estudo com pacientes de câncer seres humanos imunocompetentes sofrendo de tumores positivos para a Lewis Y, as titulações séricas dos anticorpos contra a Lewis Y são determinadas mediante o uso de pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6, determinando-se a resposta imune existente contra a Lewis Y.

Os pacientes são tratados no ambiente adjuvante após a remoção da maior parte do tumor. A composição farmacêutica compreendendo uma cepa de bactérias positivas para a Lewis Y ou um placebo é administrada diversas vezes por via oral, intraperitoneal ou intravenosa por um período de

3 a 70 semanas. A administração de pelo menos duas diferentes dosagens é realizada. As respostas imunes são seguidas pela determinação da resposta dos anticorpos e/ou células T contra a Lewis Y mediante o uso de pelo menos um dos testes de resposta humoral de 1 a 6 e/ou dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5. A resposta clínica é seguida pela determinação do tempo de progressão, sobrevivência sem o tumor e/ou volumes e/ou sítios tumorais, cada uma antes de e a intervalos apropriados após o início da administração da composição farmacêutica. Há uma elevação significativa da resposta dos anticorpos contra a Lewis Y e/ou da resposta das células T contra a Lewis Y observada em um número significativo de voluntários no grupo que recebe a formulação da invenção em comparação com a titulação antes do estudo, como positivamente testado pela positividade em pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 ou em pelo menos um dos testes de resposta imunocelular de 1 a 5 e/ou por uma resposta clínica parcial ou completa ou por um prazo prolongado de progressão ou tempo de sobrevivência em um número significativo de pacientes recebedores da formulação.

A resposta das células T induzida demonstra as características de uma resposta imunocelular específica para a Lewis Y compreendendo a ativação de células T Th1 CD4-positivas e/ou células T citotóxicas CD8-positivas. No grupo do placebo a elevação da resposta dos anticorpos ou a resposta das células T contra a Lewis Y é menos frequentemente observada ou é observada em uma menor medida e/ou nenhuma ou resposta clínica é observada ou é significativamente menor.

Isso demonstra a efetividade da composição farmacêutica em seres humanos para a construção de uma resposta imune contra a Lewis Y que funciona como um escudo contra células cancerosas positivas para a Lewis Y para a prevenção, redução ou disseminação da ocorrência de tumores positivos para a Tn ou Lewis Y ou metástases ou o seu tratamento.

O contato entre o micro-organismo positivo para a Lewis Y ou fração do mesmo dentro do corpo do organismo vivo (humano/animal) pode

iniciar a produção de anticorpos que se ligam à Lewis Y, ao antígeno da Lewis Y, às células tumorais positivas para a Lewis Y em um número significativo de seres humanos ou animais. Surpreendentemente, anticorpos contra a Lewis Y podem funcionar como um mecanismo de vigilância imune

5 contra células cancerosas recém-surgidas. A indução de uma resposta imunocelular específica para a Lewis Y eficaz pode resultar na destruição de células tumorais positivas para a Lewis Y residuais ou recém-surgidas no paciente.

F) KITS

10 A invenção refere-se também a um kit para induzir uma resposta imune-humoral e/ou celular específica em um ser humano ou animal contra o epitopo de carboidrato ou contra células tumorais positivas de epitopo de carboidrato, como descrito em outra parte deste, compreendendo o nutracêutico ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-

15 positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam, que estão descritas em outra parte deste, e uma informação sobre o uso do kit.

 A invenção refere-se também a um kit para induzir uma resposta imunocelular específica eficaz para o carboidrato em um ser humano ou animal contra o epitopo de carboidrato ou contra células tumorais ou patológicas positivas de epitopo de carboidrato, como descrito em outra parte deste,

20 compreendendo o nutracêutico ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam, que estão descritas em outra parte deste, e uma informação sobre o uso do kit.

25 A invenção refere-se também a um kit para reduzir ou prevenir a ocorrência de uma doença ou tumor positiva de epitopo de carboidrato, preferivelmente um tumor positivo de epitopo de carboidrato compreendendo o nutracêutico ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam,

30 que estão descritas em outra parte deste, e uma informação sobre o uso do kit.

 A invenção refere-se também a um kit para reduzir ou prevenir a

disseminação de uma doença ou metástase de um tumor positivo de epitopo de carboidrato, preferivelmente um tumor positivo de epitopo de carboidrato compreendendo o nutracêutico ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam, que estão descritas em outra parte deste, e uma informação sobre o uso do kit.

A invenção refere-se também a um kit para tratar uma doença ou tumor positivo de epitopo de carboidrato, preferivelmente um tumor positivo de epitopo de carboidrato, compreendendo o nutracêutico ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam, que estão descritas em outra parte deste, e uma informação sobre o uso do kit.

A invenção refere-se a um kit para fortalecer o sistema imune ou para melhorar uma resposta imune, como descrito em outra parte deste, compreendendo o nutracêutico ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam, que estão descritas em outra parte deste, e uma informação sobre o uso do kit.

O kit pode incluir informações (folheto instrutivo, endereço na internet) explicando como combinar os componentes do kit. Tais informações podem também estar relacionadas com um esquema terapêutico.

A invenção refere-se também a um kit para a determinação da resposta imune contra o epitopo de carboidrato compreendendo pelo menos um dos testes de resposta imune contra o epitopo de carboidrato aqui descritos, preferivelmente pelo menos dois, e mais preferivelmente pelo menos um teste de resposta imune-humoral e um teste de resposta imunocelular, compreendendo pelo menos um dos materiais descritos sob o teste de resposta imune correspondente e uma informação sobre o uso do kit. Em uma modalidade preferida, o kit compreende adicionalmente os controles correspondentes e mais preferivelmente pelo menos um dos seguintes: o nutracêutico ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações dos mesmos, que estão

descritas em outra parte deste, ou formulações que os compreendam.

A invenção refere-se também a um kit para a geração de pelo menos uma célula dendrítica funcional contra o epítipo de carboidrato, compreendendo o nutracêutico, ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam e uma informação sobre o uso do kit.

Em uma modalidade preferida, o kit para gerar pelo menos uma célula dendrítica funcional contra o epítipo de carboidrato compreende ainda células dendríticas imaturas derivadas de uma linhagem celular dendrítica tal como, mas sem limitação a, a MUTZ-3 ou Nemod-DC.

A invenção refere-se também a um kit para a geração de pelo menos uma célula T ativada, células T, clone de célula T ou a linhagem de células T contra o epítipo de carboidrato, compreendendo o nutracêutico, ou a formulação farmacêutica, ou o micro-organismo carboidrato-positivo, ou a fração do mesmo ou formulações que os compreendam e uma informação sobre o uso do kit.

A invenção refere-se também a um kit para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo ou uma fração de um micro-organismo compreendendo pelo menos uma molécula ou estrutura transportadora do epítipo de carboidrato compreendendo pelo menos um anticorpo específico de epítipo de carboidrato ou molécula de ligação carboidrato e uma informação sobre o uso do kit.

A invenção refere-se também a um kit para a identificação de um micro-organismo positivo para o carboidrato ou uma fração de um micro-organismo compreendendo pelo menos uma molécula ou estrutura transportadora do epítipo de carboidrato compreendendo pelo menos um anticorpo específico de epítipo de carboidrato ou molécula de ligação carboidrato e uma informação sobre o uso do kit.

A invenção refere-se também a um kit para a identificação ou isolamento de um micro-organismo ou fração de um micro-organismo positiva para o carboidrato compreendendo pelo menos uma molécula ou estrutura positiva de epítipo de carboidrato ou para a identificação de um micro-

organismo positivo para o carboidrato apropriado para uso como um componente de nutracêuticos e composições farmacêuticas da invenção compreendendo pelo menos um anticorpo específico para o carboidrato ou molécula de ligação carboidrato e uma informação sobre o uso do kit.

- 5 Em uma modalidade preferida, o kit compreende pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo como controle positivo.

G) MÉTODOS PARA A GERAÇÃO DE ANTICORPOS

- 10 A invenção proporciona também um método para a geração de um anticorpo ou composição de anticorpos ou soro policlonal que reconhece o epitopo de carboidrato de interesse, compreendendo

(a) colocação em contato entre o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo ou a fração do mesmo e um ser humano ou animal

- 15 (b) indução ou aumento de uma resposta imune-humoral que reconhece o epitopo de carboidrato e/ou uma célula tumoral positiva de epitopo de carboidrato

(c) isolamento de tal anticorpo ou composição de anticorpos contra o epitopo de carboidrato

- 20 De acordo com uma modalidade, na etapa (c) pelo menos uma célula é gerada que produz o anticorpo ou composição de anticorpos mencionada contra o epitopo de carboidrato. A etapa (c) mencionada pode ser realizada por vários métodos, tais como

- 25 (i) imortalização de pelo menos uma célula produtora do anticorpo contra o epitopo de carboidrato, preferivelmente por fusão com uma linhagem celular imortal, como realizado na tecnologia de hibridoma, ou preferivelmente por infecção com um vírus apropriado tal como o vírus Epstein Barr (VEB), ou por transfecção recombinante com pelo menos um gene que cause a imortalização da célula tal como E1 de EBV; ou

- 30 (ii) por análise da sequência de peptídeos pelo menos das regiões variáveis do anticorpo contra o epitopo de carboidrato ou pelo menos da região de ligação do anticorpo contra o epitopo de carboidrato responsável

pela especificidade do anticorpo e transformação de células com DNA codificador do anticorpo contra o epitopo de carboidrato como um anticorpo integral de qualquer isótipo ou um fragmento do mesmo ou uma proteína de fusão de um fragmento do anticorpo contra o epitopo de carboidrato ou do anticorpo integral com pelo menos uma outra sequência de aminoácidos ou de polipeptídeos.

Preferidas são as células capazes de produzir anticorpos estávelmente, significando que as células podem passar por uma quantidade apropriada de ciclos de produção dos anticorpos, tais como, mas sem limitação a, células de hibridoma e células de outras maneira imortalizadas ou por células transformadas recombinantemente de maneira estável tais como, mas sem limitação a, CHO, SP2, Y0, PerC.6, Hec293. Contudo, também a expressão transitória, tal como a expressão em células COS ou Hec293 ou células B são uma modalidade da invenção. O anticorpo monoclonal contra o dito epitopo de carboidrato pode ser isolado do sobrenadante da cultura. Em uma modalidade preferida da invenção, tal célula produtora de um anticorpo monoclonal contra o epitopo de carboidrato é obtida por clonagem de célula individual.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona o ácido nucleico tal como DNA codificador do anticorpo monoclonal contra o epitopo de carboidrato ou um fragmento do mesmo.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo ou composição de anticorpos ou soro policlonal contra o epitopo de carboidrato, o anticorpo monoclonal contra o epitopo de carboidrato ou pelo menos uma fração do mesmo. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma célula produtora de um anticorpo ou composição de anticorpos contra o epitopo de carboidrato ou pelo menos uma fração dos mesmos. Em uma modalidade preferida adicional, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal contra o epitopo de carboidrato ou o fragmento do mesmo que é um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano de um camundongo transgênico.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona a célula

produtora um anticorpo ou composição de anticorpos contra o epitopo de carboidrato, o anticorpo monoclonal contra o epitopo de carboidrato ou pelo menos um fragmento do mesmo, como descrito acima.

5 O anticorpo contra o dito epitopo de carboidrato no sentido da invenção pode ser qualquer anticorpo induzível em um ser humano ou um animal que reconhece o epitopo de carboidrato de interesse e/ou célula tumoral veículo de um epitopo de carboidrato de interesse, preferivelmente aqueles anticorpos que são anticorpos específicos de epitopo de carboidrato com os critérios de ligação ou especificidade descrito nas definições ou em
10 outra parte deste.

O anticorpo contra o dito epitopo de carboidrato pode ter and format tal como IgG, IgM, IgA, IgE, IgD ou qualquer fragmento dos mesmos por tecnologias conhecidas daqueles versados na técnica tais como, mas sem limitação a, Fab, F(ab)2, anticorpos de cadeia única, anticorpos de domínio único, multicorpos, proteínas de fusão de anticorpos, anticorpo ou anticorpos biespecífico(s) e anticorpos humanizados ou quimerizados.
15

Qualquer animal ou humano pode ser posto em contato com o nutracêutico, a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo e/ou a fração do mesmo. São preferidos seres humanos e camundongos, ratos, coelhos, cabras, camelos, galinhas, hamsters, porquinhos-da-índia ou macacos. Ainda mais preferidos são animais que aqueles versados na técnica sabem ser particularmente apropriados à geração de uma resposta dos anticorpos tais como, mas sem limitação a, coelhos, cabras, seres humanos, chimpanzés e camundongos para soros de anticorpos policlonais
20 e aqueles que os versados na técnica sabem ser particularmente apropriados à geração de anticorpos monoclonais tais como, mas sem limitação a, camundongos, ratos, seres humanos. Adicionalmente preferidos são camundongos transgênicos que carregam pelo menos partes dos genes dos anticorpos seres humanos e seres humanos.

30 Por em contato significa usar qualquer método ou via de administração em outra parte deste para administrar o nutracêutico a composição farmacêutica, o micro-organismo carboidrato-positivo e/ou a fração do mes-

mo, que é capaz de induzir uma resposta humoral contra o epítipo de carboidrato de interesse. Adjuvantes adicionais para aumentar a imunogenicidade conhecidos daqueles versados na técnica podem ser usados. É preferida a administração oral e sistêmica e, no contexto da última, a intravenosa, a intradermal ou a subcutânea e ainda mais a administração peritoneal.

A indução da resposta imune-humoral contra o epítipo de carboidrato de interesse pode ser testada nos testes de resposta imune-humoral da invenção e pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6 tem que ser positivo, como descrito em outra parte deste, em que em uma modalidade preferida os anticorpos mencionados ganhos do soro, do plasma ou das fezes também incluem aqueles que são ganhos das células produtoras de anticorpos contra o epítipo de carboidrato de interesse, tais como células B, ou células B imortalizadas, ou células B expressando recombinantemente anticorpos contra o epítipo de carboidrato. Esses anticorpos podem ser ganhos de uma variedade de maneiras conhecidas daqueles versados na técnica. Em uma modalidade preferida, soros do sangue, ou frações de soros, ou um soro ou uma fração de um soro que foi pre-absorvido contra antígenos apropriados tais como antígenos microbianos negativos de epítipo de carboidrato de interesse, preferivelmente um micro-organismo negativo de epítipo de carboidrato de interesse, ou anticorpos de uma célula produtora de anticorpos tal como aquelas descritas acima sob a forma de sobrenadantes celulares fracionados ou anticorpos purificados são usados como os anticorpos mencionados ganhos do soro, do plasma ou fezes em pelo menos um dos testes de resposta imune-humoral de 1 a 6.

DEFINIÇÕES

Nutracêutico

De acordo com a presente invenção, o termo "nutracêutico" significa qualquer nutriente, composição ou formulação de nutrientes que pode ser tomada oralmente por um ser humano ou animal tal como, mas sem limitação a, nutrientes, aditivos nutricionais, aditivos alimentares, suplementos de dieta, alimento ou nutrição clínica, alimento ou nutrição medicinal, alimento enteral, nutrição clínica enteral, nutrição ou alimento para o cuidado da

saúde, alimento para uso dietético especial, alimento para uso terapêutico específico ou alimento funcional que pode ser aplicado oralmente em diferentes formas, tais como, mas sem limitação a, cápsulas, comprimidos, emulsões, pós, líquidos, assim como sob a forma de qualquer alimento ou bebida como parte dos mesmos. Em casos especiais, o nutracêutico pode ser dado parentalmente (alimento parenteral). O nutracêutico sozinho ou sua mistura com pelo menos um outro ingrediente pode ser dado sozinho ou misturado com um alimento ou bebida. O termo nutracêutico também significa qualquer alimento, bebida, cápsula, comprimido, emulsão, pó ou líquido.

10 Composição farmacêutica

De acordo com a presente invenção, o termo "composição farmacêutica" significa qualquer composição que pode ser usada como um fármaco, ou um produto farmacêutico ou um produto biológico, ou é um componente de um fármaco ou de um produto farmacêutico ou biológico.

15 Micro-organismo carboidrato-positivo

De acordo com a presente invenção, o termo "micro-organismo carboidrato-positivo" significa qualquer micro-organismo que é reconhecido e assim ligado quando em contato com pelo menos uma molécula de ligação carboidrato capaz de reconhecer especificamente um epitopo de carboidrato (como definido em outra parte deste) em geral presente em uma molécula de uma célula humana ou animal. Preferivelmente, essa ligação pode ser inibida por tratamento brando com periodato e/ou pela remoção química ou enzimática parcial ou completa ou alteração do epitopo de carboidrato ou da estrutura da carboidrato compreendendo o epitopo de carboidrato e/ou pela inibição da ligação da molécula de ligação carboidrato com quantidades apropriadas de outra molécula de ligação carboidrato capaz de reconhecer o dito epitopo de carboidrato e/ou pela inibição da ligação da molécula de ligação carboidrato com quantidades apropriadas do epitopo de carboidrato ou de uma molécula, misturas de moléculas ou célula compreendendo o dito epitopo de carboidrato quando incubadas com o micro-organismo durante estudos de ligação com a molécula de ligação carboidrato. Também compreendidos pelo termo "micro-organismos carboidrato-positivos" estão os

micro-organismos nos quais o epítipo de carboidrato de interesse é exposto somente após um tratamento enzimático ou químico tal como, por exemplo, um tratamento com periodato. O micro-organismo é, portanto, reconhecido e ligado quando em contato pelo menos com uma molécula de ligação carboidrato após o tal tratamento.

Um micro-organismo carboidrato-positivo pode ser qualquer micro-organismo tal como, mas sem limitação a, bactérias, cianobactérias, eubactérias, fungos (cogumelos, leveduras, fuligem, mofo, etc.), vírus e protozoários, sendo preferidos micro-organismos bacterianos tais como, mas sem limitação a, micro-organismos isolados do solo, de plantas, animais, seres humanos ou outros organismos vivos superiores tais como gatos, cães, porcos, vacas, cabras, coelhos, camundongos, chimpanzés. Em uma modalidade preferida, o micro-organismo carboidrato-positivo é um micro-organismo que se origina do sistema gastrointestinal humano.

Molécula de ligação carboidrato

De acordo com a presente invenção, o termo "molécula de ligação carboidrato" significa uma molécula que reconhece uma certa estrutura de carboidrato ou que se liga ao seu epítipo dependendo de um certo carboidrato, tal como, mas sem limitação a, anticorpos monoclonais e policlonais carboidrato-específicos, lectinas e selectinas e/ou moléculas derivadas. Preferivelmente, a molécula de ligação carboidrato mencionada reconhece especificamente um epítipo de carboidrato presente em uma célula humana ou animal tal como, por exemplo, um marcador tumoral. Mediante o uso de moléculas de ligação a carboidrato específicas para um epítipo de carboidrato "humano", pode-se isolar um micro-organismo carboidrato-positivo carregador de uma estrutura idêntica a ou que mimetiza o epítipo de carboidrato de interesse, como pode ser determinado pela ligação de tal molécula de ligação carboidrato, que é preferencialmente um anticorpo. Exemplos de moléculas de ligação a carboidrato apropriadas estão descritos, por exemplo, na Tabela 2.

O anticorpo específico para o carboidrato pode ser um anticorpo integral de qualquer animal ou humano tal como um murino, camundongo,

humano, IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD humanizada ou quimérica ou qualquer fragmento de um anticorpo, desde que ele compreenda a especificidade de ligação ou dependência do carboidrato, tal como Fab, F(ab)2 ou anticorpos de domínio único. Esses anticorpos podem também
 5 conter pelo menos um aminoácido adicional ou mutações ou sequências de polipeptídeos, tais como marcadores, reticuladores ou domínios de multimerização e podem também se originar de outras fontes além dos animais, tais como plantas, e tais como seleções de bibliotecas de anticorpos sintéticos usando, por exemplo, monitor de fago ou monitor de Ribossoma, ou por re-
 10 construção recombinante.

Epitopo de carboidrato

De acordo com a presente invenção, o termo "epitopo de carboidrato" significa a estrutura à qual se liga, por contato, uma molécula de ligação carboidrato:

15 Tal epitopo de carboidrato pode, dessa maneira, equivaler à porção de carboidrato à qual se liga tal molécula de ligação carboidrato ou então o epitopo de carboidrato pode compreender a porção de carboidrato à qual se liga a molécula de ligação carboidrato. Para maior clarificação, por exemplo, mas sem limitação a, (i) tal epitopo de carboidrato pode equivaler
 20 ao tetrassacarídeo Lewis Y com todas as quatro unidades de carboidrato das quais são necessárias para a ligação da molécula de ligação carboidrato, o anticorpo monoclonal A70-C/C8 ou o dito epitopo de carboidrato, também é Lewis Y compreendendo o trissacarídeo H-type 2, que é a exigência de especificidade de ligação mínima para a molécula de ligação carboidrato,
 25 o anticorpo monoclonal A46-B/B10, o qual também se liga ao tetrassacarídeo da Lewis Y e/ou (ii) tal epitopo de carboidrato equivale à porção de carboidrato à qual se liga um molécula de carboidrato, mas ele se liga diferentemente, tal como, mas sem limitação a, ligação por ligações beta em vez de ligações alfa ou vice-versa ou por meio de um átomo de carboidrato diferen-
 30 te.

O termo epitopo de carboidrato pode também significar o antígeno carboidrato que pode ser o mesmo que o epitopo de carboidrato ou ser

qualquer estrutura compreendendo o epitopo de carboidrato descrito em outra parte deste além de, por exemplo, uma parte/porção de peptídeo.

O epitopo de carboidrato pode consistir de estruturas de carboidrato ou estruturas que mimetizam carboidratos, tais como polipeptídeos, peptídeos, lipídios ou carboidratos ou combinações dos mesmos com estrutura química diferente da do carboidrato mas que têm uma estrutura conformacional que pode ser reconhecida por moléculas de ligação a carboidratos da invenção e que, assim, têm propriedades imunoquimicamente similares ou idênticas.

O epitopo de carboidrato pode sofrer ligação de outras biomoléculas (ou ser parte das mesmas), tais como, mas sem limitação a, polissacarídeos, peptidoglicanos, glicoproteínas, glicopeptídeos, glicolipídios, lipopolissacarídeos, glicosaminoglicanos, polissacarídeos capsulares ou antígenos O.

O epitopo de carboidrato pode também ser reticulado por vários reticuladores e a várias densidades a veículos naturais ou sintéticos tais como poliacrilamida (aqui também denominada PAA) ou outras moléculas, tais como materiais de leito cromográfico (por exemplo, sefarose), biotina ou proteínas, tais como albumina sérica bovina (ASB), ovalbumin (Ova), hemocianina Keyhole limpet (KLH), toxinas, toxióides, epitopos T auxiliares.

O epitopo de carboidrato origina o corresponde a (por exemplo, mimetiza) um epitopo de carboidrato de uma célula humana ou animal e pode estar presente na superfície da célula ou ser intracelular ou pode ser secretada pela célula humana ou animal. Preferivelmente, tal epitopo de carboidrato é um marcador de patologia, p. e., um marcador tumoral.

Resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz (RICCEE)

De acordo com a presente invenção, o termo "resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz" significa uma resposta imunocelular que é induzida pela administração de um imunogênico compreendendo um epitopo de carboidrato que preferivelmente apresenta as seguintes características:

(i) a resposta imune contra o epitopo de carboidrato, significando

que a resposta imune é carboidrato-específica ou dependente do carboidrato ou da disponibilidade do carboidrato, em que a resposta imune contra o epítopo de carboidrato pode também ser ou compreender uma resposta imune contra pelo menos uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato e/ou uma célula de mamífero compreendendo tal epítopo de carboidrato

(ii) a resposta imune é MHC-dependente

(iii) a resposta imune compreende uma resposta imune de tipo Th1 compreendendo a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e/ou

(iv) a indução de células T citotóxicas CD8-positivas

10 Preferivelmente a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e a indução de células T citotóxicas CD8-positivas

A imunidade de tipo Th1 é caracterizada pela proliferação de células T e pela secreção das citocinas INF-gama e/ou TNF-alfa e GM-CSF, que pode ser medida pelos testes de resposta imunocelular como revelados neste ou por técnicas conhecidas daquele versado na técnica tais como, 15 mas sem limitação a, análises de proliferação, ELISA, ELISpot ou citometria de fluxo.

A indução de células T citotóxicas CD8-positivas pode ser medida pelos testes de resposta imunocelular como revelados neste ou por técnicas conhecidas daqueles versados na técnica. 20

A especificidade para o carboidrato da resposta imunocelular pode ser determinada pela re-estimulação das células T ativadas com o epítopo de carboidrato, preferivelmente com o epítopo de carboidrato em um veículo diferente daquele usado para a inicialização da resposta das células 25 T, tal como, mas sem limitação a, lisados ou frações de células que expressam o epítopo de carboidrato ou proteínas de peptídeos veículos do epítopo de carboidrato (no caso de inicialização com o epítopo de carboidrato em micro-organismos) e/ou por bloqueio da proliferação e/ou secreção de citocinas com moléculas de ligação a carboidrato e/ou um anticorpo específico de 30 classe MHC; preferivelmente, a especificidade da resposta imunocelular para o carboidrato é determinada pela re-estimulação das células T ativadas com o epítopo de carboidrato em um veículo diferente daquele usado na ini-

cialização da resposta das células T e por bloqueio da proliferação ou secreção de citocinas com moléculas de ligação a carboidrato.

