



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103814123 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201280040689. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 08. 22

C12N 1/20 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12R 1/01 (2006. 01)

11178322. 1 2011. 08. 22 EP

A61K 39/00 (2006. 01)

61/526, 054 2011. 08. 22 US

A61K 39/02 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/066360 2012. 08. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/026887 EN 2013. 02. 28

(83) 生物保藏信息

DSMZ DSM25004 2011. 07. 12

(71) 申请人 葛莱高托普有限公司

地址 德国柏林

(72) 发明人 S·格勒茨 P·乌尔瑟默

K·陶陶尼安

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 韩威威

权利要求书3页 说明书27页

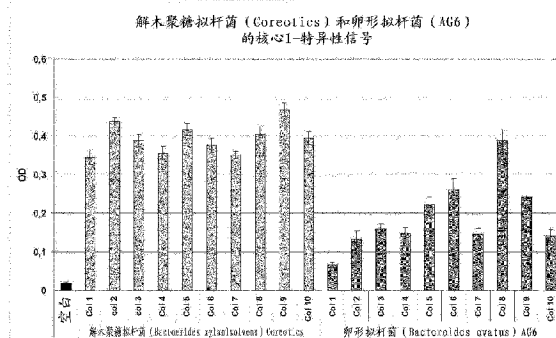
序列表14页 附图9页

(54) 发明名称

携带肿瘤抗原的微生物

(57) 摘要

本发明涉及解木聚糖拟杆菌(Bacteroides xylanisolvens)种的微生物,在其表面表达核心-1抗原。这些微生物尤其对于预防和治疗核心-1阳性疾病是有用的,且特征在于稳定的、同质的高核心-1表达。也提供的是包含相应核心-1阳性微生物或其部分的药物组合物。



1. 物种解木聚糖拟杆菌(*Bacteroides xylanisolvens*)的核心-1阳性微生物或其核心-1阳性裂解物或其核心-1阳性部分,其中所述微生物或其裂解物或部分被至少一种核心-1特异性抗体识别。

2. 权利要求1的微生物,其为 *Coreotics* (DSM25004),源于其的微生物或 *Coreotics* 同源物。

3. 权利要求2的微生物,其中源于 *Coreotics* 的微生物或 *Coreotics* 同源物具有以下特征中的2个或更多:

(a) 其属于解木聚糖拟杆菌物种;

(b) 在DNA-DNA杂交测定中,其与保藏为DSM25004的 *Coreotics* 和/或保藏为DSM18836的解木聚糖拟杆菌显示至少50%、优选至少70%、至少90%、或至少95%、更优选的至少98%、最优选的至少99%的DNA-DNA亲缘关系;

(c) 其与保藏为DSM25004的 *Coreotics* 和/或保藏为DSM18836的解木聚糖拟杆菌显示至少98%、优选至少99%或至少99.5%、更优选100%的16S rRNA基因序列相似性水平;和/或

(d) 其显示具有以下特征之一或更多的核心-1抗原表达:

(i) 其具有保藏为DSM25004的 *Coreotics* 的平均核心-1表达的至少50%、优选至少80%、至少85%、或至少90%、更优选至少95%的平均核心-1抗原表达;

(ii) 其在实施例2中描述的ELISA测定中达到至少0.3、优选至少0.35的平均吸光度值;

(iii) 其在细胞表面表达选自下列的至少一种碳水化合物结构:图4的结构#1、#2、#3、#4和#5,其类似结构,和/或其重复单元;

(iv) 在所述微生物的细胞培养物中,至少50%、优选至少80%、至少90%、或至少95%、更优选的约100%的所述微生物具有保藏为DSM25004的 *Coreotics* 的平均核心-1抗原表达的至少75%、优选至少80%的核心-1抗原表达水平;和/或

(v) 在所述微生物的细胞培养中,至少50%、优选至少80%、至少90%、或至少95%、更优选的约100%的所述微生物具有在保藏为DSM25004的 *Coreotics* 的平均核心-1抗原表达的70%~150%、优选75%~125%范围内的核心-1抗原表达水平。

4. 权利要求1~3之任一项的微生物,其中所述微生物具有核心-1抗原表达,所述核心-1抗原表达具有以下特征之一或更多:

(a) 其在实施例2中描述的ELISA测定中具有至少0.3和更优选至少0.35的平均吸光度值;

(b) 其具有保藏为DSM25004的 *Coreotics* 的平均核心-1表达的至少50%、优选至少70%、至少80%、至少85%、或至少90%、更优选至少95%的平均核心-1抗原表达;

(c) 其包含选自下列的至少一种碳水化合物结构:图4的结构#1, #2, #3, #4和#5,其类似结构,和/或其重复单元;

(d) 其能产生短链脂肪酸;和/或

(e) 在细胞培养中,所述微生物具有以下特征中的至少一个:

(i) 所述细胞培养物中至少50%,优选至少80%,至少90%,或至少95%,更优选的约100%的所述微生物具有核心-1抗原表达水平,其为

(aa) 细胞培养物中所述微生物的平均核心 -1 抗原表达水平的至少 75% 和 / 或

(bb) 保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 抗原表达的至少 75% ;

(ii) 所述细胞培养物中至少 50%, 优选至少 80%, 至少 90%, 或至少 95% 更优选的约 100% 的所述微生物具有核心 -1 抗原表达水平, 其为

(aa) 在细胞培养物中所述微生物的平均核心 -1 抗原表达水平的 70% ~ 150%、优选 75% ~ 125% 范围内, 和 / 或

(bb) 在保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 抗原表达的 70% ~ 150%、优选 75% ~ 125% 范围内。

5. 权利要求 1 ~ 4 之任一项目的微生物, 其中, 当核心 -1 特异性抗体与微生物或其裂解物或部分在适当的结合条件下接触时, 所述微生物或其裂解物或部分被至少一种核心 -1 特异性抗体识别并由此结合, 其中所述核心 -1 特异性抗体与微生物或其裂解物或部分的结合满足以下特征之一或更多:

(a) 核心 -1 特异性抗体选自以下抗体:

(i) 具有由下列组成的一组 CDR 的抗体: 根据 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列作为 CDR-H1, 根据 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列作为 CDR-H2, 根据 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列作为 CDR-H3, 根据 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列作为 CDR-L1, 根据 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列作为 CDR-L2 和根据 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列作为 CDR-L3;

(ii) 具有由下列组成的一组 CDR 的抗体: 根据 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列作为 CDR-H1, 根据 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列作为 CDR-H2, 根据 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列作为 CDR-H3, 根据 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列作为 CDR-L1, 根据 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列作为 CDR-L2 和根据 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列作为 CDR-L3;

(iii) 抗体 Nemod-TF1 及

(iv) 抗体 Nemod-TF2;

(b) 所述微生物或其裂解物或部分被至少 2 种核心 -1 特异性抗体结合, 其中所述至少 2 种不同抗体识别不同表位及优选选自权利要求 5 中定义的抗体 (a), 尤其是抗体 (i) 及 (ii) 或抗体 (iii) 及 (iv);

(c) 至少一种核心 -1 特异性抗体与所述微生物或其裂解物或部分的结合是高碘酸盐敏感的, 其中在高碘酸盐处理之后结合减少或缺乏; 和 / 或

(d) 所述微生物或其裂解物包含暴露的形式核心 -1 抗原, 其中所述暴露的核心 -1 抗原未被其他结构掩蔽, 尤其是未被其他碳水化合物结构掩蔽。

6. 组合物, 其包含权利要求 1 ~ 5 之任一项目的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或其核心 -1 阳性部分。

7. 权利要求 6 的组合物, 其中在所述组合物中物种解木聚糖拟杆菌的核心 -1 阳性微生物特征在于权利要求 4 和 / 或 5 中定义的核心 -1 抗原表达。

8. 权利要求 6 或 7 的组合物, 其中在所述组合物中至少 50%, 优选至少 70%, 至少 80%, 至少 90%, 或至少 95%, 更优选的约 100% 的核心 -1 阳性微生物具有核心 -1 抗原表达水平, 其为

(a) 在组合物中全部核心 -1 阳性微生物的平均核心 -1 抗原表达水平的至少 75%, 和 / 或保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 抗原表达的至少 75%; 和 / 或

(b) 在培养物中全部核心-1 阳性微生物的平均核心-1 抗原表达水平的 70% ~ 150%、优选 75% ~ 125% 范围内、和 / 或在保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心-1 抗原表达的 70% ~ 150%、优选 75% ~ 125% 范围内。

9. 权利要求 6 ~ 8 之任一组的组合物, 具有以下特征之一或更多:

(a) 所述组合物是细胞培养物和 / 或

(b) 在组合物中核心-1 阳性微生物或核心-1 阳性微生物以有活力的、非-生殖的、非-有活力的或裂解的形式存在。

10. 药物组合物, 包含

(i) 权利要求 1 ~ 5 之任一组的核-1 阳性微生物或其核-1 阳性裂解物或其核-1 阳性部分

和 / 或

(ii) 权利要求 6 ~ 9 之任一组的组合物。

11. 权利要求 10 的药物组合物, 其用于诱导和 / 或增强针对核心-1 抗原的免疫应答。

12. 权利要求 1 ~ 5 之任一组的核-1 阳性微生物或其裂解物或部分, 权利要求 6 ~ 9 之任一组的组合物, 或权利要求 10 或 11 的药物组合物, 其用于医学, 优选用于治疗或预防核-1 阳性肿瘤、癌、胃肠病症和 / 或核-1 阳性疾病。

13. 制备核-1 阳性产物的方法, 包括以下步骤:

(a) 提供权利要求 1 ~ 5 之任一组的核-1 阳性微生物;

(b) 任选地处理所述核-1 阳性微生物以获得核-1 阳性裂解物或其部分;

(c) 在核-1 阳性产物的制备中使用所述核-1 阳性微生物和 / 或所述核-1 阳性裂解物或其部分。

14. 权利要求 13 的方法, 其中核-1 阳性产物是抗原呈递细胞, 优选树突细胞, 及其中步骤(c) 包括用所述核-1 阳性微生物和 / 或所述核-1 阳性裂解物或其片段装载所述抗原呈递细胞。

15. 权利要求 1 ~ 5 之任一组的核-1 阳性微生物和 / 或其核-1 阳性裂解物和 / 或其核-1 阳性部分的体内或体外用途, 用于诱导或增强核-1 特定免疫应答和 / 或用于诱导针对核-1 的抗体滴度和 / 或用于产生有功能的抗原呈递细胞, 优选树突细胞, 和 / 或活化的 T 细胞, T 细胞系或 T 细胞克隆或针对核-1 的抗体。

携带肿瘤抗原的微生物

【技术领域】

【0001】 本发明涉及抗原呈递微生物。尤其是提供在它们的表面携带核心 -1 抗原的物种解木聚糖拟杆菌(*Bacteroides xylanisolvens*) 微生物。此外,本发明提供这些微生物在医学中的用途以及含有所述微生物的产品。

【背景技术】

【0002】 异常糖基化是癌细胞的典型标志。糖蛋白和糖脂上的碳水化合物肿瘤抗原因此是主动和被动免疫治疗的靶。这些高度丰富的抗原由于肿瘤细胞的复合糖基化设备的变化而从新表达或上调。多种脂质或蛋白质结合的碳水化合物肿瘤抗原已有描述,例如 GM2, GD2, GD3, 岩藻糖基化的 GM1, Globo H, Ley 和粘蛋白核心结构 Tn, 唾液酰 -Tn 和 Thomson Friedenreich 抗原。

【0003】 Thomsen-Friedenreich 抗原(TF)是在一系列报道中作为肿瘤抗原描述的已知道的碳水化合物结构。TF 以 2 种形式(TF- α 和 TF- β) 存在,可将其连接到蛋白质或糖脂。

【0004】 核心 -1 是二糖 Gal- β 1, 3-GalNAc, 其在癌细胞中尤其是以 α -异头构型 O-配糖地连接到蛋白质的羟基氨基酸丝氨酸或苏氨酸。核心 -1 对应于 Thomsen-Friedenreich 的 TF- α 结构,且仅连接到肿瘤上的蛋白质。因此,术语核心 -1 和 Thomsen-Friedenreich 不必然指称同一结构。

【0005】 核心 -1 在健康和良性 - 患病的组织中被其他碳水化合物组分掩蔽,但是在大部分癌及在一些非 - 上皮恶性肿瘤中被去掩蔽。因此,核心 -1 是特异性的泛癌抗原。

【0006】 核心 -1 是重要的肿瘤抗原。核心 -1 在超过 60% 的原发性结肠癌及超过 90% 的自结肠癌肝转移以及在其他主要适应症包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌和其他胃肠癌诸如胃癌、及胰腺癌的大多数癌上表达。核心 -1 是患结肠癌的患者独立预后标志物,随着增加核心 -1 表达强度而死亡率增加和中等存活减小。肝转移的发展与核心 -1 表达关联。患核心 -1 阳性原发性癌的患者在几乎 60% 的病例中发展肝转移,而核心 -1- 阴性肿瘤的肝转移风险显著地更低(少于 20%)。除了介导转移到肝之外,核心 -1 也可在经内皮转移中起到作用。

【0007】 格外地高泛癌特异性、预后关联和直接涉及肝转移致使 Thomsen-Friedenreich 和特别地核心 -1 成为癌免疫治疗的主要靶。

【0008】 作为核心 -1 的广泛分布的结果,提供可在例如,癌的预防和治疗,尤其是疫苗接种中用作药物的具有对应于核心 -1 的细胞表面结构的核心 -1 阳性微生物是有利的。

【0009】 存在提供基于 Thomsen-Friedenreich 的治疗方法的尝试。例如, Shigoeka 等人(1999) 描述了在小鼠模型中由抗 -Thomsen-Friedenreich 特异性单克隆抗体抑制自神经氨酸酶处理的结肠 26 细胞的肝转移。但是,由于产生高度特异性抗 -TF 抗体的困难和因为它们作为具有可比较地更低的单结合结构域的固有亲和性的 IgM 同种型的性质,至今还未开发出 TF- 特异性抗体。而且,一些抗 -TF- 抗原抗体不是临床有用的,因为它们造成肿瘤细胞的不期望的增殖。此外, WO2006/012626 也描述了抗 -TF 抗原抗体的治疗性用途。TF- 特

异性抗体的结合已显示抑制肿瘤细胞的增殖(Jeschke 等人(2006))。

[0010] 此外,也有开发基于 Thomsen-Friedenreich 的疫苗的尝试。这些多数聚焦于抗体应答的诱导。例如, Livingston 和 Lloyd(2000)使用的非-天然的 TF-缀合物,其中合成 TF 随机偶联于 KLH。此缀合物提起针对合成 TF 但不针对天然的配体上的 TF 的体液免疫应答(Adluri 等人(1995))。由此它们不是 TF 特异性的,因为它们不会识别肿瘤结构上的 TF。

[0011] Springer 和 Desai 使用由 O 型和 MN 型红细胞来源的糖蛋白组成的 T/Tn 疫苗进行疫苗接种,这导致改善的乳腺癌患者存活,尽管仅制造小量的 IgM。但是, IgM 代表欠成熟免疫应答和许多相关于针对 TF-Ag 的抗体的之前研究涉及 IgM 抗体,因此会需要更显著的高度 TF 特异性免疫应答、优选 IgG 应答。

[0012] 已知少数报道描述推定对于 TF 阳性的微生物。例如, Springer 等人(Brit J Haematol 47(1981), 453-460; Transfusion 19(1979), 233-249)报道可在鸡和人中产生多克隆抗体应答的耗氧微生物(大肠杆菌(E. coli) 086)也可识别人红细胞上的 TF。Springer 用唾液酸酶-处理的 T 红细胞使用抗-T 的吸附和血细胞凝集测定,以便测定免疫应答的粗略特异性。但是,人红细胞的唾液酸酶-处理导致几个碳水化合物表位的解蔽,在它们之中但不唯独是 TF 和尤其是核心-1。因此,由 Springer 测试的反应由于交叉反应性而不显示对 TF 和尤其是核心-1 的特异性。相应非特异性微生物作为疫苗具有仅有限的适应性,由于其非特异性,由于其不会引起特别针对 TF 的强免疫应答而是针对类似的 TF-样结构,因此潜在地也越来越针对非-肿瘤身体组织或细胞。此外,测试显示,大肠杆菌(E. coli)086 对于核心-1 表达不是阳性的,因为其未被核心-1 特异性抗体结合。

[0013] W02008/055703 公开核心-1 阳性微生物,尤其是,在它们的细胞表面表达核心-1 抗原的物种卵形拟杆菌(Bacteroides ovatus)微生物,诸如 AG6 和 MU1 和它们作为药物的应用。通过核心-1 特异性抗体与所述微生物的结合确认核心-1 抗原的表达。此外, W02008/055703 公开了相应微生物在治疗中的应用。

[0014] 当使用核心-1 阳性微生物作为药物时,渴望核心-1 阳性微生物不仅表达核心-1 抗原,而且微生物显示高核心-1 抗原表达,以有效地刺激核心-1 特异性免疫应答。此外,渴望选择用作药物的核心-1 阳性微生物具有稳定的及优选均质高核心-1 抗原表达。稳定的、高核心-1 抗原表达确保含有核心-1 阳性微生物的产品呈现更少变异性,这对于产品质量是重要的,尤其是在药物领域。为了满足管理规定,稳定的、高核心-1 抗原表达也是重要的。

[0015] 因此,本发明旨在提供替代性的核心-1 阳性微生物,尤其是在其细胞表面具有稳定的、高核心-1 抗原表达的微生物。

[0016] 【发明概述】

[0017] 本发明人发现了物种解木聚糖拟杆菌(Bacteroides xylanisolvens)的核心-1 阳性微生物。微生物是核心-1 阳性,因此,如果核心-1 特异性抗体在接触后特异性结合所述微生物,在其表面表达核心-1 抗原。

[0018] 解木聚糖拟杆菌(Bacteroides xylanisolvens)是拟杆菌属(Bacteroides)的新物种,其被 Chassard 等人首次描述("Bacteroides xylanisolvens sp. Nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces"; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology(2008); 58, 1008-1013)。其是可从人

粪便分离的木聚糖-降解细菌,由此是人共生微生物。其是革兰氏阴性芽孢杆菌细菌,其一般具有低致病性。解木聚糖拟杆菌在德意志微生物和细胞培养物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (DSMZ), **Inhoffenstraße** 7B, 38124 Braunschweig (DE) 被保藏为 DSM18836, 因此是公众可得到的。解木聚糖拟杆菌(DSM18836)不表达核心-1 抗原,如由用核心-1 特异性抗体的实验显示。所述核心-1 特异性抗体不识别、由此不结合解木聚糖拟杆菌(DSM18836), 这证明其不表达核心-1 抗原,且因此不是核心-1 阳性。因此,发明人非常惊讶它们能鉴定物种解木聚糖拟杆菌的核心-1 阳性微生物。此外,发明人发现了物种解木聚糖拟杆菌的核心-1 阳性微生物显示有利的核心-1 抗原表达谱,因为核心-1 抗原不仅高量表达,且表达也是非常稳定的,此外同质的。如在导言中讨论,稳定的、高核心-1 抗原表达是重要优势,尤其是当将核心-1 阳性微生物在药物领域使用时。例如,用具有稳定和均质、高核心-1 表达的微生物生产的产品具有恒定的、高核心-1 含量。因此,产生具有期望的核心-1 水平的产品需要更少微生物,且这些微生物提供恒定产品质量和少缺陷产品。因此,由于关于核心-1 抗原表达的特定特征,本发明的核心-1 阳性微生物对于在药物领域使用是尤其适合的。这同样适用于所述微生物的核心-1 阳性裂解物和 / 或部分。

