



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: 2016.12.30

(21) Номер заявки: 200970471

(22) Дата подачи: 2007.11.12

(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)

(54) CORE-1 ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ИЛИ ИХ ФРАКЦИИ,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АКТИВАЦИЮ КЛЕТЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ
УГЛЕВОДОВ

(31) 06090208.7; 06090209.5

(32) 2006.11.10

(33) EP

(43) 2009.12.30

(86) PCT/EP2007/009766

(87) WO 2008/055703 2008.05.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ГЛИКОТОП ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

Голетц Штеффен, Юльсеме Филипп,

Леффлер Аня (DE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) SPRINGER G. F. ET AL.: "ORIGIN OF ANTI THOMSEN FRIEDENREICH AND TN AGGLUTININS IN MAN AND IN WHITE LEGHORN CHICKS", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 47, no. 3, 1981, pages 453-460, XP009088436, ISSN: 0007-1048, the whole document

KLAAMAS 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, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 31, no. 3/4, 2002, pages 191-204, XP009047359, ISSN: 0882-0139, the whole document

KURTENKOV OLEG ET AL.: "Better survival of Helicobacter pylori infected patients with early gastric cancer is related to a higher level of Thomsen-Friedenreich antigen-specific antibodies", IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 1-2, February 2003 (2003-02), pages 83-93, XP009088439, ISSN: 0882-0139, the whole document

GOLETZ S. ET AL.: "THOMSEN-FRIEDENREICH ANTIGEN: THE HIDDEN TUMOR ANTIGEN", ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, SPRING ST., NY, US, vol. 535, 2003, pages 147-162, XP009034310, ISSN: 0065-2598, pages 150, 155, page 159.

BUTSCHAK G. ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THOMSEN-FRIEDENREICH-SPECIFIC ANTIBODIES FROM HUMAN SERUM", TUMOR BIOLOGY, KARGER, BASEL, CH, vol. 23, no. 3, May 2002

(2002-05), pages 113-122, XP009034404, ISSN: 1010-4283, the whole document

CLAUSEN H. ET AL.: "MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED TO THE BLOOD GROUP A ASSOCIATED STRUCTURE GALACTOSYL-A SPECIFICITY AND RELATION TO THE THOMSEN-FRIEDENREICH ANTIGEN", MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 2, 1988, pages 199-204, XP002497124, ISSN: 0161-5890, the whole document

TAKANO Y. ET AL.: "Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion." SURGERY TODAY, 2000, vol. 30, no. 12, 2000, pages 1073-1082, XP002497125, ISSN: 0941-1291, the whole document

FRANCO A.: "CTL-based cancer preventive/therapeutic vaccines for carcinomas: Role of tumour-associated carbohydrate antigens", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 61, no. 5, May 2005 (2005-05), pages 391-397, XP002448043, ISSN: 0300-9475, table 1

CROCE M. V. ET AL.: "THE USE OF CARBOHYDRATE ANTIGENS FOR THE PREPARATION OF VACCINES FOR THERAPY IN BREAST CANCER" DRUGS OF TODAY/MEDICAMENTOS DE ACTUALIDAD, J.R. PROUS SS.A. INTERNATIONAL PUBLISHERS, ES, vol. 38, no. 11, 2002, pages 759-768, XP008068597, ISSN: 0025-7656, the whole document

MACLEAN G. D. ET AL.: "ACTIVE IMMUNIZATION OF HUMAN OVARIAN CANCER PATIENTS AGAINST A COMMON CARCINOMA (THOMSEN-FRIEDENREICH) DETERMINANT USING A SYNTHETIC CARBOHYDRATE ANTIGEN", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 11, 1992, pages 292-305, XP002948048, ISSN: 1524-9557, the whole document

SUSAN F. SLOVIN ET AL.: "Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 54, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 694-702, XP019333138, ISSN: 1432-0851, the whole document

BAUMEISTER AND GOLETZ: "Voll funktionsfähige humane dendritische Zelllinie", LABORWELT, [Online], vol. 6, 2005, XP002474237 Retrieved from the Internet: URL:HTTP://WWW.NEMOD.COM/DOWNLOADS/NEMODD C%20IN%20LABORWELT%207.2.05.PDF>, the whole document

WO-A-2006012616

(57) Настоящее изобретение относится к профилактике и лечению желудочно-кишечных расстройств и рака. В частности, изобретение относится к профилактике и лечению карцином, которые являются Core-1-положительными. Изобретение касается Core-1-положительных микроорганизмов и способа их получения, а также способа предотвращения и лечения Core-1-положительных заболеваний при использовании указанных микроорганизмов.