Fração de um micro-organismo carboidrato-positivo

De acordo com a presente invenção, o termo "fração de um micro-organismo carboidrato-positivo" significa um preparado ou purificação de

5 uma parte ou partes de tal micro-organismo tal como, mas sem limitação a, um preparado de envelope ou parede celular, lisado, preparado de lipopolissacarídeo, preparado de cápsulas ou preparado de cápsulas de polissacarídeos. Eles compreendem pelo menos um componente carboidrato-positivo

10 de tal micro-organismo carboidrato-positivo que sofre ligação por pelo menos uma das moléculas de ligação a carboidrato mencionadas que reconhecem o epitopo de carboidrato e/ou antígeno escolhido. Eles podem ser obtidos por preparação, purificação e/ou etapas de preparação ou purificação de pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo. Tais preparados e/ou

15 purificações podem ser obtidos por métodos conhecidos daqueles versados na técnica tais como aqueles descritos acima ou tais como, mas sem limitação a, fracionamento celular único ou sequencial, extrações de água por fenol, extrações mediante éter, digestões por lisozima ou métodos cromatográficos ou combinações dos mesmos. Ademais, o termo "fração de um micro-

20 organismo carboidrato-positivo" também compreende componentes carboidrato-positivos produzidos artificialmente que também são encontrados nos micro-organismo carboidrato-positivos da presente invenção. A figura 19, por exemplo, mostra alguns componentes positivos para o Core-1 e, assim, frações de um micro-organismos positivo para o Core-1 (aqui: AG6). Esses

25 componentes/frações positivos para o Core-1 do micro-organismo positivo para o Core-1 AG6 também poderiam ser produzidos quimicamente. O componente carboidrato-positivo da fração contendo o componente carboidrato-positivo é detectado pela ligação da fração a pelo menos uma molécula de ligação carboidrato nos sistemas de teste tais como, mas sem limitação a,

30 ELISA, citometria de fluxo, imunofluorescência ou dot blots, que são conhecidos daqueles versados na técnica. Em uma modalidade preferida da invenção, a fração compreendendo um componente carboidrato-positivo é ob-

tido por cromatografia de afinidade usando-se pelo menos um anticorpo carboidrato-específico. Em uma modalidade preferida, uma única etapa de preparação ou purificação é utilizada. Em outra modalidade preferida, uma combinação de pelo menos duas etapas de preparação e/ou purificação é utilizada.

Componente carboidrato-positivo

De acordo com a presente invenção, o termo "componente carboidrato-positivo" significa qualquer componente de um micro-organismo carboidrato-positivo que sofre ligação quando em contato com pelo menos um anticorpo carboidrato-específico ou molécula de ligação carboidrato. Tal componente carboidrato-positivo compreende pelo menos uma estrutura carboidrato-positiva compreendendo o epitopo de carboidrato como definido ou descrito em outra parte deste que pode estar disponível sob a forma da sua molécula natural onde é parte do micro-organismo, tal como um peptídeo, oligopeptídeo, polipeptídeo, lipídio, ceramida, carboidrato, lipoproteína, polissacarídeo, oligossacarídeo, polissacarídeo, proteoglicano ou glicoproteína, como uma parte de tal molécula ou sozinho. O componente carboidrato-positivo pode ser usado no sentido da invenção como uma fração do micro-organismo carboidrato-positivo como tal ou acoplado a outras estruturas transportadoras não-naturais tais como, mas sem limitação a, proteínas, lipídios, moléculas químicas tais como poliacrilamida. Preferivelmente, ele é usado em sua forma natural ou como uma parte de tal molécula natural. O componente carboidrato-positivo pode compreender um ou diferentes tipos de cadeia de carboidrato com um único epitopo de carboidrato ou múltiplos epitopos de carboidrato de unidades repetidas de tais estruturas e pode conter estruturas ou unidades de carboidrato adicionais ou outras estruturas biomoleculares. Como descrito em outra parte deste, o epitopo de carboidrato pode também ser ou compreender uma estrutura que mimetiza um carboidrato que é uma estrutura que pode sofrer ligação de pelo menos um anticorpo ou molécula carboidrato-específica e/ou pode induzir uma resposta imune contra o carboidrato, preferencialmente uma resposta imune-humoral contra o carboidrato e mais preferencialmente uma resposta imunocelular

eficaz contra tal carboidrato e, ainda mais preferencialmente, uma resposta imune-humoral contra o carboidrato e uma resposta imunocelular eficaz contra o carboidrato.

Molécula natural

5 De acordo com a presente invenção, o termo "molécula natural" significa qualquer biomolécula ou partes da mesma que ocorre em pelo menos um organismo vivo ou morto (tal como, mas sem limitação a, prion, vírus, micro-organismo, protozoário, bactérias, algas, fungos, plantas, animais, seres humanos) ou é produzida por esse organismo.

10 Moléculas naturais podem ser usadas como organismos inteiros (tais como micro-organismos ou vírus) ou podem ser isoladas de fontes naturais ou podem ser sintetizadas neles com exatamente as mesmas estruturas tal como quando ocorrem na natureza.

15 Preferivelmente, as moléculas naturais não são combinações de moléculas ou partes das mesmas que não ocorrem em um organismo em tal combinação e não estão acopladas ou conjugadas a veículos sintéticos ou naturais tais como proteínas, peptídeos, KHL, OVA, ASB, toxina, toxioide, epitopo T auxiliar, biotina, PAA, contas magnéticas, nanopartículas ou material de leito cromográfico.

20 Sem a intenção de definir limitações, a invenção será explicada em maior detalhe com referência aos exemplos a seguir.

Legendas das figuras

Figura 1

25 Árvore sem raiz (unrooted tree) baseada nas sequências alinhadas sem ambiguidade (1248 pares de bases) dos isolatos AG6, MU1, seus parentes mais próximos e a cepa tipo *E. coli* obtida com o método de ligação de vizinhos mais próximos (7).

Figura 2

30 **2a: produtos de PCR da cepa de *E. coli* LH obtidos após amplificação com o iniciados OPL07** – coluna 1: ladder de 1 kb; colunas 2-11: cepas LH 2-5, 8, 13-16, 18; coluna 12: cepa 32 *E. coli* DSMZ 8697

2a: cepa MU e AG6 obtidas após amplificação com o inicia-

dos OPA18 – coluna 1: 1 kb ladder; corredores 2-5: cepas MU 1, 3-5; coluna 6: AB12; coluna 7: *B. thetaiotaomicron* DSMZ 2079; coluna 8: *B. ovatus* DSMZ 1896; coluna 9 – *B. vulgatus* DSMZ 1447; coluna 10: *B. acidifaciens* DSMZ 15896; colunas 11-13: AG6.

5 **Figura 3**

ELISA com cepas bacterianas revestidas AG6, LH2 e MU1 (5×10^6 bactérias/ml) e os anticorpos monoclonais Nemod-TF1 específicos para o Core-1 e anticorpos A68-B/A11 menos específicos e anticorpos de controle A6-B/C2.

10 **Figura 3a**

ELISA com cepas bacterianas revestidas *Helicobacter pylori* NCTC 11637, cepa de *E. coli* DSMZ 8697 (cepa 32) e cepa Mu1 de *Bacterioides ovatus* (cada um a uma densidade correspondente a $10 \times DO_{650nm} 0,1$) e os anticorpos monoclonais Nemod-TF1, Nemod-TF2 e A68-BA11.

15 **Figura 4**

Análises por SDS-PAGE e Western blot da preparação de cápsulas da cepa AG6

A) coloração com alcian blue de SDS-polyacrilamid gel

B) Western blot com DIG-glicano manchamento

20 **Figura 5**

Enriquecimento de polissacarídeos positivos para o Core-1 por cromatografia de fase reversa.

Figura 6

25 Sequência de unidades repetidas do polissacarídeo capsular positivo para o Core-1 da cepa AG6 da *B. ovatus*

Figura 7

30 Estrutura das unidades repetidas do polissacarídeo capsular positivo para o Core-1 da cepa AG6 da *B. ovatus* (L-fuc: L-fucose; D-Gal: D-galactose; HexNac: N-acetil-hexosamina; D-Hex: D-hexose; OMe: grupo O-metil).

Figura 8

Estrutura das unidades repetidas do polissacarídeo capsular po-

sitivo para o Core-1 da cepa AG6 da *B. ovatus* (L-fuc: L-fucose; D-Gal: D-galactose; HexNac: N-acetil-hexosamina; D-Hex: D-hexose; OMe: grupo O-metil).

Figura 9

5 Análise de soros de camundongos pelo teste de resposta imune-humoral 1

Anticorpos IgM contra AGP e AGP tratada com ácido periódico foram determinados por ELISA nos soros de camundongos imunizados com PBS (grupo L), bactérias negativas para o Core-1 (grupo I) e bactérias posi-
10 tivas para o Core-1 (grupo K).

Diluição sérica: 1:200, dia 21.

Figura 10

Sinais ELISA de soros imunes sobre conjugados carboidrato-PAA. Valores médios de sinais ELISA de 4 camundongos C3H contra o con-
15 jugado Gal beta-1-3GalNAc alfa1-PAA em relação com o sinal ELISA contra GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc alfa-PAA (diluição dos soros: 1:100).

Figs. 11a a 11e

Análise FACS de soros de camundongo de camundongos imunizados com PBS (grupo L), bactérias negativas para o Core-1 (grupo I) e
20 bactérias negativas para o Core-1 (AG6, grupo K) no dia 21.

A) intensidade da fluorescência média da análise FACS

B) histogram overlay (preto: grupo L; azul: grupo I; vermelho: grupo K)

Figura 11c

25 Mostra os resultados do teste de resposta imune-humoral 1 com soros de camundongos imunizados com cepas bacterianas de *Bacteroides ovatus* MU-1, *E. coli* LH2, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32 (são mostrados os valores médios de 4 camundongos por grupo).

Figura 11d

30 Mostra os resultados do teste de resposta imune-humoral 2 com soros de camundongos imunizados com cepas bacterianas de *Bacteroides ovatus* MU-1, *E. coli* LH2, *E. coli* AG3, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32 (são

mostrados os valores médios de 4 camundongos por grupo).

Figura 11e

Mostra os resultados do teste de resposta imune-humoral 3 com soros de camundongos imunizados com cepas bacterianas de *Bacteroides ovatus* MU-1, *E. coli* LH2, *E. coli* AG3, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32 (são mostrados os valores médios de 4 camundongos por grupo).

Figura 12

Teste de resposta imune-humoral 1 dos soros de camundongo livre de germes (camundongo de controle e e camundongo diferente imunizado com a cepa bacteriana AG6).

Figura 13

Teste de resposta imune-humoral 1 dos soros de camundongos CH3 imunizados oralmente com A) 2×10^{11} (grupo A) ou B 2×10^{10} (grupo B) bactérias pasteurizadas da cepa AG6 diariamente nos dias 0 a 28. São mostrados sinais ELISA no dia 21 contra a glicoforina (GP), asialoglicoforina (AGP) e AGP tratada com periodato (AGP + PJ) de camundongos individuais.

Figura 14

Teste de resposta imune-humoral 3 dos soros de camundongos CH3 imunizados oralmente com bactérias positivas para o Core-1 pasteurizadas (cepa AG6). Soros do dia 0 e do dia 28 foram diluídos a 1:300 e analisados em citometria de fluxo em busca de ligação nas linhagens celulares NM-wt e NM-D4.

Figura 15

Produção de citocinas pelas células T geradas para lisados de bactérias positivas para o Core-1 (AG6 e MU1) após re-estimulação com DCs carregadas com MN-D4 (DC/D4) positivas para Core-1 ou -negative NMwt (DC/wt) cel-lysates de linhagens celulares tumorais humanas. Inibição da produção de citocinas por pré-incubação da NM-DC carregada com lisado com anticorpo específico para o Core-1 (DC/D4+Ak).

A) Produção de GM-CSF pelas células T (CIRT 1)

B) Produção de TNF-alfa pelas células T (CIRT 2)

Figura 16

Teste de resposta imunocelular 2: resultados de análise por ELISpot para a produção de INF-gama por responder T cells após re-estimulação com DCs carregadas com lisados positivos para o Core-1 (DC/D4) ou lisados celulares negativos para o Core-1 (DC/wt) de linhagens celulares tumorais humanas e inibição da produção de citocinas mediante pré-incubação das NM-DCs carregadas com lisado com anticorpos específicos para o Core-1 (DC/D4+Ak).

Figura 17

Teste de resposta imunocelular 3: análise de proliferação das células T (WST) ou de responder cells (R) após re-estimulação com DCs carregadas com lisados celulares positivos para o Core-1 (DC/D4) ou lisados celulares negativos para o Core-1 (DC/wt) de linhagens celulares tumorais humanas e inibição da proliferação mediante pré-incubação das NM-DCs carregadas com lisado com anticorpos específicos para o Core-1 (DC/D4+Ak).

Figura 18

Teste de resposta imunocelular 4: análise por imunofluorescência de mNM-DCs carregadas com bactérias negativas para o Core-1 (AG3) ou positivas para o Core-1 (AG6) ou linhagem celular negativa para o Core-1 (NM-wt) ou positiva para o Core-1 (NM-D4).

Figura 19

Estruturas de carboidrato dos componentes positivos para o Core-1

L-fuc: L-fucose; D-GalNac: N-acetilgalactosamina; D-Gal: D-galactosamina; Hex: hexose; HExNAc: N-acetil-hexosamina; OMe: O-metilação. Tais estruturas são, por exemplo, encontradas na AG6.

Figura 20

O antígeno Core-1 oculto e exposto.

Figura 21

A figura 21 mostra os sinais ELISA contra o conjugado PAA Gal β 1-3 um -PAA e o conjugado PAA Gal β 1-3 GlcNAc α -PAA no dia 21. Os

soros foram considerados positivos se o sinal em PAA 48 era pelo menos 30% mais alto do que os sinais na PAA 43. Considerando este critério, 5 (A1, A2, A3, B1 e B5) dos 6 camundongos desenvolveram uma resposta imune-humoral específica para o Core-1.

5 **Figura 22**

Mostra uma tabela na qual cepas positivas para o Core-1 assim como cepas que não foram positivas para o Core-1 foram caracterizadas por sua sensibilidade a diferentes antibióticos.

Figura 23

10 Visão geral de um teste de resposta imune de acordo com a presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1

Técnicas e meios de cultura anaeróbica

15 As técnicas anaeróbicas empregadas no cultivo de bactérias foram baseadas em métodos previamente descritos que foram resumidos por Breznac e Costilow. Meios preparados com cisteína-HCl como agente redutor foram dispensados em tubos para cultura anaeróbica (Ochs, Bovenden, Alemanha) ou garrafas de vidro para soro, deixando aproximadamente de
20 metade a um terço do volume total do recipiente como espaço para o gás de topo e os recipientes foram então selados com tampões de borracha butílica. As soluções preparadas sem agentes redutores (p. e., PBS-a) foram fervidas antes de serem dispensadas. Antes da autoclivagem, a fase gasosa foi substituída por N₂/CO₂ (80/20, v/v). Para se realizar isso, agulhas foram in-
25 seridas nas garrafas fechadas com tampões de borracha butílica e os recipientes foram evacuados por meio de uma bomba de vácuo (Vacuubrand, Wertheim, Alemanha). Após a evacuação, os recipientes, que foram repetidamente agitados durante todo o processo, foram gaseados com N₂/CO₂ (80/20, v/v). Esse procedimento de evacuação e gaseificação foi realizado
30 três vezes no total. Antes de entrar no recipiente, a mistura gasosa foi passada por um catalisador de paládio aquecido para remover traços residuais de oxigênio nela presentes. Resazurina (1 mg l⁻¹) foi usado como indicador

de redução.

O meio para plaqueamento foi despejado sob uma cabine de fluxo laminar e armazenado sob condições anóxicas por pelo menos 24 h antes do uso. Isso foi feito seja em jarros pressurizados anaeróbicos ($1,5 \times 10^5$ Pa) ou com um AnaeroGen de 3,5 l (Oxoid, Basingtoke, Inglaterra) ou em câmara da vácuo anaeróbica (Don Whitley Scientific, Shipley, Inglaterra) com descargas repetidas de $N_2/CO_2/H_2$ (80/10/10, v/v/v). A manipulação das amostras foi realizada em uma câmara anaeróbica (estação de trabalho de atmosfera variável MACS, Don Whitley Scientific, Shipley, Inglaterra ou Coy Laboratory Products, Grass Lake, EUA).

As soluções e materiais não-estéreis foram esterilizados por autoclave (121 C, $1,2 \times 10^5$ Pa, 15 min). Compostos Heat-labile foram feitos como soluções-mãe concentradas em água milli-Q, sterile-filtered (0,22 μ m, éster celulósico misto, Roth, Karlsruhe, Alemanha) e adicionados ao meio nas concentrações exigidas.

Exemplo 2

Enriquecimento por afinidade de micro-organismos positivos para o Core-1

2.1 Preparação de Dynabeads® recobertas com TF1 e TF2

Dois volumes de 100 μ l cada um de Dynabeads® (IgM M-450 do rato anticomundongo), Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega) foram colocados em 2 tubos Eppendorf safe-lock (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), lavados duas vezes com 2 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS-a: 8,1 g l^{-1} , NaCl; 0,16 g l^{-1} , $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,98 g l^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1 g l^{-1} ASB, pH 7,4) usando o Dynal Magnetic Particle Concentrator® -S (MPC®-S, Dynal Biotech, Oslo, Noruega) e suspensos em 25 μ l de PBS-a. Sobrenadantes de cultura liofilizados de TF1 ou TF2 foram dissolvidos em 1 ml de água purificada para síntese milli-Q (milli-Q synthesis grade water) (Millipore, Billerica, MA, USA). Sobrenadantes de cultura TF1 ou TF2 (1 ml) foram adicionados aos tubos com Dynabeads® e incubados por 30 min a 4°C em um agitador de tubos (modelo 34528, Snijders Scientific, Holanda). Os tubos foram colocados no MPC®-S e deixados para descansar por 3 min antes da remoção

do fluido com uma pipeta. As Dynabeads® foram ressuspensas em 2 ml de PBS-a, colocadas no MPC®-S e o fluido removido por pipetagem. Essa etapa de lavagem foi realizada três vezes. As Dynabeads® lavadas foram suspensas em seu volume original de 100 µl de PBS-a. As Dynabeads® preparadas desta maneira foram ou usadas imediatamente ou no prazo de duas semanas desde a preparação após uma etapa de lavagem tripla com 2 ml de PBS-a.

2.2 Coleta e processamento de amostras fecais para o enriquecimento das Dynabeads®

Amostras fecais de oito voluntários (Tabela 3) foram coletadas em tubos plásticos perfurados, mantidas sob condições anóxicas usando-se um AnaeroGen Compact (Oxoid, Basinfroke, Inglaterra) e armazenadas a 4°C por um máximo de 4 h antes do processamento. Os voluntários foram adultos jovens que não tinham ingerido antibióticos por pelo menos 3 meses antes da data da coleta das amostras e tinham consumido suas dietas usuais.

Tabela 3: parâmetros individuais no momento da coleta das amostras fecais

Número do sujeito	idade	gênero
1 – GH	24	feminino
2 – RM	26	feminino
3 – TC	25	masculino
4 – AG	27	feminino
5 – AB	37	feminino
6 – MU	36	feminino
7 – LH	24	feminino
8 – CA	50	masculino

Uma diluição de 10 vezes das amostras fecais foi preparada em PBS-b (PBS-b: 8,5 g l⁻¹ NaCl, 0,3 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0,6 l⁻¹ Na₂HPO₄, pH 7,0 contendo 0,1 g l⁻¹ de peptona e 0,25 g l⁻¹ de cisteína-HCl). Seis contas de vidro de 3 mm de diâmetro foram adicionadas e as amostras diluídas foram ho-

5 mogeneizadas por agitação a baixa velocidade. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas (300 x g, 1 min, 21°C) para sedimentar os fragmentos. Uma porção de 200 µl do sobrenadante resultante foi adicionada a 1,8 ml de PBS-b resultando em uma diluição de aproximadamente 100 vezes da amostra fecal original. Essas diluições foram lavadas uma vez com 2 ml de PBS-b (8000 x g, 5 min, 21°C) e os peletizados foram suspensos em 2 ml de PBS-b.

2.3 Procedimento de enriquecimento das Dynabeads®

10 Um volume de 20 µl da diluição de 100 vezes foi adicionado a um tubo de 2ml contendo 180 µl de PBS-a e 5 µl de Dynabeads® recobertas com anticorpos TF1 ou de Dynabeads® recobertas com anticorpos TF2. Os tubos foram incubados por 30 min a 4°C em um agitador de tubos. Os tubos foram colocados no MPC®-S e deixados para descansar por 3 min antes da remoção de quanto sobrenadante quanto possível por aspiração com seringa e agulha. As amostras foram lavadas três vezes com 2 ml de PBS-a, mais uma vez removendo-se tanto sobrenadante quanto possível.

2.4 Plaqueando em meio seletivo e meio não-seletivo

20 As amostras lavadas foram suspensas em 1 ml de PBS-b e alíquotas de 100 µ foram dispersas nas placas em vários meios seletivos e não-seletivos (Tabela 4) e incubadas por 48 h a 37°C em uma câmara anaeróbica.

Tabela 4: meios empregados para spread-plating

Meios	fabricante	seletivos para	abreviação
de Man, Rogosa e Sharpe	Merck, Darmstadt, Alemanha	lactobacilos, bactérias lácticas ácidas	MRS
Bifidus selective medium	Fluka, St. Gallen, Suíça	bifidobactérias	BSM
K-F Streptococcus Ágar	Oxoid	estreptococos	KF
Nutrient Ágar	Oxoid	não-seletivo	N
Schaedler Anaerobe Ágar	Oxoid	não-seletivo	S
Wilkens Chalgren Anaerobe Ágar	Oxoid	não-seletivo	WC
Brain Heart Infusion Ágar	Biomérieux, Marcy l'Etoile, França	não-seletivo	BHI

Columbia Ágar with 5% sheep blood	Biomérieux	não-seletivo	CBA
Stamm Ágar		não-seletivo	ST

Os meios sólidos foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes. A composição do ágar ST foi como segue: 1 g l⁻¹ de peptona protease, 9 g l⁻¹ de peptona de carne, 3 g l⁻¹ de NaCl, 2 g l⁻¹ de Na₂HPO₄ 2H₂O, 3 g l⁻¹ de extrato de carne, 4 g l⁻¹ de extrato de levedura, 6 g l⁻¹ de D (+)-glicose, 0,5 ml l⁻¹ de Tween 80, 0,25 g l⁻¹ de cisteína-HCl, 1 mg l⁻¹ de re-sazurina, 0,1 g l⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O, 5 mg l⁻¹ de FESO₄ 7H₂O, 0,5 g l⁻¹, 3,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ 2H₂O, 1,5 g l⁻¹ de ágar bacteriológico, pH 7,0.

Para os sujeitos 1 a 4, as colônias de um procedimento de enriquecimento foram selecionadas por seleção com base em ELISA. Para os sujeitos 5 a 8, o procedimento de enriquecimento das Dynabeads® foi repetido duas vezes como segue: após 48 h de incubação as colônias foram raspadas das placas, suspensas em PBS-b dentro da faixa dos padrões de turbidez de McFarland 3 a 5 (preparadas como em (13)). Como antes, uma alíquota de 20 µl desta suspensão foi adicionada a 180 µl de PBS-a. O enriquecimento e o procedimento de plaqueamento foi realizado três vezes no total, como previamente descrito.

As amostras fecais de quatro outros sujeitos (5 AB, 6 MU, 7 LH e 8 CA) foram enriquecidas para bactérias positivas para o Core-1. O procedimento de enriquecimento foi ligeiramente modificado no sentido de ser realizado três vezes no total. Isto é, as colônicas foram obtidas após o isolamento inicial foram raspadas das placas e submetidas a enriquecimento adicional. Sessenta novos isolados foram obtidos desta maneira.

Exemplo 3

Identificação de isolatos

3.1 Bioquímica

As bactérias foram identificadas com o sistema VITEK (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). As bactérias foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante e os cartões de identificação foram usados como segue: cartões ANI para isolatos anaeróbicos e facultativamente bastonetes anaeróbicos gram-positivos capazes de crescer em MRS broth (suspeita de

lactobacilos), cartões GPI para Gram-positive isolatos e cartões GNI+ para isolatos aeróbicos gram-negative.

A identidade bioquímica dos isolatos obtidos usando o sistema VITEK (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) está resumida na Tabela 5. Os isolatos anaeróbicos AG6, MU (1, 3-5) e AB12 pertencem todos ao grupo *Bacteroides fragilis*, enquanto os isolatos aeróbicos são todos membros das *Enterobacteriaceae*; ambos são gram-negativos.

Cepa	identificação	probabilidade
AG6 MU (1, 3-5) AB12	<i>Bacteroides ovatus</i>	82 – 95%
AG3 LH (2-5, 8, 13-16, 18)	<i>Escherichia coli</i>	89 – 99%

3.3 Molecular (sequenciamento)

O DNA foi extraído com o Invisorb Genomic DNA Kit III (Invitex, Berlim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante para peletizados de células lavadas do protocolo III B obtidas das culturas líquidas suspensas em 1 ml de tampão de lise D. iniciador 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 1492r (5' TAC CTT GTT ACG ACT T) (10) foram usadas para amplificar o gene do DNA ribossomal bacteriano.

Cada PCR foi realizada em triplicata e a mistura da reação (50 µl) continha: 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, 1 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 1 µM de cada iniciador, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) e 1 µl do DNA modelo. O programa da PCR foi: 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min e finalmente 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados com o High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Indianapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos foram analisados por eletroforese em um gel de agarose a 1% (w/v) em tampão tris-acetato-EDTA (4,84 g l⁻¹ de Tris, 1,142 ml l⁻¹ de ácido acético glacial, 0,372 g l⁻¹ de EDTA, pH 8,0). A concentração de DNA foi estimada usando o Low DNA Mass Ladder (invitrogen, Carlsbad, EUA).

Para sequenciamento, usa-se ou o iniciador 27f, 338f (5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT) (2), 338r (5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC), 968f (5' AAC GCG AAG AAC CTT AC) (14) ou 1492r. As reações de sequenciamento foram realizadas com o DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Inglaterra) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de sequenciamento foram analisados com o MegaBACE 1000 System (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EUA). As sequências foram reunidas e manualmente ajustadas usando-se a função ContigExpress do Vector NTI Suite 9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, Alemanha). Elas foram subsequentemente alinhadas com sequências altamente similares (92% de similaridade ou mais) obtidas com a função BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1). Os percentuais de similaridade foram calculados a partir de sequências alinhadas sem ambiguidade usando-se a função Sequence Identity Matrix do software Bioedit, versão 5.0.9 ou com o Similarity Matrix, versão 1.1, do Ribosomal Database Project. Os resultados do sequenciamento foram confirmados por comparação com as sequências obtidas de um 16S rRNA gene sequencing service provider (AMODIA, Braunschweig, Alemanha).

A identidade dos isolatos está representada na Tabela 6 e uma unrooted phylogenetic tree baseada nas sequências dos isolatos AG6, MU1, seus parentes mais próximo e da cepa tipo *E. coli* ATCC 11755 está representada na Figura 1.