[0019] 因此,本发明的核心-1 阳性微生物或其核心-1 阳性裂解物或部分可用于,例如,预防和治疗与核心-1 表达关联的疾病,尤其是癌,其中癌细胞诸如例如肿瘤细胞表达核心-1。当施用给患者时,本发明的核心-1 阳性微生物或其核心-1 阳性裂解物或部分能刺激针对核心-1 的免疫应答,其然后也转向疾病的核心-1 阳性细胞。由于高、稳定的核心-1 抗原表达谱,诱导的和 / 或增强的免疫应答非常强。当使用相同的量的本发明的核心-1 阳性微生物或其核心-1 阳性裂解物或部分时,本发明的微生物的稳定的、高核心-1 抗原表达此外无显著批间变异地提供恒定核心-1 活性 / 表达。此也改善最终产物的质量,分别产生少缺陷产物,因为本发明的微生物具有稳定的、高核心-1 抗原表达,因此提供更恒定量的核心-1 抗原。由本发明的微生物提供的高、同质的量的核心-1 抗原也允许减少对于引发免疫应答必需的微生物的量。

[0020] 此外,本发明的微生物无致病性,由此可无导致不利的副作用的高风险地施用,尤其是当施用于人类时。此外,由于低致病性,对于本发明的微生物的制备、分布及销售无法令规定上的严重的限制,其由此可用很少努力实现。尤其是,解木聚糖拟杆菌微生物根据欧洲 Directive 2000/54/EC 和德国“生物材料规定”(“Biostoffverordnung”)被分类为风险组 1 的生物学剂。风险组 1 是 4 个风险组中最低的,涉及不太可能导致人疾病的生物学剂。许多其他微生物,也包括其他拟杆菌属(Bacteroides)物种微生物被分类进更高风险组(例如卵形拟杆菌(Bacteroides ovatus)是风险组 2 的生物学剂)。此外,如在实施例中展示,本发明的微生物尤其对于质粒 DNA 物质、最重要毒力因子和多数关联细胞外酶和病原性因素是阴性的,且不附着于人结肠的上皮细胞。此外,本发明的微生物显示在小鼠中的毒理学研究中无不利效果,和在摄取达 $8,5 \times 10^{11}$ CTCI 的每天剂量经 3 周的人中无任何性质的不利效果。由此,本发明的微生物实现非常高安全性标准,和可无不需要的副作用的风险地被人消费。此外,本发明的微生物优选敏感于各种抗生素,由此可容易和有效消除,如果必要的话。

[0021] 此外,可将本发明的微生物的稳定的和均质的核心-1 表达用作产品质量的标志

物。由于天然的微生物,尤其是在最终产品中不期望的微生物,通常不表达核心-1,核心-1含量可用作本发明的期望的微生物的特异性标志物。尤其是,核心-1含量可用作含有本发明的微生物的微生物培养物的同质性的标志物,和/或可用作培养物中本发明的微生物的量的标志物。而且,相比其他核心-1阳性微生物,具有稳定和均质的、高核心-1表达的本发明的微生物的产生被改善,由于在较短时间内及以更少培养步骤获得足够的量的核心-1阳性微生物。此外,不需要富集核心-1阳性微生物的产生步骤。尤其是,本发明的核心-1阳性微生物的产生可通过无需补给期或使用仅一个补给期而使用简单分批培养实施。

[0022] 因此,在第1方面,本发明提供物种解木聚糖拟杆菌的核心-1阳性微生物或其核心-1阳性裂解物或部分,其中所述微生物或其裂解物或部分被至少一种核心-1特异性抗体识别。

[0023] 在第2方面,本发明提供组合物,其包含根据本发明的第1方面的核心-1阳性微生物或其核心-1阳性裂解物或部分。根据一实施方式,所述组合物是细胞培养物。

[0024] 在第3方面,本发明提供根据本发明的第1方面的微生物或根据本发明的第2方面的组合物用于在医学中使用。

[0025] 根据第4方面,提供药物组合物,其包含根据本发明的第1方面的核心-1阳性微生物或其核心-1阳性裂解物或部分和/或根据本发明的第2方面的组合物。

[0026] 根据第5方面,本发明提供生产核心-1阳性产物的方法,包括以下步骤:

[0027] (a) 提供根据本发明的第1方面的核心-1阳性微生物;

[0028] (b) 任选地处理所述核心-1阳性微生物以获得核心-1阳性裂解物或其部分;

[0029] (c) 在核心-1阳性产物的制备中使用所述核心-1阳性微生物和/或所述核心-1阳性裂解物或其部分。

[0030] 本领域技术人员根据以下说明和随附的权利要求会明晰本发明的其他目的、特征、优势和方面。但是,应明白,以下说明,随附的权利要求和特定实施例指示本申请的优选的实施方式,仅以例证方式给出。本领域技术人员会明晰公开的发明的精神和范围之内内的各种变化和修饰。

[0031] 【发明详述】

[0032] 本发明人发现了物种解木聚糖拟杆菌的核心-1阳性微生物。因此,在第1方面,本发明针对物种解木聚糖拟杆菌的核心-1阳性微生物或其核心-1阳性裂解物或部分,其中所述微生物或其裂解物或部分被至少一种核心-1特异性抗体识别。如上所述,意外地发现存在物种解木聚糖拟杆菌微生物,其表达核心-1抗原,此外这些微生物显示有利的核心-1抗原表达谱,其中它们显示稳定的、高核心-1抗原表达,这是例如由其他拟杆菌属物种的核心-1阳性微生物、诸如例如卵形拟杆菌达不到的。

[0033] 本发明的核心-1阳性微生物携带核心-1抗原。本文所用的术语“核心-1抗原”尤其是指称被核心-1-特异性抗体识别由此特异性地结合的抗原。与核心-1特异性抗体结合可通过使核心-1特异性抗体在适当的结合条件下与核心-1抗原、分别是携带核心-1抗原的微生物和/或携带核心-1抗原的裂解物或其部分接触来测试。在现有技术中知晓适合的核心-1特异性抗体(见例如.WO2008/055703)且本文也进行了描述。优选地,本发明的微生物的核心-1抗原被至少2种核心-1特异性抗体结合,其中每个所述核心-1特异性抗体识别核心-1抗原的不同表位。优选地,核心-1抗原以暴露的形式存在于本发明的

微生物的表面。暴露的尤其是指核心-1 抗原是自周围培养基可接近的,由此可在接触后与核心-1 特异性抗体结合。暴露的核心-1 抗原例如未嵌入其他结构,尤其是其他碳水化合物结构,由此未被其他结构、尤其是其他碳水化合物结构掩蔽。存在于本发明的核心-1 阳性微生物的核心-1 抗原与肿瘤上的蛋白质上发现的天然的核心-1 不必然相同(对于天然的核心-1 的描述,见以上)。对于本发明而言,仅本发明的微生物上的核心-1 抗原与核心-1 特异性抗体结合是决定性的,因为此确保所述核心-1 抗原能模拟核心-1 结构,由此能刺激核心-1 特定免疫应答。优选地,本发明的微生物的核心-1 抗原是碳水化合物结构或包含碳水化合物结构。根据优选的实施方式,由本发明的微生物表达的核心-1 抗原包含核心-1 二糖结构 Gal- β 1, 3-GalNAc。核心-1 抗原通常连接到主链结构,优选糖结构,尤其是寡糖结构或多糖结构。优选地,核心-1 二糖结构 Gal- β 1, 3-GalNAc 和主链结构之间的连接是 α -异头。 β -异头是另一选项。优选地,其是糖苷连接。可例如在核心-1 抗原的 Gal- β 1, 3-GalNAc 结构和主链结构的 GalNAc 分子之间建立(优选 α -异头)糖苷连接。根据优选的实施方式,核心-1 抗原存在于本发明的微生物的荚膜多糖的分支结构之内。

[0034] 根据本发明,物种解木聚糖拟杆菌微生物尤其是指称属于拟杆菌属且优选具有以下特征之一或更多的微生物:

[0035] (a) 在 DNA-DNA 杂交测定中,其与保藏为 DSM18836 或 DSM25004 的解木聚糖拟杆菌显示至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、优选至少 95%、更优选的至少 98% 或至少 99% 的 DNA-DNA 亲缘关系;

[0036] (b) 其与保藏为 DSM18836 或 DSM25004 的解木聚糖拟杆菌显示至少 95%、优选至少 97%、至少 98%、优选至少 99%、更优选至少 99,5% 的 16S rRNA 基因序列相似性水平;

[0037] (c) 其具有以下特征之一或更多:

[0038] (i) 作为保藏为 DSM18836 的解木聚糖拟杆菌,其不能降解淀粉;

[0039] (ii) 其具有使用和 / 或代谢甘露糖醇(尤其是 D-甘露糖醇)、松三糖和 / 或山梨糖醇(尤其是 D-山梨糖醇)和 / 或自甘油产生酸的能力;

[0040] (iii) 其表达谷氨酰谷氨酸芳基酰胺酶活性;

[0041] (iv) 其不能产生吲哚;

[0042] (v) 其不显示过氧化氢酶活性;和 / 或

[0043] (d) 其具有以下特征之一或更多:

[0044] (i) 其是厌氧微生物;

[0045] (ii) 其是非-孢子-形成的;

[0046] (iii) 其是非-能动性的;和 / 或

[0047] (iv) 其是革兰氏阴性的。

[0048] 优选地,符合至少 2 或至少 3、及更优选的全部以上定义的标准(a)~(d)。

[0049] 术语“DNA-DNA 亲缘关系”特别指称如由根据 De Ley 等人(1970) Eur. J. Biochem. 12, 133-142 或 Hu β 等人(1983) Syst. Appl. Microbiol. 4, 184-192 的 DNA-DNA 杂交 / 复性测定测量的 2 种微生物的基因组或整个 DNA 的百分率相似性。尤其是, DNA-DNA 杂交测定优选由 DSMZ (德意志微生物和细胞培养物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) GmbH, Braunschweig, 德国) 鉴定服务实施。在一实施方式中, DNA-DNA 杂交测定如在以下实施例 1.3 中所述实施。

[0050] 术语“16S rRNA 基因序列相似性”尤其是指称第 1 微生物的 16S 核糖体 RNA(rRNA) 基因的核酸序列的区域和第 2 微生物的 16SrRNA 基因的核酸序列的对应区域之间的同一核苷酸的百分率。优选地,所述区域包含至少 100 个连续核苷酸,更优选至少 200 个连续核苷酸,至少 300 个连续核苷酸或至少 400 个连续核苷酸,最优选约 480 个连续核苷酸。在一实施方式中,16S rRNA 基因的核酸序列区侧翼分别有 SEQ ID NO:20 和 21 的序列或它们的互补序列。

[0051] 本文所用的术语“核心 -1 表达水平”尤其是指称存在于本发明的微生物的核心 -1 抗原的量 and 尤其是指称所述微生物表面上核心 -1 抗原的量。核心 -1 抗原表达可例如通过,尤其是使用 ELISA 方法,例如本文在实施例 2 中所述的方法,结合核心 -1 特异性抗体(诸如例如 .Nemod-TF1 和 / 或 Nemod-TF2 (Glycotope GmbH, 柏林);以下描述了其他适合的核心 -1 特异性抗体)及测量结合的抗体的量来测定。核心 -1 特异性抗体结合越多,核心 -1 表达越高。一般而言,核心 -1 抗原表达水平通过使用定义的数的细胞 / 微生物来测定。尤其是,在彼此比较 2 种或更多表达水平的情况中,将近似数的细胞 / 微生物用于测定各表达水平,或用数学方法将表达水平调至相同的数的细胞 / 微生物。此外,当比较不同样品的核心 -1 表达水平时,将这些样品中的微生物优选培养在近似条件和尤其是同一条件下。例如,将本发明的拟杆菌属微生物诸如解木聚糖拟杆菌和尤其是微生物在厌氧条件下于 37°C 过夜培育于 Wilkins-Chalgren (WC) 培养基(Oxoid Ltd., UK) 中。

[0052] 平均核心 -1 抗原表达水平优选通过平铺培养物样品、在温育之后挑选单集落及测定挑选的集落的核心 -1 抗原表达水平来测定。例如,平均核心 -1 抗原表达可通过随机挑选平铺的培养物的 10 个集落,测定各集落的核心 -1 表达水平(见以上)、添加获得的值并将添加的值除以 10 来测定。平均核心 -1 表达水平也可通过无需之前的平铺及单集落挑选而测量一个或更多培养物的一个或更多样品的表达水平来相应地测定。在此情况中,例如,分析包含待分析的微生物的一个培养物的几个样品或几个培养物之每个的一个样品,其中所述样品应含有大致相同的数的细胞 / 微生物,并例如通过使用本文所述的 ELISA 测定法来测定这些样品的核心 -1 抗原表达水平。自获得的个体值测定平均值。核心 -1 抗原表达水平优选通过使用 ELISA 测定法来测定。测定核心 -1 抗原表达的适合的 ELISA 测试在实施例 2 中描述。根据一实施方式,当实施在以下实施例 2 中描述的 ELISA 测定时,在 ELISA 测定中,使用至少一种核心 -1 特异性抗体,本发明的核心 -1 阳性微生物优选达到至少 0.2、至少 0.25、优选至少 0.3 和更优选至少 0.35 的平均吸光度值。具有相应高核心 -1 抗原表达水平的核心 -1 阳性微生物是有利的,因为其能诱导强免疫应答。

[0053] 此外,当在相同的条件下培养时,本发明的微生物优选呈现 Coreotics(DSM25004) 的平均核心 -1 表达的至少 60%、优选至少 70%、更优选至少 80%、至少 85%、优选至少 90%、最优选的至少 95% 的平均表面核心 -1 抗原表达。

[0054] 如上所述,本发明的微生物尤其是特征在于稳定的核心 -1 抗原表达。优选地,达到以下稳定性程度。根据一实施方式,在本发明的微生物的培养物中,至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选至少 95% 的本发明的微生物具有所述细胞培养物中全部本发明的微生物的平均核心 -1 表达水平的至少 50%、优选至少 60%、至少 70%、更优选至少 75% 和最优选至少 80% 的核心 -1 抗原表达水平。优选地,培养物中至少 95% 的本发明的微生物具有培养物中全部本发明的微生物的平均核心 -1 表达水平的

至少 75%、优选至少 80% 的核心 -1 表达水平。本质上,培养物中仅少数微生物不显示显著核心 -1 抗原表达。根据一实施方式,培养物中至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选的至少 95% 的本发明的微生物具有保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 表达水平的至少 50%、优选至少 60%、至少 70%、至少 75%、更优选至少 80% 的核心 -1 抗原表达水平。优选地,培养物中至少 95% 的本发明的微生物具有保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 表达水平的至少 75%、优选至少 80% 的核心 -1 表达水平。核心 -1 表达水平,分别地培养物中微生物的核心 -1 表达的稳定性可(例如)通过平铺培养物的样品、在温育之后挑选单集落、并测定挑选的集落的核心 -1 表达水平来测定。尤其是,如果例如培养物的至少 90% 的微生物应具有特定表达水平,则上述分析的 10 个集落中的至少 9 个应具有特定的表达水平。不同克隆或培养物的核心 -1 表达水平优选在近似条件下、更优选在同一条件下测定。尤其是,不同克隆或培养物优选在例如上述近似或同一条件下培养。

[0055] 此外,本发明的微生物也由核心 -1 抗原的均质表达表征。优选地,达到以下同质性程度。在细胞培养中,优选,所述细胞培养物中至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选至少 95% 的本发明的微生物具有在所述细胞培养物中全部本发明的微生物的平均核心 -1 抗原表达水平的 60% ~ 150%、70% ~ 140%、优选 70% ~ 130%、75% ~ 125%、80% ~ 120%、或 85% ~ 115%、及最优选 90% ~ 110% 范围内的核心 -1 抗原表达水平。尤其是,所述细胞培养物中至少 95% 的本发明的微生物具有在培养物中全部本发明的微生物的平均核心 -1 表达水平的 75% ~ 125%、优选 80% ~ 125% 范围内的核心 -1 表达水平。本质上,培养物中仅少数微生物显示自培养物中平均核心 -1 表达大大改变的核心 -1 抗原表达。根据一实施方式,所述培养物中至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选至少 95% 的本发明的微生物具有在保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 抗原表达的 60% ~ 150%、70% ~ 140%、优选 70% ~ 130%、75% ~ 125%、80% ~ 120%、或 85% ~ 115%、及最优选 90% ~ 110% 范围内的核心 -1 抗原表达水平。优选地,所述细胞培养物中至少 95% 的本发明的微生物具有在保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 表达水平的 75% ~ 125%、优选 80% ~ 125% 范围内的核心 -1 表达水平。关于稳定的核心 -1 抗原表达,优选如上述测定同质性。

[0056] 优选如上述测定核心 -1 抗原表达水平。

[0057] 根据一实施方式,本发明的微生物的核心 -1 抗原包含选自下列的至少一种碳水化合物结构:图 4 的结构 #1、#2、#3、#4 和 #5,其类似结构,和 / 或其重复单元。所述类似结构包含核心 -1 碳水化合物结构 Gal β 1, 3-GalNAc 和优选由图 4 的结构 #1、#2、#3、#4 和 #5 的单糖单元的相同的数和尤其是相同的类型和 / 或定位组成。但是,类似结构可尤其是在单糖单位的连接(α -异头或 β -异头连接,附着位置)和修饰(甲基化,乙酰化)上不同于图 4 的结构 #1、#2、#3、#4 和 #5。除了 Gal β 1, 3-GalNAc 二糖经 α 或 β 连接附着于余下糖结构的第 3 或 4 位的单糖单元和 / 或一个或更多岩藻糖单元可被甲基化(如在图 4 中显示,不必然是第 3 岩藻糖单元)之外,这些类似结构尤其是包括与图 4 的那些相同的结构。优选地,图 4 的结构的类似结构具有以下式:

[0058] $L\text{-Fuc } \alpha 1 \rightarrow (3/4)\text{-L-Fuc } \alpha 1 \rightarrow (3/4)\text{-L-Fuc } \alpha 1 \rightarrow (3/4)\text{-(D-Gal } \beta 1 \rightarrow 3\text{-D-GalNAc } (\alpha / \beta) 1 \rightarrow (3/4)\text{)-D-HexNAc } \beta 1 \rightarrow (3/4)\text{-D-Hex}$

[0059] 其中己糖单元(Hex 和 HexNAc)优选是半乳糖单元(分别 Gal 和 GalNAc),且其中一个或更多岩藻糖单元可被甲基化。

[0060] 根据一实施方式,所述核心-1 抗原包含核心-1 碳水化合物结构 Gal β 1, 3-GalNAc,其优选以 α -异头构型结合于主链结构,优选碳水化合物结构。但是,结构 Gal β 1, 3-GalNAc 可替代性地以 β -异头构型结合于主链结构。优选地,核心-1 碳水化合物结构 Gal β 1, 3-GalNAc 在寡-或多糖的重复单元之内作为分支组分存在。本发明的微生物上核心-1 抗原的此暴露的呈现对诱导的免疫应答具有有利效果。

