



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101573138 B

(45) 授权公告日 2015.04.29

(21) 申请号 200780049283.7

(22) 申请日 2007.11.12

(30) 优先权数据

06090208.7 2006.11.10 EP

06090209.5 2006.11.10 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009.07.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2007/009766 2007.11.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/055703 EN 2008.05.15

(73) 专利权人 葛莱高托普有限公司

地址 德国柏林

(72) 发明人 S·高尔兹 P·尤瑟米尔

A·劳弗勒

(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 罗菊华

(51) Int. Cl.

A61K 39/02(2006.01)

A61K 39/40(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A23L 1/30(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1416896 A, 2003.05.14, 全文.

Karsten U. et al. A New Monoclonal

Antibody (A78-G/A7) to the

Thomsen-Friedenreich Pan-Tumor Antigen.

《Hybridoma》. Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, 1995, 第14卷(第1期), 37-44.

Saskia J.A.M. et al. In vitro priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells derived from the human MUTZ-3 cell line. 《Cancer Immunol Immunother》. Springer, 2006, 第55卷(第12期), 第1480-1490页.

Springer G.F. et al. Origin of Anti-Thomsen-Friedenreich (T) and Tn Agglutinins in Man and in White Leghorn Chicks. 《British Jourrial of Haernatohgy》. Wiley, 1981, 第47卷(第3期), 第453-460页.

Klasmas K. et al. Expression of Tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen(T Ag) in Helicobacter Pylori and Modulation of T Ag specific immune response in Infected Individuals. 《Immunological Investigations》. Informa Healthcare, 2002, 第31卷(第3期), 第191页-第204页.

Klasmas K. et al. Expression of Tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen(T Ag) in Helicobacter Pylori and Modulation of T Ag specific immune response in Infected Individuals. 《Immunological Investigations》. Informa Healthcare, 2002, 第31卷(第3期), 第191页-第204页.

审查员 蔡苗

权利要求书5页 说明书117页 附图16页

(54) 发明名称

能活化针对碳水化合物的细胞免疫的微生物及其部分

(57) 摘要

本发明涉及肿瘤和胃肠道病症的预防和治疗领域。更具体而言,本发明涉及核心-1阳性癌症的预防和治疗。它涉及 coreotics 和产生其的方法以及使用其预防和治疗核心-1阳性病症的方法。

1. 选自营养食品或药物组合物的制剂,其包含至少一种核心-1 阳性微生物和 / 或其至少一种核心-1 阳性部分或裂解物,其中所述核心-1 阳性微生物和 / 或其核心-1 阳性部分或裂解物被至少一种核心-1 特异性抗体识别,其中所述的核心-1 阳性微生物以未掩蔽的形式携带核心-1 结构,所述的核心-1 特异性抗体特异性识别核心-1,所述的核心-1 是 β 1-3 连接至 α 连接的 N-乙酰半乳糖胺的半乳糖碳水化合物化合物结构,且其中所述核心-1 阳性微生物为拟杆菌属 (Bacteroides)。

2. 根据权利要求 1 的制剂,其中所述核心-1 阳性微生物和 / 或其核心-1 阳性部分或裂解物被选自下述的至少一种核心-1 特异性抗体识别

-Nemod-TF1

-Nemod-TF2

-A78-G/A7

-HB-T1

-HH8。

3. 根据权利要求 1 或 2 的制剂,其中所述微生物是核心-1 阳性的,并且被选自下述的至少 2 种核心-1 特异性抗体特异性识别

-Nemod-TF1

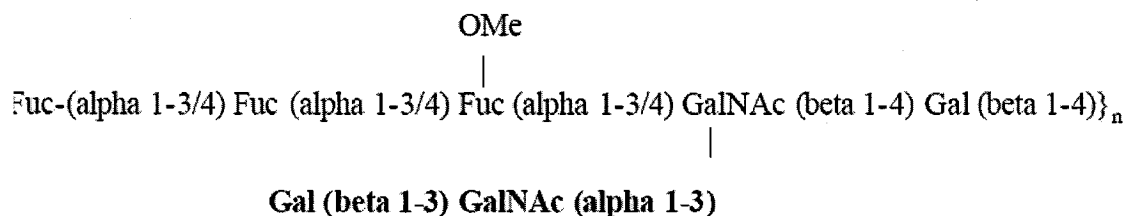
-Nemod-TF2

-A78-G/A7

其中所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

4. 根据权利要求 1 或 2 的制剂,其中所述核心-1 阳性微生物或所述核心-1 阳性微生物的部分包含 #5 的碳水化合物结构和 / 或其重复单元,其中:

#5



5. 根据权利要求 1 或 2 的制剂,其中所述核心-1 阳性微生物是拟杆菌属,并且其中所述核心-1 阳性拟杆菌属被选自下述的至少 1 种核心-1 特异性抗体识别

-Nemod-TF1

-Nemod-TF2

-A78-G/A7

-HB-T1

-HH8

其中所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

6. 根据权利要求 5 的制剂,其中所述拟杆菌属是 AG6,即 DSM18726、MU1,即 DSM 18728 和 / 或 AG6 或 MU1 同系物,其中所述同系物的特征在于它是拟杆菌属,被选自下述的至少 2

种核心 -1 特异性抗体识别

- Nemod-TF1
- Nemod-TF2
- A78-G/A7
- HB-T1
- HH8

其中所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

7. 根据权利要求 1 或 2 的制剂,其在人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的体液和 / 或细胞免疫应答,其中所述核心 -1 特异性微生物或核心 -1 阳性微生物是 AG6,即 DSM 18726 或 MU1,即 DSM 18728。

8. 根据权利要求 7 的制剂,其中所述细胞免疫应答是包含 Th1 细胞的 CD4 阳性 T 细胞和 / 或 CD8 阳性细胞毒性 T 细胞的活化的细胞免疫应答。

9. 根据权利要求 7 的制剂,其中所述核心 -1 阳性微生物通过化学处理来获得,从而暴露核心 -1 结构。

10. 核心 -1 阳性微生物,其中所述的核心 -1 阳性微生物以未掩蔽的形式携带核心 -1 结构,其在接触后被至少一种核心 -1 特异性抗体识别并因此结合,所述的核心 -1 特异性抗体特异性识别核心 1,其中所述的核心 -1 是 β 1-3 连接至 α 连接的 N-乙酰半乳糖胺的半乳糖碳水化合物结构,所述核心 -1 阳性微生物为拟杆菌属 (Bacteroides),且其中所述核心 -1 特异性抗体选自下述

- Nemod-TF1
- Nemod-TF2
- A78-G/A7
- HB-T1
- HH8。

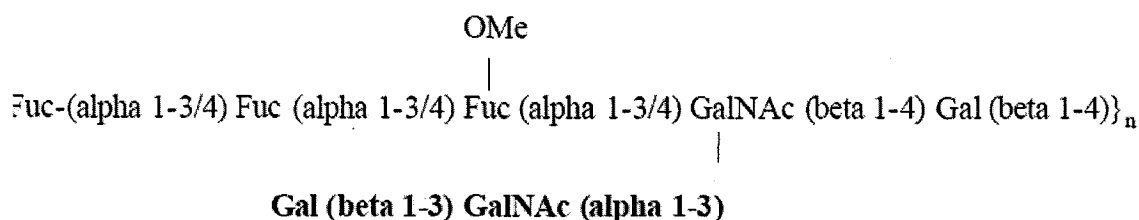
11. 根据权利要求 10 的核心 -1 阳性微生物,其中所述微生物是核心 -1 阳性的,并且被选自下述的至少 2 种核心 -1 特异性抗体特异性识别

- Nemod-TF1
- Nemod-TF2
- A78-G/A7

其中所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

12. 根据权利要求 10-11 中之一的核心 -1 阳性微生物,其中所述核心 -1 阳性微生物包含 #5 的碳水化合物结构和 / 或其重复单元,其中:

#5



13. 根据权利要求 10 或 11 的核心 -1 阳性微生物,其中所述核心 -1 阳性微生物是拟杆菌属,并且其中所述核心 -1 阳性拟杆菌属被选自下述的至少 1 种核心 -1 特异性抗体识别

-Nemod-TF1
-Nemod-TF2
-A78-G/A7
-HB-T1
-HH8

其中所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

14. 根据权利要求 13 的核心 -1 阳性微生物,其中所述拟杆菌属是 AG6,即 DSM 18726、MU1,即 DSM 18728,AG6 或 MU1 同系物,其中所述同系物的特征在于它是拟杆菌属,被选自下述的至少 2 种核心 -1 特异性抗体识别

-Nemod-TF1
-Nemod-TF2
-A78-G/A7
-HB-T1
-HH8

其中所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

15. 根据权利要求 10 或 11 的核心 -1 阳性微生物和 / 或其核心 -1 阳性部分或裂解物在制备用于治疗或预防包含核心 -1 阳性肿瘤细胞的肿瘤的药物和 / 或营养食品中的用途,其中所述核心 -1 阳性微生物是 AG6,即 DSM 18726 或 MU1,即 DSM 18728。

16. 根据权利要求 1-9 中至少一项的制剂、如前述权利要求 10-14 中任一项中限定的核心 -1 阳性微生物和 / 或其核心 -1 阳性部分或裂解物的用途,其用于制备在人类或动物中诱导或增强针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性体液和 / 或细胞免疫应答的药物,其中所述核心 -1 阳性微生物是 AG6,即 DSM 18726,或 MU1,即 DSM 18728。

17. 用于从微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法,其中所述的核心 -1 阳性微生物以未掩蔽的形式携带核心 -1 结构,其包括

(a) 使核心 -1 特异性抗体与微生物的混合物接触,所述微生物的混合物选自来自健康人类和 / 或患者、动物、土壤、食物、和 / 或植物的微生物,和 / 或来自健康个体和 / 或患者的人类胃肠道、人类粪便、人类血液、人类组织、和 / 或人类体液的微生物,和

(b) 分离被所述核心 -1 特异性抗体结合的微生物,

其中所述的方法不是疾病的诊断或治疗方法,所述的核心 -1 特异性抗体特异性识别核心 -1,所述的核心 -1 是 β 1-3 连接至 α 连接的 N-乙酰半乳糖胺的半乳糖碳水化合物结构,且其中所述核心 -1 阳性微生物为拟杆菌属 (Bacteroides)。

18. 根据权利要求 17 的方法,其中所述核心 -1 特异性抗体选自下述

-Nemod-TF1
-Nemod-TF2
-A78-G/A7
-HB-T1
-HH8。

19. 根据权利要求 17 或 18 的方法,其包括

- (a) 从粪便样品中分离包含全菌的微生物的混合物,
- (b) 使核心 -1 特异性抗体与所述微生物的混合物接触,
- (c) 在好氧或厌氧条件下,使用磁性颗粒分离来分离与所述核心 -1 特异性抗体结合的微生物,
- (d) 鉴定被 Nemod-TF2 或 A78-G/A7 和被 Nemod-TF1 结合的所述微生物,由此所述结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合和
- (e) 就在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的免疫应答的能力测试所述分别鉴定的微生物。

20. 针对核心 -1 的细胞免疫应答的方法,其包括

- a. 使合适量的未成熟树突状细胞装载有合适量的根据前述权利要求中任一项的所述核心 -1 阳性微生物、其核心 -1 阳性裂解物或核心 -1 阳性部分、或制剂,所述未成熟树突状细胞包含至少一种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物;
- b. 以合适的时间和合适条件下培养以用于成熟;
- c. 使合适量的所述装载的树突状细胞与合适量的免疫细胞接触,所述免疫细胞包括至少一种 T 细胞或外周血单核细胞,其可以被树突状细胞活化或抑制;
- d. 以合适的时间和合适条件下培养以用于活化或抑制;
- e. 加入合适量的树突状细胞用于再刺激,所述树突状细胞包含至少一种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,装载有合适量的至少一种核心 -1 携带抗原或合适的对照抗原;
- f. 以合适的时间和合适条件下培养以用于再刺激;
- g. 测量分泌的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 的量,由此针对核心 -1 的阳性细胞免疫应答显示,与用相应未装载的树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较,用装载有核心 -1 携带抗原的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞的明显更高的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌,和 / 或与用装载有未携带核心 -1 的抗原的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较,用装载有核心 -1 携带抗原的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞的明显更高的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌,和 / 或与用装载有血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较,用装载有无唾液酸血型糖蛋白的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞的明显更高的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌。

21. 产生针对核心 -1 的功能性树突状细胞的方法,其包括使合适量的树突状细胞或树突状细胞的混合物或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物与合适量的选自下述的至少一种化合物接触,

- 如前述权利要求中任一项定义的,至少一种核心 -1 阳性微生物和 / 或其核心 -1 阳性裂解物或部分;

- 核心 -1 携带分子或

- 核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分,

以产生针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞,

其中所述的方法不是疾病的诊断或治疗方法,其中所述“其裂解物或部分”中的“部分”是指细胞壁制备物、包膜制备物、脂多糖制备物、荚膜制备物、或荚膜多糖制备物。

22. 产生针对核心 -1 的活化的一种或多种 T 细胞、T 细胞克隆或 T 细胞系的方法,其包括

- 使合适量的根据权利要求 21 的针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞,与合适量的至少一种 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;和

- 使所述 T 细胞或 T 细胞的混合物连同根据权利要求 21 的所述装载的功能性树突状细胞一起培养,以活化或引发针对核心 -1 的一种或多种 T 细胞。

23. 根据权利要求 22 的方法,其包括

(a) 使装载有所述核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的根据权利要求 21 的针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞,与合适量的至少一种 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;和

(b) 在活化或引发针对核心 -1 的一种或多种 T 细胞的合适条件下,使所述 T 细胞或 T 细胞的混合物连同所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间;和

(c) 加入装载有所述核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的权利要求 24 的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激;和

(d) 以合适的时间和合适的条件下培养;

或

a) 使装载有所述核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的根据权利要求 21 的针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞,与合适量的至少一种 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;和

(b) 在活化或引发针对核心 -1 的一种或多种 T 细胞的合适条件下,使所述 T 细胞或 T 细胞的混合物连同所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间;和

(c) 加入装载有前述权利要求任一项的所述核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的权利要求 7 的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激;和

(d) 以合适的时间和合适的条件下培养,

其中所述“其裂解物或部分”中的“部分”是指细胞壁制备物、包膜制备物、脂多糖制备物、荚膜制备物、或荚膜多糖制备物。

24. 通过根据权利要求 20-23 中任一项的方法产生的针对核心 -1 的功能性树突状细胞、针对核心 -1 的一种或多种活化 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。

25. 核心 -1 阳性微生物和 / 或其部分在制备在体内或在体外用于诱导或增强核心 -1 特异性免疫应答,和 / 或用于产生功能性树突状细胞或活化 T 细胞、T 细胞系或 T 细胞克隆或针对核心 -1 的抗体的药剂中的用途,其中所述的核心 -1 阳性微生物以未掩蔽的形式携带核心 -1 结构,其中所述的“部分”是指细胞壁制备物、包膜制备物、裂解物、脂多糖制备物、荚膜制备物、或荚膜多糖制备物。

能活化针对碳水化合物的细胞免疫的微生物及其部分

发明领域

[0001] 本发明涉及胃肠道病症和癌症的预防和治疗领域。更具体而言,本发明涉及其为核心-1(Core-1)阳性且因此携带核心-1抗原的癌的预防和治疗。本发明提供了包含核心-1阳性微生物及其部分(fractions)的营养食品(nutraceuticals,或也称“保健食品”)和药物组合物,其适合于诱导针对核心-1且由此也针对核心-1携带肿瘤细胞和核心-1携带分子的免疫应答。通过诱导或增强针对核心-1的特异性免疫应答,这些组合物提供了针对核心-1阳性癌细胞的保护。此外,本发明提供了用于鉴定、选择和分离核心-1阳性微生物的方法,其适合于作为营养食品或药物组合物的有效部分,在人类或动物中诱导针对核心-1的免疫应答。本发明还提供了用于测试核心-1特异性免疫应答的特异性体液和细胞免疫应答测试系统,并且它提供了用于产生抗核心-1抗体和抗体组合物以及抗核心-1树突状细胞、活化T细胞、T细胞系和克隆的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 异常糖基化是癌细胞的一般标记。在糖蛋白和糖脂上的碳水化合物肿瘤抗原因此是用于主动和被动免疫疗法的靶。这些高度丰富的抗原是由于肿瘤细胞的复杂糖基化机制中的变化而重新表达或上调的。各种脂质或蛋白质结合的碳水化合物肿瘤抗原得到描述,例如GM2、GD2、GD3、岩藻糖化的GM1、Globo H、Le^x和粘蛋白核心结构Tn、唾液酸-Tn和Thomsen Friedenreich抗原。

[0004] Thomsen-Friedenreich抗原(TF)是在一系列报告中描述为肿瘤抗原的已知碳水化合物结构。TF以2种形式——TF α 和TF β 存在,其可以与蛋白质或糖脂连接。

[0005] 核心-1是二糖Gal β 1-3GalNAc,其以 α -异头构型与癌细胞中的蛋白质的羟基氨基酸丝氨酸或苏氨酸O-糖苷连接。核心-1对应于Thomsen-Friedenreich的TF α 结构,并且仅与肿瘤上的蛋白质连接。因此,术语核心-1和Thomsen-Friedenreich不一定指相同结构。

[0006] 核心-1抗原在健康和良性患病组织中由其他碳水化合物组分掩蔽,但在大多数癌和某些非上皮恶性肿瘤中是暴露的。因此,核心-1抗原是特异性泛癌抗原(关于举例说明参见图20)。

[0007] 核心-1是重要的肿瘤抗原。核心-1在超过60%的原发性结肠癌和超过90%的来自结肠癌的肝转移上以及在大多数癌症的其他主要适应症上表达,包括乳腺、肺、卵巢、前列腺和其他胃肠癌,例如胃和胰腺癌。核心-1是关于具有结肠癌的患者独立预后标记,随着渐增的核心-1表达强度,死亡率增加和生存中值减少。肝转移的发展与核心-1的表达关联。具有核心-1阳性原发癌的患者在接近60%的情况下发展肝转移,而关于具有核心-1阴性肿瘤的肝转移的危险明显更低(小于20%)。除了介导到肝内的转移外,核心-1还可以在经由上皮的转移中起作用。

[0008] 异常高的泛癌特异性、预后关联性和在肝转移中的直接牵涉使得Thomsen-Friedenreich且特别是核心-1成为用于癌症免疫治疗的主要靶。

[0009] 存在提供基于Thomsen-Friedenreich的治疗方法的尝试。E. g. Shigoeka等人

(1999) 描述了在小鼠模型中通过抗 -Thomsen-Friedenreich 特异性单克隆抗体抑制来自神经酰胺酶处理的结肠 26 细胞的肝转移。然而,由于在产生高度特异性抗 TF 抗体中的困难,并且由于其作为具有相对比较低的固有亲和力的单个结合结构域的 IgM 同种型的性质,TF 特异性抗体迄今为止未得到进一步开发。此外,某些抗 -TF-Ag 抗体在临床上无效,因为它们引起不希望有的肿瘤细胞增殖。此外,W02006/012626 描述了抗 -TF 抗原抗体的治疗用途。TF- 特异性 Abs 的结合已显示抑制肿瘤细胞的增殖 (Jeschke, 等人 2006)。

[0010] 此外,还存在开发基于 Thomsen-Friedenreich 的疫苗的尝试。其中大多数集中于抗体应答的诱导。例如 Livingston 和 Lloyd(2000) 使用非天然的 TF- 缀合物,其中合成的 TF 与 KLH 随机偶联。这种缀合物产生针对合成的 TF 但不针对天然配体上的 TF 的体液免疫应答 (Adluri 等人,1995)。它们因此不是 TF 特异性的,因为它们将不识别肿瘤结构上的 TF。

[0011] Springer 和 Desai 使用由 T/Tn 疫苗的疫苗接种,所述 T/Tn 疫苗由 O 和 MN 型红血球衍生的糖蛋白组成,这导致改善的乳腺癌患者存活,尽管仅产生了少量 IgM。然而,IgM 表示较不成熟的免疫应答,并且与针对 TF-Ag 的抗体相关的许多血清研究涉及 IgM 抗体,因此将需要明显更高的 TF 特异性免疫应答和优选地 IgG 应答。

[0012] 描述推测对于 TF 阳性的微生物的少数报告是已知的。例如 Springer 等人 (Brit. J Haematol,1981,47,453-460 Transfusion1979,第 19 卷,no.3 第 233-249 页) 报告了好氧微生物 (大肠杆菌 (E. coli) 086),其可以在鸡和人类中产生多克隆抗体应答,其也可以识别人类红细胞上的 TF。Springer 使用抗 T 的吸附和用唾液酸酶处理的 T 红细胞的血凝反应测定法,以便粗略测定免疫应答的特异性。然而,人类红细胞的唾液酸酶处理导致几个碳水化合物表位的解蔽,在它们中有 TF 但并非专一地有 TF。因此,由于交叉反应性,由 Springer 测试的反应未显示关于 TF 的特异性。由于其的非特异性,分别的非特异性微生物仅具有作为疫苗的有限适合性,因为它不会产生强免疫应答,所述免疫应答特异性针对 TF 但针对相似的 TF 样结构,并且因此潜在地还渐增地针对机体的非肿瘤组织或细胞。

[0013] 由于糖基化机制的复杂性和种类特异性,还没有关于癌症患者的基于核心 -1 的免疫疗法。更为重要的是,不存在可用于患者的可以预防核心 -1 阳性肿瘤的发展的试剂。

[0014] 常规治疗通常在肿瘤诊断后开始,这时肿瘤通常是充分确定且难以治疗。因此,具有几种副作用的侵略性疗法 (化学疗法、放射疗法、手术) 用于使患者解除肿瘤容积。免疫治疗选择主要应用于具有微小残留疾病的辅助背景中。

[0015] 本发明的目的是提供用于治疗或预防核心 -1 阳性肿瘤和胃肠道病症的方法,以及用于获得分别的方法的合适工具。

[0016] 发明描述

[0017] 本发明提供了适合于诱导针对核心 -1 携带肿瘤细胞和核心 -1 携带分子的免疫应答,包含核心 -1 阳性微生物或其部分以及核心 -1 阳性微生物及其部分的营养食品和药物组合物。此外,它提供了用于鉴定、选择和分离核心 -1 阳性微生物的方法,其适合于作为营养食品或药物组合物的有效部分,在人类或动物中诱导针对核心 -1 的免疫应答。它还提供了用于测试核心 -1 免疫应答的特异性体液和细胞免疫应答测试系统。它还提供了用于产生抗核心 -1 抗体和抗体组合物以及抗核心 -1 T 细胞系、克隆和呈递核心 -1 的功能性树突状细胞的方法。

[0018] 因此,本发明提供了用于诱导或增加在人类中的特异性抗核心-1 抗体水平的方法,由此诱导针对肿瘤,特别是核心-1 阳性肿瘤的保护性免疫应答。此外,本发明提供了用于诱导针对碳水化合物靶和特别是针对肿瘤特异性碳水化合物靶例如核心-1 的特异性细胞免疫应答的工具。本发明还提供了用于鉴定和分离合适的核心-1 阳性微生物的方法。本发明的另一个优点是由于制剂的性质,生产可以以极低的成本。此外,制剂可以在大规模发酵罐中快速生产。

[0019] 由本发明的制剂诱导的抗核心-1 抗体充当免疫监督机制,其在大多数(未识别的)情况下可以预防原发性肿瘤的发展和转移灶的分布,然而,仅当特异性免疫应答足够高时。因此,本发明的目标是提供通过使用核心-1 阳性微生物(优选来自健康供体的肠菌落)作为食品添加剂,诱导高特异性抗核心-1 滴度,优选与特异性细胞应答组合的工具,以便构建针对肿瘤的特异性免疫保护,或者预防或减少核心-1 阳性肿瘤和/或其转移灶的发生率。

[0020] A) 营养食品、药物组合物和免疫应答测试

[0021] 根据第一个方面,本发明提供了选自营养食品和/或药物组合物的制剂,其包含至少一种核心-1 阳性微生物和/或其至少一种核心-1 阳性部分或裂解物,其中所述核心-1 阳性微生物和/或其核心-1 阳性部分或裂解物由至少一种核心-1 特异性抗体识别。本发明因此提供了包含至少一种核心-1 阳性微生物或其至少一种核心-1 阳性部分或裂解物的营养食品和/或药物组合物,其中在接触后所述核心-1 阳性微生物由至少一种核心-1 特异性抗体识别且因此结合。

[0022] 本发明的一个重要方面是核心-1 阳性微生物和/或核心-1 阳性部分其或裂解物由至少一种核心-1 特异性抗体识别。因此,当与所述抗体接触时,核心-1 阳性微生物和/或其核心-1 阳性部分或裂解物由核心-1 特异性抗体特异性结合。核心-1 结构因此在本发明的核心-1 阳性微生物中对于所述核心-1 特异性抗体是可接近的,并且因此不由其他结构“隐藏”。可以在测试后测定的这个重要特征——合适的测试在下文描述——确保核心-1 特异性微生物和/或其核心-1 阳性部分或裂解物携带核心-1,并且因此至少在免疫化学上基本上等同于核心-1,而不是仅类似于核心-1 的表位。这个特征对于确保免疫应答由足够核心-1 特异性的所述核心-1 阳性微生物触发是重要的。可以用于确定微生物携带核心-1 的此种核心-1 特异性抗体在肿瘤相关背景中特异性识别核心-1 结构。这些抗体因此可以用于确定本发明的核心-1 阳性微生物携带特异性模拟人胃肠道病症和肿瘤上存在的核心-1 抗原的核心-1 结构。这种特征性——核心-1 特异性——描述了来自本领域已知微生物(其推测携带 Thomsen-Friedenreich 抗原)的本发明的核心-1 阳性微生物。如上文概述的以及将在下文比较实施例中显示的,本领域已知的微生物携带仅类似于 Thomsen-Friedenreich(或核心-1)的碳水化合物结构,并且因此例如与用于推测确定 TF 特异性的 PNA 交叉反应。然而,PNA 不是 TF 特异性的,因为它与许多不同的碳水化合物表位交叉反应。因此,在 TF-样(交叉反应的)和 TF-等同结构之间不存在差异。这些已知微生物也不被核心-1 特异性抗体识别并且因此不由核心-1 特异性抗体特异性结合(参见下文)。这证实它们不携带核心-1 抗原,并且因此在施用后在人类或动物中也不能诱导核心-1 特异性免疫应答,因为它们没有核心-1 的免疫化学/免疫学特征,以便能够引发分别的应答。然而,此种特异性应答是触发核心-1 特异性免疫应答所需的,并且因此是触发治

疗或预防效应所需的。

[0023] 由于本发明的微生物是真正核心-1 阳性的事实——这可以通过使用核心-1 特异性抗体进行测定——本发明提供了包含核心-1 阳性微生物的制剂,其诱导或增强针对核心-1 抗原的特异性且因此是有效的免疫应答。本发明的制剂通过诱导对于核心-1 特异性的高抗核心-1 抗体水平,以肿瘤特异性方式活化免疫系统。就我们所知,本发明是能够活化针对肿瘤的特异性免疫保护的第一种抗原特异性食品添加剂 / 营养食品或药物,以及能够诱导碳水化合物且特别是核心-1 肿瘤抗原特异性免疫应答的第一种食品添加剂。

[0024] 术语核心-1 特异性抗体、以及优选的核心-1 特异性抗体、核心-1 特异性抗体的组合或核心-1 特异性抗体的优选组合在本文的定义和其他地方详细描述。

[0025] 根据一个实施方案,核心-1 阳性微生物和 / 或其核心-1 阳性裂解物或部分由选自下述的至少一种核心-1 特异性抗体识别

[0026] -Nemod-TF1

[0027] -Nemod-TF2

[0028] -A78-G/A7

[0029] -HB-T1

[0030] -HH8。

[0031] 通过显示与除核心-1 外的其他碳水化合物结构很少的交叉反应性或无交叉反应性,这些抗体被证明是高度核心-1 特异性的。这些抗体识别在肿瘤相关形式的蛋白质上的核心-1 (以 α 或 β 异头形式),优选 HH8、A78-G/A7、Nemod-TF2、Nemod-TF1 ;更优选 A78-G/A7、Nemod-TF2、Nemod-TF1。为了增强特异性,可以使用这些抗体中的 2 种或更多,以便测定 / 测试微生物是核心-1 阳性的,并且因此是根据本发明的核心-1 阳性微生物。

[0032] 核心-1 特异性抗体的结合对于碳水化合物结构是特异性的,并且因此碳水化合物结构具有相同的结合标准,并因此与人癌症相关核心-1 相同的免疫化学特征可以通过分析核心-1 特异性抗体的结合是否 是高碘酸盐敏感的进行测定。高碘酸盐处理破坏包括核心-1 的碳水化合物结构的外部碳水化合物环,从而破坏核心-1 表位。抗体结合的减少通常在高碘酸盐氧化后观察到。因此,当核心-1 特异性抗体的结合是核心-1 特异性的时,结合在高碘酸盐处理后减少。令人惊讶的是,对于最初并非核心-1 阳性的许多生物,发现高碘酸盐处理导致 Ab 结合中的增加。这是因为高碘酸盐氧化暴露了看起来是 TF- 样的新碳水化合物结构。然而,在高碘酸盐氧化后结合中的增加是微生物最初并非核心-1 阳性的强指示剂,因为如果核心-1 表位在核心-1 阳性微生物上已呈现对于核心-1 特异性抗体可接近的,那么高碘酸盐处理应破坏核心-1 表位。然而,这样的微生物也由本发明的范围包含,其并非天然核心-1 阳性,但可以通过化学处理 (例如高碘酸盐处理) 而转变成核心-1 阳性微生物,并且可以例如在高碘酸盐处理 (暴露核心-1) 后作为本发明的制剂的组分使用。

[0033] 根据一个实施方案,本发明提供了如上文描述的营养食品或药物制剂,其中使用至少一种核心-1 阳性微生物,其由核心-1 特异性抗体 NEMOD-TF1 识别 / 结合,优选由 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1 的组合识别 / 结合,并且所述结合是高碘酸盐敏感的,并且最优选由 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1 而不是由 A68-B/A11 识别 / 结合。这种特征是非常有利的,因为它类似人癌症相关的核心-1 结构的结合标准。

[0034] 在一个优选实施方案中,所述制剂在识别核心-1 抗原和 / 或核心-1 阳性肿瘤细胞的至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心-1 的免疫应答。由于微生物是核心-1 阳性的事实,针对核心-1 抗原的免疫应答在施用后被诱导 / 增强。由此建立了免疫监督机制,其可以例如消除或减少新出现的携带核心-1 的肿瘤细胞数目,从而预防或减少原发性肿瘤生长。根据本发明的制剂在施用时在至少一个人类或动物中诱导或增强所述核心-1 特异性免疫应答,和 / 或通过具有破坏核心-1 阳性癌细胞的潜能而充当针对核心-1 阳性癌细胞的保护、和 / 或减少或预防核心-1 阳性疾病、肿瘤或转移的发生,和 / 或减少或预防核心-1 阳性疾病或肿瘤的扩展或转移,和 / 或增强免疫系统,和 / 或改善免疫应答。

[0035] 因此,本发明提供了包含至少一种核心-1 阳性微生物或其部分的营养食品,其在人类或动物中诱导免疫应答,所述免疫应答识别核心-1 抗原和 / 或核心-1 阳性肿瘤细胞和 / 或核心-1 阳性疾病。常规益生菌和益生元 (prebiotics) 导致免疫系统的总体非特异性刺激。不存在现有技术系统中牵涉的肿瘤特异性系统且特别是无一针对核心-1。

[0036] 所述核心-1 阳性微生物、优选的核心-1 阳性微生物、核心-1 阳性微生物的部分和核心-1 阳性微生物的优选部分及其组合在本文的定义和其他地方详细描述。所述核心-1 阳性微生物由至少一种核心-1 特异性抗体特异性识别。本文还描述的是用于鉴定和分离所述微生物或其部分的方法。

[0037] 核心-1 阳性微生物或其部分表示活性成分,由于其携带类似核心-1 的抗原的事实,其诱导针对核心-1、核心-1 抗原和 / 或核心-1 阳性肿瘤细胞和 / 或疾病的免疫应答的特异性。

[0038] 在施用所述核心-1 特异性微生物后,所述核心-1 特异性微生物和 / 或其核心-1 阳性裂解物或部分实现针对核心-1 的特异性免疫。引起核心-1 特异性的免疫的能力可以通过至少一种下述方法进行确定:

[0039] a) 所述核心-1 阳性微生物由选自下述的至少 1 种、优选 2 种核心-1 特异性抗体特异性识别

[0040] -Nemod-TF1

[0041] -Nemod-TF2

[0042] -A78-G/A7

[0043] -HH8

[0044] -HB-T1

[0045] 其中所述抗体的结合优选是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合;

[0046] b) 所述核心-1 特异性微生物和 / 或其核心-1 阳性裂解物或部分的特征在于,在如本文描述的至少一种体液免疫应答测试中是阳性的;

[0047] c) 所述核心-1 特异性微生物和 / 或其核心-1 阳性裂解物或部分的特征在于,在如本文描述的针对核心-1 的至少一种细胞免疫应答测试中是阳性的。

[0048] 这确保使用的微生物是真正核心-1 阳性的,并且因此能够触发针对核心-1 抗原的所需特异性免疫应答。然而,如上所述,使用这样的微生物也在本发明的范围内,所述微生物通过化学处理 (例如高碘酸盐处理),从核心-1 阴性微生物转变成核心-1 阳性微生物。由于分别的处理而变成核心-1 阳性的分别处理的微生物也在本发明的范围内,并且它

们的特征可以通过与已携带 / 包含暴露的核心 -1 表位的那些微生物相同的方法 / 测试进行测定。

[0049] 为了增强制剂的核心 -1 特异性,可以使用这样的微生物,其是核心 -1 阳性的,或可以是例如通过高碘酸盐处理而成为核心 -1 阳性的,并且由选自下述的至少 2 种核心 -1 特异性抗体特异性识别

[0050] -Nemod-TF1

[0051] -Nemod-TF2

[0052] -A78-G/A7

[0053] 其中所述抗体的结合优选是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

[0054] 核心 -1 阳性微生物或其部分可以包含选自图 19 的 #1、#2、#3、#4 和 / 或 #5 和 / 或其重复单元的至少一种碳水化合物结构。如可见的,核心 -1 阳性微生物可以在 α 或 β 异头构型上连接。

[0055] 此外,本发明人已惊讶地发现存在核心 -1 阳性拟杆菌属 (*Bacteroides*) 菌株,例如卵形拟杆菌 (*Bacteroides ovatus*)。这是未知的。因此,提供了核心 -1 阳性拟杆菌属,并且可以在根据本发明的制剂中使用,其中所述核心 -1 阳性拟杆菌属由选自下述的至少 1 种、优选 2 种核心 -1 特异性抗体识别

[0056] -Nemod-TF1

[0057] -Nemod-TF2

[0058] -A78-G/A7

[0059] -HB-T1

[0060] -HH8

[0061] 所述抗体的结合优选是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。

[0062] 优选地,所述核心 -1 阳性拟杆菌属从健康供体中分离。所述核心 -1 阳性拟杆菌属可以例如是卵形拟杆菌或与卵形拟杆菌相关,例如新菌株 AG6 (DSM 18726)、MU1 (DSM 18728) 和 / 或 AG6 或 MU1 同系物,其中所述同系物的特征在于它是拟杆菌属,由选自下述的至少 2 种核心 -1 特异性抗体识别

[0063] -Nemod-TF1

[0064] -Nemod-TF2

[0065] -A78-G/A7

[0066] -HB-T1

[0067] -HH8

[0068] 其中所述抗体的结合优选是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示减少的结合。如实施例中证实的,这些菌株引发针对核心 -1 的极强的免疫应答,并且与卵形拟杆菌相关。它们显示极强的核心 1 表达,并且因此包含许多核心 -1 表位,并与核心 -1 特异性 mAbs (TF1 和 TF2) 结合,其中结合是高碘酸盐敏感的,从而指示核心 -1 在表面上可接近地呈现。核心 1 表达 / 检测在酶消化、巴氏杀菌法和 / 或冷冻干燥后也是没有变化的,使得它是用于口部药物制剂的合适组分。此外,对于 AG6,证实以 α -异头构型的肿瘤相关的核心 -1 结构作为重复单元内的支链组分 (还参见图 19 的 #5)。这个结果非常重要,因为 TF- 抗原

在荚膜多糖内的暴露定位通过更佳的核心 -1 特异性抗体的识别和结合,可以在人类中增加针对核心 -1 的体液免疫应答的诱导。

[0069] 在一个优选实施方案中,本发明提供了选自营养食品和 / 或药物组合物的制剂,其包含至少一种核心 -1 阳性微生物和 / 或其至少一种核心 -1 阳性裂解物或部分,其中核心 -1 阳性微生物和 / 或其核心 -1 阳性裂解物或部分由至少一种核心 -1 特异性抗体识别,其中所述核心 -1 特异性抗体选自 NEMOD-TF1、NEMOD-TF2、A78-G/A7、HB-T1 和 / 或 HH8。

[0070] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了所述制剂,其中核心 -1 阳性微生物由核心 -1 特异性抗体 NEMOD-TF2 和 Nemod-TF1 结合,由此所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示显著减少的结合。

[0071] 根据本发明的制剂(例如包含核心 -1 阳性微生物的食品或药物)因此可以用于预防和治疗用途,并且支持免疫学活性。本发明的药物制剂包含至少一种核心 -1 阳性微生物——其也可以通过化学处理(例如高碘酸盐处理)成为核心 -1 阳性的——以及药学上可接受的载体。本发明的制剂的制备和施用(例如包含核心 -1 阳性微生物的药物)依照已知技术。例如,制剂可以与常规盖伦佐剂组合,以形成适合于所需应用方法的组合物。例如,本发明的化合物可以与常规赋形剂混合使用,所述赋形剂即适合于肠胃外或肠内应用的药学上可接受的有机或无机载体物质,其不与活性化合物不利地反应。合适的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液、醇、植物油、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、粘性石蜡、芳香油、脂肪酸甘油单酯和甘油二酯、pentaerythritol 脂肪酸酯、羟基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、滑石等。细节在下文描述。

[0072] 所述制剂可以在识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的体液和 / 或细胞免疫应答,优选 Th1 型细胞免疫应答。在一个优选实施方案中,制剂在识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的体液和 / 或细胞免疫应答,优选包含 Th1 细胞的 CD4 阳性 T 细胞和 / 或 CD8 阳性细胞毒性 T 细胞的活化的细胞免疫应答。

[0073] 本发明还提供了包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品,其中核心 -1 阳性微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体识别 / 结合,并且其在识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的免疫应答。

[0074] 本发明还提供了包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的药物组合物,其在人类或动物中诱导识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞和 / 或核心 -1 阳性疾病的免疫应答。

[0075] 本发明提供了包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的药物组合物,其中如果与分别的抗体接触,那么核心 -1 阳性微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体识别且因此结合,并且其在识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的至少一个人类或动物中诱导针对核心 -1 的免疫应答。

[0076] 本发明提供了包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或药物制剂,其中核心 -1 阳性微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体识别 / 结合,并且其在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的体液和 / 或细胞免疫应答。

[0077] 所述免疫应答是针对核心 -1 的体液免疫应答和 / 或针对核心 -1 的细胞免疫应答。细胞免疫加上体液免疫的活化强烈增强了本发明的制剂 / coreotics 的预防和治疗潜

能。

[0078] 在一个进一步的实施方案中,本发明提供了包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或药物制剂,其在人类或动物中诱导识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的体液和细胞免疫应答。

[0079] 在本发明的一个优选实施方案中,营养食品或药物组合物在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 特异性免疫应答,通过具有破坏核心 -1 阳性癌细胞的潜能而充当针对核心 -1 阳性癌细胞的保护。

[0080] 包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或药物组合物可以用于构建核心 -1 特异性免疫应答,其通过具有破坏那些细胞的潜能而充当针对核心 -1 阳性癌细胞的保护,如本文显示的例如通过核心 -1 特异性抗体的诱导,通过有效杀死其的针对核心 -1 阳性肿瘤细胞的核心 -1 抗体的核心 -1 特异性补体依赖性细胞毒性,或通过核心 -1 特异性 T 细胞应答的 TNF α 和 / 或 INF γ 分泌,他们是本领域技术人员关于携带核心 -1 的那些肿瘤细胞的特异性细胞毒性 T 细胞介导的肿瘤细胞杀死的科学地识别到的替代标记,如实施例中显示的和本文描述的。

[0081] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,使用包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或药物组合物,以便构建所述核心 -1 特异性免疫应答,其充当针对核心 -1 阳性癌细胞的保护,如上文描述的通过给 (至少一个) 健康个体口部施用营养食品,所述核心 -1 特异性免疫应答具有破坏那些细胞的潜能。

[0082] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,使用包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或药物组合物,以便通过给 (至少一个) 健康个体口部施用,减少或甚至进一步优选预防核心 -1 阳性疾病或肿瘤的发生。

[0083] 本发明的营养食品或药物组合物用于治疗至少一个人类或动物中的核心 -1 阳性疾病或肿瘤。在本发明的一个进一步优选的实施方案中,使用包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或药物制剂,以便减少或甚至更优选预防核心 -1 阳性疾病或肿瘤或转移的发生。

[0084] 在一个进一步的实施方案中,本发明提供了包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或药物组合物,其施用时在至少一个人类或动物中减少或预防核心 -1 阳性疾病或肿瘤的扩展或转移。

[0085] 在本发明的一个进一步的实施方案中,营养食品或药物制剂包含至少 2 种不同的核心 -1 阳性微生物或其部分。

[0086] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,营养食品或药物制剂包含与诱导或增强免疫应答的至少一种有益微生物组合的,至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分。

[0087] 在本发明的一个进一步的实施方案中,使用包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品,以便通过在患有这种疾病的患者中口部施用营养食品来治疗核心 -1 阳性疾病或肿瘤。

[0088] 在本发明的一个进一步的实施方案中,使用包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的药物制剂,以便治疗患有这种疾病的患者中的核心 -1 阳性疾病或肿瘤。

[0089] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的前述营养食品或药物组合物包含至少一种核心 -1 阳性微生物和核心 -1 阳性微生物的至少一个部分,优选来自超过一种核心 -1

阳性微生物。

[0090] 所述针对核心-1的体液免疫应答是针对核心-1的抗体应答,其可以通过下文详细描述¹的体液免疫应答测试1、2、3、4、5或6中的至少一种进行检测。

[0091] 本发明还提供了针对核心-1的体液免疫应答测试(体液免疫应答测试1),其包括在ELISA中测试抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体与糖蛋白的结合,所述糖蛋白包括无唾液酸血型糖蛋白(asialoglycophorin)和血型糖蛋白(glycophorin)、或无唾液酸血型糖蛋白和经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白、或无唾液酸血型糖蛋白和血型糖蛋白和经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白,由此针对核心-1的阳性体液免疫应答显示,与血型糖蛋白和/或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的结合相比较,所述抗体与无唾液酸血型糖蛋白明显更高的结合。无唾液酸血型糖蛋白包含核心-1结构,血型糖蛋白则不。因此,由本发明的核心-1阳性微生物触发的阳性体液免疫应答将导致与无唾液酸血型糖蛋白可检测的结合,而与血型糖蛋白较少的结合或无结合。经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白也丧失核心-1表位,并且因此也是测定阳性体液免疫应答是否由根据本发明的核心-1阳性微生物/制剂触发的测试系统。在一个更优选的实施方案中,在施用营养食品、药物组合物、核心-1阳性微生物或其部分或包含这些的制剂后,这种结合明显更高。

[0092] 所述¹的体液免疫应答测试1在ELISA中测试血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体与糖蛋白的结合,所述糖蛋白包括无唾液酸血型糖蛋白和血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白,由此针对核心-1的阳性体液免疫应答显示,与血型糖蛋白和/或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的结合相比较,所述抗体与无唾液酸血型糖蛋白明显更高的结合。在一个优选实施方案中,所述测试包括无唾液酸血型糖蛋白和血型糖蛋白和经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白。在一个优选实施方案中,关于无唾液酸血型糖蛋白的信号比血型糖蛋白的那种高至少50%,和比经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白高至少30%。在一个优选实施方案中,关于无唾液酸血型糖蛋白的信号是血型糖蛋白的那种的至少2倍,和/或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的那种的1.5倍,和甚至进一步优选的血型糖蛋白的那种的至少3倍,和/或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的那种的2倍,以及更进一步优选的血型糖蛋白的那种的至少5倍,和/或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的那种的4倍。在一个优选实施方案中,在根据本发明的制剂施用后,关于无唾液酸血型糖蛋白的信号显著增加,并且它比经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白高至少30%。在一个优选实施方案中,在根据本发明的制剂施用后,关于无唾液酸血型糖蛋白的信号高50%,更优选高80%,并且更加优选高100%,并且它比经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白高至少30%。

[0093] 体液免疫应答测试1的一个优选实施方案在实施例11中详细描述。

[0094] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了²的针对核心-1的体液免疫应答测试(体液免疫应答测试2),其在ELISA中测试抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体与和聚丙烯酰胺偶联的碳水化合物结构(PAA缀合物)的结合,所述PAA缀合物包含Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA、Gal β 1-3GalNAc β 1-PAA、GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA,和优选地高碘酸盐处理的Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA,由此针对核心-1的阳性体液免疫应答显示,与高碘酸盐处理的Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA相比较,

一种或多种抗体与 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 明显更高的结合,以及优选地与 Gal β 1-3 GalNAc β 1-PAA 相比较,一种或多种抗体与 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 更高的结合,或与在免疫接种前(例如免疫前血清)从人类或动物中获得的抗体相比较,在用根据本发明的试剂免疫接种后(例如免疫血清)从人类或动物中获得的抗体与 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 明显更高的结合。这些人工聚丙烯酰胺结构还包含核心-1 结构分别紧密相关的结构,并且因此可以用于测定所触发的体液免疫应答的特异性。

[0095] 所述体液免疫应答测试 2 在 ELISA 中测试血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体与和聚丙烯酰胺偶联的碳水化合物结构(PAA 缀合物)的结合,所述 PAA 缀合物包含 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA、Gal β 1-3 GalNAc β 1-PAA、GlcNAc β 1-2 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA,和优选地高碘酸盐处理的 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA,由此针对核心-1 的阳性体液免疫应答显示,与高碘酸盐处理的 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 相比较,以及优选地与 Gal β 1-3 GalNAc β 1-PAA 相比较,抗体与 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 明显更高的结合。在一个优选实施方案中,与 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 的结合是与高碘酸盐处理的 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA,和与 Gal β 1-3 GalNAc β 1-PAA 的结合的至少 2 倍。

[0096] 在一个优选实施方案中,与在免疫接种前相对于针对 GlcNAc β 1-2 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号,针对 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号相比较,在用根据本发明的制剂免疫接种后,相对于针对 GlcNAc β 1-2 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号,针对 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号高 50%、更优选高至少 70% 和更加优选高 100%。

[0097] 在一个优选实施方案中,在用根据本发明的制剂免疫接种后,与针对 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号相比较,针对 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号高 30%、更优选高至少 50%、更优选高至少 70% 和更加优选高 100%。

[0098] 体液免疫应答测试 2 的一个优选实施方案在实施例 11 中详细描述。

[0099] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了针对核心-1 的体液免疫应答测试(体液免疫应答测试 3),其包括在流式细胞术测试中测试抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体与包含 NM-D4 或 NM-F9 和 NM-wt 或 NM-H9(或 NM-H9D8 DSM ACC2806)的细胞的结合,由此针对核心-1 的阳性体液免疫应答显示,与 NM-wt 或 NM-H9(未携带核心-1 抗原)相比较,所述抗体与 NM-D4 或 NM-F9(两者都携带核心-1 抗原)明显更高的结合,和/或在根据本发明的制剂施用后,所述抗体与 NM-D4 或 NM-F9 明显更高的结合。

[0100] 所述体液免疫应答测试 3 在流式细胞术测试中测试血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体与包含 NM-D4 或 NM-F9 和 NM-wt 或 NM-H9 的细胞的结合,由此针对核心-1 的阳性体液免疫应答显示,与 NM-wt 或 NM-H9 相比较,所述抗体与 NM-D4 或 NM-F9 明显更高的结合。在一个优选实施方案中,NM-D4 或 NM-F9 中的阳性细胞的百分比是 NM-wt 或 NM-H9 的那种的 2 倍,并且甚至进一步优选是 5 倍。

[0101] 在本发明的另一个优选实施方案中,流式细胞术结果依照下述公式进行计算:

[0102] (免疫样品对于 NM-D4 或 NM-F9 的阳性细胞% - 免疫前样品对于 NM-D4 或 NM-F9 的阳性细胞%)/(免疫样品对于 NM-wt 或 NM-H9 的阳性细胞% - 免疫前样品对于 NM-wt 或 NM-H9 的阳性细胞%) = X,由此(免疫样品对于 NM-wt 或 NM-H9 的阳性细胞% - 免疫前样品对于 NM-wt 或 NM-H9 的阳性细胞%) ≥ 1 ,并且由此如果 $X \geq 10$ 、更优选的 $X > 20$ 和更

加优选的 $X > 30$, 那么体液免疫应答测试是阳性的。

[0103] 体液免疫应答测试 3 的一个优选实施方案在实施例 11 中详细描述。

[0104] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了针对核心 -1 的体液免疫应答测试 4), 其包括在免疫荧光测试中关于其与包含 NM-D4 或 NM-F9 和 NM-wt 或 NM-H9 的细胞 (优选与经高碘酸盐处理的 NM-D4 或 NM-F9) 的结合测试抗体, 血清中的抗体, 或从血清、血浆或粪便中获得的抗体的结合, 由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示, 与 NM-wt 或 NM-H9 (未携带核心 -1 抗原) 或经高碘酸盐处理的 NM-D4 或 NM-F9 (其中核心 -1 抗原由于高碘酸盐处理而被破坏) 相比较, 所述特定量的一种或多种抗体与 NM-D4 或 NM-F9 (两者都携带核心 -1 抗原) 更高的结合, 和 / 或在根据本发明的制剂施用后, 所述抗体与 NM-D4 或 NM-F9 明显更高的结合。

[0105] 所述体液免疫应答测试 4 在免疫荧光测试中关于其与包含 NM-D4 或 NM-F9 和 NM-wt 或 NM-H9, 以及优选地经高碘酸盐处理的 NM-D4 或 NM-F9 的细胞的结合测试血清中的抗体, 或从血清、血浆或粪便中获得的抗体的结合, 由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示, 与 NM-wt 或 NM-H9 或者经高碘酸盐处理的 NM-D4 或 NM-F9 相比较, 所述抗体与 NM-D4 或 NM-F9 更高的结合。在一个优选实施方案中, 与 NM-D4 或 NM-F9 的结合在荧光强度中明显更高, 和 / 或在 NM-D4 或 NM-F9 细胞中的荧光阳性细胞的百分比高于在用高碘酸盐处理后在 NM-D4 或 NM-F9 中的荧光阳性细胞的百分比。免疫荧光测试可以通过抗血清的系列稀释和 / 或通过相同曝光条件下获取照片来更定量地进行。

[0106] 关于体液免疫应答的核心 -1 阳性的其他合适测试是在免疫荧光或流式细胞术分析中使用各种核心 -1 阳性细胞, 例如 ZR-75-1、CAMA-1、KG-1、A-204, 以及核心 -1 阴性细胞系例如 BT-20、HT-29, 或其他核心 -1 携带分子例如 Gal β 1-3 GalNAc α 1-BSA 或 Gal β 1-3GalNAc α 1-KLH, 或含核心 -1 的糖肽, 含或不含细胞或抗原的高碘酸盐处理, 并且优选与不含核心 -1 的相应阴性分子例如 BSA 组合, 或与唾液酸化的核心 -1 结构组合 (在合适的测试系统中, 优选在 ELISA、流式细胞术或免疫荧光中)。原则上, 如上文描述的测试 1-4 中使用的, 与聚丙烯酰胺或载体蛋白质例如血型糖蛋白蛋白质主链或脂质偶联的相同碳水化合物结构, 当与其他载体分子偶联时也可以使用, 所述其他载体分子例如蛋白质主链、或肽或多肽、或脂质、或化学结构, 例如 BSA、KLH 或限定的较短的肽或化学结构例如用于层析法中的柱床的那些。本领域技术人员能够鉴定合适的载体分子, 并且使合适的结构偶联, 以获得含或不含接头的与载体分子偶联的所需碳水化合物结构。本领域技术人员还能够选择那些用或不用高碘酸盐处理的细胞或抗原, 并且选择和修改合适的方法以测试关于核心 -1 的体液免疫应答。然而, 由本发明提供的前述体液免疫应答测试 1-4 和特别地其优选组合显然是优选的, 并且还如由实施例可见的, 就特异性而言具有明显优点。

[0107] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了针对核心 -1 的体液免疫应答测试 (体液免疫应答测试 5), 其包括,

[0108] a.) 使由合适量的铕或铬 -51 标记的, 合适量的 ZR75-1、NM-D4、NM-F9、NM-H9 和 / 或 NM-wt 与合适量的抗体, 血清中的抗体, 或从血清、血浆或粪便中获得的抗体, 以及合适量的补体一起温育合适的时间 (一般为 3-5 小时或过夜)

[0109] b.) 通过测定铕或铬 -51 在 (a) 下温育后的释放来测量细胞的裂解, 由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示, 与 NM-wt 或 NM-H9 相比较, NM-D4 或 NM-F9 细胞更高的裂

解,或者它显示与不含补体的裂解、和 / 或不含抗体的裂解、和 / 或含与 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 不结合或结合较少的一种或多种抗体的裂解相比较,NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 更高的裂解。

[0110] 所述体液免疫应答测试 5 在靶细胞裂解测试中测试所诱导的体液免疫应答或核心 -1 特异性抗体的核心 -1 特异性补体依赖性细胞毒性 (CDC)——由某些抗体介导的效应机制。测试包括使由合适量的标记的核心 -1 阳性靶细胞例如 ZR75-1、优选 NM-D4 或 NM-F9, 与合适量的血清中的抗体或从血清中获得的抗体、或分离的核心 -1 抗体以及合适量的补体一起温育合适的时间,一般为 3-5 小时。核心 -1 阳性肿瘤细胞用铈或铬 -51 进行标记,这允许测量裂解的细胞。裂解细胞的量优选通过在温育后测量铈或铬 -51 的释放进行测定。合适的对照可以由本领域技术人员来确定,例如核心 -1 阴性细胞优选 NM-wt 和 / 或 NM-H9、与靶细胞不结合的抗体或抗体混合物、和 / 或不含补体。测试可以通过本领域技术人员关于其在本发明中的用途和如所述的就合适量的抗体、标记肿瘤细胞的数目、补体的浓度和温育时间进行优化。