Tabela 6: identificação das cepas isoladas com bases sequências alinhadas sem ambiguidade dos genes rRNA 16S usando-se a função Similarity Matrix, versão 1.1, do Ribosomal Database Project (5)

Cepa	identidade	Similaridade (%)	com a cepa	número de acesso
AG6	<i>Bacteroides ovatus</i>	98,2	ATCC 8483T	X83952
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	97,1	ATCC 29148T	L16489
MU1	<i>Bacteroides ovatus</i>	98,0	ATCC 8483T	X83952
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	97,1	ATCC 29148T	L16489
AG3	<i>Escherichia coli</i>	99,5	k12 MG1655	AE000460
GH1	<i>Lactobacillus paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	99,4	JCM 8130T	D79212
	<i>L. paracasei</i> sp. <i>tolerans</i>	99,4	JCM 1171T	D16550
96	<i>Staphylococcus warneri</i>	99,2	27836T	L37603
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99,0	51129T	AF041361
TC7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,6	JCM 1136T	D16552
	<i>Lactobacillus zeae</i>	98,7	ATCC 15820	D86516

3.3 DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (DPAA)

Alguns isolatos positivos para o Core-1 obtidos com o procedimento de enriquecimento repetido das Dynabeads® pareciam muito semelhantes no que diz respeito à sua morfologia celular e à morfologia das suas colônias apesar de terem sido isolados de meios diferentes. As cepas também eram muito similares no que diz respeito aos seus perfis bioquímicos obtidos com o sistema VITEK. Surgiu a seguinte questão: as bactérias isoladas seriam cepas idênticas. O RAPD é um método que não exige informações de sequenciamento e que pode ser aplicado para distinguir cepas. Re-

sumidamente, o DNA genômico total é amplificado por PCR com um iniciador de 10 pares de bases a baixo rigor de maneira que sequências randômicas de DNA sejam amplificadas com base em sequências homólogas ao iniciador presente no DNA-alvo. Os produtos de PCR resultantes podem ser separados por eletroforese com gel de agarose e o padrão resultante pode ser comparado entre cepas. Os padrões de banda resultantes para todas as cepas LH foram análogos para os cinco iniciadores RAPD empregados (O-PL07, M13, OPX14, OPA16, OPA18). O padrão claramente difere daquele da cepa de *E. coli* DSMZ 8697 (Fig 2a), uma cepa que se relatou ter atividade do grupo sanguíneo B. As cepas de MU também parecem muito similares (Figura 2b); contudo, o seu padrão de banda claramente difere daquele do de outras cepas de *Bacteroides*, incluindo a AG6. Pareceria que uma cepa positiva para o Core-1 foi repetidamente enriquecida de cada doador positivo durante o processo de isolamento. As cepas isoladas diferiam entre indivíduos.

Exemplo 4

Cultivo e fixação de bactérias para a seleção com base no ELISA

Colônias bem-separadas foram selecionadas aleatoriamente de placas de ágar seletivas e não-seletivas e redistribuídas três vezes em meio não-seletivo. Colônias individuais foram selecionadas e inoculadas em ST (como acima, omitindo-se o ágar), caldo WC ou MRS, dependendo de qual proporcionava melhor crescimento e cultivadas durante a noite a 37°C. Essas culturas foram inoculadas (1%) em 300 ml de caldo ST, WC ou MRS fresco e cultivadas durante a noite a 37°C. As células foram peletizadas (8000 x g, 15 min, 4°C) e ressuspensa em 10 ml de PBS-c (8 g l⁻¹ de NaCl, 0,2 g l⁻¹ de KCl, 1,44 g l⁻¹ de NA₂HPO₄, 0,24 g l⁻¹ de KH₂PO₄) (12). Essa suspensão foi fixada por 3 a 4 h a 4°C pela adição 30 ml de solução de paraformaldeído (PFA) a 4% (preparada de acordo com (8)) em PBS-c. Em seguida, as amostras foram lavadas com 40 ml de PBS-c (8000 x g, 15 min, 4°C) e os peletizados foram suspensos em 15 ml de PBS-c, seguido da adição de igual volume de etanol gelado a 96%. As amostras foram armaze-

nadas a -20°C até a análise.

A pureza das culturas foi checada pela comparação da morfologia celular, assim como pelo comportamento sob coloração de Gram. As culturas foram espalhadas nas placas aerobicamente em CBA para determinar sua capacidade de crescer na presença de oxigênio e para checar a ausência de contaminantes aeróbicos.

Exemplo 6: manutenção dos isolatos

Os estoques criogênicos foram mantidos em tubos Microbank (MAST Diagnostica, Reinfeld, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante e armazenados a -80°C. As soluções de trabalho foram mantidas em caldo WC, ST e MRS. Elas foram subcultivadas a cada 14 dias. A pureza das culturas foi confirmada pela observação do comportamento sob coloração de Gram, pela morfologia celular e pela comparação periódica das morfologias celulares em placas de CBA tanto sob condições aeróbicas quanto sob condições anaeróbicas.

Exemplo 6

Cultivo, fixação e liofilização das bactérias para experimentos com animais

Para uso em experimentos com animais as bactérias foram cultivadas e fixadas como descrito na seção 3 com as seguintes modificações: o volume da cultura inicial chegava a aproximadamente 4l. Antes da fixação, as bactérias foram lavadas uma vez com 100 ml de PBS-b (8000 x g, 15 min, 4°C) e ressuspensas no menor volume possível de PBS-b. Essa suspensão foi dividida em duas porções iguais, uma para fixação (7.1), a outra para liofilização (7.2).

6.1 Fixação

A porção para fixação foi lavada (8000 x g, 15 min, 4°C) e ressuspensa em 30 ml de PBS-c. Esta suspensão foi adicionada a 90 ml da solução de PFA a 4% em PBS-c e fixada por 3 a 4 h a 4°C. Para melhorar a remoção de PFA, as amostras foram lavadas três vezes com 120 ml de PBS-c (8000 x g, 15 min, 4°C). As células peletizadas foram suspensas em 45 ml de PBS-c, seguido da adição de um volume igual de igual volume de

etanol gelado a 96%. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Antes da administração nos animais, as bactérias fixadas foram liofilizadas sob condições de esterilidade em tubos Lid_{BAC} (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para evaporar o etanol. Para garantir a não-viabilidade das bactérias fixadas, elas foram inoculadas (1%) em caldo WC e plaqueadas em CBA e monitoradas para a ausência de crescimento pelo período de uma semana.

6.2 Pasteurização

As suspensões bacterianas foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em um pequeno volume de PBS. As suspensões bacterianas foram incubadas a 72°C por 30 min. Como controle da desativação bem-sucedida, as bactérias foram incubadas em um meio de cultura apropriado como descrito no exemplo 4.

6.3 Liofilização

A porção para liofilização foi adicionada a volume igual de sacarose a 24% (filtração estéril) e dividida em alíquotas em porções de 300 µl em tubos Lid_{BAC} de 2 ml. Essas alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido por 1 h e liofilizadas (Alpha 2-4, Christ, Osterode, Alemanha) após sua colocação em prateleiras pré-resfriadas a -80°C. Após a liofilização, as tampas dos tubos foram fechadas e eles foram armazenados a 4°C usando-se um minissistema de geração de gás Anaerocult® (Merck, Darmstadt, Alemanha) com a adição de sílica gel Orange (Roth, Karlsruhe, Alemanha) como dessecante.

6.4 Determinação dos preparados bacterianos

Os números totais de células dos preparados bacterianos fixados e liofilizados foram determinados com uma câmara Thoma de 0,01 mm de profundidade (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, Alemanha). No caso das bactérias liofilizadas, as unidades formadoras de colônias (UFCs) foram determinadas por plaqueamento de diluições séricas de 10 vezes em WC ágar durante a noite dos cultivos feitos durante a noite e imediatamente antes e após a liofilização. Para este fim, o liofilizado foi dissolvido em 300 µl de caldo WC, deixado para descansar por 15 min, ressuspendido por agitação a

baixa velocidade e diluído serialmente. As UCFs dos preparados foram determinados antes e após o uso em experimentos com animais para garantir a viabilidade. A pureza dos preparados foi checada como descrito na seção 4.

5

Exemplo 7

Amostras de soro

Sangue foi coletado com o sistema S-monvette (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e o soro foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro foram armazenadas em alíquotas a -80°C antes da análise.

10

Exemplo 8

Extração da IgA fecal

Amostras fecais foram coletadas e armazenadas a -80°C. As fezes foram liofilizadas e os pesos secos líquidos registrados. Todas as manipulações foram realizadas em gelo. A IgA foi extraída de acordo com Grewal (6), com algumas modificações. As amostras liofilizadas (~30 mg) foram suspensas a uma proporção de 15 µl/mg peso seco em tampão de extração (PBS-Dulbecco (Biochrom, Berlim, Alemanha) com 1 g l⁻¹ de ASB) com inibidores da protease (5 mg l⁻¹ de leupeptina (Calbiochem, Merck), 48 µg ml⁻¹ 4-(2-aminoetil)benzenosulfonilfloreto (Merck), 1 µg ml⁻¹ de aprotina, 2 µg ml⁻¹ de bestatina (Sigma, Steinheim, Alemanha) e homogenizadas. As amostras foram misturas por agitação a cada 10 min. Após um período de incubação de 1 h, as amostras foram centrifugadas (16000 x g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. O peletizado remanescente foi suspenso a uma proporção de 10 µl/mg peso seco em tampão de extração de IgA e homogeneizado. O procedimento de extração foi repetido e o sobrenadante combinado com o sobrenadante da primeira etapa de extração. Esses sobrenadantes foram centrifugados (16000 x g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante resultante foi dispensado em novos tubos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até a análise.

15

20

25

30

Exemplo 9

Seleção de cepas bacterianas por análise imunoabsorvente ligado a enzimas

As bactérias fixadas foram diluídas em PBS, os números de células foram ajustados em 1×10^7 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 ou 5×10^8 células/ml.

50 μ l de solução bacteriana foram revestidos por cavidade em uma placa de microtitulação de 96 cavidades durante a noite a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS/0,02% Tween 20 (etapas de lavagem idênticas foram realizadas em cada etapa de incubação). Após bloqueio das placas com PBS/ASB a 2%, placas ELISA foram incubadas com sobrenadantes de cultura de hibridoma contendo diferentes anticorpos que reconhecem o Core-1 (Nemod-TF1, Nemod-TF2 ou A68/BA11 menos específico) ou anticorpos de controle (A63-B/C2) em diferentes diluições. Uma imunoglobulina conjugada com peroxidase ploniclinal anticamundongo da cabra (Dako P0260) serviu como anticorpo secundário. A análise foi desenvolvida com TMB como substrato, a reação foi interrompida pela adição de 2,5 N H_2SO_4 e a extinção foi medida a 450/630 nm. Para a determinação da sensibilidade do periodato à ligação pelos anticorpos, as placas de ELISA recobertas foram incubadas com periodato de sódio antes da incubação com anticorpos. Portanto, as placas foram lavadas com tampão de acetato (50 mM, pH 4,5) por 5 min e depois incubadas com 10 mM de ácido periódico em tampão de acetato de sódio por 1 h no escuro. As placas foram lavadas com tampão de acetato de sódio (5 min) e a reação foi interrompida pela adição de 50 mM de boro-hidreto de sódio em PBS (30 min).

Um exemplo desses resultados de ELISA é mostrado nas figuras 2 e 3a.

Exemplo 10

Preparação de componentes de bactérias contendo Core-1

10.1 Análise de preparados brutos de cápsula por análises SDS-PAGE e Western blot

Preparações brutas de cápsula da cepa AG6 foram realizados

de acordo com Pantosti et al. (1991, *Infect. Immun.* 59, 2075-2082).

A preparação das cápsulas foi analisada por SDS-PAGE e o polissacarídeo no preparado foi detectado por coloração com azul alciano de acordo com Karlyshev et al. (2001, *J. Clin. Microbiol.* 39, 279-284) mostrando uma variedade de bandas contendo carboidratos e alta porcentagem de carboidratos de alto peso molecular dentro do preparado (figura 4A). Após o Western blot, os polissacarídeos foram detectados pelo DIG-Glycan Detection Kit (LaRoche Diagnostics), que mostrou fortes bandas a 37 e 26 kDa (figura 4B). A detecção de polissacarídeo contendo Core-1 no Western blot foi realizada usando-se o anticorpo específico para o Core-1 NEMOD-TF2 (sobrenadante da cultura) mostrando uma banda positiva para o Core-1 a 37 kDa (figura 4C).

10.2 Enriquecimento cromatográfico de polissacarídeos positivos para core-1

Dentro da preparação da cápsula da cepa AG6 ainda havia contaminantes de lipopolissacarídeos, como mostrado pela medição do teor de KDO de 11,2 pmol/ μ g de acordo com Hara et al. (1989, *Anal. Biochem.* 179, 162-166) e por SDS-PAGE.

Assim, cápsulas de polissacarídeos e lipopolissacarídeos foram separadas por cromatografia de fase reversa em uma coluna de C18 usando-se um gradiente de propanol/metanol (vide figura 5) de acordo com Hashimoto et al. (2001, *Eur. J. Biochem.* 268, 3139-3144). Os polissacarídeos foram eluídos por um gradiente de eluente B (72% de propanol/8% de metanol em 0,1 M de acetato de amônio, pH 4,5). A detecção de polissacarídeos dentro das frações foi realizada por dot blot e DIG-Glycan Kit. A detecção do Core-1 foi realizada usando-se os anticorpos específicos para o Core-1 Nemo-TF1 e Nemo-TF2. Os polissacarídeos foram eluídos a concentrações de propanol de 14-19% e 25-43%. O carboidrato específico do Core-1 foram detectados apenas a propanol a 29-29,4% (RP1) e propanol a 39-42% (RP2), vide a figura 5, que mostra forte enriquecimento do polissacarídeo positivo para o Core-1 por este método.

As frações positivas para o Core-1 foram usadas em separações

cromatográficas adicionais por hidrólise branda com ácido seguida por cromatografia DEAE usando um gradiente de 0-0,5 M NaCl, de acordo com Tzianabos et al. (1992, J. Biol. Chem. 267, 18230-18235). Por este método, os polissacarídeos positivos para o Core-1 foram separados em três frações eluídas a 0 M NaCl (D1), 0,04 M NaCl (D2) e 0,9-0,17 M NaCl (D3), resultando em um enriquecimento posterior dos polissacarídeos positivos para o Core-1.

No processo de acordo com a presente invenção, polissacarídeos capsulares de *B. ovatus* AG6 são purificados e sua estrutura analisada por espectrometria de massa. Preferivelmente, o polissacarídeos capsulares da *B. ovatus* AG6 são acumulados pela extração de água por fenol seguida pela extração por éter como já descrita por Pantosti et al. 1991. Em seguida, os polissacarídeos positivos para o Core-1 são acumulados de preparado capsular bruto (PCB) por cromatografia de fase reversa (C18 Synergi 4 um Fusion-RP 80i, 250 mm x 10 mm, Phenomenex). Os teores de monossacarídeos do extrato bruto de polissacarídeo capsular e dos polissacarídeos positivos para o Core-1 purificados são determinados por análise HPAEC-PAD (cromatografia de troca iônica de alto pH, detecção por amperometria pulsada). Enfim, a estrutura dos polissacarídeos capsulares positivos para o Core-1 é analisada por espectrometria de massa.

10.3 Análises dos monossacarídeos o extrato da preparação bruta e extrato capsular purificado da *B. ovatus* AG6

Na primeira etapa, o polissacarídeo positivo para o Core-1 da rough capsular preparation de *B. ovatus* AG6 foi acumulado por cromatografia de fase reversa, como já descrito antes. Em seguida, o produto da purificação, assim como o teor de monossacarídeos dos polissacarídeos positivos para o Core-1 acumulados, foi determinado por análises HPAEC-PAD.

Antes da análise dos monossacarídeos, extratos de polissacarídeos completamente hidrolisados por ácido trifluoroacético 2N (TFA) a 100°C por 4 h. Durante a hidrólise com TFA os grupos acetil foram perdidos. Portanto, os monossacarídeos glicosamina e galactosamina (GlcNH₂ e GalNH₂) não puderam distinguir entre *N*-acetilglicosamina e *N*-

acetilgalactosamina (GlcNac e GalNAc). Os monossacarídeos foram separados por cromatografia por troca de ânions em alto pH e detectados por amperometria pulsada, como já descrito antes. Para identificar os monossacarídeos e determinar suas concentrações, padrões de monossacarídeos externos e internos foram utilizados.

O teor proporcional de monossacarídeos do extrato de PCB, que foi determinado para a comparação de LPS e CPS (mencionada antes) obviamente variam entre o teor proporcional de monossacarídeos do extrato de CPS determinado para esta comparação. Mas extratos de CPS foram preparados de diferentes culturas de *B. ovatus* AG6, o que poderia ser uma explicação para a variedade mencionada de teores de monossacarídeos.

A produção de polissacarídeos positivos para o Core-1 acumulados por cromatografia de fase reversa foi de 30%. A comparação dos teores proporcionais de monossacarídeos dos extratos capsulares brutos e purificados revelou um aumento de fucose, GalNAc/GalNH₂, galactose e glicose, enquanto a glicose poderia ser um contaminante (tabela 7). O teor proporcional de ramnose, GlcNH₂/GlcNAc e manose pôde ser reduzido por cromatografia de fase reversa (tabela 7). O ácido galacturônico e o ácido glicorônico, que são componentes característicos de polissacarídeos capsulares, não puderam ser identificados no extrato de polissacarídeo positivo para o Core-1 purificado. Esses dados poderiam indicar que a AG6 do *B. Ovatus* tem mais do que um polissacarídeo capsular. Estes polissacarídeos capsulares poderiam ser separados um do outro por cromatografia de fase reversa. Tzianabos et al. (1992) também descreveram que a cápsula do *B. fragilis* consiste em dois diferentes polissacarídeos.

Tabela 7: análise dos monossacarídeos do extrato bruto de polissacarídeo capsular (PSC) e extrato de polissacarídeo positivo para o Core-1 purificado por cromatografia de fase reversa. O teor proporcional de monossacarídeos é relatado na quantidade total de monossacarídeos.

Monossacáridos	Extrato bruto de CPS (%)	Extrato purificado de CPS (%)
<i>Fucose</i>	9,5	11,4
Ramnose	17,7	3,1
GalNH ₂ /GalNAc	5,2	14,9
Galactose	4,6	6,9
Glicose	44,2	50
Manose	18,2	6,9
Ácido galacturônico	10	0
n. d.	3	2

O acúmulo de fucose, GalNH₂/GalNAc e galactose poderia ser uma indicação de que os monossacáridos são componentes das unidades repetidas do polissacarídeo positivo para o Core-1, enquanto os monossacáridos fortemente reduzidos poderiam ser contaminantes baixos

10.4 Análise estrutural do polissacarídeo positivo para o Core-1 por espectrometria de massa

A estrutura do polissacarídeo positivo para o Core-1 foi analisada por matrix-assisted laser time-off flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), como já descrito acima, e por electrospray-ion-trap-mass-spectrometry (ESI-Ion-Trap-MS).

Para a espectrometria de massa ESI-Ion-Trap o polissacarídeo positivo para o Core-1 acumulado foi fragmentado seja por hidrólise com ácido acídico a 1% (1,5 h a 100°C), seja por digestão enzimática com chondroitinase ABC (clivagem das ligações beta1-44GalNAc/GlcNAc) ou com beta1-3galactosidase). Além disso, a fragmentação por digestão dupla com condroitinase ABC/alfa1-3,4 fucosidase ou ácido acídico a 1%/beta1-3 galactosidase ocorreu (todas as enzimas recebidas da Glyko GmbH). Todas as digestões enzimáticas foram incubadas a 37°C durante a noite. Análises por espectrometria de massa (MS assim como MS/MS) foram realizadas no modo positivo e no modo negativo. Antes da análise, todas as amostras foram dessalinizadas por Carbograph SPE (Aalltech Associates Inc.), como descri-

to no manual do fabricante e diluídas em 2,5 mM de NH₃/40% acetotrinila.

A estrutura dos fragmentos glicanos positivos para o Core-1, que já foi identificada por análises MALDI-MS, pôde ser verificada por determinação ESI-Ion-Trap. Fragmentos adicionais também puderam ser identificados por espectometria de massa ESI-Ion-Trap (tabela 8).

Tabela 8: análise estrutural por espectometria de massa ESI-Ion-Trap (modo positivo). O polissacarídeo positivo para Core-1 purificado foi fragmentado por hidrólise com ácido acídico a 1% por 1,5 h a 100°C.

MS		MS/MS	
Massas determinadas (M+H⁺/M+NH₄⁺)	Sequência identificada	Massas determinadas (M+Na⁺)	Sequência identificada
425/442	HexNAc-HexNAc		
573/590	HexNAc(HexNAc)-Hex	390	HexNAc-Hex
749/766	HexNAc(HexNAc-Hex)-Hex	595	HexNAc-HexNAc-Hex
529/545	DesHex-desHexM-HexNAc		
690/706	DesHex-desHexM-HexNAc-Hex		
733/750	DesHex-HexNAc(HexNAc)-Hex		
674/591	DesHex-desHexM-HexNAc-HexNAc	493	DexHex-desHex-desHexM
633/650	Hex-desHEX-desHEX-desHexM		

HexNAc: N-acetil-hexosamina; Hex: hexose; desHex: desoxihexose; M: grupo metil

A sequência de unidades repetidas do polissacarídeo capsular positivo para o Core-1 foi determinada por sobreposição de fragmentos (figura 6).

Análises por espectometria de massa de polissacarídeos positivos para o Core-1 digeridos enzimaticamente deram indicações de ligações glicosídicas entre os monossacarídeos. Além disso, puderam ser identificadas galactose (clivagem bem-sucedida pela beta1-3 galactosidase) e fucose (clivagem bem-sucedida pela alfa1-3,4 fucosidase) (figura 7).

Esse resultado está em concordância com as análises de mo-

nossacarídeos mencionadas antes, que revelaram um acúmulo de fucose, galactose e GalNAc.

10.5 Verificação da estrutura de core-1 como dissacarídeo ramificante da unidade repetida do polissacarídeo capsular

5 A estrutura de core-1 ramificante, Galbeta1-3GalNAc, na unidade repetida deveria ser identificada por digestão dupla com a exoglicosidase beta1-3 galactosidase e HexNAcase (clivagem beta1-2,3,4,6 Gal-

10 Nac/GlcNAc) seguida por análise de monossacarídeos como descrito acima. Duas amostras contendo quantidades iguais de polissacarídeo positivo para o Core-1 foram filtradas para purificá-las de monossacarídeos livres. Em seguida, uma das amostras sofreu digestão com beta1-3 galactosidase a 37°C durante a noite. Ambas amostras foram filtradas mais uma vez para separar a galactose livre da amostra digerida, enquanto a amostra não-digerida foi usada como controle negativo. Subsequentemente, os reti-

15 dos foram coletados e digeridos com HexNAcase. Finalmente, ambas amostras foram filtradas novamente. Todos os eluídos foram analisados por HPAEC-PAD.

Para controlar se a estrutura de core-1 foi removida pela dupla digestão mas tinha sido deixada intacta pela digestão com HexNAcase (con-

20 trole negativo), os retidos foram analisados por dot blot usando-se o DIG-Glykan Detection Kit (Roche Diagnostics) para detectar polissacarídeos e com o anticorpo Nemod-TF1 específico para o Core-1 para identificar a estrutura de core-1.

Nos dois eluídos de amostras duplamente digeridas, galactose

25 (primeiro eluído) e GalNAc (segundo eluído) puderam ser identificadas por análise de monossacarídeos. Enquanto no eluído do controle negativo, que foi digerido apenas com a exoglicosidase HexNAcase, nem galactose, nem GalNAc puderam ser identificadas. Isso é uma forte indicação da ramificação da estrutura do Core-1 1, Galbeta1-3GalNAc.

30 Análises dot blot do retido duplamente digerido e da amostra digerida por HexNAcase usando-se o DIG-Glykan Detection Kit revelaram concentrações similares de polissacarídeos, que estavam aplicadas na

membrana de nitrocelulose. A estrutura de core-1 não pôde ser detectada na amostra duplamente digerida, enquanto na amostra digerida por HexNAcase a estrutura de core-1 ainda foi identificada por imunoblot usando-se o anti-corpo Nemod-TF1.

5 **10.6 Verificação da estrutura do polissacarídeo positivo para o Core-1 por análise dos seus fragmentos separados**

Para verificação adicional da estrutura do polissacarídeo positivo para o Core-1, o glicano foi fragmentado por hidrólise com ácido acídico a 1% (1,5 h, 100°C). Os fragmentos de glicano foram marcados com o fluoróforo 2-amino-benzamida (2-AB) como já descrito por J. C. Bigge et al. (1995). Para este procedimento, as amostras foram tornadas livres de partículas e sais por purificação em uma coluna Carbograoh SPE (Alltech Associates Inc.) e liofilizadas. O peletizado foi dissolvido em 5 µl de 2-AB em DMSO/ácido acético glacial/cianoboro-hidreto de sódio e incubado a 60°C por 2 h. Os fragmentos marcados com 2-AB foram separados da 2-AB livre por cromatografia em papel. Finalmente, os fragmentos conjugados com 2-AB foram eluídos com água. Após a liofilização, o peletizado foi dissolvido em acetonitrila a 50%. Com base no seu tamanho, os fragmentos foram separados por HPLC de fase normal (coluna: Luna 3µNH₂ A100, Phenomenex, eluente A 15 mM NH₄-acetato; eluente B: acetonitrila) com detecção por fluorescência. A sequência de fragmentos foi analisada por espectrometria de massa ESI. Finalmente, para a verificação das ligações glicosídicas e melhor identificação dos monossacarídeos como componentes dos fragmentos, os oligossacarídeos foram digeridos com a exoglicosidase beta1-3 galactosidase, alfa1-3,4 fucosidase e HexNAcase, como já descrito neste. O sucesso da digestão controlada por espectrometria de massa ESI e a remoção dos monossacarídeos terminais foi identificada por HPAEC-PAD, como já descrito antes.

30 A estrutura já identificada de unidades repetidas do polissacarídeo positivo para o Core-1 foi confirmada pelo fato de as duas análises mostrarem os fragmentos de oligossacarídeos e monossacarídeos clivados esperados (tabela 9).