[0061] 随着本发明的微生物在其细胞表面表达核心-1 抗原,如果所述核心-1 特异性抗体与核心-1 阳性微生物在适当的结合条件下接触,其由此被至少一种核心-1 特异性抗体识别及因此结合。结合可例如通过使用 ELISA 测试来测试。适合的结合条件例如在实施例 2 中描述。

[0062] 核心-1 特异性抗体描述及定义于 W02008/055703 和 W02004/050707,通过引用在本文合并。核心-1 特异性抗体尤其是特异性结合核心-1,其尤其是以 α -异头构型 O-配糖地连接于癌细胞中的蛋白的羟基氨基酸丝氨酸或苏氨酸的二糖 Gal- β 1, 3-GalNAc。术语核心-1 特异性抗体尤其是指称识别仅核心-1,或,次优选,识别核心-1 和核心-2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α) 的抗体。核心-1 特异性抗体优选与所述碳水化合物结构的其他衍生物和异头物不呈现任何交叉反应性(诸如在 W02004/050707 的实施例 7 中在该文描述的结合条件下给出的)。本文所用的核心-1 特异性抗体尤其是特异性结合于 Gal β 1-3GalNAc α 1-聚丙烯酰胺(TF α -PAA, TF α -PAA, TF α -PAA, Core-1-PAA),但不结合于任何列 No. 1 的物质:

[0063] 列 No. 1

[0064] ● GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA (GlcNAc β 1-2' TF)

[0065] ● Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA (H3 型)

[0066] ● GalNAc α 1-3Gal β -PAA (A_{di})

[0067] ● Gal α 1-3-GalNAc β -PAA ($T_{\alpha\beta}$)

[0068] 其可例如自 Lectinity 控股, Inc 获得。或者,全部结构可由本领域技术人员产生,其也可根据碳水化合物结构和必需中间体的合成选择另一适合的缀合用聚丙烯酰胺或另一适合的载体分子以及适合的偶联用缀合方法。

[0069] 优选地,所述核心-1 特异性抗体具有一个或更多以下特征:

[0070] (a)其结合于无唾液酸血型糖蛋白(携带核心-1),但不结合于血型糖蛋白(不携带核心-1),且此结合优选是高碘酸盐敏感的;

[0071] (b)其结合于 TF α -PAA,且少或不结合于 TF β -PAA (Gal β 1-3GalNAc β 1-聚丙烯酰胺)且其结合于无唾液酸血型糖蛋白及不结合于血型糖蛋白,且此结合优选是高碘酸盐敏感的;

[0072] (c)其结合于 TF α -PAA,且少或不结合于 TF β -PAA,且其结合于无唾液酸血型糖蛋白,且不结合于血型糖蛋白,且其结合于 NM-D4 [DSM ACC2605],NM-F9 [DSM ACC2606]中的至少一种人肿瘤细胞系,且其中结合优选是高碘酸盐敏感的;和/或

[0073] (d)其具有一个或更多结合特征(a)~(c),但其不结合于与 PAA 偶联的三糖核心-2,诸如例如 NEMOD-TF1。

[0074] 优选地,符合至少 2 个、更优选至少 3 个、最优选全部以上定义的标准(a)~(d)。

[0075] 所述核心-1 特异性抗体可为来自任何动物或人的全抗体,诸如鼠,大鼠,人,骆驼,不同抗体类诸如但不限于 IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD 的人源化的或嵌合抗体,或任何抗体片段,只要其包含针对核心-1 的结合特异性,诸如 Fab, F(ab)₂, 单链 Fv, 或单结构域抗体。那些抗体也可含有至少一个另外的氨基酸或突变或多肽序列,诸如标签,接头或多聚化结构域和它们也可来源于动物之外的其他来源,如植物和诸如自合成抗体库使用例如噬菌体展示或核糖体展示或由重组构建选择。术语“抗体”也包括抗体,诸如重链抗体,即仅由一个或更多、尤其是 2 个重链组成的抗体,及纳米抗体,即仅由单个单体可变结构域组成的抗体,以及抗体的片段或衍生物。

[0076] “特异性结合”优选是指相比结合另一靶,抗体更强结合于特异性的靶诸如表位(在本文:核心-1)。如果制剂以小于第 2 靶的解离常数的解离常数(K_d)结合第 1 靶,则该制剂相比第 2 靶更强结合于第 1 靶。优选地,制剂特异性结合的靶的解离常数比所述制剂不特异性结合的靶的解离常数低大于 2 倍、优选大于 5 倍、更优选大于 10 倍、甚至更优选大于 20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍或 1000 倍。优选地,靶(在本文是核心-1)的解离常数在 μM 或 nM 范围内。在优选的实施方式中,抗体结合其特异性靶(在本文是核心-1)的解离常数是 $10\ \mu\text{M}$ 或更小,优选 $5\ \mu\text{M}$ 或更小, $2\ \mu\text{M}$ 或更小,或 $1\ \mu\text{M}$ 或更小,更优选 500nM 或更小, 200nM 或更小, 100nM 或更小, 50nM 或更小,或 20nM 或更小,及最优选 10nM 或更小。解离常数优选在标准条件,例如于 20°C 或室温和生理学缓冲剂条件,例如在含有 150mM NaCl 和 10mM Tris/HCl pH7 的盐水或水溶液中测定。

[0077] 适合的核心-1 结合抗体描述于例如 W02004/050707 和 W02008/055703。实例是 HB-T1(IgM)[可自 DakoCytomation GmbH, Hamburg 获得;Giuffre G, Vitarelli E, Tuccari G, Ponz de Leon M, Barresi G: Detection of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Virchows Arch* 429:345-352 (1996)], HH8 (IgM)[Clausen H, Stroud M, Parker J, Springer G, Hakomori S: Monoclonal antibodies directed to the blood group A associated structure, galactosyl-A: specificity and relation to the Thomsen-Friedenreich antigen. *Mol Immunol* 25:199-204 (1988)], Nemod-TF1 [Glycotope GmbH, Berlin; Goletz S, Cao Y, Danielczyk A, Ravn P, Schoeber U, Karsten U. Thomsen-Friedenreich antigen: the “hidden” tumor antigen. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 535:147-62] 及 Nemod-TF2 [Glycotope GmbH, Berlin; Goletz S, Cao Y, Danielczyk A, Ravn P, Schoeber U, Karsten U: Thomsen-Friedenreich antigen: the “hidden” tumor antigen. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 535:147-62]。

[0078] 特别适合于测定微生物是核心-1 阳性和 / 或适合于测定核心-1 抗原表达水平的是使用抗体 mIgM-Karo2、mIgM-Karo4、cIgG-Karo4 和 / 或 cIgM-Karo4, 其公开于 W02004/050707 的第 16 ~ 18 页的序列列表,通过引用在本文合并,或使用具有对应结合特异性和亲和性的抗体。

[0079] 根据一实施方式,本发明的核心-1 阳性微生物或其核心-1 阳性裂解物或部分与包含以下组的互补决定区(CDR)之一的核心-1 特异性抗体结合:

[0080] 组 1:

[0081] 重链 CDR: SEQ ID NO:1 (CDR-H1); SEQ ID NO:2 (CDR-H2); SEQ ID NO:3 (CDR-H3);

以及

[0082] 轻链 CDR :SEQ ID NO:4 (CDR-L1);SEQ ID NO:5 (CDR-L2);SEQ ID NO:6 (CDR-L3)

[0083] 组 2 :

[0084] 重链 CDR :SEQ ID NO:7 (CDR-H1);SEQ ID NO:8 (CDR-H2);SEQ ID NO:9 (CDR-H3);

以及

[0085] 轻链 CDR :SEQ ID NO:10(CDR-L1);SEQ ID NO:11(CDR-L2);SEQ ID NO:12(CDR-L3)

[0086] 以上定义的具有组 1 的 CDR 的抗体优选包含 :包含根据 SEQ IDNO:13 的氨基酸序列的重链和 / 或包含根据 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的轻链,或包含根据 SEQ ID NO:14 或 15 的氨基酸序列的重链和 / 或包含根据 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的轻链。以上定义的具有组 2 的 CDR 的抗体优选包含 :包含根据 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的重链和 / 或包含根据 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的轻链。

[0087] 可商购的、特别适合的核心 -1 特异性抗体是例如 Nemod-TF1 和 Nemod-TF2 (可获自 Glycotope GmbH, 柏林)。这些抗体高度特异于核心 -1。

[0088] 但是,包含 CDR 组 1 的抗体和包含 CDR 组 2 的抗体均特异于核心 -1,这些抗体从 2 个不同角度结合核心 -1,由此结合不同表位。类似地,Nemod-TF1 和 Nemod-TF2 也均特异性结合核心 -1 碳水化合物结构,但结合不同表位。本发明的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分与至少 2 种识别核心 -1 碳水化合物结构上不同表位的不同核心 -1 特异性抗体的结合确保核心 -1 抗原以暴露的、可接近的形式存在于细胞表面。由此,根据一实施方式,本发明的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分与以上定义的具有组 1 的 CDR 的抗体以及以上定义的具有组 2 的 CDR 的抗体结合和 / 或本发明的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分与 Nemod-TF1 和 Nemod-TF2 结合。

[0089] 根据一实施方式,本发明的微生物不被结合 TF β 的抗体 A68-B/A11 (Glycotope, 柏林) 结合。

[0090] 根据一实施方式,至少一种核心 -1 特异性抗体与本发明的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分的结合是高碘酸盐敏感的,其中在高碘酸盐处理之后,核心 -1 特异性抗体的结合减少或甚至缺乏。高碘酸盐处理导致表面碳水化合物部分的部分降解。由此,用以暴露的由此非 - 隐藏的(分别非 - 掩蔽的)形式携带核心 -1 抗原的核心 -1 阳性微生物,高碘酸盐处理毁坏存在于细胞表面的核心 -1 抗原的结构,这导致核心 -1 特异性抗体可在高碘酸盐处理之后不再结合,因为核心 -1 抗原不再存在,分别完整。另一方面,不携带核心 -1 抗原,尤其是核心 -1 碳水化合物抗原,但仅携带核心 -1- 样碳水化合物抗原,其中核心 -1 抗原例如还被糖单元掩蔽,因此,无之前处理而不与核心 -1 特异性抗体结合的微生物,可在高碘酸盐处理之后揭示核心 -1 抗原。至少一种核心 -1 特异性抗体与本发明的微生物的结合优选是高碘酸盐敏感的,即用高碘酸盐处理导致核心 -1 特异性抗体不再结合高碘酸盐处理的微生物或高碘酸盐处理之后显示至少减少的结合。根据一实施方式,本发明的微生物的裂解物或部分具有相同的特征。

[0091] 本发明的高碘酸盐处理尤其是指待处理的物质暴露于以对于糖单元的至少部分氧化有效的浓度含有高碘酸盐的溶液。例如,高碘酸盐处理可通过将待处理的物质在 50mM 乙酸钠缓冲剂溶液中温育 5min,之后在 10mM 高碘酸钠溶液中温育 1h 来实现。在用 50mM 乙酸钠缓冲剂溶液再次洗涤之后,通过在 50mM 硼氢化钠溶液中避光温育 30min 来停止高碘酸

盐的作用。

[0092] 此外,本发明的微生物的表面的核心-1抗原或其裂解物或部分优选是自周围培养基可接近的,尤其是对于周围培养基中的核心-1特异性抗体可接近的,由此暴露于细胞表面。

[0093] 本发明的微生物尤其是优选不存在于其天然的环境中的分离的微生物。尤其是,微生物不存在于人体内,优选其不存在于人或动物体内。根据一实施方式,本发明的微生物已从包含不是核心-1阳性和/或不属于物种解木聚糖拟杆菌的微生物的组合物分离。根据一实施方式,本发明的微生物存在于或得自包含至少70%、至少80%、至少90%、优选至少95%、97%、99%、最优选约100%的本发明的微生物的培养物。

[0094] 本文所用的术语“微生物”可指称仅一个单细胞生物以及多个单细胞生物。例如,术语“物种解木聚糖拟杆菌微生物”可指称物种解木聚糖拟杆菌的一个单解木聚糖拟杆菌细菌细胞以及物种解木聚糖拟杆菌的多个细菌细胞。术语“物种解木聚糖拟杆菌微生物”和“解木聚糖拟杆菌微生物”在本文作为同义词使用。优选地,术语“微生物”指称多个细菌细胞。尤其是,所述术语指称至少 10^3 个细菌细胞,优选至少 10^4 个细菌细胞,至少 10^5 个或至少 10^6 个细菌细胞。

[0095] 本发明的解木聚糖拟杆菌微生物优选能产生短链脂肪酸(SCFA)。作为微生物碳水化合物发酵的终产物产生的短链脂肪酸(SCFA)可具有健康促进性质。作为一例,丙酸被报道具有潜在降低胆甾醇效应和抗-脂质生成效应。其可还刺激饱感,并随乙酸和丁酸提供抗-致癌效应。在优选的实施方式中,本发明的微生物能产生一种或更多选自下列的SCFA:丙酸、乙酸、琥珀酸、甲酸和乳酸。优选地,其能产生丙酸和/或乙酸。在优选的实施方式中,这些SCFA也存在于含有本发明的微生物或其裂解物或部分的本发明的组合物中。在本发明的微生物待以有活力的形式施用于患者的特定实施方式中,所述微生物仍能在施用之后在患者的体内产生所述SCFA。

[0096] 在优选的实施方式中,本发明的解木聚糖拟杆菌微生物能在摄入之后,在尤其是经过人的胃的条件,及优选也尤其是经过人的至少一部分肠的条件存活。尤其是,在人的胃中的条件存活指称包含微生物的组合物中的至少50%、优选至少60%、至少70%、至少80%或至少85%的本发明的解木聚糖拟杆菌微生物在胃液中存活至少180min。此外,在人的肠中的条件存活指称包含微生物的组合物中的至少50%、优选至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的本发明的解木聚糖拟杆菌微生物在肠液中存活至少240min。在优选的实施方式中,本发明的微生物在所述处理之后在它们的表面仍包含至少一种核心-1抗原。更优选地,它们仍在它们的表面包含一定量的核心-1抗原,其为处理开始时它们的表面上的核心-1抗原量的至少50%、优选至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。此外,本发明的微生物能在它们的表面表达核心-1,尤其是如本文所述,在上述处理之后。由此,本发明的微生物的核心-1表达未受人消化道中的条件的影响,且所述微生物仍在它们的表面包含高和稳定的核心-1抗原密度,且如果以有活力的形式使用,仍能在口服施用之后表达核心-1。因此,本发明的微生物尤其对于以口控制剂作为治疗剂使用有利。

[0097] 在优选的实施方式中,本发明的解木聚糖拟杆菌微生物具有以下安全性特征中的一个或更多:

[0098] (i) 其敏感于抗生素甲硝唑、美罗培南和/或克林霉素;

- [0099] (ii) 其不含有质粒 RP4 (DSM3876) 和 / 或质粒 pSC101 (DSM6202);
- [0100] (iii) 其不含有 β -内酰胺酶基因 *cfiA* 和 / 或 *cfxA*;
- [0101] (iv) 其不含有脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)的毒力因子多糖 A 和 / 或脆弱拟杆菌的肠毒素 Bft 和 / 或由基因 *ompW* 编码的“TonB-连接的外膜蛋白”;
- [0102] (v) 其不显示任何细胞外 DNA 酶活性、细胞外软骨素酶活性、细胞外透明质酸酶活性和 / 或细胞外神经氨酸酶活性;和 / 或
- [0103] (vi) 其不附着于人结肠的上皮细胞。
- [0104] 在优选的实施方式中,本发明的解木聚糖拟杆菌微生物是:
- [0105] (a) Coreotics, 根据布达佩斯条约的要求,其于 2011 年 7 月 12 日由 Glycotope GmbH 以保藏号 DSM25004 保藏在德意志微生物和细胞培养物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (DSMZ), **Inhoffenstraße** 7B, 38124 Braunschweig (DE), Robert-**Rössle** -Str. 10, 13125 柏林(DE), (DSM25004),
- [0106] (b) 源于 Coreotics 的微生物, 或
- [0107] (c) Coreotics 同源物。
- [0108] Coreotics (DSM25004) 属于物种解木聚糖拟杆菌。优选地, Coreotics 是严格厌氧、非-孢子-形成、非-能动性和革兰氏阴性的 0.4 ~ 0.5 μ m 宽度和通常 1 ~ 2 μ m 长度的杆-形细菌,其尤其是在 Wilkins-Chalgren 琼脂上生长 18h 之后长出具有环状、乳头状、隆起的及凸表面的直径 2 ~ 3mm 的集落。Coreotics 在其细胞表面呈现高度稳定的、均质、强核心-1 表达。如在实施例 2 中显示,对 Coreotics 的 10 个不同集落测定核心-1 抗原表达值,显示 ELISA 测定中的 OD 值(见实施例 2),在它们的核心-1 抗原表达上变化少。由此,当例如在药物组合物中使用 Coreotics 时,提供恒定、同质和高量的核心-1 抗原。此表达谱是独特的,且也显示 Coreotics 具有超过其他核心-1 抗原表达微生物诸如例如卵形拟杆菌(*Bacteroides ovatus*) AG6DSM18726 (公开于 W02008/055703) 的显著的优势,所述其他核心-1 抗原表达微生物相比 Coreotics 在它们的核心-1 表达上显示例如更高变异性。也涵盖 Coreotics 的核心-1 阳性裂解物和部分。
- [0109] 源于 Coreotics 和 / 或 Coreotics 同源物的微生物优选具有以下特征之一或更多:
- [0110] (a) 其属于以上定义的解木聚糖拟杆菌物种;
- [0111] (b) 在 DNA-DNA 杂交测定中,其与保藏为 DSM25004 的 Coreotics 和 / 或保藏为 DSM18836 的解木聚糖拟杆菌显示至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、或至少 95%、更优选的至少 98% 或至少 99% 的 DNA-DNA 亲缘关系;
- [0112] (c) 其与保藏为 DSM25004 的 Coreotics 和 / 或保藏为 DSM18836 的解木聚糖拟杆菌显示至少 95%、优选至少 97%、至少 98%、或至少 99%、更优选至少 99.5%、及最优选约 100% 的 16S rRNA 基因序列相似性水平;
- [0113] (d) 其显示具有 1 个、2 个、优选 3 个、更优选 4 个、最优选全部以下特征的核心-1 抗原表达:
- [0114] (i) 其具有保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心-1 表达的至少 50%、优选至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、或至少 90%、更优选至少 95% 的平均核心-1 抗原表达;

[0115] (ii)其在实施例 2 中描述的 ELISA 测定中达到至少 0.25、优选至少 0.3 和更优选至少 0.35 的平均吸光度值；

[0116] (iii)其在细胞表面表达选自下列的至少一种碳水化合物结构：图 4 的结构 #1、#2、#3、#4 和 #5，其类似结构，和 / 或其重复单元；

[0117] (iv)在细胞培养物中，至少 50%、优选至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、或至少 95%、更优选的约 100% 的所述微生物具有保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 抗原表达的至少 75%、优选至少 80% 的核心 -1 抗原表达水平；和 / 或

[0118] (v)在细胞培养物中，至少 50%、优选至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、或至少 95%、更优选的约 100% 的所述微生物具有在保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 抗原表达的 70% ~ 150%、75% ~ 125%、优选 80% ~ 115%、最优选 90% ~ 110% 范围内的核心 -1 抗原表达水平；