[0111] 本发明的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 优选使用铈释放测定法进行测定。靶细胞 NM-D4 在 800 μ l 铈缓冲液 (50mM HEPES, pH 7.4, 93mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 10mM 二乙三胺五乙酸、2mM 乙酸铈 (III)) 中于 4°C 温育 10 分钟,在 Multiporator (Eppendorf) 中进行电穿孔 (710V, 1 次脉冲, 30 μ s), 并且随后在冰上温育另外 10 分钟。其后,细胞在 RPMI/5% FCS 中洗涤 5 次,并且种植在 96 孔圆底平板 (Munc; 5×10^3 /孔) 中。加入以各种稀释度的 20 μ l 包含抗体的溶液或相应对照 (培养基、同种型对照人 IgM) 后,使样品在室温下温育 20 分钟。向相应孔中加入 10 μ l 1 : 10 稀释的补体 (幼兔补体)。在对照孔中,加入 10 μ l RPMI/5% FCS 代替补体溶液。对于自发性释放的测定,使靶细胞与培养基单独一起温育,并且最大释放通过用乙醇使靶完全裂解进行测定。于 37°C 温育 4 小时后,使平板在 500xg 下离心 5 分钟,并且将来自每个孔的 20 μ l 无细胞上清液吸取到在先前制备的平底平板 (Nunc-Immunoplate Maxisorp) 上的 200 μ l/孔增强溶液 (Perkin-Elmer Wallac) 中。在室温下温育 15 分钟后,测定荧光 (Victor² Fluorometer, Perkin-Elmer Wallac)。特异性细胞毒性得自等式 (实验裂解 - 自发性裂解) / (最大裂解 - 自发性裂解) $\times 100\%$ 。

[0112] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了针对核心 -1 的体液免疫应答测试 (体液免疫应答测试 6),其包括,

[0113] a) 使由合适量的铈或铬 -51 标记的,合适量的 ZR75-1、NM-D4、NM-F9、NM-H9 和 / 或 NM-wt 与合适量的抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体,以及合适量的至少一种免疫效应细胞或包含免疫效应细胞或外周血单核细胞的细胞混合物一起温育合适的时间,一般为 3-5 小时或过夜和

[0114] b) 通过测定铈或铬 -51 在 (a) 下温育后的释放来测量细胞的裂解,由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示,与 NM-wt 或 NM-H9 相比较, NM-D4 或 NM-F9 细胞明显更高的裂解,或者它显示与不含抗体的裂解、和 / 或含与 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 不结合或结合较少的一种或多种抗体的裂解相比较, NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 明显更高的裂解。

[0115] 所述体液免疫应答测试 6 在与免疫效应细胞组合的靶细胞裂解测试中测试所诱导的体液免疫应答或核心 -1 特异性抗体的核心 -1 特异性抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)——由某些抗体介导的效应机制。测试包括使由合适量的标记的核心 -1 阳性靶细胞例如

ZR75-1、优选 NM-D4 或 NM-F9,与合适量的血清中的抗体或从血清中获得的抗体、或分离的核心-1 抗体以及合适量的免疫效应细胞(例如 PBMC(外周血单核细胞)中存在的那些)一起温育合适的时间,一般为 3-5 小时或过夜。核心-1 阳性肿瘤细胞用铈或铬-51 进行标记,这允许测量裂解的细胞。裂解细胞的量优选通过在温育后测量铈或铬-51 的释放进行测定。合适的对照可以由本领域技术人员来确定,例如核心-1 阴性细胞(优选 NM-wt 和 NM-H9)、与靶细胞不结合的抗体或抗体混合物、和/或不含免疫效应细胞(例如 PBMC)。测试可以通过本领域技术人员关于其在本发明中的用途就合适量的抗体、标记肿瘤细胞的数目、免疫效应细胞的数目和温育时间进行优化。

[0116] 本发明的抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 优选使用铈释放测定法进行测定。靶细胞 NM-D4 在 800 μ l 铈缓冲液(50mM HEPES, pH 7.4, 93mM NaCl、5mM KCl、2mM MgCl₂、10mM 二乙三胺五乙酸、2mM 乙酸铈(III)) 中于 4℃温育 10 分钟,在 Multiporator(Eppendorf) 中进行电穿孔(710V, 1 次脉冲, 30 μ s), 并且随后在冰上温育另外 10 分钟。其后,细胞在 RPMI/5% FCS 中洗涤 5 次,并且种植在 96 孔圆底平板(Munc ;5x10³/孔) 中。加入以各种浓度(在 200 μ l 温育体积中 0.05-50 μ g/ml 的终浓度)的 20 μ l 核心-1 特异性抗体或相应对照(培养基、同种型对照 IgG) 后,加入 PBMC(人类外周血单核细胞, 80 μ l) 作为效应细胞,其中使用 100 : 1-10 : 1 的不同效应细胞/靶细胞比,优选 50 : 1。为了测定自发性释放,加入不含效应细胞的 80 μ l RPMI/5% FCS。最大释放在用乙醇使靶完全裂解后进行测定。

[0117] 于 37℃温育 4 小时后,使平板在 500xg 下离心 5 分钟,并且将来自每个孔的 20 μ l 无细胞上清液吸取到在先前制备的平底平板(Nunc-Immunoplate Maxisorp) 上的 200 μ l/孔增强溶液(Perkin-Elmer Wallac) 中。在室温下温育 15 分钟后,测定荧光(Victor² Fluorometer, Perkin-Elmer Wallac)。特异性细胞毒性得自等式(实验裂解-自发性裂解)/(最大裂解-自发性裂解)x100%。

[0118] 在一个优选实施方案中,所述体液免疫应答测试 1-6 进一步包括在测试前

[0119] a. 给人类或动物施用营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂

[0120] b. 分离抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体。

[0121] 在一个优选实施方案中,本发明提供了用于测试如本文其他地方描述的制剂、或核心-1 阳性微生物、或其部分或裂解物在人类或动物中诱导或增强针对核心-1 的体液免疫应答的能力的体液免疫应答测试,其包括,

[0122] a) 给人类或动物施用如本文其他地方描述的所述制剂、所述核心-1 阳性微生物或所述其裂解物或部分;和

[0123] b) 分离抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体;和

[0124] c) 在下述测定法中测试所述抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体的结合

[0125] (i) 在 ELISA 中测试与糖蛋白的结合,所述糖蛋白包括无唾液酸血型糖蛋白和血型糖蛋白、或无唾液酸血型糖蛋白和经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白、或无唾液酸血型糖蛋白和血型糖蛋白和经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白,由此针对核心-1 的阳性体液免疫应答显示,与血型糖蛋白和/或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的结合相比较,所述一种或多种抗体与无唾液酸血型糖蛋白的结合明显更高,以及与在所述制

剂、所述核心 -1 阳性微生物或所述其裂解物或部分施用前,从同一动物或人类中相应分离的一种或多种抗体相比较,所述一种或多种抗体与无唾液酸血型糖蛋白明显更高的结合;和 / 或

[0126] (ii) 在 ELISA 中测试与和聚丙烯酰胺偶联的碳水化合物结构 (PAA 缀合物) 的结合,所述 PAA 缀合物包含 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA、Gal β 1-3 GalNAc β 1-PAA、GlcNAc β 1-2 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA, 和优选地高碘酸盐处理的 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA,由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示,与在所述制剂、所述核心 -1 阳性微生物或所述其裂解物或部分施用前,从同一动物或人类中相应分离的一种或多种抗体相比较,所述一种或多种抗体与 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA 明显更高的结合;和 / 或

[0127] (iii) 在流式细胞术测试中关于与包含 NM-D4 或 NM-F9 和 NM-wt 或 NM-H9 的细胞的结合,由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示,与 NM-wt 或 NM-H9 相比较,所述抗体与 NM-D4 或 NM-F9 明显更高的结合,以及与在所述制剂、所述核心 -1 阳性微生物或所述其裂解物或部分施用前,从同一动物或人类中相应分离的一种或多种抗体相比较,所述抗体与 NM-D4 或 NM-F9 明显更高的结合;和 / 或

[0128] (iv) 在免疫荧光测试中关于与包含 NM-D4 或 NM-F9、和 NM-wt 或 NM-H9、以及优选地经高碘酸盐处理的 NM-D4 或 NM-F9 的细胞的结合,由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示,与 NM-wt 或 NM-H9 或者经高碘酸盐处理的 NM-D4 或 NM-F9 相比较,特定量的所述一种或多种抗体与 NM-D4 或 NM-F9 明显更高的结合,以及与在所述制剂、所述核心 -1 阳性微生物或所述其裂解物或部分施用前,从同一动物或人类中相应分离的一种或多种抗体相比较,特定量的所述一种或多种抗体与 NM-D4 或 NM-F9 明显更高的结合;

[0129] 和 / 或

[0130] d) 测试所述抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体的活性,其包括

[0131] (i) 使由合适量的铈或铬 -51 标记的,合适量的 ZR75-1、NM-D4、NM-F9、NM-H9 和 / 或 NM-wt 与合适量的抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体,以及合适量的补体一起温育合适的时间,一般为 3-5 小时,并且通过测定铈或铬 -51 在温育后的释放来测量所述细胞的裂解,由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示,与 NM-wt 或 NM-H9 相比较, NM-D4 或 NM-F9 细胞明显更高的裂解,或者它显示与下述相比较, NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 更高的裂解:不含补体的裂解、和 / 或不含抗体的裂解、和 / 或含与 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 不结合或结合较少的一种或多种抗体的裂解、和 / 或含与在所述制剂、所述核心 -1 阳性微生物或所述其裂解物或部分施用前,从同一动物或人类中相应分离的一种或多种抗体的 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 的裂解;和 / 或

[0132] (ii) 使由合适量的铈或铬 -51 标记的,合适量的 ZR75-1、NM-D4、NM-F9、NM-H9 和 / 或 NM-wt 与合适量的抗体,血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体,以及合适量的至少一种免疫效应细胞或包含免疫效应细胞或外周血单核细胞的细胞混合物一起温育合适的时间,一般为 3-5 小时或过夜,并且通过测定所述标记 (例如铈或铬 -51) 在温育后的释放来测量所述细胞的裂解,由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示,与 NM-wt 或 NM-H9 相比较, NM-D4 或 NM-F9 细胞明显更高的裂解,或者它显示与下述相比较, NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 更高的裂解:不含抗体的裂解、和 / 或含与 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 不结

合或结合较少的一种或多种抗体的裂解、和 / 或含与在所述制剂、所述核心 -1 阳性微生物或所述其裂解物或部分施用前,从同一动物或人类中相应分离的一种或多种抗体的 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 裂解。

[0133] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分或裂解物的营养食品或药物制剂诱导针对核心 -1 的体液免疫应答,其对于上文描述的体液免疫应答测试 1-6 中的至少 2 种体液免疫应答测试是阳性的,优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 6 是阳性的,和更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 是阳性的,和最优选对于所有 6 种体液免疫应答测试是阳性的。

[0134] 所述针对核心 -1 的细胞免疫应答测试是针对核心 -1 的 T 细胞应答,其可以例如通过本文描述的细胞免疫应答测试 1-5 中的至少一个 进行检测。更优选地它是针对核心 -1 的细胞免疫应答,其是针对核心 -1 的细胞毒性 T 细胞应答或辅助性 T 细胞应答。更加优选地是针对核心 -1 的细胞免疫应答,其是针对核心 -1 的细胞毒性 T 细胞应答和辅助性 T 细胞应答,其可以通过本文描述的细胞免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 进行检测。最优选地是针对核心 -1 的细胞免疫应答,其是针对核心 -1 的细胞毒性 T 细胞应答和 Th1 型辅助性 T 细胞应答,其可以通过本文描述的细胞免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 进行检测。

[0135] 所述细胞免疫应答测试包括使装载有核心 -1 微生物的树突状细胞与免疫细胞接触,并且以合适的时间和合适的条件下培养,然后加入合适量的装载有至少一种核心 -1 携带分子的树突状细胞用于再刺激,并且以合适的时间和条件下培养,然后测量分泌的 GM-CSF、TNF α 或 INF γ 的量,或测量 T 细胞的增殖,或 GM-CSF、TNF α 或 INF γ 分泌的抑制,或经由针对核心 -1 的抗体的增殖,或测量核心 -1 在树突状细胞上的呈递,或测量经由活化免疫细胞优选活化 T 细胞的核心 -1 阳性细胞的裂解。

[0136] 所述树突状细胞,在本文中也称为 DC,可以是任何树突状细胞、或树突状细胞的混合物、或包含树突状细胞或至少一种树突状细胞的细胞混合物。它们可以衍生自人类供体或来自动物,所述人类供体可以是健康的或患有疾病,例如但不限于肿瘤疾病、或克罗恩氏病、或核心 -1 阳性疾病、或本文其他地方列出的疾病之一。所述 DCs 可以如本领域技术人员已知的来获得和装载,并且一般得自来自人类血液或骨髓的 CD34 阳性前体细胞或 CD14 阳性单核细胞,其使用本领域技术人员已知的合适分子的某些组合而分化成未成熟的树突状细胞 (iDC)。iDCs 装载有核心 -1 阳性微生物或核心 -1 携带分子、或合适的对照,并且使用本领域技术人员已知的合适分子的某些组合进一步成熟,以获得对应于能够活化 T 细胞的装载的成熟树突状细胞 (mDC) 的树突状细胞。

[0137] 所述 DCs 也可以源自树突状细胞系,例如但不限于人树突状细胞系 NEMOD-DC (可从 Glycotope GmbH Berlin, 德国 ;www.glycotope.com 获得) 或 Mutz-3。

[0138] 所述树突状细胞的装载意指树突状细胞在合适的分化和成熟状态下与合适量的核心 -1 阳性微生物、或其部分或裂解物或至少一种核心 -1 携带分子一起温育合适的时间,一般这在上文描述的成熟步骤内与合适的分子组合而发生,一般为 24-48 小时,导致能够活化免疫细胞、优选 T 细胞,包含核心 -1 特异性 T 细胞的装载的树突状细胞。

[0139] 所述免疫细胞可以是 PBMC (外周血单核细胞) 或包含 CD4+ 和 / 或 CD8+ T 细胞的

其他细胞群体,优选 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞。本领域技术人员了解如何从人类或动物中获得这些细胞,并且这些细胞的产生可以包含通过蔗糖梯度来自人类血液或 leukaphereses 的血细胞的制剂,并且在某些情况下可以包含通过 T 细胞特异性磁分选技术进一步富集。

[0140] 在一个优选实施方案中,树突状细胞可以在至少一种 MHC 类分子中与免疫细胞匹配,优选在 MHC I 类分子或 MHC II 类分子中,更优选在至少一种 MHC I 类分子和一种 MHC II 类分子中,更优选在多种 MHC 分子中和最优选在所有 MHC 分子中。后者可以通过从同一个体获得树突状细胞和免疫细胞来达到。

[0141] 用于培养具有装载的树突状细胞的免疫细胞以及用于随后加入的装载的树突状细胞的所述合适的时间和条件是本领域技术人员已知的,并且可以通过考虑细胞所处条件进行优化。一般地,温育时间对于 2 个步骤(初步活化和再刺激)中的每一个为 7-10 天。

[0142] 所述核心-1 携带分子就所描述的细胞免疫应答测试而言意指,足够量的携带核心-1 的细胞或肿瘤细胞、携带核心-1 的蛋白质、或携带核心-1 的多肽。所述携带核心-1 的细胞或肿瘤细胞可以是活的或死的,或来自这些细胞的裂解物或其部分,更优选是裂解物。携带核心-1 的蛋白质可以是携带核心-1 的任何蛋白质,例如在其上核心-1 在肿瘤上结合的载体蛋白质。携带核心-1 的多肽可以是携带核心-1 的任何多肽,优选可以与核心-1 一起呈现在 mDC 上的那些。

[0143] 所述核心-1 阳性微生物就所描述的细胞免疫应答测试而言意指,足够量的特定核心-1 阳性微生物,其可以是活的或死的,或来自这些细胞的裂解物或其部分,更优选是其裂解物或部分。

[0144] 对照应用于进一步证实免疫应答的阳性。本领域技术人员能够像这样使用合适的对照,其在下文和实施例 12 中更详细地描述。例子是如对于核心-1 携带分子描述的装载在 DC 上且用于再刺激的对照的使用,并且可以包含 (i) 对于核心-1 是阴性的细胞,优选尽可能紧密地类似核心-1 阳性细胞如核心-1 携带分子的那些,以相应的形式例如活的或死的,或来自这些细胞的裂解物或其部分;(ii) 未携带核心-1 的蛋白质,优选与用作核心-1 携带分子相同但不含核心-1 的蛋白质,优选不含任何糖基化或含唾液酸化的核心-1 结构,(iii) 未携带核心-1 的多肽,优选与用作核心-1 携带分子相同但不含核心-1 的多肽,优选不含任何糖基化或含唾液酸化的核心-1 结构或 Tn 结构 (GalNAc α 1-0-Ser/Thr)。另外的对照可以是 (iv) 以与装载有核心-1 携带分子的 mDC 相同的方式处理的未装载的 mDC,包括用于成熟的必需分子和条件,但不含对应于核心-1 携带分子或上文提及的对照 (i-iii) 的任何额外分子。例子和优选实施方案详细描述最合适的对照,而其他合适的对照可以由本领域技术人员进行选择。

[0145] 在本发明的一个优选实施方案中,树突状细胞是得自白血病细胞系 MUTZ-3 (DSMZ ACC295) 的功能性树突状细胞,或衍生自 MUTZ-3 的细胞例如 NEMO-DC [如 DE10139428 A1、WO2003/023023 A1、EP01419240、US20040265998、CA2457287、10139428.4 (DE)、PCT/EP02/09260、02758474.7 (EP)、US10/486,966、CA2,457,287) 中描述的], 并且可从 Glycotope GmbH Berlin, 德国 [www.Glycotope.com] 获得。这些树突状细胞是活性树突状细胞,其完全能够活化 T 细胞,并且能够在其表面上包括在 MHC 类分子上加工和/或呈递抗原。在本发明的一个进一步优选的实施方案中,树突状细胞是得自 MUTZ-3 的功能性树突状细胞,或衍生自 MUTZ-3 的细胞,例如 NMD-200,并且免疫细胞在 MHC I 类分子中匹配,例如

HLA-A2 或 HLA-B44, 优选 HLA-A2 和 HLA-B44。在一个进一步优选的实施方案中, NM-D4 或 NM-F9 的裂解物用作核心 -1 携带分子, 和 NM-wt [其是如 W02005/017130 A2 和 EP1654353 中描述的 NM-D4 或 NM-F9 的亲代细胞] 或 NM-H9 [NM-H9D8, DSM ACC2806], 其在唾液酸化的潜能方面不同, 并且因此的确在其表面上不携带核心 -1 (与 NM-D4 和 NM-F9 形成对比), 以相应的形式例如活的或死的作为对照, 或来自这些细胞的裂解物或其部分, 更优选的是裂解物, 两者都装载到 DC 上且用于再刺激。在另一个优选实施方案中, 血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白作为关于无唾液酸血型糖蛋白的对照, 各自装载到 DC 上且用于再刺激。在一个更优选的实施方案中, NM-D4 或 NM-F9 的裂解物和无唾液酸血型糖蛋白用作核心 -1 携带分子用于再刺激, 和 NM-wt [NM-H9] 和血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白和 / 或未装载的 DC 用作阴性对照。

[0146] 由于特别是一般对于本领域技术人员已知的细胞免疫学方法的实验间差异, 对照必须如本领域技术人员已知的与测试平行建立。

[0147] 根据一个实施方案, 本发明提供了针对核心 -1 的体外细胞免疫应答测试, 其包括

[0148] a.) 使至少一种树突状细胞装载有第一核心 -1 阳性化合物, 其中所述核心 -1 阳性化合物携带核心 -1 ;

[0149] b.) 使装载有所述核心 -1 阳性化合物的合适量的所述至少一种树突状细胞与合适量的免疫细胞接触, 所述免疫细胞可以被树突状细胞活化或抑制 ;

[0150] c.) 培养以便允许所述免疫细胞与所述装载的树突状细胞相互作用 ;

[0151] d.) 加入装载有合适量的至少一种携带核心 -1 的第二化合物的合适量的抗原呈递细胞 (APC), 其中所述第二化合物不同于所述第一核心 -1 阳性化合物 ;

[0152] e.) 培养用于所述免疫细胞的再刺激

[0153] f.) 测定再刺激的免疫细胞的量。

[0154] 本发明提供了用于测定一般而言的核心 -1 阳性微生物或化合物 是否能够触发细胞免疫应答的方法。迄今为止现有技术假定碳水化合物无法触发细胞免疫应答。然而, 目前已发现某些碳水化合物表位能够引发细胞免疫应答。因此提供测试系统用于测定某些碳水化合物表位 (在本文中为核心 -1) 是否处于事实上能够触发分别的应答的呈递形式 (例如通过根据本发明的核心 -1 阳性微生物或核心 -1 缀合物), 由此测定所述核心 -1 阳性化合物是否是合适的治疗 / 营养食品, 这是重要的。本发明因此使用树突状细胞, 因为树突状细胞能够引发且因此刺激免疫细胞, 例如 T 细胞。树突状细胞加工它们遇到的化合物, 并将所加工的化合物 / 抗原呈递在其表面上。然而, MHC 细胞例如树突状细胞仅能够呈递某些种类的抗原, 并且确定核心 -1 表位——在其在微生物或载体上的环境中——是否能够由树突状细胞以正确形式呈递, 这是重要的, 因为只有那样这些化合物 / 微生物能够引发细胞免疫应答。这种细胞免疫应答测试的原理也在图 23 中举例说明。

[0155] 因此, 使树突状细胞装载有目的核心 -1 阳性化合物。所述化合物可以例如是如本文所描述的携带核心 -1 的微生物、携带核心 -1 的肿瘤细胞或任何其他化合物。用于装载的合适条件和携带碳水化合物结构的合适化合物如本文所描述的。

[0156] 所述装载的树突状细胞随后与免疫细胞接触, 特别是淋巴细胞例如 T 细胞。免疫细胞可以例如从人类供体获得。呈递匹配免疫细胞的受体的抗原的树突状细胞活化且因此刺激淋巴细胞, 从而允许它们增殖且存活。不匹配由树突状细胞呈递的抗原的淋巴细胞是

未活化的且死亡。

[0157] 这个第一轮刺激提供活化的淋巴细胞,其对于由所述装载的树突状细胞呈递的任何相应的抗原(包括可能呈递的核心-1)是特异的。然而,本方法的目的是鉴定包含目的碳水化合物表位/抗原(在本文中为核心-1)的化合物是否能够刺激针对核心-1特异的细胞应答。

[0158] 因此,执行选择步骤,其中淋巴细胞进行再刺激,以便确定核心-1是否刺激淋巴细胞,且因此触发细胞应答。在所述选择步骤中,抗原呈递细胞例如树突状细胞装载有也携带核心-1的第二化合物。然而,所述第二化合物不同于第一化合物。例如,第一化合物是携带核心-1的微生物,并且第二化合物是携带核心-1的肿瘤细胞。这种第二化合物也由APCs加工,并且抗原由所述APCs呈递。因为第二化合物不同于第一化合物,大多数呈递的抗原,优选所有抗原是——除核心-1外——不同于第一轮中呈递的抗原。这具有这样的效应,仅这些淋巴细胞经受住第二轮再刺激,其发现由所述APCs呈递的匹配抗原,即核心-1。在第一轮的树突状细胞以及第二轮的APCs都呈递包含核心-1或由核心-1(或在免疫学上模拟核心-1的结构)组成的抗原的情况下,识别所述抗原的淋巴细胞被刺激,且当它们也被再刺激时存活。未发现匹配配偶体的那些淋巴细胞当与装载有所述第二核心-1阳性化合物的所述APCs接触时,由于缺乏再刺激而死亡。这个选择步骤确保检测出针对核心-1的细胞应答。

[0159] 在最后一个步骤中,确定淋巴细胞是否真正被再刺激。这可以例如通过测定下述来完成

[0160] -如果所述淋巴细胞是(再)刺激的,那么分泌的淋巴细胞的分泌产物,例如干扰素 α 、干扰素 γ 或GM-CSF

[0161] -T细胞的增殖。

[0162] 用于测定再刺激是否发生的合适测试在本文中得到描述。

[0163] 所述测试的特异性可以通过使用碳水化合物结合结构得到增强,其特异性识别核心-1,当由树突状细胞/APCs呈递时。根据所述实施方案,根据步骤c)至少部分所述刺激的淋巴细胞与装载有合适量的至少一种第二核心-1阳性化合物的抗原呈递细胞(APC)接触,其中所述第二化合物不同于所述第一碳水化合物阳性化合物,在识别核心-1的核心-1结合分子的存在下。所述核心-1结合分子阻断APCs与所述淋巴细胞的相互作用,由此阻止再刺激且因此阻止细胞的存活。这个另外的步骤进一步确保目的碳水化合物特异性刺激淋巴细胞,且因此触发特异性细胞免疫应答。这个特异性增强/证实步骤可以平行——通过根据步骤c)使刺激的淋巴细胞分开——或通过另外且因此其后执行所述增强/证实步骤来完成。合适的核心-1结合分子,优选抗体在本文中得到描述。

[0164] 根据一个实施方案,本发明提供了针对核心-1的细胞免疫应答测试(细胞免疫应答测试1),其包括

[0165] a.)使合适量的树突状细胞与合适量的免疫细胞接触,所述树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,其装载有合适量的本发明的核心-1阳性微生物、其裂解物或部分、包含这些的制剂、营养食品或药物组合物,所述免疫细胞包括至少一种免疫细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、包含至少一种T细胞或外周血单核细胞的细胞混合物,其可以由树突状细胞活化或抑制

[0166] b.) 以合适的时间和合适的条件下培养

[0167] c.) 加入合适量的树突状细胞, 所述树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物, 其装载有合适量的至少一种核心 -1 携带分子

[0168] d.) 以合适的时间和合适条件下培养以用于再刺激

[0169] e) 例如通过 ELISA 或 ELISPOT 测量分泌的 GM-CSF 的量, 由此针对核心 -1 的阳性细胞免疫应答显示, 与用相应未装载的树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF 分泌相比较, 用装载有核心 -1 携带分子的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 GM-CSF 分泌, 和 / 或与用装载有未携带核心 -1 的分子的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF 分泌相比较, 用装载有核心 -1 携带分子的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 GM-CSF 分泌, 和 / 或与用装载有血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF 分泌相比较, 用装载有无唾液酸血型糖蛋白的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 GM-CSF 分泌, 和 / 或与用装载有 NM-wt 或 NM-H9 的裂解物的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF 分泌相比较, 用装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物或部分的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 GM-CSF 分泌。

[0170] 相应的免疫细胞意指相同的免疫细胞 (其是或包括至少一种免疫细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、包含至少一种 T 细胞或外周血单核细胞的细胞混合物, 或其他地方描述的细胞和细胞混合物, 其可以由树突状细胞活化或抑制) 用于对照或比较测试, 其中使用对照或测试分子、分子混合物、细胞、细胞裂解物或部分、微生物或其部分, 与用于所述免疫细胞的那些相比较以便允许比较。

[0171] 相应树突状细胞意指相同的树突状细胞 (其是或包括至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞或其他地方描述的细胞的细胞混合物, 和能够活化 T 细胞的细胞混合物, 其装载有合适量的至少一种核心 -1 携带分子) 用于对照或比较测试, 其中使用对照或测试分子、分子混合物、细胞、细胞裂解物或部分、微生物或其部分或不含任何一种, 与用于所述树突状细胞的那些相比较以便允许比较。

[0172] 这是本领域技术人员已知的, 并且它们可以由本领域技术人员进行选择。这在实施例中更详细地显示。为了清晰起见: 例如, 来自相同制剂的相同量的免疫细胞与来自相同制剂的相同量的树突状细胞接触, 所述树突状细胞装载有相同量的无唾液酸血型糖蛋白和平行地相同量的血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白, 并且在测试中使用以便允许最佳可比性。

[0173] 变化是本领域技术人员已知的, 并且可以通过他们或实施例中更详细地描述的进行测试。

[0174] 所述细胞免疫应答测试 1 通过测量特异性诱导的 GM-CSF 分泌, 来测试 CD4+ 和 / 或 CD8+T 细胞经由核心 -1 阳性微生物至核心 -1 特异性 CD4+ 和 / 或 CD8+ 活化 T 细胞的活化, 其包括使装载有核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分的树突状细胞与免疫细胞接触, 并且以合适的时间和条件下培养, 随后加入装载有核心 -1 携带分子的树突状细胞用于再刺激, 并且培养合适的时间和条件, 然后测量响应这种再刺激分泌的 GM-CSF 量。所述分泌的 GM-CSF 量的测量优选通过 ELISA 或 ELISPOT 来完成, 更优选 ELISA, 并且是本领域技术人员已知的。在本发明最优选的实施方案中, 细胞免疫应答测试 1 包括使得自衍生自 MUTZ-3 的细胞、装

载有核心-1 阳性微生物的功能性树突状细胞与至少在 MHC I 类 (HLA-A2) 和 (HLA-B44)) 中匹配的 PBMC (外周血单核细胞) 接触, 并且使这些细胞以合适的时间和条件下培养, 一般为 7-10 天, 然后加入得自衍生自 MUTZ-3 的细胞、装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物、或装载有无唾液酸血型糖蛋白的功能性树突状细胞用于再刺激, 并且以合适的时间和条件下培养, 一般为 7-9 天, 然后在 ELISA 或 ELISPOT 分析中测量分泌的 GM-CSF 量。GM-CSF 释放的 ELISA 和 ELISPOT 分析是本领域技术人员已知的, 并且在实施例 12 中详细描述。针对核心-1 的阳性细胞免疫应答显示, 与用装载有 NM-wt 或 NM-H9 的裂解物的 DC 再刺激的免疫细胞的分泌相比较, 用装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物的 DC 再刺激的免疫细胞更高的 GM-CSF 分泌, 和 / 或它显示与用装载有血型糖蛋白的 DC 再刺激的免疫细胞相比较, 用装载有无唾液酸血型糖蛋白的 DC 再刺激的免疫细胞更高的 GM-CSF 分泌。在一个优选实施方案中, 用 NM-D4 或 NM-F9 诱导的 GM-CSF 分泌比用 NM-wt 诱导的那种高 2 倍, 更优选高 3 倍。在一个优选实施方案中, 用无唾液酸血型糖蛋白诱导的 GM-CSF 分泌比用血型糖蛋白诱导的那种高 2 倍, 更优选高 3 倍。细胞免疫应答测试 1 的一个优选实施方案在实施例 12 中详细描述。

[0175] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了针对核心-1 的细胞免疫应答测试 (细胞免疫应答测试 2), 其包括

[0176] a.) 使合适量的树突状细胞与合适量的免疫细胞接触, 所述树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物, 并装载有合适量的本发明的核心-1 阳性微生物、其裂解物或部分、包含这些的制剂、营养食品或药物组合物, 所述免疫细胞包括至少一种免疫细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、包含至少一种 T 细胞或外周血单核细胞的细胞混合物, 其可以由树突状细胞活化或抑制

[0177] b.) 以合适的时间和合适的条件下培养

[0178] c.) 加入合适量的树突状细胞, 所述树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物, 其装载有合适量的至少一种核心-1 携带分子

[0179] d.) 以合适的时间和合适条件下培养以用于再刺激

[0180] e) 通过 ELISA 或 ELISPOT 测量分泌的 IFN γ 和 / 或分泌的 TNF α 的量, 由此针对核心-1 的阳性细胞免疫应答显示, 与用相应未装载的树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有核心-1 携带分子的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌, 和 / 或与用装载有未携带核心-1 的分子的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有核心-1 携带分子的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌, 和 / 或与用装载有血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有无唾液酸血型糖蛋白的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌, 和 / 或与用装载有 NM-wt 或 NM-H9 的裂解物的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物或部分的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞更高的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌。

[0181] 所述细胞免疫应答测试 2 通过测量特异性诱导的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌, 来测试细胞毒性 T 细胞例如 CTL (细胞毒性 T 淋巴细胞) 和或 Th1 (细胞毒性 T 辅助性细胞) 经由核心-1 阳性微生物至核心-1 特异性活化的细胞毒性 T 细胞的活化, 其包括使装载有核

心-1 微生物的树突状细胞与免疫细胞接触,并且以合适的时间和条件下培养,随后加入装载有核心-1 携带分子的树突状细胞用于再刺激,并且培养合适的时间和条件,然后测量响应这种再刺激分泌的 IFN γ 和 / 或分泌的 TNF α 量。所述分泌的 IFN γ 和 / 或 TNF α 量的测量优选通过 ELISA 或 ELISPOT 来完成,更优选 ELISPOT,并且是本领域技术人员已知的。在本发明最优选的实施方案中,细胞免疫应答测试 2 包括使得自衍生自 MUTZ-3 的细胞、装载有核心-1 阳性微生物的功能性树突状细胞与至少在 MHC I 类 (HLA-A2 和 HLA-B44) 中匹配的 PBMC (外周血单核细胞) 接触,并且使这些细胞以合适的时间和条件下培养,一般为 7-10 天,然后加入得自衍生自 MUTZ-3 的细胞、装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物、或装载有无唾液酸血型糖蛋白的功能性树突状细胞用于再刺激,并且以合适的时间和条件下培养,一般为 7-9 天,然后通过 ELISPOT 分析测量分泌的 IFN γ 量和 / 或通过 ELISA 分析测量分泌的 TNF α 量。TNF α 和 IFN γ 的 ELISA 和 ELISPOT 分析是本领域技术人员已知的,并且在实施例 12 中详细描述。针对核心-1 的阳性细胞免疫应答显示,与用装载有 NM-wt 或 NM-H9 的裂解物的 DC 再刺激的免疫细胞的分泌相比较,用装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物的 DC 再刺激的免疫细胞更高的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌,和 / 或它显示与用装载有血型糖蛋白的 DC 再刺激的免疫细胞相比较,用装载有无唾液酸血型糖蛋白的 DC 再刺激的免疫细胞更高的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌。在一个优选实施方案中,用 NM-D4 或 NM-F9 诱导的 IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌比用 NM-wt 诱导的那种高 2 倍,更优选高 3 倍。在一个优选实施方案中,用无唾液酸血型糖蛋白诱导的 GM-CSF 分泌比用血型糖蛋白诱导的那种高 2 倍,更优选高 3 倍。细胞免疫应答测试 2 的一个优选实施方案在实施例 12 中详细描述。

[0182] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了针对核心-1 的细胞免疫应答测试 (细胞免疫应答测试 3),其包括

[0183] a.) 使合适量的树突状细胞与合适量的免疫细胞接触,所述树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,装载有合适量的本发明的核心-1 阳性微生物、其裂解物或部分、包含这些的制剂、营养食品或药物组合物,所述免疫细胞包括至少一种免疫细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、包含至少一种 T 细胞或外周血单核细胞的细胞混合物,其可以由树突状细胞活化或抑制

[0184] b.) 以合适的时间和合适的条件下培养

[0185] c.) 加入合适量的树突状细胞,所述树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,装载有合适量的至少一种核心-1 携带分子

[0186] d.) 以合适的时间和合适条件下培养以用于再刺激和

[0187] e) 优选通过使用 WST 反应与比色测量组合来测量增殖和 / 或增殖诱导,由此针对核心-1 的阳性细胞免疫应答显示,与用相应未装载的树突状细胞再刺激时相比较,用装载有核心-1 携带分子的所述树突状细胞再刺激时,在培养一定时间后, T 细胞更高的增殖或数目,和 / 或与用装载有未携带核心-1 的分子的相应树突状细胞再刺激时相比较,用装载有核心-1 携带分子的所述树突状细胞再刺激时,在培养一定时间后, T 细胞更高的增殖或数目,和 / 或与用装载有血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的相应树突状细胞再刺激时相比较,用装载有无唾液酸血型糖蛋白的所述树突状细胞再刺激时,在培养一定时间后, T 细胞更高的增殖或数目,和 / 或与用装载有 NM-wt 或 NM-H9 的裂解物的相应树突状细胞再刺激时相比较,用装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物或部分的所述树突状细

胞再刺激时,在培养一定时间后,T 细胞更高的增殖或数目。

[0188] 所述细胞免疫应答测试 3通过测量 T 细胞增殖的诱导,来测试 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺T 细胞经由核心 -1 阳性微生物至核心 -1 特异性活化 T 细胞的活化,其包括使装载有核心 -1 阳性微生物的树突状细胞与免疫细胞接触,并且以合适的时间和条件下培养,随后加入装载有核心 -1 携带分子的树突状细胞用于再刺激,并且培养合适的时间和条件,然后测量增殖。所述增殖诱导的测量优选使用 WST 反应与比色测量组合来完成,并且 DC 单独的和非再刺激的免疫细胞单独的推导是本领域技术人员已知的,且在实施例 12 中描述。在本发明最优的实施方案中,细胞免疫应答测试 3包括使得自衍生自 MUTZ-3 的细胞、装载有核心 -1 阳性微生物的功能性树突状细胞与至少在 MHC I 类 (HLA-A2 和 HLA-B44) 中匹配的 PBMC (外周血单核细胞) 接触,并且使这些细胞以合适的时间和条件下培养,一般为 7-10 天,然后加入得自衍生自 MUTZ-3 的细胞、装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物、或装载有无唾液酸血型糖蛋白的功能性树突状细胞用于再刺激,并且以合适的时间和条件下培养,一般为 7-9 天,然后如上文和实施例 12 中更详细描述的进行测量增殖率。针对核心 -1 的阳性细胞免疫应答显示,与单独的 DC 和与未装载的 mDC 或装载有相应对照的 DC 接触的 T 细胞的增殖率相比较,用装载有核心 -1 携带分子的 DC 再刺激的 T 细胞更高的增殖。在一个优选实施方案中,用 NM-D4 或 NM-F9 装载的 DC 诱导的 T 细胞增殖比用 NM-wt 或 NM-H9 诱导的那种高 2 倍,更优选高 3 倍。细胞免疫应答测试 3 的一个优选实施方案在实施例 12 中详细描述。

[0189] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了针对核心 -1 的细胞免疫应答测试 (细胞免疫应答测试 4),其包括使合适量的树突状细胞与合适量的至少一种核心 -1 特异性抗体 (优选 Nemod-TF1、Nemod-TF2 或 A78-G/A7) 接触,所述树突状细胞包含一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,装载有合适量的本发明的核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分、包含这些的制剂、营养食品或药物组合物或核心 -1 携带分子、包含核心 -1 携带分子的混合物、对于核心 -1 阳性的分子、其裂解物或部分,由此在下述情况下,存在核心 -1 在所述一种或多种树突状细胞上的阳性呈递:与其与相应未装载的一种或多种树突状细胞、或与装载有未携带核心 -1 的分子、或用高碘酸盐处理的核心 -1 携带分子的相应一种或多种树突状细胞的结合相比较,核心 -1 特异性抗体与装载有核心 -1 携带分子的所述一种或多种树突状细胞的结合更高,和 / 或与未装载的相应一种或多种树突状细胞的结合相比较、或与装载有不被核心 -1 特异性抗体结合的微生物的相应一种或多种树突状细胞的结合相比较、或与装载有在高碘酸盐处理后核心 -1 阳性微生物的相应一种或多种树突状细胞的结合相比较,核心 -1 特异性抗体与装载有核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分、其营养食品、药物组合物或制剂的所述一种或多种树突状细胞的结合更高。

[0190] 所述细胞免疫应答测试 4测试树突状细胞在装载有核心 -1 阳性微生物后在其表面上呈递核心 -1 的能力,显示装载的树突状细胞加工并将微生物衍生的核心 -1 呈递给免疫细胞例如 T 细胞的潜能,其包括使合适量的核心 -1 阳性微生物和处于合适的分化和成熟状态的树突状细胞接触,优选随后使用本领域技术人员已知的合适的分子混合物 (cocktail) 成熟为 mDC 的未成熟 DC,并且通过测试本发明的核心 -1 特异性抗体与所述装载的 DC 的结合来测量经由装载的 DC 的核心 -1 呈递。所述结合的测试通过合适的方法来进行,优选免疫细胞化学、免疫荧光或流式细胞术、并且更优选通过本领域技术人员已知的和实施例中描述的免疫细胞化学。测试显示在下述情况下装载的 DC 的阳性呈递:与其与未

装载的 DC、或更优选与装载有不被核心 -1 特异性抗体结合的微生物的 DC 的结合相比较，或与装载有在高碘酸盐处理后核心 -1 阳性微生物的 DC 的结合相比较，核心 -1 特异性抗体与装载有核心 -1 阳性微生物的 DC 的结合更高。在本发明最优选的实施方案中，细胞免疫应答测试 4 包括使得自衍生自 MUTZ-3 的细胞的功能性未成熟树突状细胞与核心 -1 阳性微生物的裂解物接触，随后使用合适的分子混合物例如实施例 12 中描述的培养和成熟 24 小时 -48 小时，并且使用核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF1 或 Nemod-TF2 或 A78-G/A7 经由免疫荧光显微镜检查（免疫细胞化学）测试核心 -1 的呈递。在一个优选实施方案中，Nemod-TF1、Nemod-TF2 或 A78-G/A7 的结合比至装载有核心 -1 阴性微生物的 DC 高至少 2 倍，更优选可以检测出 Nemod-TF1、Nemod-TF2 或 A78-G/A7 与装载有核心 -1 阳性微生物的 DC 的强结合，并且用未装载的 DC 或用装载有核心 -1 阴性微生物的 DC 未获得超过本底的抗体结合。

[0191] 细胞免疫应答测试 4 的一个优选实施方案在实施例 12 中详细描述。

[0192] 在另一个实施方案中，本发明提供了针对核心 -1 的细胞免疫应答测试（细胞免疫应答测试 5），其包括

[0193] a) 使由合适量的铈或铬 -51 标记的，来自细胞系 ZR-75-1、NM-D4、NM-F9、NM-H9 和 / 或 NM-wt 的合适量的靶细胞与针对核心 -1 的至少一种免疫细胞或包含针对核心 -1 的至少一种免疫细胞的细胞混合物以合适的时间（一般为 3-6 小时或过夜）和合适的条件下温育和

[0194] b) 通过测定铈或铬 -51 的释放来测量靶细胞的裂解，由此针对核心 -1 的阳性体液免疫应答显示，与 NM-wt 或 NM-H9 相比较，NM-D4 或 NM-F9 细胞明显更高的裂解，或者它显示与和相应对照免疫细胞温育的 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 的裂解相比较，与核心 -1 针对的免疫细胞温育的 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 明显更高的裂解。

[0195] 所述 CIRT（细胞免疫应答测试）5 测试针对核心 -1 的免疫细胞的核心 -1 特异性细胞毒性，例如但不限于一种或多种 T 细胞、T 细胞克隆、T 细胞系、CD4 阳性 T 细胞、CD8 阳性 T 细胞、NK 细胞和 / 或 PBMCs。

[0196] 核心 -1 针对的免疫细胞的产生在本文中其他地方描述。

[0197] 在本发明的一个优选实施方案中，核心 -1 针对的免疫细胞通过给人类或动物施用本发明的制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分或裂解物，更优选通过给人类或动物施用本发明的制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分或裂解物，随后通过本领域技术人员已知的和本文描述的技术从人类或动物中分离免疫细胞，所述技术例如但不限于来自全血或 leukaphereses 的血细胞的免疫细胞的蔗糖梯度分离，和 / 或通过免疫磁珠分离技术的免疫细胞亚群分离。

[0198] 在本发明的另一个优选实施方案中，如本文其他地方描述的，在它们在 CIRT 5 中使用前，核心 -1 针对的免疫细胞用树突状细胞再刺激至少一次，所述树突状细胞装载有本发明的制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分或裂解物、或核心 -1 携带分子或肿瘤细胞。

[0199] 在本发明的一个更优选的实施方案中，在它们在 CIRT 5 中使用前，核心 -1 针对的免疫细胞用树突状细胞再刺激超过一次，所述树突状细胞装载有本发明的制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分或裂解物、或核心 -1 携带分子或肿瘤细胞，由此在不同载体（例如但不限于在微生物上的核心 -1 或来自微生物的核心 -1、核心 -1 携带分子、核心 -1 携带蛋白质

或肿瘤细胞)上的核心-1用于不同的再刺激循环。

[0200] 在一个更加优选的实施方案中,核心-1活化的T细胞用树突状细胞再刺激至少一次,所述树突状细胞装载有另一种分子或细胞或所述细胞的部分,所述细胞包含核心-1并且在核心-1微生物中不存在,优选来自对于核心-1阳性的肿瘤细胞的裂解物,所述裂解物不用于测量裂解的量。

[0201] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中,核心-1针对的免疫细胞的活化或产生、或核心-1特异性免疫细胞的再刺激、或核心-1阳性肿瘤细胞的裂解受合适量的至少一种核心-1特异性抗体抑制。

[0202] 测试包括使合适量的标记的核心-1阳性靶细胞例如ZR75-1、优选NM-D4或NM-F9,与针对核心-1的合适量的免疫细胞温育合适的时间,一般为3-6小时或过夜。核心-1阳性肿瘤细胞用铈或铬-51进行标记,这允许测量裂解的细胞。裂解细胞的量优选通过在温育后测量铈或铬-51的释放进行测定。合适的对照可以由本领域技术人员来确定,例如核心-1阴性细胞(优选NM-wt或NM-H9)或不针对核心-1的相应对照免疫细胞。测试可以通过本领域技术人员关于其在本发明中的用途就合适的标记的肿瘤细胞数目、免疫效应细胞的数目和温育时间进行优化。

[0203] 在一个优选实施方案中,CIRT-5使用铈释放测定法进行测定。靶细胞NM-D4在800 μ l铈缓冲液(50mM HEPES, pH 7.4, 93mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 10mM 二乙三胺五乙酸、2mM 乙酸铈(III))中于4°C温育10分钟,在Multiporator(Eppendorf)中进行电穿孔(710V, 1次脉冲, 30 μ s),并且随后在冰上温育另外10分钟。其后,细胞在RPMI/5% FCS中洗涤5次,并且种植在96孔圆底平板(Munc ; 5×10^3 /孔)中。其后加入核心-1针对的免疫细胞或相应免疫细胞作为效应细胞(100 μ l/孔),其中使用100 : 1-5 : 1的不同效应细胞/靶细胞比,优选50 : 1-20 : 1的效应细胞/靶细胞比。为了测定自发性释放,加入不含效应细胞的100 μ l RPMI/5% FCS。最大释放在用乙醇使靶完全裂解后进行测定。

[0204] 于37°C温育4小时后,使平板在500xg下离心5分钟,并且将来自每个孔的20 μ l无细胞上清液吸取到在先前制备的平底平板(Nunc-Immunoplate Maxisorp)上的200 μ l/孔增强溶液(Perkin-Elmer Wallac)中。在室温下温育15分钟后,测定荧光(Victor² Fluorometer, Perkin-Elmer Wallac)。特异性细胞毒性得自等式(实验裂解-自发性裂解)/(最大裂解-自发性裂解) $\times 100\%$ 。

[0205] 在一个优选实施方案中,本发明提供了针对核心-1的细胞免疫应答测试,其包括

[0206] a.) 使合适量的未成熟树突状细胞装载有合适量的如本文其他地方描述的核心-1阳性微生物、其裂解物或部分、或制剂,所述未成熟树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物

[0207] b.) 以合适的时间和合适条件下培养以用于成熟;

[0208] c.) 使合适量的所述装载的树突状细胞与合适量的免疫细胞接触,所述免疫细胞包括至少一种免疫细胞、T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、包含至少一种T细胞或外周血单核细胞的细胞混合物,其可以被树突状细胞活化或抑制;

[0209] d.) 以合适的时间和合适条件下培养以用于活化或抑制;

[0210] e.) 加入合适量的树突状细胞用于再刺激,所述树突状细胞包含至少一种或多种树突状细胞、或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,装载有合适量的至少一种核心-1

携带抗原或合适的对照抗原；

[0211] f.) 以合适的时间和合适条件下培养以用于再刺激；

[0212] g.) 通过 ELISA 或 ELISPOT 测量分泌的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 的量, 由此针对核心 -1 的阳性细胞免疫应答显示, 与用相应未装载的树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有核心 -1 携带抗原的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞明显更高的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌, 和 / 或与用装载有未携带核心 -1 的抗原的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有核心 -1 携带抗原的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞明显更高的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌, 和 / 或与用装载有血型糖蛋白或经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有无唾液酸血型糖蛋白的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞明显更高的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌, 和 / 或与用装载有 NM-wt 或 NM-H9 的裂解物的相应树突状细胞再刺激的相应免疫细胞的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌相比较, 用装载有 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物或部分的所述树突状细胞再刺激的所述免疫细胞明显更高的 GM-CSF、IFN γ 和 / 或 TNF α 分泌。

[0213] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中, 包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其裂解物或部分的营养食品或药物制剂诱导针对核心 -1 的细胞免疫应答, 其对于细胞免疫应答测试 1-5 中的至少 2 种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0214] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中, 包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其裂解物或部分的营养食品或药物制剂诱导针对核心 -1 的体液和细胞免疫应答, 其对于至少一种体液免疫应答测试和至少一种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0215] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中, 包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其裂解物或部分的营养食品或药物制剂诱导针对核心 -1 的体液和细胞免疫应答, 其对于至少 2 种体液免疫应答测试和 2 种细胞免疫应答测试是阳性的, 优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 以及细胞免疫应答测试 1 和 3 是阳性的, 和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 以及细胞免疫测试 1、2 和 3 是阳性的, 和更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 以及细胞免疫应答测试 1、2、3 和 4 是阳性的, 和更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 6 以及所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的, 和更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 以及所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的, 和最优选对于所有 6 种体液免疫应答测试以及所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0216] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了细胞免疫应答测试 1-5, 其中一种或多种树突状细胞或包含树突状细胞的细胞混合物包含这样的至少一种树突状细胞, 当与所述免疫细胞接触时, 其是成熟的树突状细胞。

[0217] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了细胞免疫应答测试 1-5, 其中一种或多种树突状细胞或细胞混合物包含得自衍生自 MUTZ-3 的细胞的功能性树突状细胞。

[0218] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了细胞免疫应答测试 1-5, 其中免疫细胞至少在一种 MHC I 类分子中与所述树突状细胞匹配。

[0219] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了细胞免疫应答测试 1-5, 其中核心 -1 携带分子是 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物或部分或者无唾液酸血型糖蛋白。

[0220] 在另一个优选实施方案中,本发明涉及如上所述的任何免疫应答测试用于在至少一个人类或动物中测定由根据本发明的营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分、或包含这些的制剂诱导或增强的针对核心-1 的免疫应答的用途。

[0221] 在另一个优选实施方案中,本发明涉及如上所述的任何免疫应答测试用于在营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分、或包含这些的制剂,或在营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分、或包含这些的制剂的施用前在至少一个人类或动物中测试天然存在的免疫应答的用途。

[0222] 在另一个优选实施方案中,本发明涉及如上所述的任何免疫应答测试用于测定和优化有效量、最大有效量、剂量、给药方案、施用途径,以及与根据本发明的营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分、或包含这些的制剂一起使用的组合物、制剂、载体其他分子的用途。

[0223] 本发明的所述营养食品可以由单独的至少一种核心-1 阳性微生物或其部分组成,例如但不限于活的或死的、冷冻干燥的或巴氏杀菌的微生物,或其裂解物、或组分或部分,或以在液体中至少部分溶解的形式,或者它可以由另外的组分组成,例如但不限于本领域技术人员已知的其他营养素、营养添加剂或食品或饮料添加剂、溶液或乳剂。所述营养食品可以以不同形式口服应用,例如胶囊、片剂、乳剂、粉剂、液体。营养食品可以单独给予或混合到食品或饮料内。所述营养食品也可以是任何食品、饮料、食品或食品的组分、食品添加剂、或标准单独的营养食品。

[0224] 在一个优选实施方案中,营养食品作为胶囊或片剂使用。在另一个优选实施方案中,将营养食品混合到食品或饮料内,例如但不限于本发明其他地方列出的那些。

[0225] B) 用于测试核心-1 阳性微生物诱导免疫应答的潜能的方法、用于分离核心-1 阳性微生物的方法、用于鉴定关于营养食品和药物组合物的合适核心-1 阳性微生物的方法

[0226] 本发明进一步提供了用于测试核心-1 阳性微生物或其部分诱导针对核心-1 的体液免疫应答的潜能的方法,其包括

[0227] a.) 给至少一个人类或动物施用合适量的核心-1 阳性微生物或其部分

[0228] b.) 在针对核心-1 的至少一种体液免疫应答测试 1-6 中测试免疫应答。

[0229] 本发明进一步提供了用于测试核心-1 阳性微生物或其部分诱导针对核心-1 的细胞免疫应答的潜能的方法,其包括

[0230] a.) 给至少一个人类或动物施用合适量的核心-1 阳性微生物或其部分

[0231] b.) 在针对核心-1 的至少一种细胞免疫应答测试中测试免疫应答。

[0232] 在一个优选实施方案中,本发明提供了用于测试任何营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分、或包含这些的制剂,诱导免疫应答且确定何种免疫应答被诱导的方法。

[0233] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了确定剂量、给药方案、施用途径,以及在营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分、或包含这些的制剂中使用,或与营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分、或包含这些的制剂一起使用的制剂、载体其他组分的方法。

[0234] 本发明进一步提供了用于测试核心-1 阳性微生物诱导体液免疫应答的潜能的方法,其包括体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种、优选至少 2 种、更优选 3 种、更优选 4 种、

更优选 5 种、和最优选所有 6 种体液免疫应答测试,由此对至少一个动物或人类口部或全身地给予合适量的待测试的微生物(含或不含另外的佐剂),并且血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体,优选与在微生物给予前血清中的抗体,或从血清、血浆或粪便中获得的抗体进行比较测试。本领域技术人员能够测定合适量的微生物和从血液获得抗体的方法以及合适的对照。测试在本文和/或实施例 11 中详细描述。

[0235] 本发明进一步提供了用于测试核心 -1 阳性微生物诱导细胞免疫应答的潜能的方法,其包括细胞免疫应答测试 1-5 中的至少一种、优选至少 2 种、更优选 3 种、和最优选所有 5 种细胞免疫应答测试。

[0236] 本发明进一步提供了用于测试核心 -1 阳性微生物诱导细胞毒性细胞免疫应答的潜能的方法,其包括至少细胞免疫应答测试 2、优选 2 和 1、更优选 2、3 和、和最优选所有 5 种细胞免疫应答测试。