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области профилактики и лечения желудочно-кишечных расстройств и рака. В частности, изобретение относится к профилактике и лечению карцином, которые являются Coge-1-положительными и соответственно несут антиген Coge-1. Изобретение предоставляетнутрицевтические и фармацевтические композиции, содержащие Coge-1-положительный микроорганизм и его фракции, способные вызывать иммунную реакцию на Coge-1 и тем самым на опухолевые клетки, несущие Coge-1, и на несущие Coge-1 молекулы. Запуская или усиливая специфические иммунные реакции на Coge-1, эти композиции создают щит против Coge-1-положительных раковых клеток. Более того, изобретение предоставляет способы выявления, отбора и изоляции Coge-1-положительных микроорганизмов, что весьма существенно при составлениинутрицевтических или фармацевтических композиций, вызывающих иммунную реакцию на Coge-1 у людей и животных. Далее, изобретение предоставляет специфические гуморальные и клеточные тест-системы для Coge-1-специфичных иммунных реакций и способы выработки антител и композиций антител к Coge-1, а также анти-Coge-1 дендритных клеток, активированных Т клеток, линий и клонов Т-клеток.

Предпосылки создания изобретения

Аномальное гликозилирование - типичный признак раковых клеток. Поэтому углеводные антигены опухолей на гликопротеинах и гликолипидах служат целями при активной и пассивной иммунотерапии. Эти мощные антигены заново выражаются или регулируются благодаря изменениям в сложном механизме гликозилирования опухолевых клеток. Известны различные связанные с липидами или протеинами углеводные антигены опухолей, например, GM2, GD2, GD3, фукозилированный GM1, Globo H, Le^Y и структуры муцинового ядра Tn, Sialyl-Tn и антиген Томсена-Фриденрайха.

Антиген Томсена-Фриденрайха (TF) - известная углеводная структура, описанная как опухолевый антиген во многих работах. TF существует в двух формах - TF-альфа и TF-бета, способных связываться с протеинами или гликолипидами.

Coge-1 - это дисахарид Gal β 1-3 GalNAc, который O-гликозидно связан в альфа-аномерной конфигурации с серином или треонином гидроксиминокислот протеинов в карциномных клетках. Coge-1 соответствует TF-альфа структуре антигена Томсена-Фриденрайха и связывается только с протеинами на опухолях. Поэтому термины "Coge-1" и "антиген Томсена-Фриденрайха" не обязательно относятся к идентичным структурам.

Антиген Coge-1 в здоровых тканях и доброкачественных опухолях замаскирован другими углеводными компонентами, но открывается в большинстве карцином и в некоторых неэпителиальных злокачественных образованиях. Поэтому антиген coge-1 является специфичным антигеном панкарциномы (см. фиг. 20).

Coge-1 - важный опухолевый антиген. Coge-1 проявляется в более чем 60% первичных карцином толстой кишки и более чем в 90% метастазов рака толстой кишки в печени, а также в большинстве карцином других важных показаний - груди, легких, яичников, простаты - и в других видах желудочно-кишечного рака, включая рак желудка и карциному поджелудочной железы. Coge-1 - независимый прогностический маркер для больных карциномой толстой кишки, причем с повышением экспрессии Coge-1 растет смертность и сокращается выживаемость. Развитие метастазов в печени коррелирует с экспрессией Coge-1. У больных с Coge-1-положительной первичной карциномой метастазы в печень развиваются в 60% случаев, а риск метастазов в печень при Coge-1-отрицательных опухолях гораздо меньше (ниже 20%). Кроме метастазов в печень Coge-1 может также быть медиатором метастазов через эндотелий.

Исключительно высокая панкарциномная специфичность, прогностическая значимость и прямая связь с метастазами в печень делает антигены Томсена-Фриденрайха, особенно Coge-1, важнейшей целью при иммунотерапии рака.

Предпринимались попытки лечения на основе антигенов Томсена-Фриденрайха. Например, Shigoeka et al. (1999) описывают ингибирование метастазов в печень от обработанных нейраמידозой клеток 26 толстой кишки с помощью специфичного моноклонального антитела против антигена Томсена-Фриденрайха в модели на мышах. Однако ввиду трудности создания высокоспецифичных антител против TF и природы последних как изоформ IgM с довольно слабым сродством к одиночным доменам связывания до сих пор не удалось создать TF-специфичные антитела. К тому же некоторые антитела против TF-Ag клинически недопустимы, поскольку приводят к нежелательному распространению опухолевых клеток. В WO2006/012626 описано терапевтическое использование антител к антигену TF. Показано, что связывание TF-специфичных Abs ингибирует распространение опухолевых клеток (Jeschke, et.al. 2006).

Более того, предпринимались попытки создания вакцин на основе антигенов Томсена-Фриденрайха. Большинство из них сводилось к индуцированию реакций на антитела. Например, Livingston and Lloyd (2000) использовали ненатуральные конъюгаты TF, в которых синтетический TF произвольно связан с KLN. Эти конъюгаты вызывали гуморальную иммунную реакцию на синтетический TF, но не на TF на природных лигандах (Adluri et al., 1995). Так что они не являются TF-специфичными, поскольку не распознают TF на опухолевой структуре.