[0119] (e) 其具有以上公开的安全性特征中的一个或更多；

[0120] (f) 其在人的胃和 / 或肠中的条件生存，且尤其是能在所述条件存活之后表达核心 -1；和 / 或

[0121] (g) 其能产生短链脂肪酸，尤其是丙酸。

[0122] 优选地，符合至少 2 个、更优选至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个、且最优选全部以上定义的标准(a) ~ (f)。

[0123] 在第 2 方面，本发明提供组合物，其包含根据本发明的第 1 方面的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分。所包含的本发明的核心 -1 阳性微生物可相同或不同。关于根据本发明的第 1 方面的物种解木聚糖拟杆菌(*Bacteroides xyloisolvans*)的核心 -1 阳性微生物的特征，参照以上公开。关于核心 -1 阳性裂解物、部分和 / 或其片段也同样适用。

[0124] 优选地，在组合物中 80% 或更多、更优选 85% 或更多、90% 或更多、95% 或更多、98% 或更多或 99% 或更多、及最优选约 100% 的微生物是根据本发明的第 1 方面的物种解木聚糖拟杆菌的核心 -1 阳性微生物。

[0125] 在优选的实施方式中，在本发明的组合物中的核心 -1 阳性微生物特征在于稳定的核心 -1 抗原表达。优选地，获得以下稳定性程度。根据一实施方式，在组合物中至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选至少 95% 的核心 -1 阳性微生物具有所述组合物中全部核心 -1 阳性微生物的平均核心 -1 表达水平的至少 50%、优选至少 60%、至少 70%、更优选的至少 75%、至少 80% 的核心 -1 抗原表达水平。优选地，在组合物中至少 95% 的核心 -1 阳性微生物具有在组合物中全部核心 -1 阳性微生物的平均核心 -1 表达水平的至少 75% 的核心 -1 表达水平。根据一实施方式，至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选的至少 95% 的核心 -1 阳性微生物在组合物中具有保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 表达水平的至少 50%、优选至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80% 的核心 -1 抗原表达水平。优选地，在组合物中至少 95% 的核心 -1 阳性微生物具有保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 表达水平的至少 75% 的核心 -1 表达水平。优选地，所述核心 -1 阳性微生物属于物种解木聚糖拟杆菌。

[0126] 根据优选的实施方式，在本发明的组合物中核心 -1 阳性微生物特征在于核心 -1 抗原的均质表达。优选地，达到以下同质性程度。优选地，在组合物中至少 30%、优选至少

50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选至少 95% 的核心 -1 阳性微生物具有在组合物中全部核心 -1 阳性微生物的平均核心 -1 抗原表达的 60% ~ 150%、70% ~ 140%、优选 70% ~ 130%、75% ~ 125%、80% ~ 120%、或 85% ~ 115%、及最优选 90% ~ 110% 范围内的核心 -1 抗原表达水平。尤其是,在组合物中至少 95% 的核心 -1 阳性微生物具有在组合物中全部核心 -1 阳性微生物的平均核心 -1 表达水平的 75% ~ 125% 范围内的核心 -1 表达水平。根据一实施方式,在组合物中至少 30%、优选至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、优选至少 90% 和更优选至少 95% 的核心 -1 阳性微生物具有在保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 抗原表达的 60% ~ 150%、70% ~ 140%、优选 70% ~ 130%、75% ~ 125%、80% ~ 120%、或 85% ~ 115%、及最优选 90% ~ 110% 范围内的核心 -1 抗原表达水平。尤其是,在组合物中至少 95% 的本发明的核心 -1 阳性微生物具有在保藏为 DSM25004 的 Coreotics 的平均核心 -1 表达水平的 75% ~ 125% 范围内的核心 -1 表达水平。优选地,所述核心 -1 阳性微生物属于物种解木聚糖拟杆菌。

[0127] 以上描述了测定核心 -1 抗原表达水平以及稳定性和同质性的手段。

[0128] 根据一实施方式,根据第 2 方面的组合物是细胞培养物。以上结合本发明的第 1 方面描述了包含本发明的核心 -1 阳性微生物的细胞培养物的优选的值。

[0129] 根据一实施方式,微生物在组合物中以有活力的、非 - 增殖的、非 - 有活力的或裂解的形式存在。根据一实施方式,仅所述微生物的核心 -1 阳性部分用于所述根据本发明的第 2 方面的组合物。

[0130] 优选地,组合物包含至少 10^3 个本发明的微生物,更优选至少 10^4 个,至少 10^5 个或至少 10^6 个本发明的微生物;或此量的本发明的微生物的核心 -1 阳性裂解物或部分。

[0131] 在第 3 方面,本发明提供根据本发明的第 1 方面的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分或者根据本发明的第 2 方面的组合物用于在医学中使用。本发明的核心 -1 阳性微生物、裂解物或其部分和 / 或组合物优选用于诱导和 / 或增强针对核心 -1 的免疫应答。诱导的或增强的免疫应答可为体液和 / 或细胞免疫应答和尤其是涉及针对核心 -1 的抗体滴度的诱导。由此,可治疗和 / 或预防核心 -1 阳性肿瘤、癌、胃肠病症和 / 或核心 -1 阳性疾病。诱导的和 / 或增强的核心 -1 特异性免疫应答发挥抵御例如核心 -1 阳性癌细胞的屏蔽的功能,尤其是用于核心 -1 阳性肿瘤或转移的预防、减小或扩展。根据本发明的第 1 方面的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分或根据本发明的第 2 方面的组合物也可用作针对癌的疫苗。核心 -1 阳性微生物的适合的其他治疗性用途也描述于 W02008/055703,通过引用在本文合并。

[0132] 尤其是,根据本发明的第 1 方面的核心 -1 阳性微生物或其核心 -1 阳性裂解物或部分或根据本发明的第 2 方面的组合物可施用于患癌或处于发展癌的风险的患者。根据一实施方式,本发明的核心 -1 阳性微生物在其表面表达核心 -1 抗原、或其核心 -1 阳性裂解物或部分能在患者中引发针对核心 -1 抗原的特异性免疫应答。免疫应答可为体液和 / 或细胞免疫应答,且优选包括细胞免疫应答,尤其是适应性免疫系统的应答,优选包括免疫系统的记忆细胞的形成。

[0133] 癌优选是包含在它们的表面携带核心 -1 碳水化合物抗原的肿瘤细胞的癌(核心 -1 阳性癌)。优选地,癌是结肠癌或结肠癌的转移。

[0134] 本文所用的术语“患者”尤其是指称人,非人灵长类动物或别的动物,尤其是哺乳

动物诸如牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物诸如小鼠和大鼠。优选地，患者是人。

[0135] 术语“癌”根据本发明尤其是包含白血病、精原细胞瘤、黑色素瘤、畸胎瘤、淋巴瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾上腺癌、甲状腺癌、血癌、皮肤癌、脑癌、子宫颈癌、肠癌、肝癌、结肠癌、胃癌、肠癌、头颈癌、胃肠癌、淋巴结癌、食管癌、结直肠癌、胰腺癌、耳、鼻和喉(ENT)癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌和肺癌以及其转移。其例是结肠癌、结直肠癌和上述癌类型或肿瘤的转移。本发明的术语癌也包含癌转移。术语“肿瘤”尤其是指由错调节的细胞增殖形成的一组细胞或组织。肿瘤可显示结构组织和与正常组织的功能协调的部分或完全缺乏，及通常形成可为良性或恶性的组织的离生团块。术语“转移”尤其是指癌细胞自其原位点扩展到身体的另一部分。转移的形成是非常复杂的过程和正常涉及癌细胞自原发性肿瘤脱离，进入身体循环及在身体别处的正常组织内定居生长。当肿瘤细胞转移时，新肿瘤被称为继发性或转移性肿瘤，且其细胞正常模拟原肿瘤中的那些。这是指，例如，如果乳腺癌转移到肺，继发性肿瘤由异常乳腺细胞组成，而非由异常肺细胞组成。肺中的肿瘤然后被称为转移性乳腺癌，而非肺癌。

[0136] 根据本发明术语“核心-1 阳性疾病”尤其是指相关于特征在于核心-1 肿瘤抗原的发生的真核生物细胞、肿瘤细胞或癌或其他生物材料的任何疾病(见以上)。

[0137] 本发明也在第 4 方面提供药物组合物，其包含

[0138] (i) 根据本发明的第 1 方面的核心-1 阳性微生物或其核心-1 阳性裂解物或部分(以上描述了根据本发明的核心-1 阳性微生物的细节，参照以上公开)

[0139] 和 / 或

[0140] (ii) 根据本发明的第 2 方面的组合物(以上描述了相应组合物的细节；参照以上公开)。

[0141] 术语“药物组合物”特别指称适宜于施用于人或动物的组合物，即，含有药学可接受的组分的组合物。优选地，药物组合物作为活性化合物包含根据第 1 方面的核心-1 阳性微生物或其核心-1 阳性裂解物或部分和 / 或与载体，稀释剂或药学赋形剂诸如缓冲剂，防腐剂和张度修饰物一起包含根据第 2 方面的组合物。以上描述了适合的药物使用；参照以上公开。药物组合物可经口施用，但也可由任何其他适合的施用途径施用。

[0142] 本发明的药物组合物优选包含对于患者导致约 10^4 ~ 约 10^{13} 个微生物的每天剂量的量或浓度的核心-1 阳性微生物。优选地，每天剂量不超过 2.8×10^{12} 个微生物，优选 2.3×10^{12} 个微生物，和 / 或至少是 10^7 个微生物，优选至少 10^9 个微生物。尤其是，每天剂量在约 10^{10} ~ 约 10^{12} 个微生物范围内。药物组合物优选处于单个单元剂量形式，各包含上述核心-1 阳性微生物的每天剂量。对于包含核心-1 阳性微生物的核心-1 阳性裂解物或部分的药物组合物，在组合物中核心-1 阳性裂解物或部分的量或浓度等同于在上述组合物中核心-1 阳性微生物的量或浓度。尤其是，在组合物中核心-1 阳性裂解物或部分从上述核心-1 阳性微生物的量或浓度得到。

[0143] 本发明的核心-1 阳性微生物和在本发明的组合物中的核心-1 阳性微生物可以有活力的、非-增殖、非-有活力的或裂解的形式使用。在特定实施方式中，核心-1 阳性微生物以有活力的形式使用。尤其是，当以有活力的形式使用时，微生物仍能在患者身体中产生短链脂肪酸诸如丙酸，由此提供进一步上述健康益处。优选地，微生物以非-病原性形式、非-增殖、非-有活力的或裂解的形式使用。此外，也可使用所述微生物的核心-1 阳性部

分。根据本发明,微生物的核心-1 阳性裂解物或部分包含至少一种核心-1 抗原,其优选是上述核心-1 特异性抗体可接近的和 / 或是如上述高碘酸盐敏感的。

[0144] 本发明的核心-1 阳性微生物和药物组合物的一个特定优势是它们在人或动物身体中诱导针对核心-1 的抗体滴度的能力。此抗-核心-1 抗体滴度尤其是提供针对核心-1 阳性疾病,尤其是包含核心-1 阳性肿瘤或癌细胞的癌的一般性保护。由此,在优选的实施方式中,本发明的核心-1 阳性微生物或其核心-1 阳性裂解物或片段或部分或本发明的药物组合物当施用时能在人或动物身体中诱导针对核心-1 抗原的抗体滴度。诱导的抗体滴度优选至少可由常见的检测方法检测,和优选足以减小获取核心-1 阳性疾病,尤其是包含核心-1 阳性肿瘤或癌细胞的癌的风险。

[0145] 根据第 5 方面,本发明提供生产核心-1 阳性产品的方法,其包括以下步骤:

[0146] (a) 提供根据本发明的第 1 方面的核心-1 阳性微生物;

[0147] (b) 任选地处理所述核心-1 阳性微生物以获得核心-1 阳性裂解物或其部分;

[0148] (c) 在核心-1 阳性产物的制备中使用所述核心-1 阳性微生物和 / 或所述核心-1 阳性裂解物或其部分。

[0149] 所述产品可为任何产品及包括但不限于药物产品。关于相应产品的生产和本发明的核心-1 阳性微生物的细节,参照以上公开。根据本发明的第 1 方面的核心-1 阳性微生物可以有活力的或非-有活力的形式使用。生产的产品也可进一步加工。

[0150] 本文所用的术语“核心-1-阳性微生物部分”和类似术语尤其是指所述微生物的更小部分的制备或纯化,诸如例如本发明的所述核心-1 阳性微生物的核心-1 阳性组分的细胞壁制备,包膜制备,裂解物,脂多糖制备,胶囊制备,或胶囊多糖制备。所述部分应包含所述核心-1 阳性微生物的至少一种核心-1 阳性组分,以便能引发期望的免疫应答。它们可从自至少一种本发明的核心-1 阳性微生物的制备或纯化得到。所述制备和纯化可由本领域技术人员知道的方法获得,诸如单或连续细胞分部分离,苯酚水提取,醚提取,酶消化诸如用溶菌酶消化或层析方法。此外,术语核心-1 阳性微生物的部分也包含也在本发明的核心-1 阳性微生物上发现的人工产生的核心-1 阳性组分。

[0151] 根据一实施方式,根据第 5 方面的方法产生的核心-1 阳性产品是抗原呈递细胞,优选树突细胞。在此情况中,根据本发明的第 5 方面的方法的步骤(c)优选包括用本发明的核心-1 阳性微生物和 / 或其核心-1 阳性裂解物或部分装载所述抗原呈递细胞。优选地,抗原呈递细胞是人的抗原呈递细胞。优选地,抗原呈递细胞是自白血病细胞系 MUTZ-3(DSM ACC295)获得的树突细胞或源于 MUTZ-3 的细胞,诸如 NEMOD-DC(见 W02003/023023)。

[0152] 在 W02008/055703 中,描述了当被有功能的抗原呈递细胞、尤其是树突细胞体外呈递时,核心-1 阳性微生物和其裂解物和 / 或部分能以核心-1 特异性方式活化人 T-细胞,由此开启了新治疗性机会(见 W02008/055703, 尤其是第 77 页, 第 26 行~第 85 页, 第 20 行, 通过引用在本文合并)。

[0153] 因此,根据本发明的第 6 方面提供生产针对核心-1 的有功能的抗原呈递细胞、优选树突细胞的方法,其包括以下步骤:

[0154] (a) 提供根据本发明的第 1 方面的核心-1 阳性微生物(也见权利要求 1~5)

[0155] (b) 任选地处理所述核心-1 阳性微生物以获得核心-1 阳性裂解物或其部分;

[0156] (c) 使适合的量的至少一种抗原呈递细胞、优选树突细胞与适合的量的下列物质

接触：

[0157] (i) 所述核心 -1 阳性微生物和 / 或

[0158] (ii) 所述核心 -1 阳性裂解物或其部分，

[0159] 由此获得针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞，优选树突细胞。

[0160] 步骤(c) 中的接触在适合的情况下发生适合的时间，以产生至少一种针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞，优选树突细胞。优选地，在步骤(c) 中与核心 -1 阳性化合物接触的抗原呈递细胞是未成熟的抗原呈递细胞诸如未成熟的树突细胞，其然后成熟而获得针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞。所述接触步骤(c) 的细节也描述于 W02008/055703；参照相应公开。

[0161] 已获得该针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞，可通过使用上述核心 -1 特异性抗体测试。针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞装载使用的本发明的核心 -1 阳性微生物(或其核心 -1 阳性裂解物或部分，见以上)的核心 -1 抗原。由此，核心 -1 抗原可由分别装载的抗原呈递细胞上的核心 -1 特异性抗体检测。获得的针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞(其也可作为抗原呈递细胞，优选树突细胞的混合物)可活化 T- 细胞，尤其是原发性人 T- 细胞(其特异性针对核心 -1)，由此可刺激针对核心 -1 的特异性细胞免疫应答。T- 细胞活化可例如由如描述于 W02008/055703 的细胞免疫应答测试测试。

[0162] 根据第 7 方面，提供产生针对核心 -1 的活化的 T 细胞、T 细胞、T 细胞克隆或 T 细胞系的方法，所述方法包括：

[0163] (a) 使用根据本发明的第 6 方面的方法获得至少一种针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞，优选树突细胞；

[0164] (b) 使适合的量的针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞与适合的量的至少一种 T 细胞或 T 细胞的混合物或包含至少一种 T 细胞的细胞混合物接触；以及

[0165] (c) 与上述装载的针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞一起培养所述 T 细胞或 T 细胞混合物，以活化和 / 或引发针对核心 -1 的 T 细胞。

[0166] 也可结合本发明使用的对应产生方法的细节也描述于 W02008/055703；参照相应公开。

[0167] 也提供的是由根据本发明的第 6 或第 7 方面的方法产生的针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞，优选树突细胞，针对核心 -1 的活化的 T 细胞，包含针对核心 -1 的 T 细胞的细胞组合物，针对核心 -1 的 T 细胞系，或针对核心 -1 的 T 细胞克隆，其诱导针对核心 -1 阳性细胞和 / 或疾病的体液和 / 或细胞免疫应答。相应细胞适宜于生产用于预防或治疗核心 -1 阳性疾病，诸如尤其是核心 -1 阳性肿瘤的药物。

[0168] 本发明也属于根据本发明的第 1 方面的核心 -1 阳性微生物和 / 或其核心 -1 阳性裂解物或部分体内或体外用于诱导或增强核心 -1 特异性免疫应答和 / 或用于产生针对核心 -1 的有功能的抗原呈递细胞，优选树突细胞，和 / 或活化的 T 细胞、T 细胞系或 T 细胞克隆或抗体的用途。

[0169] 表述“包含”，如本文所用，除其字面含义之外，也包括及特别指称表述“基本上由... 组成”和“由... 组成”。由此，表述“包含”指称实施方式，其中“包含”特别列出的要素的主题不包含其他要素，以及实施方式，其中“包含”特别列出的要素的主题可和 / 或的确包括其他要素。同样，表述“具有”应被理解为表述“包含”，也包括及特别指称表述“基

本上由... 组成”和“由... 组成”。

【附图说明】

[0170] 图 1 显示根据本发明的微生物 *Coreotics* 和不同参照微生物的限制性分析。结果支持 *Coreotics* 属于物种解木聚糖拟杆菌。

[0171] 图 2 显示使用核心 -1 特异性抗体的 *Coreotics* (DSM25004) 和 AG6 (DSM18726) 的抗原 ELISA 结合研究。将不同 *Coreotics* 或 AG6 集落平铺于微量滴定孔及与核心 -1 特异性抗体结合。结合通过使用过氧化物酶 - 偶联的第二抗体可视化。ELISA 测定显示, *Coreotics* 具有核心 -1 抗原的稳定的和均质的表达, 而 AG6 具有欠稳定的和因此欠同质的核心 -1 表达。AG6 的平均核心 -1 抗原表达也少于 *Coreotics* 的平均核心 -1 抗原表达。

[0172] 图 3 显示使用 ELISA 测定的抗 - 核心 -1 抗体与 *Coreotics* (DSM25004) 的结合。在前的高碘酸盐处理消除了抗体结合。对于核心 -1 阳性对照 (PK) 获得相同的结果。参照株解木聚糖拟杆菌 DSM18836 未显示任何抗 - 核心 -1 抗体结合。