[0237] 在本发明的 2 种实施方案中,测试如上所述在体外进行,或者细胞免疫测试 1-3 或 5 通过对至少一个动物或人类口部或全身地给予合适量的待测试的微生物(含或不含另外的佐剂),并且免疫细胞得自血液和(i)如上所述根据细胞测试 1-3 或 5 进行测试,或(ii)如上所述根据细胞测试 1-3 或 5 进行测试,其中差异是免疫细胞不与装载有核心 -1 阳性微生物的树突状细胞接触,并且仅加入装载有核心 -1 携带分子的树突状细胞用于再刺激。(i) 优选用于增强体内效应和改善具有较弱应答的读出,和(ii) 优选用于强应答。本领域技术人员能够测定合适量的微生物和合适的对照。测试在实施例 12 中详细描述。

[0238] 在一个优选实施方案中,本发明进一步提供了用于测试核心 -1 阳性微生物诱导体液和细胞免疫应答的潜能的方法,其对应于上文描述的方法的组合,包括体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种和细胞免疫应答测试 1-4 中的至少一种,优选体液免疫应答测试 1-6 中的至少 2 种和细胞免疫应答测试 1-5 中的至少一种、更优选至少 2 种,更优选 体液免疫应答测试 1-6 中的至少 3 种,更优选体液免疫应答测试 1-6 中的至少 4 种以及所有细胞免疫应答测试 1-5,更优选体液免疫应答测试 1-6 中的至少 5 种以及所有细胞免疫应答测试 1-5,和最优选所有 6 种体液免疫应答测试 1-6 以及所有 5 种细胞免疫应答测试 1-5。

[0239] 本发明还提供了鉴定就本发明而言的核心 -1 阳性微生物的方法,以及从核心 -1 阳性和阴性微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法。

[0240] 本发明进一步提供了用于从微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法,其包括

[0241] (a) 使核心 -1 特异性抗体与微生物的混合物接触,和

[0242] (b) 分离与所述核心 -1 特异性抗体结合的微生物。

[0243] 在一个优选实施方案中,本发明进一步提供了用于从微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法,其中在步骤(b)下磁性颗粒用于分离与所述核心 -1 特异性抗体结合的微生物。在一个优选实施方案中,本发明进一步提供了用于从微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法,其中所述微生物的混合物是包含来自健康人类和/或患者、动物、土壤、食物或植物的微生物的混合物。

[0244] 在一个优选实施方案中,本发明进一步提供了用于从微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法,其中所述微生物的混合物是包含健康个体或患者的人类胃肠道、人类粪便、人类血液、人类组织或人类体液的微生物的混合物。

[0245] 在一个优选实施方案中,本发明进一步提供了用于从微生物的混合物中分离核心-1 阳性微生物的方法,其在允许分离厌氧性核心-1 阳性微生物的厌氧条件下进行。

[0246] 所述微生物的混合物可以是至少 2 种不同微生物的混合物,例如但不限于自然界中存在的那些,例如但不限于在土壤、食物、植物、动物、健康个体或患者的人类胃肠道、人类血液、人类组织或人类体液中,最优选的是来自健康个体的微生物的混合物。在使混合物与核心-1 特异性抗体接触前,优选使微生物与合适的溶液接触。核心-1 特异性抗体优选与载体例如磁珠偶联,这允许分离与所述载体结合的微生物。并且在使核心-1 特异性分子与微生物的混合物一起接触后,与核心-1 特异性抗体结合的那些微生物与未与抗体结合的那些分开。在一个可替代实施方案中,核心-1 特异性抗体未与载体偶联,并且通过使用特异性分离抗体的方法使核心-1 阳性微生物连同核心-1 特异性抗体一起分离,例如蛋白质 A、蛋白质 G、蛋白质 L 或抗 IgM 抗体或抗 IgG 抗体,其自身与载体例如磁珠层析床材料偶联。在本发明的一个优选实施方案中,与核心-1 特异性抗体结合的核心-1 阳性微生物用合适的缓冲液(例如 PBS-a)充分洗涤,并且铺平板在选择性和非选择性培养基上,所述培养基例如但不限于 MRS、BSM、KF、N、S、WC、BHI、CBA 和 ST(关于细节参见表 3)。所得到的菌落从平板刮下来,并且应用于用核心-1 特异性抗体的另外的亲和力富集循环。菌落进行挑选、重新划线培养并且在 ELISA 和免疫荧光中就核心-1 表达进行分析(更多的细节在实施例 1-9 下)。根据这个说明书和实施例,本领域技术人员能够调整或优化关于来自各种来源的各种细菌的方法。

[0247] 在一个优选的具体实施方案中,该方法在厌氧条件下进行,这允许分离厌氧的核心-1 阳性微生物,这例如对于来自人类肠的大多数微生物是重要的。该方法在实施例 1-9 中详细描述。

[0248] 根据一个实施方案,微生物从食品中进行分离。在一个更加优选的实施方案中,微生物从胃肠系统中进行分离,并且更加优选地从人类粪便中进行分离。该方法在实施例 1-9 中详细描述。通常居住于人类胃肠道的细菌的使用产生不会引起不希望有的副作用的预防和治疗试剂。碳水化合物性质负责相关耐受性产生(tolerogenicity)的缺乏,且显示没有相关的过敏反应。

[0249] 本发明进一步提供了用于鉴定合适的核心-1 阳性微生物用于用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的方法,其包括

[0250] a.) 就其与至少一种核心-1 特异性抗体的结合测试微生物和

[0251] b.) 如本文所述鉴定由至少一种核心-1 特异性抗体结合的这种核心-1 阳性微生物。

[0252] 最优选地是由核心-1 特异性抗体 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 结合的那些核心-1 阳性微生物,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,在用高碘酸处理后显示 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 减少的结合。

[0253] 在本发明的一个优选实施方案中,微生物就其与至少一种核心-1 特异性抗体的结合的测试通过 ELISA 来完成,由此核心-1 阳性微生物显示对于至少一种核心-1 特异性抗体的 ELISA 信号是本底信号的至少 3 倍、更优选 5 倍和更加优选至少 10 倍。

[0254] 在本发明的另一个优选实施方案中,当以 1×10^7 /ml、更优选 5×10^6 /ml、更加优选 1×10^6 /ml、最优选 1×10^5 /ml 的微生物浓度包被时,核心-1 阳性微生物显示对于核心-1 特异

性抗体 Nemod-TF1 的阳性 ELISA 信号。

[0255] 在本发明的另一个优选实施方案中,当以 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 、更优选 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 、更加优选 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 、最优选 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的微生物浓度包被时,核心 -1 阳性微生物显示对于核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF2 的阳性 ELISA 信号。

[0256] 在本发明的另一个优选实施方案中,在用高碘酸处理后,核心 -1 阳性微生物显示对于核心 -1 特异性抗体减少的 ELISA 信号,优选 ELISA 信号显示至少 30%、更优选至少 50%和最优选至少 80%的减少。

[0257] 在一个优选实施方案中,本发明涉及用于鉴定合适的核心 -1 阳性微生物用于用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的方法,其包括

[0258] a) 就其与至少一种核心 -1 特异性抗体的结合测试核心 -1 阳性微生物和

[0259] b) 测试其在人类或动物中诱导的识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫应答的能力

[0260] c) 通过对于本文描述的至少一种体液免疫应答测试 1-6 或细胞免疫应答测试 1-4 是阳性的来鉴定这种微生物,其由如本文描述的至少一种核心 -1 特异性抗体结合,并且能够在人类或动物中诱导识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫应答。优选的是这样的核心 -1 阳性微生物,其对于 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 阳性的,并且是高碘酸盐敏感的,如本文描述的(实施例 9)显示减少的 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 结合,并且在至少一个人类或动物中诱导免疫应答,所述微生物对于至少一种体液和至少一种细胞免疫应答测试是阳性的,更优选对于细胞免疫应答测试 2 至少是阳性的那些。更加优选的是这样的核心 -1 阳性微生物,其对于 TF1 和 TF2 是阳性的,并且是高碘酸盐敏感的,如本文其他地方描述的显示减少的 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 结合,并且对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 以及对于细胞免疫应答测试 1、2、3 和 4 是阳性的,如本文所描述的。最优选的是这样的核心 -1 阳性微生物,其对于 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 是阳性的,并且是高碘酸盐敏感的,如本文其他地方描述的显示减少的 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 结合,并且对于至少 5 种体液免疫应答测试以及对于所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的,如本文所描述的。

[0261] 在一个优选实施方案中,本发明涉及用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法,其中所鉴定的微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体结合,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,但与 # 列表 2# 的任何物质(参见定义)不结合。

[0262] 在一个优选实施方案中,本发明涉及用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法,其中所鉴定的微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体结合,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与 NM-D4(DSM ACC2605)、NM-F9(DSM ACC2606)、ZR-75-1(ATCC CRL-1500)、CAMA-1(ATCC HTB-21)、KG-1(DSM ACC 14)或 A-204(DSM ACC 250)中的至少一种人肿瘤细胞系结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的。NM-9 和 NM-D4 细胞系已经通过 NemodBiotherapeutics GmbH & Co. KG, Robert-Rossle-Strasse 10, 13125 Berlin, 德国(即保藏处)保藏在 DSMZ,其授权本申请的申请人提及 本文描述的所保藏的生物材料,并且将它们不保留的和不能变更的同意见书给予本申请的申请人,本文描述的所保藏的生物材料依照欧洲专利协定的规则 28(1)

(d) 对于公众是可获得的。DSMZ 位于 MascheroderWeg 1b, D-38124 Braunschweig, 德国。前述 DSMZ 保藏根据国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约来进行。

[0263] 在一个优选实施方案中, 本发明涉及用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法, 其中所鉴定的微生物由至少一种抗体结合, 其与 TFa-PAA 结合, 且与 TFb-PAA 结合较少或不结合, 且与 # 列表 2# 中列出的任何 X-PAA 构建体不结合, 并且与无唾液酸血型糖蛋白结合, 且与血型糖蛋白不结合, 并且与 NM-D4、NM-F9、ZR-75-1、CAMA-1、KG-1 或 A-204 中的至少一种人肿瘤细胞系结合, 并且由此结合是高碘酸盐敏感的, 并且由具有任何上述结合特征, 但与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 不结合的至少一种核心 -1 特异性抗体结合。

[0264] 在一个优选实施方案中, 本发明涉及用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法, 其中所鉴定的微生物由 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 或 NEMOD-TF1 结合。

[0265] 在一个优选实施方案中, 本发明涉及用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法, 其中所鉴定的微生物在 (b) 下由 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1 结合。

[0266] 在一个优选实施方案中, 本发明涉及用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法, 其中所鉴定的微生物在 (b) 下由 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1 结合, 但不由 A68-B/A11 结合。

[0267] 在一个优选实施方案中, 本发明涉及用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法, 其中在人类或动物中施用根据本发明的制剂后诱导的免疫应答是这样的免疫应答, 其对于针对核心 -1 的至少一种体液免疫应答测试和针对核心 -1 的至少一种细胞免疫应答测试是阳性的, 如本文其他地方描述的。

[0268] 用于鉴定用作本发明的营养食品和药物组合物的组分的合适的核心 -1 阳性微生物的方法, 可以用于从现有菌株 (例如在 DSMZ 或其他微生物保藏中心发现的) 或核心 -1 阳性微生物 (通过根据本发明从微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法分离的) 中鉴定合适的微生物。

[0269] 本发明还涉及用于分离和鉴定核心 -1 阳性细菌的方法, 其包括

[0270] a) 从粪便样品中分离全菌,

[0271] b) 在好氧或厌氧条件下, 使用下述单克隆核心 -1 抗体 Nemod-TF1、Nemod-TF2 和 A78-G/A7 中的一种或多种执行核心 -1 阳性细菌的亲富集,

[0272] c) 将所富集的细菌铺平板在不同的选择性培养基上, 并且就与核心 -1 特异性抗体或凝集素的结合筛选细菌。

[0273] 在另一个优选实施方案中, 本发明涉及用于分离和鉴定核心 -1 阳性细菌的方法, 其包括

[0274] a.) 从粪便样品中分离包含全菌的微生物的混合物,

[0275] b.) 使核心 -1 特异性抗体与微生物的混合物接触,

[0276] c.) 在好氧或厌氧条件下, 使用磁性颗粒分离来分离与 Nemod-TF1、Nemod-TF2 或 A78-G/A7 结合的微生物,

[0277] d.) 将所富集的细菌铺平板在至少一种选择性培养基上

[0278] e.) 鉴定由至少一种核心 -1 特异性抗体结合的微生物。

[0279] 产生也意指核心 -1 阳性微生物例如通过化学处理由包含以隐蔽形式的核心 -1 结构的微生物而产生。化学处理例如高碘酸盐处理可以暴露核心 -1 结构,从而产生核心 -1 阳性微生物。在另一个优选实施方案中,本发明涉及用于分离和鉴定核心 -1 阳性细菌的方法,其包括

[0280] a.) 由至少一种核心 -1 特异性抗体结合的纯细菌菌株的产生 ;和 / 或

[0281] b.) 测试所述纯细菌菌株在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的免疫应答的能力。

[0282] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于测试核心 -1 阳性微生物诱导核心 -1 特异性免疫应答的潜能的方法,其包括下述步骤:

[0283] 1) 核心 -1 阳性微生物的鉴定和在纯培养物中的产生 ;

[0284] 2) 肠的免疫有效细菌菌株的鉴定 ;

[0285] 3) 有效、免疫学和毒理学测试的核心 -1 阳性制剂作为准备用于人类测试的营养添加剂的产生 ;

[0286] 4) 在人类中核心 -1 特异性免疫应答的诱导或增强 ;和必要时

[0287] 5) 所述微生物的免疫有效限定的核心 -1 阳性部分或组分的分离、鉴定和测试。

[0288] 该方法也在实施例 1-10 中详细描述。

[0289] 在一个优选实施方案中,本发明提供了用于从微生物的混合物中分离核心 -1 阳性微生物的方法,其包括

[0290] a.) 使核心 -1 特异性抗体与微生物的混合物接触,所述微生物的混合物选自来自健康人类和 / 或患者、动物、土壤、食物、和 / 或植物的微生物,和 / 或来自健康个体和 / 或患者的人类胃肠道、人类粪便、人类血液、人类组织、和 / 或人类体液的微生物和

[0291] b.) 分离与所述核心 -1 特异性抗体结合的微生物。

[0292] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于分离和鉴定核心 -1 阳性细菌的方法,其包括

[0293] (a) 从粪便样品中分离包含全菌的 (whole bacterial) 微生物的混合物,

[0294] (b) 使核心 -1 特异性抗体与微生物的混合物接触,

[0295] (c) 在好氧或厌氧条件下,使用磁性颗粒分离来分离与核心 -1 特异性抗体结合的微生物,

[0296] (d) 鉴定由 Nemod-TF2 或 A78-G/A7、和由 Nemod-TF1 结合的微生物,由此结合是高碘酸盐敏感的,在高碘酸盐处理后显示明显减少的结合和

[0297] (e) 测试在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的免疫应答的能力。

[0298] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于鉴定合适的核心 -1 阳性微生物用于用作任何前述权利要求的制剂的组分的方法,其包括

[0299] a. 就其与至少一种核心 -1 特异性抗体的结合测试微生物和

[0300] b. 在人类或动物中测试识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫应答的诱导和

[0301] c. 鉴定由至少一种核心 -1 特异性抗体结合的所述微生物

[0302] 由此所述微生物在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的免疫应答,

如本文其他地方描述的所述免疫应答通过对于针对核心 -1 的至少一种体液免疫应答测试或一种细胞免疫应答测试是阳性的而表征的。

[0303] 本发明还涉及用于产生核心 -1 阳性微生物的方法,其包括

[0304] a.) 通过化学和 / 或物理诱变剂使微生物与用于诱导突变的试剂接触,所述诱变剂例如但不限于 EMS、UV、氨甲蝶呤、微波、致癌物质、致癌剂、诱变剂或在杀死大多数微生物的条件下的放射和

[0305] b.) 在合适的条件下培养存活的微生物

[0306] c.) 如本文其他地方描述的富集、分离和 / 或鉴定核心 -1 阳性微生物

[0307] d.) 测试所述微生物在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心 -1 的免疫应答的能力。

[0308] 本发明还涉及通过遗传工程用于产生核心 -1 阳性微生物的方法,其包括

[0309] a) 在微生物内引入、敲除和 / 或沉默基因、基因的部分、DNA、RNA、反义 RNA、寡核苷酸、寡肽或蛋白质,从而影响核心 -1 生物合成、核心 -1 降解或者侧翼碳水化合物的生物合成或降解和

[0310] b.) 如本文其他地方描述的富集、分离、鉴定和 / 或测试核心 -1 阳性微生物。

[0311] 根据一个实施方案,所述微生物是核心 -1 阴性微生物。在一个进一步的实施方案中,所述微生物是对于肠道有益的微生物,例如但不限于乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 或双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)。在一个进一步的实施方案中,所述微生物是用于生产常规食品的微生物,例如但不限于乳杆菌属或双歧杆菌属。在另一个实施方案中,所述微生物已是核心 -1 阳性的,并且所述方法用于增加在细胞表面上表达的核心 -1 的量。

[0312] C) 核心 -1 阳性微生物的供应

[0313] 本发明还提供了核心 -1 阳性微生物,其中所述核心 -1 阳性微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体识别。

[0314] 本发明提供了合适的核心 -1 阳性微生物用于用作关于本发明的营养食品或药物组合物的组分,其中所述核心 -1 阳性微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体结合。本发明还提供了核心 -1 阳性微生物,其在人类或动物中诱导针对核心 -1、核心 -1 抗原、核心 -1 阳性肿瘤细胞或核心 -1 阳性疾病的特异性免疫应答。

[0315] 本发明还提供了合适的核心 -1 阳性微生物用于用作关于本发明的营养食品或药物组合物的组分,其中所述核心 -1 阳性微生物在人类或动物中诱导针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性免疫应答。

[0316] 本发明还提供了代表本发明的营养食品或药物组合物的活性成分的核心 -1 阳性微生物,其在人类或动物中诱导针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫应答的特异性。

[0317] 本发明提供了这样的核心 -1 阳性微生物,当其在本发明的营养食品或药物组合物中使用,所述核心 -1 阳性微生物在人类或动物中诱导或增强针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性免疫应答。

[0318] 在本发明的一个优选实施方案中,当由下述抗体的至少一种核心 -1 特异性抗体接触时,所述核心 -1 阳性微生物被识别且因此结合 -HB-T1、HH8、A78-G/A7、Nemod-TF1 或 Nemod-TF2,更优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少

或不结合,但与#列表2#的任何物质不结合;

[0319] - 更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与#列表2#中列出的任何物质不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且这种结合是高碘酸盐敏感的;

[0320] - 更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与#列表2#中列出的任何物质不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与 NM-D4、NM-F9、ZR-75-1、CAMA-1、KG-1 或 A-204 中的至少一种人肿瘤细胞系结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的(例如 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7),更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体具有任何上述结合特征,但与和 PAA 偶联的三糖核心-2 不结合,更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与和 PAA 偶联的三糖核心-2 不结合,且与#列表2#中列出的任何 X-PAA 不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9 和 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的(例如 NEMOD-TF1);

[0321] - 更加优选至少 2 种上文描述的抗体,更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与#列表2#中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与 NM-D4、NM-F9、ZR-75-1、CAMA-1、KG-1 或 A-204 中的至少一种人肿瘤细胞系结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,例如 NEMOD-TF 2 或 A78-G/A7,以及至少一种这样的抗体,所述抗体具有任何上述结合特征,但与和 PAA 偶联的三糖核心-2 不结合;

[0322] - 更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与和 PAA 偶联的三糖核心-2 不结合,且与#列表2#中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9 和 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,例如 NEMOD-TF1;

[0323] - 更加优选 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1;

[0324] - 更加优选 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1 而不是 A68-B/A11;

[0325] - 更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与#列表2#中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且这种结合是高碘酸盐敏感的;

[0326] - 更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与#列表2#中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与 NM-D4、NM-F9、ZR-75-1、CAMA-1、KG-1 或 A-204 中的至少一种人肿瘤细胞系结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,例如 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7,更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体具有任何上述结合特征,但与和 PAA 偶联的三糖核心-2 不结合,更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与和 PAA 偶联的三糖核心-2 不结合,且与#列表2#中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9 和 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,例如 NEMOD-TF1;

[0327] - 更加优选至少 2 种上文描述的抗体,更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与#列表2#中列出的任何 X-PAA 构建

体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与 NM-D4、NM-F9、ZR-75-1、CAMA-1、KG-1 或 A-204 中的至少一种人肿瘤细胞系结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,例如 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7,以及至少一种这样的抗体,所述抗体具有任何上述结合特征,但与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 不结合;

[0328] - 更加优选至少一种这样的抗体,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何物质不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9 和 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的(例如 NEMOD-TF1);

[0329] - 更加优选 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1;

[0330] - 以及更加优选 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 和 NEMOD-TF1 而不是 A68-B/A11。

[0331] 在一个优选实施方案中,本发明提供了核心 -1 阳性微生物,其由至少 2 种核心 -1 特异性抗体识别/结合。

[0332] 在一个优选实施方案中,本发明提供了核心 -1 阳性微生物,其由至少一种抗体结合,所述抗体与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何物质不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与 NM-D4、NM-F9、ZR-75-1、CAMA-1、KG-1 或 A-204 中的至少一种人肿瘤细胞系结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,并且由至少一种这样的抗体结合,所述抗体具有任何上述结合特征,但与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 不结合。

[0333] 在一个更优选的实施方案中,本发明提供了核心 -1 阳性微生物,其由 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 或 NEMOD-TF1 识别/结合。

[0334] 在一个优选实施方案中,本发明提供了核心 -1 阳性微生物,其由核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF1 结合,由此所述结合在 ELISA 中进行测试,并且当以 1×10^7 /ml、更优选 5×10^6 /ml、更加优选 1×10^6 /ml、最优选 1×10^5 /ml 的微生物浓度包被时,对于核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF1 的阳性 ELISA 信号是本底的那种的至少 3 倍。

[0335] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心 -1 阳性微生物,其由核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF2 结合,由此所述结合在 ELISA 中进行测试,并且当以 1×10^7 /ml、更优选 5×10^6 /ml、更加优选 1×10^6 /ml、最优选 1×10^5 /ml 的微生物浓度包被时,对于核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF2 的阳性 ELISA 信号是本底的那种的至少 3 倍。

[0336] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心 -1 阳性微生物,其由核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF2 结合,由此所述结合在 ELISA 中进行测试,并且当以 1×10^7 /ml、更优选 5×10^6 /ml、更加优选 1×10^6 /ml、最优选 1×10^5 /ml 的微生物浓度包被时,对于核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF2 的阳性 ELISA 信号是本底的那种的至少 3 倍,并且由此所述结合是高碘酸盐敏感的,在用高碘酸处理后显示减少的 ELISA 信号,优选 ELISA 信号显示至少 30%、更优选至少 50%和最优选至少 80%的减少。

[0337] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心 -1 阳性微生物,其由核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF1 结合,由此所述结合在 ELISA 中进行测试,并且当以 1×10^7 /ml、更优选 5×10^6 /ml、更加优选 1×10^6 /ml、最优选 1×10^5 /ml 的微生物浓度包被时,对于核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF1 的 ELISA 信号是本底的那种的至少 3 倍,并且由此所述结合是高碘酸盐敏感的,在用高碘酸处理后显示减少的 ELISA 信号,优选 ELISA 信号显示至少 30%、更优选至少

50%和最优选至少 80%的减少。

[0338] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物,其由核心-1 特异性抗体 Nemod-TF1 和 Nemod-TF2 结合,由此所述结合在 ELISA 中进行测试,并且当以 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 、更优选 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 、更加优选 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 、最优选 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的微生物浓度包被时,ELISA 信号是本底的那种的至少 3 倍,并且由此所述结合是高碘酸盐敏感的,在用高碘酸处理后显示减少的 ELISA 信号,优选 ELISA 信号显示至少 30%、更优选至少 50%和最优选至少 80%的减少。

[0339] 在一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物,其在人类或动物中诱导或增强针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的特异性体液和/或细胞免疫应答。

[0340] 在本发明的一个优选实施方案中,所述免疫应答是针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的体液免疫应答,或者针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的细胞免疫应答。

[0341] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的体液免疫应答,以及针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的细胞免疫应答。

[0342] 所述核心-1 特异性抗体、优选的核心-1 特异性抗体、核心-1 特异性抗体的组合或核心-1 特异性抗体的优选组合在本文的定义和其他地方详细描述。

[0343] 所述营养食品或药物组合物及其优选实施方案在本文其他地方详细描述。

[0344] 所述针对核心-1 的体液免疫应答和所述针对核心-1 的细胞免疫应答,以及可以检测针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的相应抗体或 T 细胞应答的体液和细胞免疫应答测试,在本发明的其他地方详细描述。

[0345] 在一个优选实施方案中,本发明的核心-1 阳性微生物在人类或动物中诱导或增强针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的特异性体液和细胞免疫应答,其可以通过至少一种体液免疫应答测试和至少一种细胞免疫应答测试进行检测。

[0346] 在一个优选实施方案中,核心-1 阳性微生物由 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 结合,由此所述结合是高碘酸盐敏感的,并且其在至少一个人类或动物中诱导或增强免疫应答,所述免疫应答在体液免疫应答测试 1、2 和 3 中的至少 2 种以及对于细胞免疫应答测试 1、2 和 3 中的至少 1 种中是阳性的。

[0347] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心-1 的体液免疫应答,其对于体液免疫应答测试 1-6 中的至少 2 种体液免疫应答测试是阳性的,优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 6 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 是阳性的,和最优选对于所有 5 种体液免疫应答测试是阳性的。

[0348] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心-1 的细胞免疫应答,其对于细胞免疫应答测试 1-5 中的至少 2 种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0349] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心-1 的体液和细胞免疫应答,其对于至少一种体液免疫应答测试和至少一种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0350] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心-1的体液和细胞免疫应答,其对于至少2种体液免疫应答测试和2种细胞免疫应答测试是阳性的,优选对于体液免疫应答测试1和3以及细胞免疫应答测试1和3是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试1、2和3以及细胞免疫测试1、2和3是阳性的,和更加优选对于体液免疫应答测试1、2、3和4以及细胞免疫测试1、2、3和4是阳性的,和更加优选对于体液免疫应答测试1、2、3、4和6以及所有5种细胞免疫测试是阳性的,和更加优选对于体液免疫应答测试1、2、3、4和5以及所有5种细胞免疫应答测试是阳性的,和最优选对于所有6种体液免疫应答测试以及所有5种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0351] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了可以用于构建核心-1特异性免疫应答的核心-1阳性微生物,其通过具有破坏那些细胞的潜能而充当针对核心-1阳性癌细胞的保护,如本文显示的例如通过核心-1特异性抗体的诱导,通过有效杀死其的针对核心-1阳性肿瘤细胞的核心-1抗体的核心-1特异性补体依赖性细胞毒性,和/或通过核心-1特异性T细胞应答的TNF α 和/或INF γ 分泌,其是本领域技术人员关于携带核心-1的那些肿瘤细胞的特异性细胞毒性T细胞介导的肿瘤细胞杀死的科学地识别到的替代标记,当用作本发明的营养食品或药物组合物时。

[0352] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了可以用于构建所述核心-1特异性免疫应答的核心-1阳性微生物,其充当针对核心-1阳性癌细胞的保护,如本文其他地方描述的通过在(至少一个)健康个体中口部施用营养食品,所述核心-1特异性免疫应答具有破坏那些细胞的潜能。

[0353] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了核心-1阳性微生物,通过给(至少一个)健康个体口部施用(其作为本发明的营养食品的组分),其可以用于减少或甚至进一步优选预防核心-1阳性疾病或肿瘤的发生。

[0354] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了核心-1阳性微生物,当作为本发明的药物制剂的组分在(至少一个)个体中施用,其可以用于减少或更加优选预防核心-1阳性疾病或肿瘤的发生。

[0355] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1阳性微生物,通过在患有这种疾病的患者中口部施用营养食品,其作为营养食品的活性成分使用,以治疗核心-1阳性疾病或肿瘤。

[0356] 在一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1阳性微生物,通过如本文其他地方描述的施用药物组合物,其作为药物组合物的活性成分使用,以治疗患有这种疾病的患者中的核心-1阳性疾病或肿瘤。

[0357] 在一个更优选的实施方案中,本发明提供了核心-1阳性微生物,其是营养食品制剂的合适组分,其在人类中优先地显示识别核心-1抗原和/或核心-1阳性肿瘤细胞的免疫应答的诱导,所述免疫应答通过在核心-1阳性微生物的口部施用后,对于本文和如上所述的优选实施方案中描述的至少一种体液或细胞免疫测试是阳性的。

[0358] 在最优选的实施方案中,所述核心-1阳性微生物对于与核心-1特异性抗体NEMOD-TF1和NEMOD-TF2结合是阳性的,由此所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在用高碘酸处理后显示NEMOD-TF1和NEMOD-TF2减少的结合,如本文其他地方描述的,并且其在至少一个人类或动物中诱导免疫应答,所述免疫应答对于体液免疫应答测试1、2和3以及对于

细胞免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,并且更加优选对于至少 5 种体液免疫应答测试以及对于所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的,并且更加优选对于所有 6 种体液免疫应答测试以及对于所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的,如本文描述的。

[0359] 在一个优选实施方案中,本发明提供或使用

[0360] (i) 本发明的核心 -1 阳性微生物,或

[0361] (ii) 包含核心 -1 阳性微生物的营养食品或药物制剂或食品添加 剂

[0362] 其选自肠杆菌科 (enterobacteriaceae)、大肠埃希杆菌 (*Escherichia coli*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、拟杆菌属、*Rhuminococcus*、乳杆菌属、双歧杆菌属、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、约翰森氏菌属 (*Johnsonella*)、奇异菌属 (*Atopobium*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、真细菌属 (*Eubacterium*)、*Fingoldia*、梭菌属 (*Clostridium*)、埃格特氏菌属 (*Eggerthella*)、丁酸杆菌属 (*Butyribacterium*)、柠檬细菌属 (*Citrobacter*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 和棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、卵形拟杆菌、多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、嗜酸拟杆菌 (*Bacteroides acidophilus*)、粪拟杆菌 (*Bacteroides caccae*)、AG6 (DSM 18726) 和 / 或 MU1 (DSM18728),其中选自所述组的所述微生物是核心 -1 阳性的,并且由至少一种核心 -1 特异性抗体识别。

[0363] 因为这些微生物并非本身是核心 -1 阳性的,所以重要的是选择能够触发核心 -1 特异性免疫应答的微生物 / 菌株。因此,重要的是所述微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体特异性识别,并且因此如果与之接触,那么由所述抗体结合。触发核心 -1 特异性免疫应答的能力也可以通过本文描述的体液和细胞测试系统进行测定。当比较根据本发明的微生物与现有技术时,这种特异性选择重要也变得显而易见。

[0364] 例如 G. F. Springer 等人描述了在饲养来自血清型 086 的菌株的大肠杆菌后,T-抗原的诱导。在这些实验中,为了评估抗 -T 抗体,使用含唾液酸酶处理的红细胞的凝集试验。红细胞的唾液酸酶处理导致核心 -1 表位的解蔽,但同样许多更多的表位解蔽。因此,这种测定法并非核心 -1 特异性的。未使用特异性的抗核心 -1 抗体。为了发现这些菌株根据本发明是否是核心 -1 阳性的,在筛选操作中包括几种大肠杆菌菌株,在它们中有来自培养物保藏中心的 7 种建立的大肠杆菌菌株,且特别是大肠杆菌菌株 DSMZ 8697 (菌株 32),其具有血清型 086 且 因此与由 Springer 使用的大肠杆菌菌株强相关;原始菌株无法获得。此外,在用 TF- 特异性抗体的亲和力富集后,测试了得自 3 个健康人类受试者的粪便样品的 12 种大肠杆菌菌株。然而,在高碘酸盐处理后,这些菌株无一显示所期望的 TF- 特异性抗体 Nemod-TF-1 和 Nemod-TF2 结合的减少。对于血清型 086 (菌株 32) 的大肠杆菌菌株,与 Nemod-TF1、Nemod-TF2 和 B/A11 的结合仅在高碘酸盐处理后 (破坏糖结构) 显示。这指出隐藏的核心 -1 表达,意指核心 -1 表位是不可接近的,并且因此无法用于触发核心 -1 特异性免疫应答。为了证实这点,在小鼠的免疫接种后,血清型 086 (= 32) 的大肠杆菌菌株也在体液免疫应答测试中进行测试。令人惊讶的是,尽管在 HIRT 1 (其是较不特异性的) 中在这些小鼠的血清中发现抗 AGP 抗体,但在特异性测试 HIRT 2 和 HIRT 3 中不存在阳性结果。这些结果证实不存在由所述大肠杆菌菌株诱导的核心 -1 特异性免疫应答,所述免疫应答识别在 PAA 或人肿瘤细胞上的核心 -1 (关于细节参见实施例)。因此,据说是 TF 阳性的血清型 086 的大肠杆菌菌株事实上不适合于解决该问题,因为与本发明的核心 -1 阳性微生

物形成对比——它不能触发核心-1 特异性免疫应答。因此,重要的是选择这样的大肠杆菌菌株,其为核心-1 阳性的,且由至少一种核心-1 特异性抗体特异性识别,且因此如果与之接触,那么由所述抗体结合。如上所述,包含隐藏形式的核心-1 的分别的微生物可以通过化学处理(例如高碘酸盐处理)转变成核心-1 阳性微生物。用于测定微生物在所述处理后是否是核心-1 阳性微生物的合适测试方法在上文描述。

[0365] 类似结果也对于螺杆菌属发现。Klaamas 等人(Immunological Investigations 第 31 卷, Nos 3&4, 第 191-204 页, 2002) 描述了幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 菌株 NCTC 11637 对于与 T 抗原特异性抗体的结合是阳性的。在 ELISA 实验中以约 $5-10 \times 10^6$ 细菌 / 孔平行使用幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637, 这导致 Nemod-TF1 和 Nemod-TF2 抗体对于核心-1 阳性菌株 AG6 和 MU1 的强结合。然而, 无法检测出 Nemod-TF1 和 Nemod-TF2 抗体与幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 的结合。 仅在用高碘酸处理后, 幽门螺杆菌菌株 NCTC11637 由 Nemod-TF1 抗体结合, 但不由 Nemod-TF2 抗体结合。这也指出核心-1 在幽门螺杆菌上的隐藏表达, 这仅在高碘酸盐处理后检测出。在 Klaamas 等人的实验中, 核心-1 结果可能是由于所使用的抗体较少的特异性或由于极高量细菌 (10^8 / 试管) 的使用, 这可能在某种程度上包括包含核心-1 的降解产物。此外, 螺杆菌属在营养食品或药物中的使用是困难的。人类胃的幽门螺杆菌定居诱导慢性感染, 并且在胃十二指肠溃疡疾病的发病机理中起重要作用, 并且与胃粘膜的 B 细胞淋巴瘤的发展相关。因此, 幽门螺杆菌在人类的预防或治疗中的应用是困难的。因此, 幽门螺杆菌优选不根据本发明使用。

[0366] 更优选地所述核心-1 阳性微生物选自大肠埃希杆菌, 拟杆菌属例如卵形拟杆菌、多形拟杆菌、嗜酸拟杆菌和粪拟杆菌, 并且更加优选选自拟杆菌属新菌株 AG6 (DSM 18726)、拟杆菌属新菌株 MU1 (DSM18728), 所述新菌株于 2006 年 10 月 20 日通过 Glycotope GmbH, Robert- **Rössle** -Str. 10, 13125 Berlin (德国) 保藏于 Braunschweig (德国) 中的“DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”处。

[0367] 在另一个优选实施方案中, 提供了本发明的制剂, 其中核心-1 阳性微生物选自大肠埃希杆菌、链球菌属、拟杆菌属、*Rhuminococcus*、乳杆菌属、双歧杆菌属、消化链球菌属、梭杆菌属、约翰森氏菌属、奇异菌属、葡萄球菌属、真细菌属、*Fingoldia*、梭菌属、埃格特氏菌属、丁酸杆菌属、柠檬细菌属、螺杆菌属、丙酸杆菌属和棒状杆菌属、卵形拟杆菌、多形拟杆菌、嗜酸拟杆菌、粪拟杆菌、AG6 (DSM 18726)、MU1 (DSM 18728)。

[0368] 在一个优选实施方案中, 细菌菌株选自 AG6 (DSM 18726)、MU1 (DSM 18728)。

[0369] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中, 营养食品或药物制剂的核心-1 阳性微生物(活性组分)是不同菌株的核心-1 阳性微生物的组合。

[0370] 在一个进一步优选的实施方案中, 所述活性组分是选自菌株 AG6 和 MU1 的不同菌株的核心-1 阳性微生物的组合。

[0371] 在一个进一步优选的实施方案中, 本发明的营养食品或药物组合物(制剂)包含与至少一种其他有益微生物(例如但不限于乳杆菌和/或双歧杆菌)组合的至少一种核心-1 阳性微生物, 更加优选与其他有益微生物组合的不同菌株的核心-1 阳性微生物组合。

[0372] 在本发明的一个优选实施方案中, 核心-1 阳性微生物是非致病性微生物。在本发明的一个进一步优选的实施方案中, 核心-1 阳性微生物从健康供体中分离。在本发明的一个进一步优选的实施方案中, 核心-1 阳性微生物可以从健康供体中分离。

[0373] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,核心-1 阳性微生物和 / 或其部分通过本领域技术人员已知的技术,用于制备用于治疗或预防肿瘤的药物和 / 或营养食品。

[0374] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,核心-1 阳性微生物和 / 或其部分在体内或在体外用于诱导或增强核心-1 特异性免疫应答,和 / 或用于产生功能性树突状细胞或活化 T 细胞、T 细胞系或 T 细胞克隆或针对核心-1 的抗体。

[0375] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,核心-1 微生物作为活生物体在营养食品或药物组合物中使用。

[0376] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,核心-1 微生物作为活生物体使用且口部施用。

[0377] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,在营养食品或药物组合物中使用的核心-1 微生物对于至少一种抗生素是敏感的。

[0378] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,在营养食品中使用的核心-1 微生物可以寄居肠。

[0379] 在本发明的另一个优选实施方案中,在营养食品或药物组合物中使用的核心-1 微生物是死的。

[0380] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中,在营养食品或药物组合物中使用的核心-1 微生物是巴氏杀菌的。

[0381] 在本发明的一个更加优选的实施方案中,在营养食品或药物组合物中使用的核心-1 微生物作为活生物体使用,且从健康人类供体中分离,且可以寄居人类肠,且是抗生素敏感的。

[0382] 在本发明的一个更加优选的实施方案中,核心-1 微生物在营养食品中以巴氏杀菌形式使用,且从健康人类供体的肠中分离,且是抗生素敏感的。

[0383] 在本发明的另一个优选实施方案中,在药物组合物中使用的核心-1 微生物是死的或裂解的。

[0384] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,在营养食品或药物组合物中使用的核心-1 微生物是冷冻干燥的。

[0385] 所选择的核-1 阳性菌株以及并非核-1 阳性的菌株通过其针对不同抗体的敏感性 (参见表 1- 图 22) 以及通过其与核-1 特异性抗体的结合 (参见表 2) 进行表征。

[0386] 表 2

[0387]

代码 / 菌株	物种	与 NEMOD-TF1 结合	与 NEMOD-TF1 结合的高碘酸盐敏感性	与 NEMOD-TF2 结合	与 NEMOD-TF2 结合的高碘酸盐敏感性	与 A68-B/A11 结合	与 A68-B/A11 结合的高碘酸盐敏感性
AG6	卵形拟杆菌	阳性	信号减少	阳性	信号减少	阴性	无信号减少
MU1	卵形拟杆菌	阳性	信号减少	阳性	信号减少	阴性	无信号减少
LH2 (DSM 18727),	大肠杆菌	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少	阳性	信号减少
32	大肠杆菌	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少
52	多形拟杆菌	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少
53	卵形拟杆菌	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少	阳性	信号减少
AG3	大肠杆菌	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少	阴性	无信号减少

[0388] D) 核心 -1 阳性微生物的部分的供应

[0389] 本发明提供了本发明的核心 -1 阳性微生物的部分, 其中核心 -1 阳性微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体识别 / 结合。

[0390] 本发明提供了本发明的核心 -1 阳性微生物的合适部分, 其用于用作关于本发明的营养食品或药物组合物的组分, 其中核心 -1 阳性微生物由至少一种核心 -1 特异性抗体识别 / 结合。

[0391] 本发明提供了本发明的核心 -1 阳性微生物的部分, 其在人类或动物中诱导针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性免疫应答。

[0392] 本发明提供了核心 -1 阳性微生物的合适部分, 其用于用作关于本发明的营养食品或药物组合物的组分, 其中核心 -1 阳性微生物的部分在人类或动物中诱导针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性免疫应答。

[0393] 本发明提供了核心 -1 阳性微生物的部分, 其代表本发明的营养食品或药物组合物的活性成分, 并且其在人类或动物中诱导针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫应答的特异性。

[0394] 本发明提供了核心 -1 阳性微生物的部分, 当其在本发明的营养食品或药物组合物中使用, 其在人类或动物中诱导或增强针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性免疫应答。

[0395] 所述核心 -1 特异性抗体、优选的核心 -1 特异性抗体、核心 -1 特异性抗体的组合或核心 -1 特异性抗体的优选组合在本文的定义和其他地方详细描述。

[0396] 所述营养食品或药物组合物及其优选实施方案在本文其他地方详细描述。

[0397] 所述核心 -1 阳性微生物的部分意指所述微生物的较小部分的制备或纯化, 例如细胞壁制备、包膜制备、裂解物、脂多糖制备、荚膜制备、或荚膜多糖制备, 这在实施例 (实施例 10) 中描述, 或本领域技术人员能够优化和选择一种合适的方法或合适方法的组合。它们优选包含所述核心 -1 阳性微生物的至少一种核心 -1 阳性组分。它们可以通过由至少一种核心 -1 阳性微生物的制备或纯化而获得。所述制备和纯化可以通过本领域技术人员已知的方法来获得, 所述方法例如上文描述的那些、或单次或顺次细胞分级、酚水萃取法、醚萃取法、溶菌酶消化或层析法。核心 -1 阳性组分或包含核心 -1 阳性组分的部分通过所述部分在测试系统中与至少一种核心 -1 特异性抗体的结合进行检测, 所述测试系统例如但不限于本领域技术人员已知的 ELISA 或斑点印迹。在本发明的一个优选实施方案中, 包含核心 -1 阳性组分的部分通过亲和层析使用至少一种核心 -1 特异性抗体来获得。

[0398] 在一个优选实施方案中, 使用单个制备或纯化步骤。在另一个优选实施方案中, 使用至少分离和纯化部分的组合。

[0399] 在一个进一步优选的实施方案中, 当与全 (whole) 微生物比较时, 核心 -1 阳性组分在所述部分中富集, 如可以通过与微生物比较, 至少一种核心 -1 特异性抗体与所述部分增加的结合测定, 例如通过 ELISA, 和优选地当相同体积中包含的生物学材料的重量相同时。

[0400] 所述核心 -1 阳性组分意指由至少一种核心 -1 特异性抗体结合的核心 -1 阳性微生物的任何组分。所述核心 -1 阳性组分包含至少一种核心 -1 碳水化合物结构或核心 -1 模拟结构, 其可以以其天然分子的形式获得, 在其中它是在微生物上的部分, 例如肽、寡肽、多肽、脂质、神经酰胺、碳水化合物、脂蛋白、多糖、寡糖、多糖、蛋白聚糖、脂多糖或糖蛋白,

或作为所述天然分子的部分或单独地获得。所述核心 -1 阳性组分还可以从携带隐蔽形式的核心 -1 的组分获得,例如通过化学处理例如高碘酸盐处理释放核心 -1。核心 -1 阳性组分就本发明而言可以像这样作为核心 -1 阳性微生物的部分使用,或与其他非天然载体结构偶联使用,所述非天然载体结构例如蛋白质、脂质、化学分子例如聚丙烯酰胺。优选地它以其天然形式使用。核心 -1 阳性组分可以包含单个核心 -1 碳水化合物结构或核心 -1 模拟结构或所述结构的重复单元,且可以包含另外的碳水化合物结构或单元或其他生物分子结构。所述核心 -1 模拟结构是这样的结构,其由至少一种核心 -1 特异性抗体结合和 / 或诱导针对核心 -1 的免疫应答,优先地针对核心 -1 的体液免疫应答或针对核心 -1 的细胞免疫应答,和更优先地针对核心 -1 的体液免疫应答和针对核心 -1 的细胞免疫应答。

[0401] 在本发明的一个优选实施方案中,所述免疫应答是针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的体液免疫应答,或者针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的细胞免疫应答。

[0402] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的体液免疫应答,以及针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的细胞免疫应答。

[0403] 所述针对核心 -1 的体液免疫应答和所述针对核心 -1 的细胞免疫应答,以及可以检测针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的相应抗体或 T 细胞应答的体液和细胞免疫应答测试,在本发明的其他地方详细描述。

[0404] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心 -1 的体液免疫应答,其对于体液免疫应答测试 1-6 中的至少 2 种体液免疫应答测试是阳性的,优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 6 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 是阳性的,和最优选对于所有 6 种体液免疫应答测试是阳性的。

[0405] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心 -1 的细胞免疫应答,其对于细胞免疫应答测试 1-5 中的至少 2 种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0406] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心 -1 的体液和细胞免疫应答,其对于至少一种体液免疫应答测试和至少一种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0407] 在本发明的一个更进一步优选的实施方案中,所述免疫应答是针对核心 -1 的体液和细胞免疫应答,其对于至少 2 种体液免疫应答测试和 2 种细胞免疫应答测试是阳性的,优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 以及细胞免疫应答测试 1 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 以及细胞免疫测试 1、2 和 3 是阳性的,和更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 以及细胞免疫测试 1、2、3 和 4 是阳性的,和更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 6 以及所有 5 种细胞免疫测试是阳性的,和更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 以及所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的,和最优选对于所有 6 种体液免疫应答测试以及所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0408] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了可以用于构建核心 -1 特异性免疫应答的核心 -1 阳性微生物的部分,其通过具有破坏那些细胞的潜能而充当针对核心 -1

阳性癌细胞的保护,如本文显示的例如通过核心-1 特异性抗体的诱导,通过有效杀死其的针对核心-1 阳性肿瘤细胞的核心-1 抗体的核心-1 特异性补体依赖性细胞毒性,和/或通过核心-1 特异性 T 细胞应答的 TNF α 和/或 INF γ 分泌,其是本领域技术人员关于携带核心-1 的那些肿瘤细胞的特异性细胞毒性 T 细胞介导的肿瘤细胞杀死的科学地识别到的替代标记,当作为本发明的营养食品或药物组合物使用时。

[0409] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了可以用于构建所述核心-1 特异性免疫应答的核心-1 阳性微生物的部分,其充当针对核心-1 阳性癌细胞的保护,如上文描述的通过在(至少一个)健康个体中口部施用营养食品,所述核心-1 特异性免疫应答具有破坏那些细胞的潜能。

[0410] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物的部分,通过给(至少一个)健康个体口部施用它(作为本发明的营养食品的组分),其可以用于减少或甚至进一步优选预防核心-1 阳性疾病或肿瘤的发生。

[0411] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物的部分,当作为本发明的药物制剂的组分在(至少一个)个体中施用,其可以用于减少或更加优选预防核心-1 阳性疾病或肿瘤的发生。

[0412] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物的部分,通过在患有这种疾病的患者中口部施用营养食品,其作为营养食品的活性成分使用,以治疗核心-1 阳性疾病或肿瘤。

[0413] 在一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物的部分,通过如本文其他地方描述的施用药物组合物,其作为药物组合物的活性成分使用,以治疗患有这种疾病的患者中的核心-1 阳性疾病或肿瘤。

[0414] 在一个更优选的实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物的部分,其是营养食品制剂的合适组分,其在人类中优先地显示识别核心-1 抗原和/或核心-1 阳性肿瘤细胞的免疫应答的诱导,通过在核心-1 阳性微生物的部分的口部施用后,对于本文和如上所述的优选实施方案中描述的至少一种体液或细胞免疫测试是阳性的。

[0415] 在最优选的实施方案中,所述核心-1 阳性微生物的部分对于与核心-1 特异性抗体 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 结合是阳性的,由此所述抗体的结合是高碘酸盐敏感的,在用高碘酸处理后显示 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 减少的结合,如本文其他地方描述的,并且其诱导这样的免疫应答,所述免疫应答对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 以及对于细胞免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,并且更加优选对于所有 6 种体液免疫应答测试以及对于所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的,如本文描述的。

[0416] 在本发明的另一个优选实施方案中,核心-1 阳性组分并非细菌脂多糖的部分。

[0417] 在一个优选实施方案中,本发明提供或使用

[0418] - 本发明的核心-1 阳性微生物的部分,或

[0419] - 包含至少一种核心-1 阳性微生物的至少一个部分的营养食品或药物制剂或食品添加剂,

[0420] 由此核心-1 阳性微生物选自肠杆菌科、大肠埃希杆菌、链球菌属、拟杆菌属、Rhuminococcus、乳杆菌属、双歧杆菌属、消化链球菌属、梭杆菌属、约翰森氏菌属、奇异菌属、葡萄球菌属、真细菌属、Finegoldia、梭菌属、埃格特氏菌属、丁酸杆菌属、柠檬细菌属、

螺杆菌属、丙酸杆菌属和棒状杆菌属、卵形拟杆菌、多形拟杆菌、嗜酸拟杆菌、粪拟杆菌、AG6 (DSM 18726) 和 / 或 MU1 (DSM 18728), 其中选自所述组的所述微生物是核心 -1 阳性的, 并且由至少一种核心 -1 特异性抗体识别。因为螺杆菌属是病原体, 所以所述核心 -1 阳性微生物优选不是螺杆菌属, 因为由于其的致病性质——螺杆菌属无法活的使用而没有危险。

[0421] 更优选地所述核心 -1 阳性微生物选自大肠埃希杆菌, 拟杆菌属例如卵形拟杆菌、多形拟杆菌、嗜酸拟杆菌和粪拟杆菌, 并且更加优选选自新菌株 AG6 (DSM 18726)、MU1 (DSM 18728), 所述新菌株于 2006 年 10 月 20 日通过 Glycotope GmbH, Robert- Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (德国) 保藏于 Braunschweig (德国) 中的 “DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” 处。

[0422] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中, 营养食品或药物制剂的核心 -1 阳性微生物的部分 (活性组分) 包含来自一种核心 -1 阳性微生物或优先地来自不同菌株的不同核心 -1 阳性微生物的部分的组合。所述部分可以具有相同或不同制备或纯化类型, 优选地是具有不同的分子载体或模拟结构的核心 -1 阳性组分的组合, 例如但不限于肽、寡肽、多肽、脂质、神经酰胺、碳水化合物、脂蛋白、多糖、寡糖、多糖、蛋白聚糖、脂多糖或糖蛋白, 或作为另一种天然或合成分子的部分。

[0423] 在一个进一步优选的实施方案中, 所述核心 -1 阳性微生物的部分 (活性组分) 包含至少 2 种不同菌株的核心 -1 阳性微生物的核心 -1 阳性组分的组合, 优选新菌株 AG6 (DSM 18726) 和 MU1 (DSM 18728)。

[0424] 在一个进一步优选的实施方案中, 所述核心 -1 阳性微生物的部分 (活性组分) 包含菌株 AG6 的核心 -1 阳性微生物的核心 -1 阳性组分。

[0425] 在本发明的另一个优选实施方案中, 所述核心 -1 阳性微生物的所述部分包含选自图 19 的 #1、#2、#3、#4 和 / 或 #5 的碳水化合物结构。

[0426] 在本发明的另一个优选实施方案中, 所述核心 -1 阳性微生物的部分包含选自图 19 的 #1、#2、#3、#4 和 / 或 #5 的碳水化合物结构的重复单元。

[0427] 在本发明的另一个优选实施方案中, 所述核心 -1 阳性微生物的部分包含选自图 19 的 #1、#2、#3、#4 和 / 或 #5 的至少一种碳水化合物结构和 / 或其重复单元。

[0428] 在本发明的另一个优选实施方案中, 所述碳水化合物结构或所述其重复单元通过富集和 / 或纯化和 / 或分离从核心 -1 阳性微生物获得。

[0429] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中, 所述碳水化合物结构或所述其重复单元通过富集和 / 或纯化和 / 或分离从菌株 AG6 获得。

[0430] 细节在实施例 10 中显示。

[0431] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中, 所述碳水化合物结构或所述其重复单元通过化学合成获得。

[0432] 本领域技术人员能够确定用于化学合成根据图 8 的碳水化合物结构或其重复单元的合适条件和方法。

[0433] 在一个进一步优选的实施方案中, 所述核心 -1 阳性微生物的部分 (活性组分) 包含菌株 MU1 的核心 -1 阳性微生物的核心 -1 阳性组分。

[0434] 在另一个优选实施方案中, 本发明的营养食品或药物组合物包含核心 -1 阳性微生物的至少一个部分和至少一种核心 -1 阳性微生物。

[0435] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明的营养食品或药物组合物包含与至少一种其他有益微生物(例如但不限于乳杆菌和/或双歧杆菌)组合的核心-1 阳性微生物的至少一个部分,更加优选与其他有益微生物组合的不同菌株的核心-1 阳性微生物组合。

[0436] 在另一个优选实施方案中,本发明的营养食品或药物组合物包含与至少一种其他有益微生物(例如但不限于乳杆菌和/或双歧杆菌)组合的核心-1 阳性微生物的至少一个部分和至少一种核心-1 阳性微生物。

[0437] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,在合适的组合物或制剂中施用,其在至少一个人类或动物中诱导或增强针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的体液和/或细胞免疫应答。

[0438] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,在合适的组合物或制剂中施用,其通过具有破坏核心-1 阳性癌细胞的潜能,在至少一个人类或动物中诱导或增强核心-1 特异性免疫应答,充当针对核心-1 阳性癌细胞的保护。

[0439] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,在合适的组合物或制剂中施用,其在至少一个人类或动物中减少和预防核心-1 阳性疾病、肿瘤或转移的发生。

[0440] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,在合适的组合物或制剂中施用,其在至少一个人类或动物中减少和预防核心-1 阳性疾病或肿瘤的扩展或转移。

[0441] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,在合适的组合物中施用,其在至少一个人类或动物中用于治疗核心-1 阳性疾病或肿瘤。

[0442] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,通过在健康个体中口部施用营养食品,其作为营养食品的活性成分使用,以预防核心-1 阳性肿瘤、减少核心-1 阳性肿瘤发展的危险、或减少核心-1 阳性肿瘤的发生。

[0443] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,通过在患有这种疾病的患者中口部施用营养食品,其作为营养食品的活性成分使用,以预防或减少核心-1 阳性肿瘤或肿瘤细胞的肿瘤扩展或转移或转移的扩展或复发时间,改善生活质量或生存中值或复发时间比率,或治疗具有或已具有核心-1 阳性肿瘤细胞的肿瘤患者。