Спрингер и Десаи использовали вакцинацию вакциной T/Tn, составленной из гликопротеинов, выведенных из красных кровяных телец типов O и MN, что повысило выживаемость больных раком груди,

хотя образовывались лишь небольшие количества IgM. Тем не менее, IgM представляет менее зрелую иммунную реакцию, и многие исследования антител к TF-Ag включают антитела IgM, тогда как требуются более четко выраженные высокоспецифичные к TF иммунные реакции, предпочтительно реакции IgG.

Опубликовано мало работ по микроорганизмам, которые могут быть положительны к TF. Например, Springer et al. (Brit. J Haematol, 1 981,47,453-460, Transfusion 1979, vol. 19, no.3 pp. 233-249) сообщают об аэробном микроорганизме (E.coli 086), способном вырабатывать реакцию поликлональных антител у кур и людей, а также распознавать их в человеческих эритроцитах. Спрингер использовал адсорбцию проб анти-Т гемоагглютинации на обработанных сиалидазой Т-эритроцитах, чтобы приблизительно определить специфичность иммунной реакции. Однако обработка человеческих эритроцитов сиалидазой демаскирует несколько углеводных эпитопов, среди которых некоторые, но далеко не все представляют TF. Поэтому реакция Спрингера не проявляет специфичности к TF ввиду кросс-реакций. Соответствующий неспецифичный микроорганизм лишь ограниченно пригоден для вакцины, поскольку ввиду своей неспецифичности не способен вызвать сильную иммунную реакцию, направленную специфично против TF, а не других TF-подобных структур, и потенциально способную разрушить неопухольевые ткани или здоровые клетки.

Ввиду сложности и специфичности механизма гликозилирования пока не существует иммунотерапии больных раком на основе Core-1. Более того, не существует и доступных лекарственных средств, способных предотвратить развитие Core-1-положительных опухолей.

Обычная терапия начинается после диагностирования опухоли, когда она уже развилась и плохо поддается лечению. Поэтому для избавления больного от основной массы опухоли прибегают к агрессивной терапии с тяжелыми побочными явлениями (химиотерапия, радиотерапия, оперативное вмешательство). Иммунотерапевтические варианты в основном используются как вспомогательные при минимальных остатках болезни.

В основу настоящего изобретения поставлена задача создать средство для лечения или профилактики Core-1-положительных опухолей и желудочно-кишечных расстройств, а также способы получения таких средств.

Описание изобретения

Изобретение предусматривает нутрицевтические и фармацевтические композиции, содержащие Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, а также Core-1-положительные микроорганизмы и их фракции, способные вызывать иммунные реакции на несущие Core-1 опухолевые клетки и несущие Core-1 молекулы. Далее предлагаются способы выявления, отбора и выделения Core-1-положительных микроорганизмов, которые образуют действующий компонент питательных и фармацевтических композиций, способный вызывать иммунную реакцию на Core-1 у людей и животных. Также предлагаются гуморальные и клеточные тест-системы для иммунных реакций на Core-1, способы выработки антител и композиций антител к Core-1, Т-клеточные линии и клоны против Core-1 и функциональные дендритные клетки, представляющие Core-1.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает средство для создания или повышения уровня специфичных антител к Core-1 в человеческом организме, особенно против Core-1-положительных опухолей. Кроме того, изобретение обеспечивает средство включения специфической клеточной иммунной реакции на углеводную цель, особенно опухолевую специфичную углеводную цель, например, Core-1. Изобретение предусматривает также способы выявления и выделения пригодных Core-1-положительных микроорганизмов. Преимущество настоящего изобретения состоит также в очень низкой стоимости получения композиций ввиду их природы. Их можно быстро получать в промышленных ферментерах.

Антитела к Core-1, порождаемые композициями в соответствии с изобретением, служат механизмом иммунонаблюдения, способным предотвращать развитие первичных опухолей и распространение метастазов в большинстве (нераспознанных) случаев, однако только при достаточно сильной специфической иммунной реакции. Поэтому цель изобретения заключается в достижении высокого специфичного к Core-1 титра, предпочтительно в сочетании со специфичной клеточной реакцией, с использованием Core-1-положительных микроорганизмов, предпочтительно из кишечной флоры здоровых доноров, в качестве пищевых добавок для создания специфического иммунного щита против опухолей или для предотвращения или снижения вероятности появления Core-1-положительных опухолей и/или их метастазов.

А) Нутрицевтики, фармацевтические композиции и тесты иммунных реакций

В первом аспекте изобретение обеспечивает состав, выбранный из группы, включающей нутрицевтическую и/или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм и/или по меньшей мере одну Core-1-положительную фракцию или ее лизат, распознаваемые по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом. Таким образом, в соответствии с изобретением нутрицевтическая и/или фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм и/или по меньшей мере одну Core-1-положительную фракцию или ее лизат, распознаваемые и, соответственно, связываемые по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом при контакте.