[0173] 图 4 显示携带可存在于 *Coreotics* 微生物的细胞表面的核心 -1- 样二糖基序的不同碳水化合物结构。

[0174] 图 5 显示质粒和 β -内酰胺酶基因 *cfiA*, *cfxA* 和 *cepA* 的确定。(A) 质粒: 装载 20 μ g 的各分离的质粒 DNA。泳道: 1, 1kb DNA 阶梯; 2, 大肠杆菌 DSM3876; 3, 大肠杆菌 DSM6202; 4, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004。(B) *cfiA* 基因: 泳道: 1, 100bp DNA 阶梯; 2, 脆弱拟杆菌 TAL3636; 3, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004; 4, 阴性对照。(C) *cfxA* 基因: 泳道: 1 和 6, 1kb DNA 阶梯; 2, 卵形拟杆菌 MN7; 3, 卵形拟杆菌 MN23; 4, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004; 5, 阴性对照。(D) *cepA* 基因: 泳道: 1 和 6, 100bp DNA 阶梯; 2, 脆弱拟杆菌 DSM1396; 3, 卵形拟杆菌 MN23; 4, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004; 泳道 5, 阴性对照。

[0175] 图 6 显示毒力编码基因 *bft*、*wcfR*、*wcfS* 和 *ompW* 的确定。(A) *bft* 基因: 泳道: 1, 100bp DNA 阶梯; 2, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004; 3, 脆弱拟杆菌 ATCC43858; 4, 阴性对照。(B) *wcfR* 基因: 泳道: 1, 1kb DNA 阶梯; 2, 脆弱拟杆菌 DSM1396; 3, 脆弱拟杆菌 ATCC43858; 4, 脆弱拟杆菌 DSM2151; 5, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004; 6, 脆弱拟杆菌 TAL3636; 7, 阴性对照。(C) *wcfS* 基因: 泳道: Lanes: 1, 1kb DNA 阶梯; 2, 脆弱拟杆菌 DSM1396; 3, 脆弱拟杆菌 ATCC43858; 4, 脆弱拟杆菌 DSM2151; 5, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004; 6, 脆弱拟杆菌 TAL3636; 7, 阴性对照。(D) *ompW* 基因: 泳道: 1, 100bp DNA 阶梯; 2, 解木聚糖拟杆菌 DSM25004; 3, 粪拟杆菌 (*Bacteroides caccae*) DSM19024; 4, 阴性对照。

[0176] 图 7 显示株 DSM25004 与 Caco-2 细胞的结合的分子分析。(A) GAPDH 和蔗糖异麦芽糖酶。泳道: 1, 100bp DNA 阶梯 (Bioline); 2, 第 1 天; 3, 第 3 天; 4, 第 6 天; 5, 第 8 天; 6, 第 10 天; 7, 第 13 天; 8, 第 14 天; 9, 阴性对照。(B) 株 DSM25004 和脆弱拟杆菌 DSM1396 的检测。泳道: 1, 100bp DNA 阶梯; 2, 株 DSM25004, 在第 1 洗涤步骤之后; 3, 株 DSM25004, 在第 6 洗涤步骤之后; 4, 株 DSM25004+Caco-2 细胞; 5, 脆弱拟杆菌 DSM1396, 在第 1 洗涤步骤之后; 6, 脆弱拟杆菌 DSM1396, 在第 6 洗涤步骤之后; 7, 脆弱拟杆菌 DSM1396+Caco-2 细胞; 8, Caco-2 细胞; 9, 株 DSM25004; 10, 脆弱拟杆菌 DSM1396; 11, 阴性对照。(C) 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 的检测。泳道: 1, 嗜酸乳杆菌 DSM9126, 在第 1 洗涤步骤之后; 2, 嗜酸乳杆菌 DSM9126, 在第 6 洗涤步骤之后; 3, 嗜酸乳杆菌 DSM9126+Caco-2 细胞; 4,

Caco-2 细胞 ;5,嗜酸乳杆菌 DSM9126 ;6,阴性对照 ;7,100bp DNA 阶梯。

[0177] 图 8 显示在 90 天口腔毒性研究期间小鼠的体重和食物消费。(A)雄性 Cr1 :NMRI 小鼠体重。(B)雌性 Cr1 :NMRI 小鼠体重。(C)雄性 Cr1 :NMRI 小鼠的食品消费。(D)雌性 Cr1 :NMRI 小鼠的食品消费。平均值 / 组 :组 1 (0),组 2 (1×10^6),组 3 (1×10^7),组 4 (1×10^8) CFU 的解木聚糖拟杆菌 DSM25004 和组 5 (1×10^{11}) 巴氏消毒的解木聚糖拟杆菌 DSM25004/动物 / 天。由 $P \leq 0.01$ 指示统计学意义。根据 Dunnett 氏测试的值。

[0178] 图 9 显示由多重物种特定 PCR 的注射的溶液中混杂的检测。泳道 :1,阳性对照(解木聚糖拟杆菌 DSM25004);2,溶液 2 (1×10^9 脆弱拟杆菌 RMA6791/ml);3,溶液 3 (1×10^9 解木聚糖拟杆菌 DSM25004/ml);4,溶液 4 (1.5×10^8 脆弱拟杆菌 RMA6791/ml);5,溶液 5 (1.5×10^8 解木聚糖拟杆菌 DSM25004/ml);6,溶液 6 (5×10^6 脆弱拟杆菌 RMA6791/ml);7,溶液 7 (5×10^6 解木聚糖拟杆菌 DSM25004/ml);8,阳性对照(脆弱拟杆菌 RMA6791);9,溶液 1(对照组)。混杂对照 :泳道 10,90% 脆弱拟杆菌 RMA6791 和 10% 解木聚糖拟杆菌 DSM25004 的混合物 ;泳道 11,10% 脆弱拟杆菌 RMA6791 和 90% 解木聚糖拟杆菌) DSM25004 的混合物。泳道 12,1kb DNA 阶梯(Fermentas)。

[0179] 图 10 显示自穿刺的脓肿分离的 DNA 的物种特异性 PCR。(A)注射解木聚糖拟杆菌 DSM25004 的动物脓肿中解木聚糖拟杆菌的检测。泳道 :1,100bp DNA 阶梯(Fermentas);2-3,组 3 (4.6×10^9 解木聚糖拟杆菌 DSM25004/kg bw);4-5,组 5 (6.9×10^8 解木聚糖拟杆菌 DSM25004/kg bw);6-7,组 7 (2.3×10^7 解木聚糖拟杆菌 DSM25004/kg bw);8,阳性对照(解木聚糖拟杆菌 DSM25004);9,阴性对照(水)。(B)注射脆弱拟杆菌 RMA6791 的动物脓肿中脆弱拟杆菌的检测。泳道 :1,100bp DNA 阶梯(Fermentas);2-3,组 2 (4.6×10^9 脆弱拟杆菌 RMA6791/kg bw);4-5,组 4 (6.9×10^8 脆弱拟杆菌 RMA6791/kg bw);6-7,组 6 (2.3×10^7 脆弱拟杆菌 RMA6791/kgbw);8,阳性对照(脆弱拟杆菌 RMA6791);9,阴性对照(水);10,1kb DNA 阶梯(fermentas)。

[0180] 【实施例】

[0181] 【实施例 1 :核心 -1 阳性微生物是物种解木聚糖拟杆菌的不同株】

[0182] 【1.1. 自人粪便样品的细菌的选择性富集和分离】

[0183] 为了自人粪便样品富集核心 -1 阳性细菌,根据生产商的建议制备用特异于核心 -1 的单克隆抗体包被的磁珠(Dynal Biotech ASA,Oslo,Norway)。将来自在最后 3 个月期间未摄取抗生素的健康人受试者的粪便样品用于研究。将粪便样品在还原的 PBS(PBS_{red} : 8.5g NaCl,0.3g KH_2PO_4 ,0.6g Na_2HPO_4 ,0.1g 蛋白胨和 0.25g 半胱氨酸 · HCl/L,pH7.0)中稀释,均质化及离心($300 \times g$,1min,21°C)。将上清液洗涤一次($8000 \times g$,5min,21°C)及重悬浮于 PBS_{red} 。将 $20 \mu\text{l}$ 体积的细菌悬浮液添加到 $180 \mu\text{l}$ 的 PBS_{red} 和 $5 \mu\text{l}$ 的抗体包被的磁珠,并将混合物于室温温育 30min。随后将珠悬浮于 1ml PBS_{red} ,并洗涤 3 次。将等份($100 \mu\text{l}$)扩展在选择性和非选择性平铺的琼脂上。集落悬浮于 PBS_{red} 至 McFarland 浊度标准 3 至 5 (Smibert 和 Krieg1994),并将 $20 \mu\text{l}$ 等份的此悬浮液再次添加到抗 - 核心 -1- 抗体 - 包被的珠。自琼脂板随机挑选集落,并在非 - 选择性培养基上再划线几次。将集落在适当的肉汤培养基中在适当的条件下培养。将培养部分冷冻及部分固定。将固定的培养物用于检定抗体 NM-TF1,NM-TF2 和 B/A11-68 与各株的结合。仅株 Coreotics 表现类似于免疫 - 可接近的人核心 -1 结构的抗体结合表征,NM-TF1 和 NM-TF2 的强和高碘酸盐敏感结合和无 B/A11-68

处的吸光度测量各株的 DNA 以及等同浓度的两株的 DNA 的混合物(样品中的最终 DNA 浓度基本上相同和优选位于约 20 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 之间,尤其是约 30 $\mu\text{g/ml}$)的复性。通过快速冷却溶液至低于 DNA 的溶解温度的温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 来起始复性,并实施测量 30min。由各单细菌株的 DNA 和两株的 DNA 的混合物的复性曲线的不同斜率计算 DNA 亲缘关系。尤其是,复性速度 v' 测定为吸光度 /min 减小 ($\Delta A/t$),而结合程度(D),即 DNA 亲缘关系,根据由 De Ley 等人给出的式计算(见以上):

$$[0194] \quad D = \frac{4v'_m - (v'_A + v'_B)}{2\sqrt{v'_A v'_B}} 100$$

[0195] 其中 D 是结合程度(%), v'_m 是混合物的复性速度, v'_A 是第 1 株的 DNA 的复性速度, 及 v'_B 是第 2 株的 DNA 的复性速度。

[0196] 全基因组杂交的结果显示于表 1:

[0197] 表 1

[0198]

参照株	与 Coreotics 的 DNA 亲缘关系
解木聚糖拟杆菌 (<i>Bacteroides xylanisolvens</i>) DSM 18836	98.65%
卵形拟杆菌 (<i>Bacteroides ovatus</i>) DSM 1896	26.9%
多形拟杆菌 (<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>) DSM 2079	28.65%
<i>Finegoldii</i> 拟杆菌 (<i>Bacteroides finegoldii</i>) DSM 17565	25.2%

[0199] 【1.4. 分类学分析 3:微生物和生物化学表征】

[0200] 株 DSM25004 可被鉴定为是严格厌氧、非-孢子-形成、非-能动性和革兰氏阴性的。短杆或杆-形细胞是 0.4 ~ 0.5 μm 宽,且长度有变化;通常跨 1 ~ 2 μm 。在 Wilkins ~ Chalgren 琼脂(Oxoid)上生长 18h 之后的集落的直径为 2 ~ 3mm,具有环状、乳状、隆起的及凸表面。初始生物化学分析显示与卵形拟杆菌物种(Databank BioMérieux)91%相似性。与卵形拟杆菌相反,株 DSM23964 不能利用淀粉产生吡啶,且其未显示过氧化氢酶活性。通过使用快速 ID32A 和 API20A 生物化学试剂盒(Biomérieux, Marcy l'Etoile, 法国)根据生产商的使用说明实施分离的细菌和它们的组成性酶和底物利用特征的生物化学鉴定。株解木聚糖拟杆菌 Coreotics,解木聚糖拟杆菌 DSM18836, Finegoldii 拟杆菌 DSM17565, 卵形拟杆菌 DSM1896, 多形拟杆菌 DSM2079 和脆弱拟杆菌 DSM1396 的化学分类学分析的结果总结于表 2。株解木聚糖拟杆菌 Coreotics 和解木聚糖拟杆菌 DSM18836 具有相同的生物化学特征。解木聚糖拟杆菌 Coreotics 可通过利用甘油、D-山梨糖醇、D-甘露糖醇和 D-松三糖从卵形拟杆菌 DSM1896 区分开来。此外,解木聚糖拟杆菌 Coreotics 显示谷氨酰谷氨酸芳基酰胺酶活性,与卵形拟杆菌 DSM1896 的结果相反。在其他位点上,卵形拟杆菌 DSM1896 能表达亮氨酸芳基酰胺酶活性,然而解木聚糖拟杆菌 Coreotics 未能如此。因此,解木聚糖拟杆菌

Coreotics 可从 Finegoldii 拟杆菌 DSM17565, 多形拟杆菌 DSM2079 和脆弱拟杆菌 DSM1396 区分开来(表 2)。与解木聚糖拟杆菌 Coreotics 和解木聚糖拟杆菌 DSM18836 的结果相反, 多形拟杆菌 DSM2079 酶活性测试中显示大量的阳性结果。

[0201] 表 2

[0202]

生物化学特征性	1	2	3	4	5	6
吲哚形成	-	-	-	+	+	-
酶促活性						
N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶	+	+	+	-	+	+
谷氨酸脱羧酶	+	+	+	-	+	+
α -岩藻糖苷酶	+	+	-	+	+	+
吲哚产生	-	-	-	+	+	+
精氨酸芳基酰胺酶	-	-	-	-	+	-
苯丙氨酸芳基酰胺酶	-	-	-	-	+	+
亮氨酸芳基酰胺酶	-	-	-	+	+	+
酪氨酸芳基酰胺酶	-	-	-	-	+	+
甘氨酸芳基酰胺酶	-	-	-	-	+	-
组氨酸芳基酰胺酶	-	-	-	-	+	+
谷氨酰谷氨酸芳基酰胺酶	+	+	+	-	+	+
丝氨酸芳基酰胺酶	-	-	-	-	+	-
酸产生自						
D-甘露糖醇	+	+	-	-	-	-
水扬苷	+	+	+	+	-	-
马栗树皮苷水解	+	+	+	+	+	-
甘油	+	+	-	-	-	-
D-松三糖	+	+	-	-	-	-
D-山梨糖醇	+	+	-	-	+	-
D-海藻糖	+	+	-	+	+	-
过氧化氢酶活性	-	-	+	+	+	+

[0203] 株:1:解木聚糖拟杆菌 Coreotics;2:解木聚糖拟杆菌 DSM18836;3:Finegoldii 拟杆菌 DSM17565;4:卵形拟杆菌 DSM1896;5:多形拟杆菌 DSM2079;6:脆弱拟杆菌 DSM1396。特征评分为:'+' :阳性反应;'-' :阴性反应。

[0204] 【1.5. 随机扩增的多态 DNA (RAPD) 图案和基因型分析】

[0205] 为了测试是否 *Coreotics* 是物种解木聚糖拟杆菌的不同株, 实施 RAPD 测定。将 4 种不同随机引物用于独立反应(在各反应中使用仅一种引物)用于模板 DNA 的扩增。PCR 反应混合物(50 μ l) 含有: Taq 缓冲剂(16mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67mM Tris HCl), 2, 5mM MgCl_2 , 0. 25mM 各 dNTP, 1 μ M 引物, 2. 5U Taq DNA 聚合酶和 2 μ l 的模板 DNA。PCR 程序是: 95 $^\circ\text{C}$ 经 5min, 95 $^\circ\text{C}$ 经 1min, 50 $^\circ\text{C}$ 经 1min 和 72 $^\circ\text{C}$ 经 1min 的 35 个循环, 及最终 72 $^\circ\text{C}$ 经 6min。在 1% 琼脂糖凝胶上分析全部引物的条带图案。由此, 为各模板 DNA, 获得 4 个不同条带图案(每种引物一个)。

[0206] 使核心 -1- 阳性 *Coreotics* 经历 RAPD 分析, 并将结果与物种解木聚糖拟杆菌(DSM18836), *Finegoldii* 拟杆菌(DSM17565) 和卵形拟杆菌(DSM1896) 的参照细菌的结果进行比较(见图 1, 对于一个例示引物)。结果展示, *Coreotics* 是与已知的解木聚糖拟杆菌株 DSM18836 不相同的不同株。

[0207] 【1.6. 总结】

[0208] 16S rRNA 序列相似性、全基因组 DNA-DNA 杂交和生物化学表征的结果展示, 分离的微生物 *Coreotics* 属于物种解木聚糖拟杆菌。此外, RAPD 分析显示, *Coreotics* 是与已知的解木聚糖拟杆菌株不同的特定和不同的解木聚糖拟杆菌株。

[0209] 【实施例 2: 核心 -1 抗原稳定的和均质的表达】**[0210] 【2.1. 相比 AG6 的 *Coreotics* 的核心 -1 表达】**

[0211] 将固定的细菌细胞用 PBS 调至 1×10^7 个细胞/ml 的细胞浓度。将 50 μ l 以一式两份应用于 PolySorp 微孔板(Nunc, Wiesbaden, 德国) 的孔及于 37 $^\circ\text{C}$ 过夜包被。在全部进一步温育步骤之前, 将板用 200 μ l 含吐温 20 的 Tris- 缓冲的盐水(8. 78g NaCl, 6. 06g Tris/L, 及 0, 05% [v/v] 吐温 20, pH7. 6) 洗涤 3 次。于室温实施进一步方法步骤。通过用 200 μ l 的 PBS 中 2% 牛血清白蛋白(BSA) 温育孔 20min 来阻断残留的结合位点。将特异于核心 -1 的单克隆抗体(Nemod-TF1) 作为第一抗体应用于 50 μ l 含有 1% BSA 的 PBS 中, 并于室温温育 1h。在用第二抗体温育之前, 将板用 200 μ l 含吐温 20 的 Tris- 缓冲的盐水洗涤 3 次。将第二抗体(过氧化物酶-兔-抗-小鼠 IgG/IgM P0260, DAKO, Hamburg, 德国) 在含 1% BSA 的 PBS 中 1/5000 稀释, 及每孔应用 50 μ l, 并于室温温育 1h。将板用 200 μ l 含吐温 20 的 Tris- 缓冲的盐水再次洗涤 3 次, 并通过向各孔添加 100 μ l 的显影溶液(在含 1% [v/v] DMSO 的 50 μ M 乙酸钠缓冲剂中 1mg/ml 四甲基联苯胺) 来避光显影 5 ~ 20min。随后, 加入 50 μ l 的 2. 5M H_2SO_4 停止反应, 并在 ELISA 读取器(Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA, USA) 中测量吸光度($E_{450/630}$)。也将 W02008/055703 中公开的 AG6 DSM18726 的固定的培养物用 PBS 调至 1×10^7 个细胞/ml 的细胞浓度而作为阳性对照。或者, 对于核心 -1 抗原, 将无唾液酸血型糖蛋白和血型糖蛋白(100ng/孔 [in] PBS, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 德国) 分别作为阳性和阴性对照。在至少 2 个分开的时机以一式两份实施测定。

[0212] 10 个不同 *Coreotics* (DSM25004) 和 10 个不同 AG6 (DSM18726, 公开于 W02008/055703) 集落的 ELISA 测定揭示, *Coreotics* (解木聚糖拟杆菌呈现在它们的细胞表面非常稳定的和均质的高核心 -1 表达, 而 AG6 (卵形拟杆菌) 显示更高变异性及更低平均核心 -1 表达(见图 2)。