[0444] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,通过在健康个体中施用药物组合物,其作为药物组合物的活性成分使用,以预防核心-1 阳性肿瘤、减少核心-1 阳性肿瘤发展的危险、或减少核心-1 阳性肿瘤的发生。

[0445] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了核心-1 阳性微生物或其部分,通过在患有这种疾病的患者中口部施用药物组合物,其作为药物组合物的活性成分使用,以预防或减少核心-1 阳性肿瘤或肿瘤细胞的肿瘤扩展或转移或转移的扩展或复发时间,改善生活质量或生存中值或复发时间比率,或治疗具有或已具有核心-1 阳性肿瘤细胞的肿瘤患者。

[0446] E) 用于诱导针对核心-1 阳性癌细胞的免疫保护、用于预防和/或治疗核心-1 阳性肿瘤和用于治疗或预防核心-1 阳性疾病的方法

[0447] 本发明提供了用于诱导或增强针对核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的特异性体液和/或细胞免疫应答的方法,其包括在人类或动物中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物组合物、或核心-1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制

剂。

[0448] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于诱导或增强针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性体液和 / 或细胞免疫应答的方法,其包括在人类或动物中施用有效量的如本文其他地方描述的制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其裂解物或部分。

[0449] 在一个优选实施方案中,本发明提供了上文提及的方法,其中所述营养食品、或所述药物制剂、或所述核心 -1 阳性微生物、或所述其部分、或所述包含这些的制剂包含来自由 Nemod-TF1 或 A78-G/A7 和 Nemod-TF2 识别 / 结合的核心 -1 阳性微生物的至少一种微生物、裂解物或部分。

[0450] 本发明提供了用于诱导或增强核心 -1 特异性免疫应答的方法,其通过具有破坏至少一种核心 -1 阳性癌细胞的潜能而充当针对核心 -1 阳性癌细胞的保护。

[0451] 在一个优选实施方案中,本发明提供了用于诱导核心 -1 特异性免疫应答的方法,其如本文显示的通过具有破坏这些细胞的潜能而充当针对核心 -1 阳性癌细胞的保护,例如通过核心 -1 特异性抗体的诱导,通过有效杀死其的针对核心 -1 阳性肿瘤细胞的核心 -1 抗体的核心 -1 特异性补体依赖性细胞毒性,和 / 或通过核心 -1 特异性 T 细胞应答的 TNF α 和 / 或 INF γ 分泌,其是本领域技术人员关于携带核心 -1 的那些肿瘤细胞的特异性细胞毒性 T 细胞介导的肿瘤细胞杀死的科学地识别到的替代标记,如实施例显示的和本文描述的,其包括在人类或动物中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0452] 本发明进一步提供了用于减少或甚至进一步优选用于预防肿瘤、优选地核心 -1 阳性肿瘤的发生的方法,其包括给人类或动物施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂,优选地在健康个体中。

[0453] 本发明进一步提供了用于减少或甚至进一步优选用于预防肿瘤、优选地核心 -1 阳性肿瘤的扩展或转移的方法,其包括给人类或动物施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0454] 本发明提供了治疗肿瘤、优选地核心 -1 阳性肿瘤的方法,其包括给人类或动物施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0455] 本发明提供了用于减少或甚至进一步优选用于预防核心 -1 阳性疾病的发生的方法,其包括在人类或动物中,优选地在健康个体中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0456] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于针对核心 -1 疫苗接种或免疫接种人类或动物的方法,其包括

[0457] i) 给人类或动物施用至少一次有效量的功能性树突状细胞或包含针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞的细胞混合物,并且通过所述功能性树突状细胞在人类或动物中诱导免疫应答和

[0458] ii) 通过施用至少一次有效量的药物组合物加强免疫应答,所述药物组合物包含至少一种核心 -1 阳性微生物和 / 或其部分和 / 或裂解物。

[0459] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于针对来自人类或动物细胞的分子上

存在的碳水化合物表位疫苗接种人类或动物的方法,其包括

[0460] i) 给人类或动物施用至少一次有效量的活化 T 细胞、T 细胞克隆、T 细胞系或包含针对核心 -1 的至少一种活化 T 细胞的细胞混合物,并且通过所述活化 T 细胞在人类或动物中诱导免疫应答和

[0461] ii) 通过施用至少一次有效量的药物组合物加强免疫应答,所述药物组合物包含核心 -1 阳性微生物和 / 或其部分和 / 或裂解物。

[0462] 功能性树突状细胞、活化 T 细胞、T 细胞系和 T 细胞克隆的产生在本文其他地方描述。

[0463] 在本发明的一个优选实施方案中,根据前述方法在 (i) 下的施用执行 1 次。在本发明的另一个优选实施方案中,根据前述方法在 (i) 下的施用执行 2 次。在本发明的另一个优选实施方案中,根据前述方法在 (i) 下的施用执行至少 3-5 次。

[0464] 在本发明的一个优选实施方案中,根据前述方法的 (ii) 通过施用有效量的药物组合物加强免疫应答执行 1 次,在本发明的另一个优选实施方案中,加强执行 2-10 次,更优选超过 10 次,更优选高达 20 次,最优选加强经过数月至数年的时间段以规则时间间隔持续进行。

[0465] 在本发明的一个优选实施方案中,免疫应答的加强接近于引发进行 1-5 次,并且其后以 3 个月 -1 年或 1 年 -10 年的间隔进行。

[0466] 功能性树突状细胞、活化 T 细胞、T 细胞系和 T 细胞克隆的产生在本文其他地方描述。

[0467] 本发明提供了用于减少或甚至进一步优选用于预防核心 -1 阳性疾病的扩展的方法,其包括在人类或动物中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0468] 本发明提供了治疗核心 -1 阳性疾病的方法,其包括在人类或动物中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0469] 本发明提供了增强免疫系统或改善免疫应答的方法,其包括在人类或动物中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。这可以是例如但不限于免疫系统的情况例如针对传染病或肿瘤的一般改善,其他免疫刺激试剂或益生菌或益生元的活性的改善,或作为佐剂的作用。

[0470] 在本发明的一个优选实施方案中,上文所述方法的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂包含来自自由 Nemod-TF1 和 / 或 A78-G/A7 和 Nemod-TF2 识别 / 结合的核心 -1 阳性微生物的至少一种微生物、裂解物或部分。

[0471] 在一个优选实施方案中,上文所述方法的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂包含来自菌株 AG6 (DSM 18726) 和 / 或 MU1 (DSM 18728) 的至少一种微生物、裂解物或部分。

[0472] 术语制剂意指包含至少一种营养食品、药物制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分的以用于施用的合适形式的任何物质或物质的组合物,其可以包含药学上可接受的载体或对于食品添加剂和 / 或营养食品可接受的载体,或者单独地营养食品、药物组合物、核心 -1 阳

性微生物或其部分。

[0473] 术语阻止发生指给受试者使用营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂,目的是减少发展核心 -1 阳性癌症或核心 -1 阳性疾病的危险或比率或可能性。

[0474] 术语减少或预防肿瘤或核心 -1 阳性疾病的扩展或肿瘤的转移指给受试者使用营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂,目的是减少该疾病转移或扩展至机体中的其他器官或其他位点或者其他个体的危险或比率或可能性。

[0475] 术语治疗指给个体或受试者使用营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂,目的是治愈、愈合、减轻、解除、改变、补救、改进、改善、或影响癌症、癌症的症状、朝向癌症的倾向、生存时间、或进展时间。

[0476] 所述核心 -1 阳性疾病是这样的任何疾病,其与可以由至少一种核心 -1 特异性抗体结合的病毒、微生物或其他生物学材料相关,或者与机体的组分相关或在人类或动物的机体中存在的组分相关,所述组分例如但不限于由至少一种核心 -1 特异性抗体结合的细胞、微生物、病毒或颗粒。

[0477] 营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂中的任何一个的“有效量”包含活的或死的微生物,或这些微生物的裂解物或部分,其对应于或衍生自约 1×10^6 - 约 1×10^{14} cfu/人/天 (cfu/人/天),由此 cfu 是菌落形成单位,像这样已知的作为一种微生物的测量,且可以由本领域技术人员进行测定。

[0478] 在本发明的另一个实施方案中,有效量是营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的量,其在至少一个个体中诱导针对核心 -1 的体液或细胞免疫应答,优选针对核心 -1 的体液和细胞免疫应答,可通过本文其他地方描述的针对核心 -1 的至少一种免疫应答测试检测。

[0479] 在本发明的另一个实施方案中,有效量是营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的量,其是赋予针对核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫保护、具有针对癌症的预防效应或具有针对癌症的治疗效应、或具有针对另一种核心 -1 阳性疾病的预防或治疗效应所需的,各自在至少一个个体中。

[0480] 关于个体或一群个体的有效量可以通过本领域技术人员进行测定和 / 或优化,优选使用本文其他地方描述的针对核心 -1 的至少一种免疫应答测试,和优选地在本文其他地方作为优选实施方案描述的针对核心 -1 的免疫应答测试的那些组合,和 / 或本领域技术人员已知的或本文其他地方描述的临床应答测试。

[0481] 这些有效量可以与上文描述的量或本文其他地方对于个人描述的剂量或优选量或剂量不同,依赖于例如受试者、剂量的数目和时间计划表、营养食品的形式或制剂、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分、施用途径和时间表、其用于例如治疗或预防的目的、核心 -1 阳性疾病或癌症的状态,并且它们可以依接受营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的物种、种族以及在个别动物或个别人类之间而变。本领域技术人员能够测定对于个体或一群个体合适的和 / 或最佳的剂量、施用途径和时间表,优选通过使用本文描述的本发明的说明书和实施方案。

[0482] 优选的是营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的那些有效量和剂量,其在超过一个个体中诱导或增强针对核心 -1 的所述免疫应答,更

优选在显著数目的个体中、更优选在至少 10%、更优选至少 20%、更优选至少 30%、更优选至少 40%、优选至少 50%、和最优选在大多数个体中。

[0483] 在一个优选实施方案中,有效量是所述营养食品、所述药物组合物、所述核心 -1 阳性微生物或所述其部分或所述包含这些的制剂的量,其在至少一个个体中诱导针对核心 -1 的免疫应答。

[0484] 在一个优选实施方案中,所述诱导的或增强的免疫应答是针对核心 -1 的体液和细胞免疫应答,可通过体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种和细胞免疫应答测试 1-5 中的一种检测。在一个优选实施方案中,有效量是诱导免疫应答的营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的量,所述免疫应答在本文描述的针对核心 -1 的免疫应答测试中的至少 2 种中是阳性的,更优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 是阳性的,更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 6 是阳性的,更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 是阳性的,和更优选对于所有 6 种体液免疫应答测试是阳性的,更加优选对于细胞免疫应答测试 1-5 中的至少 2 种细胞免疫应答测试是阳性的,更加优选对于至少一种体液免疫应答测试和至少一种细胞免疫应答测试是阳性的,更加优选对于至少 2 种体液免疫应答测试和 2 种细胞免疫应答测试是阳性的,优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 以及细胞免疫应答测试 1 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 以及细胞免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 以及细胞免疫测试 1、2、3 和 4 是阳性的,更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 6 以及所有 5 种细胞免疫测试是阳性的,更加优选对于体液免疫应答测试 1、2、3、4 和 5 以及所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的,和最优选对于所有 6 种体液免疫应答测试以及所有 5 种细胞免疫应答测试是阳性的。

[0485] 在一个优选实施方案中,有效量是所述营养食品、所述药物组合物、所述核心 -1 阳性微生物或所述其部分或所述包含这些的制剂的量,其是赋予针对核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫保护、具有针对癌症的预防效应或具有针对癌症的治疗效应、或具有针对另一种核心 -1 阳性疾病的预防或治疗效应所需的,各自在至少一个个体中。

[0486] 在另一个优选实施方案中,有效量是所述营养食品、所述药物组合物、所述核心 -1 阳性微生物或所述其部分或所述包含这些的制剂的量,其在至少一个个体中诱导最大或接近最大的针对核心 -1 的免疫应答。

[0487] 在一个更加优选的实施方案中,优选的有效量是营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的量,其诱导最大或接近最大的针对核心 -1 的免疫应答,如通过本领域技术人员在针对核心 -1 的免疫应答测试中检测的,由此这个最大免疫应答不一定在所有免疫应答测试中是阳性的,但优选给出针对核心 -1 的最高抗体应答或抗体滴度,和 / 或针对核心 -1 和更优选针对核心 -1 阳性肿瘤细胞的最高 T 细胞应答,更优选两者,和最优选下述那些:至少在针对核心 -1 的体液免疫应答测试 1 和 3 中显示最高的抗体滴度,和 / 或至少在针对核心 -1 的细胞免疫应答测试 1 或 2 或 3 中显示针对核心 -1 的最高 T 细胞应答。

[0488] 在优选实施方案中,所述营养食品、所述药物组合物、所述核心 -1 阳性微生物或所述其部分或所述包含这些的制剂的有效量包含活的或死的微生物,或这些微生物的裂解

物或部分,其对应于或衍生自约 1×10^6 – 约 1×10^{14} cfu/ 个体 / 剂量。

[0489] 在一个更优选的实施方案中,营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的有效量包含活的或死的微生物,或这些微生物的裂解物或部分,其对应于或衍生自约 1×10^7 – 约 1×10^{13} cfu/ 个人 / 天、更优选 2×10^8 – 1×10^{12} 、和更优选 1×10^9 – 约 1×10^{11} cfu/ 个人 / 天。

[0490] 如本领域技术人员公认的,有效量或有效剂量也可以依施用途、赋形剂使用和其他试剂共使用的可能性而变,所述其他试剂例如用于免疫增强、用于诱导免疫应答、或构建免疫保护或者预防或治疗癌症的那些。

[0491] 如本领域技术人员公认的,有效量或有效剂量也可以依使用形式以及剂量的量和剂量之间的时间间隔而变,所述使用形式例如作为营养食品、作为药物组合物、作为核心 -1 阳性微生物或作为其部分或作为包含这些的制剂使用,以及它们是否包含活的、死的裂解物或其部分。它们可以通过本领域技术人员进行测定和优化,优选通过使用本发明提供的发明、测试和方法。

[0492] 在一个优选实施方案中,营养食品口部施用,从每天超过 1 次剂量到每天、每周或每月一次剂量,从短期间隔到一年长的使用,优选经过 4 周到 2 年每天或每周使用。

[0493] 在另一个优选实施方案中,单次剂量施用于个体。在另一个优选实施方案中,多次剂量施用于个体。在另一个优选实施方案中,有效量对应于单次剂量。在另一个优选实施方案中,有效量对应于多次剂量。

[0494] 在一个优选实施方案中,药物组合物可以全身地施用,从少至仅 1 次剂量到多次剂量,优选每周到每月一次到每 3 个月一次或每 6 个月一次或其交错组合,并且可以与免疫接种更新每 6 个月一次到每年一次,到每 5 年一次到每 10 年一次组合。

[0495] 在本发明的另一个优选实施方案中,包含至少一种核心 -1 阳性微生物裂解物或其部分的营养食品制剂在人的有效剂量是 $0, 1\text{mg}/\text{m}^2$ – $10\text{g}/\text{m}^2$ 、更优选 $10\text{mg}/\text{m}^2$ – $10\text{g}/\text{m}^2$ 、更加优选 $0, 1\text{g}/\text{m}^2$ – $10\text{g}/\text{m}^2$ 。

[0496] 在另一个优选实施方案中,制剂首先全身地施用,伴随免疫接种的后续口部更新。

[0497] 术语施用意指使人类或动物与有效量的营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂接触,对于其可以使用另外的载体。施用途包括使人类或动物与营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂接触的任何方式。优选的是这些施用途,例如但不限于口部施用、全身施用、经由吸入或经由与皮肤或另一种表皮接触施用,这导致针对核心 -1 的免疫应答、针对核心 -1 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的免疫保护、针对癌症的预防效应或针对癌症的治疗效应,这可以以其优选形式如上文或本文其他地方描述的进行测定。本领域技术人员可以选择最合适的施用途。

[0498] 关于优选施用途和制剂的例子在下文描述:

[0499] 营养食品优选口部施用,例如作为胶囊、片剂、乳剂、粉剂、液体、以任何食品或饮料的形式、或作为食品或饮料的组分例如食品添加剂。营养食品可以单独给予或与至少一种其他成分混合。单独的营养食品或其与至少一种其他成分的混合物可以单独给予或混合到食品或饮料内。

[0500] 用于营养食品以及药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的口部施用的制剂可以是营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些

的制剂的任何经口可接受的剂型或有效量,包括但不限于片剂、胶囊、纳米颗粒、乳剂和水悬浮液、分散系和溶液。用于片剂的常用载体包括乳糖和玉米淀粉。润滑剂例如硬脂酸镁一般也加入片剂中。对于以胶囊形式的口部施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当水悬浮液或乳剂口部施用时,活性成分可以与乳化剂或悬浮剂组合悬浮或溶解于油相中。需要时,可以加入某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0501] 用于口部施用的制剂可以是营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂的任何经口可接受的剂型或有效量,包括但不限于片剂、胶囊、纳米颗粒、乳剂和水悬浮液、分散系和溶液。用于片剂的常用载体包括乳糖和玉米淀粉。润滑剂例如硬脂酸镁一般也加入片剂中。对于以胶囊形式的口部施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当水悬浮液或乳剂口部施用时,活性成分可以与乳化剂或悬浮剂组合悬浮或溶解于油相中。需要时,可以加入某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0502] 本发明的制剂可以口部或肠胃外施用。肠胃外施用包括注射,例如点滴输注、皮下、静脉内或肌肉注射、用软膏或经皮药物的经皮应用、和用栓剂的直肠应用。当组合物口部施用时,它可以以硬胶囊、软胶囊、粒剂、粉剂、微粒剂、丸剂、糖锭片剂、活性成分逐步递送系统、液体和悬浮液的形式制备。制剂可以通过药学领域中的常规方法容易地进行。

[0503] 施用方式和剂型当然将影响对于给定治疗应用所需和有效的化合物或组合物的治疗量。当本发明的制剂以口部施用的形式制备时,组合物可以使用标准医学中的常规药学成分进行制备,例如填充剂、膨胀剂、粘合剂、崩解剂、表面活性剂、稀释剂例如润滑剂和赋形剂。常规成分的具体例子包括接受者例如乳糖、精制糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、淀粉、碳酸钙、白陶土、结晶纤维素和硅酸;粘合剂例如水、乙醇、单糖浆、葡萄糖液、淀粉液、明胶液、羧甲基纤维素、虫胶、甲基纤维素、磷酸钾和聚乙烯吡咯烷酮;崩解剂例如干燥淀粉、海藻酸钠、琼脂、海带多糖粉、碳酸氢钠、碳酸钙、聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、十二烷基硫酸钠、硬脂酸甘油单酯、淀粉和乳糖;腐烂抑制剂例如精制糖、硬脂酸、可可脂和氢化油;吸收促进剂例如季铵盐和十二烷基硫酸钠;湿润剂例如甘油和淀粉;吸收剂例如淀粉、乳糖、白陶土、皂粘土和胶体硅酸;和润滑剂例如纯化滑石和硬脂酸盐。必要时,制剂进一步包括着色剂、防腐剂、香料、调味剂和甜味剂。

[0504] 合适的药学上可接受的盐是本领域技术人员众所周知的,并且包括无机酸和有机酸的碱性盐,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、乙酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、草酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苯甲酸、水杨酸、苯乙酸和扁桃酸。此外,本发明化合物的药学上可接受的盐还可以由药学上可接受的阳离子形成,例如如果取代基包含羧基部分。合适的药学上可接受的阳离子是本领域众所周知的,并且包括碱、碱土金属铵和季铵阳离子。

[0505] 在一个优选实施方案中,药物组合物的施用途径选自静脉内注射、腹膜内注射、肌肉注射、颅内注射、瘤内注射、上皮内注射、经皮递送、食管施用、腹内施用、阑尾内施用、动脉内施用、关节内施用、支气管内施用、颊内施用、囊内施用、心脏内施用、软骨内施用、腔内施用、脑内施用、结肠内施用、皮内施用、囊内施用、真皮内施用、导管内施用、十二指肠内施用、束内施用、脂肪内施用、花丝内施用、裂内施用、胃内施用、腺内施用、肝内施用、肠内施用、板内施用、损伤内施用、韧带内施用、舌内施用、乳房内施用、髓内施用、脑膜内施用、心肌内施用、鼻内施用、眼内施用、手术中施用、口内施用、骨内施用、卵巢内施用、胰内

施用、顶区内施用、肾盂内施用、心包内施用、会阴内施用、腹膜内施用、胎盘内施用、胸膜内施用、脑桥内施用、前列腺内施用、肺内施用、脊椎内施用、直肠内施用、肾内施用、巩膜内施用、阴囊内施用、段内施用、蝶鞍内施用、椎管内施用、脾内施用、胸骨内施用、基质内施用、滑膜内施用、跗骨内施用、睾丸内施用、胸内施用、扁桃体内施用、气管内施用、管内施用、鼓室内施用、输尿管内施用、尿道内施用、子宫内施用、阴道内施用、血管内施用、心室内施用、脊柱内施用、膀胱内施用和玻璃体内施用。

[0506] 在本发明的一个更优选的实施方案中，施用（=接触）途径的例子包括肠胃外，例如静脉内、真皮内、皮下、口部、经皮（局部）、经粘膜、腹膜内、鼻内、直肠内和口部施用。

[0507] 本发明的制剂可以包括其中的组分的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括由无机酸例如盐酸或磷酸，或者此种有机酸如乙酸、酒石酸、扁桃酸等形成的酸加成盐。由游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱例如氢氧化钠、钾、铵、钙或铁，以及此种有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。生理学上可耐受的载体是本领域众所周知的。液体载体的例子是无菌水溶液，其不包含除活性成分和水外的材料，或包含缓冲剂例如在生理学 pH 值下的磷酸钠、生理盐水或两者，例如磷酸盐缓冲盐水。再进一步地，水性载体可以包含超过一种缓冲盐，以及诸如氯化钠和钾的盐、右旋糖、丙二醇、聚乙二醇和其他溶质。液体组合物还可以包含除水外的液相和排除水的液相。此种另外的液相的例子是甘油、植物油例如棉籽油、有机酯例如油酸乙酯和水油乳剂。制剂包含本发明的核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分，一般以至少 0.1 重量百分比的核心 -1 阳性微生物、或其部分或裂解物 / 总组合物的重量。重量百分比是核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分与总组合物的重量比。因此，例如，0.1 重量百分比是 0.1 克核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分与总组合物 / 100 克总组合物。

[0508] 术语“药学上可接受的盐”指这样的化合物的盐，其保留游离碱的生物学有效性和性质且通过与无机酸反应而获得，所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。药学上可接受的盐包括例如碱金属盐例如钠和钾，碱土金属盐和铵盐。

[0509] 包含核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分）作为活性成分的制剂可以以适合于口部使用的形式，例如作为片剂、锭剂、糖锭剂、水或油悬浮液、可分散的粉剂或粒剂、乳剂、硬或软胶囊、或糖浆剂或酏剂。预期用于口部使用的组合物可以根据本领域已知用于制备药物组合物的任何方法进行制备，并且此种组合物可以包含选自下述的一种或多种试剂：甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂，以便提供药学上精制和可口的制剂。片剂包含与无毒的药学上可接受的赋形剂混合的活性成分，所述赋形剂适合于制备片剂。这些赋形剂可以是例如惰性稀释剂，例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；粒化剂和崩解剂，例如玉米淀粉或海藻酸；结合剂例如淀粉、明胶或阿拉伯胶，和润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可以是无包被的，或它们通过已知技术进行包被，以在胃肠道中延迟崩解和吸收，且从而提供经过更长的时间段的持续作用。例如，可以采用时间延迟材料例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们还可以通过美国专利号 4, 256, 108 ; 4, 166, 452 ; 和 4, 265, 874 中描述的技术进行包被，以形成渗透治疗片剂用于控制释放。根据本发明的制剂还可以或可替代地包含一种或多种药物，其可以与调节剂连接或可以是在组合物内游离的。如本文描述的，基本上任何药物可以与调节剂组合施用，用于如下所述的各种用途。‘可以与调节剂一

起施用的药物类型的例子包括镇痛药、麻醉药、抗心绞痛药、抗真菌药、抗生素、抗癌药（例如泰素或丝裂霉素C）、抗炎药（例如布洛芬和吲哚美辛）、抗蠕虫药、抗抑郁药、解毒药、止吐药、抗组织胺药、抗高血压药、抗疟药、抗微管剂（例如秋水仙碱或长春花生物碱）、抗偏头痛剂、抗微生物药、抗精神病药、解热药、抗菌药、抗信号药物（例如蛋白质激酶C抑制剂或细胞内钙动员抑制剂）、抗关节炎药、抗凝血酶试剂、抗结核病药、镇咳药、抗病毒药物、食欲抑制剂、心血管活性药物、化学依赖性药物、泻药、化学治疗剂、冠状、大脑或周围血管扩张药、避孕药、抑郁药、利尿药、祛痰药、生长因子、激素试剂、安眠药、免疫抑制试剂、麻醉品拮抗药、拟副交感神经药、镇静药、兴奋剂、拟交感神经药、毒素（例如霍乱毒素）、安神药和泌尿抗感染药。

[0510] 用于口部施用的制剂还可以呈现为硬明胶胶囊，其中活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或白陶土混合，或作为软明胶胶囊，其中活性成分与水或油介质例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。水悬浮液包含与适合于制备水悬浮液的赋形剂混合的活性材料。此种赋形剂是悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯树胶；分散剂或湿润剂可以是天然存在的磷脂例如卵磷脂，或烷基氧化物与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，例如十七烷乙烯氧鲸蜡醇（heptadecaethyleneoxycetanol），或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，例如聚氧乙烯与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯，例如聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯。水悬浮液还可以包含一种或多种防腐剂，例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂、和一种或多种甜味剂例如蔗糖或糖精。

[0511] 油悬浮液可以通过使活性成分悬浮于植物油（例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油）或者矿物油（例如液体石蜡）中进行配制。油悬浮液可以包含增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂例如上文列出的那些和调味剂以提供可口的口服制剂。这些组合物可以通过添加抗氧化剂例如抗坏血酸进行保存。

[0512] 适合于通过添加水用于制备水悬浮液的可分散粉剂和粒剂提供与分散剂或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂是例示的，还可以存在例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0513] 本发明的制剂还可以以水包油乳剂的形式。油相可以是植物油，例如橄榄油或花生油，或矿物油例如液体石蜡，或这些的混合物。合适的乳化试剂可以是天然存在的树胶，例如阿拉伯树胶或黄蓍树胶，天然存在的磷脂例如大豆、卵磷脂、和衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯，例如去水山梨糖醇单油酸酯，以及所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯。乳剂还可以包含甜味剂和调味剂。

[0514] 糖浆剂和酏剂可以用甜味剂进行配制，例如甘油、丙二醇、山梨糖醇或蔗糖。此种制剂还可以包含缓和剂、防腐剂和调味剂以及着色剂。药物组合物还可以以无菌可注射水或油悬浮液的形式。这种悬浮液可以根据已知技术进行配制，使用上文已提及的那些合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液，例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。在可以采用的可接受的媒介物和溶剂中有水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外，无菌不挥发性油照惯例用作溶剂或悬浮介质。为此可以采用任何温和的不挥发性油，包括合成甘油单或二酯。此外，

脂肪酸例如油酸在血管注射剂的制备中有用。约 0.01mg- 约 140mg/ 千克体重 / 天级别的剂量水平在治疗上文指出的病状中有用 (约 2.5mg- 约 7g/ 患者 / 天)。例如,核心-1 阳性肿瘤可以通过施用约 0.01mg- 约 50mg 化合物 / 千克体重 / 天 (约 0.5mg- 约 3.5g/ 患者 / 天) 进行有效治疗。可以与载体材料组合以产生单个剂型的活性成分的量可以依治疗的宿主和具体施用方式而变。例如,预期用于人类的口部施用的制剂可以从约 5 到约 95% 总组合物不同。剂量单位形式一般将包含约 1mg- 约 10g 活性成分。然而,应当理解关于任何特定患者的特定剂量水平将依赖各种因素,包括采用的特定化合物的活性、年龄、体重、一般健康、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄率、药物并用和处于治疗的具体疾病的严重程度。根据本发明的化合物的剂量有效量将依下述因素而变,包括具体化合物、毒性和抑制活性、治疗的病状、以及化合物是单独施用还是与其他治疗一起施用。一般地,剂量有效量将为约 0.0001mg/kg-1500mg/kg,更优选 1-1000mg/kg,更优选约 1-150mg/kg 体重,和最优选约 50-100mg/kg 体重。本发明还涉及用于治疗前述病理学状况的过程或方法。本发明的化合物可以预防地或治疗地施用于需要此种治疗的温血动物例如人类,优选以针对所提及的病状有效的量,化合物优选以药物组合物或营养食品的形式使用。

[0515] 药学上可接受的赋形剂和载体溶液的配制是本领域技术人员众所周知的,如关于使用本文描述的在各种治疗方案中的具体组合物开发合适的给药和治疗方案,包括例如口部、肠胃外、静脉内、鼻内和肌内施用和制剂。

[0516] A. 口部递送

[0517] 在某些应用中,本文公开的制剂可以经由口部施用递送给人类或动物。像这样,这些化合物可以用惰性稀释剂或用可同化的可食用载体进行配制,或它们可以装入硬或软壳明胶胶囊中,或它们可以压缩成片剂,或它们可以与饮食的食品一起直接掺入。

[0518] 活性化合物甚至可以与赋形剂一起掺入,或以可摄取片剂、颊含片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆剂、华夫等的形式使用。片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可以包含下述:粘合剂,如黄蓍树胶、阿拉伯胶、玉蜀黍淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸二钙;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等;润滑剂,例如硬脂酸镁;和甜味剂,例如可以加入蔗糖、乳糖或糖精,或调味剂例如薄荷油、冬青油或樱桃调味料。当剂量单位形式是胶囊时,除上述类型的材料外,它还可以包含液体载体。可以存在各种其他材料作为包衣,或以其他方式修饰剂量单位的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊可以用虫胶、糖或两者进行包被。糖浆剂或酏剂可以包含活性化合物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的 对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、染料和调味剂,例如樱桃或橙子风味。当然,在制备任何剂量单位形式中使用的任何材料应是药学上纯的,并且在使用的量方面基本上是无毒的。此外,活性化合物可以掺入持续释放的制剂和配方内。

[0519] 一般地,这些制剂可以包含至少约 0.1% 活性化合物或更多,尽管当然活性成分的百分比可以改变,并且可以方便地为约 1 或 2% - 约 60% 或 70% 或更多重量或体积的总制剂。天然地,每种治疗上有用的组合物中活性化合物的量可以以这样的方式进行制备,使得合适的剂量将以化合物的任何给定单位剂量获得。因素例如溶解性、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品贮存期限以及其他药理学考虑将由制备此种药物配方领域的技术人员加以考虑,并且像这样,各种剂量和治疗方案可以是令人满意的。

[0520] 对于口部施用,本发明的组合物可以可替代地与一种或多种赋形剂一起掺入,以

漱口水、牙粉、颊含片、口腔喷雾或舌下口部施用制剂的形式。例如，漱口水可以在合适的溶剂（例如硼酸钠溶液（多贝耳液））中掺入所需量的活性成分进行制备。可替代地，活性成分可以掺入口服溶液例如包含硼酸钠、甘油和碳酸氢钾的溶液内，或分散在牙粉中，或以治疗有效量 / 有效剂量加入组合物内，所述组合物可以包括水、粘合剂、磨料、调味剂、发泡剂和保湿剂。可替代地组合物可以塑造成片剂或溶液形式，其可以放置在舌下或以其他方式溶解于口中。

[0521] B. 血管注射剂递送

[0522] 在某些情况下，将希望肠胃外、静脉内、肌内或甚至腹膜内递送本文公开的制剂。作为游离碱或药学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在水中与表面活性剂适当地混合进行制备，所述表面活性剂例如羟丙基纤维素。分散系还可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中进行制备。在常见的贮存和使用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

[0523] 适合于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散系和无菌粉剂 用于即时制备无菌可注射溶液或分散系。在所有情况下，形式必须是无菌的，并且必须是流动至存在容易的注射性的程度。它在制备和贮存条件下必须是稳定的，并且必须针对微生物的污染作用进行保存，所述微生物例如细菌和真菌。载体可以是溶剂或分散介质，包含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、聚乙二醇、和液体聚乙二醇等）、其合适的混合物、和 / 或植物油。合适的流动性可以例如通过下述来达到：使用包衣例如卵磷脂、在分散系的情况下维持所需粒子大小，和使用表面活性剂。微生物作用的防止可以通过各种抗菌和抗真菌剂得到促进，例如对羟基苯甲酸、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下，将优选包括等渗剂，例如糖或氯化钠。可注射组合物的延迟吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来达到。

[0524] 对于在水溶液中的肠胃外施用，必要时，例如溶液可以适当地缓冲，并且液体稀释剂首先使得与充足的盐水或葡萄糖等渗。这些特定水溶液特别适合于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这个背景中，根据本公开内容可以采用的无菌水介质将是本领域技术人员已知的。例如，一次剂量可以溶解于 1ml 等渗 NaCl 溶液中，并且加入 1000ml 皮下输液中或在提议的输注位点处注射。依赖待治疗的受试者的状况，剂量中的某些变化将必须发生。在任何情况下，负责施用的个人将测定对于个别受试者的合适的剂量。此外，对于人类施用，制剂应符合如由国家或区域办公室生物制品标准要求的无菌性、致热原性以及一般的安全和纯度标准。

[0525] 无菌可注射溶液通过将所需量的活性化合物掺入合适的溶剂中，随后过滤灭菌来制备，需要时所述溶剂中含有上文列举的各种其他成分。一般地，分散系通过将各种无菌活性成分掺入无菌媒介物内进行制备，所述无菌媒介物包含基本分散介质以及所需的来自上文列举的那些的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，这产生来自其先前无菌过滤溶液的活性成分加上任何另外的所需成分的粉剂。

[0526] 本文公开的组合物可以以中性或盐形式进行配制。药学上可接受的盐包括酸加成盐（由蛋白质的氨基形成）以及由无机酸（例如盐酸或磷酸）或此种有机酸（如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等）形成的盐。由游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱，例如氢氧化

钠、钾、铵、钙或铁,以及此种有机碱如异丙胺、三甲胺、组胺、普鲁卡因等。在配制后,溶液将以与剂量制剂相容的方式和以治疗上有效的量进行施用。制剂在各种剂型中容易地施用,所述剂型例如为可注射溶液、药物释放胶囊等。

[0527] 如本文所使用的,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟试剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。用于药学活性物质的此种介质和试剂的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则将考虑它在治疗组合物中的使用。补充活性成分也可以掺入组合物内。

[0528] 术语“药学上可接受的”指当施用于人类时,不产生过敏或相似不良反应的分子实体和组合物。包含蛋白质作为活性成分的水性组合物的制备是本领域众所周知的。一般地,此种组合物制备为血管注射剂,作为液体溶液或悬浮液;也可以制备适合于在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式。制剂也可以是乳化的。

[0529] 在本发明的一个优选实施方案中,包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或其制剂作为食品添加剂应用于人类。

[0530] 在本发明的一个优选实施方案中,包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的营养食品或其制剂作为医疗食品应用于人类。

[0531] 本发明还涉及这样的营养食品或其制剂,其包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分作为食品添加剂或作为食品或作为其组分。在本发明的背景中的食品是由活生物体消费的任何物质,包括液体饮料。食品是关于动物/人类的能量和营养的主要来源,并且通常具有动物或植物起源。食品优选是素食食品,其一般是不含动物产品的所有类型的食品,所述动物产品如肉、乳或蛋。在本发明的背景中的食品也优选是包含动物产品的非素食食品。在本发明的背景中的食品是:

[0532] (i) 任何物质或产品,无论是加工的、部分加工的或未加工的,预期或合理地期望由人类摄取,无论是否具有营养价值;

[0533] (ii) 水和其他饮料;

[0534] (iii) 口香糖或糖果产品;和/或

[0535] (iv) 在食品的制备中用作成分或组分的物品和物质。在本发明的背景中的食品常规地通过饲养、经营牧场和渔业而获得,使用狩猎、觅食和对于某些群体局部重要,但对于其他较不重要的其他生存方法。在现代,在发达国家中,食品供应日益依赖农业、工业饲养、水产业和鱼类养殖技术,其旨在使产生的食品量达到最大,而使成本降到最低。这些包括对已开发的机械化工具的依赖,从脱粒机、条播机直到拖拉机和联合收割机等。这些已与农药的使用相组合,以促进高农作物产量且对抗减少产量的那些昆虫或哺乳动物。最近,已存在朝向更持续的农业实践增长的趋势。部分由消费者需求推定的这种方法鼓励生物多样性、局部自力更生和有机饲养方法。

[0536] 在本发明的背景中的制造食品(包含至少一种核心 -1 阳性微生物或其部分的食品)的类型是:

[0537] - 饮料:啤酒,果汁,软饮料,果汁饮料,酒,包含乳的饮料,乳制品或其他酒精性或非酒精饮料,例如水,包括仅含二氧化碳的水、天然果汁和蔬菜汁、软饮料、aguas frescas、柠檬水、可乐类饮料、姜汁啤酒、irn bru、根汁汽水、菝葜汽水、奶油苏打、蒲公英和牛蒡、果汁饮料、用水稀释的水果调味的糖浆、运动饮料、浸液、咖啡、茶,乳饮料,例如乳、酸干酪饮

料、巧克力奶、奶昔、蛋奶酒、杏仁乳, horchata, 酒精性饮料, 鸡尾酒——混合饮料, 热饮料, 例如热巧克力、热苹果酒、热牛奶咖啡或珍珠奶茶。

[0538] - 面包是用于许多国家的主食, 由小麦或其他谷物的发酵生面团制成, 例如黑麦 - 小麦、吐司 (白面包)、全谷物、小麦 - 黑麦、白面包、多种谷类、黑麦、向日葵子、南瓜子、比萨、薄煎饼、墨西哥面饼、法国棍子面包、比塔饼、拉法奇面包、软饼、椒盐卷饼、圆盘烤饼、圈饼、puris、蛋糕、裸麦粗面包、全麦面包、麦胚面包、全谷物、混合谷物 (granary) 面包和许多其他变化

[0539] - 蛋糕和饼干, 例如天使蛋糕、苹果蛋糕、巴布卡蛋糕、buccellato、烘面包、奶油蛋糕、蝴蝶蛋糕、胡萝卜蛋糕、干酪饼、巧克力蛋糕、圣诞蛋糕、戚风蛋糕、泡芙塔、杯形蛋糕、魔鬼蛋糕、葡萄干馅饼、小仙人松糕、水果蛋糕、德国巧克力蛋糕、热那亚氏蛋糕、姜饼、gob、牛油蛋糕、热牛奶蛋糕、冰激淋蛋糕、佳发蛋糕、发酵蛋糕、月饼、节日果子面包、菠萝蛋糕、磅蛋糕、伊丽莎白女王蛋糕、红豆蛋糕、红丝绒蛋糕、沙哈蛋糕、重油水果蛋糕、香料蛋糕、海绵蛋糕、太阳饼、绿茶蛋糕、反转苹果塔 (tarte tatin)、香草切片蛋糕或结婚蛋糕

[0540] - 干酪是凝结乳制品, 其存在许多品种, 例如 sardo 干酪、testouri 干酪、bokmakiri 干酪、kwaito 干酪、wookie 干酪、ackawi 干酪、basket 干酪、浓缩酸乳 (labneh)、jibneh arabieh 干酪、kenafa 干酪、naboulsi 干酪、paneer、奶豆腐 (affineur)、**bergkäse**、brimsen、dachsteiner、tyrolean grey 干酪、luneberg、beauvoorde 干酪、brussels' 干酪、herve 干酪、limburger 干酪、maredsous 干酪、passendale 干酪、plateau de herve 干酪、postel 干酪、remedou 干酪、丹麦蓝纹 (danish blue) 干酪、丹麦太尔西特干酪或太尔西特哈瓦提干酪、**allgäu** emmental 干酪、蓝白毛毛 (cambozola) 干酪、harzer 干酪、林堡干酪、**spundekäs**干酪、羊干酪、halloumi 干酪或莫泽雷勒干酪

[0541] - 点心是一道菜, 通常是甜的, 并且一般在主菜后提供, 例如冰激淋, 例如软饼或饼干、蛋糕、酥皮水果甜点心、牛奶蛋糊、水果、明胶点心、冰激淋、蛋白甜饼、面粉糕饼、馅饼或果馅饼、布丁、果汁冰糕、蛋奶酥或屈莱弗甜食

[0542] - 炸马铃薯片、薄片, 例如马铃薯片或“炸薯条”、玉米饼片或玉米片

[0543] - 功能食品 (功能食品称为营养食品、营养和药物的混成词, 并且可以包括已遗传修饰的食品; 一般范畴包括由功能食品成分制成的, 或由健康促进添加剂加强的加工食品, 如“维生素富集的”产品, 以及已附加特定要求的新鲜食品 (例如蔬菜))

[0544] - 果酱和果子冻, 例如圆醋栗、红醋栗、黑醋栗、柑橘类水果、苹果、覆盆子、草莓和成熟黑莓果酱或蜂乳

[0545] - 面食例如成形面食、campanelle、casarecci、cavatelli、贝壳通心粉 (conchiglie)、conchiglioni、蝴蝶通心粉 (farfalle)、**fiori**、fusilli、fusilli bucati、gemelli、gigli、gramigna、lumache、lumaconi、maltagliati、orecchiette、pipe、quadrefiore、radiator、ricciolini、rotelle、rotini、spiralini、strozzapreti、torchio 或 trofie

[0546] - 馅饼, 例如培根或鸡蛋馅饼、鸡肉和香菇馅饼、成牛肉馅饼、康瓦尔郡菜肉烘饼、鱼馅饼、kalakukko、kulebjaka、比萨饼、猪肉馅饼、菜肉馅饼、苏格兰馅饼、马铃薯泥肉饼、stargazy 馅饼、牛排馅饼、牛排腰子饼、苹果馅饼、香蕉奶油馅饼、黑莓馅饼、蓝莓馅饼、波士顿奶油馅饼、bumbleberry 馅饼、樱桃馅饼、巧克力奶油馅饼、椰子奶油馅饼、牛奶蛋糊馅饼、

荷兰苹果馅饼、葡萄馅饼、奇檬馅饼、柠檬蛋白馅饼、柠檬馅饼、混合浆果馅饼、橘子馅饼、桃子馅饼、大黄馅饼、草莓-大黄馅饼、草莓馅饼或醋馅饼

[0547] - 比萨例如传统类型及其分别的浇头,包括:杂菜(marinara)或napoletana:番茄、橄榄油、牛至(oregano)和大蒜;margherita:番茄、橄榄油、新鲜罗勒叶和fior-di-latte(由牛奶制成的莫泽雷勒干酪)或mozzarella di bufala;formaggio e pomodoro:番茄、橄榄油和搓碎的巴马干酪,罗勒叶是任选的;ripieno或calzone:fior-di-latte,有时也用酪浆干酪、橄榄油和意大利腊肠(salami)、其他肉类、蔬菜等或stromboli:莫泽雷勒干酪、肉、蔬菜等。

[0548] - 加工肉类例如来自两栖动物的肉、蟾蜍、人造肉、仿制肉、体外肉、牛肉(牛)、水牛、牛、牛排、子牛肉(小牛)、牦牛、家禽(鸟类)、鸡、鸭、猎鸟、火鸡、犬科动物、海鲜、鱼、鲨鱼、甲壳类动物、螃蟹、兔、羊肉(绵羊)、羔羊、猪肉(猪)、火腿(后腿)、培根(熏制肉条)或昆虫

[0549] - 三明治例如aram三明治、填料的法国棍子面包、培根三明治、小圆面包、碎肉夹饼、墨西哥玉米煎饼、薯片三明治、总会三明治、烤干酪三明治、烤羊肉串、佐治亚热狗(georgia hots)、融化三明治:金枪鱼融化等,帕尼尼(panini)、牛排三明治、玉米面豆卷、茶三明治、烤三明治、单层馅饼或包裹

[0550] - 色拉例如凯撒色拉、主厨色拉、科布色拉、希腊色拉、意大利色拉、mesclun色拉、尼斯(niçoise)色拉、豆色拉如绿豆色拉、七豆色拉、鸡色拉、蛋色拉、水果色拉(以其自身果汁或与调味品一起供应的扇形、去皮水果)、larb、面色拉、马铃薯色拉、somen色拉、青木瓜色拉(som tam)、tabouli、沃尔多夫色拉或水门色拉

[0551] - 酱例如白调味汁、香菇酱、阿勒曼德酱、américaine酱、suprême酱、elouté brown酱、bordelaise酱、bourguignonne酱、烤大牛排酱、africaine酱、robert酱、béchamel酱、mornay酱、乳化酱、béarnaise酱、hollandaise酱、蛋黄酱、塔塔酱、色拉调料、奶油酱、beurre blanc、caféde paris、糖汁、鱼酱、sambal、烤肉酱、mole、番茄酱或酸奶黄瓜

[0552] - 香肠例如andouille、黑香肠、血肠、boerewors、德国熟香肠、早餐香肠、butifarra、西班牙香肠、坎伯兰香肠、falukorv、fuet、苏格兰羊杂碎布丁、kieska、波兰熏肠、kishka、kishke、德国蒜肠、kovbasa、landjäger、linguiça、肝肠、保加利亚香肠、生熏软香肠、百果馅、意大利大香肠、萨拉米香肠、soujouk、图林根香肠、weißwurst或白布甸

[0553] - 小吃:糕饼、马铃薯片、巧克力、硬面饼、块状糖、垃圾食品例如熟花生、块状糖、cheetos、chex mix、饼干、脆饼、套餐、环状乳糖、呼拉圈、冰激淋、月饼、海盗战利品(pirate's booty)、爆玉米花、猪肉皮、马铃薯片、椒盐卷饼、smart泡芙、软饮料、雪球、学生食品、瑞士蛋糕卷、tings、twinkies、veggie booty或斑马(zebra)蛋糕

[0554] - 汤例如点心汤(ginataan,由椰子乳、水果和木薯粉珍珠制成的菲律宾汤);日式红豆汤(oshiruko),日本赤豆汤或水果汤、冬甜瓜汤、酱汤、pho、拉面、saimin、罗马尼亚马铃薯汤、鸡肉柠檬蛋汤、俄罗斯甜菜浓汤、鱼肉羹、callaloo、苏格兰韭葱鸡肉汤、fanesca、西班牙凉菜汤、小扁豆汤、蔬菜通心粉汤、咖喱肉汤、苏格兰浓汤、snert、蔬菜肉汤、塔拉托(tarator)或waterzooi。

[0555] - 糖或糖制品例如金黄糖浆、糖果或巧克力。

[0556] - 酸奶酪、凝乳、酸奶油、生奶油例如 lassi、克菲尔奶酒、ayran、doogh 或 tarator。

[0557] - 粉状或片状饮料例如维生素饮料或矿物质饮料。

[0558] - 胶囊或片剂治疗食品（治疗食品是设计用于特异性、通常是营养的治疗用途的食品）、功能食品、医疗食品、肠内食品、肠胃外食品、指定健康用途的食品。例子是安素，设计主要用于老年人的强化奶昔饮料，和 Plumpy' nut，设计用于严重营养不良儿童的紧急摄食的基于花生的食品。

[0559] 在另一个优选实施方案中，本发明的制剂作为非处方药物进行生产。

[0560] 在另一个优选实施方案中，本发明提供了诱导或增强核心 -1 特异性免疫应答和 / 或预防或治疗核心 -1 阳性疾病的方法，其中将所述营养食品、所述药物组合物、所述核心 -1 阳性微生物或所述其部分或所述包含这些的制剂施用于健康个体。

[0561] 在另一个优选实施方案中，本发明提供了诱导或增强核心 -1 特异性免疫应答和 / 或预防或治疗核心 -1 阳性疾病的方法，其中将所述营养食品、所述药物组合物、所述核心 -1 阳性微生物或所述其部分或所述包含这些的制剂施用于具有癌症、肿瘤、至少一种肿瘤或癌细胞、或至少一个转移灶的个体。

[0562] 特别地，营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂可以用于诱导针对癌症、肿瘤、一种或多种癌细胞、或由其衍生的转移的免疫应答，诱导充当针对肿瘤细胞、癌症、肿瘤、一种或多种癌细胞、或由其衍生的转移的免疫保护的免疫应答，治疗肿瘤或癌症、转移灶和 / 或转移，和 / 或在健康个体或患者中分别减少或预防癌症、肿瘤、一种或多种癌细胞、或由其衍生的转移的发生、扩展或转移，各自优选包含至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞，选自癌症、肿瘤或癌性或肿瘤疾病，如下文或本文其他地方所述的。例如，治疗针对原发性肿瘤或癌症、最小残留肿瘤或癌症疾病、复发和 / 或其转移灶或部分。肿瘤或癌症的治疗也可以作为辅助治疗来实现。营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂可以在核心 -1 阳性肿瘤疾病、肿瘤或肿瘤细胞的预防中使用。例如，预防用途针对肿瘤和转移灶的预防。这些抗癌试剂根据众所周知的或如本文其他地方描述的方法以合适的形式施用。优选变化是口部，静脉内，在体腔中局部地例如腹膜内、直肠内、胃肠道内途径，局部地例如直接在肿瘤、器官或淋巴管中（结内），以及皮下、皮内或在皮肤上和肌内注射或施用这些抗肿瘤剂或药物。在一种优选方式中，施用类型也可以相组合，在这种情况下施用可以在治疗的不同天或在治疗的一天时完成，如本文其他地方详细描述。根据本发明，还可以将本发明的营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物或其部分或包含这些的制剂中的 2 种或更多相组合，以及将这些中的一种或组合与一种或多种药物或肿瘤治疗（例如抗体疗法、化学疗法或放射疗法）相组合，适当地同时或在时间上分开施用或应用。

[0563] 癌症、肿瘤、肿瘤细胞、癌细胞或由其衍生的转移灶选自耳鼻喉区域的癌性疾病或肿瘤疾病、肺、纵隔、胃肠道、泌尿生殖系统、妇科系统、乳腺、内分泌系统、皮肤、骨和软组织肉瘤、间皮瘤、黑素瘤、中枢神经系统的赘生物、在婴儿期间的癌性疾病或肿瘤疾病、淋巴瘤、白血病、副肿瘤综合征、具有未知原发性肿瘤的转移灶（CUP 综合征）、腹膜癌扩散、免疫抑制相关的恶性肿瘤和 / 或肿瘤转移灶。

[0564] 更具体而言，癌症、肿瘤、肿瘤细胞、癌细胞或由其衍生的转移灶可以包含下述类

型的癌症：乳腺、前列腺和结肠的腺癌；在支气管开始的所有形式的肺癌；骨髓癌、黑素瘤、肝癌、成神经细胞瘤；乳突状瘤；胺前体摄取脱羧细胞瘤、迷芽瘤、鳃原瘤；恶性类癌综合征；类癌心脏病、癌症（例如沃克（Walker）癌、基底细胞癌、鳞状基底细胞癌、布-皮二氏（Brown-Pearce）癌、导管癌、艾利希氏（Ehrlich）瘤、原位癌、癌症-2-癌、Merkel 细胞癌、粘液癌、非小细胞性支气管癌、燕麦细胞癌、乳头状癌、硬癌、细支气管肺泡癌、支气管癌、鳞状细胞癌和过渡细胞癌）；组织细胞功能紊乱；白血病（例如，与 B 细胞白血病、混合细胞白血病、裸细胞白血病、T 细胞白血病、慢性 T 细胞白血病、HTLV-II 相关白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、肥大细胞白血病和髓样白血病相关）；恶性组织细胞增生症、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、孤立性浆细胞肿瘤；网状内皮组织增殖症、成软骨细胞瘤；软骨瘤、软骨肉瘤；纤维瘤；纤维肉瘤；巨细胞瘤；组织细胞瘤；脂肪瘤；脂肪肉瘤；白血病性肉瘤；间皮瘤；粘液瘤；粘液肉瘤；骨瘤；骨肉瘤；尤因肉瘤；滑膜瘤；腺纤维瘤；腺淋巴瘤；癌肉瘤、脊索瘤、颅咽管瘤、无性细胞瘤、错构瘤；间叶瘤；中肾瘤、肌肉瘤、成釉细胞瘤、牙骨质瘤；牙瘤；畸胎瘤；胸腺瘤、成绒膜细胞瘤；腺癌、腺瘤；胆管瘤；胆脂瘤；圆柱瘤；囊腺癌、囊腺瘤；粒层细胞瘤；gynadroblastoma；汗腺腺瘤；胰岛细胞瘤；莱迪希（Leydig）细胞瘤；乳头状瘤；塞尔托利（Sertoli）细胞瘤、卵泡膜（theca）细胞瘤、平滑肌瘤；平滑肌肉瘤；成肌细胞瘤；肌瘤；肌肉瘤；横纹肌瘤；横纹肌肉瘤；室管膜瘤；神经节瘤、神经胶质瘤；成髓细胞瘤；脑膜瘤；神经鞘瘤；成神经细胞瘤；神经上皮瘤、神经纤维瘤、神经瘤、副神经节瘤、非嗜铬性副神经节瘤、血管角质瘤、血管淋巴样增生伴嗜酸性粒细胞增多；硬化血管瘤；血管瘤病；血管球瘤；血管内皮瘤；血管瘤；血管外皮细胞瘤、血管肉瘤；淋巴管瘤、淋巴管肌瘤、淋巴管肉瘤；松果体瘤；叶状囊性肉瘤；血管肉瘤；淋巴管肉瘤；粘液肉瘤、卵巢癌；肉瘤（例如尤因肉瘤、实验上地卡波济肉瘤和肥大细胞肉瘤）；赘生物（例如，骨肿瘤、乳腺肿瘤、消化系统肿瘤、结肠直肠肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、下垂体肿瘤、睾丸肿瘤、眶肿瘤、头与颈、中枢神经系统肿瘤，听觉器官、骨盆、呼吸道和泌尿生殖道肿瘤）；神经纤维瘤病和宫颈鳞状上皮非典型增生、和 / 或由这些中的任何一种衍生的转移灶。