Важная особенность настоящего изобретения состоит в том, что Core-1-положительный микроорга-

низм и/или по меньшей мере одна Core-1-положительная фракция или ее лизат распознаются по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом, а значит, Core-1-положительный микроорганизм и/или по меньшей мере одна Core-1-положительная фракция или ее лизат специфически связываются при контакте указанным антителом. Тогда структура Core-1 становится доступной для указанного Core-1-специфичного антитела в Core-1-положительном микроорганизме, не будучи "скрытой" другими структурами. Это важное свойство, которое можно подтвердить описываемыми далее тестами, обеспечивает то, что Core-1-специфичный микроорганизм и Core-1-положительная фракция или ее лизат, по меньшей мере, иммунохимически виртуально идентичны Core-1, а не образуют эпитоп, лишь сходный с Core-1. Тем самым гарантируется запуск иммунной реакции указанным Core-1-положительным микроорганизмом, который достаточно специфичен к Core-1. Такие Core-1-специфичные антитела, способные определять, что тот или иной микроорганизм несет Core-1, специфично распознают структуру Core-1 в опухолевой среде. Эти антитела способны определять, несут ли Core-1-положительные микроорганизмы в соответствии с изобретением структуру Core-1, специфично копируя антиген Core-1, имеющий место при желудочно-кишечных расстройствах и опухолях у людей. Это свойство специфичности отличает Core-1-положительные микроорганизмы в соответствии с изобретением от ранее известных микроорганизмов, предположительно несущих антиген Томсена-Фриденрайха. Как отмечалось выше и как будет показано в сравнительных примерах далее, известные микроорганизмы несут углеводные структуры, просто сходные с антигеном Томсена-Фриденрайха (или Core-1), и потому перекрестно реагируют, например, с PNA (арахисовым агглютинином), который используют для предположительного определения специфичности TF. Однако PNA не специфичен к TF, поскольку он реагирует со многими различными углеводными эпитопами. Поэтому отсутствует различие между TF-подобными (перекрестнореактивными) и собственно TF-структурами. Эти известные микроорганизмы не распознаются и, соответственно, не связываются Core-1-специфичными антителами (см. ниже). Отсюда следует, что они не несут антиген Core-1 и потому не могут вызвать Core-1-специфичную иммунную реакцию у человека или животных при введении, поскольку не распознают иммунохимических и иммунологических характеристик Core-1, чтобы запустить такую реакцию. Однако эта специфичная реакция необходима, чтобы привести в действие Core-1-специфичную иммунную реакцию и добиться терапевтического или профилактического эффекта.

Ввиду того, что микроорганизмы в соответствии с изобретением истинно положительны к Core-1, что подтверждается с помощью Core-1-специфичных антител, композиции в соответствии с изобретением содержат Core-1-положительные микроорганизмы, которые вызывают или усиливают мощную иммунную реакцию на антиген Core-1. Состав в соответствии с изобретением активирует иммунную систему специфичным для данной опухоли образом, создавая высокие уровни специфичных к Core-1 антител. Насколько нам известно, настоящее изобретение предусматривает первую антиген-специфичную нутрицевтическую добавку для продовольственных и фармацевтических композиций, способную активировать специфичную иммунную противоопухолевую защиту, и первую нутрицевтическую добавку, способную вызывать антиген-специфичную иммунную реакцию на углеводную, в частности, Core-1, опухоль.

Термин Core-1-специфичное антитело, а также предпочтительно Core-1-специфичные антитела, комбинации Core-1-специфичных антител или комбинации предпочтительно Core-1-специфичных антител разъясняются далее в разделе "Определения" и в других местах.

В соответствии с одним из аспектов изобретения Core-1-положительный микроорганизм и/или Core-1-положительный лизат или его фракция распознается по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом, выбранным из группы, которая включает

Nemod - TF1,
Nemod - TF2,
A78-G/A7,
НВ-Т1 и
НН8.

Доказано, что эти антитела высоко специфичны к Core-1 и не проявляют или почти не проявляют перекрестной реактивности к другим углеводным структурам кроме Core-1. Эти антитела распознают Core-1 (в альфа- или бета-аномерной форме) на белках по типу опухолей, предпочтительно НН8, А78-Г/А7, Nemod-TF2, Nemod-TF1; наиболее предпочтительно А78-Г/А7, Nemod-TF2, Nemod-TF1. Для усиления специфичности можно использовать два или больше из этих антител, чтобы проверить, представляет ли собой данный микроорганизм Core-1-положительный микроорганизм в соответствии с изобретением.