[0213] 【2.2. 相比解木聚糖拟杆菌参照株的 *Coreotics* 的核心 -1 表达】

[0214] 通过在 ELISA 实验中核心 -1 特异性抗体 Nemo-TF1 (Glycotope GmbH, 德国) 的结合来分析核心 -1 表达。可对阳性对照(PK)和株 Coreotics 鉴定强 TF1 结合。此揭示在它们的表面核心 -1 结构的存在。用高碘酸盐预处理完全消除抗 - 核心 -1 抗体的结合。参照株解木聚糖拟杆菌 DSM18836 未呈现核心 -1 特异性抗体的任何结合。结果显示于图 3。

[0215] 【实施例 3:模拟的胃液和热处理对核心 -1 表达的效应】

[0216] 为了模拟经过消化道,使 Coreotics 细菌经历模拟的胃和肠液的作用。胃液中 Coreotics 株的存活率是在 180min 之后 90% 以上,而在暴露于肠液 240min 之后是 96% 以上。有趣的是,无一处理对株 Coreotics 表面上的核心 -1 抗原暴露具有任何效应。巴氏消毒也未影响核心 -1 抗原密度,当于室温,4 或 -20℃ 存储时,保持稳定超过 12 个月。

[0217] 【实施例 4:短链脂肪酸的产生】

[0218] 基于 HPLC 分析,展示解木聚糖拟杆菌株 CTC1 能产生短链脂肪酸(SCFA)如丙酸和乙酸以及其他物质如琥珀酸、甲酸和乳酸。依赖于生长条件和培养基组合物,上清液中测量的代谢产物的浓度分别变动于:琥珀酸是 2.5mM ~ 44.7mM,丙酸是 5.8mM ~ 29.3mM,乙酸是 3.4mM ~ 38.3mM,甲酸是 0mM ~ 45mM 和乳酸是 0.88mM ~ 8.6mM。

[0219] 【实施例 5:毒力因子的分析】

[0220] 【5.1. Coreotics 的抗生素抗性】

[0221] 几种抗生素的最小抑制性浓度(MIC)的分析揭示解木聚糖拟杆菌 Coreotics 株抵抗 β -内酰胺药物如青霉素 G、氨苄西林和美洛西林。但是,其敏感于通常的抗生素剂如甲硝唑、美罗培南和克林霉素,而 β -内酰胺酶抑制物的添加恢复 β -内酰胺药物的灵敏度。

[0222] 【5.2. Coreotics 中质粒的检测】

[0223] 为了研究 Coreotics 株中质粒的潜在存在,分别从 Coreotics 及从两个对照株,即含有低拷贝质粒 RP4 (60kb)和 pSC101 (9.4kb)的大肠杆菌 DSM3876 及大肠杆菌(E. coli) DSM6202,分离质粒 DNA 物质。在 260nm 处的质粒 DNA 浓度的测量揭示 Coreotics 的质粒制备物中不存在 DNA。在琼脂糖凝胶上运行质粒制备物确认两种低拷贝质粒自对照株的分离和自解木聚糖拟杆菌 Coreotics 的可检测的质粒物质的缺失(图 5A)。

[0224] 【5.3. Coreotics 的基因组中 β -内酰胺酶基因 cfxA、cepA 和 cfiA 的鉴定】

[0225] 为了表征 Coreotics 株的 β -内酰胺酶活性,对于在拟杆菌属已知的各 β -内酰胺酶基因 cfiA、cfxA 和 cepA 运行特定 PCR 测定。结果指示株 Coreotics 唯独含有 cepA 基因(图 5B ~ D)。

[0226] 【5.4. 拟杆菌属中编码毒力因子的基因】

[0227] 脆弱拟杆菌多糖 A (PS A) 和脆弱拟杆菌肠毒素 Bft 是拟杆菌属的最重要的毒力因子。为了研究肠毒素 Bft 的存在,实施对 bft 基因的特异性 PCR。在 PS A 的情况中,为位于 PS A 的生物合成基因的上游的高度保守的开放阅读框 upaY、upaZ,及为最重要基因:编码氨基转移酶的 wcfR 和编码糖基转移酶的 wcfS 设计特定 PCR。与脆弱拟杆菌 ATCC43858 相反,Coreotics 株不具有 bft 基因。基因 wcfR、wcfS 及两个开放阅读框 upaY 和 upaZ 也不可检测到(图 6A ~ C)。

[0228] 此外,分析编码可涉及 IBD 发展的毒力因子“Ton B-连接的外膜蛋白”的基因 ompW 的存在。在 Coreotics 株中不可检测到 ompW 编码基因(图 6D)。

[0229] 【5.5. Coreotics 的细胞外酶和病原性因子的确定】

[0230] 除了神经氨酸酶之外,描述几株拟杆菌属产生不需要的外酶,包括胶原酶、DNA 酶和可参与感染过程的一些蛋白酶。利用 PCR (神经氨酸酶) 或酶促测定分析最关联的外酶活性。Coreotics 株显示无 DNA 酶、软骨素酶、透明质酸酶和神经氨酸酶活性,及仅弱 β -溶血和胶原酶活性。

[0231] 【5.6. Coreotics 与 Caco-2 细胞的粘接】

[0232] 培养 caco-2 细胞及诱导分化。结果展示, GAPDH 的表达水平在分化期间恒定,然而蔗糖酶异麦芽糖酶水平在分化期间增加。显微镜观察确认, Caco-2 细胞在 14 天之后良好分化为单层。利用对随后洗涤步骤的上清液,及最终对刮下的 Caco-2 细胞实施物种-特异性 PCR 来分析在厌氧条件下 3 小时的共温浴之后细菌与分化的 Caco-2 细胞的结合。与阳性对照相反, Coreotics 细胞,其当然可在第 1 洗涤步骤的上清液中检测到,在随后上清液中或刮下的 Caco-2 细胞上不再可检测到,指示 Coreotics 细胞不附着于人结肠的上皮细胞(图 7)。

[0233] 【实施例 6:毒理学研究】

[0234] 【6.1. 活力测定】

[0235] 在几个独立实验中分析在冷冻干燥和再水化之后解木聚糖拟杆菌 Coreotics (DSM25004)的活力。最低鉴定的存活率指示 4×10^9 CFU/g 有活力的细菌的最小浓度。此浓度被接受为“可利用的浓度”。

[0236] 【6.2. 体外诱变性研究(Ames-测试)】

[0237] 实施此测试以检测 Coreotics 或它们的发酵产物的任何毒性或诱变效应。在 2 个独立实验中采用 5 剂量的 0.28 ~ 28.5mg 细菌/板的有活力的细菌或一个剂量的 59mg 巴氏消毒的细菌/板,各实施及不实施代谢活化。相比对照计数,对任何浓度的有和无代谢活化的 5 个测试株,且也分别以两种测试形式,板并合和预温育模式,未观察到细胞毒性迹象和回复体集落数增加。

[0238] 【6.3. 致畸变活性的体外评定(体外染色体畸变测定)】

[0239] 研究中采用的 Coreotics 的最高浓度是 2.8mg 有活力的细菌/ml 培养基和 5.9mg 巴氏消毒的细菌/ml 培养基,其被认为是最大合理的浓度。在代谢活化缺失下,在 4 小时和 24 小时暴露之后,阴性对照中观察到的染色体畸变的平均发生率(排除间隔)分别是 1.0% 或 0.5%。有活力的或巴氏消毒的 Coreotics 浓度在 4 小时和 24 小时暴露后无一产生异常细胞的任何统计学地显著增加(0.5% ~ 2.5%)。相反,在 4 小时和 24 小时暴露之后,异常细胞中阳性对照呈现分别 10.5% 和 17.5% 增加。在代谢活化存在下,在 4 小时暴露之后,阴性对照中观察到的染色体畸变的平均发生率(排除间隔)是 0.5%。再次,有活力的或巴氏消毒的 Coreotics 浓度无一产生异常细胞的任何统计学地显著增加,在 2 个独立实验中,分别产生 0.0% 和 1.5%。在 4 小时之后在 2 个实验中,阳性对照呈现分别 13.5% 和 16.5% 异常细胞。对于测试的全部 Coreotics 浓度,在有或无代谢活化的实验中未见到物品-相关的多倍性或核内再复制。此外,确认在先结果,在有及无代谢活化的实验中,以 Coreotics 的任何测试的浓度未见到细胞毒性迹象。

[0240] 【6.4. 小鼠中 90 天口服毒性研究】

[0241] 此研究的目的是测定 Coreotics 的口腔摄入是否会具有任何毒理学效果。将 Cr1 : NMRI 小鼠(50 只雄性和 50 只雌性)分配到 5 个测试组(10 只雄性和 10 只雌性/组),并经

口经强饲施用每天剂量的细菌 90 天。我们测试了 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ CFU 或 1×10^{11} 巴氏消毒的 Coreotics/ 动物 / 天的效应。结果显示于图 8。如在对照组中看到的一样,在有用活力的或巴氏消毒的 Coreotics 治疗的任何组中注意到在 90 天测试期间无死亡率。处理或未处理的小鼠无一被揭示它们的行为或外观上有任何变化。此外,功能观察未揭示任何测试物品 - 相关的影响:能动性、粪便一致性、及水消费、以及体重增加和食品消费呈现贯穿实验时期处理组和对照组之间无显著差异。血液检查显示在有活力的及巴氏消毒的 Coreotics 的任何测试的剂量水平无测试物品 - 相关的影响,并观察到对照组和处理的小鼠组之间无统计学地显著差异。临床生物化学值和眼科检查揭示,对有活力的及巴氏消毒的 Coreotics 二者,在任何组,以任何剂量水平无测试物品 - 相关的变化。而且,宏观死后分析揭示无测试物品相关的损伤或异常。最终,全部器官的扩展的及细节化的组织病理学分析揭示处理组和对照组之间无差异。

[0242] 【6.5. Coreotics 的体内致病性(脓肿形成)】

[0243] 体内腹膜内脓肿形成模型是用来研究机会性细菌菌株的病理学性质的良好接受的模型(McConville 等人, 1981; Onderdonk 等人, 1984; Thadepalli 等人, 2001)。使用脆弱拟杆菌 RMA6971 或解木聚糖拟杆菌 DSM25004 (Coreotics) 的新鲜过夜细菌培养物。将含有 $2.3 \times 10^7 \sim 4.6 \times 10^9$ CFU/kg 体重, 50% (w/w) 高压灭菌的大鼠粪便, 及 10% (w/v) 硫酸钡的混合物腹膜内注射给小鼠。在注射之后对余下物质回顾性地测定各物品的活力、细菌浓度和纯度。为了鉴定脆弱拟杆菌及 / 或解木聚糖拟杆菌的存在, 实施由 Liu 等人(2003) 描述的多重物种特异性 PCR。此多重 PCR 也允许鉴定在混杂情况中两个物种, 其中一个物种会被强烈忽视。我们确认各单测试物品含有想要的细菌株, 且未与其他物种混杂(见图 9)。通过将各测试物品平铺在适当的琼脂上, 并在耗氧条件下温育来分析进一步潜在混杂。在 48 小时的温育之后无法检测到单集落。在 2 个分开的实验中, 注射高剂量的 Coreotics 的小鼠未如阴性对照(硫酸钡 + 无菌大鼠粪便) 诱导更多或更大的脓肿的发展。相反, 高浓度的脆弱拟杆菌 RMA6971 诱导了更多和更大的脓肿的形成。在 7 天之后, 在无菌条件下取 2 个脓肿 / 动物, 将内容物刺破及交付于 DNA 提取。我们利用物种 - 特异性 PCR 评价了脓肿中 Coreotics 或脆弱拟杆菌 RMA6971 的存在(图 10)。可在自分别注射 $2.3 \times 10^7 \sim 4.6 \times 10^9$ 脆弱拟杆菌 /kg 体重的组 2、4 和 6 分离的全部脓肿中检测到脆弱拟杆菌 RMA6971。相反, 独立于注射的细菌浓度, 在任何分析的脓肿中不能检测到 Coreotics。注射 Coreotics 的小鼠的这些结果明显指示, 此株不诱导脓肿的形成, 且其实际上在腹膜内注射之后由免疫系统快速和完全根除。

[0244] 【实施例 7: 小鼠模型】

[0245] 小鼠血清可含有与碳水化合物结构交叉 - 反应的抗体。免疫后, 在任何核心 -1 载体分子或细胞上观察到的增加的结合也可涉及该交叉 - 反应抗体, 导致假阳性信号。为了特异性分析核心 -1- 特异性抗体滴度, 在各时间点的核心 -1 特异性抗体水平表示为以下比例: “Core-1_r = 载体 - 核心 -1 上的信号 / 载体 - ref 上的信号”。参照结构可为不存在于 Coreotics 表面的任何碳水化合物结构, 优选二糖。Coreotics 施用后所述比例的增加指示核心 -1 特异性抗体滴度的增加。

[0246] 给 7 ~ 9 周龄的雄性 C3H 小鼠每天经口施用 5×10^9 Coreotics, 经 4 周。作为阴性对照, 4 只小鼠用 NaCl 处理和 4 只小鼠用核心 -1- 阴性株卵形拟杆菌 DSM1896 处理。在起

始免疫之前及在第 21 天和第 28 天取血清。将血清 1/100 稀释和对糖缀合物 PAA- 核心 -1 和 PAA-ref (**GalB1**-3GlcNAc) 如下分析核心 -1 特异性 IgM 抗体中它们的含量。

[0247] 将糖缀合物聚丙烯酰胺 - **GalB1**-3GalNAc(PAA- 核心 -1) 和聚丙烯酰胺 - **GalB1**-3GlcNAc (PAA-ref) 调节至在包被缓冲液 (4.2g NaHCO₃, 1.78g Na₂CO₃, 用 Millipore-H₂O 补至 1L, pH9.6) 中 5 μg/ml 的浓度。将 50 μl 的各糖缀合物以一式两份应用于 MaxiSorp 微孔板 (Nunc, Wiesbaden, 德国) 的孔, 于 4°C 包被过夜。在全部进一步温育步骤之前, 将板用含吐温 20 的 200 μl Tris- 缓冲的盐水 (8.78g NaCl, 6.06g Tris/L, 及 0.05% [v/v] 吐温 20, pH7.6) 洗涤 3 次。残留的结合位点通过将孔与 200 μl 的含 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 温育 20min 来阻断。

[0248] 将动物血清用含有 1%BSA 的 PBS 适当稀释 (1/50 ~ 1/200), 并将 50 μl 以一式两份应用于用 PAA- 核心 -1 和 PAA-ref 包被的孔, 并于室温温育 1h。将板用 200 μl 含吐温 20 的 Tris- 缓冲的盐水洗涤 3 次, 之后与 50 μl 的第二抗体 (过氧化物酶 - 山羊 - 抗 - 小鼠 IgM115-035-075, Jackson ImmunoResearch) 在含 1%BSA 的 PBS 中的 1/5000 稀释物温育 1h。将板用 200 μl 含吐温 20 的 Tris- 缓冲的盐水再次洗涤 3 次, 并通过向各孔添加 100 μl 的显影溶液 (含 1% [v/v] DMSO 的 50 μM 乙酸钠缓冲剂中的 1mg/ml 四甲基联苯胺) 避光显影 5 ~ 20min。随后, 加入 50 μl 的 2.5M H₂SO₄ 停止反应, 并测量吸光度 (E_{450/630})。将核心 -1 特异性抗体的水平表示为以下比例: “PAA- 核心 -1 上的 E_{450/630}/PAA-ref 上的 E_{450/630}”。比较在免疫之前及之后的所述比例能够特异性分析核心 -1 特异性抗体滴度的变化。

[0249] 结果, 可显示小鼠中核心 -1 特异性抗体滴度被解木聚糖拟杆菌株 CTC1 所诱导。由此, 表明本发明的微生物能够诱导针对所述核心 -1 抗原的免疫应答。

[0001]

序列表

<110> 葛莱高托普有限公司

<120> 携带肿瘤抗原的微生物

<130> 53 810 K

<150> EP 11178322.1

<151> 2011-08-22

<150> US 61/526,054

<151> 2011-08-22

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR H1

<400> 1

Asn Tyr Trp Leu Gly
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR H2

<400> 2

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR H3

<400> 3

Tyr Asp Ala Ala Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR L1

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

[0002]

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR L2

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR L3

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR H1

<400> 7

Asn Tyr Trp Leu Gly
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR H2

<400> 8

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR H3

<400> 9

Tyr Asp Asn His Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

[0003]

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR L1

 <400> 10
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR L2

 <400> 11
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR L3

 <400> 12
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5

 <210> 13
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> heavy chain mIgM

 <400> 13
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

 Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

[0004]

Ala Tyr Tyr Asp Ala Ala Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe Pro
115 120 125

Leu Val Ser Cys Glu Ser Pro Leu Ser Asp Lys Asn Leu Val Ala Met
130 135 140

Gly Cys Leu Ala Arg Asp Phe Leu Pro Ser Thr Ile Ser Phe Thr Trp
145 150 155 160

Asn Tyr Gln Asn Asn Thr Glu Val Ile Gln Gly Ile Arg Thr Phe Pro
165 170 175

Thr Leu Arg Thr Gly Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu
180 185 190

Ser Pro Lys Ser Ile Leu Glu Gly Ser Asp Glu Tyr Leu Val Cys Lys
195 200 205

Ile His Tyr Gly Gly Lys Asn Arg Asp Leu His Val Pro Ile Pro Ala
210 215 220

Val Ala Glu Met Asn Pro Asn Val Asn Val Phe Val Pro Pro Arg Asp
225 230 235 240

Gly Phe Ser Gly Pro Ala Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Glu Ala
245 250 255

Thr Asn Phe Thr Pro Lys Pro Ile Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly
260 265 270

Lys Leu Val Glu Ser Gly Phe Thr Thr Asp Pro Val Thr Ile Glu Asn
275 280 285

Lys Gly Ser Thr Pro Gln Thr Tyr Lys Val Ile Ser Thr Leu Thr Ile
290 295 300

Ser Glu Ile Asp Trp Leu Asn Leu Asn Val Tyr Thr Cys Arg Val Asp
305 310 315 320

His Arg Gly Leu Thr Phe Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Cys Ala Ala
325 330 335

Ser Pro Ser Thr Asp Ile Leu Thr Phe Thr Ile Pro Pro Ser Phe Ala
340 345 350

Asp Ile Phe Leu Ser Lys Ser Ala Asn Leu Thr Cys Leu Val Ser Asn
355 360 365

Leu Ala Thr Tyr Glu Thr Leu Asn Ile Ser Trp Ala Ser Gln Ser Gly
370 375 380

Glu Pro Leu Glu Thr Lys Ile Lys Ile Met Glu Ser His Pro Asn Gly
385 390 395 400

[0005]

Thr Phe Ser Ala Lys Gly Val Ala Ser Val Cys Val Glu Asp Trp Asn
 405 410 415

Asn Arg Lys Glu Phe Val Cys Thr Val Thr His Arg Asp Leu Pro Ser
 420 425 430

Pro Gln Lys Lys Phe Ile Ser Lys Pro Asn Glu Val His Lys His Pro
 435 440 445

Pro Ala Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg
 450 455 460

Glu Ser Ala Thr Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala Asp
 465 470 475 480

Ile Ser Val Gln Trp Leu Gln Arg Gly Gln Leu Leu Pro Gln Glu Lys
 485 490 495

Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gly Ala Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510

Phe Thr His Ser Ile Leu Thr Val Thr Glu Glu Glu Trp Asn Ser Gly
 515 520 525

Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Gly His Glu Ala Leu Pro His Leu Val
 530 535 540

Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn
 545 550 555 560

Val Ser Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly Thr Cys Tyr
 565 570

<210> 14
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain cIgG

<400> 14

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

[0006]

Ala Tyr Tyr Asp Ala Ala Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

[0007]