Tabela 9:

Fragmentos de oligossacarídeos	exoglicosidase	análises ESI-MS	análises de monossacarídeos
HexNAc-Hex	beta1-3 galactosidase	HexNAc Hex HexNAc-Hex	GalNAc/GalNH ₂ galactose
DesHex-desHex-desHexM	alfa1-3,4 fucosidase	desHexM DesHex-desHexM DesHex-desHex	fucose
DesHex-desHex	alfa1-3, 4 fucosidase	desHex	fucose
DesHex-desHexM-HexNAcM-HexNAc	HexNAcase (alfa 1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc)	HexNAc DesHex-desHexM-HexNAc	n. d.

Em conclusão, a estrutura de unidades repetidas do polissacarídeo capsular positivo para core-1 (figura 8) foi confirmada por uma variedade de análises.

- 5 Além disso, os resultados revelaram (por favor, vide também a figura 19, em particular nº 5) que a ligação glicosídica entre a Gal-GalNAc e a molécula GalNAc fundamental é alfanumérica. Esta descoberta recebeu apoio das análises dot blot com mAbs TF1, TF2 e HH8, que são específicos para o anômero alfa da TF. Os mAbs A68-E/A2 e A68-E/E3, que são específicos para o Tfbeta também foram usados. Assim, o Ag TFalfa tumor-específico foi identificado dentro da estrutura ramificante do polissacarídeo capsular da AG6 do *B. ovatus*.
- 10

Exemplo 11 Modelos animais

- 15 **11.1 Imunização intraperitoneal de camundongos com bactérias mortas**

11.1.1 Análise de soros de camundongo pelo teste de resposta imune-humoral 1

- Camundongos Balb/c fêmeas (Charles River, 4 por grupo) foram tratados com ciclofosfamida a uma dose de 50 mg/kg do peso corporal no dia -1. Nos dias 0, 7 e 4, os camundongos receberam 5×10^8 bactérias por
- 20

injeção intraperitoneal (cepas AG3 (grupo L) 32 ou 53 negativas para o Core-1 ou cepas AG6 (grupo K) positivas para o Core-1) em PBS ou apenas PBS (grupo L). Amostras de soro foram tomadas nos dias -4, 21, 27 e 30.

5 Os soros dos camundongos foram analisados por ELISA em busca da ligação à core-1. Como antígeno do Core-1 serviu a asialoglicoforina. Como controle negativo foi usado a asialoglicoforina tratada com ácido periódico. O tratamento com periodato destrói o anel exterior de carboidrato do Core-1, destruindo assim o epitopo de core-1.

10 Placas de fundo chato de 96 cavidades foram revestidas com asialoglicoforina A (AGP) em uma concentração de 2 µg/ml. A placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween.

Metade da placa foi tratada com periodato como segue:

15 As cavidades foram incubadas por 5 minutos com 50 mM de tampão de acetato de sódio pH 4,5 seguido de 1 h de incubação com 10 mM de ácido periódico em tampão de acetato no escuro. As cavidades foram incubadas por 5 minutos com 50 mM de tampão de acetato de sódio pH 4,5. A reação foi interrompida por incubação com boro-hidreto de sódio (50 mM em PBS, 30 min). Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween.

20 As placas foram então bloqueadas por adição de ASB a 2% por 30 min.

25 A incubação com diferentes diluições de soro de camundongo foi realizada por 1,5 h. A imunoglobulina que sofrera ligação foi detectada com um anticorpo IgM anticamundongo da cabra conjugado com peroxidase (1:5000 em PBS/ABS a 1%). A análise foi desenvolvida com TMB como substrato e a reação foi interrompida por adição de 2,5 N H₂SO₄.

30 A figura 9 mostra a ligação dos anticorpos IgM do soro a AGP positivo para o core-1 e a AGP negativo para o core-1 (AGP+PJ). Apenas os soros de três entre quatro camundongos imuzados com bactérias positivas para o Core-1 (grupo K) mostraram forte ligação ao AGP, enquanto o sinal é reduzido após clivagem do Core-1 com PJ.

Portanto, as bactérias positivas para o Core-1 são capazes de

induzir imunidade humoral direcionada à core-1 em camundongos.

111.1.2 Análise dos soros de camundongo pelo teste de resposta humoral 2

Camundongos C3H machos (Charles River, 4 por grupo) foram
5 imunizados com 5×10^8 bactérias pasteurizadas por injeção intraperitoneal das cepas core-1 positivas e core-1 negativas em 200 μ l de PBS nos dias 0, 7 e 14. Os soros foram coletados antes da imunização e nos dias 13, 21 e 28 e analisados pelo teste de resposta humoral 2.

10 Placas de microtitulação de fundo chato com 96 cavidades foram recobertas com diferentes conjugados de carboidrato-PAA (GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA, Fuc α 1-2GalNAc α 1-PAA, GalNAc α 1-3Gal β -PAA, Gal α 1-3GalNAc β -PAA, Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA) em 5 μ g/ml em tampão de revestimento (8,4 g/l NaHCO₃, 3,56 g/l Na₂CO₃, pH=9,49) e incubadas durante a noite a 4°C.

15 As placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween.

As placas foram então bloqueadas pela adição de ASB a 2% por 30 min.

20 As incubações com diferentes diluições de soro de camundongo foram realizadas por 1,5 h. A imunoglobulina que sofrera ligação foi detectada com um anticorpo IgM anticamundongo da cabra conjugado com peroxidase (1:5000 em PBS/ABS a 1%). A análise foi desenvolvida com TMB como substrato e a reação foi interrompida por adição de 2,5 N H₂SO₄.

A figura 10 mostra o valor médio dos sinais ELISA contra o conjugado PAA Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA em relação ao sinal ELISA contra
25 o GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA, para os soros de 4 camundongos por grupo no dia 0 (antes do soro imune) e no dia 21 [o sinal ELISA relativo é calculado de acordo com a equação: (sinais ELISA contra a Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA) * 100/ (sinal ELISA contra a GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA)]. Os soros foram calculados como positivos se o soro
30 imune mostrasse um aumento de pelo menos 50% em comparação com o soro pré-imune. Pode ser demonstrado que apenas as cepas AG6 e MU1 positivas para o Core-1 induziram uma resposta imune-humoral específica

para o Core-1 em camundongos.

11.1.3 Análise do soro do camundongo com o teste de resposta imune-humoral 3

Camundongos Balb/c fêmeas (Charles River, 4 por grupo) foram tratados com ciclofosfamida a uma dose de 50 mg/kg do peso corporal no dia -1. Nos dias 0, 7 e 14, os camundongos receberam 5×10^8 bactérias por injeção intraperitoneal (cepas AG3 (grupo L) 32 ou 53 negativas para o Core-1 ou cepas AG6 (grupo K) positivas para o Core-1) em PBS ou apenas PBS (grupo L). Amostras de soro foram tomadas nos dias -4, 21, 27 e 30.

Análises por citometria de fluxo foram realizadas de maneira a analisar a ligação do soro dos camundongos às linhagens celulares tumorais humanas positivas e negativas para o Core-1 (NM-wt e NM-D4, respectivamente; NM-wt é a linhagem-mãe da NM-D4, como descrito em WO2005/017130 A2 e EP1654353; a NM-D4 está depositada na DSMZ como DSM ACC2605). 3×10^5 células por tubo foram peletizadas e o peletizado foi ressuspensionado em 50 µl de soro murino (diluído a 1:50 em PBS/ FCS a 10%), anticorpo de controle ou apenas PBS/FCS a 10%. As amostras foram incubadas por 20 min a 4°C, lavadas com PBS e centrifugadas. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo IgM anticamundongo da cabra conjugado com Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:200 em PBS/FCS a 10%) por 20 min a 4°C, lavadas com PBS e ressuspensas em 200 µl de PBS para análise por citometria de fluxo.

A figuras 11 a e b mostram a ligação dos anticorpos IgM do soro do rato às linhagens celulares humanas NM-wt (negativa para o Core-1) e NM-D4 (positiva para o Core-1). Enquanto a ligação à linhagem NM-wt negativa para o Core-1 é comparável entre os camundongos imunizados com bactérias negativas para o Core-1 (grupo L) e bactérias positivas para o Core-1 (grupo K), há uma ligação significativamente mais forte de 3 entre 4 camundongos do grupo K à linhagem NM-D4 positiva para o Core-1. Isso é indicativo da especificidade da resposta imune-humoral em camundongos imunizados com as bactérias positivas para o Core-1.

11.1.4 Análise do soro do camundongo com os testes de

resposta imune-humoral 1, 2 e 3

Camundongos C3H machos (Charles River, 4 camundongos por grupo) foram imunizados por injeção intraperitoneal com 1×10^9 bactérias pasteurizadas da cepa *Bacteroides ovatus* positiva para o Core-1 da cepa de *Bacteroides ovatus* MU1, 1×10^9 bactérias pasteurizadas da cepa de *E. coli* LH2 positiva para a A69-BA11 e 1×10^9 bactérias pasteurizadas negativas para o Core-1 de cepas da *E. coli* (AG3, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32) em 200 μ l de PBS nos dias 0, 7 e 14. Os soros foram coletados antes da imunização e nos dias 13, 21 e 28 e analisados pelos testes de resposta imune-humoral 1, 2 e 3 como descrito acima.

Enquanto a cepa AG3 foi negativa para todos os testes de resposta imune-humoral, o soro coletado dos camundongos após a imunização com as cepas de *E. coli* O86 e LH2 mostraram anticorpo reativos à AGP em TRIH 1. Ainda assim, apenas a cepa MU-1 positiva para o Core-1 mostrou forte respostas imunes específicas fortes contra o Core-1 dos conjugados PAA (TRIH 2) e nas células tumorais humanas (TRIH 3) além da indução de anticorpos específicos para a AGP no TRIH. Assim, pudemos induzir uma forte resposta imune-humoral específica contra o Core-1 apenas com micro-organismos positivos para o Core-1 do *Bacteroides ovatus* (MU-1).

As figs. 11 c a e mostram os resultados.

11.2 Imunização oral de camundongos livres de germes com bactérias positivas para o Core-1 vivas

Camundongos C3H livres de germes foram imunizados com 2×10^9 bactérias vivas da cepa AG6 nos dias 2, 3, 4, 9, 10, 11, 16, 17 e 18. As amostras de soro foram tomadas no dia 0 (soro pré-imune) e nos dias 14 e 21 e analisadas em busca de anticorpos IgM específicos para a AGP no teste de resposta imune-humoral 1.

Os camundongos imunizados mostraram titulações anti-Core-1 maiores em comparação com os camundongos de controle, como demonstrado pela ligação do soro dos camundongos às placas de microtitulação recobertas com AGP. A detecção da IgM do camundongo ligada foi realizada com anticorpos IgM anticamundongo acoplados com peroxidase. A especifi-

cidade do sinal para o Core-1 foi demonstrada pelo decréscimo do sinal ELISA após o tratamento com ácido periódico (destruindo a estrutura de carboidrato). Após 14 ou 21 dias, 3 de 3 camundongos tinham níveis elevados de anticorpos IgM contra o Core-1 enquanto os camundongos de controle não demonstraram qualquer aumento dos sinais ELISA contra a AGP em comparação com AGP+PJ, como mostrado na figura 12.

11.3 Imunização oral de camundongos convencionais com bactérias pasteurizadas e vivas positivas para o Core-1

Camundongos C3H foram imunizados oralmente com 1×10^{11} (grupo A) ou 1×10^{10} (grupo B) bactérias pasteurizadas da cepa AG6 diariamente nos dias 0 a 28. Amostras de soro foram tomadas no dia -1 (soro pré-imune) e nos dias 13, 21 e 35 e analisados em busca de anticorpos IgM AGP-específicos no teste de resposta imune-humoral 1.

O soro coletado dos camundongos após a imunização mostrou diminuição das titulações anti-Core-1, como demonstrado pela ligação dos soros dos camundongos a placas de microtitulação revestidas com GP ou AGP (com e sem tratamento com ácido periódico). A detecção da IgM de camundongo ligada foi realizada com anticorpos IgM anticamundongo acoplados com peroxidase. A especificidade do sinal para o Core-1 foi demonstrada pela diminuição do sinal ELISA após o tratamento com ácido periódico (destruindo a estrutura de carboidrato; diminuição de pelo menos 30%) e pelo menor sinal contra a GP (aumento do sinal para AGP de pelo menos 50%).

Foi demonstrado que 5 entre 6 camundongos do grupo A e 5 entre 8 camundongos do grupo B tinham desenvolvido anticorpos específicos para o Core-1 pelo dia 21 (figura 13).

No teste de resposta imune-humoral 3 os soros de camundongo foram analisados para a ligação à linhagem celular tumoral positiva para o Core-1 NM-D4 em comparação com a linhagem negativa para Core-1 NM-wt por citometria de fluxo. 3×10^5 células por tubo foram peletizadas e o peletizado foi ressuspensionado em 50 μ l de soro murino (diluído a 1:300 em PBS/ASB a 1%), anticorpo de controle ou apenas PBS/ASB a 1%. As amos-

tras foram incubadas por 60 min a 4°C, lavadas com PBS e centrifugadas. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo IgM anticamundongo da cabra conjugado com biotina (Jackson Immuno Research; 1:200 em PBS/ASB a 1%) por 60 min a 4°C e lavadas com PBS. A seguir, as células foram incubadas com estreptavidina conjugada com Cy3 (Jackson Immuno Research; 1:200 em PBS/ASB a 1%) por 60 min a 4°C e ressuspensas em 200 µl de PBS para análise por citometria de fluxo.

Os resultados foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$(\% \text{ de células positivas em NM-D4}_{\text{soro imune}} - \% \text{ de células positivas em NM-D4}_{\text{soro pré-imune}}) / (\% \text{ de células positivas em NM-wt}_{\text{soro imune}} - \% \text{ células positivas em NM-wt}_{\text{soro pré-imune}}) = X$$

Soros de camundongo com um quociente $X \geq 10$ foram encarados como positivos (com $\% \text{ de células positivas em NM-wt}_{\text{soro imune}} - \% \text{ de células positivas em NM-wt}_{\text{soro pré-imune}} \geq 1$).

No dia 28, 11 dos 13 camundongos tinham desenvolvido uma resposta imune-humoral contra a linhagem celular tumoral humana positiva para o Core-1 NM-D4, como mostrado na figura 14.

No teste de resposta imune-humoral 2, os soros de camundongo do dia 28 foram analisados em busca da ligação à Galβ1-3 GalNAc a-PAA (PAA 48) ou Galβ1-3 GlcNAc a-PAA (PAA 43).

Placas de microtitulação de fundo chato de 96 cavidades foram revestidas seja com Galβ1-3 GalNAc a-PAA (PAA 48), seja com Galβ1-3 GlcNAc a-PAA (PAA 43), a 5 µg/ml em tampão de revestimento (8,4 g/l NaHCO₃, 3,56 g/l Na₂CO₃, pH = 9,49) e incubadas durante a noite a 4°C. Após o bloqueio, as incubações foram realizadas por 1,5 hora. A imunoglobulina que sofreu ligação foi detectada com um anticorpo IgM anticamundongo da cabra conjugado com peroxidase (1:5000 em PBS/ABS a 1%). A análise foi desenvolvida com TMB como substrato e a reação foi interrompida por adição de 2,5 N H₂SO₄.

Os resultados estão representados na Figura 21. Foi demonstrado que 5 de 13 camundongos tinham desenvolvido anticorpos específicos

pelo dia 28.

Exemplo 12 Potencial de bactérias positivas para o Core-1 para a indução de uma resposta imunocelular (*in vitro*)

12.1 Geração de células dendríticas funcionais

5 A linhagem celular dendrítica NemodDC (pNM-DC) foi usada como fonte de células apresentadoras de antígenos (APCs). As pNM-DCs foram diferenciadas em iNM-DCs e em seguida ocorreu o carregamento com lisados de bactérias (LiBa) das seguintes cepas bacterianas: AG6, MU1, 52 e 53. 50 µg/ml de cada LiBa foram reunidos com citocinas de maturação ao
10 meio de cultura e as iNM-DCs foram diferenciadas até o seu estado maduro (mNM-DCs).

Mais detalhadamente, na primeira etapa, as pNM-DCs (1×10^5 /ml) foram diferenciadas em iNM-DCs por incubação de 7 dias em meio NemodDC (70% de MEM-alfa; 20% de FCS; 10% de CM5637) com a adição
15 de 1000 U/ml de GM-CSF, 100 U/ml de IL-4 e 2,5 ng/ml de TNF-alfa. Em seguida 1×10^6 /ml de Nm-DCs (iNM-DCs) imaturas foram carregadas seja com lisados de bactérias (50 µg/ml), lisados de células tumorais (1×10^6 células tumorais lisadas para carregamento em 1×10^6 NM-DCs) ou proteínas de AGP ou GP (20 µg/ml) e amadurecidas por 2 dias por adição de 75 ng/ml
20 de TNF-alfa.

O amadurecimento do fenótipo de mNM-DC é muito importante para a bem-sucedida ativação das células T e foi testado por meio de citometria de fluxo para a expressão de CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD35, CD80, CD83, CD86, CD116, HLA-ABC e HLA-DR. Apenas aquelas DCs com fenótipo correspondente ao fenótipo das DCs maduras foram usados na ativação
25 das células T.

12.2 Geração de células T ativadas contra o Core-1 e detecção da produção de GM-CSF (teste de resposta imunocelular 1) e de produção TNF-alfa (teste de resposta imunocelular 2) usando ELISA

30 Após 7-10 dias de inicialização dos linfócitos T com NM-DCs carregadas com lisados bacterianos, as células T resultantes ($0,7 \times 10^6$ /ml) foram re-estimuladas com mNM-DCs (1×10^5 /ml) carregadas com lisados

clulares tumorais positivos para o Core-1 (50 µg/ml). Após 48 h de incubação os sobrenadantes foram coletados e analisados usando, para avaliação da produção de citocinas em resposta à linhagem celular tumoral humana positiva para o Core-1 NM-D4, os kits BD OptEIA® para GM-CSF e TNF-alfa.

5 As placas de 96 cavidades foram pré-revestidas com 50 µl de anticorpos anti-seres humanos (GM-CSF ou TNF-alfa) diluídos a 1:250 em tampão de revestimento. Após as etapas de lavagem e de bloqueio, 100 µl de sobrenadantes ou padrões foram adicionados a microcavidades e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Para a curva padrão, o GM-CSF humano recombinante em concentrações de 0; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125 e 10 250 pg/ml e a TNF-humana recombinante, em concentrações de 0; 4,7; 9,4; 18,8; 37,5; 75; 150 e 300 pg/ml foram usadas. Após lavagem, 100 µl de solução Working Detector preparada por cavidade foram adicionados e a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Na próxima etapa, 100 µl 15 de One-step Substrate Reagent TMB foram adicionados por cavidade. Após a incubação final por 30 minutos e adição de 50 µl de solução interruptora, as extensões foram lidas a 450 nm.

Os resultados demonstrados nas figuras 15A e B mostram evidências claras de que as células T geradas para lisados bacterianos positivos para o Core-1 são capazes de reconhecer DCs carregadas com lisado 20 celular positivo para o Core-1 da linhagem celular humana NM-D4 por produção de citocinas inibidoras de tumores tais como a TNF-alfa e a GM-CSF. Em contraste, um nível muito baixo de citocinas foi liberado em resposta aos lisados celulares negativos para o Core-1. Além do mais, esse reconhecimento 25 foi inibido especificamente através da pré-incubação com NM-DCs carregadas com lisado junto com anticorpos específicos para o Core-1.

12.3 Análise por ELISPOT para avaliação da secreção de IFN-gama pelos linfócitos T ativados direcionados contra o Core-1 (teste de resposta imunocelular 2)

30 A análise por ELISPOT foi usada para a avaliação da secreção de IFN-gama em resposta à estimulação antígeno-específica. Essa análise permite a quantificação da capacidade funcional das células T pré-

sensibilizadas para reconhecer antígenos do Core-1 de uma maneira antígeno-específica.

Os linfócitos T foram primeiro ativados *in vitro* mediante cocultivo com DCs carregadas com lisados bacterianos. Após 7 a 10 dias de inicia-
5 lização, as células T ativadas foram coletadas e reapresentadas (redesafiados) (na proporção células T/DCs de 10:1) a DCs carregadas com lisados celulares tumorais seres humanos positivos para o Core-1 (NM-D4) e negativos para o Core-1 (NM-wt).

As cavidades da placa de ELISpot foram pré-revestidas com anticorpos de camundongo anti-IFN-gama humana (kit Mactech) que se ligam
10 à base de nitrocelulose da placa de ELISpot. As células T reapresentadas foram transferidas para as cavidades e citocinas foram liberadas durante o período de incubação. A IFN-gama liberada localmente ao redor de cada célula T se liga ao anticorpo específico e é dessa forma "capturada" por ele.
15 Após 24 horas de incubação, as células foram removidas. Um segundo anticorpo contra anti-IFN-gama humana na concentração de 1 µl/ml é adicionado às cavidades; esse anticorpo biotinilado é acoplado a uma enzima capaz de converter um substrato em um produto insolúvel colorido. As placas são lavadas mais uma vez e estreptavidina conjugada com enzima-AP em uma
20 concentração de 1 µg/ml é adicionada. Finalmente, um substrato precipitante BCIP + NBT é adicionado e a placa é incubada até manchas emergirem no lado das células que estão respondendo. As manchas coloridas são contadas e analisadas usando-se um sistema de imagens digitais.

Os resultados mostraram que as células T geradas para lisados
25 bacterianos positivos para o Core-1 (AG6 e MU1) são capazes de reconhecer DCs carregadas com lisado celular positivo para o Core-1 da linhagem celular tumoral humana NM-D4 pela produção da citocina inidora de tumores IFN-gama (Figura 16). Um nível muito baixo de citocinas foi liberado em resposta aos lisados celulares negativos para o Core-1 (R+DC/wt). Além disso,
30 a especificidade do reconhecimento do lisado celular positivo para o Core-1 (R+DC/D4) foi provado pelo bloqueio da liberação de citocinas com o anticorpo Nemod TF1 específico para o Core-1 (R+DC/D4+Ak).

12.4 Teste de resposta imunocelular 3: análise da proliferação das células T

As células T sensibilizadas e re-estimuladas, como descrito acima para a análise por ELISpot, foram transferidas após a incubação da placa de ELISpot para uma placa de 96 cavidades e analisadas o reagente de proliferação celular colorimétrico WST-1 (Roche Molecular Biochemicals) cujo sal de tetrazólio é clivado pelas enzimas mitocondriais, de maneira que a quantidade de tintura desenvolvida (lida a 450 nm) se correlaciona diretamente com o número de células metabolicamente ativas na cultura. A absorção do meio de cultura mais wst-1 na ausência de células foi a posição nula para o leitor da análise reticulada por enzima imunoabsorvente. O procedimento consiste em uma adição em uma etapa de 10 µl por cavidade do reagente de proliferação WST (Roche) e incubação por 3 horas a 37°C e, em seguida, medição a 450 nm.

Os resultados demonstrados na figura 17 mostram evidências claras de que as células T geradas para os lisados bacterianos positivos para o Core-1 reconhecem DCs carregadas com lisado celular positivo para o Core-1 da linhagem celular tumoral humana NM-D4, como demonstrado pela proliferação específica. Além disso, esse reconhecimento foi inibido especificamente através de pré-incubação de NM-DCs carregas com lisado junto com anticorpos específicos para o Core-1.

12.5 Teste de resposta imunocelular 4: teste de imunofluorescência para a apresentação de Core-1 em DCs carregadas com lisados bacterianos

Para analisar o processamento e a apresentação do Core-1 por NM-DCs carregadas com lisado bacteriano, análises por imunofluorescência foram realizadas usando anticorpos monoclonais específicos para o Core-1 (Nemod-TF1, Nemod-TF2). A apresentação do antígeno do Core-1 processado na superfície das DCs maduras foi demonstrada com a ajuda de imunofluorescência. A imunofluorescência (IF) é uma técnica que permite a visualização de um antígeno específico (Core-1) nas células mediante a ligação de um anticorpo específico para o Core-1 seguida da adição de um anti-

corpo secundário marcado com fluorocromo, que é usado para o reconhecimento do anticorpo primário.

Na primeira etapa, pNM-DCs (1×10^5 /ml) foram diferenciadas em iNM-DCs por incubação de 7 dias em meio NemodDC (70% de MEM-alfa; 20% de FCS; 10% de CM5637) com adição de 1000 U/ml de GM-CSF, 100 U/ml de IL-4 e 2,5 ng/ml de TBF-alfa. Em seguida, 1×10^6 /ml NM-DCs imaturas (iNM-DCs) foram carregadas seja com lisados de bactérias (50 µg/ml), lisados celulares tumorais (1×10^8 /ml células tumorais lisadas para carregamento em 1×10^6 /ml NM-DCs) ou proteínas da AGP e da GP (20 µg/ml) e amadurecidas por 2 dias por adição de 75 ng/ml de TNF-alfa.

As DCs maduras e carregadas foram lavadas e 1×10^6 células por 50 µl foram colocadas na placa de microtitulação para coloração para imunofluorescência. 3 µg/ml de anticorpo específico para o Core-1 (Nemod-TF1) diluídos em meio de cultura (FCS a 10%) foram incubados com a suspensão celular por 1 hora a temperatura ambiente. Após etapas de lavagem, 50 µl anticorpos IgM anticamundongo secundários da goat marcados com Cy3 e diluídos a 1:200 (Jackson/Dianova) foram adicionados e incubados por 20 minutos. Após as etapas de lavagem, 20 µl de suspensão celular foram colocados em cada cavidade de um slide Multitest (10 cavidades, Roth). As amostras marcadas por imunofluorescência foram examinadas com um microscópio de fluorescência Axioplan 2 equipado com uma câmera digital AxioCam (Zeiss).

A figura 18 mostra coloração específica para o Core-1 positiva das mNM-DCs maduras, que processaram lisados positivos para o Core-1 AG6 e NM-D4, e imunofluorescência negativa nas mNM-DCs carregadas com lisados negativos para o Core-1 (AG3 e NM-wt).