Это связывание Core-1-специфичного антитела специфично для углеводной структуры, а значит, выявить, обладает ли данная углеводная структура такими же критериями связывания и иммунохимическими характеристиками, что и связанная с человеческим раком Core-1, можно путем установления чувствительности к периодату связывания Core-1-специфичного антитела. Обработка периодатом разрушает наружное углеводное кольцо углеводных структур, включая Core-1, и тем самым уничтожает эпитоп Core-1. После периодатного окисления обычно ослабляется связывание антител. Поэтому, если связывание антитела специфично к Core-1, связывание после периодатной обработки уменьшается. Как ни

странно, установлено, что у многих организмов, изначально не Core-1-положительных, после обработки периодатом возрастает связывание Ab. Значит, периодатное окисление вскрывает новые углеводные структуры, по всей видимости, схожие с TF. Однако усиленное связывание после периодатной обработки свидетельствует о том, что данный микроорганизм не был изначально Core-1-положительным, поскольку такая обработка разрушает эпитоп Core-1, если он был уже доступен для Core-1-специфичных антител на Core-1-положительном микроорганизме. Тем не менее, микроорганизмы, которые сами по себе не Core-1-положительны, а могут быть преобразованы в Core-1-положительные химической обработкой, например периодатом, также охватываются объемом изобретения и могут использоваться после периодатной обработки (вскрывающей Core-1) как компоненты составов в соответствии с изобретением.

В соответствии с одним из аспектов изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция вышеописанного типа содержит по меньшей мере один Core-1 положительный микроорганизм, распознаваемый и связываемый Core-1-специфичным антителом NEMOD-TF1, предпочтительно комбинацией NEMOD-TF2 или A78-G/A7 и NEMOD-TF1, причем это связывание чувствительно к периодату, а наиболее предпочтительно комбинацией NEMOD-TF2 или A78-G/A7 с NEMOD-TF1, но не A68-B/A11. Этот профиль очень удобен, поскольку напоминает критерии связывания структуры Core-1, имеющей отношение к раку у человека.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения такой состав инициирует или усиливает иммунную реакцию на Core-1 в по меньшей мере одном человеческом или животном организме, распознавая антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку. Поскольку микроорганизм Core-1-положительный, его введение инициирует или усиливает иммунную реакцию на антиген Core-1. Таким путем устанавливается иммуносторожевой механизм, который может уничтожать или сокращать количество вновь образующихся опухолевых клеток, несущих Core-1, тем самым предотвращая или приостанавливая рост первичной опухоли. Состав в соответствии с настоящим изобретением при введении инициирует или усиливает иммунную реакцию на Core-1 в по меньшей мере одном человеческом или животном организме и/или служит щитом против Core-1-положительных раковых клеток, обладая потенциалом для уничтожения Core-1-положительных раковых клеток, и/или уменьшает или предотвращает появление Core-1-положительных клеток или метастазов, и/или уменьшает или предотвращает распространение метастазов Core-1-положительной опухоли, и/или усиливает иммунную реакцию.

Следовательно, изобретение создает нутрицевтическую добавку, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, который инициирует у людей или животных иммунную реакцию с распознаванием антигена Core-1, и/или Core-1-положительной опухолевой клетки, и/или Core-1-положительного заболевания. Обычные пробиотики и пребиотики стимулируют иммунную систему неспецифично. В известном уровне техники не существует специфичных противовоспалительных систем, в том числе против Core-1.

Указанные Core-1-положительные микроорганизмы, предпочтительные Core-1-положительные микроорганизмы, фракции Core-1-положительных микроорганизмов и предпочтительные фракции Core-1-положительных микроорганизмов подробно рассматриваются в разделе "Определения" и в других местах. Указанный Core-1-положительный микроорганизм специфично распознается по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом. Также рассматриваются способы выявления и выделения указанных микроорганизмов или их фракций.

Core-1-положительный микроорганизм или его фракция является действующим компонентом, который придает специфичность иммунной реакции на Core-1, антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку, несущую антиген, сходный с Core-1.

Указанный Core-1-специфичный микроорганизм и/или Core-1-положительный лизат или его фракция обеспечивает специфическую иммунизацию против Core 1 при введении указанного Core-1-специфичного микроорганизма. Способность вызывать специфическую иммунизацию против Core 1 определяется одним из следующих способов:

а) указанный Core-1-положительный микроорганизм специфически распознается по меньшей мере одним, предпочтительно двумя Core-1-специфичными антителами, выбранными из группы, включающей NEMOD - TF1, NEMOD - TF2, A78-G/A7, NN8 и NB-T1,

где связывание указанных антител предпочтительно чувствительно к периодату и ослабляется после обработки периодатом;

б) указанный Core-1-специфичный микроорганизм и/или Core-1-положительный лизат или его фракция признается положительным по меньшей мере в одном тесте на гуморальную иммунную реакцию, как описано здесь;

с) указанный Core-1-специфичный микроорганизм и/или Core-1-положительный лизат или его фракция признается положительным по меньшей мере в одном тесте на клеточную иммунную реакцию, как описано здесь.

Это гарантирует, что данный микроорганизм действительно Core-1-положительный и способен запускать иммунную реакцию на антиген Core-1. Однако, как отмечалось выше, объем изобретения охватывает и микроорганизмы, преобразованные из Core-1-отрицательных в Core-1-положительные путем химической обработки, например, периодатом. Микроорганизмы, которые становятся Core-1-положительными после соответствующей обработки, также принадлежат к настоящему изобретению, и их характеристики определяются теми же приемами и тестами, что и свойства микроорганизмов, уже несущих открытый эпитоп Core-1.