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 15
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain cIgM

<400> 15

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Tyr Tyr Asp Ala Ala Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro
 115 120 125

Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val
 130 135 140

Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp
 145 150 155 160

Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser
 165 170 175

Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro
 180 185 190

Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val
 195 200 205

[0008]

Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile
 210 215 220

Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly
 225 230 235 240

Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly
 245 250 255

Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln
 260 265 270

Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu
 275 280 285

Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu
 290 295 300

Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg
 305 310 315 320

Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln
 325 330 335

Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile
 340 345 350

Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr
 355 360 365

Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala
 370 375 380

Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe
 385 390 395 400

Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly
 405 410 415

Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu
 420 425 430

Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp
 435 440 445

Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser
 450 455 460

Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe
 465 470 475 480

Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val
 485 490 495

Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala
 500 505 510

[0009]

His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr
 515 520 525

Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu
 530 535 540

Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser
 545 550 555 560

Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
 565 570

<210> 16
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> light chain mIgM

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

[0010]

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 17
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> light chain eIgG/M

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 18
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> Artificial

[0011]

<220>
 <223> heavy chain mIgM
 <400> 18
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90
 Ala Arg Tyr Asp Asn His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe Pro Leu Val
 115 120 125
 Ser Cys Glu Ser Pro Leu Ser Asp Lys Asn Leu Val Ala Met Gly Cys
 130 135 140
 Leu Ala Arg Asp Phe Leu Pro Ser Thr Ile Ser Phe Thr Trp Asn Tyr
 145 150 155 160
 Gln Asn Asn Thr Glu Val Ile Gln Gly Ile Arg Thr Phe Pro Thr Leu
 165 170 175
 Arg Thr Gly Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Ser Pro
 180 185 190
 Lys Ser Ile Leu Glu Gly Ser Asp Glu Tyr Leu Val Cys Lys Ile His
 195 200 205
 Tyr Gly Gly Lys Asn Arg Asp Leu His Val Pro Ile Pro Ala Val Ala
 210 215 220
 Glu Met Asn Pro Asn Val Asn Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe
 225 230 235 240
 Ser Gly Pro Ala Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Glu Ala Thr Asn
 245 250 255
 Phe Thr Pro Lys Pro Ile Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Lys Leu
 260 265 270
 Val Glu Ser Gly Phe Thr Thr Asp Pro Val Thr Ile Glu Asn Lys Gly
 275 280 285

[0012]

Ser Thr Pro Gln Thr Tyr Lys Val Ile Ser Thr Leu Thr Ile Ser Glu
 290 295 300
 Ile Asp Trp Leu Asn Leu Asn Val Tyr Thr Cys Arg Val Asp His Arg
 305 310 315 320
 Gly Leu Thr Phe Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Cys Ala Ala Ser Pro
 325 330 335
 Ser Thr Asp Ile Leu Thr Phe Thr Ile Pro Pro Ser Phe Ala Asp Ile
 340 345 350
 Phe Leu Ser Lys Ser Ala Asn Leu Thr Cys Leu Val Ser Asn Leu Ala
 355 360 365
 Thr Tyr Glu Thr Leu Asn Ile Ser Trp Ala Ser Gln Ser Gly Glu Pro
 370 375 380
 Leu Glu Thr Lys Ile Lys Ile Met Glu Ser His Pro Asn Gly Thr Phe
 385 390 395 400
 Ser Ala Lys Gly Val Ala Ser Val Cys Val Glu Asp Trp Asn Asn Arg
 405 410 415
 Lys Glu Phe Val Cys Thr Val Thr His Arg Asp Leu Pro Ser Pro Gln
 420 425 430
 Lys Lys Phe Ile Ser Lys Pro Asn Glu Val His Lys His Pro Pro Ala
 435 440 445
 Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser
 450 455 460
 Ala Thr Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala Asp Ile Ser
 465 470 475 480
 Val Gln Trp Leu Gln Arg Gly Gln Leu Leu Pro Gln Glu Lys Tyr Val
 485 490 495
 Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gly Ala Pro Gly Phe Tyr Phe Thr
 500 505 510
 His Ser Ile Leu Thr Val Thr Glu Glu Glu Trp Asn Ser Gly Glu Thr
 515 520 525
 Tyr Thr Cys Val Val Gly His Glu Ala Leu Pro His Leu Val Thr Glu
 530 535 540
 Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser
 545 550 555 560
 Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly Thr Cys Tyr
 565 570

<210> 19
 <211> 219

[0013]

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> light chain mlgM

 <400> 19
 Asp Ile Val Ile Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 16S rRNA primer

 <400> 20
 agagtttgat cmtgctcag

20

[0014]

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 16S rRNA primer

<400> 21
gwattaccgc ggckgctg

18

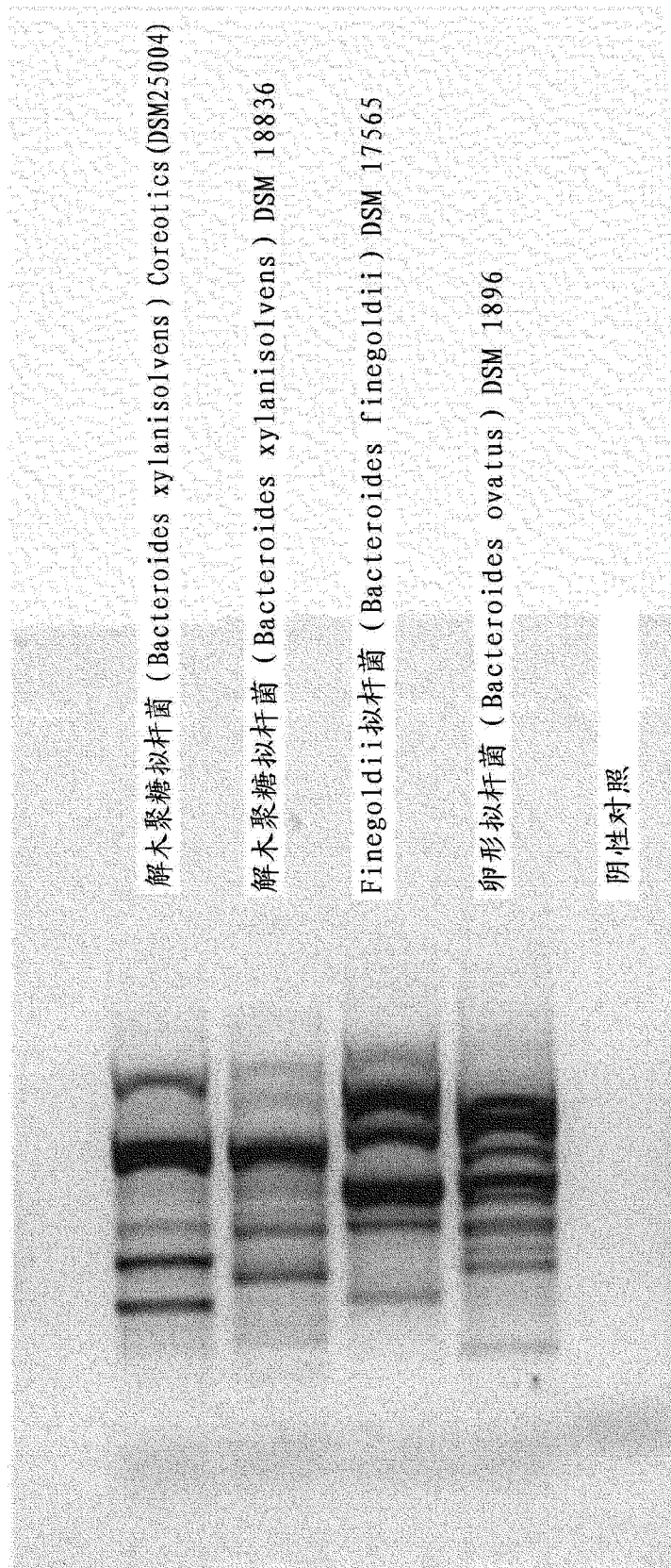


图 1

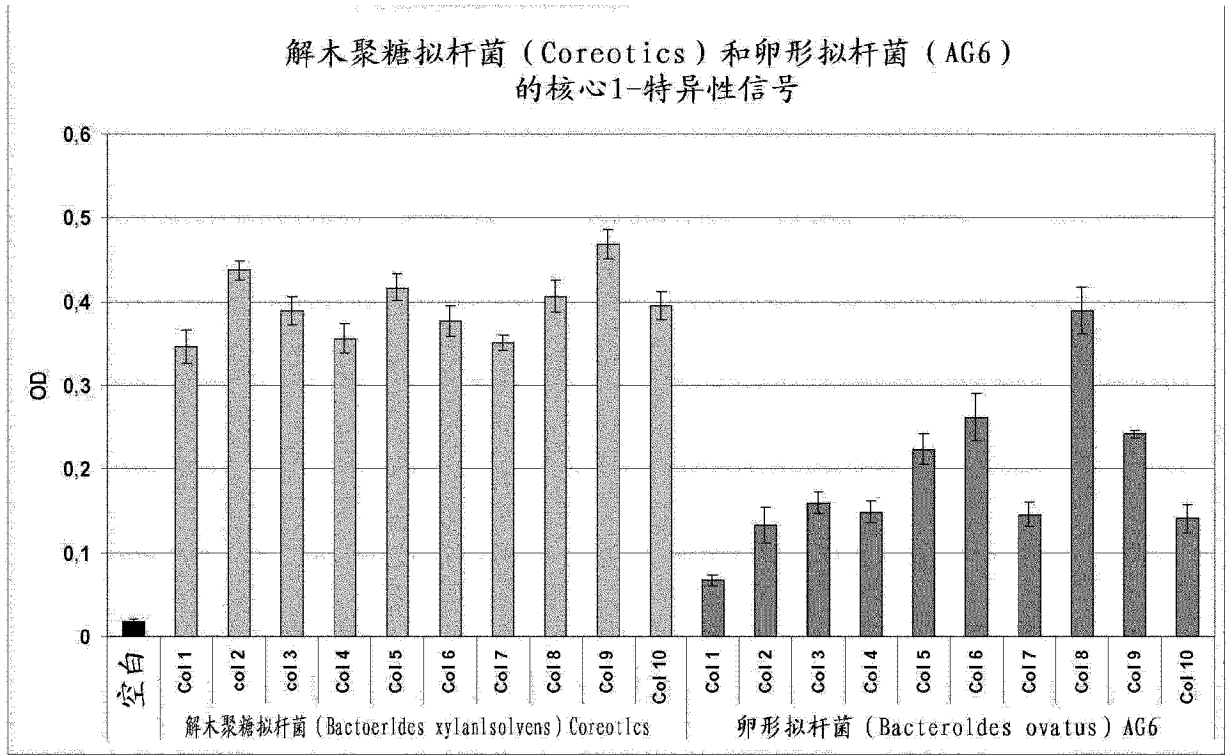


图 2

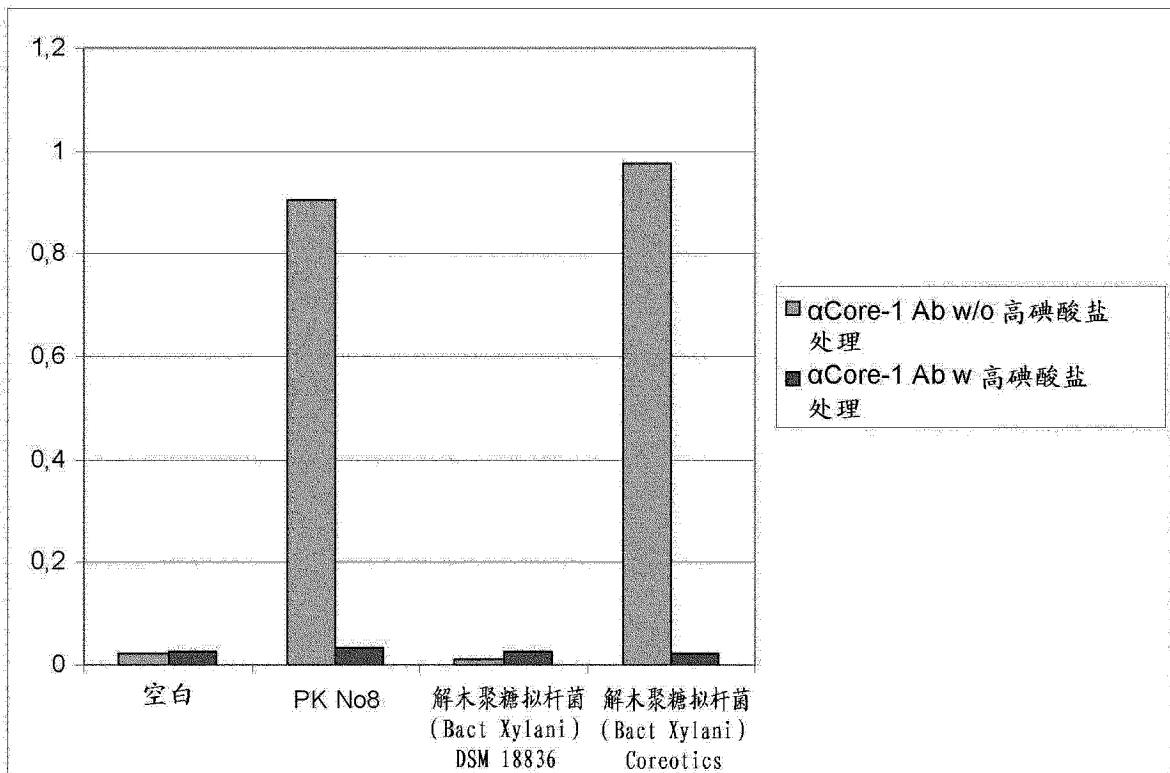
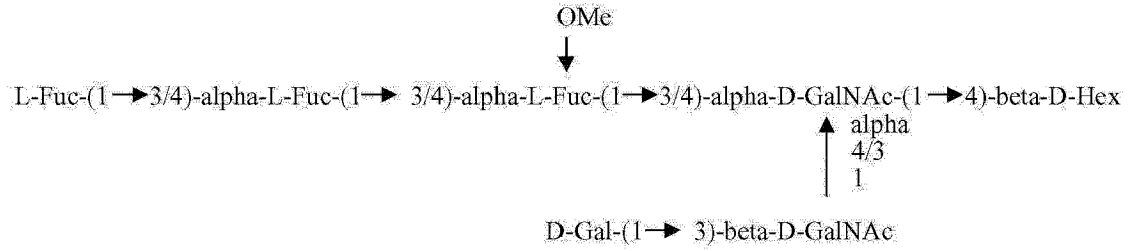
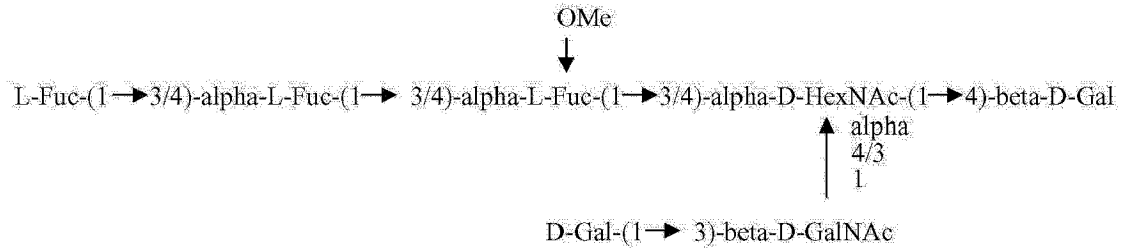