A invenção foi descrita em termos de modalidades preferidas, mas aquele versado na técnica perceberá que várias modificações, substituições, omissões e alterações podem ser feitas sem que ocorra um afastamento do espírito da mesma. Da mesma maneira, pretende-se que o escopo da presente invenção seja limitado apenas pelo escopo das reivindicações a seguir, incluindo os equivalentes das mesmas. Assim, ficará claro para aqueles versados na técnica à qual a invenção se direciona, que a presente in-

venção pode ser corporificada em outras formas além daquelas especificamente revaladas acima sem se afastar do espírito ou das características essenciais da invenção. As modalidades particulares da presente invenção, descritas acima, devem assim ser consideradas em todos os sentidos como
5 ilustrativas e não como restritivas. O escopo da presente invenção é apresentado nas reivindicações anexadas em vez de se limitar ao dos exemplos contidos na descrição acima. Deve se entender que várias alternativas das modalidades empregadas neste relatório descritivo podem ser empregadas na prática da invenção. Pretende-se que as reivindicações a seguir definam
10 o escopo da invenção e que o método e os meios dentro do escopo da invenção dessas reivindicações e seus equivalentes estejam cobertos nelas.

Linhagens celulares:

NM-D4 (DSM ACC2605), NM-F9 (DSM ACC2606), ZR-75-1 (ATCC XRL-1500), CAMA-1 (ATCC HTB-21), KG-1 (DSM ACC 14) ou A-204
15 (DSM ACC 250). NM-wt ou NM-H9 9ou NM-H9D8 DSM ACC 2606). As linhagens celulares NM-9 e NM-D4 foram depositadas na DSMZ pela Nemod Biotherapeutics GmbH % Co. KG, Robert-Rossle-Strasse 10, 13125, Berlim, Alemanha (isto é, o depositante) que autoriza o solicitante da presente invenção a se referir ao material biológica depositado aqui descrito e e dá o
20 seu consentimento sem reservas e irrevogável ao solicitante da presente invenção para que o material biológico aqui descrito seja disponibilizado ao público de acordo com a Regra 28 (1) (d) da Convenção Europeia de Patentes. A DSMZ tem sede em Mascheroder Weg 1b, D-38124, Braunschweig, Alemanha. Os depósitos na DSMZ supramencionados foram feitos de acordo com os termos do Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento inter-
25 nacional do depósito de micro-organismos para fins de procedimentos de patenteamento.

AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728) e a nova cepa de *Escherichia coli* LH2 (DSM 18727) depositada na "DSMZ – Deutsche Sammlung
30 von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha) pela Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125, Berlim, Alemanha, em 20 de outubro de 2006.

Referência de depósito do solicitante ou agente 48 603 K	Pedido internacional no.:
--	---------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES AO MICRO-ORGANISMO OU OUTROS MATERIAIS BIOLÓGICOS DEPOSITADOS
(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao micro-organismo ou outros materiais biológicos depositados mencionados na descrição de página <u>101</u> (<i>inter alia</i>) _____, linha <u>24</u> _____.	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO Depósitos adicionais estão identificados em uma folha adicional [☒]	
NOME DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)	
ENDEREÇO DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE (INCLUINDO CÓDIGO POSTAL E PAÍS) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 14/08/2003	Número de acesso DSM ACC2605
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>)	Esta informação continua em folha adicional [☒]
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS SÃO FEITAS INDICAÇÕES (<i>caso as indicações não sejam para todos os estados designados</i>)	
E. PRESTAÇÃO SEPARADA DE INFORMAÇÕES (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) As indicações listadas abaixo serão submetidas posteriormente ao Escritório Internacional (<i>especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de acesso do depósito"</i>).	

Para uso exclusivo do escritório receptor	Para uso exclusivo do Escritório Internacional
[☒] Este formulário foi recebido com o pedido internacional	[] Este formulário foi recebido pelo Escritório Internacional em
Funcionário autorizado Giel-Barragen Ramos, Cecilia	Funcionário autorizado

Formulário PCT/RO/134 (julho de 1998; reimpresso em janeiro de 2004)

Nossa ref.: 48 603 K

Indicações adicionais de acordo com o formulário PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC 2605

O solicitante requer por meio deste que naqueles países que têm uma determinação correspondente, o fornecimento de uma amostra do material biológico depositado ao qual se faz referência no pedido seja feito apenas a um especialista independente nomeado (exigência da "solução especializada" quando aplicável, em particular Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido e Europa).

No caso da Europa, o solicitante requer de acordo com isso que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada como determinado pela Regra EPC 28 (3) até a publicação da cessão da patente ou por 20 anos da data da protocolação do pedido, caso este seja indeferido, retirado ou considerado retirado, apenas pela emissão de uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa que requer a amostra (Regra EPC 28 (4)).

**TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNA-
CIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-ORGANISMOS COM O OBJETIVO DE
PROCEDIMENTOS DE PATENTEAMENTO
FORMULÁRIO INTERNACIONAL**

Nemod Biotherapeutics GmbH % Co. KG
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlim

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido de acordo com a Regra 7, pela
AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL
Identificada ao final desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	
Referência de identificação dada pelo DE-POSITANTE: NM-D4	Número de acesso dado pela AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNA- CIONAL DSM ACC 2605
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O micro-organismo identificado em I, acima, estava acompanhado de: (X) uma descrição científica () uma designação taxonômica proposta (Marque com um X onde aplicável.)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
Esta Autoridade Depositária Internacional aceita o micro-organismo identificado em I, acima, que foi recebido em 14/08/2003 (Data do depósito original.)	
IV. RECEBIMENTO DE SOLICITAÇÃO DE CONVERSÃO	
O micro-organismo identificado sob I, acima, foi recebido por esta Autoridade Depositária Internacional em e uma solicitação para converter o depósito original em um depósi- to sob o Tratado de Budapeste foi recebido por ela em para conversão.	
V. AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIK- ROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) com o poder para representar a Autori- dade Depositária Internacional ou do(s) funcionário(s) autorizado(s) Data: 16/10/2006

Onde a Regra 6.4 (d) se aplicar, esta data será a data na qual o status de
autoridade depositária internacional foi adquirido

.Referência de arquivo do solicitante ou agente 48 603 K	Pedido internacional no.:
---	---------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES AO MICRO-ORGANISMO OU OUTROS MATERIAIS BIOLÓGICOS DEPOSITADOS
(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao micro-organismo ou outros materiais biológicos depositados mencionados na descrição de página <u>101</u> (<i>inter alia</i>) _____, linha <u>24</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO Depósitos adicionais estão identificados em uma folha adicional [X]	
NOME DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)	
ENDEREÇO DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE (INCLUINDO CÓDIGO POSTAL E PAÍS) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 14/08/2003	Número de acesso DSM ACC2606
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) Esta informação continua em folha adicional [X]	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS SÃO FEITAS INDICAÇÕES (<i>caso as indicações não sejam para todos os estados designados</i>)	
E. PRESTAÇÃO SEPARADA DE INFORMAÇÕES (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) As indicações listadas abaixo serão submetidas posteriormente ao Escritório Internacional (<i>especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de acesso do depósito"</i>).	

Para uso exclusivo do escritório receptor	Para uso exclusivo do Escritório Internacional
[X] Este formulário foi recebido com o pedido internacional	[] Este formulário foi recebido pelo Escritório Internacional em
Funcionário autorizado Giel-Barragen Ramos, Cecilia	Funcionário autorizado

Nossa ref.: 48 603 K

Indicações adicionais de acordo com o formulário PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC 2606

O solicitante requer por meio deste que naqueles países que têm uma determinação correspondente, o fornecimento de uma amostra do material biológico depositado ao qual se faz referência no pedido seja feito apenas a um especialista independente nomeado (exigência da "solução especializada" quando aplicável, em particular Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido e Europa).

No caso da Europa, o solicitante requer de acordo com isso que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada como determinado pela Regra EPC 28 (3) até a publicação da cessão da patente ou por 20 anos da data da protocolação do pedido, caso este seja indeferido, retirado ou considerado retirado, apenas pela emissão de uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa que requer a amostra (Regra EPC 28 (4))

**TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNA-
CIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-ORGANISMOS COM O OBJETIVO DE
PROCEDIMENTOS DE PATENTEAMENTO
FORMULÁRIO INTERNACIONAL**

Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlim

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido de acordo com a Regra 7, pela
AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL
Identificada ao final desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	
Referência de identificação dada pelo DEPOSITANTE: NM-F9	Número de acesso dado pela AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNA- CIONAL DSM ACC 2606
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O micro-organismo identificado em I, acima, estava acompanhado de: (X) uma descrição científica () uma designação taxonômica proposta (Marque com um X onde aplicável.)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
Esta Autoridade Depositária Internacional aceita o micro-organismo identificado em I, acima, que foi recebido em 14/08/2003 (Data do depósito original.)	
IV. RECEBIMENTO DE SOLICITAÇÃO DE CONVERSÃO	
O micro-organismo identificado sob I, acima, foi recebido por esta Autoridade Depositária Internacional em e uma solicitação para converter o depósito original em um depósi- to sob o Tratado de Budapeste foi recebido por ela em para conversão. (data do depósito original) (data do recebimento da solicitação)	
V. AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) com o poder para representar a Autoridade Depositária Internacional ou do(s) funcionário(s) autorizado(s) Data: 16/10/2006

Onde a Regra 6.4 (d) se aplicar, esta data será a data na qual o status de autoridade depositária internacional foi adquirido

Referência de arquivo do solicitante ou agente 48 603 K	Pedido internacional no.:
---	---------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES AO MICRO-ORGANISMO OU OUTROS MATERIAIS BIOLÓGICOS DEPOSITADOS
(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao micro-organismo ou outros materiais biológicos depositados mencionados na descrição de página <u>101</u> (<i>inter alia</i>), linha <u>25</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO Depósitos adicionais estão identificados em uma folha adicional [X]	
NOME DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)	
ENDEREÇO DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE (INCLUINDO CÓDIGO POSTAL E PAÍS) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 15/09/2006	Número de acesso DSM ACC2806
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) Esta informação continua em folha adicional [X]	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS SÃO FEITAS INDICAÇÕES (<i>caso as indicações não sejam para todos os estados designados</i>)	
E. PRESTAÇÃO SEPARADA DE INFORMAÇÕES (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) As indicações listadas abaixo serão submetidas posteriormente ao Escritório Internacional (<i>especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de acesso do depósito"</i>).	

Para uso exclusivo do escritório receptor	Para uso exclusivo do Escritório Internacional
[X] Este formulário foi recebido com o pedido internacional	[] Este formulário foi recebido pelo Escritório Internacional em
Funcionário autorizado Giel-Barragen Ramos, Cecilia	Funcionário autorizado

Nossa ref.: 48 603 K

Indicações adicionais de acordo com o formulário PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC 2806

O solicitante requer por meio deste que naqueles países que têm uma determinação correspondente, o fornecimento de uma amostra do material biológico depositado ao qual se faz referência no pedido seja feito apenas a um especialista independente nomeado (exigência da "solução especializada" quando aplicável, em particular Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido e Europa).

No caso da Europa, o solicitante requer de acordo com isso que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada como determinado pela Regra EPC 28 (3) até a publicação da cessão da patente ou por 20 anos da data da protocolação do pedido, caso este seja indeferido, retirado ou considerado retirado, apenas pela emissão de uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa que requer a amostra (Regra EPC 28 (4)).

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DE-
PÓSITO DE MICRO-ORGANISMOS COM O OBJETIVO DE PROCEDIMENTOS DE PA-
TENTEAMENTO
FORMULÁRIO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido de acordo com a Regra 7, pela
AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL
Identificada ao final desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	
Referência de identificação dada pelo DE- POSITANTE: NM-H9D8	Número de acesso dado pela AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNA- CIONAL DSM ACC 2806
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O micro-organismo identificado em I, acima, estava acompanhado de: ☐ uma descrição científica ☐ uma designação taxonômica proposta (Marque com um X onde aplicável.)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
Esta Autoridade Depositária Internacional aceita o micro-organismo identificado em I, acima, que foi recebido em 14/08/2003 (Data do depósito original.)	
IV. RECEBIMENTO DE SOLICITAÇÃO DE CONVERSÃO	
O micro-organismo identificado sob I, acima, foi recebido por esta (data do depósito original) Autoridade Depositária Internacional em e uma solicitação para converter o depósito original em um depósi- (data do recebimento to sob o Tratado de Budapeste foi recebido por ela em da solicitação) para conversão.	
V. AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIK- ROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Inhoffenstr. 1B D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) com o poder para representar a Autori- dade Depositária Internacional ou do(s) funcionário(s) autorizado(s) Data: 10/09/2006

Onde a Regra 6.4 (d) se aplicar, esta data será a data na qual o status de autoridade depo-
sitária internacional foi adquirido

Referência de arquivo do solicitante ou agente 48 603 K	Pedido internacional no.:
---	---------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES AO MICRO-ORGANISMO OU OUTROS MATERIAIS BIOLÓGICOS DEPOSITADOS
(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao micro-organismo ou outros materiais biológicos depositados mencionados na descrição de página <u>101</u> (<i>inter alia</i>) _____, linha <u>36</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO Depósitos adicionais estão identificados em uma folha adicional [☒]	
NOME DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)	
ENDEREÇO DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE (INCLUINDO CÓDIGO POSTAL E PAÍS) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 20/10/2006	Número de acesso DSM 18726
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>)	Esta informação continua em folha adicional [☒]
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS SÃO FEITAS INDICAÇÕES (<i>caso as indicações não sejam para todos os estados designados</i>)	
E. PRESTAÇÃO SEPARADA DE INFORMAÇÕES (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) As indicações listadas abaixo serão submetidas posteriormente ao Escritório Internacional (<i>especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de acesso do depósito"</i>).	

Para uso exclusivo do escritório receptor	Para uso exclusivo do Escritório Internacional
[☒] Este formulário foi recebido com o pedido internacional	[] Este formulário foi recebido pelo Escritório Internacional em
Funcionário autorizado Giel-Barragen Ramos, Cecilia	Funcionário autorizado

Nossa ref.: 48 603 K

Indicações adicionais de acordo com o formulário PCT/RO/134 para o número de acesso

DSM 18726

O solicitante requer por meio deste que naqueles países que têm uma determinação correspondente, o fornecimento de uma amostra do material biológico depositado ao qual se faz referência no pedido seja feito apenas a um especialista independente nomeado (exigência da "solução especializada" quando aplicável, em particular Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido e Europa).

No caso da Europa, o solicitante requer de acordo com isso que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada como determinado pela Regra EPC 28 (3) até a publicação da cessão da patente ou por 20 anos da data da protocolação do pedido, caso este seja indeferido, retirado ou considerado retirado, apenas pela emissão de uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa que requer a amostra (Regra EPC 28 (4)).

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DE-
PÓSITO DE MICRO-ORGANISMOS COM O OBJETIVO DE PROCEDIMENTOS DE PA-
TENTEAMENTO
FORMULÁRIO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido de acordo com a Regra 7, pela
AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL
Identificada ao final desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	
Referência de identificação dada pelo DEPOSITANTE: AG6	Número de acesso dado pela AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNA- CIONAL DSM 18726
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O micro-organismo identificado em I, acima, estava acompanhado de: () uma descrição científica (x) uma designação taxonômica proposta (Marque com um X onde aplicável.)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
Esta Autoridade Depositária Internacional aceita o micro-organismo identificado em I, acima, que foi recebido em 14/08/2003 (Data do depósito original.)	
IV. RECEBIMENTO DE SOLICITAÇÃO DE CONVERSÃO	
O micro-organismo identificado sob I, acima, foi recebido por esta Autoridade Depositária Internacional em e uma solicitação para converter o depósito original em um depósi- to sob o Tratado de Budapeste foi recebido por ela em para conversão.	
(data do depósito original) (data do recebimento da solicitação)	
V. AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Inhoffenstr. 1B D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) com o poder para representar a Autoridade Depositária Internacional ou do(s) funcionário(s) autorizado(s) Data: 24/10/2006

Onde a Regra 6.4 (d) se aplicar, esta data será a data na qual o status de autoridade depositária internacional foi adquirido

Referência de arquivo do solicitante ou agente 48 603 K	Pedido internacional no.:
---	---------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES AO MICRO-ORGANISMO OU OUTROS MATERIAIS BIOLÓGICOS DEPOSITADOS
(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao micro-organismo ou outros materiais biológicos depositados mencionados na descrição de página <u>101</u> (<i>inter alia</i>) _____, linha <u>36</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO Depósitos adicionais estão identificados em uma folha adicional [☒]	
NOME DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)	
ENDEREÇO DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE (INCLUINDO CÓDIGO POSTAL E PAÍS) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 26/10/2006	Número de acesso DSM 18727
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) Esta informação continua em folha adicional [X]	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS SÃO FEITAS INDICAÇÕES (<i>caso as indicações não sejam para todos os estados designados</i>)	
E. PRESTAÇÃO SEPARADA DE INFORMAÇÕES (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) As indicações listadas abaixo serão submetidas posteriormente ao Escritório Internacional (<i>especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de acesso do depósito"</i>).	

Para uso exclusivo do escritório recebedor	Para uso exclusivo do Escritório Internacional
[X] Este formulário foi recebido com o pedido internacional	[] Este formulário foi recebido pelo Escritório Internacional em
Funcionário autorizado Giel-Barragen Ramos, Cecilia	Funcionário autorizado

Nossa ref.: 48 603 K

Indicações adicionais de acordo com o formulário PCT/RO/134
para o número de acesso

DSM 18727

O solicitante requer por meio deste que naqueles países que têm uma determinação correspondente, o fornecimento de uma amostra do material biológico depositado ao qual se faz referência no pedido seja feito apenas a um especialista independente nomeado (exigência da "solução especializada" quando aplicável, em particular Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido e Europa).

No caso da Europa, o solicitante requer de acordo com isso que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada como determinado pela Regra EPC 28 (3) até a publicação da cessão da patente ou por 20 anos da data da protocolação do pedido, caso este seja indeferido, retirado ou considerado retirado, apenas pela emissão de uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa que requer a amostra (Regra EPC 28 (4)).

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DE-
PÓSITO DE MICRO-ORGANISMOS COM O OBJETIVO DE PROCEDIMENTOS DE PA-
TENTEAMENTO
FORMULÁRIO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido de acordo com a Regra 7, pela
AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL
Identificada ao final desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	
Referência de identificação dada pelo DE- POSITANTE: LH2	Número de acesso dado pela AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNA- CIONAL DSM 18727
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O micro-organismo identificado em I, acima, estava acompanhado de: () uma descrição científica (x) uma designação taxonômica proposta (Marque com um X onde aplicável.)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO Esta Autoridade Depositária Internacional aceita o micro-organismo identificado em I, acima, que foi recebido em 26/10/2006 (Data do depósito original.)	
IV. RECEBIMENTO DE SOLICITAÇÃO DE CONVERSÃO	
O micro-organismo identificado sob I, acima, foi recebido por esta Autoridade Depositária Internacional em e uma solicitação para converter o depósito original em um depósi- to sob o Tratado de Budapeste foi recebido por ela em para conversão.	(data do depósito original) (data do recebimento da solicitação)
V. AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIK- ROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Inhoffenstr. 1B D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) com o poder para representar a Autori- dade Depositária Internacional ou do(s) funcionário(s) autorizado(s) Data: 24/10/2006

Onde a Regra 6.4 (d) se aplicar, esta data será a data na qual o status de autoridade depo-
sitária internacional foi adquirido

Referência de arquivo do solicitante ou agente 48 603 K	Pedido internacional no.:
---	---------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES AO MICRO-ORGANISMO OU OUTROS MATERIAIS BIOLÓGICOS DEPOSITADOS
(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao micro-organismo ou outros materiais biológicos depositados mencionados na descrição de página <u>101</u> (<i>inter alia</i>) _____, linha <u>36</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO Depósitos adicionais estão identificados em uma folha adicional [☒]	
NOME DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)	
ENDEREÇO DA INSTITUIÇÃO DEPOSITANTE (INCLUINDO CÓDIGO POSTAL E PAÍS) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 26/10/2006	Número de acesso DSM 18728
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>) Esta informação continua em folha adicional [☒]	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS SÃO FEITAS INDICAÇÕES (<i>caso as indicações não sejam para todos os estados designados</i>)	
E. PRESTAÇÃO SEPARADA DE INFORMAÇÕES (<i>deixe em branco caso não se aplique</i>)	
As indicações listadas abaixo serão submetidas posteriormente ao Escritório Internacional (<i>especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de acesso do depósito"</i>).	

Para uso exclusivo do escritório receptor	Para uso exclusivo do Escritório Internacional
[☒] Este formulário foi recebido com o pedido internacional	[] Este formulário foi recebido pelo Escritório Internacional em
Funcionário autorizado Giel-Barragen Ramos, Cecilia	Funcionário autorizado

Nossa ref.: 48 603 K

Indicações adicionais de acordo com o formulário PCT/RO/134
para o número de acesso

DSM 18728

O solicitante requer por meio deste que naqueles países que têm uma determinação correspondente, o fornecimento de uma amostra do material biológico depositado ao qual se faz referência no pedido seja feito apenas a um especialista independente nomeado (exigência da "solução especializada" quando aplicável, em particular Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido e Europa).

No caso da Europa, o solicitante requer de acordo com isso que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada como determinado pela Regra EPC 28 (3) até a publicação da cessão da patente ou por 20 anos da data da protocolação do pedido, caso este seja indeferido, retirado ou considerado retirado, apenas pela emissão de uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa que requer a amostra (Regra EPC 28 (4)).

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-ORGANISMOS COM O OBJETIVO DE PROCEDIMENTOS DE PATENTEAMENTO

FORMULÁRIO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido de acordo com a Regra 7, pela
AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL
Identificada ao final desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	
Referência de identificação dada pelo DEPOSITANTE: MU1	Número de acesso dado pela AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL DSM 18728
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O micro-organismo identificado em I, acima, estava acompanhado de: () uma descrição científica (x) uma designação taxonômica proposta (Marque com um X onde aplicável.)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO Esta Autoridade Depositária Internacional aceita o micro-organismo identificado em I, acima, que foi recebido em 20/10/2006 (Data do depósito original.)	
IV. RECEBIMENTO DE SOLICITAÇÃO DE CONVERSÃO	
O micro-organismo identificado sob I, acima, foi recebido por esta Autoridade Depositária Internacional em e uma solicitação para converter o depósito original em um depósito sob o Tratado de Budapeste foi recebido por ela em para conversão.	(data do depósito original) (data do recebimento da solicitação)
V. AUTORIDADE DEPOSITÁRIA INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Inhoffenstr. 1B D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) com o poder para representar a Autoridade Depositária Internacional ou do(s) funcionário(s) autorizado(s) Data: 24/10/2006

Onde a Regra 6.4 (d) se aplicar, esta data será a data na qual o status de autoridade depositária internacional foi adquirido

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL		Pedido internacional no.: PCT/EP2007/009765
A. CLASSIFICAÇÃO DO ASSUNTO INV. A61K39/02 A61K39/40 G01N33/53 A61P35/00 A23L1/30 De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (CIP) ou tanto com a classificação nacional quanto com a CIP		
B. CAMPOS PESQUISADOS Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido de símbolos de classificação) C07K A61K G01N A23L Documentação pesquisada além da documentação mínima na medida em que tais documentos estão incluídos nos campos pesquisados		
Banco de dados eletrônico consultado durante a pesquisa internacional (nome do banco de dados e, quando possível, termos de pesquisa utilizados) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Citação de documento, com indicação, quando apropriado, das passagens relevantes	Pedido relevante no.
X	SPRINGER G F ET AL: "ORIGIN OF ANTI-THOMSEN FRIEDENREICH AND TN AGGLUTINANTS IN MAN AND IN WHITE LEGHORN CHICKS" BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY Vol. 47, no. 3, 1982, páginas 453-460, XP009088436 ISSN: 0007-1048 O documento inteiro	18-22, 24
☒ [X] Documentos adicionais estão listados na continuação da caixa C ☒ [X] Vide anexo da família da patente		
* Categorias especiais dos documentos citados: "A" documento que define o estado geral da técnica que não é considerado particularmente relevante "E" documento anterior, mas publicado na ou após a data do protocolo internacional "L" documento que pode lançar dúvidas sobre a(s) reivindicação(ões) prioritária(s) que é citado para estabelecer a data de publicação de outra citação ou por outra razão especial (conforme especificado) "O" documento que se refere a uma revelação oral, uso, exibição ou outros meios "P" documento publicado antes da data da protocolo internacional mas após da data de prioridade reivindicada "T" documento posterior publicado após a data da protocolização internacional ou data prioritária não em conflito com o pedido, mas citado para se entender o princípio da teoria subjacente à invenção "X" documento de especial relevância: a invenção reivindicada não pode ser considerada nova ou não pode ser considerada representante de uma etapa inovadora quando o documento é considerado sozinho "Y" documento de especial relevância: a invenção reivindicada não pode ser considerada representante de uma etapa inovadora quando o documento é combinado com um ou mais de tais documentos, tal combinação sendo óbvia para alguém versado na técnica.		
Data da finalização de fato da pesquisa internacional 7 de abril de 2008		Data da remessa do relatório de pesquisa internacional 15/04/2008
Nome e endereço de correspondência do ISA/ European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2		Funcionário autorizado Domingues, Helena