Для повышения специфичности состава к Core-1 можно использовать микроорганизм, который является Core-1-положительным или может быть сделан таковым путем, например, обработки периодатом, и специфично распознается по меньшей мере двумя Core-1-специфичными антителами, выбранными из группы, включающей

Nemod - TF1,
Nemod - TF2 и
A78-G/A7,

где связывание указанных антител предпочтительно чувствительно к периодату и ослабляется после обработки периодатом.

Core-1-положительный микроорганизм или его фракция может включать по меньшей мере одну углеводную структуру, выбранную из группы, включающей №№ 1, 2, 3, 4 и/или 5 с фиг. 19 и/или их повторяющиеся единицы. Как видим, Core-1-положительные организмы могут быть связаны на альфа- или бета-аномерной конфигурации.

Более того, авторами неожиданно установлено, что существуют Core-1-положительные штаммы *Bacteroides*, например *Bacteroides ovatus*. Это не было известно ранее. Итак, Core-1-положительные *Bacteroides* также могут использоваться в составе в соответствии с настоящим изобретением, где указанные Core-1-положительные *Bacteroides* распознаются по меньшей мере одним, предпочтительно двумя Core-1-специфичными антителами, выбранными из группы, включающей

Nemod - TF1,
Nemod - TF2,
A78-G/A7,
HB-T1 и
HH8.

Связывание указанных антител предпочтительно чувствительно к периодату и ослабляется после обработки периодатом.

Предпочтительно указанные Core-1-положительные *Bacteroides* отбираются у здорового донора. Указанные Core-1-положительные *Bacteroides* могут представлять собой или быть связанными с *Bacteroides ovatus*, например, с новыми штаммами AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728) и/или AG6 или гомологом MU1, причем указанный гомолог отличается тем, что распознаются по меньшей мере одним, предпочтительно двумя Core-1-специфичными антителами, выбранными из группы, включающей

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

где связывание указанных антител предпочтительно чувствительно к периодату и ослабляется после обработки периодатом. Как показано в примерах, эти штаммы вызывают очень сильную иммунную реакцию на Core-1 и относятся к *Bacteroides ovatus*. Они показывают очень сильную экспрессию Core1, содержат много эпитопов Core-1 и связываются с Core-1-специфичными mAb (TF1 и TF2), причем связывание чувствительно к периодату, а значит, Core-1 доступен на поверхности. Экспрессия и выявление Core1 не изменяются после энзиматического дигерирования, пастеризации и/или лиофилизации, что позволяет готовить оральные фармацевтические композиции. Более того, нами показано, что для AG6 связанная с опухолью структура Core-1 в альфа-аномерной конфигурации служит разветвляющим компонентом внутри повторяющейся единицы (см. также № 5 на фиг. 19). Это очень важно, потому что открытая локализация TF-антигена внутри капсульного полисахарида может усилить гуморальную иммунную реакцию на Core-1 у человека за счет лучшего распознавания и связывания Core-1-специфичных антител.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает состав, выбранный из группы, включающей нутрицевтическую и/или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм и/или по меньшей мере один Core-1-положительный лизат или его фракцию, где Core-1-положительный микроорганизм или Core-1-положительный лизат или его фракция распознается, по меньшей мере, одним Core-1-специфичным антителом, причем Core-1-специфичное антитело выбрано из группы, включающей NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A78-G/A7, HB-T1 и/или HH8.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает указанный состав, в котором Core-1-положительный микроорганизм связан Core-1-специфичными антителами NE-

MOD-TF2 и NemoD-TF1, причем связывание указанных антител чувствительно к периодату и существенно ослабевает после обработки периодатом.

Состав в соответствии с настоящим изобретением (например, нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая Core-1-положительный микроорганизм) может использоваться для профилактики или лечения, а также для поддержания иммунологической активности. Фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм - который также может быть превращен в Core-1-положительный химической обработкой, например, периодатом, и фармацевтически приемлемый носитель. Состав по изобретению (например, лекарство, содержащее Core-1-положительный микроорганизм) готовят и применяют известными способами. Например, состав можно смешивать с обычными галеновыми адьювантами с получением композиции, пригодной для того или иного способа введения. Так, композиции согласно изобретению можно применять в смеси с обычными фармацевтически приемлемыми органическими или неорганическими носителями для парентерального или энтерального применения, которые не вступают в нежелательные реакции с действующими веществами. К числу таких фармацевтически приемлемых носителей относятся вода, растворы солей, спирты, растительные масла, полиэтиленгликоли, желатин, лактоза, амилоза, стеарат магния, вязкий парафин, эфирное масло, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, гидроксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон и т.п. Подробности см. далее.

Такой состав может вызывать или усиливать гуморальную и/или клеточную иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере в одном человеческом или животном организме, распознающем антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку, предпочтительно клеточную иммунную реакцию типа Th1. В предпочтительном варианте осуществления состав вызывает или усиливает гуморальную и/или клеточную иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере в одном человеческом или животном организме, распознающем антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку, предпочтительно клеточную иммунную реакцию за счет активации CD4-положительных Т-клеток Th1 и/или CD8-положительных цитотоксичных Т-клеток.