[0565] 在一个优选实施方案中，癌症、肿瘤、肿瘤细胞、癌细胞或由其衍生的转移灶选自癌症疾病或肿瘤疾病，其包含在根据本发明的定义中对于核心-1 阳性的至少一个细胞、或优选显著数目的细胞或更优选大多数肿瘤细胞，其选自：耳鼻喉区域的肿瘤，包含内鼻、鼻窦、鼻咽、唇、口腔、口咽、喉、下咽部、耳、唾液腺的肿瘤和副神经节瘤，肺肿瘤，包含非小细胞性支气管癌、小细胞性支气管癌，纵隔肿瘤，胃肠道肿瘤，包含食道、胃、胰腺、肝、胆囊和胆道肿瘤，小肠、结肠和直肠癌和肛门癌，泌尿生殖肿瘤包含肾、输尿管、膀胱、前列腺、尿道、阴茎和睾丸肿瘤，妇科肿瘤包含子宫颈、阴道、阴户、子宫癌，恶性滋养层疾病，卵巢癌，输尿管（Tuba Faloppii）肿瘤，腹腔肿瘤，乳癌，内分泌器官肿瘤，包含甲状腺、副甲状腺、肾上腺皮质肿瘤，内分泌胰腺肿瘤，类癌瘤和类癌综合征，多发性内分泌肿瘤，骨和软组织肉瘤，间皮瘤，皮肤肿瘤，黑素瘤包含皮肤和眼内黑素瘤，中枢神经系统肿瘤，在婴儿期间的肿瘤，包含成视网膜神经瘤、肾母细胞瘤、神经纤维瘤病、成神经细胞瘤、尤因肉瘤肿瘤家族，横纹肌肉瘤，淋巴瘤包含非霍奇金淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性淋巴瘤、霍奇金氏病，白血病包含急性白血病、慢性髓性和淋巴细胞性白血病、浆细胞肿瘤、脊髓发育不良综合征、副肿瘤综合征、具有未知原发性肿瘤的转移灶（CUP 综合征）、腹膜癌扩散、免疫抑制相关的恶性肿瘤，包含 AIDS- 相关恶性肿瘤例如卡波济肉瘤、AIDS- 相关淋巴

瘤、中枢神经系统的 AIDS- 相关淋巴瘤、AIDS- 相关的霍奇金病和 AIDS- 相关的肛门生殖肿瘤, 移植相关的恶性肿瘤, 转移的肿瘤包含脑转移、肺转移、肝癌、肝转移、骨转移、胸膜和心包转移、和恶性腹水、和 / 或由这些中的任何一种衍生的转移灶。

[0566] 在另一个优选实施方案中, 癌症、肿瘤、肿瘤细胞、癌细胞或由其衍生的转移灶选自癌性疾病或肿瘤疾病, 例如乳癌、胃肠道肿瘤, 包括结肠癌、胃癌、胰腺癌、结肠癌、早期胃癌、小肠癌、卵巢癌、子宫颈癌、肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、恶性黑素瘤、和 / 或肝癌、和 / 或由这些中的任何一种衍生的转移灶。

[0567] 在一个进一步优选的实施方案中, 癌症、肿瘤、肿瘤细胞、癌细胞或由其衍生的转移灶选自癌性疾病或肿瘤疾病, 其包含在根据本发明的定义中对于核心 -1 阳性的至少一个细胞、优选显著数目的细胞或更优选大多数肿瘤细胞, 其选自乳癌, 胃肠道肿瘤, 包括结肠癌、胃癌、胰腺癌、结肠癌、早期胃癌、小肠癌、卵巢癌、子宫颈癌、肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、恶性黑素瘤、和 / 或肝癌、和 / 或由这些中的任何一种衍生的转移灶。

[0568] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了诱导或增强核心 -1 特异性免疫应答和 / 或预防或治疗包含其为核心 -1 阳性的至少一个细胞的核心 -1 阳性疾病、癌症、肿瘤、至少一种肿瘤或癌细胞、或至少一个转移灶的方法。

[0569] 在一个进一步优选的实施方案中, 本发明提供了诱导或增强核心 -1 特异性免疫应答和 / 或预防或治疗核心 -1 阳性疾病的方法, 其中个体具有选自癌性疾病或肿瘤疾病的癌症、肿瘤、至少一种肿瘤或癌细胞、或至少一个转移灶, 其包含乳癌, 胃肠道肿瘤, 包括结肠癌、胃癌、胰腺癌、结肠癌、早期胃癌、小肠癌、卵巢癌、子宫颈癌、肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、恶性黑素瘤、和 / 或肝癌、和 / 或由这些中的任何一种衍生的转移灶。

[0570] 在用健康人类志愿者的研究中, 针对核心 -1 的血清抗体滴度通过使用体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种进行测定, 测定在第一次应用营养食品前针对核心 -1 的现有抗体应答, 和优选地选择不具有或具有较低抗核心 -1 抗体水平的志愿者用于人体试验。在那些志愿者中, 包含 AG6 或 MU1 或安慰剂的营养食品经过 3-30 周的时间段口部给予。执行至少 2 个不同剂量的口部应用。免疫应答随后为针对核心 -1 的抗体和 / 或 T 细胞应答的测定, 其中在营养食品的口部施用开始前以及在营养食品的口部施用开始后以适当地间隔, 通过使用体液免疫应答测试 1-6 和 / 或细胞免疫应答测试 1-5 中的至少一种进行。与研究前的滴定比较, 在显著数目的志愿者中观察到存在针对核心 -1 的抗体应答和 / 或针对核心 -1 的 T 细胞应答中的显著升高, 所述志愿者在接受营养食品的志愿者组中, 如通过在体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种或在细胞免疫应答测试 1-5 中的至少一种中是阳性而阳性测试的。在安慰剂组中, 观察到针对核心 -1 的抗体或 T 细胞应答的升高较不频繁或至较少的程度。

[0571] 这显示营养食品在人类中关于构建针对核心 -1 的免疫应答的有效性, 这充当针对核心 -1 阳性癌细胞的保护, 用于核心 -1 阳性肿瘤或转移的预防、减少或扩展或者其治疗。

[0572] 在用具有核心 -1 阳性肿瘤的人类免疫感受态癌症患者的研究中, 针对核心 -1 的血清抗体滴度通过使用体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种进行测定, 测定在第一次应用药物组合物前针对核心 -1 的现有抗体应答。包含 AG6 或 MU1 或安慰剂的药物组合物经过 3-70 周的时间段几次口部、腹膜内或静脉内施用。执行至少 2 个不同的合适剂量的施用。

免疫应答随后为针对核心-1 的抗体和 / 或 T 细胞应答的测定,通过使用体液免疫应答测试 1-6 和 / 或细胞免疫应答测试 1-5 中的至少一种,和 / 或临床应答随后为进展时间、无瘤生存期和 / 或肿瘤体积和 / 或位点的测定,各自在药物组合物的施用开始前以及在药物组合物的施用开始后以适当地间隔。与研究前的滴定比较,在显著数目的志愿者中观察到存在针对核心-1 的抗体应答和 / 或针对核心-1 的 T 细胞应答中的显著升高,所述志愿者在接受本发明的制剂的组中,如通过在体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种或在细胞免疫应答测试 1-5 中的至少一种中是阳性,和 / 或在接受制剂的显著数目的患者中的部分或完全临床应答或延长的进展时间或生存时间而阳性测试的。在安慰剂组中,观察到针对核心-1 的抗体或 T 细胞应答的升高较不频繁或至较少的程度,和 / 或未观察到显著降低的临床应答。

[0573] 这显示药物组合物在人类中关于构建针对核心-1 的免疫应答的有效性,这充当针对核心-1 阳性癌细胞的保护,用于核心-1 阳性肿瘤 或转移的发生的预防、减少或扩展或者其治疗。

[0574] 核心-1 阳性微生物或其部分在活生物体(人类/动物)的机体内的接触起始结合核心-1、核心-1 抗原或核心-1 阳性肿瘤细胞的抗体的产生。令人惊讶的是,针对核心-1 的抗体充当针对新出现的癌细胞的免疫监督机制。

[0575] F) 用于治疗或预防胃肠道病症的方法

[0576] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于减少或预防胃肠道病症或疾病的发生或扩展的方法,其包括在人类或动物中施用有效量的营养食品、或药物制剂、或核心-1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0577] 营养食品、或药物制剂、或核心-1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂的有效量在本文其他地方描述。

[0578] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于减少或预防胃肠道病症或疾病的发生或扩展的方法,其中本文其他地方描述的所述营养食品、或所述药物制剂、或所述核心-1 阳性微生物、或所述其部分、或所述制剂是或包含来自自由 Nemod-TF1 或 A78-G/A7 和 Nemod-TF2 识别 / 结合的核心-1 阳性微生物的至少一种微生物、裂解物或部分。

[0579] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于减少或预防胃肠道病症或疾病的发生或扩展的方法,其中本文其他地方描述的所述营养食品、或所述药物制剂、或所述核心-1 阳性微生物、或所述其部分、或所述制剂是或包含来自菌株 AG6 (DSM 18726)、MU1 (DSM 18728) 和 LH2 (DSM 18727),更优选来自菌株 AG6 或 MU1,最优选来自菌株 AG6 的至少一种微生物、裂解物或部分。

[0580] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了治疗胃肠道病症或疾病的方法,其包括在人类或动物中施用有效量的营养食品、或药物制剂、或核心-1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0581] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了治疗胃肠道病症或疾病的方法,其中胃肠道病症是炎性肠病或功能性肠病症。

[0582] 本发明提供了用于减少或优选用于预防胃肠道病症或疾病,优选 炎性肠病或功能性肠病症的发生的方法,其包括在人类或动物中,优选在健康个体中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心-1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0583] 本发明提供了用于减少或甚至进一步优选用于预防胃肠道病症或疾病, 优选炎性肠病或功能性肠病症的扩展的方法, 其包括在人类或动物中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0584] 本发明提供了治疗胃肠道病症或疾病, 优选炎性肠病或功能性肠病症的方法, 其包括在人类或动物中施用有效量的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂。

[0585] 在本发明的一个优选实施方案中, 上述方法的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂包含来自自由 Nemod-TF1 或 A78-G/A7 和 Nemod-TF2 识别 / 结合的核心 -1 阳性微生物的至少一种微生物、裂解物或部分。

[0586] 在一个优选实施方案中, 上述方法的在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分、或包含这些的制剂包含来自菌株 AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728)、最优选来自菌株 AG6 的至少一种微生物、裂解物或部分。

[0587] 施用途径、有效剂量、制剂是例如本文其他地方描述的, 优选在用于治疗或预防核心 -1 阳性疾病或肿瘤的方法内描述的那些。在一个优选实施方案中, 包含 10^9 - 10^{12} 核心 -1 阳性微生物的 2 次剂量 / 天经过至少 2 周进行施用。

[0588] 胃肠道病症优选选自功能性肠病症和炎性肠病; 由此炎性肠病选自克罗恩氏病、回肠炎和 / 或溃疡性结肠炎, 并且功能性肠病症选自胃食管反流、消化不良、肠激惹综合征和 / 或功能性腹痛。在本发明的背景中中的胃肠道由下述组分组成: 口 (口腔; 包括唾液腺、粘膜、牙齿和舌)、咽、食道和贲门、胃, 其包括窦和幽门、肠或肠子: 小肠, 其具有 3 个部分: 十二指肠、空肠、回肠; 大肠, 其具有 3 个部分: 盲肠 (阑尾与盲肠附着); 结肠 (升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠曲); 直肠和 / 或肛门。

[0589] 在用具有肠激惹综合征、克罗恩氏病 (CD)、回肠炎或溃疡性结肠炎的人类患者的研究中, 包含 AG6 或 MU1 的营养食品或药物组合物或安慰剂经过 3-30 周的时间段进行口部施用。执行至少 2 个不同的合适剂量的施用。分别在营养食品或药物组合物的施用开始前以及在药物组合物的施用开始后以适当地间隔跟踪临床应答, 例如胃气胀或肠胃气胀的减少、维持 CD 中的缓解、生活质量的改善、突然爆发的时间或严重度的减少、腹泻的减少、隐窝炎的缓解的维持、活性溃疡性结肠炎的缓解的诱导或维持。与安慰剂组中的那些比较, 在显著数目的患者中观察到存在上述症状中的至少一种或临床应答中的显著改善, 所述患者接受营养食品或药物组合物。

[0590] 这显示营养食品或药物组合物在人类中用于胃肠道病症的预防、减少、扩展或治疗的有效性。

[0591] G) 用于抗体产生的方法

[0592] 本发明提供了用于产生抗核心 -1 抗体或抗体组合物或多克隆血清的方法, 其包括

[0593] (a) 使营养食品、药物制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分与人类或动物接触

[0594] (b) 诱导或增强识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的体液免疫应答

[0595] (c) 分离所述抗核心 -1 抗体或抗体组合物。

[0596] 在另一个优选实施方案中, 本发明提供了用于产生这样的细胞的方法, 所述细胞

生产抗核心 -1 抗体或抗体组合物,所述方法包括

[0597] (a) 使前述权利要求中任一项的制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分与人类或动物接触

[0598] (b) 诱导或增强针对核心 -1 的体液免疫应答

[0599] (c) 产生至少一种细胞,所述细胞生产所述抗核心 -1 抗体或抗体组合物。

[0600] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于产生这样的细胞的方法,所述细胞生产抗核心 -1 抗体或抗体组合物,所述方法包括

[0601] (a) 使根据本发明的营养食品、药物制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分与人类或动物接触

[0602] (b) 诱导或增强针对核心 -1 的体液免疫应答

[0603] (c) 产生至少一种细胞,所述细胞生产所述抗核心 -1 抗体或抗体组合物。

[0604] 所述最后步骤 (c) 可以通过各种方法来完成,例如

[0605] (i) 通过使生产抗核心 -1 抗体的至少一种细胞永生化,优选通过如杂交瘤技术中进行的与永生化细胞系融合,或优选通过用合适的病毒例如 EB 病毒 (EBV) 感染,或通过用引起细胞例如来自 EBV 的 E1 永生化的至少一种基因重组转染;或

[0606] (ii) 通过分析负责抗体的特异性的抗核心 -1 抗体的至少可变区或抗核心 -1 抗体的至少结合区的肽序列,和用编码抗核心 -1 抗体的 DNA 来转化细胞,所述抗核心 -1 抗体如作为任何同种型的完整抗体、或者其片段、或者抗核心 -1 抗体的片段或完整抗体与至少一种其他氨基酸或多肽序列的融合蛋白。

[0607] 优选的是能够稳定生产抗体的细胞,意指细胞可以经过合适量的循环传代用于生产抗体,例如但不限于杂交瘤细胞和以其他方式永生化的细胞,或通过重组稳定转化的细胞,例如但不限于 CHO、NS0、SP2、Y0、PerC. 6、Hec293。然而,瞬时表达例如在 COS 或 Hec293 细胞或 B 细胞中的表达也是本发明的一个实施方案。

[0608] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于产生抗核心 -1 单克隆抗体的方法,其进一步包括

[0609] (a) 使生产抗核心 -1 抗体或抗体组合物的所述细胞的至少一个细胞在合适的条件下生长

[0610] (a) 分离所述抗核心 -1 抗体或抗体组合物。

[0611] 在本发明的一个优选实施方案中,所述抗核心 -1 单克隆抗体从培养上清液中进行分离。

[0612] 在本发明的一个优选实施方案中,生产抗核心 -1 单克隆抗体的所述细胞通过单细胞克隆来获得。

[0613] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于产生编码抗核心 -1 单克隆抗体或其片段的 DNA 序列的方法,其包括

[0614] (a) 使营养食品、药物制剂、核心 -1 阳性微生物或其部分与人类或动物接触

[0615] (b) 诱导或增强针对核心 -1 的体液免疫应答

[0616] (c) 分离生产抗核心 -1 抗体的细胞或细胞克隆

[0617] (d) 分析编码抗核心 -1 抗体或其片段的遗传材料,或分析抗核心 -1 抗体或其片段的肽序列。

[0618] 在一个优选实施方案中,本发明提供了编码抗核心 -1 单克隆抗体或其片段的核酸。

[0619] 在另一个实施方案中,本发明提供了编码抗核心 -1 单克隆抗体或其片段的 DNA 序列。

[0620] 在一个优选实施方案中,本发明提供了抗核心 -1 抗体或抗体组合物或多克隆血清、抗核心 -1 单克隆抗体或其至少一个片段。

[0621] 在另一个实施方案中,本发明提供了抗核心 -1 单克隆抗体或其片段。

[0622] 在另一个实施方案中,本发明提供了生产抗核心 -1 抗体或抗体组合物或其至少一个片段的细胞。

[0623] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了抗核心 -1 单克隆抗体或其片段,其是来自转基因小鼠的人源化抗体或人抗体。

[0624] 在一个优选实施方案中,本发明提供了如上所述生产抗核心 -1 抗体或抗体组合物、抗核心 -1 单克隆抗体或或其至少一个片段的细胞。

[0625] 所述抗核心 -1 抗体就本发明而言可以是在人类或动物中的任何可诱导的识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的抗体,优选这些抗体,其为具有在本文的定义下和其他地方描述的结合或特异性标准的核心 -1 特异性抗体,在本文中更优选的是这些抗体,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与至少一种肿瘤细胞 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,并且甚至更优选的是此种抗体,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9 和 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的。

[0626] 所述抗核心 -1 抗体组合物就本发明而言可以是在人类或动物中的任何可诱导的识别核心 -1 抗原和 / 或核心 -1 阳性肿瘤细胞的抗体的混合物,所述抗核心 -1 抗体或抗体组合物就本发明而言可以是单种抗体、或抗体的混合物,例如但不限于单克隆抗体、多克隆抗体混合物例如抗体血清或其部分、或至少一种单克隆抗体与多克隆抗体混合物的混合物。所述抗核心 -1 抗体或抗体组合物可以是或包含任何可诱导的抗体形式,例如 IgG、IgM、IgA、IgE、IgD,或通过本领域技术人员已知的技术由其衍生的任何片段,例如但不限于 Fab、F(ab)2、单链抗体、单结构域抗体、多抗体 (multibodies)、抗体融合蛋白、双特异性抗体或抗体、和人源化或嵌合抗体。

[0627] 通过本发明的方法产生的抗核心 -1 抗体或抗体组合物具有超过目前可用的核心 -1 特异性抗体或抗体组合物中的核心 -1 特异性抗体的优点,其具有下述特征中的至少一个:

[0628] 可以获得抗核心 -1 抗体,其

[0629] (i) 具有不同于 IgM 的抗体形式

[0630] (ii) 可以更快速地产生或分离

[0631] (iii) 可以以更高的量产生

[0632] (iv) 识别更多的肿瘤情况

- [0633] (v) 具有更高的亲和力
- [0634] (vi) 在免疫测试中显示更高的结合信号,例如 ELISA、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫组织化学或免疫细胞化学
- [0635] (vii) 具有针对至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞的 ADCC 活性
- [0636] (viii) 当与合适量的抗体一起温育时,在至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞中抑制细胞生长或增殖
- [0637] (ix) 在与合适量的抗体一起温育的至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞中诱导细胞死亡例如凋亡
- [0638] (x) 是 IgG。
- [0639] 可以获得抗核心 -1 抗体组合物,其
- [0640] (i) 包含具有不同于 IgM 的抗体形式的针对核心 -1 的抗体
- [0641] (ii) 包含针对核心 -1 的 IgG 抗体
- [0642] (iii) 包含 IgG 抗体作为抗体的主要抗核心 -1 部分
- [0643] (iv) 包含更高量的识别核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的抗体
- [0644] (v) 包含更高滴度的抗核心 -1 抗体
- [0645] (vi) 在免疫测试中显示更高的结合信号,例如 ELISA、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫组织化学或免疫细胞化学
- [0646] (vii) 具有更高的亲和力
- [0647] (viii) 具有针对至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞的 ADCC 活性
- [0648] (ix) 当与合适量的抗体一起温育时,在至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞中抑制细胞生长或增殖
- [0649] (x) 在与合适量的抗体一起温育的至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞中诱导细胞死亡例如凋亡
- [0650] 优选的是显示至少 2 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少 3 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少 4 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少 5 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少 6 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少 7 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少 8 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少 9 种上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物,更优选的是显示至少所有上述特征的那些抗核心 -1 抗体或抗体组合物。
- [0651] 在一个优选实施方案中,抗核心 -1 抗体是单克隆抗体。
- [0652] 在一个优选实施方案中,抗核心 -1 抗体混合物是多克隆抗血清。
- [0653] 任何动物或动物都可以与营养食品、药物组合物、核心 -1 阳性微生物和 / 或其部分接触,优选的是人类和小鼠、大鼠、兔、山羊、骆驼、鸡、仓鼠、豚鼠或猴,甚至进一步优选的是本领域技术人员已知特别适合于产生抗体应答的动物,例如但不限于兔、山羊、大鼠、人类、黑猩猩和小鼠用于多克隆抗体血清,以及本领域技术人员已知特别适合于产生单克隆抗体的那些,例如但不限于小鼠、大鼠、人类,进一步优选的是携带至少部分人抗体基因的转基因小鼠和人类。

[0654] 使接触意指本文其他地方描述的用于施用营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物和 / 或其部分的任何施用方法或途径,其能够诱导针对核心-1 的体液应答。另外的佐剂可以用于增加本领域技术人员已知的免疫原性。优选的是口部和全身施用,并且在后者内是静脉内、皮内或皮下和甚至腹膜内施用。

[0655] 针对核心-1 的体液免疫应答的诱导可以在本发明的体液免疫应答测试中进行测试,并且体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种必须是阳性的,如本文其他地方描述的,由此在一个优选实施方案中,所述得自血清、血浆或粪便的抗体也包括得自生产针对核心-1 的抗体的细胞的那些,所述细胞例如 B 细胞、或永生化 B 细胞、或重组表达核心-1 抗体的细胞。这些抗体可以以本领域技术人员已知的各种方法来获得,在一个优选实施方案中,来自血液的血清、或血清的部分、或血清或针对合适的抗原预吸附的血清的部分,所述抗原例如对于核心-1 阴性的微生物抗原,优选对于核心-1 阴性的微生物,或来自抗体生产细胞例如上文描述的那些的抗体(以完整或分级细胞上清液或纯化抗体形式),在体液免疫应答测试 1-6 中的至少一种中用作所述得自血清、血浆或粪便的抗体。

[0656] 在一个优选实施方案中,本发明提供了抗核心-1 抗体或抗体组合物或多克隆血清、抗核心-1 单克隆抗体或其至少一个片段,其在体液免疫应答测试 1-6 中的至少 5 种体液免疫应答测试中是阳性的。

[0657] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了抗核心-1 抗体或抗体组合物或多克隆血清、抗核心-1 单克隆抗体或其至少一个片段,其优选对于体液免疫应答测试 1 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2 和 3 是阳性的,和更优选对于体液免疫应答测试 1、2、3 和 4 是阳性的,和更优选对于体液免疫测试 5 是阳性的,和最优选对于体液免疫测试 6 是阳性的。

[0658] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了抗核心-1 抗体或抗体组合物或多克隆血清、抗核心-1 单克隆抗体或其至少一个片段,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何物质不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,并且其是 IgG 或源于 IgG。

[0659] 在一个优选实施方案中,抗核心-1 抗体是单克隆抗体或其片段,其是核心-1 特异性的与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何物质不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9 或 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,并且其是 IgG 或源于 IgG,更优选单克隆抗体是来自转基因小鼠或人类的人源化抗体或人抗体,最优选抗体显示针对核心-1 阳性肿瘤细胞的 ADCC 活性。

[0660] 本领域技术人员能够使用所描述的方法用于其目的,并且能够选择和采用合适的条件以达到所描述的目的。本领域技术人员例如能够选择合适的动物或人类和免疫接种条件,选择合适的细胞并使细胞永生化,分析肽序列或者编码抗体或其片段或部分的肽序列的 DNA,选择合适的抗体形式或片段并产生合适的载体用于细胞的重组转染,选择和稳定或瞬时转化合适的细胞用于抗体生产,选择和生长细胞或细胞克隆并分离和纯化抗体或其片段。

[0661] 在本发明的另一个实施方案中,抗核心-1 抗体可以通过使用至少一种核心-1 阳

性微生物或其片段来产生,以使用诸如噬菌体展示或核糖体展示的技术从抗体文库中分离抗核心-1 抗体或抗体混合物。

[0662] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于产生抗核心-1 抗体或抗体组合物的方法,其包括

[0663] a.) 使营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分与抗体噬菌体文库(例如基于噬菌粒或噬菌体载体的文库)或衍生自人类或动物的抗体核糖体展示文库或嵌合抗体接触

[0664] b.) 通过其与所述营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分的结合来分离所述抗核心-1 抗体或抗体组合物。

[0665] 在一个优选实施方案中,使用人、人源化、嵌合或动物抗体基因的合成抗体文库。在一个更优选的实施方案中,由至少一个动物和/或人类的储库构建文库,所述动物和/或人类通过营养食品、药物组合物、核心-1 阳性微生物或其部分进行免疫。本领域技术人员了解如何构建这些文库,并且使用这些文库用于产生或选择特异性抗体。

[0666] 本发明的优选实施方案在实施例中描述。

[0667] H) 核心-1 特异性树突状细胞、T 细胞、T 细胞克隆和 T 细胞系的产生

[0668] 令人惊讶地,当通过人树突状细胞呈递时(在体外),本发明所提供的核心-1 阳性微生物也能够以核心-1 特异性方式活化人 T 细胞。没有证明针对碳水化合物肿瘤抗原且特别是小的非带电的碳水化合物例如核心-1 的细胞免疫应答,且特别是细胞毒性细胞免疫应答的报告。也不存在人肿瘤碳水化合物抗原,且特别是并非源于微生物的人碳水化合物结构在人树突状细胞(免疫系统的关键调节物)上的呈递的报告。相比之下,一般的科学意见是人并不发展碳水化合物特异性细胞免疫应答,并且特别是不发展针对碳水化合物肿瘤抗原的特异性细胞免疫应答。本发明的核心-1 阳性微生物由人树突状细胞进行加工和呈递,并且那些分别装载的树突状细胞可以用于活化特异性针对核心-1 的初始人 T 细胞。在用核心-1 阳性人肿瘤细胞裂解物再刺激后,通过用来自本发明的核心-1 阳性细菌的裂解物致敏产生的这些 T 细胞显示强免疫应答,如通过细胞因子的分泌证明的,所述细胞因子证明特异性 T 细胞应答且特别是细胞毒性 T 细胞应答。

[0669] 令人惊讶的是可以使人树突状细胞装载有根据本发明的核心-1 阳性微生物,或装载有一般而言的核心-1 携带分子,并且达到人 T 细胞的核心-1 特异性活化。甚至更令人惊讶的是,通过装载有所述核心-1 阳性微生物的人树突状细胞活化的免疫细胞可以使用装载有核心-1 携带分子例如来自 NM-D4 或 NM-F9 的裂解物,或无唾液酸血型糖蛋白的人树突状细胞进一步活化或再刺激,显示 (i) 核心-1 特异性 T 细胞可以通过核心-1 阳性微生物进行活化,和 (ii) 这种免疫应答包含核心-1 特异性 T 细胞,其可以通过装载有核心-1 携带分子的 DC 进行进一步活化或再刺激。进一步令人惊讶的是核心-1 结构可以通过在装载有核心-1 阳性微生物的 DC 上以及装载有无唾液酸血型糖蛋白的 DC 上的核心-1 特异性抗体检测。进一步令人惊讶的是,不仅 GM-CSF 的分泌和 T 细胞的增殖可以使用本发明的核心-1 阳性微生物进行有效诱导,而且 $\text{INF } \gamma$ (干扰素 γ) 和甚至更令人惊讶的 $\text{TNF } \alpha$ (肿瘤坏死因子 α) 的分泌也是如此,显示核心-1 特异性细胞毒性 T 细胞的活化。进一步令人惊讶的是核心-1 特异性 T 细胞可以在体外再刺激,优选至少 4 次,这指出由 T 细胞介导的针对肿瘤抗原和肿瘤的强和特异性细胞免疫应答。这些免疫应答是对于本领域技术人员的证

据,即由本发明提供的核心 -1 阳性微生物在人类中能够诱导有效的抗核心 -1 细胞免疫应答。

[0670] 因此本发明还提供了用于产生针对核心 -1 的功能性树突状细胞的方法,其包括使适量的树突状细胞或树突状细胞的混合物或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,与适量的如本文其他地方描述的至少一种核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分,或核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分在合适的条件下接触合适的时间,以产生针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞。

[0671] 本发明提供了用于产生针对核心 -1 的功能性树突状细胞的方法,其包括使适量的树突状细胞或树突状细胞的混合物或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,与适量的如本文其他地方描述的至少一种核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分,在合适的条件下接触合适的时间,以产生装载有核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞。

[0672] 本发明提供了用于产生针对核心 -1 的功能性树突状细胞的方法,其包括使适量的树突状细胞或树突状细胞的混合物或包含至少一种树突状细胞的细胞混合物,与适量的如本文其他地方描述的至少一种核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分,在合适的条件下接触合适的时间,以产生装载有核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞。

[0673] 所述针对核心 -1 的功能性树突状细胞是树突状细胞或树突状细胞的混合物,其活化针对核心 -1 的至少一种 T 细胞,这可以优先通过本发明的细胞免疫应答测试进行测试,并且在本文其他地方描述的细胞免疫应答测试的至少一种中针对核心 -1 是阳性的。在一个优选实施方案中,功能性树突状细胞在其表面上呈递核心 -1,并且可以通过如所述的核心 -1 特异性抗体例如在细胞免疫应答测试 4 中进行检测。在本发明的一个优选实施方案中,针对核心 -1 的功能性树突状细胞通过下述来获得:使未成熟树突状细胞或未成熟树突状细胞的混合物或包含至少一种未成熟的树突状细胞的树突状细胞混合物,与适量的如本文其他地方描述的至少一种核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分,以合适的时间和合适的条件下接触,以使所述树突状细胞成熟,其中使用如本文其他地方描述的且如本领域技术人员已知的合适条件,包括例如分子 TNF α (肿瘤坏死因子 α)、LPS(脂多糖)或 BCG(卡介苗)、INF γ (干扰素 γ)、地塞米松和 / 或 TGF β (转化生长因子 β),至装载有核心 -1 的功能性树突状细胞。在本发明的一个优选实施方案中,树突状细胞衍生自 MUTZ-3 或 NemodDC(可从 Glycotope GmbH Berlin, Germany ;www.glycotope.com 获得),并且进一步优选的未成熟树突状细胞在合适的条件下由 MUTZ-3 细胞或 NemodDC 产生,所述条件包括使用 IL-4 和 GM-CSF 一般约 1 周,使所得到的未成熟树突状细胞或 iNMDc 与适量的至少一种核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分接触,所述细胞使用合适的条件进行成熟,所述条件包括例如 TNF α 、LPS、BCG、INF γ 、地塞米松或 TGF β , 优选 TNF α , 一般约 1-2 天,导致装载有核心 -1 的成熟树突状细胞,其对应于所述针对核心 -1 的功能性树突状细胞。

[0674] 本发明的优选实施方案在实施例中描述。

[0675] 本发明提供了用于产生针对核心 -1 的一种或多种活化 T 细胞的方法,其包括

[0676] (a) 使装载有适量的核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分的适量的功能性树突状细胞或包含至少一种功能性树突状细胞的细胞混合物与至少一种或多种 T 细胞接触

[0677] (b) 在合适的条件下,使所述一种或多种 T 细胞连同所述装载的功能性树突状细

胞一起培养合适的时间,以活化或引发针对核心-1的一种或多种T细胞。

[0678] 本发明提供了用于产生针对核心-1的一种或多种活化T细胞的方法,其包括

[0679] (a) 使装载有合适量的核心-1携带分子或核心-1阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的功能性树突状细胞或包含至少一种功能性树突状细胞的细胞混合物与至少一种或多种T细胞或包含至少一种T细胞的细胞混合物接触

[0680] (b) 在合适的条件下,使所述一种或多种T细胞或包含至少一种T细胞的细胞混合物连同所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间,以活化或引发针对核心-1的一种或多种T细胞。

[0681] 在一个优选实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的一种或多种活化T细胞的方法,其包括

[0682] (a) 使装载有合适量的核心-1阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的功能性树突状细胞与一种或多种T细胞接触

[0683] (b) 在合适的条件下,使所述一种或多种T细胞连同所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间,以活化或引发针对核心-1的一种或多种T细胞

[0684] (c) 加入装载有核心-1携带分子或核心-1阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的功能性树突状细胞用于再刺激

[0685] (d) 以合适的时间和合适的条件下培养

[0686] 在一个优选实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的一种或多种活化T细胞的方法,其包括

[0687] (a) 使装载有合适量的核心-1阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞与合适量的至少一种T细胞或T细胞混合物或包含至少一种T细胞的细胞混合物接触

[0688] (b) 在合适的条件下,使所述T细胞或T细胞混合物或包含至少一种T细胞的细胞混合物与所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间,以活化或引发针对核心-1的一种或多种T细胞。

[0689] 在一个优选实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的一种或多种活化T细胞的方法,其包括

[0690] a) 使装载有合适量的至少一种核心-1携带分子或核心-1阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞与合适量的至少一种T细胞或T细胞混合物或包含至少一种T细胞的细胞混合物接触

[0691] b) 在合适的条件下,使所述T细胞或T细胞混合物或包含至少一种T细胞的细胞混合物与所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间,以活化或引发针对核心-1的一种或多种T细胞。

[0692] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的一种或多种活化T细胞的方法,其包括前述方法的步骤(a)和(b),并且随后包括,

[0693] (c) 加入装载有合适量的至少一种核心-1携带分子或核心-1阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激;

[0694] 或加入装载有合适量的至少一种核心-1阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激;和

[0695] (d) 以合适的时间和合适的条件下培养

[0696] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的T细胞系的方法,其包括前述方法的步骤(a)、(b)、(c)和(d),

[0697] 并且随后包括至少一个进一轮的再刺激循环,由此一轮再刺激包括步骤(e)和(f)或步骤(g)和(h),其中

[0698] (e) 加入装载有合适量的至少一种核心-1携带分子或核心-1阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激;

[0699] (f) 以合适的时间和合适的条件下培养和

[0700] (g) 加入装载有合适量的至少一种核心-1阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激

[0701] (h) 以合适的时间和合适的条件下培养

[0702] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的T细胞系的方法,其另外包括2轮进一步的所述再刺激循环。在一个更优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的T细胞系的方法,其包括3轮进一步的所述再刺激循环。在一个更加优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的T细胞系的方法,其包括5轮进一步的所述再刺激循环。

[0703] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的T细胞克隆的方法,其中至少在一轮所述再刺激循环前执行克隆细胞的另外步骤。

[0704] 在一个优选实施方案中,一种或多种活化T细胞是针对核心-1的T细胞系,由此对应于一轮再刺激的(c)和(d)优选执行2次,更优选3次,更优选4次,和最优选对于其执行超过4轮再刺激的T细胞系。

[0705] 在一个优选实施方案中,一种或多种活化T细胞是针对核心-1的T细胞克隆,由此对应于一轮再刺激的(c)和(d)优选执行2次,更优选3次,更优选4次,和最优选对于其执行超过4轮再刺激的T细胞系,并且细胞在再刺激前例如通过单细胞稀释克隆至少1次。

[0706] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的T细胞克隆的方法,其中所述功能性树突状细胞是成熟树突状细胞。

[0707] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的T细胞克隆的方法,其中所述功能性树突状细胞以及一种或多种T细胞是人细胞。

[0708] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的活化T细胞、T细胞系或T细胞克隆的方法,其中所述功能性树突状细胞衍生自MUTZ-3[专利申请10139428.4(DE)、PCT/EP02/09260、02758474.7(EP)、US10/486,966、CA2,457,287、DE10139428A1、WO2003/023023A1、EP01419240、US20040265998、CA2457287],例如Nemod-DC(可从Glycotope GmbH Berlin,德国,www.glycotope.com获得)。

[0709] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的活化T细胞、T细胞系或T细胞克隆的方法,其中所述功能性树突状细胞以及一种或多种T细胞在至少一种MHC类分子中匹配。

[0710] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了用于产生针对核心-1的活化T细胞、T细胞克隆或T细胞系的方法,其包括

[0711] a. 使合适量的如本文其他地方描述的针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞与合适量的至少一种 T 细胞、或 T 细胞混合物或包含至少一种 T 细胞的细胞混合物接触 ; 和

[0712] b. 在合适的条件下, 使所述 T 细胞或 T 细胞混合物连同所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间, 以活化或引发针对核心 -1 的一种或多种 T 细胞。

[0713] 在一个优选的实施方案中, 本发明提供了用于产生针对核心 -1 的一种或多种活化 T 细胞、T 细胞克隆或 T 细胞系的方法, 其包括

[0714] a) 使装载有所述核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞, 与合适量的至少一种 T 细胞、或 T 细胞混合物或包含至少一种 T 细胞的细胞混合物接触 ; 和

[0715] b) 在合适的条件下, 使所述 T 细胞或 T 细胞混合物连同所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间, 以活化或引发针对核心 -1 的一种或多种 T 细胞 ; 和

[0716] c) 加入装载有所述核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激 ; 和

[0717] d) 以合适的时间和合适的条件下培养 ;

[0718] 或

[0719] a) 使装载有所述携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的合适量的针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞, 与合适量的至少一种 T 细胞、或 T 细胞混合物或包含至少一种 T 细胞的细胞混合物接触 ; 和

[0720] b) 在合适的条件下, 使所述 T 细胞或 T 细胞混合物连同所述装载的功能性树突状细胞一起培养合适的时间, 以活化或引发针对核心 -1 的一种或多种 T 细胞 ; 和

[0721] c) 加入前述权利要求中任一项的装载有所述核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分的合适量的至少一种功能性树突状细胞用于再刺激 ; 和

[0722] d) 以合适的时间和合适的条件下培养。

[0723] 本发明的优选实施方案在实施例中描述。

[0724] 在一个进一步优选的实施方案中, 本发明提供了如上所述的针对核心 -1 的一种或多种活化 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。

[0725] 在一个进一步优选的实施方案中, 本发明提供了如上所述的针对核心 -1 的一种或多种活化 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, 其包含针对核心 -1 的至少一种 CD4⁺ 辅助细胞。

[0726] 在一个进一步优选的实施方案中, 本发明提供了如上所述的针对核心 -1 的一种或多种活化 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, 其包含针对核心 -1 的至少一种细胞毒性 T 细胞。

[0727] 在一个进一步优选的实施方案中, 本发明提供了如上所述的针对核心 -1 的一种或多种活化 T 细胞、包含针对核心 -1 的至少一种 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, 其杀死至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞, 或分泌介导至少一种肿瘤细胞的杀死的分子。

[0728] 杀死至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞, 或分泌介导至少一种肿瘤细胞的杀死的分子的, 本发明的针对核心 -1 的一种或多种活化 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,意指所述针对核心-1的细胞毒性T细胞杀死核心-1阳性肿瘤细胞,这可以通过使用本文其他地方描述的测量INF γ 或TNF α 的分泌的相应细胞免疫应答测试,或通过细胞毒性测试(例如细胞免疫应答测试5)进行测定,其中至少一种标记的核心-1阳性肿瘤细胞通过本领域技术人员主要已知的所述T细胞进行裂解,其中通过使用本发明的T细胞例如CTL或Th1应答,或通过诱导特异性CD4 T辅助应答(其介导相应的体液和细胞免疫应答的活化,这导致至少一种核心-1阳性肿瘤细胞的杀死)。

[0729] 在一个优选实施方案中,本发明提供了治疗癌症患者的方法,其包括施用如上所述的针对核心-1的一种或多种活化T细胞、包含针对核心-1的至少一种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细胞克隆或包含这些的组合物中的任何一种。

[0730] 在一个优选实施方案中,本发明提供了治疗癌症患者的方法,其包括施用合适量的如上所述的针对核心-1的至少一种功能性树突状细胞或包含这些的组合物。

[0731] 在一个优选实施方案中,本发明提供了治疗癌症患者的方法,其中患者具有或已具有对于核心-1阳性的癌细胞。

[0732] 在一个更优选的实施方案中,本发明提供了治疗癌症患者的方法,其中功能性树突状细胞是自体的。在另一个优选实施方案中,本发明提供了治疗癌症患者的方法,其中功能性树突状细胞是源于供体的同种异体的。

[0733] 在一个优选实施方案中,本发明提供了治疗癌症患者的方法,其中功能性树突状细胞衍生自MUTZ-3。

[0734] 在一个优选实施方案中,本发明提供了治疗癌症患者的方法,其中功能性树突状细胞与所述患者共享至少一种MHC类分子。

[0735] 本发明进一步提供了治疗癌症患者的方法,其包括施用本文其他地方描述的针对核心-1的一种或多种活化T细胞、包含针对核心-1的至少一种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细胞克隆或包含这些中的至少一种的组合物中的任何一种。

[0736] 本发明进一步提供了治疗癌症患者的方法,其包括施用合适量的本文其他地方描述的针对核心-1的至少一种功能性树突状细胞或包含这些的组合物。

[0737] 在本发明的一个优选实施方案中,至少一种所述方法用于具有或已具有对于核心-1阳性的癌细胞的患者的患者,所述癌细胞可通过至少一种核心-1特异性抗体检测,并且在本文其他地方描述的其优选实施方案中。进一步优选的是其中功能性树突状细胞是自体的所述方法,进一步优选其中功能性树突状细胞是同种异体的,进一步优选的是当功能性树突状细胞源于供体时,更加优选的是当功能性树突状细胞源于MUTZ-3时,更加优选的是当所述的功能性树突状细胞中的任何一种与它施用于其的个体共享至少一种MHC类分子时。

[0738] 本领域技术人员通过使用本文公开的方法和材料能够执行所描述的任务。他们可以测定获得这些功能性树突状细胞或T细胞的最佳条件,最佳施用途径,和/或包含这些的合适组合物,和/或关于产生和使用在优选实施方案中进一步描述,在专利申请DE10139428A1、W02003/023023A1、EP01419240、US20040265998、CA2457287中。

[0739] 所述针对核心-1的一种或多种活化T细胞意指,所产生的一种或多种T细胞或包

含 T 细胞的细胞组合物对于本发明的至少一种细胞免疫应答测试、优选对于 2 种、更优选对于 3 种和最优选对于所有 4 种 是阳性的。优选地它们包含至少一种 CD4⁺ 辅助细胞,和更加优选至少一种细胞毒性 T 细胞 (其能够杀死至少一种核心 -1 阳性肿瘤细胞)。

[0740] 用于接触的所述一种或多种 T 细胞是至少一种 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺ T 细胞,其之前通过标准方法进行分离或富集,或是包含至少一种 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺ T 细胞的细胞组合物。

[0741] 所述裂解物可以是分别来自核心 -1 阳性微生物或来自核心 -1 阳性肿瘤细胞的任何裂解物,例如但不限于通过反复冻融、通过超声处理、通过机械力或通过温度诱导产生的裂解物。

[0742] 关于核心 -1 特异性 T 细胞产生的细节参见实施例 12。

[0743] 功能性树突状细胞是可以活化 T 细胞的细胞。T 细胞的活化意指增殖的刺激和 / 或从未致敏的到活化 T 细胞的转化。活化 T 细胞分泌诱导或帮助针对靶核心 -1 或携带核心 -1 的肿瘤细胞的免疫应答的分子,优选介导核心 -1 阳性肿瘤细胞的杀死的那些细胞毒性 T 细胞。

[0744] 在一个优选实施方案中,所述功能性树突状细胞是成熟树突状细胞。更优选成熟细胞由其衍生的树突状细胞前体得自人,更优选来自一种或多种 T 细胞也由其获得的,或在至少一种 MHC 类分子中匹配的人。在一个更优选的实施方案中,功能性树突状细胞衍生自 MUTZ-3,并且更加优选 MUTZ-3 细胞或由其衍生的细胞使用 IL-4 和 GM-CSF 进行分化,并装载有合适量的核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分或核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分,并且使用例如合适量的 TNF- α 进行进一步成熟为成熟树突状细胞,这对应于本发明的功能性树突状细胞。在一个更加优选的实施方案中,装载的功能性树突状细胞与至少在 MHC I 类 (HLA-A2) 和 (HLA-B44) 中匹配的 PBMC (外周血单核细胞) 一起使用。

[0745] 本领域技术人员能够测定用于产生装载有核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分、或核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分的功能性树突状细胞的合适条件,以及一种或多种 T 细胞的合适量和富集或纯化操作,以及用于一起培养 2 种细胞的合适条件,例如包括时间、培养基、培养条件和所需的另外因子。功能性树突状细胞一般由前体细胞在 6-10 天内进行分化,并且装载和成熟另外 1-2 天。所述一种或多种 T 细胞连同所述装载的功能性树突状细胞的培养一般为 7-10 天,并且用于再刺激的装载的功能性树突状细胞的添加和培养对于每轮再刺激一般为 7-9 天。进一步的细节在实施例 12 中显示。

[0746] 在另一个优选实施方案中,来自不同来源的不同树突状细胞或功能性树突状细胞,例如 MUTZ-3 衍生的和来自人的供体衍生的树突状细胞,用于不同的引发和再刺激步骤。本领域技术人员能够选择最佳组合。

[0747] 一种或多种 T 细胞、或包含针对核心 -1 的一种或多种 T 细胞、CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺ T 细胞的细胞组合物可以通过使用本发明的至少一种细胞免疫应答测试进行检测。进一步的细节在本文其他地方描述。优选至少 2 种细胞免疫应答测试是阳性的,更优选 3 种,更优选 4 种和最优选所有 5 种。

[0748] 本文用于树突状细胞、其使用以及关于其使用的合适条件和分子的描述对于本文其他地方描述的细胞免疫应答测试也是有效的,并且反之亦然,并且对于本发明的所有其他部分也将是有效的。

[0749] 在另一个实施方案中,本发明提供了针对核心 -1 的活化 T 细胞。

[0750] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含针对核心 -1 的至少一种活化 T 细胞的 T 细胞。

[0751] 在另一个实施方案中,本发明提供了针对核心 -1 的 T 细胞系。在另一个实施方案中,本发明提供了针对核心 -1 的 T 细胞克隆。

[0752] 在一个优选实施方案中,T 细胞系或 T 细胞克隆通过使用 MUTZ-3 衍生的功能性树突状细胞(装载有核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分)与用 MUTZ-3 衍生的功能性树突状细胞(装载有来自供体的至少一种核心 -1 携带分子或核心 -1 阳性肿瘤细胞、其裂解物或部分)的至少一轮再刺激组合而产生,和更加优选来自肿瘤患者,和更加优选来自其肿瘤对于与核心 -1 特异性抗体结合是阳性的肿瘤患者。

[0753] 本发明进一步提供了用于产生至少一种活化 T 细胞用于用作肿瘤治疗的方法,其包括在患者内施用针对核心 -1 阳性肿瘤细胞的活化 T 细胞。

[0754] 在一个优选实施方案中,本发明提供了通过如上所述的方法产生的针对核心 -1 的功能性树突状细胞、针对核心 -1 的一种或多种活化 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。

[0755] 在另一个优选实施方案中,如上所述的制剂和 / 或功能性树突状细胞和 / 或一种或多种活化 T 细胞、T 细胞克隆或 T 细胞系,通过本领域技术人员已知的技术用于制备用于预防或治疗肿瘤的药物和 / 或营养食品。

[0756] 本发明的优选实施方案在实施例中描述。

[0757] I) 试剂盒

[0758] 本发明还涉及用于在人类或动物中诱导针对核心 -1、核心 -1 抗原或核心 -1 阳性肿瘤细胞的特异性体液和 / 或细胞免疫应答的试剂盒,如本文其他地方描述的,其包含在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或包含这些的制剂,以及关于试剂盒的使用的信息。

[0759] 在一个更优选的实施方案中,所述核心 -1 特异性免疫应答充当针对核心 -1 阳性癌细胞的保护。

[0760] 本发明还涉及用于减少或预防核心 -1 阳性疾病,或肿瘤优选核心 -1 阳性肿瘤的发生的试剂盒,其包含在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂或包含这些的制剂,以及关于试剂盒的使用的信息。

[0761] 本发明还涉及用于减少或预防核心 -1 阳性疾病的扩展,或肿瘤优选核心 -1 阳性肿瘤的转移的试剂盒,其包含在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂或包含这些的制剂,以及关于试剂盒的使用的信息。

[0762] 本发明还涉及治疗核心 -1 阳性疾病,或肿瘤优选核心 -1 阳性肿瘤的试剂盒,其包含在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂或包含这些的制剂,以及关于试剂盒的使用的信息。

[0763] 本发明还涉及用于预防和治疗胃肠道病症的试剂盒,其包含在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂或包含这些的制剂,以及关于试剂盒的使用的信息。

[0764] 本发明还涉及增强如本文其他地方描述的免疫系统或改善免疫应答的试剂盒,其包含在本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂或包含这些的制剂,以及关于试剂盒的使用的信息。

[0765] 在本发明的一个优选实施方案中,在上文描述的试剂盒中包含的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或制剂包含来自由 Nemod-TF1 和 / 或 A78-G/A7 和 Nemod-TF2 结合的核心 -1 阳性微生物的至少一种微生物、裂解物或部分,优选来自菌株 AG6 (DSM18726)、菌株 MU1 (DSM 18728) 和 / 或菌株 LH2 (DSM 18727),和更优选来自菌株 AG6 和 / 或 MU1,最优选来自菌株 AG6。

[0766] 试剂盒可以包括解释如何组合试剂盒的组分的信息(散页的说明书、因特网址)。所述信息也可以与治疗方案相关。

[0767] 本发明还涉及用于确定针对核心 -1 的免疫应答的试剂盒,其包含本文描述的针对核心 -1 的免疫应答测试中的至少一种、优选至少 2 种、和更优选至少一种体液和一种细胞免疫应答测试,包含在相应的免疫应答测试下描述的至少一种材料和关于试剂盒的使用的信息。在一个优选实施方案中,试剂盒另外包含相应的对照,和更优选本文其他地方描述的至少一种营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂、或包含这些的制剂。

[0768] 本发明还涉及用于产生如本文其他地方描述的抗核心 -1 抗体或抗体组合物的试剂盒,其包含本文其他地方描述的营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂、或包含这些的制剂,和关于试剂盒的使用的信息。

[0769] 本发明还涉及用于产生针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞的试剂盒,其包含营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或包含这些的制剂,和关于试剂盒的使用的信息。

[0770] 在一个优选实施方案中,用于产生针对核心 -1 的至少一种功能性树突状细胞的试剂盒进一步包含,衍生自树突状细胞系例如但不限于 MUTZ-3 或 Nemod-DC 的未成熟树突状细胞。

[0771] 本发明还涉及用于产生针对核心 -1 的至少一种或多种活化 T 细胞、T 细胞克隆或 T 细胞系的试剂盒,其包含营养食品、或药物制剂、或核心 -1 阳性微生物、或其部分或其制剂、或包含这些的制剂,和关于试剂盒的使用的信息。

[0772] 本发明还涉及用于分离核心 -1 阳性微生物或包含至少一种核心 -1 分子或结构的微生物部分的试剂盒,其包含至少一种核心 -1 特异性抗体或抗核心 -1 抗体或抗体组合物,和关于试剂盒的使用的信息。

[0773] 本发明还涉及用于鉴定核心 -1 阳性微生物或包含至少一种核心 -1 分子或结构的微生物部分的试剂盒,其包含至少一种核心 -1 特异性抗体或抗核心 -1 抗体或抗体组合物,和关于试剂盒的使用的信息。

[0774] 本发明还涉及用于鉴定或分离核心 -1 阳性微生物或包含至少一种核心 -1 分子或结构的微生物部分,或用于鉴定合适的核心 -1 阳性微生物用于用作关于本发明的营养食品和药物组合物的组分的试剂盒,其包含至少一种核心 -1 特异性抗体或抗核心 -1 抗体或抗体组合物,和关于试剂盒的使用的信息。

[0775] 在本发明的一个优选实施方案中,使用如本文其他地方描述的优选核心 -1 特异

性抗体,最优选 Nemod-TF1、Nemod-TF2 和 / 或 A78-G/A7。

[0776] 在一个优选实施方案中,试剂盒包含至少一种核心 -1 阳性微生物、其裂解物或部分作为阳性对照。

[0777] 本发明的优选实施方案在实施例中描述。

[0778] 定义:

[0779] 依照本发明,术语“营养食品”意指可以由人类或动物口服的任何营养素、营养素组合物或制剂,例如但不限于营养素、营养添加剂、食品添加剂、饮食补充剂、医疗食品、临床食品、肠胃外食品、肠内食品、用于特殊饮食用途的食品、指定健康用途的食品或功能食品,其可以以不同形式,例如但不限于胶囊、片剂、乳剂、粉剂、液体,以及以任何食品或饮料的形式或作为其部分口服应用。在特定情况下,营养食品可以肠胃外给予(肠胃外食品)。营养食品可以单独或与至少一种其他成分混合给予。单独的营养食品或其与至少一种其他成分的混合物可以单独给予或混合到食品或饮料内。术语营养食品还意指任何食品、饮品、胶囊、片剂、乳剂、粉剂或液体。

[0780] 依照本发明,术语“药物组合物”意指任何组合物,其可以作为药物、或药品或生物制品使用,或是药物或药品或生物制品的组分。

[0781] 依照本发明,术语“核心 -1”意指 β 1-3 连接至 α 1 连接的 N-乙酰半乳糖胺的半乳糖碳水化合物结构 ($\text{Gal } \beta$ 1-3 $\text{GalNAc } \alpha$ 1; TF α , TF α)。在蛋白质或多肽上,核心 -1 经由 O-糖苷键与丝氨酸或苏氨酸氨基酸共价连接 ($\text{Gal } \beta$ 1-3 $\text{GalNAc } \alpha$ 1-O-Ser/Thr)。核心 -1 还可以经由各种接头和各种密度与天然或合成载体连接,所述载体例如聚丙烯酰胺(在本文中也称为 PAA),或其他分子例如层析床材料(例如琼脂糖),生物素或蛋白质,例如牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(Ova)、人血清白蛋白(HSA)或钥孔血蓝蛋白(KLH),毒素,类毒素,珠或纳米颗粒。就本发明而言,术语核心 -1 也意指核心 -1 模拟结构,例如多肽、肽、脂质或碳水化合物或其组合,其具有不同于核心 -1 的化学结构,但具有可以由本发明的核心 -1 特异性抗体识别的构象结构,并且因此在免疫化学上等同于核心 -1。术语核心 -1 因此还包含以 β 异头构型的核心 -1(还参见图 19)。

[0782] 依照本发明,术语“核心 -1 特异性抗体”特别意指任何抗体,其与 $\text{Gal } \beta$ 1-3 $\text{GalNAc } \alpha$ 1-PAA(TF α -PAA、TF α -PAA、Core-1-PAA) 特异性结合,但与 # 列表 1# 中的任何物质不结合。

[0783] # 列表 1#

[0784] $\text{GlcNAc } \beta$ 1-2 $\text{Gal } \beta$ 1-3 $\text{GalNAc } \alpha$ -PAA($\text{GlcNAc } \beta$ 1-2' TF)

[0785] $\text{Fuc } \alpha$ 1-2 $\text{Gal } \beta$ 1-3 $\text{GalNAc } \alpha$ -PAA(H type 3)