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL		Pedido internacional no.: PCT/EP2007/009765
C. (continuação) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Citação de documento, com indicação, quando apropriado, das passagens relevantes	Pedido relevante no.
X	KLAAMAS K ET AL: "EXPRESSION OF TUMOR-ASSOCIATED THOMSEN-FRIEDENREICH ANTIGEN (T AG) IN HELIOBACTER PYLORI AND MODULATION OF T AG SPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN INFECTED INDIVIDUALS" IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, EUA vol. 31, no. 3/4, 2002, páginas 191-204 XP009047359 ISSN: 0882-0139 o documento inteiro	18, 19
X	KURTENKOV OLEG ET AL "Better survival of Heliobacter pyloru infected patients with early gastric cancer is related to a higher level of Thomsen-Friedenreich antigen-specific antibodies" IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, EUA vol. 32, no. 1-2, fevereiro de 2003 (02/2003), páginas 83-93, XP009088439 ISSN: 0882-0139 o documento inteiro	18, 19
X	TAKAHASHI ET AL: "ANTITUMOR EFFECTS OF THE INTRAVESICAL INSTILLATION OF HEAT KILLED CELLS OF THE LACTOBACILLUS CASEI STRAIN SHIROTA ON THE MURINE ORTHOTOPIC BLADDER TUMOR MBT-2" JOURNAL OF UROLOGY, BALTIMORE, MD, EUA, vol. 166, no. 6, dezembro de 2001 (12/2001) páginas 2506-2511, XP005543483 ISSN: 0022-5347 o documento inteiro	18, 22, 24-26
X	GOLETZ S ET AL: "THOMSEN-FRIEDENREICH ANTIGEN: THE HIDDEN TUMOR ANTIGEN" ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, SPRING ST., NY, EUA vol. 535, 2003, páginas 147-162, XP00903410 ISSN: 0065-2598 páginas 150, 155 página 159	1-26
X	BUTSCHAK G ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THOMSEN-FRIEDENREICH-SPECIFIC ANTIBODIES FROM HUMAN SERUM" TUMOR BIOLOGY, KARGER, BASEL, SUÍÇA vol. 23, no. 3, maio de 2002 (05/2002), páginas 113-122, XP009034404 ISSN: 1010-4283 o documento inteiro	1-9, 24-26
Y	FRANCO A: "CTL-based cancer preventive/therapeutic vaccines for carcinomas: Role of tumour-associated carbohydrate-antigens" SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 61, no. 5, maio de 2005 (05/2005), páginas 391-397, XP002448043 ISSN: 0300-9475 tabela 1	1-26
y	CROCE M V ET AL: "THE USE OF CARBOHYDRATE ANTIGENS FOR THE PREPARATION OF VACCINES FOR THERAPY IN BREAST CANCER" DRUGS OF TODAY / FÁRMACOS DE ACTUALIDAD, J. R. PROUS SS.A. INTERNATIONAL PUBLISHERS, ES. vol. 38, no. 11, 2002, páginas 759-768 XP008068597 ISSN: 0025-7656 o documento inteiro	1-26

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL		Pedido internacional no.: PCT/EP2007/009765
C. (continuação) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Citação de documento, com indicação, quando apropriado, das passagens relevantes	Pedido relevante no.
Y	MACLEAN G D ET AL: "ACTIVE IMMUNIZATION OF HUMAN OVARIAN CANCER PATIENTS AGAINST A COMMON CARCINOMA (THOMSEN-FRIEDENREICH DETERMINANT USING A SYNTHETIC CARBOHYDRATE ANTIGEN" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, USA, vol. 11, 1992, páginas 292-305, XP002948048 ISSN: 1524-9557 o document inteiro	1-26
Y	SUSAN F SLOVIN ET AL: "Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer" CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 54, 694-702, XP019333138 ISSN: 1432-0851 o documento inteiro	1-26
Y	BAUMEISTER AND GOLETZ: "Voll funktionsfähige humane dendritische Zelllinie" LABORWELT, [online] vol. 6, 2005, XP002474237 Obtido na internet: URL: HTTP://WWW.NEMOD.COM/DOWNLOADS/NEMODDC%20IN%20LABORWELT%207.2.05.PDF o documento inteiro	13-17,023
Y	WO 2006/012616 A (UNIV NEW YORK [EUA]; RITTENHOUSE-OLSON KATE [EUA]) 2 de fevereiro de 2006 (02/02/2006) exemplo 5	1-26

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL	Pedido internacional no.: PCT/EP2007/009765
Caixa no. II Observações em casos nos quais certas reivindicações foram consideradas impossíveis de pesquisar (continuação do item 2 da primeira página)	
Este relatório de pesquisa internacional não foi estabelecido no que diz respeito a certas reivindicações sob o Artigo 17 (2) (a) pelas seguintes razões: 1. ☐ Reivindicações nos.: porque elas se referem a um assunto para o qual esta autoridade não exige pesquisa, especificamente: 2. ☐ Reivindicações nos.: porque elas se referem a partes do pedido internacional que não se conformam com as exigências prescritas de maneira que nenhuma pesquisa internacional pode ser realizada, especificamente: 3. ☐ Reivindicações nos.: porque elas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com o segundo e o terceiro parágrafo da Regra 6.4 (a)	
Caixa no. III Observações para casos nos quais falta unidade à invenção (continuação do item 3 da primeira página)	
A autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste pedido internacional, como segue: vide folha adicional 1. ☐ Uma vez que taxas de pesquisas adicionais foram devidamente pagas pelo solicitante, este relatório de pesquisa internacional cobre todas as reivindicações passíveis de pesquisa. 2 ☒ Uma vez que todas as reivindicações puderam ser pesquisadas sem esforço que justificasse taxas adicionais, esta autoridade não exigiu o pagamento de taxas adicionais. 3. ☐ Uma vez que apenas algumas das taxas de pesquisa adicionais foram devidamente pagas pelo solicitante, este relatório de pesquisa internacional cobre apenas aquelas reivindicações para as quais as taxas foram pagas, especificamente as reivindicações de nos.: 4. ☐ Nenhuma taxa de pesquisa adicional foi devidamente paga pelo solicitante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional está restrito à primeira invenção mencionada nas reivindicações; ela está coberta pelas reivindicações nos.: Observação no protesto ☐ As taxas de pesquisa adicionais estavam acompanhadas do protesto do solicitante e, quando aplicável, do pagamento de uma taxa de protesto ☐ As taxas de pesquisa adicionais estavam acompanhadas do protesto do solicitante, mas a taxa de protesto aplicável não foi paga no prazo especificado no convite. ☐ nenhum protesto acompanhou o pagamento das taxas de pesquisa adicionais	

Formulário PCT/ISA/210 (continuação da primeira página (2)) (abril de 2005)

INFORMAÇÕES ADICIONAIS (CONTINUAÇÃO DE PCT/ISA/210)

Esta Autoridade de Pesquisa Internacional encontrou múltiplos (grupos de) invenções neste pedido internacional, como segue:

1. reivindicações 1-17 e 23

Diz respeito a aspectos referentes a um método para o isolamento e identificação de um micro-organismo carboidrato-positivo compreendendo a colocação em contato entre uma molécula de ligação carboidrato específico de epitopo de carboidrato de interesse em uma mistura de micro-organismos e isolamento de pelo menos um micro-organismo ligado a tal molécula de ligação carboidrato; e testagem da indução de uma resposta imunocelular e/ou humoral eficaz específica pelo dito epitopo de carboidrato. A invenção refere-se também a aspectos referentes a um método para gerar células dendríticas funcionais e células T ativadas contra um micro-organismo carboidrato-positivo compreendendo a colocação em contato entre uma quantidade apropriada de células dendríticas funcionais e uma quantidade apropriada de micro-organismos carboidrato-positivos; e colocação em contato entre pelo menos uma célula dendrítica funcional e pelo menos uma célula T.

2. reivindicações 18-22, 24-26

Refere-se a aspectos ligados a micro-organismo carboidrato-positivo, lisado ou fração do mesmo; e a um nutracêutico ou composição farmacêutica compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo e ao seu uso para a imunização e para o tratamento/profilaxia de uma doença associada com o dito epitopo de carboidrato, particularmente tumores.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informações sobre membros da família de patentesPedido internacional no.:
PCT/EP2007/009765

Documento de patente citado no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 2006012616 A	02/02/2006	CA 2582252 A1 EP 1789027 A2	02/02/2006 30/05/2007

Formulário PCT/ISA/210 (anexo da família de patentes) (abril de 2005)

REIVINDICAÇÕES

1. Método para isolar um micro-organismo carboidrato-positivo compreendendo um epitopo de carboidrato de interesse de uma mistura de micro-organismos compreendendo

5 (a) colocação em contato entre uma molécula de ligação carboidrato específica para o epitopo de carboidrato de interesse e uma mistura de micro-organismos e

(b) isolamento de pelo menos um micro-organismo ligado à molécula de ligação carboidrato mencionada de tal mistura

10 (c) opcionalmente, teste de micro-organismo isolado para verificar que se trata de micro-organismo carboidrato-positivo testando-se o micro-organismo isolado em busca de ligação específica à molécula de ligação carboidrato.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente:

(d) testagem da indução de uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e/ou resposta imune-humoral eficaz contra o dito epitopo de carboidrato pelo micro-organismo mencionado e/ou fração e/ou lisado do mesmo *in vivo* ou *in vitro*.

20 3. Método de acordo com a reivindicação 3, sendo que a etapa (d) compreende o teste da indução de uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato pelo micro-organismo carboidrato-positivo mencionado e/ou fração e/ou lisado do mesmo para a ativação de células T do tipo Th1 CD4-positivas e/ou para a ativação de células T CD8-positivas citotóxicas, preferivelmente em pelo menos um animal ou humano e/ou *in vitro*.

4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, sendo que a testagem da resposta imunocelular na etapa (d) compreende

30 i) carregamento de pelo menos uma célula dendrítica com a célula carboidrato-positiva identificada nas etapas (a) a (c);

ii) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica mencionada carregada com o micro-

organismo carboidrato-positivo mencionado e uma quantidade apropriada de células imunes passíveis de ativação ou inibição por uma célula dendrítica;

iii) cultivo de maneira a permitir a interação das células imunes mencionadas com as células dendríticas mencionadas;

5 iv) adição de uma quantidade apropriada de células apresentadoras de antígenos (APCs) carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos um segundo composto veículo do mesmo epitopo de carboidrato que o micro-organismo carboidrato-positivo, sendo o segundo composto diferente do primeiro micro-organismo carboidrato-positivo mencionado;

10 v) cultivo para re-estimulação das células imunes mencionadas;

vi) confirmação da ocorrência de re-estimulação das células imunes.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, sendo pelo menos uma porção das APCs carregadas com uma quantidade apropriada do segundo composto mencionado postas em contato com as células imunes na presença de uma molécula de ligação carboidrato capaz de reconhecer o epitopo de carboidrato de interesse.

6. Método de acordo com a reivindicação 4 ou 5, sendo a re-estimulação determinada pela determinação

20 - dos produtos secretados pelas células imunes que são secretados quando tais células imunes são (re)estimuladas, tais como interferon alfa, interferon gama ou GM-CSF e/ou

- da proliferação das células imunes.

7. Método de acordo com uma das reivindicações de 2 a 6, sendo o teste de resposta imunocelular selecionado do grupo a seguir:

(i) um teste de resposta imunocelular 1 em cuja etapa (d (vi)) a re-estimulação das células imunes é determinada pela medição da secreção de GM-CSF;

30 (ii) um teste de resposta imunocelular 2 em cuja etapa (d (vi)) a quantidade/grau de linfócitos re-estimulados é determinada pela medição da quantidade de INF-gama e/ou TNF-alfa secretada;

(iii) um teste de resposta imunocelular 3 em cuja etapa (d (vi)) a

quantidade/grau de linfócitos re-estimulados é determinada pela medição da proliferação e/ou indução de proliferação;

(iv) um teste de resposta imunocelular 4 contra o epitopo de carboidrato de interesse compreendendo

5 (a) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de uma célula dendrítica, células dendríticas, ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica, carregada com uma quantidade apropriada

10 (i) do micro-organismo carboidrato-positivo, um lisado ou fração do mesmo,

(ii) formulações que os compreendam,

(iii) o nutracêutico ou a composição farmacêutica da invenção ou

15 (iv) uma molécula veículo do epitopo de carboidrato ou que o compreenda,

(v) uma mistura compreendendo uma molécula veículo do epitopo de carboidrato

(vi) uma célula positiva para ou compreendendo o epitopo de carboidrato, um lisado ou fração da mesma,

20 e de com uma quantidade apropriada de pelo menos uma molécula de ligação carboidrato;

b) testagem da ligação da molécula de ligação carboidrato mencionada à célula dendrítica, células dendríticas ou a uma mistura de células;

25 (v) um teste de resposta imunocelular 5 contra o epitopo de carboidrato de interesse compreendendo

(a) incubação de uma quantidade apropriada de células-alvo de uma linhagem celular compreendendo o epitopo de carboidrato de interesse marcado com uma quantidade apropriada de um marcador com pelo menos uma célula imune direcionada contra o epitopo de carboidrato ou
30 uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula imune direcionada contra o epitopo de carboidrato de interesse, e

(b) medição da lise das células-alvo pela determinação da liberação do marcador, sendo que uma resposta imunocelular positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma lise significativamente maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que de células negativas para o epitopo de carboidrato e/ou mostra uma lise significativamente maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato incubadas com células imunes dirigidas contra o epitopo de carboidrato, do que uma lise de células compreendendo o epitopo de carboidrato incubadas com células imunes de controle correspondentes não direcionadas contra o epitopo de carboidrato.

10 8. Método de acordo com pelo menos uma das reivindicações de 2 a 7, em que a indução de uma resposta imune-humoral carboidrato-específica eficaz contra o dito epitopo de carboidrato é testada em um teste de resposta imune-humoral do grupo selecionado do grupo consistindo em

15 a. teste de resposta imune-humoral 1 contra o epitopo de carboidrato compreendendo testagem da ligação do anticorpo, dos anticorpos no soro ou anticorpos ganhos do soro, plasma ou fezes, em um ELISA para compostos-veículo do epitopo de carboidrato em que que uma resposta imune-humoral contra o epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior dos anticorpos ao composto veículo do epitopo de carboidrato do que a tal composto sem o epitopo de carboidrato ou a tal composto (por exemplo, uma proteína ou peptídeo) após um tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato;

20 b. teste de resposta imune-humoral 2 contra o epitopo de carboidrato compreendendo testagem da ligação de um anticorpo, anticorpos no soro ou anticorpos ganhos do soro, plasma ou fezes, em um ELISA para estruturas de carboidrato acopladas a conjugados de poliacrilamida (PAA), em que que uma resposta imune-humoral positiva contra um epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior do anticorpo ou anticorpos ao conjugado de PAA compreendendo o epitopo de carboidrato do que ao mesmo conjugado de PAA após tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato e/ou maior ligação do anticorpo ou anticorpos a um conjugado PAA compreendendo o epitopo de carboidrato em

comparação com um conjugado de PAA que não compreende o epitopo de carboidrato, preferivelmente ambos;

5 c. teste de resposta imune-humoral 3 contra o epitopo de carboidrato compreendendo testagem da ligação do anticorpo, anticorpos no soro ou anticorpos ganhos do soro, do plasma ou fezes em um teste de citometria de fluxo em busca da sua ligação a células compreendendo o epitopo de carboidrato e a células que não compreendem o epitopo de carboidrato, em que que uma resposta imune-humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior dos anticorpos a
10 células compreendendo o epitopo de carboidrato do que a células negativas para o epitopo de carboidrato;

d. teste de resposta imune-humoral (teste de resposta imune-humoral 4) contra o epitopo de carboidrato compreendendo testagem da ligação do anticorpo, anticorpos no soro, ou anticorpos ganhos do soro, plasma ou fezes em um teste de imunofluorescência para determinar sua ligação
15 a células compreendendo o epitopo de carboidrato e a células negativas para o epitopo de carboidrato, em que que uma resposta imune-humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma ligação significativamente maior do anticorpo ou anticorpos a células compreendendo o epitopo de carboidrato do que a células que não compreendem o epitopo de carboidrato
20 e/ou a células compreendendo o epitopo de carboidrato após tratamento enzimático ou químico que destrói o epitopo de carboidrato;

e. teste de resposta imune-humoral 5 contra o epitopo de carboidrato compreendendo,

25 i. incubação de uma quantidade apropriada de células compreendendo o epitopo de carboidrato marcadas com uma quantidade apropriada de marcador, com uma quantidade apropriada de um anticorpo, de anticorpos no soro ou de anticorpos ganhos do soro, do plasma ou das fezes, com uma quantidade apropriada de complemento;

30 ii. medição da lise celular pela determinação da liberação do marcador mencionado após a incubação sob (a) em que que uma resposta imune-humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma lise sig-

nificativamente maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que de células não compreendendo o epitopo de carboidrato e/ou ela mostra uma lise maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que uma lise sem complemento e/ou do que uma lise sem o anticorpo e/ou do
 5 que uma lise com um anticorpo ou anticorpos que não se ligam ou se ligam menos a células compreendendo o epitopo de carboidrato;

f. um teste de resposta imune-humoral 6 contra o epitopo de carboidrato compreendendo,

i) incubação de uma quantidade apropriada de células compre-
 10 endendo o epitopo de carboidrato e/ou células não compreendendo o epitopo de carboidrato, marcadas com uma quantidade apropriada de um marcador, com uma quantidade apropriada de um anticorpo ou anticorpos no soro ou de anticorpos ganhos do soro, plasma ou fezes, com uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula imuneefetora ou mistura de células
 15 compreendendo células imunes efetoras ou células mononucleares do sangue periférico, e

ii) medição da lise celular pela determinação da liberação do marcador após a incubação sob (a) em que que uma resposta imune-humoral positiva contra o epitopo de carboidrato mostra uma lise significati-
 20 vamente maior de células compreendendo o epitopo de carboidrato do que de células negativas para o epitopo de carboidrato do que uma lise sem o anticorpo e/ou do que uma lise sem um anticorpo ou anticorpos que não se ligam ou que se ligam menos a células compreendendo o epitopo de carboidrato.

25 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que que

(i) o epitopo de carboidrato é selecionado do grupo compreendendo TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil-Lewis-A, sialil-Lewis-X, ácido polissíalico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3,
 30 GD3L, fucosil GM1, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis-B, sLac, cadeia sialiada de tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno CA 72-4 e antígeno CA-50, e

(ii) a molécula de ligação carboidrato é selecionada do grupo

compreendendo lectinas, selectinas e/ou anticorpos e/ou moléculas derivadas das mesmos que se ligam a TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil-Lewis-A, sialil-Lewis-X, ácido polissíalico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, GD3L, fucosil GM1, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis-B, sLac, cadeia sialiada de tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno CA 72-4 e antígeno CA-50 ou a uma estrutura de carboidrato compreendendo qualquer um desses epítopos de carboidrato ou partes dos mesmos.

10. Teste de resposta imunocelular compreendendo

- a) Carregamento de pelo menos uma célula dendrítica com um primeiro composto carboidrato-positivo, em que tal composto carboidrato-positivo carrega o epítopo de carboidrato de interesse;
- b) colocação em contato entre uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica mencionada carregada com o composto carboidrato-positivo e uma quantidade apropriada de células imunes passíveis de ativação ou inibição por uma célula dendrítica;
- c) cultivo de maneira a permitir a interação das células imunes mencionadas com tais células dendríticas;
- d) adição de uma quantidade apropriada de células apresentadoras de antígenos (APC) carregadas com uma quantidade apropriada de pelo menos um segundo composto veículo do mesmo epítopo de carboidrato que o primeiro composto, em que o referido segundo composto diferente do primeiro composto carboidrato-positivo mencionado;
- e) cultivo para re-estimulação das células imunes mencionadas;
- f) determinação da ocorrência da re-estimulação das células imunes.

11. Método de acordo com a reivindicação 18, em que pelo menos uma porção de APC carregadas com uma quantidade apropriada do segundo composto mencionado é posta em contato com as células imunes na presença de uma molécula de ligação carboidrato capaz de reconhecer tal carboidrato de interesse.

12. Método de acordo com a reivindicação 18 ou 19, em que a re-estimulação é determinada pela determinação

- dos produtos de secreção das células imunes que são secretadas quando tais células imunes são (re)estimuladas, tais como interferon-alfa, interferon-gama ou GM-CSF e/ou

- da proliferação das células imunes.

5 13. Método para a geração de uma célula funcional dendrítica contra um epítipo de carboidrato de interesse compreendendo a colocação em contato entre uma quantidade apropriada de uma célula dendrítica ou de uma mistura de células dendríticas ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula dendrítica e uma quantidade apropriada de
10 um micro-organismo carboidrato-positivo ou fração ou lisado do mesmo de uma das reivindicações deste e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo tal epítipo de carboidrato por um período apropriado sob condições apropriadas para gerar pelo menos uma célula dendrítica funcional contra o dito epítipo de carboi-
15 drato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo tal epítipo de carboidrato.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que a célula dendrítica mencionada é de origem humana.

15. Método de acordo com a reivindicação 13 ou 14, em que
20 que o dito epítipo de carboidrato não é um epítipo de carboidrato dipolar.

16. Método para a geração de uma célula T ativada, células T, clone de célula T ou linhagem de células T contra um epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o epítipo de carboidrato compreendendo

25 (a) promoção de contato entre uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula dendrítica funcional de acordo com pelo menos uma das reivindicações de 13 a 15 e uma quantidade apropriada de pelo menos uma célula T ou uma mistura de células T ou uma mistura de células compreendendo pelo menos uma célula T, cultivo de tais células T ou mistura de
30 células T junto com as células dendríticas funcionais carregadas mencionadas para ativar um inicializar uma célula T ou células T contra tal antígeno carboidrato, e

(b) re-estimulação de tais células T com uma quantidade apropriada de células apresentadoras de antígenos (APC), preferivelmente pelo menos uma célula dendrítica funcional carregada com uma célula ou molécula humana ou animal veículo do dito epítipo de carboidrato.

5 17. Célula dendrítica funcional, uma célula T ativada, células T, clone de célula T ou linhagem de células T produzidas pelo método de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que que a célula T ativada, células T, clone de célula T ou linhagem de células T é direcionada contra o epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato.

10 18. Micro-organismo carboidrato-positivo ou fração ou lisado do mesmo compreendendo um epítipo de carboidrato de interesse que é reconhecido por pelo menos uma molécula de ligação carboidrato que reconhece especificamente o epítipo de carboidrato de interesse, em que que tal micro-organismo, tal fração ou tal lisado induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o dito epítipo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato.

15 19. Micro-organismo carboidrato-positivo obtenível pelo método de acordo com pelo menos uma das reivindicações de 1 a 9.

20 20. Formulação selecionada do grupo compreendendo composições nutracêuticas ou farmacêuticas compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo como definido na reivindicação 18 ou 19.

25 21. Formulação de acordo com a reivindicação 20, em que
(a) que a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz mencionada compreende a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e/ou a ativação de células T citotóxicas CD8-positivas direcionadas contra o epítipo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epítipo de carboidrato e

30 (b) o epítipo de carboidrato é selecionado do grupo consistindo em TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil-Lewis-A, sialil-

Lewis-X, ácido polissialico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, GD3L, fucosil GM1, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis-B, sLac, cadeia sialiada de tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno CA 72-4 e antígeno CA-50, e

- (c) a molécula de ligação carboidrato é selecionada do grupo compreendendo lectinas, selectinas e/ou anticorpos e/ou moléculas derivadas dos mesmos que se ligam a TF, Core-1, Tn, sialil-Tn, sialil-TF, Globo-H, Lewis-Y, sialil-Lewis-A, sialil-Lewis-X, ácido polissialico, Lewis-X, GM2, GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, GD3L, fucosil GM1, Fucosil GM1, Lewis-A, Lewis-B, sLac, cadeia sialiada de tipo 1, antígeno CA 19-9, antígeno CA 72-4 e antígeno CA-50 ou a uma estrutura de carboidrato compreendendo pelo menos qualquer um desses epitopos de carboidrato ou partes dos mesmos.

22. Formulação de acordo com a reivindicação 20 ou 21 em que que a resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz compreende a ativação de células T CD4-positivas de tipo Th1 e ativação das células T citotóxicas CD8-positivas direcionadas contra o dito epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo o dito epitopo de carboidrato.

23. Método para a imunização ou vacinação de um ser humano ou um animal contra um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula de ser humano ou animal compreendendo

- (i) administração a um ser humano ou a um animal de uma quantidade apropriada de uma célula dendrítica funcional, célula T ativada, clone de célula T ou linhagem de células T ou uma mistura de células de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentens direcionada contra um epitopo de carboidrato de interesse e a indução de uma resposta imune contra o epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo tal epitopo de carboidrato pela célula mencionada do ser humano ou animal (inicialização) e

- (ii) intensificação da resposta imune pela administração de uma quantidade eficaz de uma formulação compreendendo pelo menos um micro-organismo carboidrato-positivo reconhecido por pelo menos uma molé-

cula de ligação carboidrato que reconhece especificamente um epitopo de carboidrato presente em uma molécula de uma célula de ser humano ou animal ou uma fração ou lisado da mesma, em que tal micro-organismo, tal fração ou tal lisado ou tal formulação compreendendo os mesmos induz uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz contra o epitopo de carboidrato e/ou estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo tal epitopo de carboidrato.

24. Método para induzir ou aumentar uma resposta imunocelular carboidrato-específica eficaz e/ou resposta imune-humoral eficaz contra um epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo tal epitopo de carboidrato em pelo menos um animal ou ser humano, compreendendo a administração em um ser humano ou animal de uma quantidade eficaz da formulação definida em qualquer uma das reivindicações 20 a 22.

25. Método para profilaxia e/ou tratamento de um tumor e/ou doença positiva para o epitopo de carboidrato compreendendo a administração de uma quantidade apropriada de uma formulação, um micro-organismo carboidrato-positivo ou um lisado ou fração do mesmo, uma célula dendrítica funcional ou uma célula T ativada, linhagem de células T ou clone de célula T contra o epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo tal epitopo de carboidrato de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, a um ser humano ou a um animal.

26. Uso de um micro-organismo carboidrato-positivo isolado ou identificado por um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, 11 a 16 e 23 a 25 ou uma fração ou um lisado do mesmo para a produção de um medicamento ou um nutracêutico para a profilaxia e/ou terapia de uma doença associada com tal epitopo de carboidrato em que tal micro-organismo e/ou fração e/ou lisado do mesmo induz uma resposta imune celular carboidrato-específica e/ou uma resposta imune-humoral contra tal epitopo de carboidrato e/ou uma estrutura de carboidrato, conjugado de carboidrato ou uma célula de mamífero compreendendo tal epitopo de

carboidrato em pelo menos um animal ou ser humano.