Изобретение также предусматривает нутрицевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, где Core-1-положительный микроорганизм распознается и связывается по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, порождая или усиливая иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере в одном человеческом или животном организме, распознающем антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку.

Далее изобретение предполагает фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, которая порождает или усиливает иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере в одном человеческом или животном организме, распознающем антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку.

Изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, где Core-1-положительный микроорганизм распознается и связывается по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом при контакте с соответствующим антителом, которая порождает или усиливает иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере в одном человеческом или животном организме, распознающем антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку.

Изобретение обеспечивает нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, где Core-1-положительный микроорганизм распознается и связывается по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, которая порождает или усиливает иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере в одном человеческом или животном организме.

Указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную или клеточную иммунную реакцию на Core-1. Активация клеточного иммунитета в дополнение к гуморальному заметно усиливает профилактический или терапевтический потенциал состава в соответствии с настоящим изобретением.

В еще одном варианте осуществления изобретение предусматривает нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, которая порождает или усиливает гуморальную и клеточную иммунную реакцию в человеческом или животном организме, распознающем антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция порождает или усиливает Core-1-специфическую иммунную реакцию по меньшей мере одним в человеческом или животном организме, служащую защитой от Core-1-положительных раковых клеток, поскольку обладает потенциалом уничтожения Core-1-положительных раковых клеток.

Нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, может вызывать Core-1-специфичную иммунную реакцию для защиты от Core-1-положительных раковых клеток, обладая потенциалом уничтожения этих клеток, как показано здесь, порождая Core-1-специфичные антитела, которые обладают цитотоксичностью по отношению к Core-1-положительным раковым клеткам, эффективно убивая их, или путем секре-

ции TNF-альфа и/или INF-гамма за счет Core-1-специфичных реакций T-клеток, которые, как известно специалистам, являются суррогатными маркерами медирированного специфическими цитоксичными T-клетками уничтожения опухолевых клеток, несущих Core-1, как описано далее в примерах.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, используется для создания Core-1-специфической иммунной реакции, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток, поскольку обладает потенциалом уничтожения этих клеток, как описано выше, при оральном введении композиции (по меньшей мере одному) здоровому человеку.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, служит для уменьшения, а предпочтительно для недопущения Core-1-положительной опухоли при оральном введении композиции (по меньшей мере одному) здоровому человеку.

Нутрицевтическая или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением применяется для лечения Core-1-положительной опухоли по меньшей мере у одного человека или животного. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, служит для уменьшения, а предпочтительно для недопущения Core-1-положительной опухоли или метастаза.

В еще одном варианте осуществления нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, уменьшает или предотвращает распространение метастаза Core-1-положительной опухоли по меньшей мере у одного человека или животного при приеме.

В еще одном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере два различных Core-1-положительных микроорганизма или их фракции.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию в сочетании по меньшей мере с одним другим благоприятным микроорганизмом, вызывающим или усиливающим иммунную реакцию.

В еще одном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, служит для лечения Core-1-положительной опухоли путем орального введения больным.

В еще одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, служит для лечения Core-1-положительной опухоли путем орального введения больным.

В другом варианте осуществления изобретения указанная нутрицевтическая или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением содержит по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм и по меньшей мере одну фракцию Core-1-положительного микроорганизма, предпочтительно от нескольких Core-1-положительных микроорганизмов.

Указанная гуморальная иммунная реакция на Core-1 представляет собой реакцию антител на Core-1, которая выявляется по меньшей мере одним из тестов на гуморальную иммунную реакцию №№ 1, 2, 3, 4, 5 или 6, подробно рассмотренными далее.

Изобретение также предусматривает тест на гуморальную иммунную реакцию (тест на гуморальную иммунную реакцию 1) на Core-1, в котором проверяются связывание антитела, антитела в сыворотке или полученные из сыворотки, плазмы или фекалий, ELISA (иммунофазный твердоферментный анализ) на гликопротеины, включая азиалогликофорин и гликофорин, или азиалогликофорин и обработанный периодатом азиалогликофорин, или азиалогликофорин и гликофорин и обработанный периодатом азиалогликофорин, при котором положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно большее связывание антител с азиалогликофорином, чем с гликофорином или обработанным периодатом азиалогликофорином. Азиалогликофорин содержит структуру Core-1, а гликофорин не содержит. Таким образом, положительная гуморальная иммунная реакция, запущенная Core-1-положительным микроорганизмом в соответствии с изобретением, приводит к обнаруживаемому связыванию с азиалогликофорином при слабом связывании или отсутствии связывания с гликофорином. Обработанный периодатом азиалогликофорин утрачивает эпитоп Core-1 и потому тоже представляет собой тест-систему для установления того, запускается ли положительная гуморальная иммунная реакция Core-1-положительным микроорганизмом композиции в соответствии с изобретением. В более предпочтительном варианте связывание становится существенно сильнее после введения нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного микроорганизма или его фракции либо содержащих их составов.