[0786] $\text{GalNAc } \alpha$ 1-3 $\text{Gal } \beta$ -PAA(A_{di})

[0787] $\text{Gal } \alpha$ 1-3- $\text{GalNAc } \beta$ -PAA(T α β)

[0788] 其得自 Lectinity holdings, Inc。

[0789] 可替代地,所有结构可以通过本领域技术人员来产生,其还可以选择另一种合适的聚丙烯酰胺用于缀合,或另一种合适的载体分子,以及合适的缀合方法用于偶联相应的碳水化合物结构,和合成必需中间产物。

[0790] 核心 -1 特异性抗体是例如

[0791] - 与无唾液酸血型糖蛋白(携带核心 -1) 结合但与血型糖蛋白(不携带核心 -1)

不结合的抗体,并且这种结合是高碘酸盐敏感的,

[0792] - 更优选与 Tfa-PAA 结合,且与 Tfb-PAA (Gal β 1-3GalNAc β 1-PAA) 结合较少或不结合,但与 # 列表 2# 的任何物质不结合的任何抗体:

[0793] 蛋白质:

[0794] 血型糖蛋白

[0795] BSA(牛血清白蛋白)

[0796] PAA-缀合物:

[0797] 氨基葡萄糖醇 (Aminoglucitol)

[0798] β -N-乙酰神经氨酸 (β -N-乙酰神经氨酸)

[0799] α -D-葡萄糖 (α -D-葡萄糖)

[0800] β -D-葡萄糖 (β -D-葡萄糖)

[0801] α -D-半乳糖 (α -D-半乳糖)

[0802] β -D-半乳糖 (β -D-半乳糖)

[0803] α -D-甘露糖 (α -D-甘露糖)

[0804] α -D-甘露糖-6-磷酸盐 (α -D-甘露糖-6-磷酸盐)

[0805] α -L-岩藻糖 (α -L-岩藻糖)

[0806] β -N-乙酰-D-葡糖胺 (β -N-乙酰-D-葡糖胺)

[0807] α -N-乙酰-D-半乳糖胺 (α -N-乙酰-D-半乳糖胺, Tn, T_n)

[0808] β -D-半乳糖-3-硫酸盐 (β -D-半乳糖-3-硫酸盐)

[0809] α -N-乙酰神经氨酸 (α -N-乙酰神经氨酸)

[0810] β -N-乙酰-D-葡糖胺-6-硫酸盐 (β -N-乙酰-D-葡糖胺-6-硫酸盐)

[0811] Lac-di-NAc (GalNAc β 1-4GlcNAc β -, GalNAc β 1-4GlcNAc β -)

[0812] GlcNAc β 3Gal (GlcNAc β 1-3Gal β -, GlcNAc β 1-3Gal β -)

[0813] Gala4GlcNAc (Gal α 1-4GlcNAc β -, Gal α 1-4GlcNAc β -)

[0814] 麦芽糖

[0815] Gal β 3Gal (Gal β 1-3Gal β -, Gal β 1-3Gal β -)

[0816] Le^c (Gal β 1-3GlcNAc β -, Gal β 1-3GlcNAc β -)

[0817] Lac (Gal β 1-4Glc β -, Gal β 1-4Glc β -)

[0818] LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc β -, Gal β 1-4GlcNAc β -,)

[0819] Fuca3GlcNAc (Fuc α 1-3GlcNAc β -, Fuc α 1-3GlcNAc β -)

[0820] Fuca4GlcNAc, (Fuc α 1-4GlcNAc β -, Fuc α 1-4GlcNAc β -)

[0821] Fs-2 (GalNAc α 1-3GalNAc β -, GalNAc α 1-3GalNAc β -)

[0822] Core5 (GalNAc α 1-3GalNAc α -, GalNAc α 1-3GalNAc α -)

[0823] T α α Gal α 1-3GalNAc α -, Gal α 1-3GalNAc α -, T α α)

[0824] Gal α 2Gal (Gal α 1-2Gal β -, Gal α 1-2Gal β -, Gala2Gal)

[0825] SiaTn (Neu5Ac α 2-6GalNAc α -; Neu5Ac α 2-6GalNAc α sTn)

[0826] 3'-su-LacNAc (3'-O-su-LacNAc β -, 3'-O-su-LacNAc β -)

[0827] 3'-su-Le^c (3'-O-su-Gal β 1-3GlcNAc β -, 3'-O-su-Gal β 1-3GlcNAc β -)

[0828] 蜜二糖 (Gal α 1-6Glc β -, Gal α 1-6Glc β -)

- [0829] (Sia)₂(Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α -, Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α)
- [0830] Gal2 β Gal (Gal β 1-2Gal β -, Gal β 1-2Gal β -, Gal β 2Gal-)
- [0831] 6-0-su-LacNAc (Gal β 1-4 (6-0-su)GlcNAc β -, Gal β 1-4 (6-0-su)GlcNAc β -)
- [0832] A_{di} (GalNAc α 1-3Gal β -, GalNAc α 1-3Gal β -)
- [0833] B_{di} (Gal α 1-3Gal β -, Gal α 1-3Gal β)
- [0834] 6' -0-su-LacNAc (6' -su-LacNAc β -, 6' -su-LacNAc β -)
- [0835] H_{di} (Fuc α 1-2Gal β -, Fuc α 1-2Gal β)
- [0836] 3' -0-su-TF (3' -0-su-Gal β 1-3GalNAc α -, 3' -0-su-Gal β 1-3GalNAc α -)
- [0837] di-GalNAc β (GalNAc β 1-3GalNAc β -, GalNAc β 1-3GalNAc β)
- [0838] 核心 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α -, GlcNAc β 1-3GalNAc α)
- [0839] 核心 6 (GlcNAc β 1-6GalNAc α -, GlcNAc β 1-6GalNAc α)
- [0840] GA1, Gg0se3 (GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -, GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β)
- [0841] Gala1-3' Lac (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -, Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β)
- [0842] GlcNAc β 1-2' TF (GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -)
- [0843] Man₃ (Man α 1-6Man α -Man α 1-3)
- [0844] 3' SLN (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -)
- [0845] Pk (Gb3, Gb0se3, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -)
- [0846] Le^a (Fuc α 1-4 GlcNAc β -Gal β 1-3)
- [0847] Le^d (H1 型, Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -)
- [0848] Le^x (Fuc α 1-3GlcNAc β -Gal β 1-4)
- [0849] 3' -SiaLe^c (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -)
- [0850] H3 型 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -)
- [0851] 3' -SL (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -)
- [0852] 6' -SL (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -)
- [0853] 3' -0-su-Le^a (Fuc α 1-4 GlcNAc β -0-su-3Gal β 1-3)
- [0854] 3' -0-su-Lex (Fuc α 1-3 GlcNAc β -0-su-3Gal β 1-4)
- [0855] Gala1-3' LacNAc (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -)
- [0856] (Sia)₃(Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-)
- [0857] GlcNAc β 1-3' TF (GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -)
- [0858] A_{tri} (Fuc α 1-2 Gal β -GalNAc α 1-3)
- [0859] 其得自 Lectinity holdings, Inc.。
- [0860] 可替代地,所有结构可以通过本领域技术人员来产生,其还可以选择另一种合适的聚丙烯酰胺用于缀合,或另一种合适的载体分子,以及合适的缀合方法用于偶联相应的碳水化合物结构,和合成必需中间产物。
- [0861] - 更加优选选自下述抗体的抗体:HB-T1(IgM)[可从 DakoCytomation GmbH, Hamburg;GiuffréG, Vitarelli E, TuccariG, Ponz de Leon M, Barresi G:Detection of Tn, sialosyl-Tn andT antigens in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Virchows Arch 429:345-352(1996) 获得]、HH8(IgM)[Clausen H, Stroud M, Parker J, Springer G, Hakomori S:Monoclonal antibodiesdirected to the

blood group A associated structure, galactosyl-A :specificity and relation to theThomsen-Friedenreich antigen.Mol Immunol 25 :199-204(1988)]、A78-G/A7[Glycotope GmbH, Berlin ;Karsten U, Butschak G, CaoY, Goletz S, Hanisch FG.A new monoclonal antibody (A78-G/A7)to the Thomsen-Friedenreich pan-tumor antigen.Hybridoma 1995Feb ;14(1) :37-44]、Nemod-TF1[Glycotope GmbH, Berlin ;GoletzS, Cao Y, Danielczyk A, Ravn P, Schoeber U, Karsten U.Thomsen-Friedenreich antigen:the " hidden " tumor antigen.AdvExp Med Biol.2003 ;535 :147-62]、或 Nemod-TF2[Glycotope GmbH,Berlin ;Goletz S,Cao Y,Danielczyk A,Ravn P,Schoeber U, Karsten U.Thomsen-Friedenreich antigen:the" hidden" tumorantigen.Adv Exp Med Biol.2003 ;535 :147-62],

[0862] -更加优选这样的抗体,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何蛋白质和 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且结合是高碘酸盐敏感的,

[0863] -更加优选这样的抗体,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何蛋白质和 X-PAA 构建体不 结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且与 NM-D4[DSM ACC2605]、NM-F9[DSM ACC2606]、ZR-75-1、CAMA-1、KG-1 或 A-204 中的至少一种人肿瘤细胞系结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,例如 NEMOD-TF2 或 A78-G/A7,

[0864] -更优选地是这样的任何抗体,其具有任何上述结合特征但与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 不结合,例如 NEMOD-TF1,

[0865] -最优选地是这样的任何抗体,其与 TFa-PAA 结合,且与 TFb-PAA 结合较少或不结合,且与和 PAA 偶联的三糖核心 -2 不结合,且与 # 列表 2# 中列出的任何蛋白质和 X-PAA 构建体不结合,并且与无唾液酸血型糖蛋白结合,且与血型糖蛋白不结合,并且至少与细胞 NM-D4、NM-F9[DSM ACC2606] 和 ZR-75-1 结合,并且由此结合是高碘酸盐敏感的,例如 NEMOD-TF1。

[0866] 所述核心 -1 特异性抗体可以是来自任何人类或动物例如鼠类、大鼠、人类、骆驼的完整抗体,不同抗体种类的人源化或嵌合抗体,所述抗体种类例如但不限于 IgM、IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgD,或抗体的任何片段,只要它包含针对核心 -1 的结合特异性,例如 Fab、F(ab)2、单链 Fv 或单结构域抗体。这些抗体还可以包含至少一种另外的氨基酸或突变或多肽序列,例如标记、接头或多聚化结构域,并且它们还可以源于除动物外的其他来源例如植物,和使用例如噬菌体展示或核糖体展示从合成抗体文库选择或通过重组构建。

[0867] 测试核心 -1 特异性抗体对于 TFa-PAA ;TFb-PAA (TF β -PAA, TF β -PAA) 或其他 PAA 构建体 (X-PAA)、无唾液酸血型糖蛋白或肿瘤细胞的结合的高碘酸盐敏感性的高碘酸盐处理根据 Woodward 等人 [Woodward MP 等人, (1985) J. Immunol. Methods 78 :143-153], 并且在实施例中详细描述。本领域技术人员可以采用技术,并优化关于本文其他地方描述的可替代方法的条件。

[0868] 依照本发明,术语“高碘酸盐敏感性”意指与其和未用高碘酸盐处理的相同抗原或细胞的结合相比较,当这种抗原或细胞用高碘酸盐处理时,抗体与抗原或细胞的结合较少,

如例如在实施例 9 中高碘酸盐处理下详细描述。为了确定抗体对于其核心 -1 特异性的高碘酸盐敏感性,其结合的高碘酸盐敏感性优选 TFa-PAA、TFb-PAA、无唾液酸血型糖蛋白、NM-D4[03018576.3 (EP)、PCT/EP2004/009281、WO2005/017130 A2、EP1654353]) 和 / 或其他肿瘤细胞进行测试。优选地在抗原或细胞的高碘酸盐处理后减少的结合小于非高碘酸盐处理的对应物的 50%, 并且更加优选小于与未用高碘酸盐处理的相同抗原或细胞的结合 的 20%。

[0869] 根据本发明的优选核心 -1 特异性抗体是 NEMOD-TF1、NEMOD-TF2、A78-G/A7、HB-T1、HH8, 优选抗体是 NEMOD-TF1、NEMOD-TF2、A78-G/A7 和 HH8, 更优选的是 NEMOD-TF1、NEMOD-TF2 和 A78-G/A7, 更加优选 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2, 并且最优选 NEMOD-TF1。NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 也在 DE 10256900.2、PCT/DE2003/003994、EP 03788853.4、US 10/536,834 中描述。NEMOD-TF1、NEMOD-TF2、A78-G/A7 以及 A68B/A11 也可以通过购买而获得, 并且例如可从 Glycotope GmbH Berlin, 德国获得。

[0870] 抗体与 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA、Gal β 1-3 GalNAc β 1-PAA、GlcNAc β 1-2 Gal β 1-3 GalNAc α 1-PAA、无唾液酸血型糖蛋白和血型糖蛋白的结合优选在 ELISA 中进行测定, 并且与肿瘤细胞的结合优选在流式细胞术分析或免疫荧光分析中进行测定, 这在实施例中详细描述。本领域技术人员可以使用并采用可替代方法以测试此种抗体的结合, 例如但不限于关于细胞结合的 scatchard 分析、BIAcore 分析、蛋白质印迹分析、或关于抗原结合的斑点印迹分析。本领域技术人员还可以使用其他核心 -1 携带分子用于测试核心 -1 结合例如与合适的接头使用或未使用合适的接头与 KLH、生物素或 BSA 偶联 (Gal β 1-3GalNAc α 1-), 然而, 上述优选实施方案就本发明而言是优选的。

[0871] 依照本发明, 术语“核心 -1 阳性微生物”意指当所述微生物与所述抗体接触时, 由至少一种核心 -1 特异性抗体结合的任何微生物。为了确定微生物是核心 -1 阳性的, 因此决定所述微生物由核心 -1 特异性抗体识别。由此确定微生物携带这样的表位, 其为核心 -1 的, 或其结构特别类似核心 -1 (核心 -1 模拟结构), 并且因此能够引发核心 -1 特异性免疫应答。这也包含其中核心 -1 以 β 形式偶联的微生物 (还参见图 19)。微生物可以天然地是核心 -1 阳性的, 或可以通过用化学制品处理微生物暴露核心 -1 而成为核心 -1 阳性的, 例如在某些实施方案中的高碘酸盐处理。在分别的处理导致核心 -1 阳性微生物的情况下, 它是根据本发明的核心 -1 阳性微生物, 当所述微生物由所述抗体接触时, 它由至少一种核心 -1 特异性抗体特异性结合。然而, 优选其中微生物已是核心 -1 阳性的可替代方案。

[0872] 还存在除识别并因此在接触后结合核心 -1 的抗体外的其他结构。凝集素是例如碳水化合物结合分子, 其并非抗体分子, 能够与核心 -1 结合。例如花生凝集素 (PNA) 数年来已是常规的 Thomsen-Friedenreich 试剂。然而, 它并非 Thomsen-Friedenreich 特异性的, 因为它还与具有末端 Gal β 结构的其他聚糖结合, 并且还显示与正常组织相当广泛的反应性 (Cao 等人, 1996)。根据一个实施方案, 所述核心 -1 阳性微生物的特征在于, 它由至少一种核心 -1 特异性抗体以及至少一种非抗体核心 -1 结合蛋白 (凝集素) 识别 / 结合, 所述结合蛋白例如 (但不限于) 落花生 (*Arachis hypogaea*) (花生) 凝集素 (PNA)、尾穗苋 (*Amaranthus caudatus*) 凝集素 (ACA)、木菠萝 (*Artocarpus integrifolia*) 凝集素 (榴莲凝集素)、红花羊蹄甲 (*Bauhinia purpurea*) 凝集素 (BPL)、或双孢子蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 凝集素 (ABA) [凝集素可从 Vector Labs., Burlingame, CA, USA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA 或其

他来源获得]。在一个优选实施方案中,所述核心-1 阳性微生物的特征在于,它由至少 2 种核心-1 特异性抗体识别 / 结合。在一个更优选的实施方案中,所述核心-1 阳性微生物的特征在于,它由至少 2 种核心-1 特异性抗体识别 / 结合,并且结合是高碘酸盐敏感的。在一个进一步优选的实施方案中,核心-1 阳性微生物的特征在于,它由核心-1 特异性抗体 NEMOD-TF1、NEMOD-TF2 或 A78-G/A7 识别 / 结合,并且结合是高碘酸盐敏感的。在最优选的实施方案中,所述核心-1 阳性微生物由 NEMOD-TF1 和 NEMOD-TF2 或 NEMOD-TF1 和 A78-G/A7 识别 / 结合,并且结合是高碘酸盐敏感的。这些抗体非常适合于在本文描述的选择 / 鉴定过程之一中产生具有足够核心-1 特异性的核心-1 阳性微生物。

[0873] 在本发明中用于测试核心-1 特异性抗体是否与微生物结合的合适方法是 ELISA 和免疫荧光(参见实施例),但本领域技术人员可以使用其他测试系统例如流式细胞术或几种吸附技术,以便鉴定核心-1 阳性微生物。

[0874] 测试核心-1 特异性抗体对于微生物的结合的高碘酸盐敏感性的高碘酸盐处理在实施例 9 中详细描述。

[0875] 依照本发明,术语“微生物的核心-1 高碘酸盐敏感性”意指与其和未用高碘酸盐处理的相同微生物的结合相比较,当所述微生物用高碘酸盐处理时,核心-1 特异性抗体与所述微生物的结合改变(例如更少或更高),如例如在实施例中详细描述的。在一个优选实施方案中,与其和未用高碘酸盐处理的相同微生物的结合相比较,当所述微生物用高碘酸盐处理时,核心-1 特异性抗体与所述微生物的所述结合是较少的且因此是减少的。如上所述,高碘酸盐破坏核心-1 抗原的特异性结构。在一个更优选的实施方案中,在微生物的高碘酸盐处理后,核心-1 特异性抗体与所述微生物的所述减少的结合小于非高碘酸盐处理的对应物的 80%,和更加优选小于 50%,和最优选小于 30%。

[0876] 核心-1 阳性微生物可以是任何微生物,例如但不限于细菌、蓝细菌、真细菌、藻类、真菌(蘑菇、酵母、黑粉菌、霉菌等)、病毒和原生动物。优选的是细菌微生物,例如但不限于从土壤、植物、动物、人类或其他高等活生物体中分离的微生物,所述其他高等活生物体例如猫、犬、猪、牛、山羊、兔、小鼠、黑猩猩。在一个优选实施方案中,核心-1 阳性微生物是源于人类胃肠系统的微生物。

[0877] 依照本发明,术语“核心-1 阳性微生物的部分”意指所述微生物的较小部分的制备或纯化,例如细胞壁制备、包膜制备、裂解物、脂多糖制备、荚膜制备、或荚膜多糖制备、或所述核心-1 阳性微生物的核心-1 阳性组分。它们应包含所述核心-1 阳性微生物的至少一种核心-1 阳性组分,或由所述核心-1 阳性微生物的至少一种核心-1 阳性组分组成,以便能够引发所需免疫应答。它们可以通过由至少一种核心-1 阳性微生物的制备或纯化而获得。所述制备和纯化可以通过本领域技术人员已知的方法来获得,所述方法例如上文描述的那些、或单次或顺次细胞分级、酚水萃取法、醚萃取法、溶菌酶消化或层析法。此外,术语核心-1 阳性微生物的部分还包含人工产生的核心-1 阳性组分,其也在本发明的核心-1 阳性微生物上发现。图 19 例如显示某些核心-1 阳性组分,且因此核心-1 阳性微生物(在本文中:AG6)的部分。核心-1 阳性微生物 AG6 的这些核心-1 阳性组分 / 部分也可以化学产生。核心-1 阳性组分或包含核心-1 阳性组分的部分通过所述部分在测试系统中与至少一种核心-1 特异性抗体的结合进行检测,所述测试系统例如但不限于本领域技术人员已知的 ELISA 或斑点印迹。在本发明的一个优选实施方案中,包含核心-1 阳性组分的部分通

过亲和层析使用至少一种核心-1 特异性抗体来获得。在一个优选实施方案中,使用单个制备或纯化步骤。在另一个优选实施方案中,使用至少 2 个分离和纯化步骤的组合。

[0878] 依照本发明,术语“核心-1 阳性组分”意指由至少一种核心-1 特异性抗体结合的核心-1 阳性微生物的任何组分。所述核心-1 阳性组分包含至少一种核心-1 碳水化合物结构或核心-1 模拟结构,其可以以其天然分子的形式获得,在其中它是在微生物上的部分,例如肽、寡肽、多肽、脂质、神经酰胺、碳水化合物、脂蛋白、多糖、寡糖、多糖、蛋白聚糖、脂多糖或糖蛋白,或作为所述天然分子的部分或单独地获得。核心-1 阳性组分就本发明而言可以像这样作为核心-1 阳性微生物的部分使用,或与其他非天然载体结构偶联使用,所述非天然载体结构例如蛋白质、脂质、化学分子例如聚丙烯酰胺。优选地它以其天然形式使用。核心-1 阳性组分可以包含单个核心-1 碳水化合物结构或核心-1 模拟结构或所述结构的重复单元,且可以包含另外的碳水化合物结构或单元或其他生物分子结构。所述核心-1 模拟结构是这样的结构,其可以由至少一种核心-1 特异性抗体结合和/或可以诱导针对核心-1 的免疫应答,优先地针对核心-1 的体液免疫应答或针对核心-1 的细胞免疫应答,和更优先地针对核心-1 的体液免疫应答和针对核心-1 的细胞免疫应答。

[0879] 依照本发明,术语 coreotic™ 意指包含至少一种核心-1 阳性微生物或其部分的营养食品或营养制剂。

[0880] 依照本发明,术语“核心-1 阳性疾病”意指这样的任何疾病,其特征在于核心-1 抗原的存在的病毒、微生物、真核细胞、肿瘤细胞或其他生物学材料相关,所述核心-1 抗原由至少一种核心-1 特异性抗体识别且因此可以由至少一种核心-1 特异性抗体结合,或者与机体的组分相关或在人类或动物的机体中存在的组分相关,所述组分例如但不限于细胞、肿瘤细胞、微生物、病毒或颗粒,其特征不在于由至少一种核心-1 特异性抗体识别且因此可以由至少一种核心-1 特异性抗体结合的核心-1 抗原的存在。

[0881] 如本文所使用的,术语“治疗剂”包含至少一种核心-1 阳性微生物或其部分,并且可以进一步包含其他组分或元素或优选本领域技术人员已知的药物组合物、药物和药剂的载体。

[0882] 载体是这样的物质,其可以在施用于人类或患者前与活性化合物结合,一般用于控制化合物的稳定性或生物利用度的用途。用于在此种制剂内施用的载体一般是生物相容的,并且还可以是生物可降解的。载体包括例如单价或多价分子,例如血清白蛋白(例如,人或牛的)、卵白蛋白、肽、聚赖氨酸或多糖例如氨基右旋糖和聚乙二醇。载体还包括固体载体材料,例如珠和微粒,其包含例如聚乳酸、聚甘醇酸、聚(丙交酯共乙交酯)、聚丙烯酸酯、胶乳、淀粉、纤维素或右旋糖。载体可以以各种方式拥有化合物,包括直接或经由接头基团的共价结合、非共价相互作用或混合。

[0883] 如本文其他地方描述的针对核心-1 的免疫应答的诱导就本发明而言也意指已存在的针对核心-1 的免疫应答的增强。

[0884] 不希望是限制性的,本发明将参考下述实施例更详细地说明。

[0885] 图例

[0886] 图 1

[0887] 基于分离物 AG6、MU1、其最紧密的亲属和用 Neighbor-Joining 方法 (7) 获得的大肠杆菌型菌株的明确比对序列 (1248 个碱基对) 的无根 (Unrooted) 树 (或称“连根树”)。

[0888] 图 2

[0889] 2a :在用引物 OPL07 扩增后获得的 LH 大肠杆菌菌株 PCR 产物 - 泳道 1-1kb 梯 ;泳道 2-11-LH 菌株 2-5、8、13-16、18 ;泳道 12- 菌株 32 大肠杆菌 DSMZ 8697

[0890] 2b :在用引物 OPA18 扩增后获得的 MU 菌株和 AG6- 泳道 1-1kb 梯 ;泳道 2-5-MU 菌株 1、3-5 ;泳道 6-AB12 ;泳道 7- 多形拟杆菌 DSMZ 2079 ;泳道 8- 卵形拟杆菌 DSMZ 1896 ;泳道 9- 普通拟杆菌 (*B. vulgatus*)DSMZ 1447 ;泳道 10- 嗜酸拟杆菌 DSMZ 15896 ;泳道 11-13-AG6

[0891] 图 3

[0892] 用包被的细菌菌株 AG6、LH2 和 MU1 (5×10^6 细菌 /ml) 和核心 -1 特异性单克隆抗体 Nemod-TF1、Nemod-TF2 以及特异性较少的 A68-B/A11 和对照抗体 A63-B/C2 的 ELISA。

[0893] 图 3a

[0894] 用包被的细菌菌株幽门螺杆菌 NCTC 11637、大肠杆菌菌株 DSMZ8697 (菌株 32) 和卵形拟杆菌菌株 MU1 (各自以对应于 $10 \times OD_{650nm}$ 0, 1 的密度) 以及单克隆抗体 Nemod-TF1、Nemod-TF2 和 A68-BA11 (对照抗体 A63-B/C2 的 $OD_{450/630nm}$ 减 $OD_{450/630nm}$) 的 ELISA。

[0895] 图 4

[0896] 菌株 AG6 的荚膜制剂的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析

[0897] A) SDS- 聚丙烯酰胺凝胶的阿辛蓝染料

[0898] B) 蛋白质印迹的 DIG- 聚糖染色

[0899] C) 对于 Nemod-TF2 的蛋白质印迹染色

[0900] 图 5

[0901] 核心 -1 阳性多糖经由反相层析的富集

[0902] 图 6

[0903] 卵形拟杆菌菌株 AG6 的核心 -1 阳性荚膜多糖的重复单元的序列

[0904] 图 7

[0905] 卵形拟杆菌菌株 AG6 的核心 -1 阳性荚膜多糖的重复单元的结构 (L-Fuc ;L- 岩藻糖, D-Gal ;D- 半乳糖, HexNAc ;N- 乙酰己糖胺, D-Hex ;D- 己糖, OMe ;O- 甲基)

[0906] 图 8

[0907] 卵形拟杆菌菌株 AG6 的核心 -1 阳性荚膜多糖的重复单元的结构 (L-Fuc ;L- 岩藻糖, D-Gal ;D- 半乳糖, HexNAc ;N- 乙酰己糖胺, D-Hex ;D- 己糖, OMe ;O- 甲基)

[0908] 图 9

[0909] 小鼠血清通过体液免疫应答测试 1 的分析

[0910] 在来自用 PBS (组 L)、核心 -1 阴性细菌 (组 I) 和核心 -1 阳性细菌 (组 K) 免疫接种的小鼠的血清中,通过 ELISA 测定针对 AGP 抗体和高碘酸处理的 AGP 的 IgM 抗体

[0911] 血清稀释度 1 : 200, 第 21 天

[0912] 图 10

[0913] 关于碳水化合物 -PAA 缀合物的免疫血清的 ELISA 信号意指,相对于针对 GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA 的 ELISA 信号,来自 4 只 C3H 小鼠的针对 PAA 缀合物 Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号值 (血清的稀释度 1 : 100)

[0914] 图 11a 至 e

[0915] 在第 21 天时来自用 PBS (组 L)、核心 -1 阴性细菌 (组 I) 和核心 -1 阳性细菌 (AG6, 组 K) 免疫接种的小鼠的小鼠血清的 FACS 分析

[0916] A) FACS 分析的平均荧光强度

[0917] B) 直方图覆盖 (histogram overlay) (黑色 : 组 L, 蓝色 : 组 I, 红色 : 组 K)

[0918] 图 11c 显示用小鼠血清的体液免疫应答测试 1 的结果, 所述小鼠用细菌菌株卵形拟杆菌 MU-1、大肠杆菌 LH2、大肠杆菌 AG3、大肠杆菌 086 DSMZ 8697 = 32 进行免疫接种 (显示了 4 只小鼠 / 组的平均值)。

[0919] 图 11d 显示用小鼠血清的体液免疫应答测试 2 的结果, 所述小鼠用细菌菌株卵形拟杆菌 MU-1、大肠杆菌 LH2、大肠杆菌 AG3、大肠杆菌 086 DSMZ 8697 = 32 进行免疫接种 (显示了 4 只小鼠 / 组的平均值)。

[0920] 图 11e 显示用小鼠血清的体液免疫应答测试 3 的结果, 所述小鼠用细菌菌株卵形拟杆菌 MU-1、大肠杆菌 LH2、大肠杆菌 AG3、大肠杆菌 086 DSMZ 8697 = 32 进行免疫接种 (显示了 4 只小鼠 / 组的平均值)。

[0921] 图 12

[0922] 来自无菌小鼠 (对照小鼠和用细菌菌株 AG6 免疫接种的 3 只不同小鼠) 的血清的体液免疫应答测试 1

[0923] 图 13

[0924] 在第 0 到 28 天时, 来自 C3H 小鼠的血清的体液免疫应答测试 1, 所述 C3H 小鼠用 A) 2×10^{11} (组 A) 或 B) 2×10^{10} (组 B) 巴氏消毒的细菌菌株 AG6 进行口部免疫接种。显示了个别小鼠在第 21 天时针对血型糖蛋白 (GP)、无唾液酸血型糖蛋白 (AGP) 和高碘酸盐处理的 AGP (AGP+PJ) 的 ELISA 信号

[0925] 图 14

[0926] 来自 C3H 小鼠的血清的体液免疫应答测试 3, 所述 C3H 小鼠用巴氏消毒的核心 -1 阳性细菌 (菌株 AG6) 进行口部免疫接种。从第 0 天到第 28 天的血清进行 1 : 300 稀释, 并且在流式细胞术中就在细胞系 NM-wt 和 NM-D4 上的结合进行分析。

[0927] 图 15

[0928] 在用装载有来自人肿瘤细胞系的核心 -1 阳性 MN-D4 (DC/D4) 或阴性 NMwt (DC/wt) 细胞裂解物的 DC 再刺激后, 经由对于核心 -1 阳性细菌裂解物 (AG6 和 MU1) 的 T 细胞产生的细胞因子生产。细胞因子生产通过裂解物装载的 NM-DC 与核心 -1 特异性抗体 (DC/D4+Ak) 的预温育的抑制。

[0929] A) 经由 T 细胞的 GM-CSF 生产 (CIRT 1)

[0930] B) 经由 T 细胞的 $\text{TNF } \alpha$ 生产 (CIRT 2)

[0931] 图 16

[0932] 细胞免疫应答测试 2 : 在用装载有来自人肿瘤细胞系的核心 -1 阳性 (DC/D4) 或阴性 (DC/wt) 细胞裂解物的 DC 再刺激, 以及通过裂解物装载的 NM-DC 与核心 -1 特异性抗体 (DC/D4+Ak) 的预温育抑制细胞因子生产后, 关于经由应答子 T 细胞的 $\text{IFN-}\gamma$ 生产的 ELISpot 测定法结果。

[0933] 图 17

[0934] 细胞免疫应答测试 3 : 在用装载有来自人肿瘤细胞系的核心 -1 阳性 (DC/D4) 或阴性 (DC/wt) 细胞裂解物的 DC 再刺激, 以及通过裂解物装载的 NM-DC 与核心 -1 特异性抗体 (DC/D4+Ak) 的预温育抑制增殖后, 关于应答子 T 细胞的 T 细胞 (R) 增殖测定法 (WST)。

[0935] 图 18

[0936] 细胞免疫应答测试 4 :装载有核心 -1 阴性 (AG3) 或核心 -1 阳性 (AG6) 细菌、或核心 -1 阴性 (NM-wt) 或核心 -1 阳性 (NM-D4) 人细胞系的 mNM-DC 的免疫荧光分析。

[0937] 图 19

[0938] 核心 -1 阳性组分的碳水化合物结构

[0939] L-Fuc :L- 岩藻糖, D-GalNAc :N- 乙酰半乳糖胺, D-Gal :D- 半乳糖胺, Hex :己糖, HexNAc :N- 乙酰己糖胺, OMe :O- 甲基化

[0940] 此种结构例如在 AG6 上发现。

[0941] 图 20

[0942] 隐藏和暴露的核心 -1 抗原。

[0943] 图 21

[0944] 图 21 显示在第 21 天时,针对 PAA 缀合物 Gal β 1-3 GalNAc aPAA 和 PAA 缀合物 Gal β 1-3 GlcNAc a-PAA 的 ELISA 信号。如果关于 PAA 48 的信号比关于 PAA 43 的信号高至少 30%,那么血清视为阳性的。考虑到这个标准,来自 6 只小鼠中的 5 只 (A1、A2、A3、B1 和 B5) 发展出核心 -1 特异性体液免疫应答。

[0945] 图 22

[0946] 显示表 1,其中所选择的核心 -1 阳性菌株以及并非核心 -1 阳性的 菌株的特征在于其针对不同抗生素的敏感性。

[0947] 图 23

[0948] 关于根据本发明的细胞免疫应答测试的概述。

实施例

[0949] 实施例 1 厌氧培养技术和培养基

[0950] 在细菌培养中采用的厌氧技术基于先前描述的方法,所述方法已由 Breznak 和 Costilow 概括。将由半胱氨酸 $\cdot$ HCl 作为还原剂制备的培养基分配到厌氧培养管 (Ochs, Bovenden, 德国) 或玻璃血清瓶内,留下约一半至三分之一的总容器体积作为气体顶空,并且用丁基橡胶塞子进行密封。不用还原剂制备的溶液 (例如 PBS-a) 在分配前进行煮沸。在高压灭菌前,将气相替换为 N_2/CO_2 (80/20, v/v)。为了达到这点,使针刺穿丁基橡胶塞住的瓶,并且借助于真空泵 (Vacuubrand, Wertheim, 德国) 将瓶抽空。抽空后,在整个过程中反复振荡的瓶用 N_2/CO_2 (80/20, v/v) 进行充气。这个抽空和充气操作总共进行 3 次。在进入容器之前,使气体混合物经过热钯催化剂,以去除气体混合物中存在的残留的痕量氧。刃天青 (1mg l^{-1}) 用作氧化还原指示剂。

[0951] 用于铺平板的培养基在层流通风橱下倾出,并且在使用前在厌氧条件下贮存至少 24 小时。这在具有 3.5 l AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke, 英国) 或反复冲刷的 $N_2/CO_2/H_2$ (80/10/10, v/v/v) 厌氧培养室气塞 (Don Whitley Scientific, Shipley, 英国) 的增压 ($1.5 \times 10^5 \text{Pa}$) 厌氧培养罐中达到。样品的处理在厌氧培养室 (MACS 可调大气工作站, Don Whitley Scientific, Shipley, 英国或 CoyLaboratory Products, Grass Lake, USA) 中进行。

[0952] 有菌溶液和材料通过高压灭菌 (121°C , $1.2 \times 10^5 \text{Pa}$, 15 分钟) 进行灭菌。不耐热的化合物作为在 milli-Q 水中的浓缩原液进行制备,无菌过滤 ($0.22 \mu\text{m}$, 混合纤维素酯, Roth,

Karlsruhe, 德国) 并以所需浓度加入培养基中。

[0953] 实施例 2 核心-1 阳性微生物的亲合力富集

[0954] 2.1 包被 TF1 和 TF2 的 **Dynabeads[®]** 制备

[0955] 将各 100 μ l 体积的 **Dynabeads[®]** (M-450 大鼠抗小鼠 IgM, DynalBiotech ASA, Oslo, 挪威) 置于 2ml Safe-Lock Eppendorf 管 (Eppendorf, Hamburg, 德国) 中, 用 2ml 磷酸盐缓冲盐水 a (PBS-a: 8.1g l^{-1} NaCl、 0.16g l^{-1} $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 0.98g l^{-1} $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 1g l^{-1} BSA、pH 7.4) 洗涤 2 次, 使用 Dynal Magnetic Particle **Concentrator[®]-S** (**MPC[®]-S**, Dynal Biotech, Oslo, 挪威), 并且悬浮于 25 μ l PBS-a 中。将冷冻干燥的 TF1 或 TF2 细胞培养上清液溶解于 1ml milli-Q 合成级别水 (Millipore, Billerica, MA, USA) 中。将溶解的 TF1 或 TF2 细胞培养上清液 (1ml) 加入具有 **Dynabeads[®]** 的管中, 并且于 4°C 在试管旋转器 (型号 34528, Snijders Scientific, 荷兰) 上温育 30 分钟。将管置于 **MPC[®]-S** 中, 并且在用吸管去除液体前静置 3 分钟。将 **Dynabeads[®]** 重悬浮于 2ml PBS-a 中, 置于 **MPC[®]-S** 中, 并且通过吸取去除液体。这个洗涤步骤执行 3 次。将洗涤的 **Dynabeads[®]** 悬浮于其原始体积的 100 μ l PBS-a 中。在用 2ml PBS-a 的重复 3 倍洗涤步骤后, 以这种方式制备的 **Dynabeads[®]** 或者立即使用或在制备 2 周内使用。

[0956] 2.2 关于 **Dynabeads[®]** 富集的粪便样品的收集和处理

[0957] 将 8 个志愿者 (表 3) 的粪便样品收集在多孔塑料管中, 使用 AnaeroGen Compact (Oxoid, Basingstoke, 英国) 维持在厌氧条件下, 并且在处理前贮存于 4°C 最多 4 小时。志愿者是在取样日期前至少 3 个月未服用抗生素且消耗其通常饮食的健康成人。

[0958] 表 3: 在粪便样品收集时的个体参数

[0959]

受试者编号	年龄	性别
1 - GH	24	女
2-RM	26	女
3-TC	25	男
4-AG	27	女
5-AB	37	女
6-MU	36	女
7-LH	24	女
8 - CA	50	男

[0960] 粪便样品的 10 倍 (w/v) 稀释物在 PBS-b (PBS-b: 8.5g l^{-1} NaCl、 0.3g l^{-1} KH_2PO_4 、 0.6g l^{-1} Na_2HPO_4 , pH 7.0 包含 0.1g l^{-1} 蛋白胨和 0.25g l^{-1} 半胱氨酸 $\cdot \text{HCl}$) 中进行制备。加入 6 个无菌 3mm 直径玻璃珠, 并且通过低速旋转使稀释的样品均质化。均质化样品进行离心 ($300\times g$, 1 分钟, 21°C) 以使碎片沉积。将 200 μ l 所得到的上清液部分加入 1.8ml PBS-b 中, 产生原始粪便样品的约 100 倍稀释物。这些稀释物用 2ml PBS-b ($8000\times g$, 5 分钟, 21°C)

洗涤 1 次,并且将团块悬浮于 2ml PBS-b 中。

[0961] 2.3 Dynabeads[®]富集操作

[0962] 将来自 100 倍稀释物的 20 μ l 体积加入包含 180 μ l PBS-a 和 5 μ l TF1 或 TF2 抗体包被的 Dynabeads[®]的 2ml 管中。使管于 4℃ 在试管旋转器上温育 30 分钟。将管置于 MPC[®]-S 中,并且在通过用注射器和针抽吸尽可能多的上清液前静置 3 分钟。将样品用 2ml PBS-a 洗涤 3 次,再次去除尽可能多的上清液。

[0963] 2.4 在选择性和非选择性培养基上铺平板

[0964] 将洗涤样品悬浮于 1ml PBS-b 中,并且将 100 μ l 等分试样扩展铺平板在各种选择性和非选择性培养基(表 4)上,并且于 37℃ 在厌氧培养室中温育 48 小时。

[0965] 表 4:用于扩展铺平板的培养基

[0966]

培养基	制造商	对于选择性	缩写
de Man, Rogosa and Sharpe	Merck, Darmstadt, 德国	乳杆菌, 乳酸细菌	MRS
Bifidus 选择性培养基	Fluka, St. Gallen, 瑞士	双歧杆菌	BSM
K-F 链球菌属琼脂	Oxoid	链球菌	KF
营养琼脂	Oxoid	非选择性	N
Schaedler 厌氧培养琼脂	Oxoid	非选择性	S
Wilkins Chalgren 厌氧培养琼脂	Oxoid	非选择性	WC
脑心浸液琼脂	Bio é rieux, Marcy l'Etoile, 法国	非选择性	BHI
含 5% 绵羊血的哥伦比亚琼脂	Biom é rieux	非选择性	CBA
Stamm 琼脂		非选择性	ST

[0967] 固体培养基根据制造商的说明书进行制备。ST 琼脂的组成如下:1g l^{-1} 胰蛋白胨、9g l^{-1} 来自肉的蛋白胨、3g l^{-1} NaCl、2g l^{-1} Na₂HPO₄·2H₂O、3g l^{-1} 肉提取物、4g l^{-1} 酵母提取物、6g l^{-1} D(+)-葡萄糖、0.5ml l^{-1} Tween 80、0.25g l^{-1} 半胱氨酸·HCl、1mg l^{-1} 刃天青、0.1g l^{-1} MgSO₄·7H₂O、5mg l^{-1} FeSO₄·7H₂O、0.5g l^{-1} 、3.4mg l^{-1} MnSO₄·2H₂O、1.5g l^{-1} 细菌琼脂, pH 7.0。

[0968] 对于受试者 1-4,选择来自 1 个富集操作的菌落用于基于 ELISA 的筛选。对于受试者 5-8, Dynabeads[®]富集操作如下重复 2 次:在 48 小时温育后,从平板刮下菌落,悬浮

于 PBS-b 中在 McFarland 浊度标准 3-5 的范围内 (如 (13) 中制备)。如前,将 20 μ l 等分试样的这种悬浮液加入 180 μ l PBS-a 中。富集和铺平板操作总共进行 3 次,如前所述。

[0969] 另外 4 个受试者 (5AB、6MU、7LH 和 8CA) 的粪便样品就核心-1 阳性细菌进行富集。富集操作的略微修改之处在于富集总共进行 3 次。即从平板刮下在起始分离后获得的菌落,且实施进一步的富集。以这种方式获得 60 个新分离物。

[0970] 实施例 3 分离物的鉴定

[0971] 3.1 生物化学

[0972] 细菌用 VITEK 系统 (Biomérieux, Marcy l' Etoile, 法国) 进行鉴定。细菌根据制造商的说明书进行制备,并且使用的鉴定卡如下:ANI 卡用于能够在 MRS 肉汤中生长的厌氧分离物和偶发的厌氧革兰氏阳性杆菌 (可疑的乳杆菌), GPI 卡用于革兰氏阳性分离物和 GNI+ 卡用于革兰氏阴性好氧分离物。

[0973] 使用 VITEK 系统 (Biomérieux, Marcy l' Etoile, 法国) 所获得的分离物的生物化学鉴定概括于表 5 中。厌氧分离物 AG6、MU (1, 3-5) 和 AB12 全都属于脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 族,而厌氧分离物都是肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 的成员;两者都是革兰氏阴性的。

[0974] 表 5:分离的菌株基于生物化学特征的鉴定 (VITEK)

[0975]

菌株	鉴定	概率
AG6	卵形拟杆菌	82 - 95 %
MU (1, 3 - 5)		
AB12		
AG3	大肠埃希杆菌	89 - 99 %
LH (2 - 5, 8, 13 - 16, 18)		

[0976] 3.2 分子 (测序)

[0977] DNA 用 Invisorb Genomic DNA Kit III (Invitek, Berlin, 德国) 根据制造商关于方案 III B 的说明书进行提取,其中得自液体培养的洗涤的细胞团块悬浮于 1ml 裂解缓冲液 D 中。引物 27f (5'AGA GTTGA TCC TGG CTC AG) 和 1492r (5'TAC CTT GTT ACG ACT T) (10) 用于扩增细菌 16S 核糖体 RNA 基因。

[0978] 每次 PCR 一式三份地进行,并且反应混合物 (50 μ l) 包含:50mMKCl、20mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.25mM 每种 dNTP、1 μ M 每种引物、2.5 单位 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Karlsruhe, 德国) 和 1 μ l 模板 DNA。PCR 程序是:94°C 5 分钟,94°C 1 分钟、55°C 1 分钟和 72°C 1 分钟的 30 个循环,和最后 72°C 10 分钟。PCR 产物用 HighPure PCR Product Purification Kit (Roche, Indianapolis, USA) 根据制造商的说明书进行纯化。产物通过在 Tris- 乙酸盐-EDTA 缓冲液 (4.84g l⁻¹ Tris、1.142ml l⁻¹ 冰乙酸 0.372g l⁻¹ EDTA, pH 8.0) 中在 1% 琼脂糖凝胶 (w/v) 上电泳进行分析。DNA 浓度使用 Low DNA

MassLadder(Invitrogen, Carlsbad, USA) 进行评估。

[0979] 对于测序,使用引物 27f、338f(5'GCT GCC TCC CGT AGG AGT)(2)、338r(5'ACT CCT ACG GGA GGC AGC)、968f(5'AAC GCGAAG AAC CTT AC)(14) 或 1492r。测序反应用 DYEnamic™ ET DyeTerminator Cycle Sequencing Kit(Amersham Biosciences, LittleChalfont, 英国) 根据制造商的说明书来进行。测序产物用 MegaBACE1000 System(Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) 进行分析。序列使用 Vector NTI Suite 9.0.0(Invitrogen, Carlsbad, USA) 的 ContigExpress 功能进行装配和人工调整。随后使它们与高度相似的序列(92%的相似性或更多)进行比对,所述高度相似的序列用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)的 BLAST 功能获得(1)。相似性百分比使用 Bioedit 软件版本 5.0.9 的 Sequence Identity Matrix 功能或 Ribosomal Database Project 的 Similarity Matrix 版本 1.1 由明确比对的序列进行计算。测序结果通过与得自 16S rRNA 基因测序服务供应者(AMODIA, Braunschweig, 德国)的序列比较加以证实。

[0980] 分离物的鉴定在表 6 中描述,并且基于分离物 AG6、MU1、其最紧密的亲属和大肠杆菌 ATCC 11755 型菌株的序列的连根系统树描述于图 1 中。

[0981] 表 6:使用 Ribosomal Database Project 的相似性矩阵功能版本 1.1,基于 16S rRNA 基因的明确比对序列的分离菌株的鉴定(5)

[0982]

菌株	鉴定	相似性	
		(%)	与菌株 登记号
AG6	卵形拟杆菌	98.2	ATCC 8483T X83952
	多形拟杆菌	97.1	ATCC 29148T L16489
MU1	卵形拟杆菌	98.0	ATCC 8483T X83952
	多形拟杆菌	97.1	ATCC 29148T L16489
AG3	大肠埃希杆菌	99.5	k12 MG1655 AE000460
	副干酪乳杆菌属副干酪亚种 (<i>Lactobacillus paracasei</i> sp.		
GH1	<i>paracasei</i>)	99.4	JCM 8130T D79212
	副干酪乳杆菌属 (<i>L. paracasei</i> <i>sp. tolerans</i>)	99.4	JCM 1171T D16550
96	沃氏葡萄球菌	99.2	ATCC 27836T L37603
	巴氏葡萄球菌 (<i>Staphylococcus</i> <i>pasteuri</i>)	99.0	ATCC 51129T AF041361
	鼠李糖乳杆菌 (<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>)	99.6	JCM 1136T D16552
TC7	玉米乳杆菌 (<i>Lactobacillus</i> <i>zeae</i>)	98.7	ATCC 15820 D86516

[0983] 3.3 随机扩增多态 DNA (RAPD)

[0984] 用重复的 Dynabead®富集操作获得的某些核心 -1 阳性分离物看起来在其细胞和菌落形态方面非常相似, 尽管从不同培养基中分离。菌株就其用 VITEK 系统获得的生物化学特征而言也非常相似。出现分离的细菌是否是相同的菌株的问题。RAPD 是不需要序列信息的方法, 其可以应用以区分菌株。简言之, 在低严格条件下用 10 碱基对引物 PCR 扩增总基因组 DNA, 从而使得 DNA 的随机序列基于靶 DNA 中存在的与引物的同源序列进行扩增。所得到的 PCR 产物可以通过琼脂糖凝胶电泳进行分离, 并且所得到的模式 (pattern) 可以在菌株之间进行比较。关于所有 LH 菌株所得到的带型对于使用的 5 种 RAPD 引物 (OPL07、M13、OPX14、OPA16、OPA18) 是类似的。该模式明显不同于大肠杆菌菌株 DSMZ 8697——已报告具有血型 B 活性的菌株的那种 (图 2a)。MU 菌株看起来也非常相似 (图 2b); 然而, 它们的条带模式明显不同于其他拟杆菌属菌株, 包括 AG6。看起来 1 个核心 -1 阳性菌株在分离过程中从每个阳性供体中重复富集。所分离的菌株在个体之间不同。

[0985] 实施例 4 用于基于 ELISA 的筛选的细菌的生长和固定

[0986] 从选择性和非选择性琼脂平板中随机挑选良好分离的菌落,并且在非选择性培养基上重新划线培养3次。挑选单个菌落并且依赖于何者提供最佳生长接种到ST(如上,省略琼脂)、WC或MRS肉汤内,并且于37℃生长过夜。将这些培养物接种(1%)到300ml新鲜的ST、WC或MRS肉汤内,并且于37℃生长过夜。使细胞形成团块(8000×g,15分钟,4℃),且重悬浮于10ml PBS-c(8g l⁻¹ NaCl、0.2g l⁻¹ KCl、1.44g l⁻¹ Na₂HPO₄、0.24g l⁻¹ KH₂PO₄) (12)中。这种悬浮液通过加入在PBS-c中的30ml 4%多聚甲醛(PFA)溶液(根据(8)制备)于4℃固定3-4小时。接下来,样品用40ml PBS-c(8000×g,15分钟,4℃)进行洗涤,随后使团块悬浮于15ml PBS-c中,随后加入等体积的96%冰冷的乙醇。使样品贮存于-20℃直至分析。

[0987] 培养物的纯度通过比较细胞形态以及革兰氏染色行为进行检查。将培养物好氧铺平板在CBA上,以测定其在氧的存在下生长的能力并且就好氧污染物的不存在检查。

[0988] 实施例5分离物的维持

[0989] 冷冻原种根据制造商的说明书维持在Microbank管(MAST Diagnostica, Reinfeld, 德国)中,并贮存于-80℃。工作原种维持在WC、ST或MRS肉汤中。这些每14天进行传代培养。培养物的纯度通过在好氧和厌氧条件下观察革兰氏染色行为、细胞形态和菌落形态在CBA划线平板上的定期比较进行确定。

[0990] 实施例6用于动物实验的细菌的生长、固定和冷冻干燥

[0991] 对于在动物实验中的使用,细菌如部分3中所述进行生长和固定,伴随下述修改:起始培养体积总计为约4l。在固定前,细菌用100ml PBS-b(8000×g,15分钟,4℃)洗涤1次,并且重悬浮于最低限度可能的PBS-b体积中。将这种悬浮液分成2个相等的部分,一个用于固定(7.1),另一个用于冷冻干燥(7.2)。

[0992] 6.1 固定

[0993] 用于固定的部分进行洗涤(8000×g,15分钟,4℃),并且重悬浮于30ml PBS-c中。将这种悬浮液加入90ml在PBS-c中的4%PFA溶液中,并且于4℃固定3-4小时。为了改善PFA的去除,样品用120ml PBS-c(8000×g,15分钟,4℃)洗涤3次。将细胞团块悬浮于45ml PBS-c中,随后加入等体积的96%冰冷的乙醇。使样品贮存于-20℃。

[0994] 在施用于动物前,使固定的细菌在Lid_{Bac}管(Eppendorf, Hamburg, 德国)中在无菌条件下进行冷冻干燥,以使乙醇蒸发。为了确保固定的细菌的非活力,将它们接种(1%)到WC肉汤内,并且在CBA上铺平板,并且就生长的不存在监控1周的时间段。

[0995] 6.2 巴氏灭菌法

[0996] 细菌悬浮液在PBS中洗涤2次,并且重悬浮于小体积的PBS中。使细菌悬浮液于72℃温育30分钟。作为关于成功的对照,将灭活细菌接种中合适的培养基中,如实施例4中所述。

[0997] 6.3 冷冻干燥

[0998] 将用于冷冻干燥的部分加入等体积的24%无菌过滤的蔗糖中,并且以300 μl部分等分到2ml Lid_{Bac}管内。使这些等分试样在液氮中速冻1小时,并且在将它们放到预冷却至-80℃的支架上后进行冷冻干燥(α 2-4, Christ, Osterode, 德国)。冷冻干燥后,将管的盖关上,并且使用Anaerocult[®] C微型气体发生器系统(Merck, Darmstadt, 德国)使它们贮存于4℃,其中添加硅胶橙(Roth, Karlsruhe, 德国)作为干燥剂。

[0999] 6.4 细菌制剂的计数

[1000] 固定且冷冻干燥的细菌制剂的总细胞数目用 0.01mm 深度 Thoma-室 (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, 德国) 进行测定。对于冷冻干燥的细菌, 菌落形成单位 (CFU) 通过在冷冻干燥前和后, 立即将 10 倍系列稀释物铺平板在过夜培养物的 WC 琼脂上进行测定。为此, 使冷冻干燥物溶于 300 μ l WC 肉汤中, 静置 15 分钟, 通过低速旋转进行重悬浮并且进行连续稀释。冷冻干燥制剂的 CFU 在动物实验中使用前和后进行计数以确保活力。制剂的纯度如部分 4 中所述进行检查。

[1001] 实施例 7 血清样品

[1002] 血液用 S-monvette 系统 (Sarstedt, Nümbrecht, 德国) 进行收集, 并且血清根据制造商的说明书进行制备。血清样品在分析前以等分试样贮存于 -80°C 。

[1003] 实施例 8 粪便 IgA 提取

[1004] 收集粪便样品, 贮存于 -80°C 。粪便进行冷冻干燥并且记录净干重。所有操作都在冰上进行。粪便 IgA 根据 Grewal (6) 进行提取, 伴随某些修改。将冷冻干燥的样品 ($\sim 30\text{mg}$) 以 15 μ l/mg 干重的比悬浮于 IgA 提取缓冲液 (含 1g l^{-1} BSA 的 PBS-Dulbecco (Biochrom, Berlin, 德国)) 中, 所述 IgA 提取缓冲液具有蛋白酶抑制剂 (5 μ g ml^{-1} 亮抑酶肽 (Calbiochem, Merck)、48 μ g ml^{-1} 4-(2-氨基乙基) 苯磺酰氯化物 (Merck)、1 μ g ml^{-1} 抑肽酶、2 μ g ml^{-1} 抑氨肽酶 (Sigma, Steinheim, 德国), 并且进行均质化。样品通过每 10 分钟旋转进行混合。在 1 小时温育期后, 使样品离心 (16000xg, 10 分钟, 4°C), 并且将上清液收集在新管中。其余团块以 10 μ l/mg 干重的比悬浮于 IgA 提取缓冲液, 并且进行均质化。重复提取操作, 并且使所得到的上清液与来自第一个提取步骤的上清液合并。使这些上清液离心 (16000xg, 10 分钟, 4°C), 并且将所得到的上清液分配到新管内, 在液氮中速冻, 并且贮存于 -80°C 直至分析。