FIG. 1

```

+MU1
|
| +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 17.4 AY319392
| |
| | +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 0633 AY895186
| | +7
| | +11 +8 +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 8713 AY895202
| | !!
| | !! +9 +Bacteroides thetaiotaomicron BNRRR16SB M58763
| | !!!
| | !! +10 +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 3751 AY895192
| |
| +20 | +Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29148 BNRRR16SAF L16489
| |
| | +Bacteroides acidifaciens AB021156
| | +18 +2
| | !!! +Bacteroides acidifaciens cepa A1 AB021158
| | !!! +5
| | !!! +Bacteroides acidifaciens cepa A32 AB021162
| | !!! +4
| | !!! +12 +Bacteroides acidifaciens cepa A29 AB021160
| | !!! +3
| | !!! +Bacteroides acidifaciens cepa A40 AB021164
| | !!!
| | !!! +13 +Bacteroides caccae ATCC 43185T BC16S X83951
| | +19
| | +Bacteroides fragilis BNRRGDAM11658
+22 | +6
| | +Bacteroides distasonis BNRRR16S M86695
| | +1
| | +-----Escherichia coli ATCC 11755T ECAT1177T X80725
| |
| | +Bacteroides ovatus AB050108
| | +14
| | +15 +Bacteroides ovatus ATCC 8438T B016S X83952
| | !!!
| | +17 +Bacteroides ovatus NCTC 11153 L16484 BNRRR16SAA
| |
| | +Bacteroides ovatus cepa 3941 AY895193
| | +16
| | +Bacteroides ovatus cepa 4140 AY895197
| |
| +Bacteroidaceae bacterium Smarlab AY538687
|
| +Bacteroides sp. WH302 AY895184
23-21
| +Bacteroides sp. WH305 AY895185
|
+AG6

```

FIG. 2

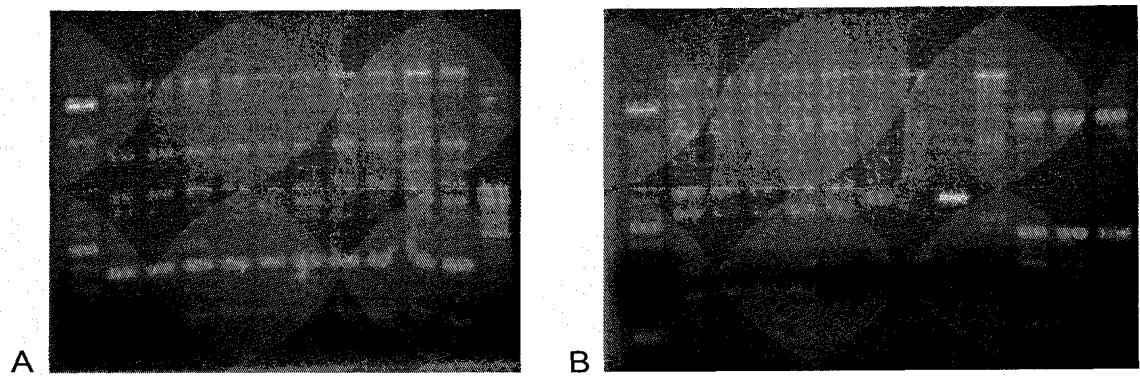


FIG. 3

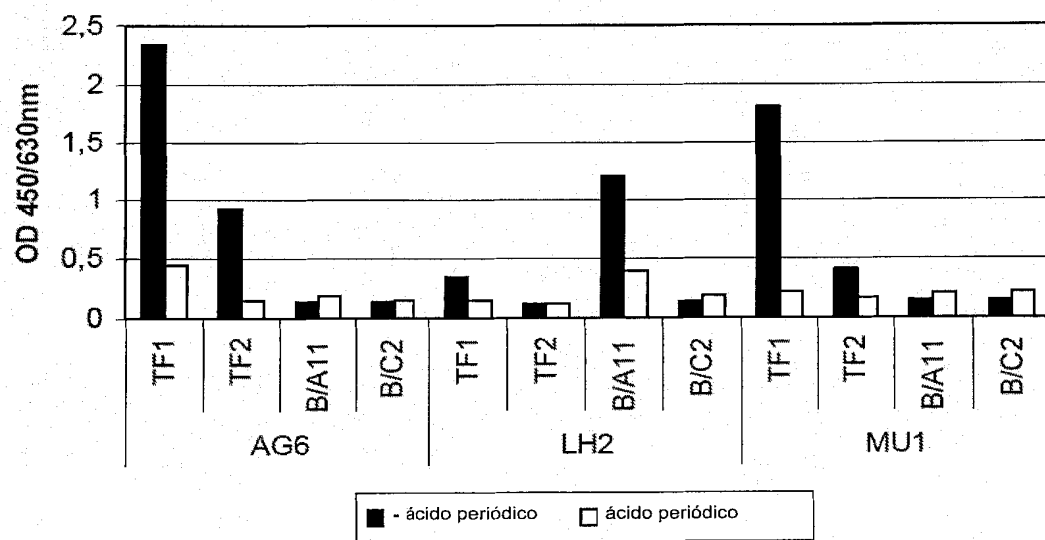


FIG. 3a

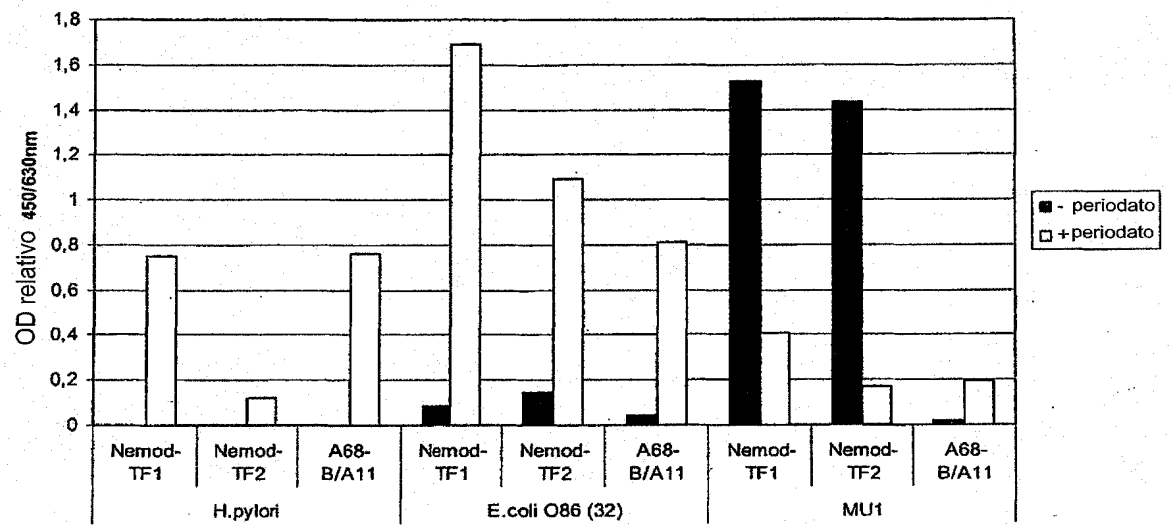


FIG. 4

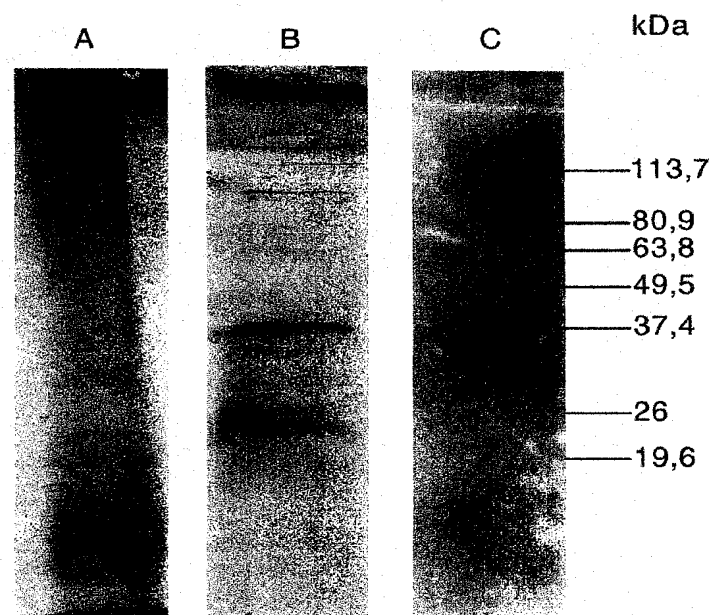


FIG. 5

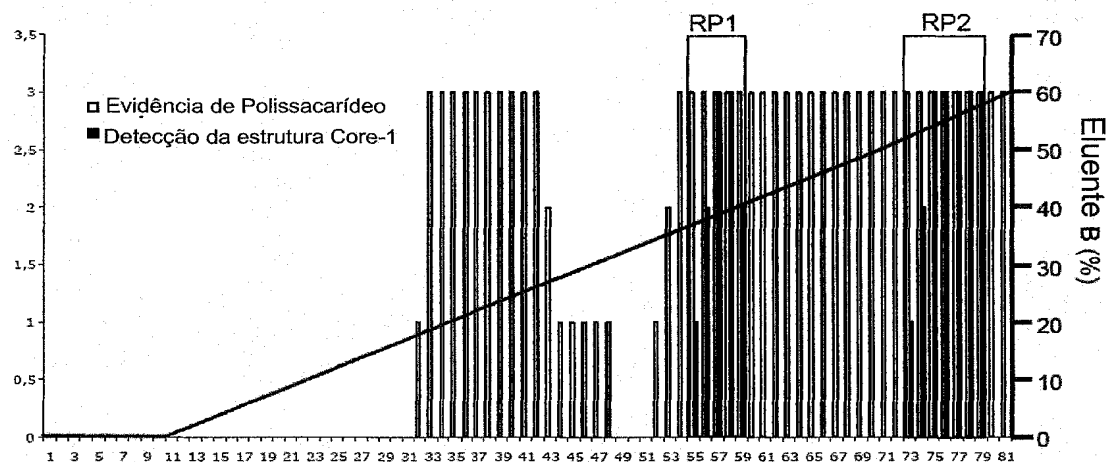


FIG. 6

-desHex-desHex-desHexM-HexNAc(HexNAc-Hex)-Hex-

FIG. 7

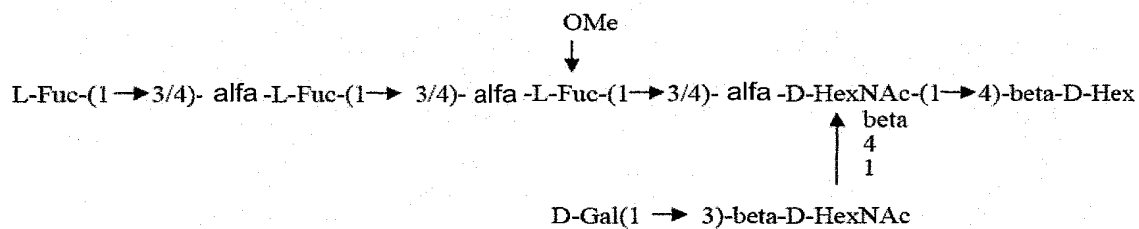


FIG. 8

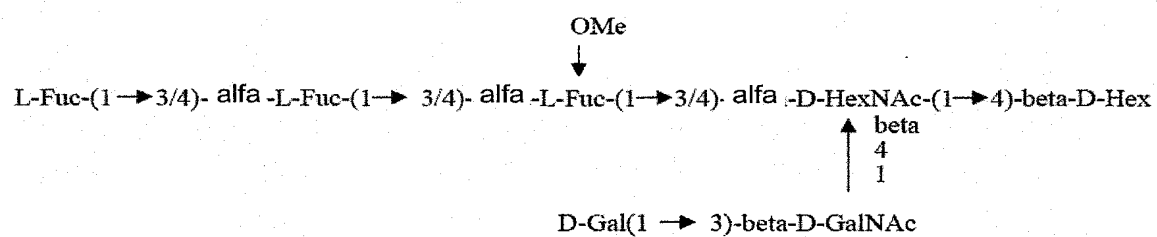


FIG. 9

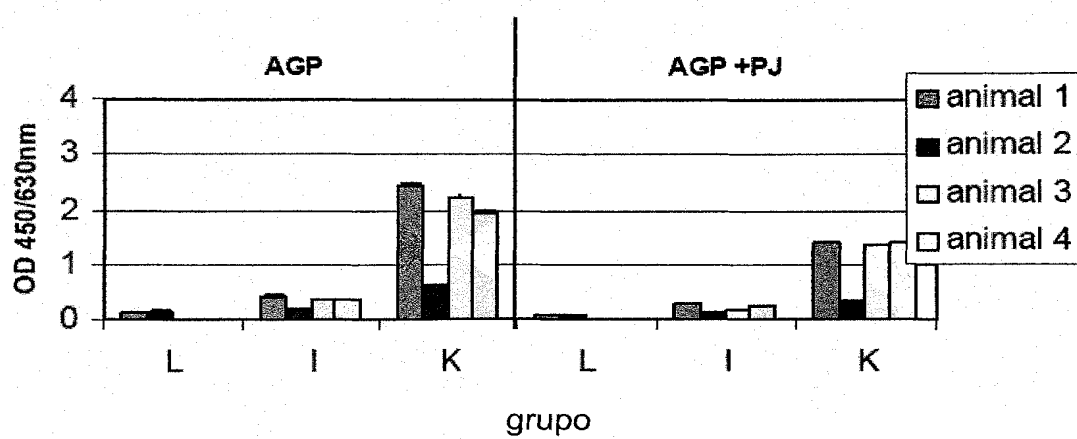


FIG. 10

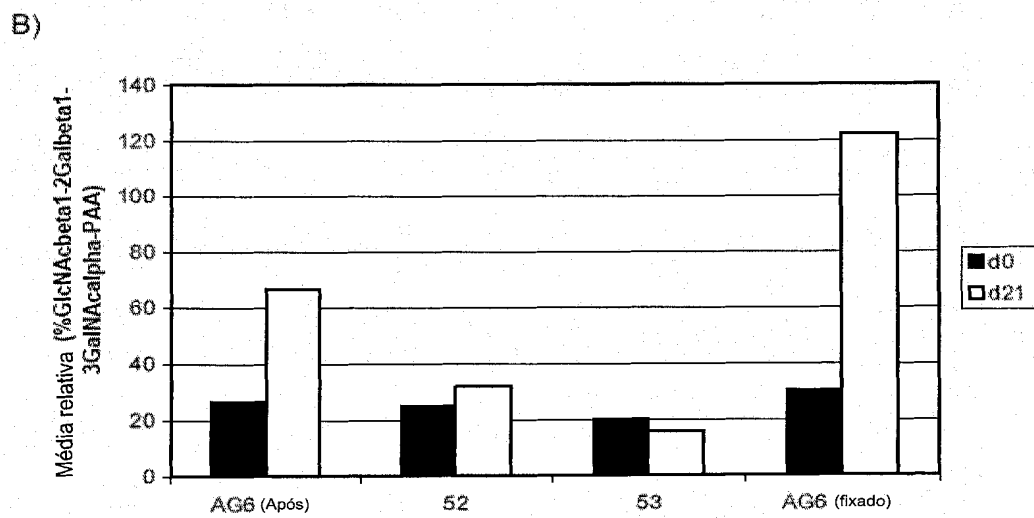
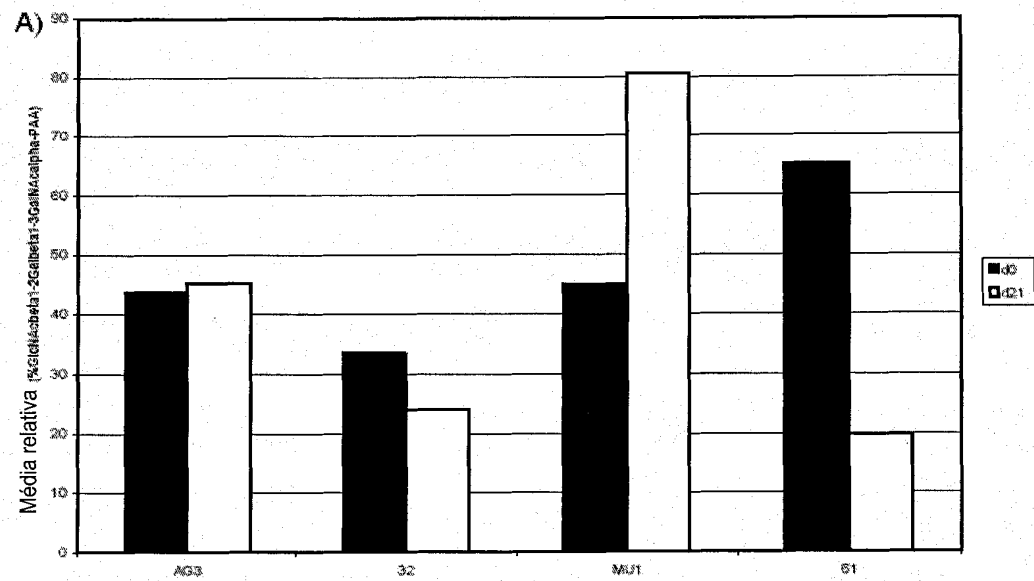
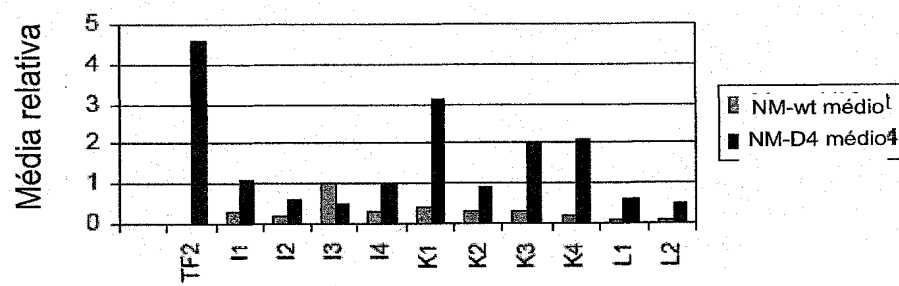
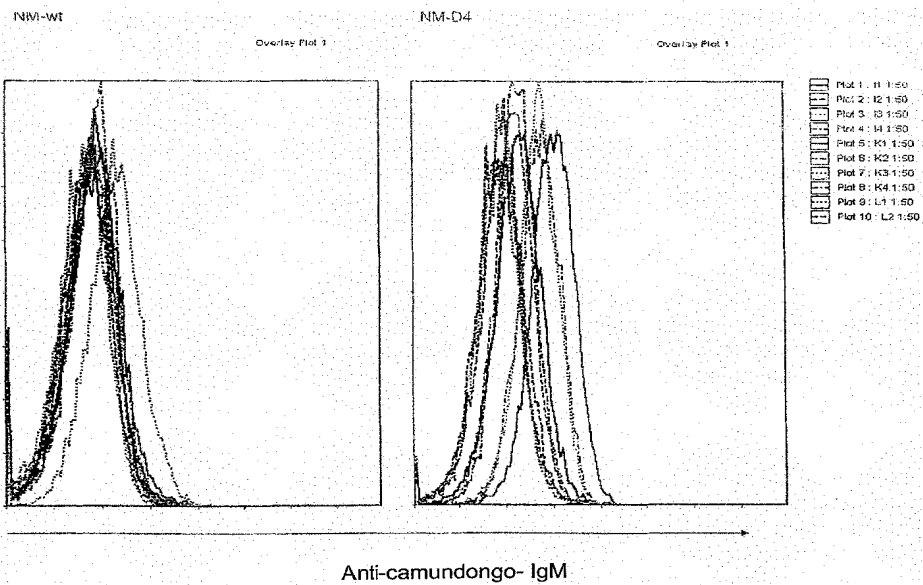


FIG. 11

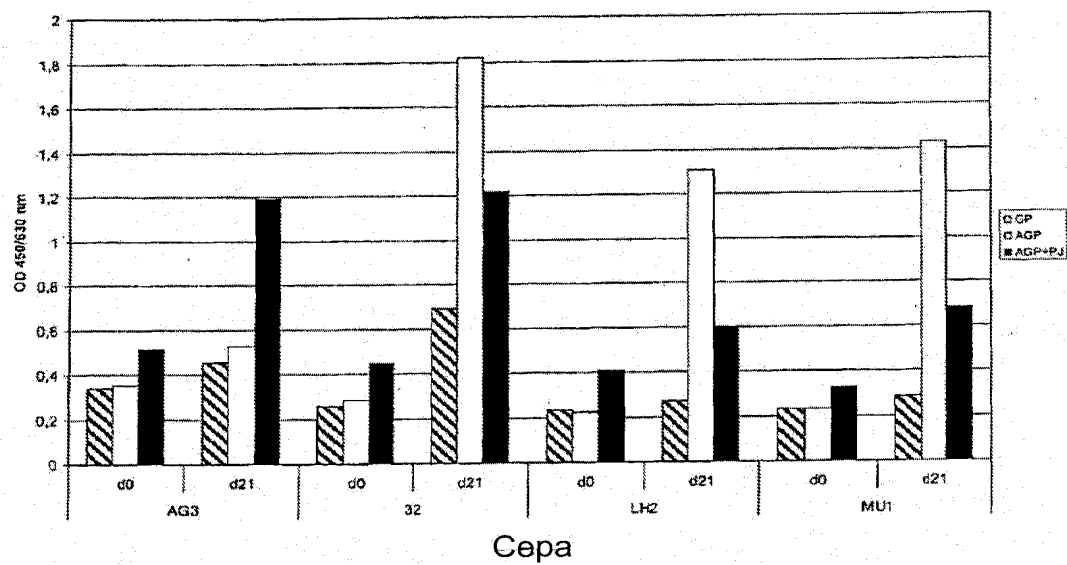
A



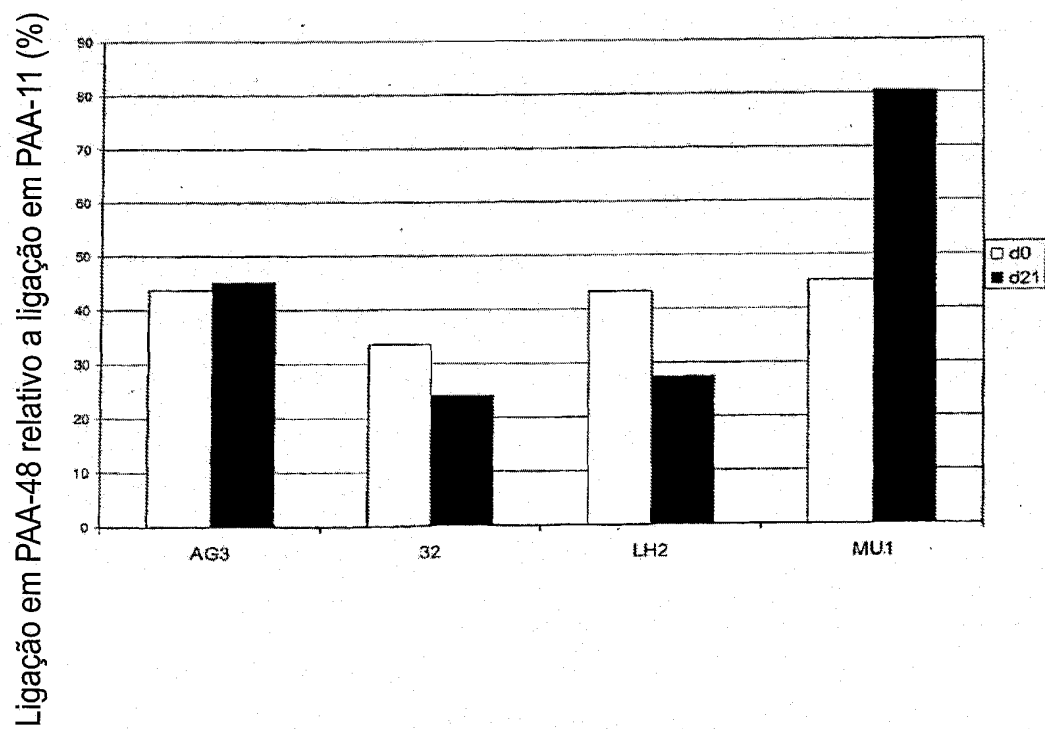
B



C



D



9/18

E)