图 3

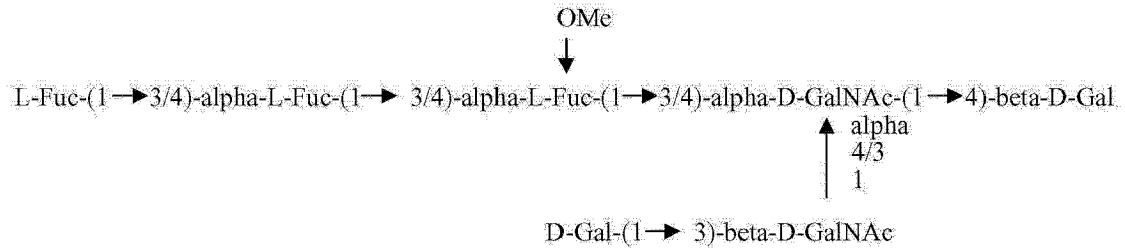
结构 #1



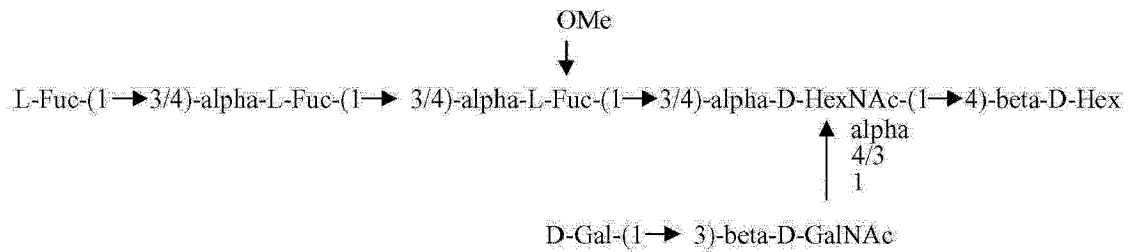
结构 #2



结构 #3



结构 #4



结构 #5

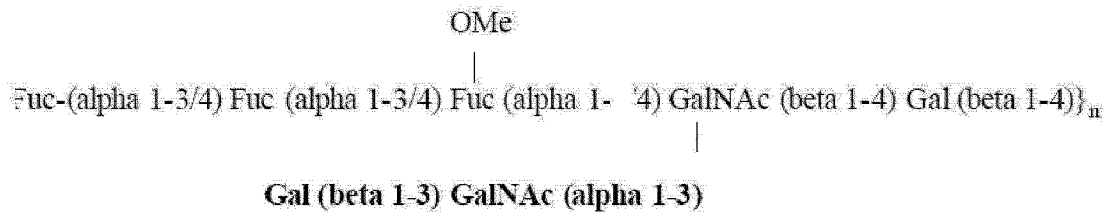


图 4

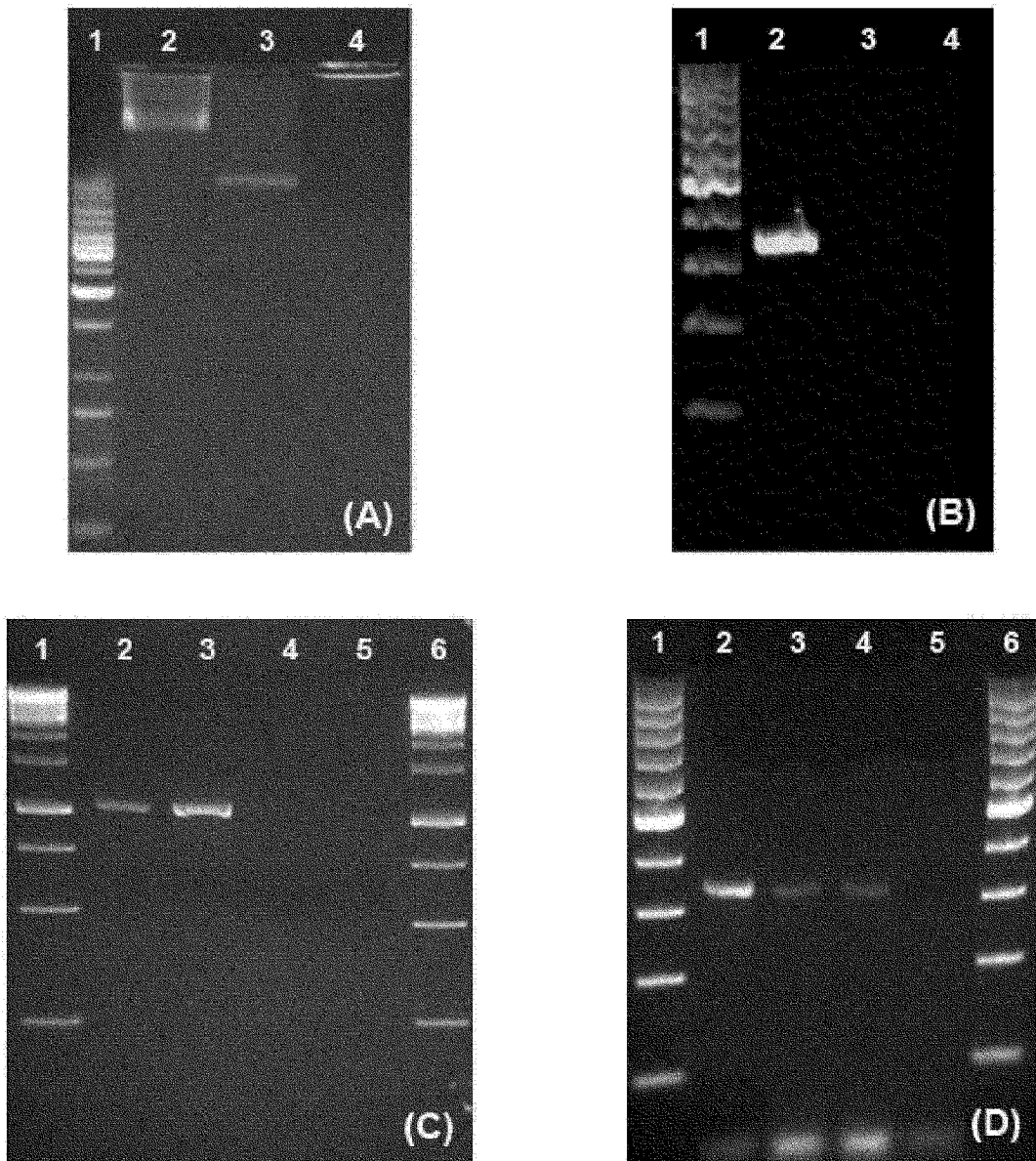


图 5

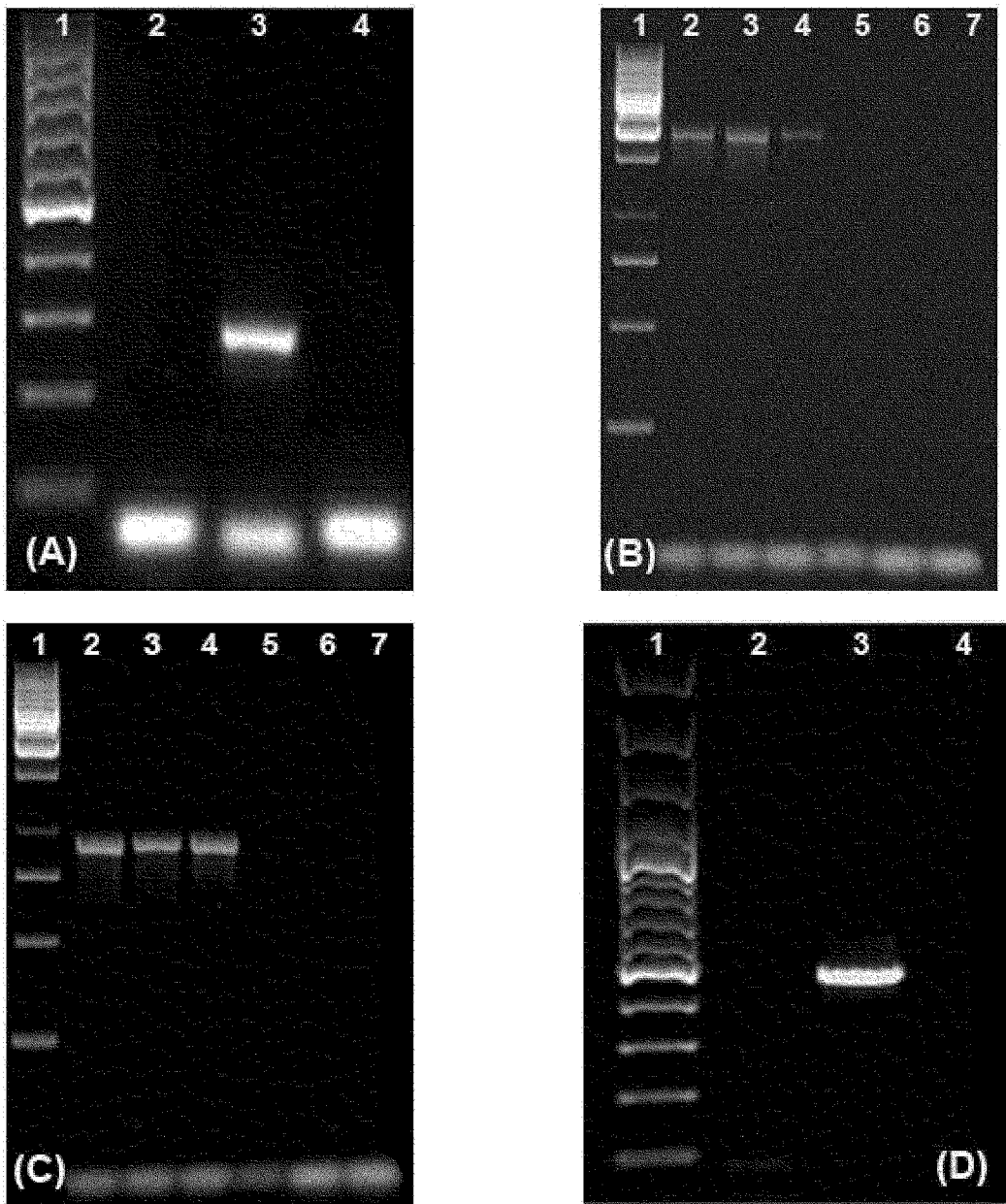


图 6

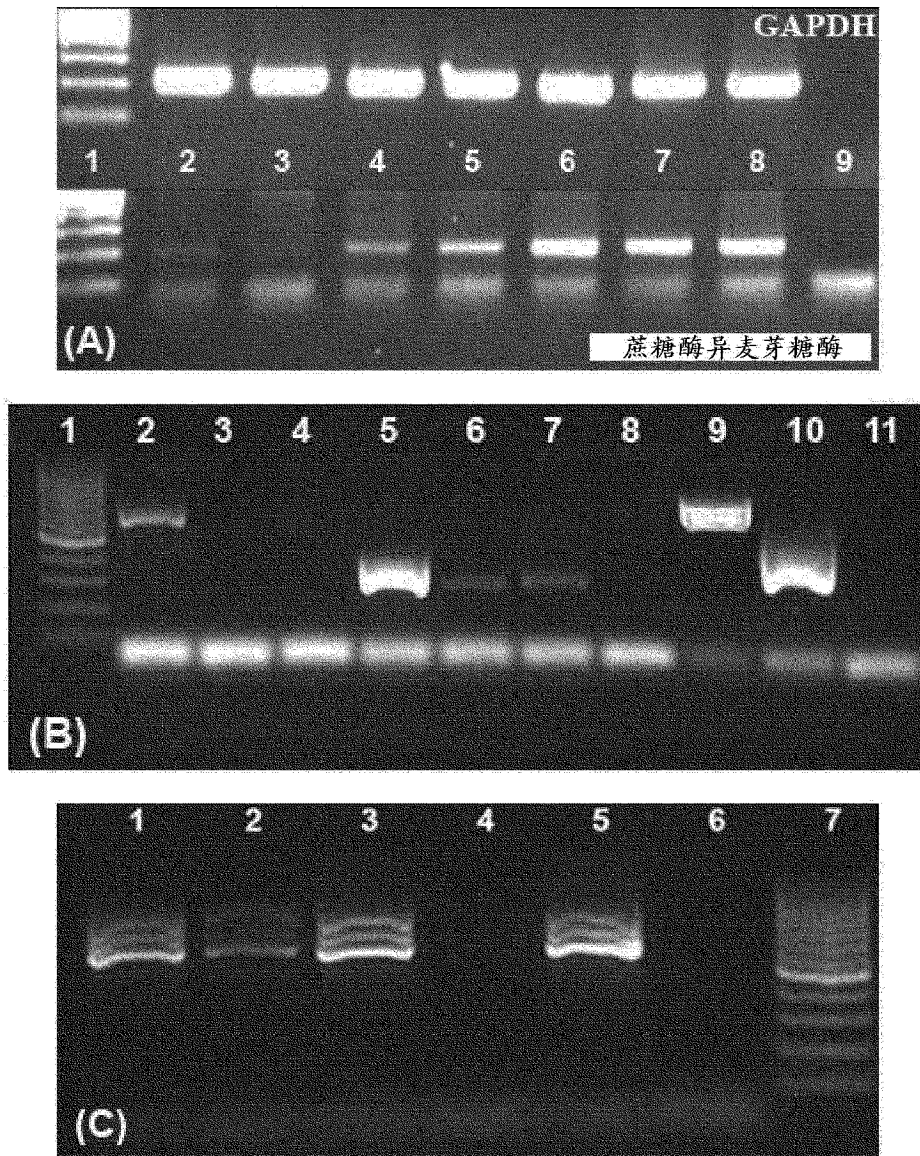
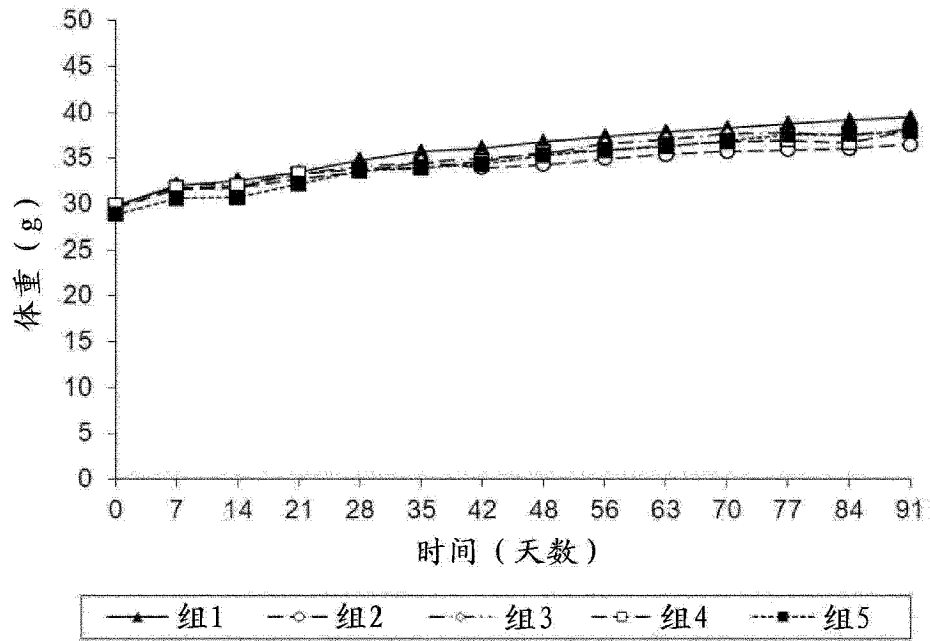


图 7

A



B

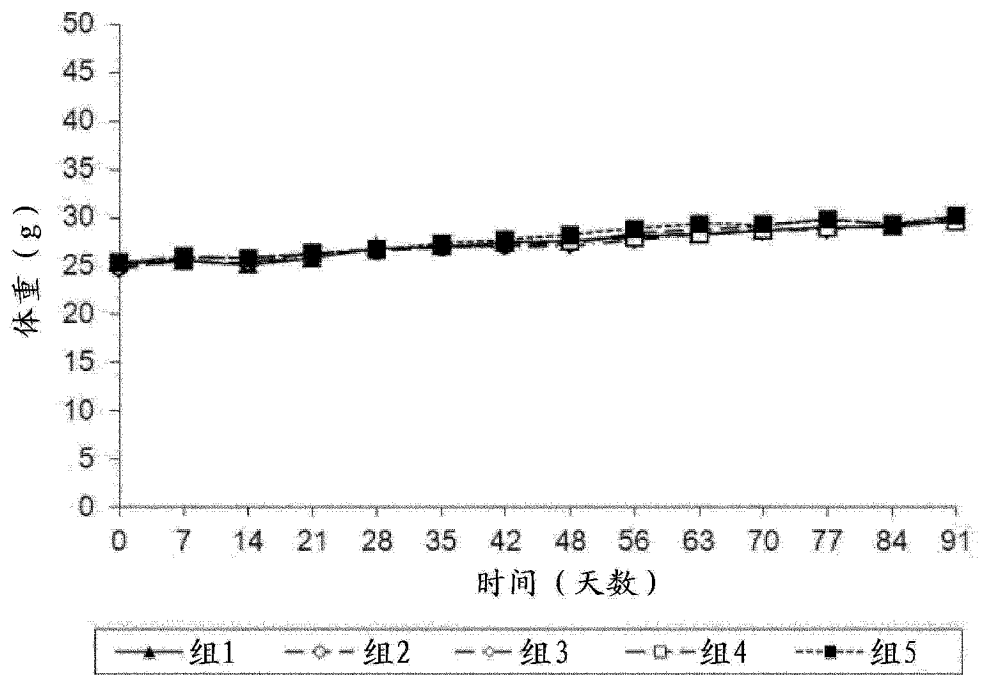
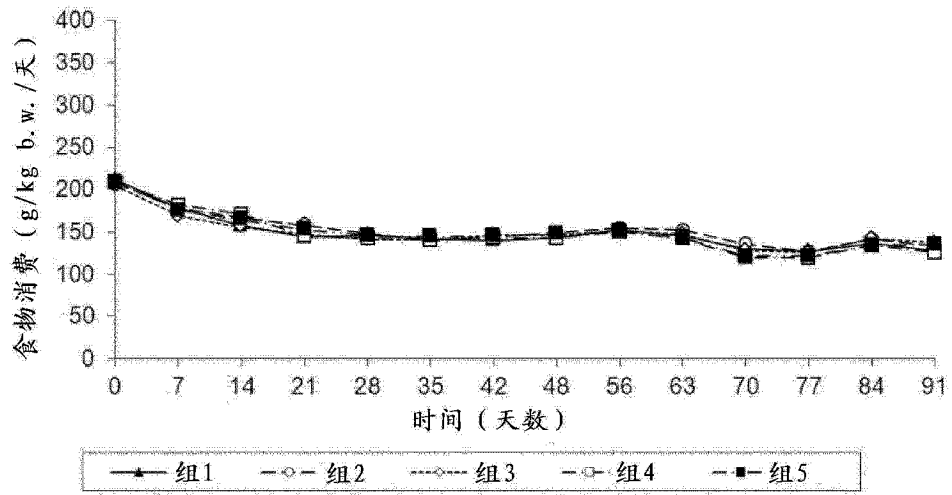


图 8

C



D

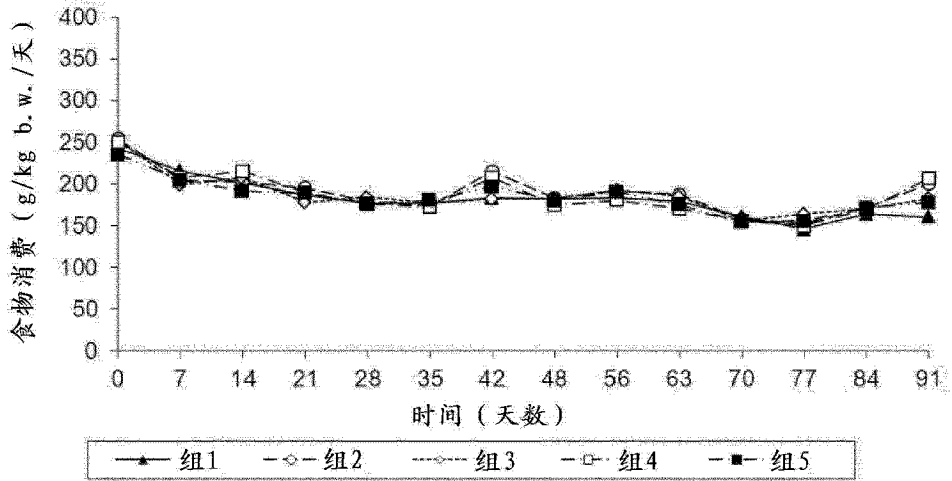


图 8 续

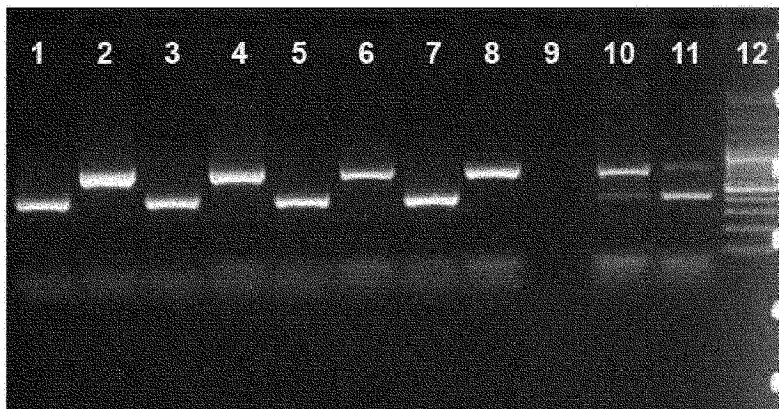


图 9

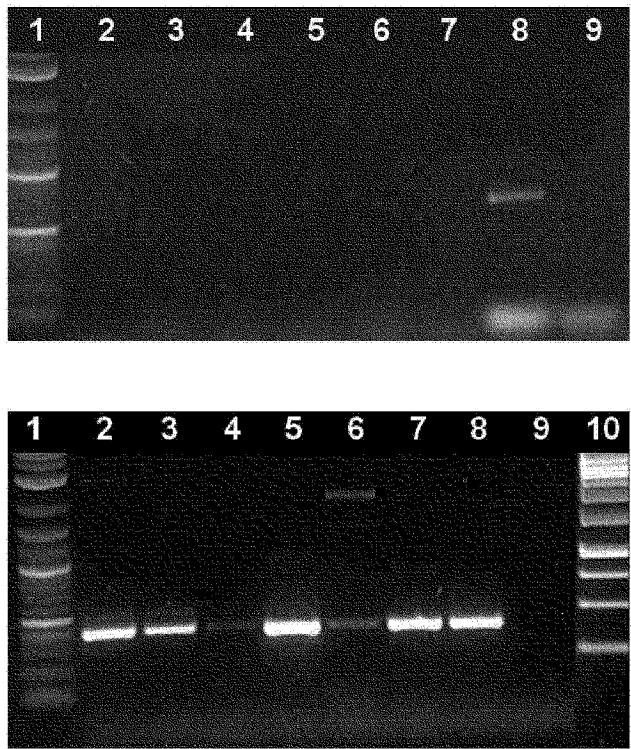


图 10