[1005] 实施例 9 细菌菌株通过酶联免疫吸附测定法的筛选

[1006] 使固定的细菌在 PBS 中稀释, 将细胞数目调整至 1×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 细胞/ml。

[1007] 使 50 μ l 细菌溶液于 37°C 包被 96 孔微量滴定板的每个孔过夜。平板用 PBS/0.02% Tween 20 洗涤 3 次 (相同的洗涤步骤在每个温育步骤后进行)。用 PBS/2% BSA 阻断平板后, ELISA 平板与杂交瘤培养上清液进行温育, 所述杂交瘤培养上清液包含以不同稀释度的不同核心 -1 识别单克隆抗体 (Nemod-TF1、Nemod-TF2 或特异性较少的 A68/BA11) 或对照抗体 (A63-B/C2)。作为二抗使用过氧化物酶缀合的多克隆山羊抗小鼠免疫球蛋白 (Dako P0260)。测定法用 TMB 作为底物进行显色, 并且反应通过添加 2.5N H_2SO_4 得到终止, 并且消光在 450/630nm 处进行测量。对于抗体结合的高碘酸盐敏感性的测定, 在与抗体一起温育前, 使包被的 ELISA 平板与高碘酸钠一起进行温育。因此, 平板用乙酸钠缓冲液 (50mM, pH 4, 5) 洗涤 5 分钟, 并且其后与在乙酸钠缓冲液中的 10mM 高碘酸在黑暗中温育 1 小时。平板用乙酸钠缓冲液进行洗涤 (5 分钟), 并且反应通过添加在 PBS 中的 50mM 硼氢化钠得到终止 (30 分钟)。

[1008] 此种 ELISA 结果的例子显示于图 3 和 3a 中。

[1009] 实施例 10: 细菌的包含核心 -1 的组分的制备

[1010] 10.1. 粗荚膜制剂经由 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析的分析

[1011] 菌株 AG6 的粗荚膜制备根据 Pantosti 等人 (1991, *Infect. Immun.* 59, 2075–2082) 进行。

[1012] 荚膜制剂通过 SDS-PAGE 进行分析, 并且制剂中的多糖通过阿辛蓝染色依据 Karlyshev 等人 (2001, *J. Clin. Microbiol.* 39, 279–284) 进行检测, 显示了各种包含碳水化合物化合物的条带, 以及在制剂内高百分比的高分子量碳水化合物 (图 4A)。在蛋白质印迹后, 多糖通过 DIG-Glycan Detection Kit (LaRoche Diagnostics) 进行检测。显示了在 37 和 26kDa 处的强条带 (图 4B)。包含核心 -1 的多糖在蛋白质印迹上的检测使用核心 -1 特异性抗体 NEMOD-TF2 (培养上清液) 来进行, 显示了在 37kDa 处的核心 -1 阳性条带 (图 4C)。

[1013] 10.2. 核心 -1 阳性多糖的层析富集

[1014] 在菌株 AG6 的荚膜制剂内, 还存在脂多糖的污染物, 如依据 Hara 等人 1989, *Anal. Biochem.* 179, 162–166) 通过 11, 2pmol/ μ g 的 KDO 含量测量和通过 SDS-PAGE 显示的。

[1015] 因此荚膜多糖和脂多糖根据 Hashimoto 等人 (2001, *Eur. J. Biochem.* 268, 3139–3144) 通过反相层析在 C18 柱上使用丙醇 / 甲醇 - 梯度进行分离 (参见图 5)。多糖通过洗脱剂 B (在 0.1M 乙酸铵 pH 4.5 中的 72% 丙醇 / 8% 甲醇) 的梯度进行洗脱。在部分内的多糖的检测通过斑点印迹和 DIG-Glycan-Kit 来进行。核心 -1 的检测使用核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF1 和 Nemod-TF2 来进行。多糖在 14–19% 和 25–43% 的丙醇浓度下进行洗脱。核心 -1 特异性碳水化合物仅在 29–29.4% 丙醇 (RP1) 和 39–42% 丙醇 (RP2) 下检测出, 参见图 5, 显示了核心 -1 阳性多糖经由这种方法的强富集。

[1016] 核心 -1 阳性部分用于通过弱酸水解的另外层析分离, 随后根据 Tzianabos 等人 (1992, *J. Biol. Chem.* 267, 18230–18235) 使用 0–0.5M NaCl 梯度进行 DEAE- 层析。通过这种方法, 核心 -1 阳性多糖分成在 0M NaCl (D1)、0.04M NaCl (D2) 和 0.9–0.17M NaCl (D3) 处洗脱的 3 个部分, 导致核心 -1 阳性多糖的进一步富集。

[1017] 在根据本发明的过程中, 卵形拟杆菌 AG6 的荚膜多糖进行纯化, 并且结构通过质谱法进行分析。优选地, 卵形拟杆菌 AG6 的荚膜多糖通过酚水萃取法, 随后为醚萃取法进行积聚, 如已由 Pantosti 等人 1991 描述的。其后, 核心 -1 阳性多糖通过反相层析 (C18 Synergi 4 μ Fusion-RP 80i, 250mmx10mm, Phenomenex) 从粗荚膜制剂 (CPS) 中积聚。粗荚膜多糖提取物和纯化的核心 -1 阳性多糖的单糖含量通过 HPAEC-PAD 分析 (高 pH 阴离子交换层析, 脉冲电流检测) 进行测定。最后核心 -1 阳性荚膜多糖的结构通过质谱法进行分析。

[1018] 10.3 卵形拟杆菌 AG6 的粗荚膜制剂提取物和纯化的荚膜提取物的单糖分析

[1019] 在第一个步骤中, 卵形拟杆菌 AG6 的粗荚膜制剂的核心 -1 阳性多糖通过反相层析进行积聚, 如先前已描述的。其后, 积聚的核心 -1 阳性多糖的纯化得率以及单糖含量通过 HPAEC-PAD 分析进行测定。

[1020] 在单糖分析发生前, 多糖提取物通过 2N 三氟乙酸 (TFA) 于 100°C 完全水解 4 小时。在 TFA 水解期间, 乙酰基丧失。因此单糖葡萄糖胺和半乳糖胺 (GlcNH₂ 和 GalNH₂) 无法与 N- 乙酰葡萄糖胺和 N- 乙酰半乳糖胺 (GlcNAc 和 GalNAc) 区分开。单糖通过高 pH 阴离子交换层析进行分离, 并且通过脉冲电流法进行检测, 如先前已描述的。为了鉴定单糖和测定其浓度, 使用外部和内部单糖标准。

[1021] 测定用于 LPS 和 CPS 比较 (先前提及) 的粗 CPS 提取物的比例单糖含量, 明显不

同于测定用于这种比较的粗 CPS 提取物的比例单糖含量。2 种粗 CPS 提取物由卵形拟杆菌 AG6 的不同培养物进行制备,这可以是所提及的单糖含量变化的解释。

[1022] 通过反相层析积聚的核心 -1 阳性多糖的得率为 30%。粗和纯化的荚膜提取物的比例单糖含量的比较揭示增加量的岩藻糖、GalNH₂/GalNAc、半乳糖和葡萄糖,而葡萄糖可能是污染物(表 7)。鼠李糖、GlcNH₂/GlcNAc 和甘露糖的比例含量可以通过反相层析得到减少(表 7)。其为荚膜多糖特征组分的半乳糖醛酸和葡糖醛酸无法在纯化的核心 -1 阳性多糖提取物中进行鉴定。这些可能指出卵形拟杆菌 AG6 具有超过一种荚膜多糖。2 种荚膜多糖可以通过反相层析彼此分开。Tzianabos 等人(1992)也描述脆弱拟杆菌的荚膜由 2 种不同的多糖组成。

[1023] 表 7:粗荚膜多糖提取物(CPS)和通过反相层析纯化的核心 -1 阳性多糖提取物的单糖分析。比例单糖含量与单糖总量相关。

[1024]

单糖	粗 CPS- 提取物 (%)	纯化的 CPS- 提取物 (%)
岩藻糖	9, 5	11, 4
鼠李糖	17, 7	3, 1
GalNH ₂ /GalNAc	5, 2	14, 9
GlcNH ₂ /GlcNAc	14	3, 5
Galaktose	4, 6	6, 9
葡萄糖	44, 2	50
甘露糖	18, 2	6, 9
半乳糖醛酸	10	0
葡糖醛酸	0, 5	0
n. d.	3	2

[1025] 岩藻糖、GalNH₂/GalNAc 和半乳糖的积聚可以是这些单糖是核心 -1 阳性多糖的重复单元的组分的指示,。而强还原的单糖可以是低污染物。

[1026] 10.4 核心 -1 阳性多糖经由质谱法的结构分析

[1027] 核心 -1 阳性多糖的结构通过如先前已描述的基质辅助激光解吸飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS) 进行分析以及通过电喷射离子阱质谱法(ESI- 离子阱-MS) 进行分析。

[1028] 对于 ESI-Ion-Trap 质谱法,积聚的核心 -1 阳性多糖通过用 1%酸性酸水解(1.5 小时,于 100℃) 或者用软骨素酶 ABC(β 1-4GalNAc/GlcNAc 键的切割) 或 β 1-3 半乳糖苷酶的酶促消化成为碎片。此外,发生通过用软骨素酶 ABC/α 1-3,4 岩藻糖苷酶或 1%酸性酸/β 1-3 半乳糖苷酶(所有酶从 Glyko GmbH 获得)的双重消化的断裂。所有酶促消化于 37℃温育过夜。质谱法分析(MS 以及 MS/MS) 以阳性和阴性模式来进行。在分析发生前,所有样品通过 Carbohydrate SPE (Alltech Associates Inc.) 如制造商手册描述进行除盐,并且在 2, 5mM NH₃/40%乙腈中进行稀释。

[1029] 已通过 MALDI-MS 分析鉴定的核心 -1 阳性聚糖片段的结构可以通过 ESI- 离子阱测定加以验证。另外的片段也可以通过 ESI- 离子阱质谱法进行鉴定(表 8)。

[1030] 表 8:通过 ESI- 离子阱质谱法(阳性模式)的结构分析。纯化的核心 -1 阳性多糖通过用 1%酸性酸于 100℃水解 1.5 小时成为碎片。

[1031]

MS		MS/MS	
测定的质量 ($M+H^+$ / $M+NH_4^+$)	鉴定的序列	测定的质量 ($M+Na^+$)	鉴定的序列
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-desHex-desHexM-HexNAc	493	DesHex-desHex-desHexM
633/650	Hex-desHex-desHex-desHexM		

[1032] HexNAc :N- 乙酰己糖胺, Hex :己糖, desHex :脱氧己糖, M :甲基

[1033] 核心 -1 阳性荚膜多糖的重复单元的序列通过使片段重叠进行测定 (图 6)。

[1034] 酶促消化的核心 -1 阳性多糖的质谱法分析给出在单糖之间的糖苷键的指示。此外,可以鉴定半乳糖 (经由 β 1-3 半乳糖苷酶的成功切割) 和岩藻糖 (经由 α 1-3,4 岩藻糖苷酶的成功切割) (图 7)。

[1035] 这个结果与前文提及的单糖分析一致,其揭示岩藻糖、半乳糖和 GalNAc 的积聚。

[1036] 10.5 核心 -1 结构作为荚膜多糖的重复单元的支链二糖的验证

[1037] 在重复单元中的支链核心 -1 结构 Gal β 1-3GalNAc 应通过用糖苷外切酶 β 1-3 半乳糖苷酶和 HexNAcase (β 1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc 切割) 的双重消化,随后为如上所述的单糖分析进行鉴定。

[1038] 包含等量核心 -1 阳性多糖的 2 种样品进行过滤,以从游离单糖中纯化它们。其后 2 种样品之一用 β 1-3 半乳糖苷酶于 37°C 消化过夜。2 种样品再过滤一次,以使游离半乳糖与消化的样品分开,而未消化的样品用作阴性对照。然后,收集渗余物并用进行 HexNAcase 消化。最后 2 种样品再次进行过滤。所有洗脱物通过 HPAEC-PAD 进行分析。

[1039] 为了对照,如果核心 -1 结构通过双重消化得到去除但未被 HexNAcase 消化的影响 (阴性对照),渗余物通过斑点印迹进行分析,使用 DIG-Glykan Detection Kit (Roche Diagnostics) 以检测多糖和核心 -1 特异性抗体 Nemod-TF1 以鉴定核心 -1 结构。

[1040] 在双重消化的样品的 2 种洗脱物中,半乳糖 (第一种洗脱物) 和 GalNAc (第二种洗脱物) 可以通过单糖分析进行鉴定。然而,在仅用糖苷外切酶 HexNAcase 消化的阴性对照的洗脱物中,无法鉴定出半乳糖和 GalNAc。这是关于支链核心 -1 结构 Gal β 1-3GalNAc 的强指示。

[1041] 双重消化的渗余物和 HexNAcase 消化的样品使用 DIG-Glykan 检测 Kit 的斑点印迹分析揭示相似的多糖浓度,将这应用于硝酸纤维素膜上。核心 -1 结构无法再在双重

消化的样品中检测出,而在 HexNAcase 消化的样品中,核心 -1 结构仍可通过免疫印迹使用 Nemod-TF1 抗体进行鉴定。

[1042] 10.6 核心 -1 阳性多糖结构通过分析其分离片段的验证

[1043] 对于核心 -1 阳性多糖结构的进一步验证,聚糖通过用 1% 酸性酸水解 (1.5 小时, 100℃) 成为碎片。聚糖片段通过荧光团 2- 氨基苯甲酰胺 (2-AB) 进行标记,如已由 J. C. Bigge 等人 (1995) 描述的。对于这个操作,样品通过在 Carboglyph SPE 柱 (Alltech Associates Inc.) 上纯化使得成为无颗粒和无盐的,并且进行冷冻干燥。使团块溶解于在 DMSO/ 冰乙酸 / 氰基硼氢化钠中的 5 μ l 2-AB 中,并且于 60℃ 温育 2 小时。2-AB 标记的片段通过纸层析与游离 2-AB 分开。最后 2-AB 缀合的片段通过水进行洗脱。在冷冻干燥后,使团块溶解于 50% 乙腈中。基于其大小,片段通过正相 HPLC (柱:Luna 3 μ NH₂ A100, Phenomenex, 洗脱剂 A:15mM NH₄- 乙酸盐,洗脱剂 B:乙腈) 与荧光检测进行分离。片段的序列通过 ESI 质谱法进行分析。最后,为了验证糖苷键和更好的鉴定为片段组分的单糖,寡糖用糖苷外切酶 β 1-3 半乳糖苷酶、 α 1-3,4 岩藻糖苷酶和 HexNAcase 进行消化,如先前已描述的。消化的成功通过 ESI 质谱法加以控制,并且末端单糖的去除通过 HPAEC-PAD 进行鉴定,如先前已描述的。

[1044] 已鉴定的核心 -1 阳性多糖的重复单元的结构通过 2 种分析加以证实,得到预期的寡糖片段和切割的单糖 (表 9)。

[1045] 表 9:

[1046]

寡糖的片段	糖苷外切酶	ESI-MS 分析	单糖分析
HexNAc-Hex	β 1-3 半乳糖 苷酶	HexNAc Hex HexNAc-Hex	GalNAc/GalN H ₂ 半乳糖
DesHex-desHex-desHexM	α 1-3,4 岩藻糖 苷酶	desHexM DesHex-desHexM DesHex-desHex	岩藻糖
DesHex-desHex	α 1-3,4 岩藻糖 苷酶	desHex	岩藻糖
DesHex-desHexM-HexNAcM-Hex NAc	HexNAcase (α 1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc)	HexNAc DesHex-desHexM-HexN Ac	n. d

[1047] 总之,核心 -1 阳性荚膜多糖的重复单元的结构 (图 8) 通过各种分析加以证实。

[1048] 此外,结果揭示 (还请参见图 19,特别是 #5)Gal-GalNAc 和主链 GalNAc 分子之间的糖苷键是 α - 异头物的。这个发现得到斑点印迹分析的支持,所述斑点印迹分析使用对于 TF 的 α 异头物特异的 mAbsTF1、TF2 和 HH8。还使用对于 TF β 特异的 mAbs A68-E/A2 和 A68-E/E3。由此,肿瘤特异性的 Ag TF α 在卵形拟杆菌 AG6 的荚膜多糖的支链结构内进行鉴定。

[1049] 实施例 11 动物模型

[1050] 11.1 小鼠用死细菌的腹膜内免疫接种

[1051] 11.1 小鼠血清经由体液免疫应答测试 1 的分析

[1052] 雌性 Balb/c 小鼠 (Charles River, 4 只 / 组) 在第 -1 天用环磷酰胺以 50mg/kg 体重的剂量进行处理。在第 0、7 和 14 天时,小鼠用在 PBS 中的 5×10^8 细菌 (核心 -1 阴性菌株 AG3 (组 I)、32 或 53 或核心 -1 阳性菌株 AG6 (组 K)) 或用单独的 PBS (组 L) 进行腹膜内注射。血清样品在第 -4、21、27 和 30 天时获取。

[1053] 小鼠血清在 ELISA 中就和核心 -1 的结合进行分析。作为核心 -1 携带抗原使用无唾液酸血型糖蛋白。作为阴性对照,使用经高碘酸盐处理的无唾液酸血型糖蛋白。高碘酸盐处理破坏核心 -1 的外部碳水化合物环,从而破坏核心 -1 表位。

[1054] 96 孔平底微量滴定板用无唾液酸血型糖蛋白 A (AGP) 以 2 μ g/ml 的浓度进行包被。

平板用 PBS/Tween 洗涤 3 次。

[1055] 一半平板用高碘酸盐如下进行处理：

[1056] 使孔与 50mM 乙酸钠缓冲液 pH 4.5 温育 5 分钟，随后与在乙酸盐缓冲液中的 10mM 高碘酸在黑暗中温育 1 小时。孔与 50mM 乙酸钠缓冲液 pH 4.5 温育 5 分钟。反应通过与硼氢化钠（在 PBS 中 50mM, 30 分钟）温育得到终止。接下来，平板用 PBS/Tween 洗涤 5 次。

[1057] 随后平板通过添加 2% BSA 阻断 30 分钟。

[1058] 与小鼠血清的不同稀释物的温育进行 1.5 小时。结合的小鼠免疫球蛋白用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠 IgM 抗体（在 PBS/1% BSA 中 1 : 5000）进行检测。测定法用 TMB 作为底物进行显色，并且反应通过添加 2.5N H₂SO₄ 得到终止。

[1059] 图 9 显示血清 IgM- 抗体与核心 -1 阳性 AGP 和核心 -1 阴性 AGP (AGP+PJ) 的结合。仅用核心 -1 阳性细菌（组 K）免疫接种的 4 只小鼠中的 3 只的血清显示与 AGP 的强结合，而信号在用 PJ 切割核心 -1 后减少。

[1060] 因此，核心 -1 阳性细菌能够在小鼠中诱导针对核心 -1 的体液免疫。

[1061] 11.1.2 小鼠血清经由体液免疫应答测试 2 的分析

[1062] 雄性 C3H 小鼠 (Charles River, 4 只 / 组) 在第 0、7 和 14 天时在 200 μ l PBS 中的来自核心 -1 阳性和核心 -1 阴性菌株的 5x10⁸ 巴氏灭菌的细菌进行腹膜内免疫接种。在免疫接种前以及在第 13、21 和 28 天时收集血清，并且在体液免疫应答测试 2 中进行分析。

[1063] 96 孔平底微量滴定板用在包被缓冲液 (8, 4g/l NaHCO₃, 3, 56g/l Na₂CO₃, pH = 9, 49) 中以 5 μ g/ml 的不同碳水化合物 -PAA 缀合物 (GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA、Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA、GalNAc α 1-3Gal β -PAA、Gal α 1-3-GalNAc β -PAA、Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA) 进行包被，并且于 4℃ 温育过夜。

[1064] 平板用 PBS/Tween 洗涤 3 次。

[1065] 随后平板通过添加 2% BSA 阻断 30 分钟。

[1066] 与小鼠血清的不同稀释物的温育进行 1.5 小时。结合的小鼠免疫球蛋白用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠 IgM 抗体（在 PBS/1% BSA 中 1 : 5000）进行检测。测定法用 TMB 作为底物进行显色，并且反应通过添加 2.5N H₂SO₄ 得到终止。

[1067] 图 10 显示在第 0 天（免疫前血清）和第 21 天时对于来自 4 只小鼠 / 组的血清，相对于针对 GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA 的 ELISA 信号，针对 PAA 缀合物 Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号的平均值 [相对 ELISA 信号依照下式进行计算：(针对 Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA 的 ELISA 信号) * 100 / (针对 GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA 的 ELISA 信号)]。如果与免疫前血清比较，免疫血清显示至少 50% 的增加，那么血清计算为阳性的。可以显示仅核心 -1 阳性菌株 AG6 和 MU1 在小鼠中诱导核心 -1 特异性体液免疫应答。

[1068] 11.1.3 小鼠血清经由体液免疫应答测试 3 的分析

[1069] 雌性 Balb/c 小鼠 (Charles River, 4 只 / 组) 在第 -1 天时用环磷酰胺 50mg/kg 体重的剂量进行处理。在第 0、7 和 14 天时，小鼠用在 PBS 中的 5x10⁸ 细菌（核心 -1 阴性菌株 AG3 (组 I)、32 或 53 或核心 -1 阳性菌株 AG6 (组 K)）或用单独的 PBS (组 L) 进行腹膜内注射。血清样品在第 -4、21、27 和 30 天时获取。

[1070] 执行流式细胞术分析，以便分析小鼠血清与核心 -1 阳性和核心 -1 阴性人肿瘤

细胞系（分别为 NM-wt 和 NM-D4；NM-wt 是 NM-D4 的亲本细胞，如 WO2005/017130 A2 和 EP1654353 中描述的，NM-D4 在 DSMACC2605 下保藏于 DSMZ）的结合。使 3×10^5 细胞 / 试管形成团块，并且将团块重悬浮于 $50 \mu\text{l}$ 鼠类血清（在 PBS/10% FCS 中 1 : 50 稀释）、对照抗体或单独的 PBS/10% FCS 中。样品于 4°C 温育 20 分钟，用 PBS 进行洗涤并且进行离心。接下来，细胞与 Cy3- 缀合的山羊抗小鼠 IgM 抗体（Jackson Immuno Research，在 PBS/10% FCS 中 1 : 200）于 4°C 温育 20 分钟，用 PBS 进行洗涤并且重悬浮于 $200 \mu\text{l}$ PBS 中用于流式细胞术分析。

[1071] 图 11a 和 b 显示来自小鼠血清的 IgM 抗体与人细胞系 NM-wt（核心 -1 阴性）和 NM-D4（核心 -1 阳性）的结合。尽管与核心 -1 阴性 NM-wt 系的结合在用核心 -1 阴性细菌（组 I）和核心 -1 阳性细菌（组 K）免疫接种的小鼠之间是可比较的，但存在来自组 K 的 4 只小鼠中的 3 只与核心 -1 阳性 NM-D4 系明显更强的结合。这是在用核心 -1 阳性细菌免疫接种的小鼠中体液免疫应答的核心 -1 特异性的指示。

[1072] 11. 1. 4 小鼠血清经由体液免疫应答测试 1、2 和 3 的分析

[1073] C3H 小鼠（Charles River，4 只 / 组）在第 0、7 和 14 天时在 $200 \mu\text{l}$ PBS 中的来自核心 -1 阳性卵形拟杆菌菌株卵形拟杆菌 MU-1、A68-BA11- 阳性大肠杆菌菌株 LH2 和核心 -1 阴性大肠杆菌菌株（AG3，大肠杆菌 086 DSMZ 8697 = 32）的 1×10^9 巴氏灭菌的细菌进行腹膜内免疫接种。在免疫接种前以及在第 13、21 和 28 天时收集血清，并且如前所述在体液免疫应答测试 1、2 和 3 中进行分析。

[1074] 尽管菌株 AG3 对于所有体液免疫应答测试都是阴性的，但从用菌株大肠杆菌 086 和 LH2 免疫接种后的小鼠中收集的血清在 HIRT 1 中显示 AGP 反应抗体。然而，仅核心 -1 阳性菌株 MU-1 显示在 PAA 缀合物（HIRT2）和人肿瘤细胞（HIRT3）上针对核心 -1 的强抗核心 -1 特异性体液免疫应答，除在 HIRT 中 AGP 特异性抗体的诱导外。

[1075] 因此，可以仅用卵形拟杆菌的核心 -1 阳性微生物（MU-1）诱导强核心 -1 特异性体液免疫应答。

[1076] 图 11c-e 显示结果。

[1077] 11. 2. 无菌小鼠用活的核心 -1 阳性细菌的口部免疫接种

[1078] 在第 2、3、4、9、10、11、16、17 和 18 天时，无菌 C3H 小鼠用菌株 AG6 的 2×10^9 活细菌进行口部免疫接种。血清样品在第 0 天（免疫前血清）以及在第 14 和 21 天时获取，并且在体液免疫应答测试 1 中就 AGP 特异性 IgM 抗体进行分析。

[1079] 与对照小鼠比较，免疫接种的小鼠显示增加的抗核心 -1 滴度，如通过小鼠血清与 AGP 包被的微量滴定板的结合显示的。结合的小鼠 IgM 的检测用过氧化物酶缀合的抗小鼠 -IgM 抗体来进行。关于核心 -1 的信号的特异性通过用高碘酸处理（破坏碳水化合物结构）后 ELISA 信号的减少来显示。在 14 或 21 天后，3 只小鼠中的 3 只具有针对核心 -1 升高的 IgM 抗体水平，而与 AGP+PJ 比较，对照小鼠未显示关于 AGP 的 ELISA 信号的增加，如图 12 中所示的。

[1080] 11. 3 常规小鼠用巴氏灭菌的和活的核心 -1 阳性细菌的口部免疫接种

[1081] C3H- 小鼠在第 0-28 天时每天用菌株 AG6 的 1×10^{11} （组 A）或 1×10^{10} （组 B）巴氏灭菌的细菌进行口部免疫接种。在第 -1 天（免疫前血清）以及在第 13、21、28 和 35 天时获取血清样品，并且在体液免疫应答测试 1 中就 AGP- 特异性 IgM 抗体进行分析。

[1082] 在免疫接种后从小鼠中收集的血清显示增加的抗核心 -1 滴度,如通过小鼠血清与用 GP 或 AGP(含或不含有高碘酸的处理) 包被的微量 滴定板的结合显示的。结合的小鼠 IgM 的检测用过氧化物酶缀合的抗小鼠 IgM 抗体来进行。信号对于核心 -1 的特异性通过用高碘酸处理 (破坏碳水化合物结构) 后 ELISA 信号的减少至少 30%, 并且通过针对 GP 较少的信号 (AGP 信号增加至少 50%) 来显示。

[1083] 显示来自组 A 的 6 只小鼠中的 5 只和来自组 B 的 8 只小鼠中的 5 只到第 21 天时已发展出核心 -1 特异性抗体 (图 13)。

[1084] 在体液免疫应答测试 3 中, 小鼠血清通过流式细胞术就与核心 -1 阳性肿瘤细胞系 NM-D4 的结合进行分析, 与核心 -1 阴性细胞系 NM-wt 比较。使 3×10^5 细胞 / 试管形成团块, 并且将团块重悬浮于 $50 \mu\text{l}$ 鼠类血清 (在 PBS/1% BSA 中 1 : 300 稀释)、对照抗体或单独的 PBS/1% BSA 中。样品于 4°C 温育 60 分钟, 用 PBS 进行洗涤并且进行离心。接下来, 细胞与生物素 - 缀合的山羊抗小鼠 IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch, 在 PBS/1% BSA 中 1 : 200) 于 4°C 温育 60 分钟, 用 PBS 进行洗涤。随后细胞与 Cy3- 缀合的链霉亲和素 (Jackson ImmunoResearch, 在 PBS/1% BSA 中 1 : 200) 于 4°C 温育 60 分钟, 并且重悬浮于 $200 \mu\text{l}$ PBS 中用于流式细胞术分析。

[1085] 结果依照下述进行计算:

[1086]
$$\left(\text{关于 NM-D4}_{\text{免疫血清}} \text{ 的阳性细胞 \%} - \text{关于 NM-D4}_{\text{免疫前血清}} \text{ 的阳性细胞 \%} \right) / \left(\text{关于 NM-wt}_{\text{免疫血清}} \text{ 的阳性细胞 \%} - \text{关于 NM-wt}_{\text{免疫前血清}} \text{ 的阳性细胞 \%} \right) = X$$

[1087] 具有商 $X \geq 10$ 的小鼠血清视为阳性的 (其中关于 NM-wt_{免疫血清} 的阳性细胞 % - 关于 NM-wt_{免疫前血清} 的阳性细胞 % ≥ 1)。

[1088] 在第 28 天时, 13 只小鼠中的 11 只已发展出针对核心 -1 阳性人肿瘤细胞系 NM-D4 的体液免疫应答, 如图 14 中所示。

[1089] 在体液免疫应答测试 2 中, 来自第 28 天的小鼠血清就与 Gal β 1-3GalNAc a-PAA(PAA 48) 或 Gal β 1-3 GlcNAc a-PAA(PAA 43) 的结合进行分析。

[1090] 96 孔平底微量滴定板用在包被缓冲液 (8, 4g/l NaHCO_3 , 3, 56g/l Na_2CO_3 , pH = 9, 49) 中以 $5 \mu\text{g/ml}$ 的 Gal β 1-3GalNAc a-PAA(PAA 48) 或 Gal β 1-3 GlcNAc a-PAA(PAA 43) 进行包被, 并且于 4°C 温育过夜。阻断后, 与血清的温育进行 1.5 小时。结合的小鼠免疫球蛋白用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠 IgM 抗体 (在 PBS/1% BSA 中 1 : 5000) 进行检测。测定法用 TMB 作为底物进行显色, 并且反应通过添加 2.5N H_2SO_4 得到终止。

[1091] 结果显示于图 21 中。显示 13 中小鼠中的 5 只到第 28 天时已发展出核心 -1 特异性抗体。

[1092] 实施例 12 核心 -1 阳性细菌用于诱导细胞免疫应答 (在体外) 的能力

[1093] 12.1 功能性树突状细胞的产生

[1094] 树突状细胞系 NemodDC (pNM-DC) 已用作关于抗原呈递细胞 (APC) 的来源。pNM-DCs 分化成 iNM-DC, 随后装载有下述细菌菌株的细菌裂解物 (BaLy): AG6、MU1、52 和 53。 $50 \mu\text{g/ml}$ 的每种 BaLy 连同成熟细胞因子一起加入培养基中, 并且使 iNM-DC 分化至其成熟状态 (mNM-DC)。

[1095] 更详细地, 在第一个步骤中, pNM-DC ($1 \times 10^5/\text{ml}$) 通过在 NemodDC 培养基 (70% MEM- α 、20% FCS、10% CM5637) 中温育 7 天分化成 iNM-DC, 伴随 1000U/ml GM-CSF、100U/ml

IL-4 和 2, 5ng/ml TNF- α 的添加。接下来, 1×10^6 /ml 未成熟 NM-DC (iNM-DC) 装载有细菌裂解物 (50 μ g/ml)、肿瘤细胞裂解物 (1×10^6 裂解的肿瘤细胞用于装载在 1×10^6 NM-DC 上) 或 AGP 和 GP 蛋白质 (20 μ g/ml), 并且通过添加 75ng/ml TNF- α 成熟 2 天。

[1096] mNM-DC 的成熟表型对于成功的 T 细胞活化是非常重要的, 并且借助于流式细胞术就下述的表达进行测试: CD1a、CD11c、CD14、CD40、CD35、CD80、CD83、CD86、CD116、HLA-ABC 和 HLA-DR。仅具有对应于成熟 DCs 表型的表型的那些 DC 用于 T 细胞活化。

[1097] 12.2 针对核心 -1 的活化 T 细胞的产生以及使用 ELISA 检测 GM-CSF (细胞免疫应答测试 1) 和 TNF- α (细胞免疫应答测试 2) 的生产

[1098] 在用装载有核心 -1 阳性细菌裂解物的 NM-DC 引发 T 淋巴细胞 7-10 天后, 所得到的 T 细胞 ($0.7-1 \times 10^6$ /ml) 用装载有核心 -1 阳性肿瘤细胞裂解物 (50 μ g/ml) 的 mNM-DC (1×10^5 /ml) 进行再刺激。温育 48 小时后, 收获上清液, 并且使用 GM-CSF- 和 TNF- α -BD OptEIA™ Kits 进行测定, 用于评估响应人核心 -1 阳性肿瘤细胞系 NM-D4 的细胞因子生产。

[1099] 96 孔平板用在包被缓冲液中 1 : 250 稀释的 50 μ l 合适的捕获抗人 (GM-CSF 或 TNF- α) 抗体进行预包被。在洗涤和阻断步骤后, 将 100 μ l 上清液或标准加入微孔中, 并且在室温下温育 2 小时。对于标准曲线, 使用以浓度 0 ; 7, 8 ; 15, 6 ; 31, 2 ; 62, 5 ; 125 ; 250pg/ml 的重组人 GM-CSF 和以浓度 0 ; 4, 7 ; 9, 4 ; 18, 8 ; 37, 5 ; 75 ; 150 ; 300pg/ml 的重组人 TNF- α 。在洗涤后, 加入 100 μ l 制备的工作检测 (Working Detector) 溶液, 并且使平板在室温下温育 1 小时。在接下来的步骤中, 加入 100 μ l TMB 单步底物试剂 (One-Step Substrate Reagent)/ 孔。最后温育 30 分钟和添加 50 μ l 终止溶液 (Stop Solution) 后, 消光在 450nm 处进行阅读。

[1100] 在图 15A 和 B 中证实的结果显示清楚证据: 通过肿瘤抑制细胞因子例如 TNF- α 和 GM-CSF 的产生, 对于核心 -1 阳性细菌裂解物产生的 T 细胞能够识别来自人细胞系 NM-D4 的装载有核心 -1 阳性细胞裂解物的 DC。相比之下, 极低水平的细胞因子响应核心 -1 阴性细胞裂解物得到释放。此外, 这种识别通过裂解物装载的 NM-DC 与核心 -1 特异性抗体的预温育得到特异性抑制。

[1101] 12.3 用于评估经由针对核心 -1 的活化 T 淋巴细胞的 IFN- γ 分泌的 ELISPOT 测定法 (细胞免疫应答测试 2)

[1102] ELISpot 测定法用于评估响应抗原特异性刺激的 IFN- γ 分泌。这种测定法允许以抗原特异性方式定量预致敏的 T 细胞识别核心 1 抗原的功能能力。

[1103] T 淋巴细胞首先通过与装载有细菌裂解物的 DC 共培养在体外进行活化。在引发 7-10 天后, 收获活化 T 细胞, 并且用装载有核心 -1 阳性 (NM-D4) 和核心 -1 阴性 (NM-wt) 人肿瘤细胞裂解物的 DC 再次攻击 (以 T 细胞与 DC 10 : 1 的比)。

[1104] ELISpot 平板的孔用小鼠抗人 IFN- γ 抗体 (Mabtech-Kit) 进行预包被, 所述抗体与 ELISpot 平板的硝化纤维素基结合。将再次攻击的 T 细胞转移到孔内, 并且细胞因子在温育期间得到释放。在每个 T 细胞周围局部释放的 IFN- γ 与特异性抗体结合, 并且因此由特异性抗体 ‘捕获’。在温育 24 小时后, 去除细胞。将第二种抗人 IFN- γ 抗体以浓度 1 μ g/ml 加入孔内; 这种生物素化的抗体与酶偶联, 所述酶能够将底物转变成不溶性有色产物。平板再洗涤 1 次, 并且加入以 1 μ g/ml 的浓度与酶-AP 缀合的链霉亲和素。最后, 加入沉淀底物

BCIP+NBT,并且平板温育直至斑点在响应的 T 细胞的侧上出现。有色斑点使用数字成像系统进行计数和分析。

[1105] 结果显示通过肿瘤抑制细胞因子 IFN- γ 的产生,对于核心-1 阳性细菌裂解物 (AG6 和 MU1) 产生的 T 细胞能够识别来自人细胞系 NM-D4 的装载有核心-1 阳性细胞裂解物的 DC (图 16)。极低水平的细胞因子响应核心-1 阴性细胞裂解物 (R+DC/wt) 得到释放。此外,核心-1 阳性细胞裂解物 (R+DC/D4) 的识别的特异性通过用核心-1 特异性抗体 Nemod-TF1 (R+DC/D4+Ak) 阻断细胞因子释放得到证明。

[1106] 12.4 细胞免疫应答测试 3:T 细胞增殖测定法

[1107] 如上文对于 ELISpot 分析描述的致敏且再刺激的 T 细胞在与温育后从 ELISpot 平板转移到 96 孔平板内,并且使用比色细胞增殖试剂 (Cell Proliferation Reagent) WST-1 (Roche MolecularBiochemicals) 进行测定,所述试剂的四唑盐通过线粒体酶进行切割,从而使得所显色的染料量 (在 450nm 处的读数) 与在培养基中的代谢活性细胞的数目直接相关。在不存在细胞的情况下培养基加 wst-1 的吸光度是关于酶联免疫吸附测定阅读器的空白位置。该操作由单步添加 10 μ l WST- 增殖试剂 (Roche)/孔,且于 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时,随后在 450nm 处测量组成。

[1108] 在图 17 中证实的结果显示清楚证据:如通过特异性增殖显示的,对于核心-1 阳性细菌裂解物产生的 T 细胞识别来自人细胞系 NM-D4 的 装载有核心 1 阳性细胞裂解物的 DC。此外,这种识别通过裂解物装载的 NM-DC 与核心-1 特异性抗体的预温育得到特异性抑制。

[1109] 12.5 细胞免疫应答测试 4:关于在装载有细菌裂解物的 DCs 上的核心-1 呈递的免疫荧光测试

[1110] 为了分析核心-1 经由细菌裂解物装载的 NM-DC 的加工和呈递,使用核心-1 特异性单克隆抗体 (Nemod-TF1、NEMOD-TF2) 进行免疫荧光分析。加工的核心-1 抗原在成熟 DC 的表面上的呈递借助于免疫荧光加以证实。免疫荧光 (IF) 是允许显现在细胞上的特异性抗原 (核心 1) 的技术,通过结合特异性核心-1 抗体,随后加入用于识别一抗的用荧光染料标记的二抗。

[1111] 在第一个步骤中, pNM-DC (1×10^5 /ml) 通过在 NemodDC 培养基 (70% MEM- α 、20% FCS、10% CM5637) 中温育 7 天分化成 iNM-DC,伴随 1000U/ml GM-CSF、100U/ml IL-4 和 2,5ng/ml TNF- α 的添加。接下来, 1×10^6 /ml 未成熟 NM-DC (iNM-DC) 装载有细菌裂解物 (50 μ g/ml)、肿瘤细胞裂解物 (1×10^6 裂解的肿瘤细胞用于装载在 1×10^6 NM-DC 上) 或 AGP 和 GP 蛋白质 (20 μ g/ml),并且通过添加 75ng/ml TNF- α 成熟 2 天。

[1112] 成熟且抗原装载的 DC 进行洗涤,并且将 1×10^6 细胞/50 μ l 置于微量滴定板上用于免疫荧光染色。使在培养基 (10% FCS) 中稀释的 3 μ g/ml 核心-1 特异性抗体 (Nemod-TF1) 与细胞悬浮液在室温下温育 1 小时。洗涤步骤后,加入 50 μ l 1:200 稀释的第二山羊抗小鼠 IgM, Cy3- 标记的 Ab (Jackson/Dianova),并且温育 30 分钟。洗涤步骤后,将 20 μ l 细胞悬浮液置于 Multitest 载玻片 (10 个孔, Roth) 的每个孔内。

[1113] 免疫荧光染色的样品用配备数码相机 AxioCam (Zeiss) 的 Axioplan 2 荧光显微镜进行检查。

[1114] 图 18 显示成熟 mNM-DC 的阳性核心-1 特异性染色,其具有加工的 AG6- 和 NM-D4- 核心-1 阳性裂解物;和关于装载有核心-1 阴性裂解物 (AG3 和 NM-wt) 的 mNM-DC 的

阴性免疫荧光

[1115] 尽管本发明已就优选实施方案而言进行描述,但本领域技术人员应当理解可以进行各种修饰、取代、省略和改变而不背离其精神。因此,预期本发明的范围仅受下述权利要求包括其等价物的范围的限制。因此,如本发明致力的领域的技术人员显而易见的,本发明可以以除上文具体公开的那些外的形式具体化,而不背离本发明的精神或基本特征。上文描述的本发明的具体实施方案因此在所有方面视为举例说明性的而非限制性的。本发明的范围如附加权利要求中所示,而不是限制于前述说明书中包含的实施例。

[1116] 应当理解关于本文描述的本发明实施方案的各种替代方案可以用于实践本发明。预期下述权利要求限定本发明的范围,并且因此涵盖在这些权利要求及其等价物的范围内的方法和仪器。

[1117]

申请人或代理人文件号 :48 602 K

国际申请号 :

[1118] 关于保藏的微生物的说明

[1119] (PCT 实施细则第 13 条之二)

[1120]

A. 以下所作的说明涉及说明书第 33 (例如) 页第 46 行等所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 ☒	
保藏单位名称: 德意志微生物保藏中心 (DSMZ)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家): Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE (德国)	
保藏日期: 2003 年 08 月 14 日	保藏编号: DSM ACC 2605
C. 其它说明 (如果不适用则留空) 该信息续在附页上 ☒	
D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国)	
E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空)	
以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如 “保藏编号”)	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
授权官员

本栏由国际局填写
☐ 国际局于以下日期收到本页: 年 月 日
授权官员

[1121] PCT/RO/134 表 (1998 年 7 月; 2004 年 1 月再版)

[1122] 根据登记号 DSM ACC2605 的 PCT/RO/134 表格的标识

[1123] 申请人在此向有各自规定的那些国家请求: 本申请所涉及的保藏的生物材料样品只提供给独立的指定的专家 (“专家方案” 请求 (适用时), 尤其是澳大利亚、加拿大、克罗地亚、丹麦、芬兰、德国、冰岛、挪威、新加坡、西班牙、瑞典、联合王国、欧洲)

[1124] 对于欧洲, 申请人因此请求, 如 Rule 28(3)EPC 中所规定的, 保藏的生物材料样品在授予专利权的出版之前或从申请日起 20 年 (如果本申请被驳回或撤回或视为撤回) 仅

仅通过将样品发放至请求样品的人指定的专家的途径获得 (Rule28(4)EPC)。

[1125] 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

[1126] 国际表格

[1127] 葛莱高托普有限公司

在原始保藏情况下的收条，

[1128] Robert- Rössle -str. 10

由本页下面所示的国际保藏单位根据第

[1129] 13125 柏林

7.1 款发给

[1130]

I. 微生物的鉴别	
由保藏人提供的鉴别参考号： NM-D4	由国际保藏单位给予的登录号： DSM ACC2605
II. 科学描述和/或建议的分类命名	
在上面 I 中鉴别的微生物附有下列信息： ☒ 科学描述 ☐ 建议的分类命名 (在合适的项目上打 x 号)	
III. 收到和受理	
本国际保藏单位受理在上面 I 中鉴别的微生物，其于 2003 年 08 月 14 日 (原始保藏日期) ¹ 收到	
IV. 收到转换请求	
本国际保藏单位于 (原始保藏日期) 收到在上面 I 中鉴别的微生物， 并且本国际保藏单位于 (收到转换请求的日期) 收到将该原始保藏转换成根据布达佩斯条约的保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称：德意志微生物保藏中心 (DSMZ) 地址：Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏单位的人员或者经授权的官员的签字：  日期：2003-10-16

[1131] ¹ 当 Rule6.4(d) 适用时，该日期是指获得国际保藏单位地位的日期 DSMZ-BP/9 表格 (单页) 12/2001

[1132]

申请人或代理人文件号 :48 602 K

国际申请号 :

[1133] 关于保藏的微生物的说明

[1134] (PCT 实施细则第 13 条之二)

[1135]

A. 以下所作的说明涉及说明书第 33 (例如) 页第 47 行等所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 ☒	
保藏单位名称: 德意志微生物保藏中心 (DSMZ)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家): Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE (德国)	
保藏日期: 2003 年 08 月 14 日	保藏编号: DSM ACC 2606
C. 其它说明 (如果不适用则留空) 该信息续在附页上 ☒	
D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国)	
E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空)	
以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如 “保藏编号”)	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
授权官员

本栏由国际局填写
☐ 国际局于以下日期收到本页: 年 月 日
授权官员

[1136] PCT/RO/134 表 (1998 年 7 月 ;2004 年 1 月再版)

[1137] 根据登记号 DSM ACC2606 的 PCT/RO/134 表格的标识

[1138] 申请人在此向有各自规定的那些国家请求：本申请所涉及的保藏的生物材料样品只提供给独立的指定的专家（“专家方案”请求（适用时），尤其是澳大利亚、加拿大、克罗地亚、丹麦、芬兰、德国、冰岛、挪威、新加坡、西班牙、瑞典、联合王国、欧洲）

[1139] 对于欧洲，申请人因此请求，如 Rule 28(3)EPC 中所规定的，保藏的生物材料样品在授予专利权的出版之前或从申请日起 20 年（如果本申请被驳回或撤回或视为撤回）仅仅通过将样品发放至请求样品的人指定的专家的途径获得（Rule28(4)EPC）。

[1140] 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

[1141] 国际表格

[1142] 葛莱高托普有限公司 在原始保藏情况下的收条，

[1143] Robert- Rössle -str. 10 由本页下面所示的国际保藏单位根据第

[1144] 13125 柏林 7.1 款发给

[1145]

I. 微生物的鉴别	
由保藏人提供的鉴别参考号： NM-F9	由国际保藏单位给予的登录号： DSM ACC2606
II. 科学描述和/或建议的分类命名	
在上面 I 中鉴别的微生物附有下列信息： ☒ 科学描述 ☐ 建议的分类命名 (在合适的项目上打 x 号)	
III. 收到和受理	
本国际保藏单位受理在上面 I 中鉴别的微生物，其于 2003 年 08 月 14 日 (原始保藏日期) ¹ 收到	
IV. 收到转换请求	
本国际保藏单位于 (原始保藏日期) 收到在上面 I 中鉴别的微生物， 并且本国际保藏单位于 (收到转换请求的日期) 收到将该原始保藏转换成根据布达佩斯条约的保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称：德意志微生物保藏中心 (DSMZ) 地址：Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏单位的人员或者经授权的官员的签字：  日期：2003-10-16

[1146] ¹ 当 Rule 6.4(d) 适用时，该日期是指获得国际保藏单位地位的日期 DSMZ-BP/9 表格 (单页) 12/2001

[1147]

申请人或代理人文件号 : 48 602 K

国际申请号 :

[1148] 关于保藏的微生物的说明

[1149] (PCT 实施细则第 13 条之二)

[1150]

A. 以下所作的说明涉及说明书第 12 (例如) 页第 7 行等所指的微生物。	
B. 保藏物标识	更多的保藏物标识见附页 ☒
保藏单位名称: 德意志微生物保藏中心 (DSMZ)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家): Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE (德国)	
保藏日期: 2006 年 09 月 15 日	保藏编号: DSM ACC 2806
C. 其它说明 (如果不适用则留空)	该信息续在附页上 ☒
D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国)	
E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空)	
以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如 “保藏编号”)	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
授权官员

本栏由国际局填写
☐ 国际局于以下日期收到本页: 年 月 日
授权官员

[1151] PCT/RO/134 表 (1998 年 7 月 ;2004 年 1 月再版)

[1152] 根据登记号 DSM ACC2806 的 PCT/RO/134 表格的标识

[1153] 申请人在此向有各自规定的那些国家请求: 本申请所涉及的保藏的生物材料样品只提供给独立的指定的专家 (“专家方案” 请求 (适用时), 尤其是澳大利亚、加拿大、克罗地亚、丹麦、芬兰、德国、冰岛、挪威、新加坡、西班牙、瑞典、联合王国、欧洲)

[1154] 对于欧洲, 申请人因此请求, 如 Rule 28(3)EPC 中所规定的, 保藏的生物材料样品在授予专利权的出版之前或从申请日起 20 年 (如果本申请被驳回或撤回或视为撤回) 仅

仅通过将样品发放至请求样品的人指定的专家的途径获得 (Rule28(4)EPC)。

[1155] 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

[1156] 国际表格

[1157] 葛莱高托普有限公司

在原始保藏情况下的收条，

[1158] Robert- Rössle -str. 10

由本页下面所示的国际保藏单位根据第

[1159] 13125 柏林

7.1 款发给

[1160]

I. 微生物的鉴别	
由保藏人提供的鉴别参考号： NM-H9D8	由国际保藏单位给予的登录号： DSM ACC2806
II. 科学描述和/或建议的分类命名	
在上面 I 中鉴别的微生物附有下列信息：	
☐ 科学描述 ☐ 建议的分类命名 (在合适的项目上打 x 号)	
III. 收到和受理	
本国际保藏单位受理在上面 I 中鉴别的微生物，其于 2006 年 09 月 15 日 (原始保藏日期) ¹ 收到	
IV. 收到转换请求	
本国际保藏单位于 (原始保藏日期) 收到在上面 I 中鉴别的微生物， 并且本国际保藏单位于 (收到转换请求的日期) 收到将该原始保藏转换成根据布达佩斯条约的保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称：德意志微生物保藏中心 (DSMZ) 地址：Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏单位的人员或者经授权的官员的签字：  日期：2006-10-09

[1161] ¹ 当 Rule6.4(d) 适用时，该日期是指获得国际保藏单位地位的日期 DSMZ-BP/9 表格 (单页) 08/2006

[1162]

申请人或代理人文件号 :48 602 K

国际申请号 :

[1163] 关于保藏的微生物的说明

[1164] (PCT 实施细则第 13 条之二)

[1165]

A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>7 (例如)</u> 页第 <u>33</u> 行等所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 ☒	
保藏单位名称: 德意志微生物保藏中心 (DSMZ)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家): Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE (德国)	
保藏日期: 2006 年 10 月 20 日	保藏编号: DSM 18726
C. 其它说明 (如果不适用则留空) 该信息续在附页上 ☒	
D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国)	
E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空)	
以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如 “保藏编号”)	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
授权官员

本栏由国际局填写
☐ 国际局于以下日期收到本页: 年 月 日
授权官员

[1166] PCT/RO/134 表 (1998 年 7 月 ;2004 年 1 月再版)

[1167] 根据登记号 DSM 18726 的 PCT/RO/134 表格的标识

[1168] 申请人在此向有各自规定的那些国家请求：本申请所涉及的保藏的生物材料样品只提供给独立的指定的专家（“专家方案”请求（适用时），尤其是澳大利亚、加拿大、克罗地亚、丹麦、芬兰、德国、冰岛、挪威、新加坡、西班牙、瑞典、联合王国、欧洲）

[1169] 对于欧洲，申请人因此请求，如 Rule 28(3)EPC 中所规定的，保藏的生物材料样品在授予专利权的出版之前或从申请日起 20 年（如果本申请被驳回或撤回或视为撤回）仅仅通过将样品发放至请求样品的人指定的专家的途径获得（Rule28(4)EPC）。

[1170] 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

[1171] 国际表格

[1172] 葛莱高托普有限公司

在原始保藏情况下的收条，

[1173] Robert- Rössle -str. 10

由本页下面所示的国际保藏单位根据第

[1174] 13125 柏林

7.1 款发给

[1175]

I. 微生物的鉴别	
由保藏人提供的鉴别参考号： AG6	由国际保藏单位给予的登录号： DSM 18726
II. 科学描述和/或建议的分类命名	
在上面 I 中鉴别的微生物附有下列信息： ☐ 科学描述 ☒ 建议的分类命名 （在合适的项目上打 x 号）	
III. 收到和受理	
本国际保藏单位受理在上面 I 中鉴别的微生物，其于 2006 年 10 月 20 日（原始保藏日期） ¹ 收到	
IV. 收到转换请求	
本国际保藏单位于 _____（原始保藏日期）收到在上面 I 中鉴别的微生物， 并且本国际保藏单位于 _____（收到转换请求的日期）收到将该原始保藏转换成根据布达佩斯条约的保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称：德意志微生物保藏中心（DSMZ） 地址：Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏单位的人员或者经授权的官员的签字：  日期：2006-10-24

[1176] ¹ 当 Rule 6.4(d) 适用时，该日期是指获得国际保藏单位地位的日期 DSMZ-BP/9 表格（单页）08/2006

[1177]

申请人或代理人文件号：48 602 K

国际申请号：

[1178] 关于保藏的微生物的说明

[1179] （PCT 实施细则第 13 条之二）

[1180]

A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>71</u> (例如) 页第 <u>17</u> 行等所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 ☒	
保藏单位名称: 德意志微生物保藏中心 (DSMZ)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家): Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE (德国)	
保藏日期: 2006 年 10 月 20 日	保藏编号: DSM 18727
C. 其它说明 (如果不适用则留空) 该信息续在附页上 ☒	
D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国)	
E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空)	
以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如 “保藏编号”)	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
授权官员

本栏由国际局填写
☐ 国际局于以下日期收到本页: 年 月 日
授权官员

[1181] PCT/RO/134 表 (1998 年 7 月; 2004 年 1 月再版)

[1182] 根据登记号 DSM 18727 的 PCT/RO/134 表格的标识

[1183] 申请人在此向有各自规定的那些国家请求: 本申请所涉及的保藏的生物材料样品只提供给独立的指定的专家 (“专家方案” 请求 (适用时), 尤其是澳大利亚、加拿大、克罗地亚、丹麦、芬兰、德国、冰岛、挪威、新加坡、西班牙、瑞典、联合王国、欧洲)

[1184] 对于欧洲, 申请人因此请求, 如 Rule 28(3)EPC 中所规定的, 保藏的生物材料样品在授予专利权的出版之前或从申请日起 20 年 (如果本申请被驳回或撤回或视为撤回) 仅

仅通过将样品发放至请求样品的人指定的专家的途径获得 (Rule28(4)EPC))。

[1185] 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

[1186] 国际表格

[1187] 葛莱高托普有限公司

在原始保藏情况下的收条，

[1188] Robert- Rössle -str. 10

由本页下面所示的国际保藏单位根据第

[1189] 13125 柏林

7.1 款发给

[1190]