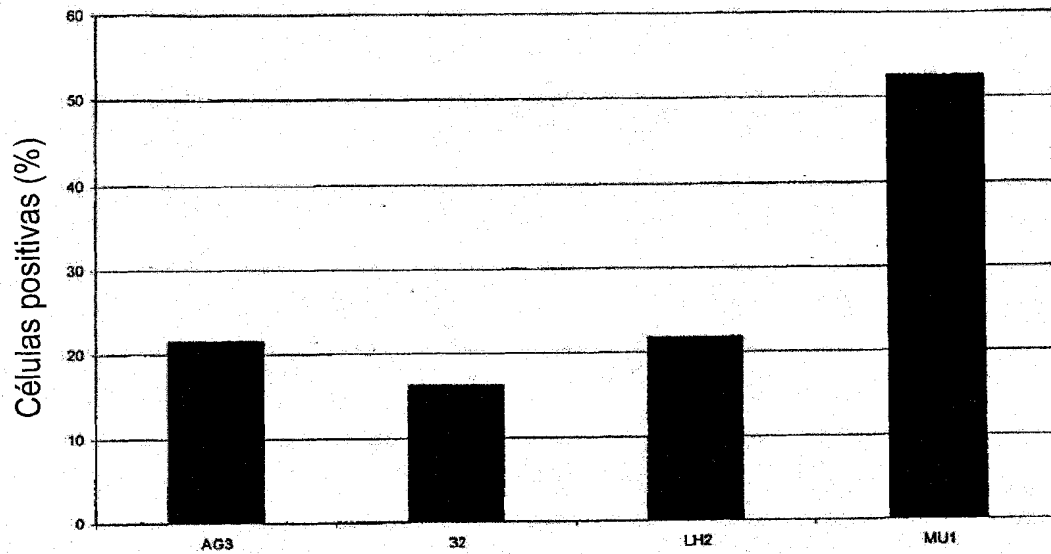


FIG. 12

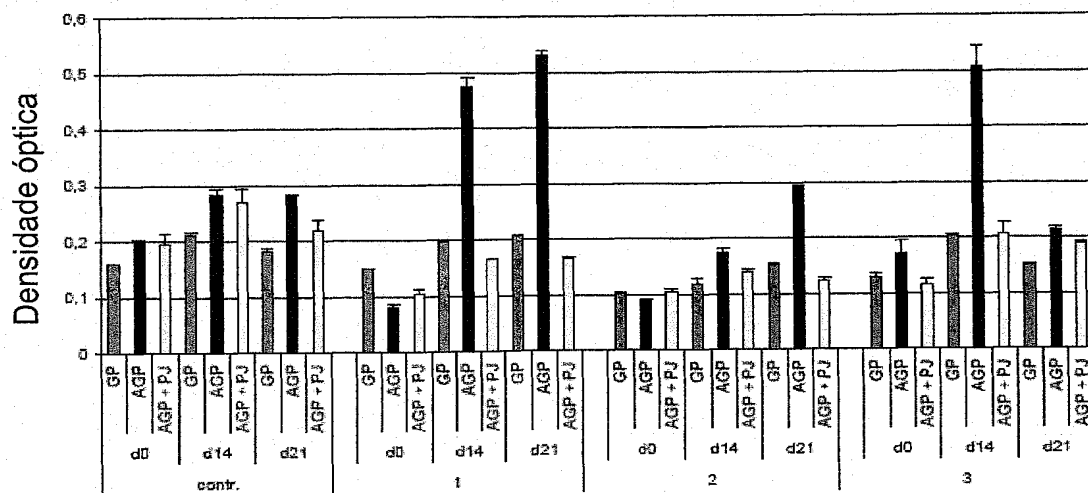


FIG. 13

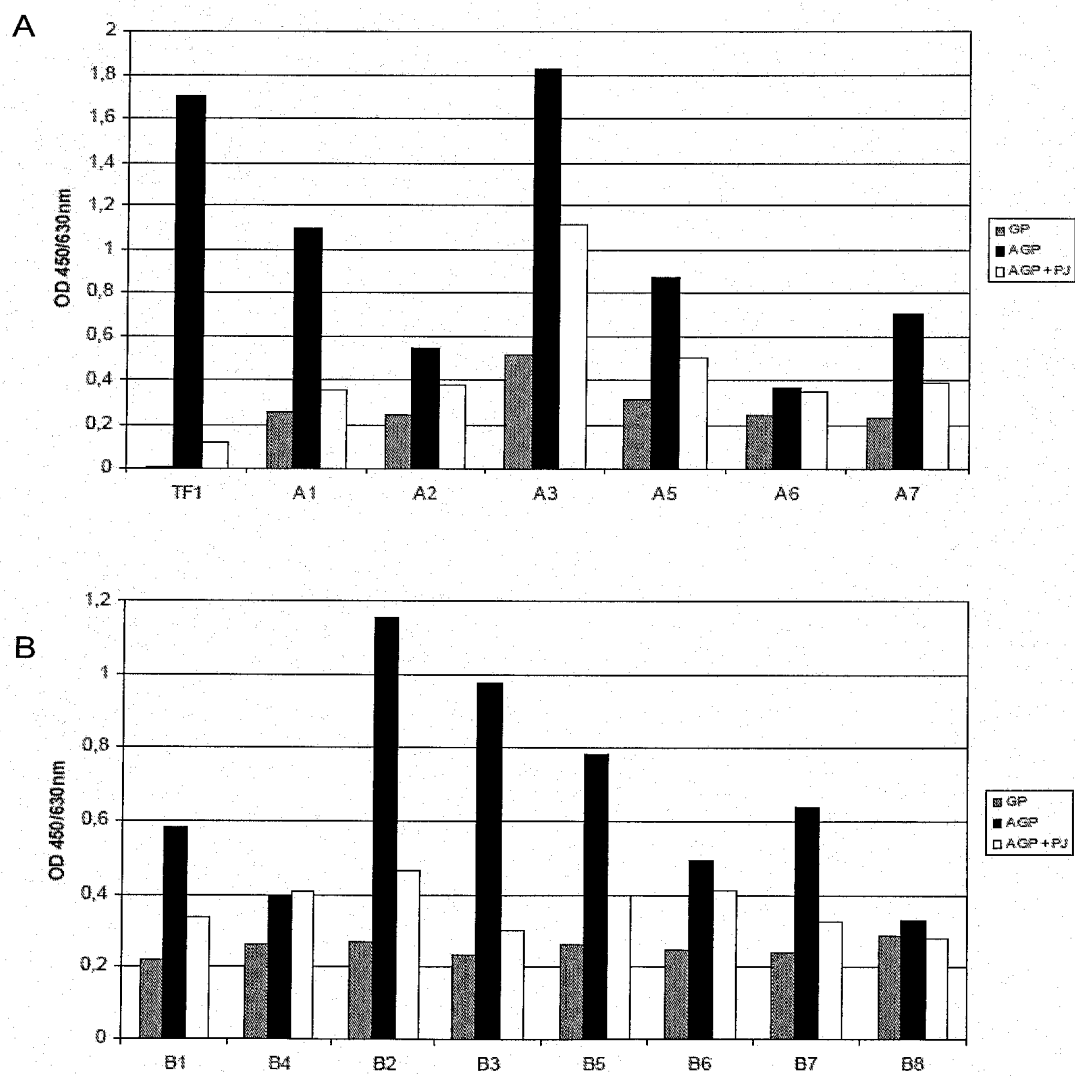


FIG. 14

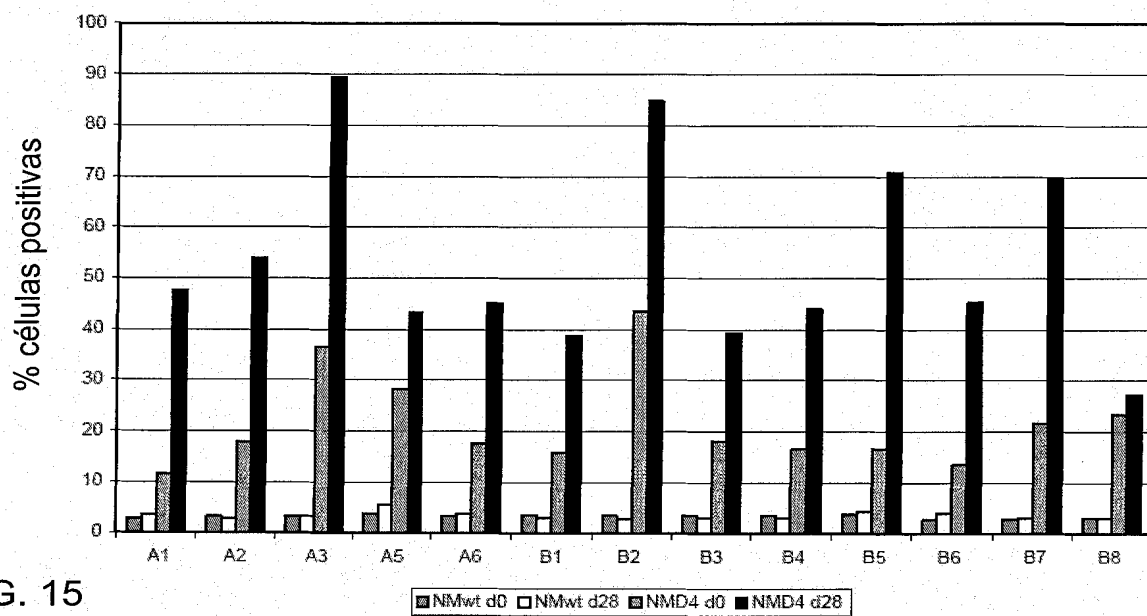
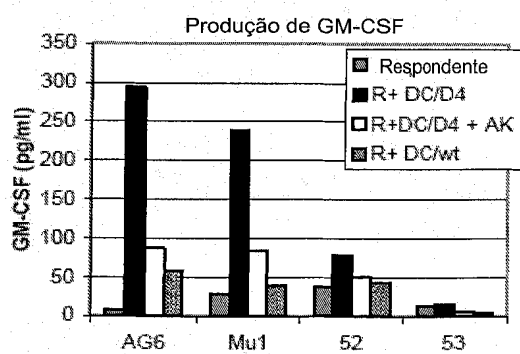


FIG. 15

A)



B)

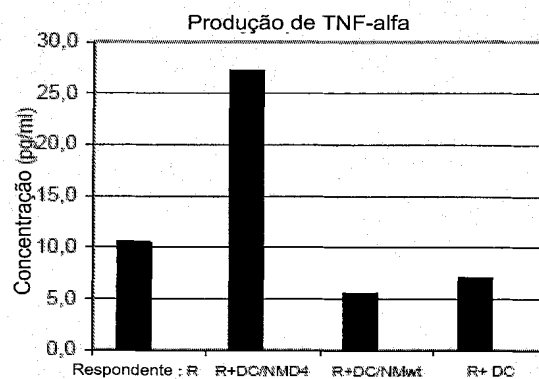


FIG. 16

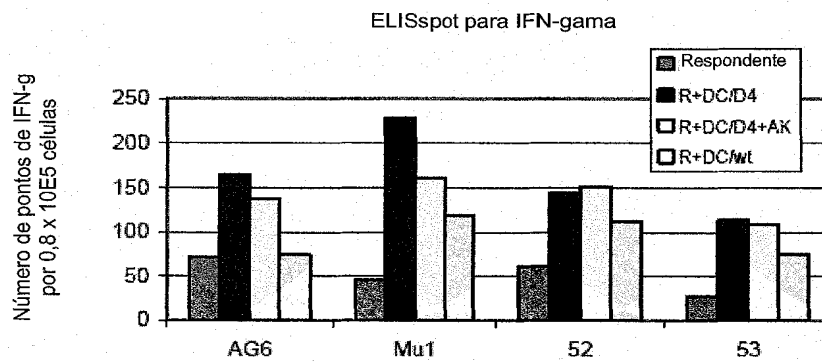


FIG. 17

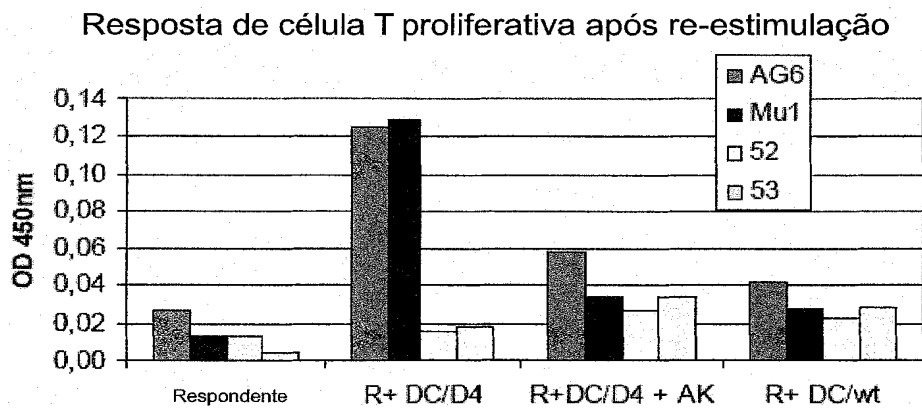


FIG. 18

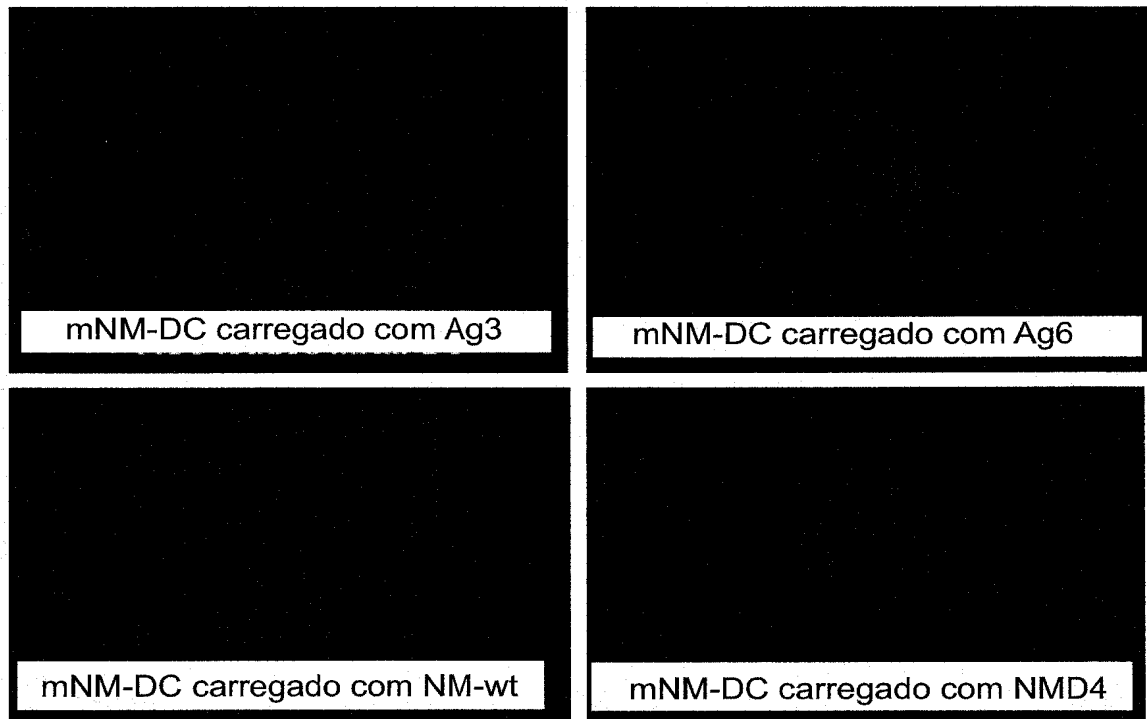
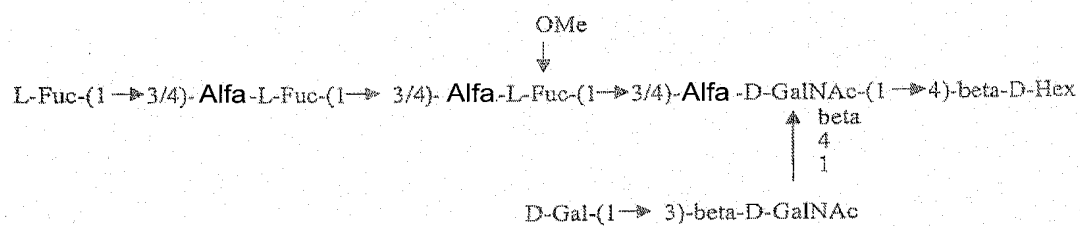
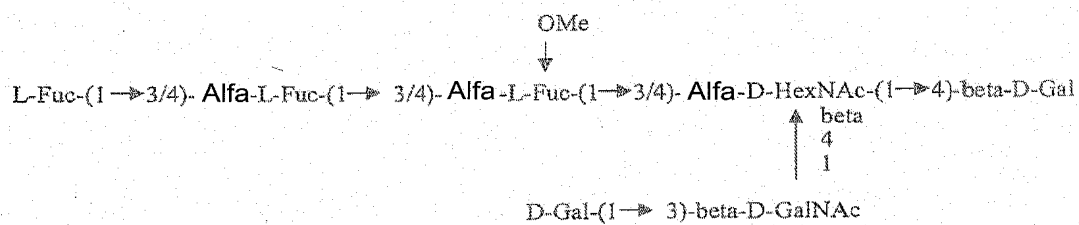


FIG. 19

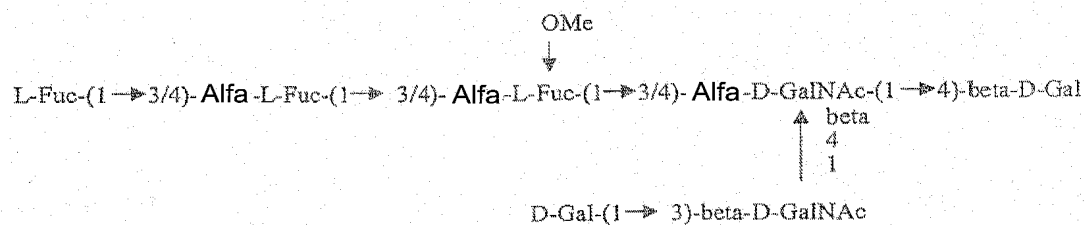
#1



#2



#3



#4

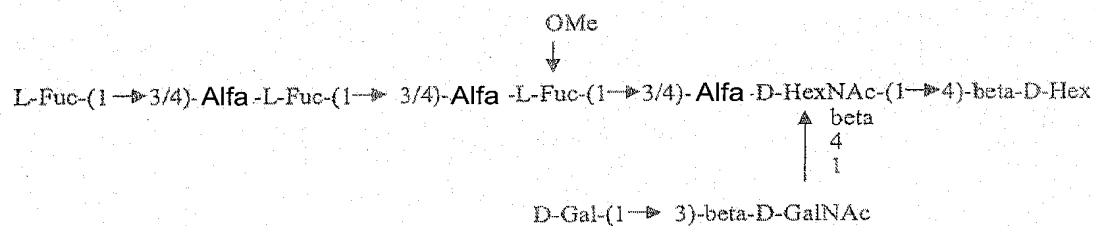


FIG. 19 (continuação)

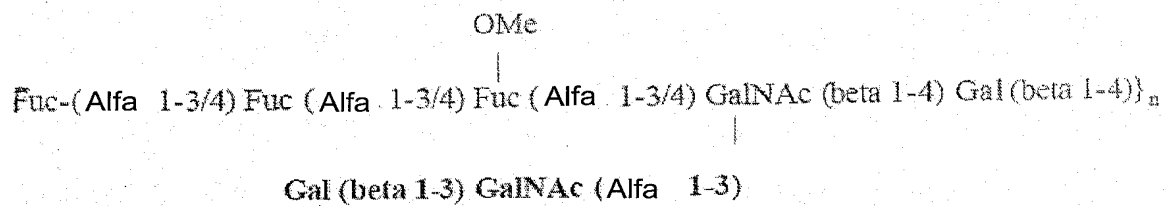
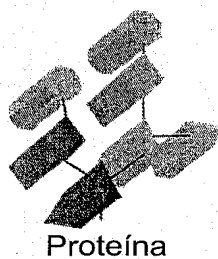


FIG. 20

Tecido normal



Cancer

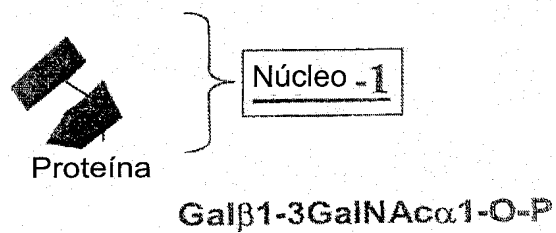


FIG. 21

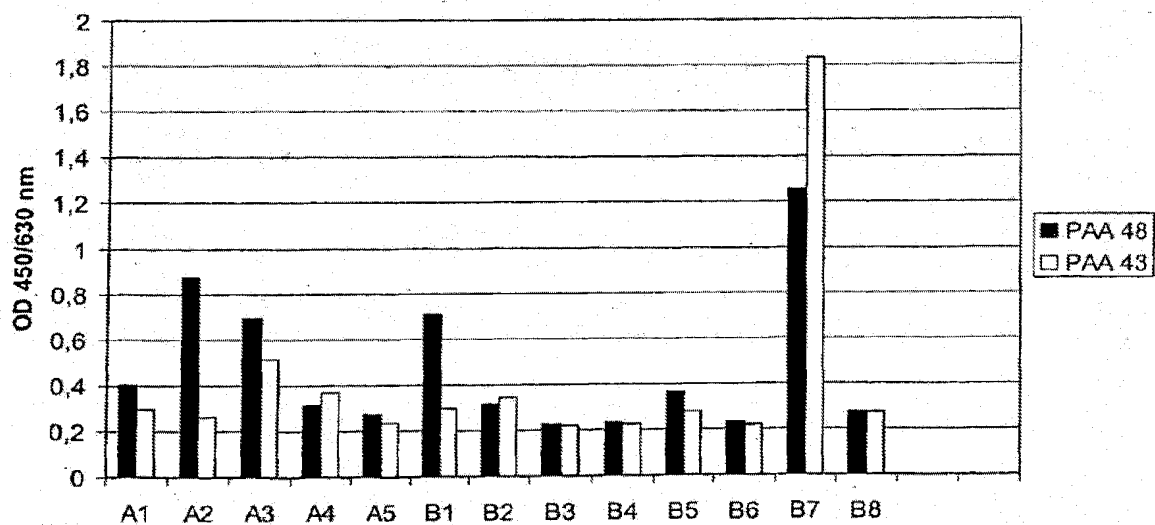


FIG. 22

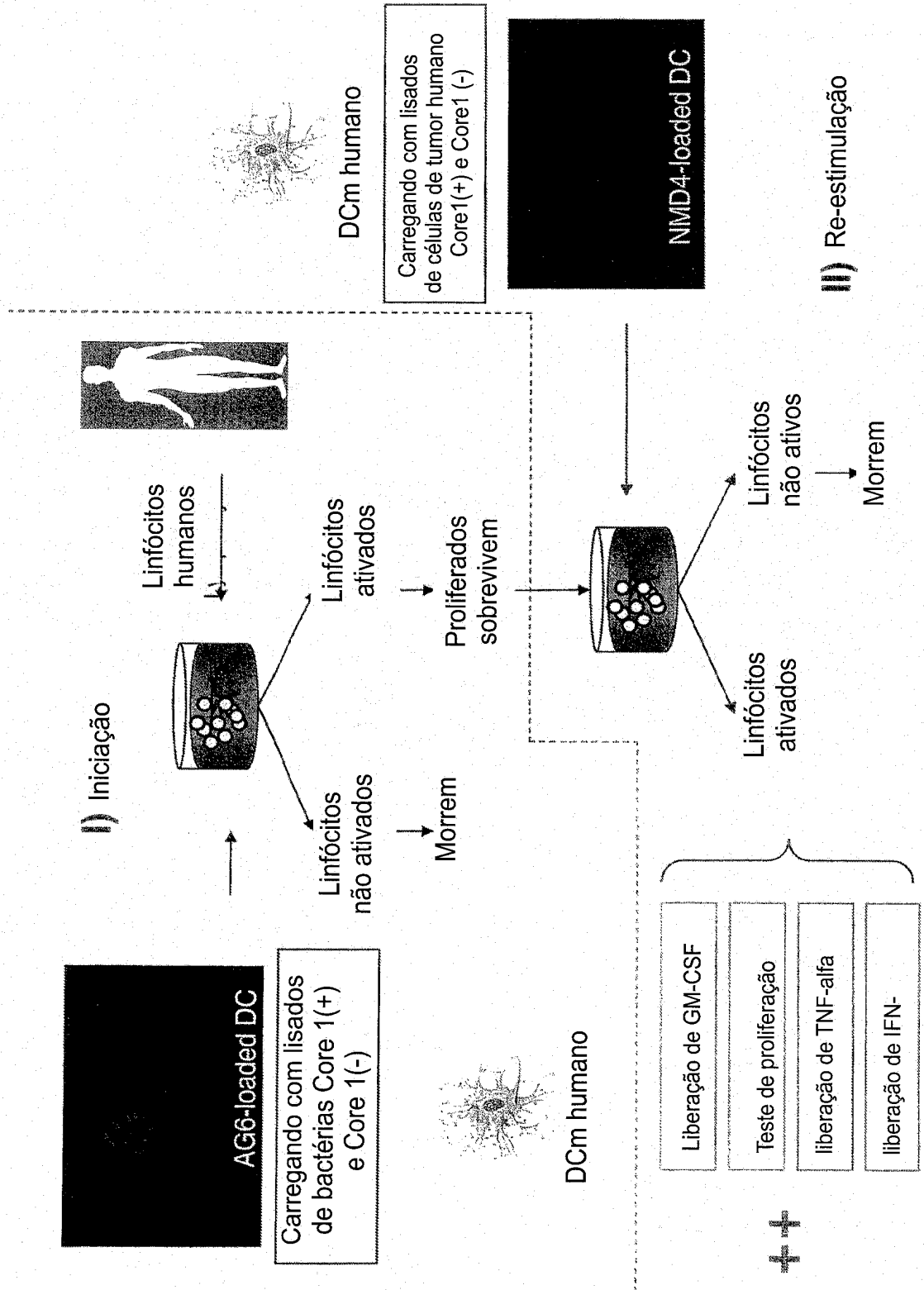
Antibiótico / cepa	53	52	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32
Espécies	<i>B. ovatus</i>	<i>B. thetaiotaomicon</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Cepa	DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697
Penicilina	R	R	R	sensibilidad media	R	R	R	R	R
Mezlocilina	R	R	sensibilidad media	sensibilidad media	sensibilidad elevada	sensível	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensível
Ampicilina	R	R	R	R	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível
Ampicilina + sulbactam	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada
Piperacilina + Tazobactam	sensível	sensibilidad media	sensível	sensível	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada
Meropenem	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada
Clindamicina	sensibilidad elevada	sensibilidad media	sensível	R	R	R	R	R	R
Metronidazol	sensível	sensível	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada					

Antibiótico / cepa	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32	53	52	AG6	MU1
Espécies	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. thetaiotaomicon</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>
Cepa	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697	DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1
Ampicilina	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	R	R	R	R
Sulfametoxazol + trimetoprim	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada				
Gentamicina	sensibilidad elevada	sensível	sensível	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada				
Tobramicina	sensível	sensível	sensível	sensível	sensibilidad elevada	R	R	sensibilidad media	sensibilidad media
Mezlocilina	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada				
Cefotaxina	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada				
Cefotaxin	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada
Meropenem	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada				
Ceftriaxon	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada	sensibilidad elevada				

FIG. 22 (continuação)

Cefuroxim	MS	MS	MS	MS	R				
Cefixim	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Tetraciclina	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Oxacilina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente			
Eritromicina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente			
Vancomicina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente			
Ampicilina + Sulbactam	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada
Linezolid	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente			
Piperacilina	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Piperacilina + Tazobactam	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensível	sensível	sensível
Amicacina	sensível	sensível	sensível	sensível	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Ceftazidim	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Imipenem	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Rifampicina	Resistente	Resistente	sensibilidade média	sensibilidade média	Resistente	Resistente			
Ciprofloxacina	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Fosfomicina	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensível	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada	sensibilidade elevada			
Penicilina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	sensibilidade média
Teicoplanina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente			
Cilindamicina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	sensibilidade elevada	sensível	Resistente
Bacitracina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente			
Neomicina	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível			
Colistina	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível			
Fucidina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente			
Metronidazol							sensível	sensível	sensibilidade elevada

FIG. 23



RESUMO

Patente de Invenção: "**MICRO-ORGANISMOS INDUTORES DE IMUNIDADE CELULAR ESPECÍFICA PARA CARBOIDRATOS E FRAÇÕES DOS MESMOS**".

- 5 A presente invenção refere-se ao campo da prevenção e do tratamento de distúrbios associados com a ocorrência de certos epitopos de carboidrato. Mais especificamente, a presente invenção refere-se à prevenção e ao tratamento de tumores positivos para epitopos de carboidrato. Ela refere-se formulações e métodos para a indução de uma reposta imunocelular carboidrato-específica eficaz.
- 10