I. 微生物的鉴别	
由保藏人提供的鉴别参考号： LH2	由国际保藏单位给予的登录号： DSM 18727
II. 科学描述和/或建议的分类命名	
在上面 I 中鉴别的微生物附有下列信息： ☐ 科学描述 ☒ 建议的分类命名 (在合适的项目上打 x 号)	
III. 收到和受理	
本国际保藏单位受理在上面 I 中鉴别的微生物，其于 2006 年 10 月 20 日 (原始保藏日期) ¹ 收到	
IV. 收到转换请求	
本国际保藏单位于 (原始保藏日期) 收到在上面 I 中鉴别的微生物， 并且本国际保藏单位于 (收到转换请求的日期) 收到将该原始保藏转换成根据布达佩斯条约的保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称：德意志微生物保藏中心 (DSMZ) 地址：Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏单位的人员或者经授权的官员的签字：  日期：2006-10-24

[1191] ¹ 当 Rule6.4(d) 适用时，该日期是指获得国际保藏单位地位的日期 DSMZ-BP/9 表

格(单页)08/2006

[1192]

申请人或代理人文件号 :48 602 K

国际申请号 :

[1193] 关于保藏的微生物的说明

[1194] (PCT 实施细则第 13 条之二)

[1195]

A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>7 (例如)</u> 页第 <u>33</u> 行等所指的微生物。	
B. 保藏物标识	更多的保藏物标识见附页 ☒
保藏单位名称:	
德意志微生物保藏中心 (DSMZ)	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家):	
Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE (德国)	
保藏日期: 2006 年 10 月 20 日	保藏编号: DSM 18728
C. 其它说明 (如果不适用则留空)	该信息续在附页上 ☒
D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国)	
E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空)	
以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如“保藏编号”)	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
授权官员

本栏由国际局填写
☐ 国际局于以下日期收到本页: 年 月 日
授权官员

[1196] PCT/RO/134 表 (1998 年 7 月;2004 年 1 月再版)

[1197] 根据登记号 DSM 18728 的 PCT/RO/134 表格的标识

[1198] 申请人在此向有各自规定的那些国家请求：本申请所涉及的保藏的生物材料样品只提供给独立的指定的专家（“专家方案”请求（适用时），尤其是澳大利亚、加拿大、克罗地亚、丹麦、芬兰、德国、冰岛、挪威、新加坡、西班牙、瑞典、联合王国、欧洲）

[1199] 对于欧洲，申请人因此请求，如 Rule 28(3)EPC 中所规定的，保藏的生物材料样品在授予专利权的出版之前或从申请日起 20 年（如果本申请被驳回或撤回或视为撤回）仅仅通过将样品发放至请求样品的人指定的专家的途径获得（Rule28(4)EPC）。

[1200] 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

[1201] 国际表格

[1202] 葛莱高托普有限公司

在原始保藏情况下的收条，

[1203] Robert- Rössle -str. 10

由本页下面所示的国际保藏单位根据第

[1204] 13125 柏林

7.1 款发给

[1205]

I. 微生物的鉴别	
由保藏人提供的鉴别参考号： MU1	由国际保藏单位给予的登录号： DSM 18728
II. 科学描述和/或建议的分类命名	
在上面 I 中鉴别的微生物附有下列信息： ☐ 科学描述 ☒ 建议的分类命名 (在合适的项目上打 x 号)	
III. 收到和受理	
本国际保藏单位受理在上面 I 中鉴别的微生物，其于 2006 年 10 月 20 日 (原始保藏日期) ¹ 收到	
IV. 收到转换请求	
本国际保藏单位于 (原始保藏日期) 收到在上面 I 中鉴别的微生物， 并且本国际保藏单位于 (收到转换请求的日期) 收到将该原始保藏转换成根据布达佩斯条约的保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称：德意志微生物保藏中心 (DSMZ) 地址：Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏单位的人员或者经授权的官员的签字：  日期：2006-10-24

[1206] ¹ 当 Rule 6.4(d) 适用时，该日期是指获得国际保藏单位地位的日期 DSMZ-BP/9 表格 (单页) 08/2006

```

+MU1
|
|   +Bacteroides thetaiotaomicron strain 17.4 AY319392
|   |
|   |   +Bacteroides thetaiotaomicron strain D833 AY895196
|   |   +7
|   |   +8 +Bacteroides thetaiotaomicron strain 8713 AY895202
|   |   |
|   |   |   +9 +Bacteroides thetaiotaomicron BNRRR16SB M58763
|   |   |   |
|   |   |   |   +10 +Bacteroides thetaiotaomicron strain 3751 AY895192
|   |   |   |   |
|   |   |   |   |   +20 +Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29148 BNRRR16SAF L16489
|   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   +Bacteroides acidifaciens AB021156
|   |   |   |   |   |   +2
|   |   |   |   |   |   +Bacteroides acidifaciens strain A1 AB021158
|   |   |   |   |   |   +5
|   |   |   |   |   |   +Bacteroides acidifaciens strain A32 AB021162
|   |   |   |   |   |   +4
|   |   |   |   |   |   +12 +Bacteroides acidifaciens strain A29 AB021160
|   |   |   |   |   |   +3
|   |   |   |   |   |   +Bacteroides acidifaciens strain A40 AB021164
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   +13 +Bacteroides caccae ATCC 43185T BC16S X83951
|   |   |   |   |   |   |   +19
|   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   +Bacteroides fragilis BNRRGDAM11656
+22 |   |   |   |   |   |   |   +8
|   |   |   |   |   |   |   |   +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 strain 3941 AY895193
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   +18
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   +Bacteroides ovatus strain 4140 AY895197
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   +Bacteroidaceae bacterium Smarlab AY538687
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   +Bacteroides sp. WH302 AY895184
23-21 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   +Bacteroides sp. WH305 AY895185
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
+AG6

```

图 1

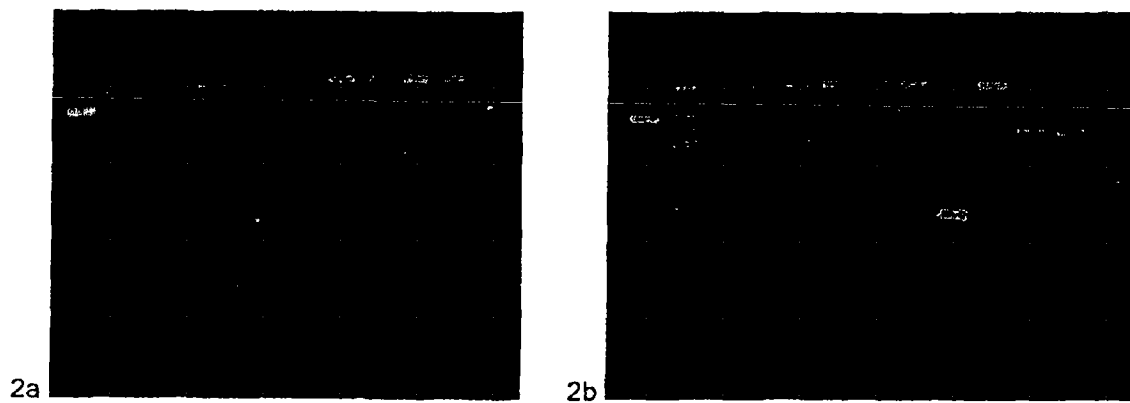


图 2

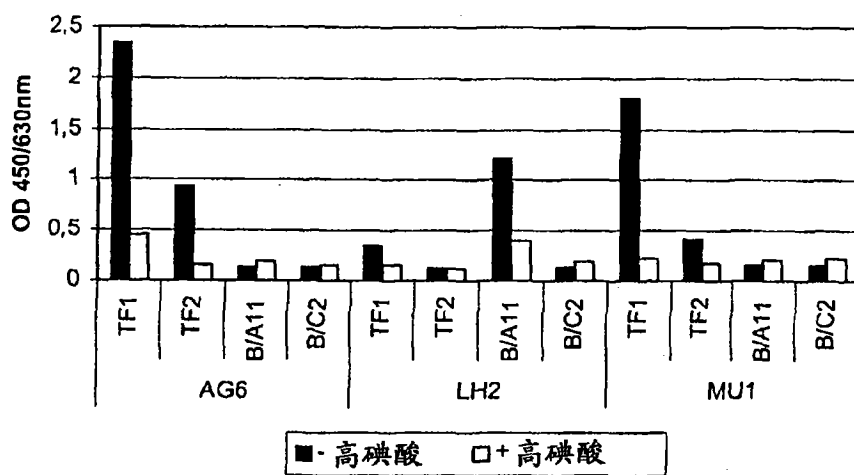


图 3

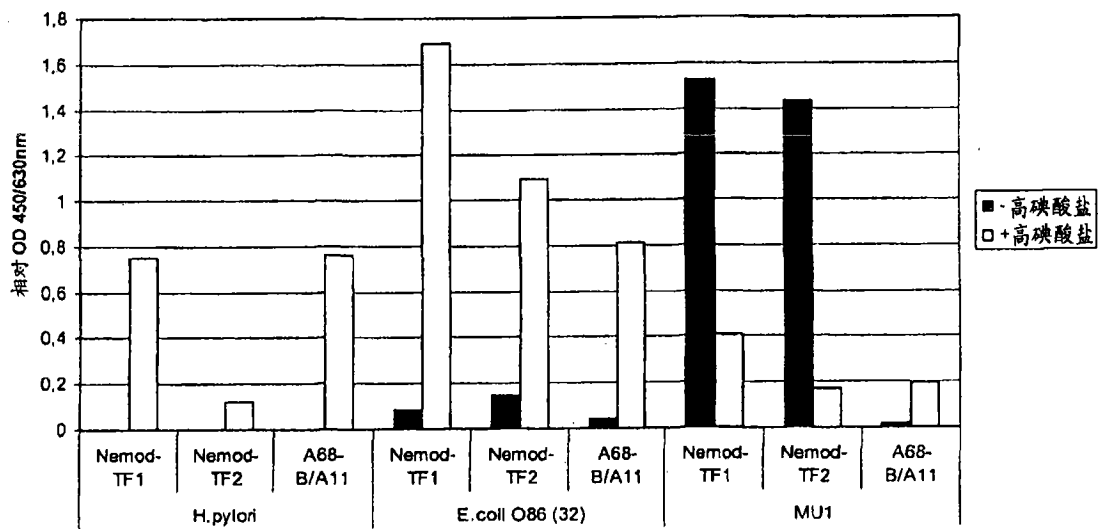


图 3a

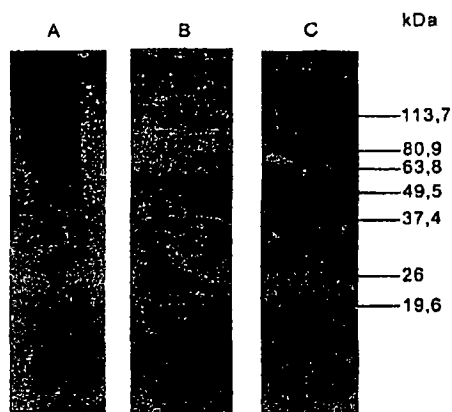


图 4

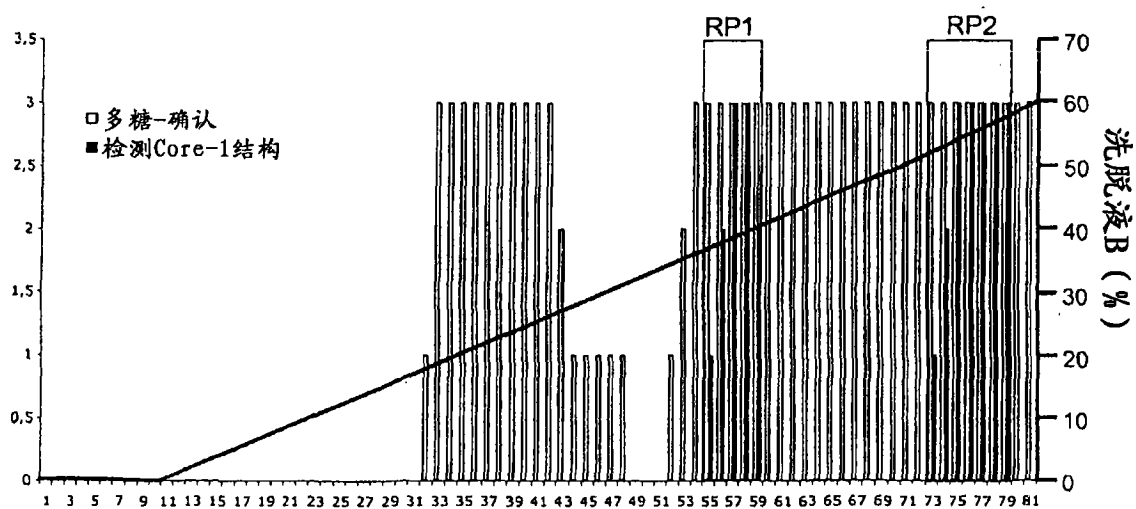


图 5

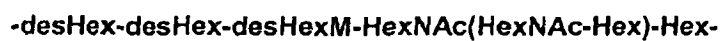


图 6

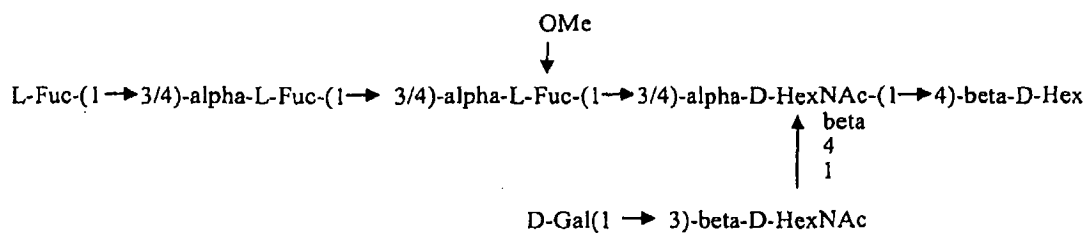


图 7

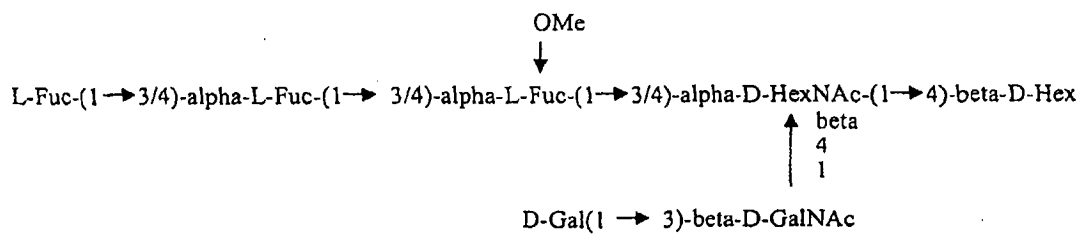


图 8

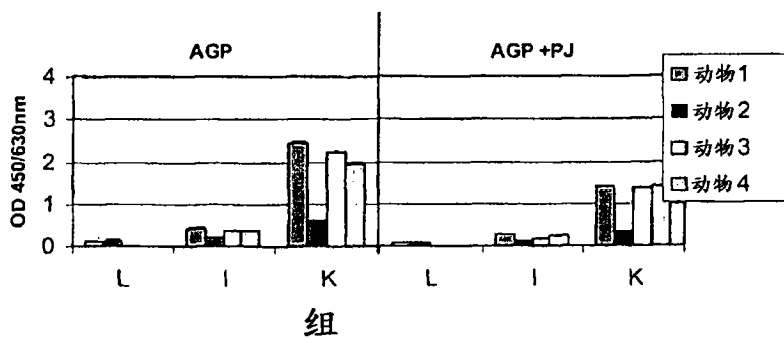
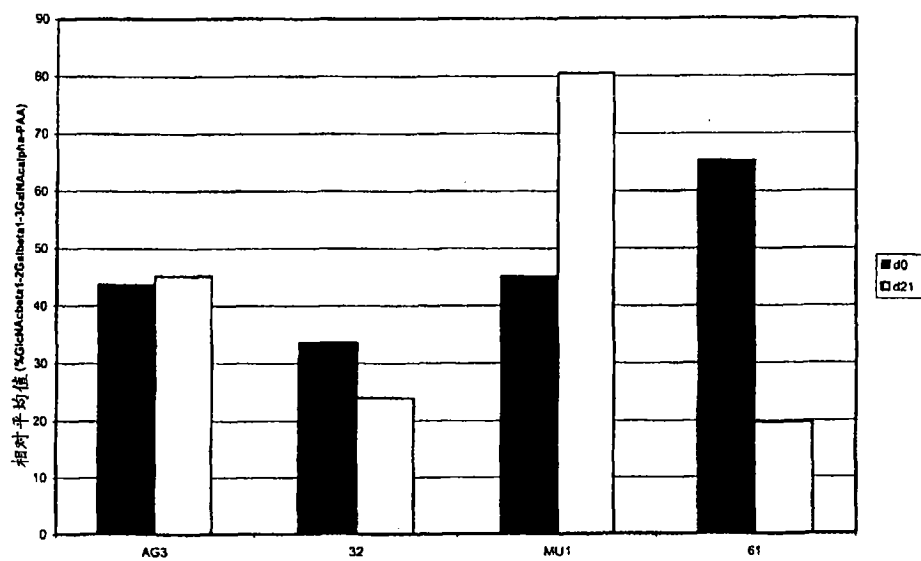


图 9

A)



B)

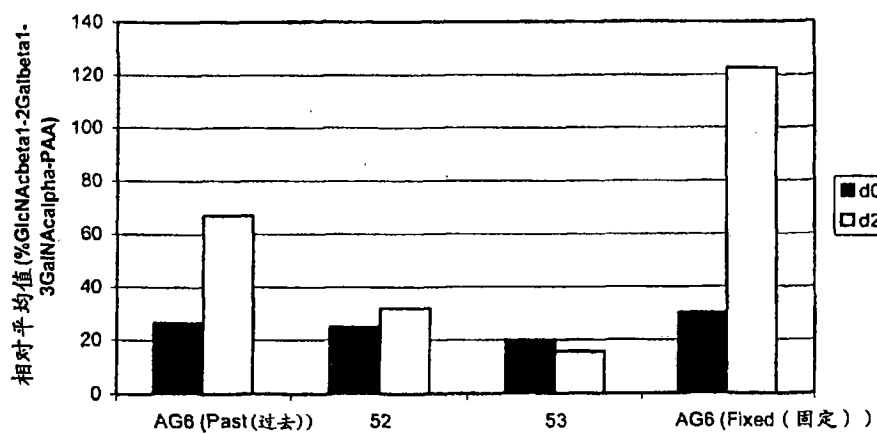
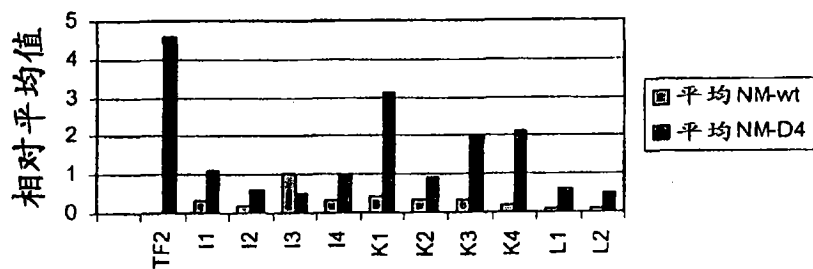


图 10

A)



B)

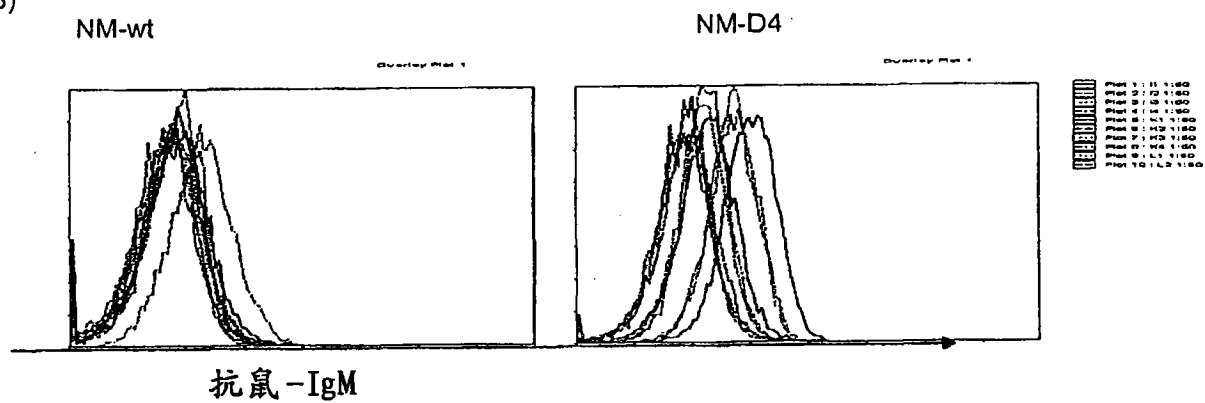
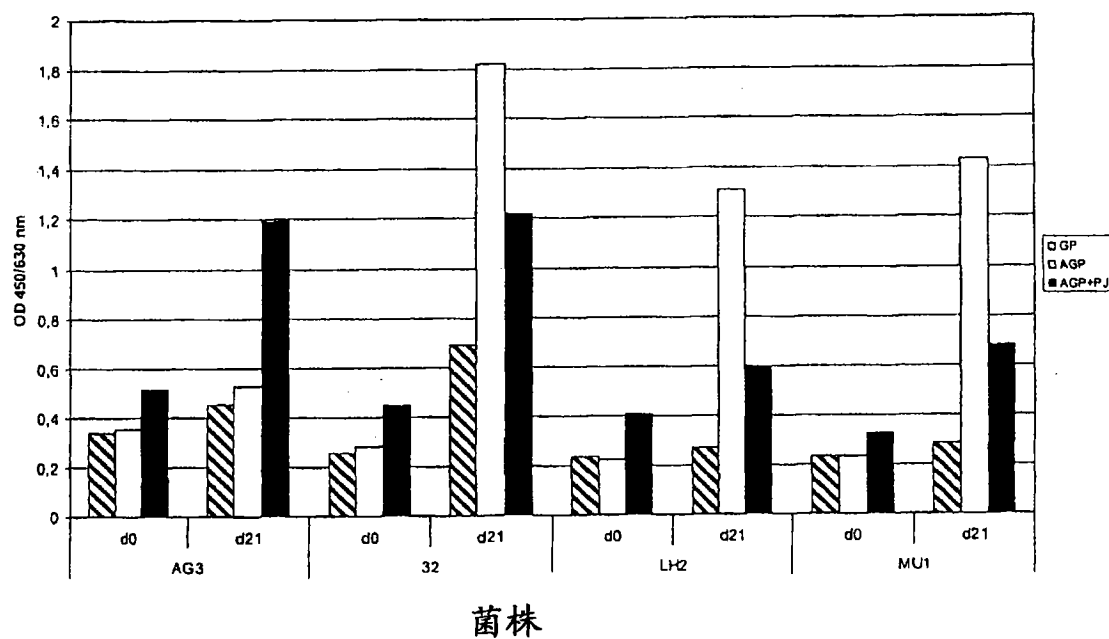
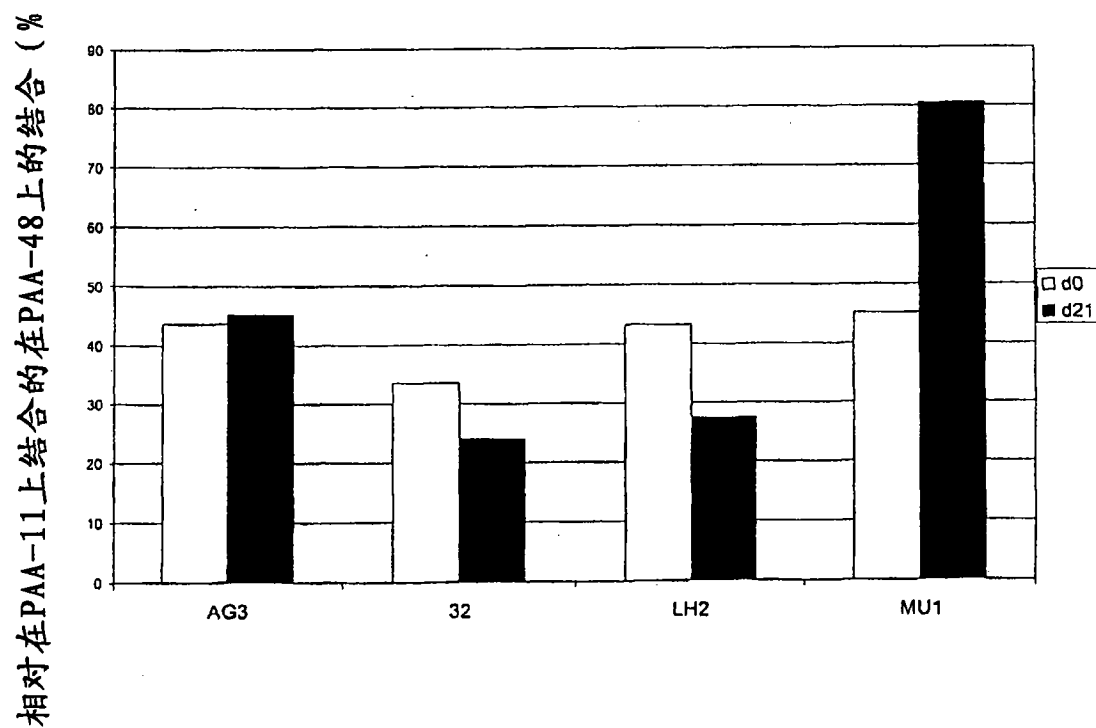


图 11

C.)



D.)



E)

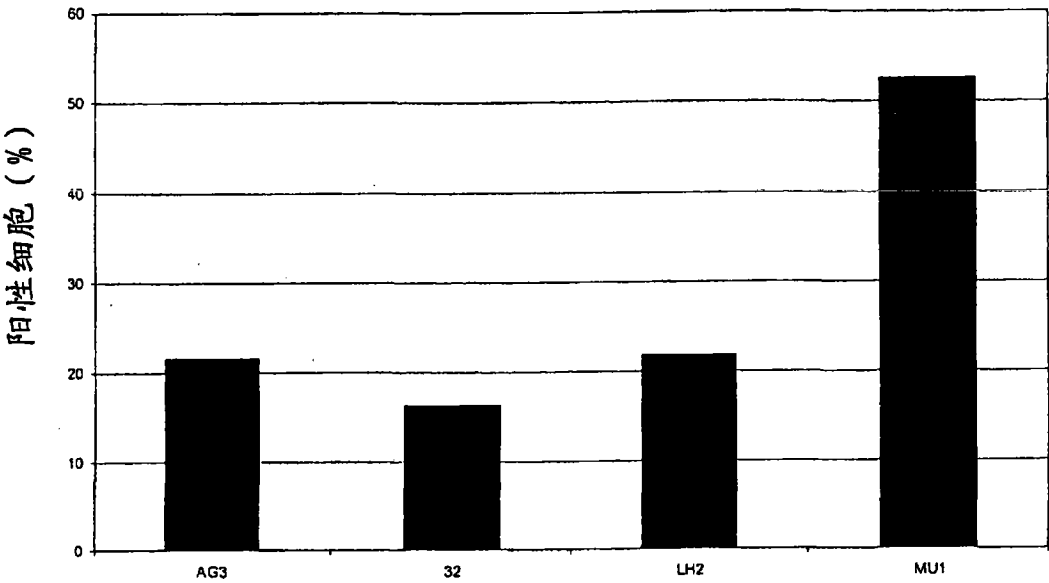


图 11

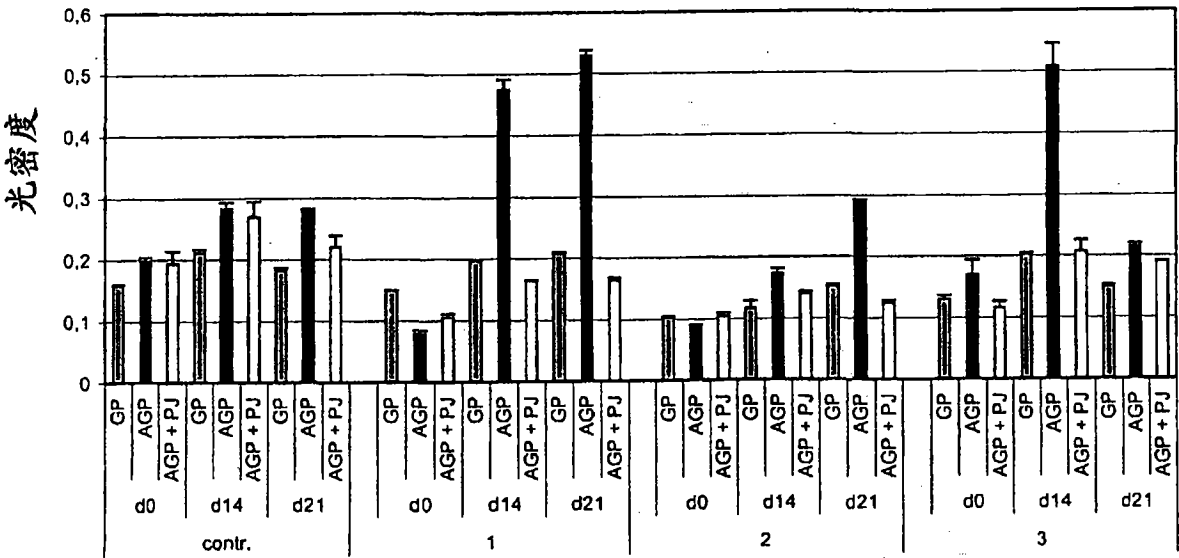
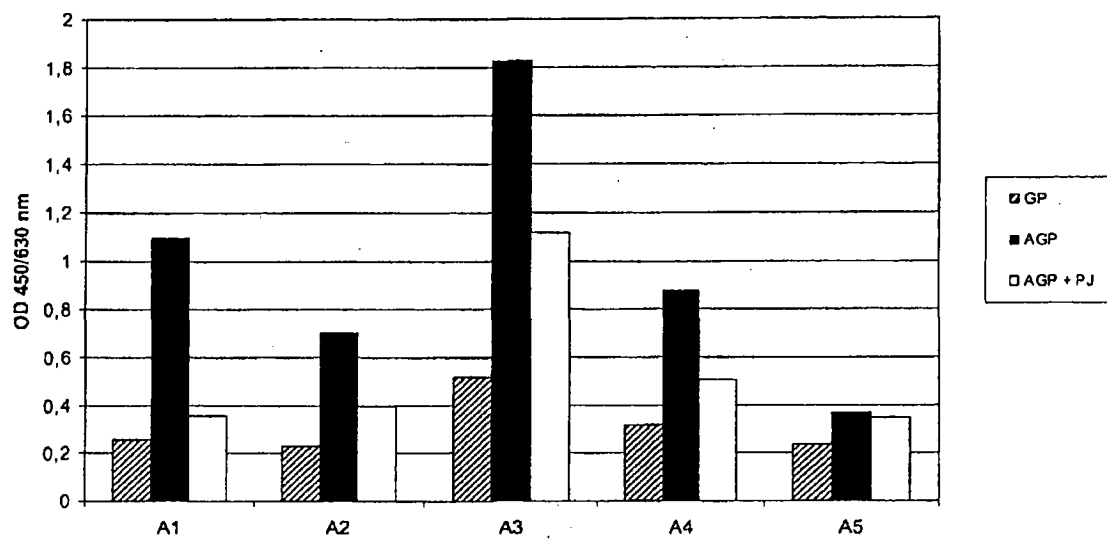


图 12

A)



B)

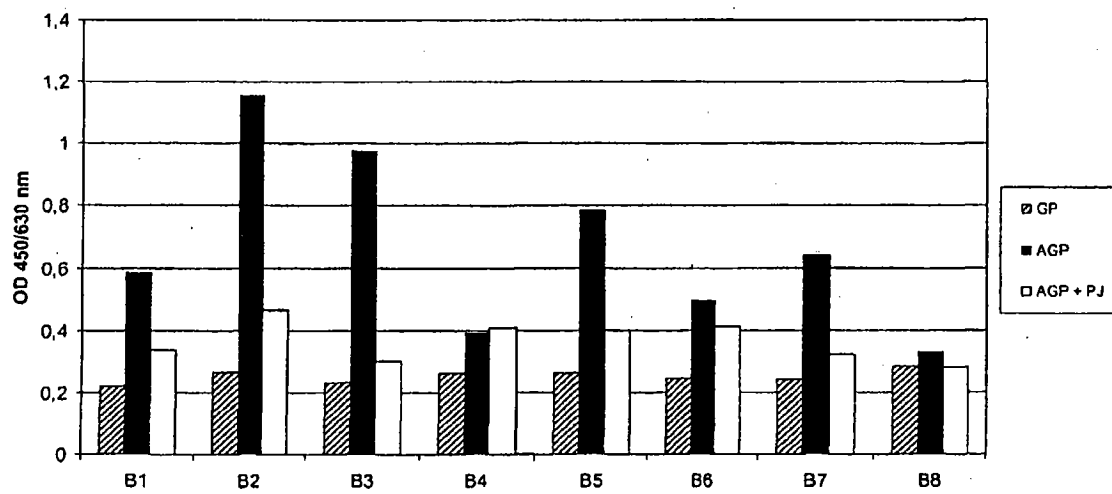


图 13

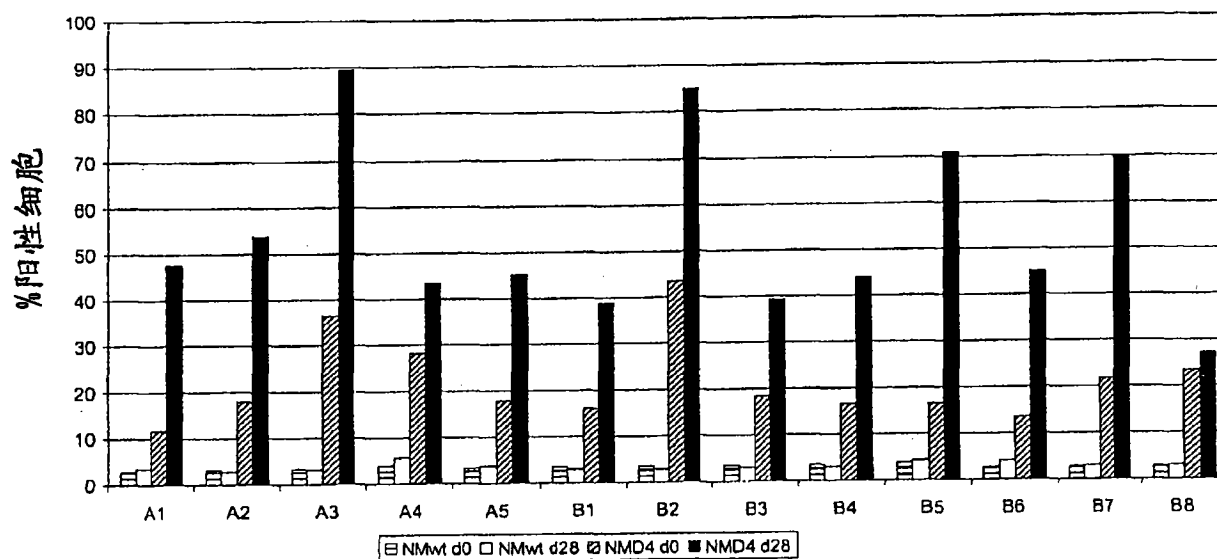


图 14

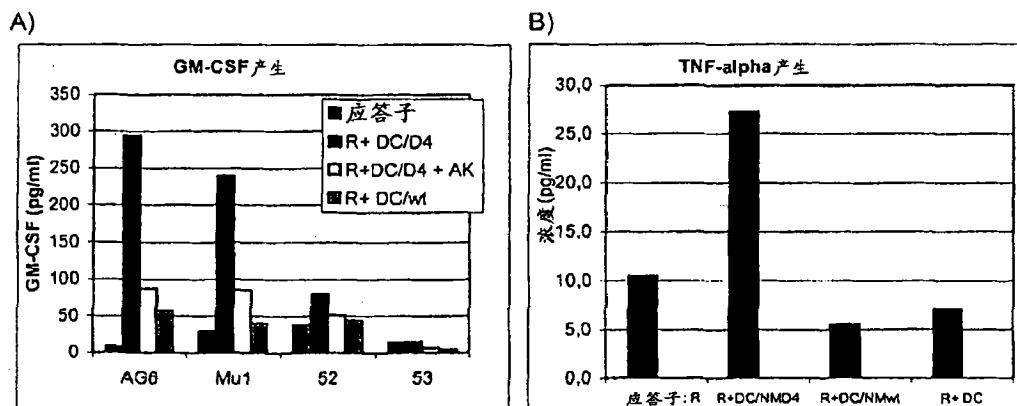


图 15

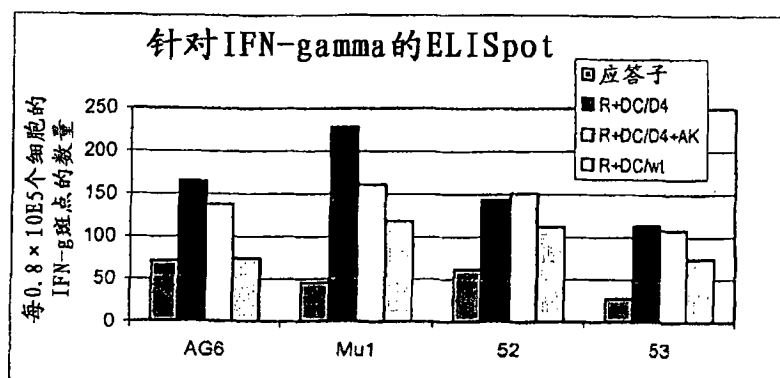


图 16

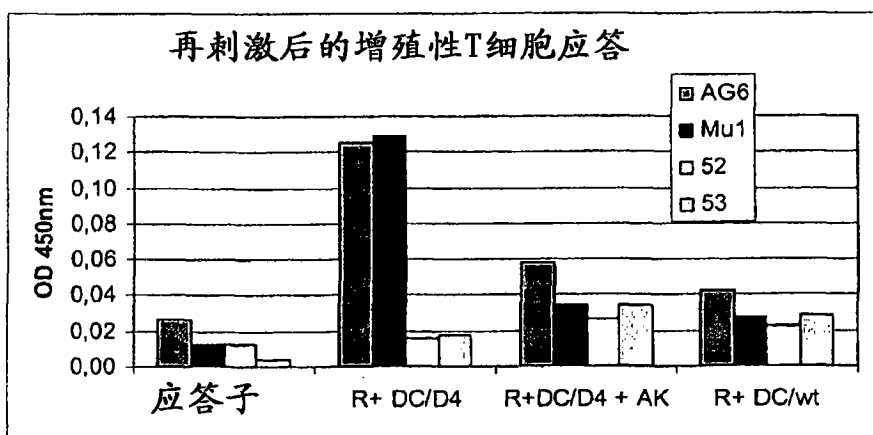


图 17

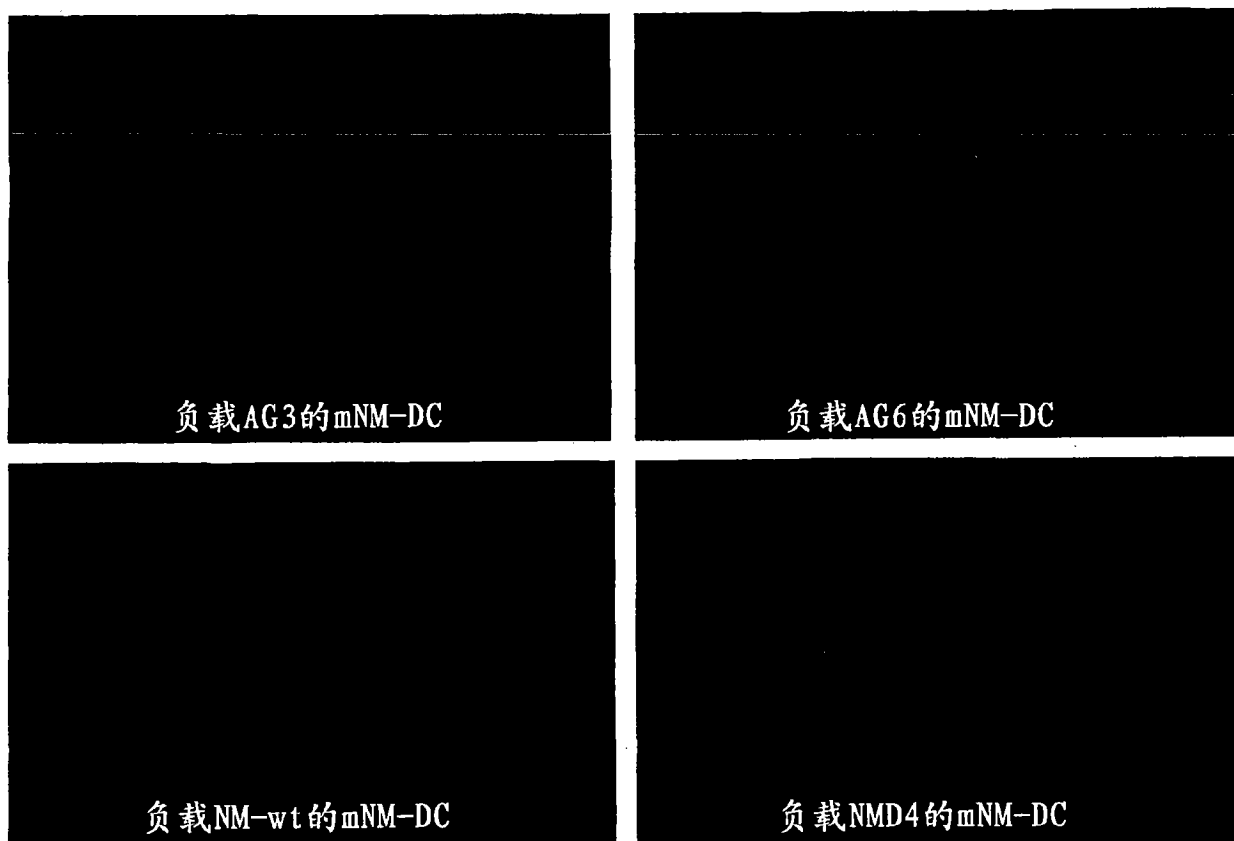
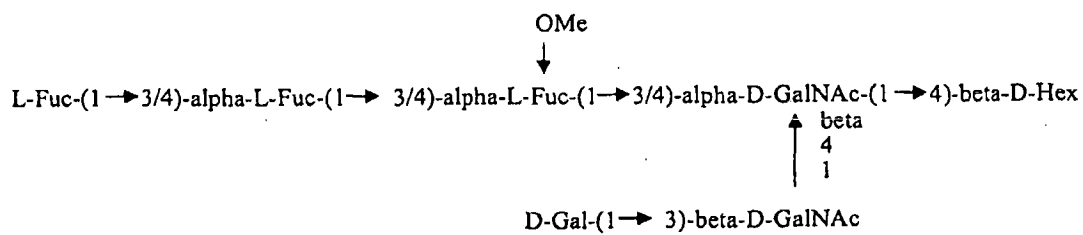
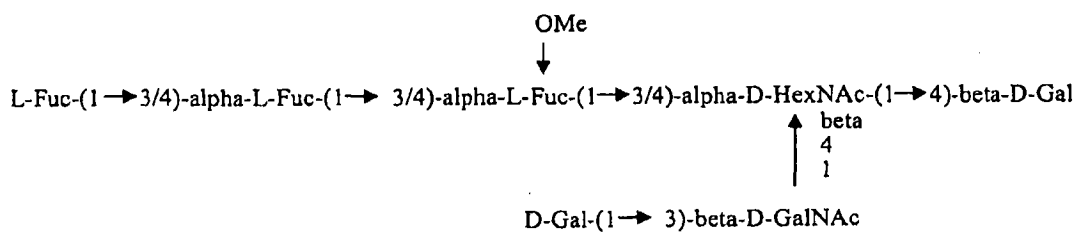


图 18

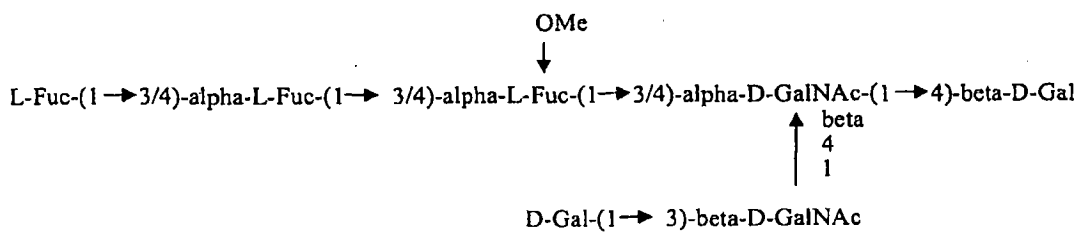
#1



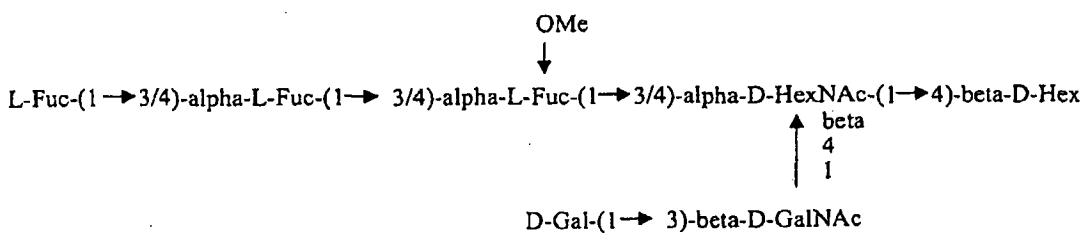
#2



#3



#4



#5

图 19

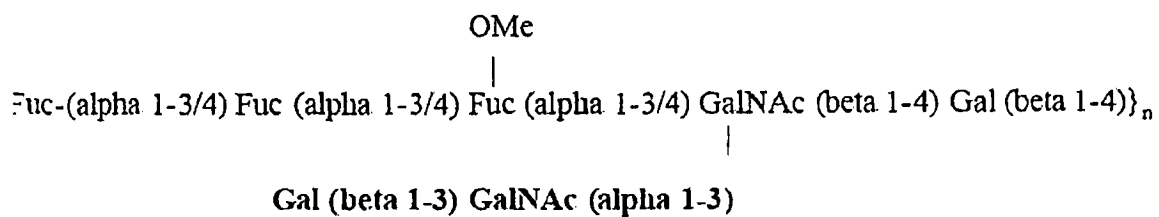


图 19 续

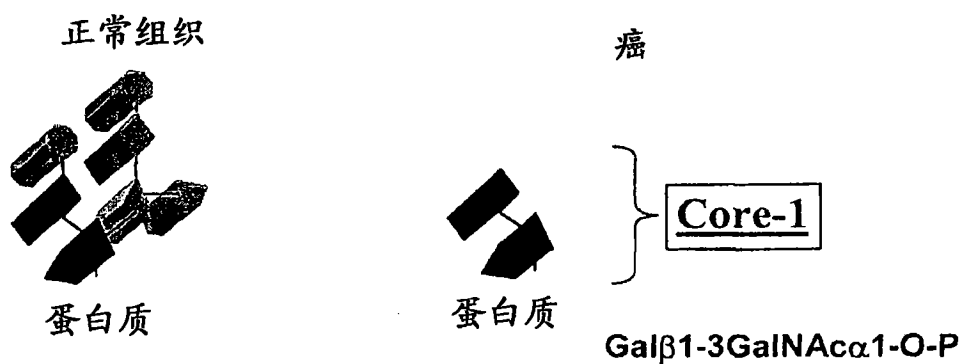


图 20

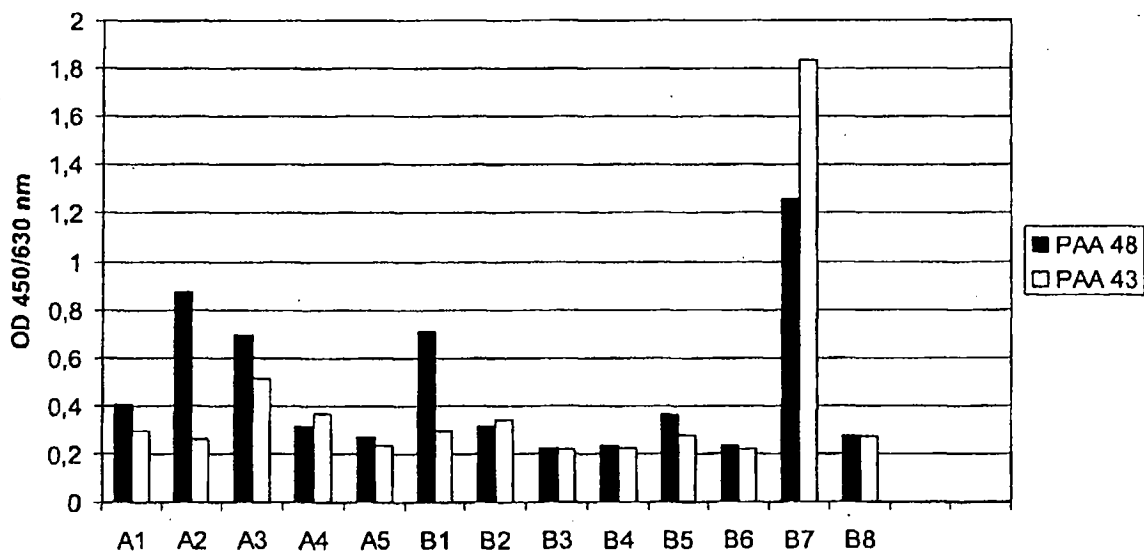


图 21

表1

抗生素/菌株	53	52	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32
种									
菌株									
青霉素	B. ovatus DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697
美洛西林			MS	MS	HS	S	HS	HS	S
氟苯青霉素					S	S	S	S	S
氟苯青霉素+舒巴坦	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS
哌拉西林+他佐巴坦	S	MS	S	S	HS	HS	HS	HS	HS
美洛培南	HS	MS	HS	HS	HS	HS	HS	HS	HS
克林霉素	HS	MS	S	HS					
甲硝唑	S	S	HS	HS					

抗生素/菌株	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32	53	52	AG6	MU1
种									
菌株									
氟苯青霉素	S	S	S	S	S	B. ovatus DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1
磺胺甲恶唑+三甲氧苄二氧嘧啶	HS	HS	HS	HS	HS				
庆大霉素	HS	S	S	HS	HS				
妥布霉素	S	S	S	S	S				
美洛西林	HS	S	HS	HS	S			MS	MS
头孢替安	HS	HS	HS	HS	HS				
Cefotaxim	HS	HS	HS	HS	HS				
美罗培南	HS	HS	HS	HS	HS			HS	HS
头孢曲松 (Ceftriaxon)	HS	HS	HS	HS	HS				
头孢呋辛 (Cefuroxim)	MS	MS	MS	MS	MS				

图 22

[illegible]

图 22 续

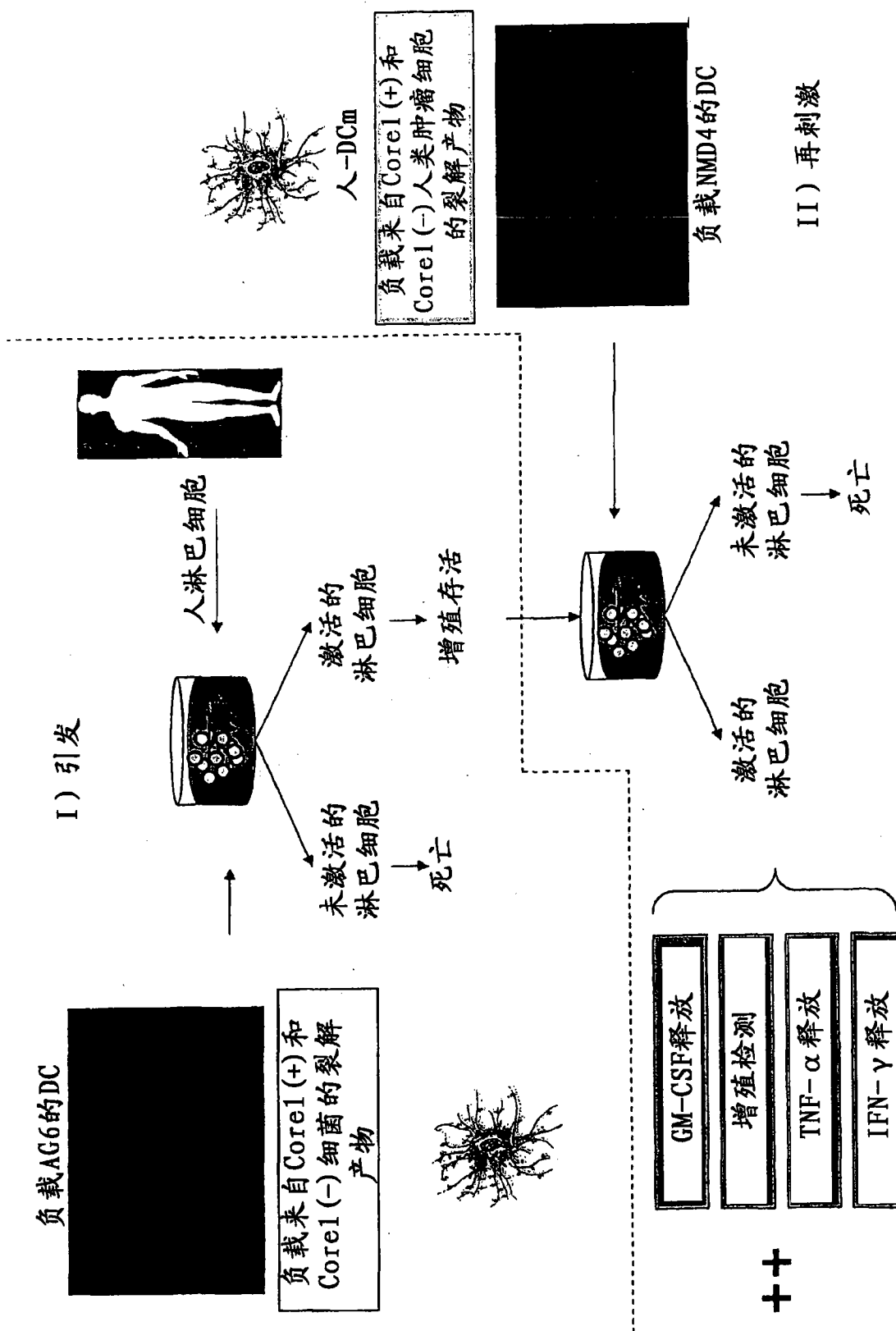


图 23