В указанном тесте на гуморальную иммунную реакцию 1 проверяются связывание антител в сыворотке или антител, полученных из сыворотки, плазмы или фекалий в ELISA (иммунофазный твердофер-

ментный анализ) на гликопротеины, включая азиалогликофорин и гликофорин или обработанный периодом азиалогликофорин, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно большее связывание антител с азиалогликофорин, чем с гликофорин или обработанным периодом азиалогликофорин. В предпочтительном варианте осуществления указанный тест включает азиалогликофорин и гликофорин и обработанный периодом азиалогликофорин. В предпочтительном варианте осуществления сигнал от азиалогликофорина по меньшей мере на 50% выше, чем от гликофорина и по меньшей мере на 30% выше, чем от обработанного периодом азиалогликофорина. В предпочтительном варианте осуществления сигнал от азиалогликофорина по меньшей мере в 2 раза выше, чем от гликофорина и по меньшей мере в 1,5 раза выше, чем от обработанного периодом азиалогликофорина, в более предпочтительном случае сигнал от азиалогликофорина по меньшей мере в 3 раза выше, чем от гликофорина, и/или по меньшей мере в 2 раза выше, чем от обработанного периодом азиалогликофорина, в оптимальном же варианте сигнал от азиалогликофорина по меньшей мере в 5 раз выше, чем от гликофорина, и/или по меньшей мере в 4 раза выше, чем от обработанного периодом азиалогликофорина. В предпочтительном варианте осуществления сигнал от азиалогликофорина существенно увеличивается после введения композиции в соответствии с изобретением и по меньшей мере на 30% выше, чем от обработанного периодом азиалогликофорина. В предпочтительном варианте осуществления сигнал от азиалогликофорина на 50% выше, предпочтительно на 80% выше, а оптимально становится на 100% выше после введения композиции в соответствии с изобретением и по меньшей мере на 30% выше, чем от обработанного периодом азиалогликофорина.

Предпочтительный вариант теста 1 на гуморальную иммунную реакцию описан в примере 11.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на гуморальную иммунную реакцию (тест на гуморальную иммунную реакцию 2) на Core-1, в котором проверяются связывание антитела, антитела в сыворотке или полученные из сыворотки, плазмы или фекалий, ELISA (иммунофазный твердоферментный анализ) на углеводные структуры, связанные с полиакриламидом (конъюгаты PAA), включая Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, Gal бета 1-3 GalNAc бета 1-PAA, GlcNAc бета1-2 Gal бета 1-3 GalNAc альфа 1-PAA, и предпочтительно обработанные периодом Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно более сильное связывание антитела или антител с Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, чем с обработанной периодом Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, а предпочтительно также более сильное связывание антитела или антител с Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, чем с Gal бета 1-3 GalNAc бета 1-PAA, или существенно более сильное связывание с Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA антител, возникших у человека или животного после иммунизации композицией в соответствии с изобретением (например, иммунными сыворотками) по сравнению с антителами, возникшими у человека или животного до иммунизации ((например, доиммунными сыворотками)). Эти искусственные полиакриламидные структуры также содержат структуры, близкие к Core-1, и пригодны для определения специфичности запущенной гуморальной иммунной реакции.

В указанном тесте на гуморальную иммунную реакцию 2 проверяются связывание антител в сыворотке или антител, полученных из сыворотки, плазмы или фекалий в ELISA (иммунофазный твердоферментный анализ) на углеводные структуры, связанные с полиакриламидом (конъюгаты PAA), включая Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, Gal бета 1-3 GalNAc бета 1-PAA, GlcNAc бета1-2 Gal бета 1-3 GalNAc альфа 1-PAA, и предпочтительно обработанные периодом Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно более сильное связывание антител с Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, чем с обработанной периодом Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, а предпочтительно также с Gal бета 1-3 GalNAc бета 1-PAA. В предпочтительном варианте осуществления связывание с Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA по меньшей мере, в 2 раза сильнее связывания с обработанной периодом Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA и с Gal бета 1-3 GalNAc бета 1-PAA.

В предпочтительном варианте осуществления сигнал ELISA от Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA по сравнению с сигналом ELISA от GlcNAc бета1-2 Gal бета 1-3 GalNAc альфа 1-PAA на 50% выше после иммунизации композицией в соответствии с изобретением по сравнению с сигналом ELISA от Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA по сравнению с сигналом ELISA от GlcNAc бета1-2 Gal бета 1-3 GalNAc альфа 1-PAA до иммунизации, предпочтительно по меньшей мере на 70% выше, а желательно на 100% выше.

В предпочтительном варианте осуществления после иммунизации композицией в соответствии с изобретением сигнал ELISA от Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA на 30% выше по сравнению с сигналом ELISA от Gal бета1-3 GlcNAc альфа 1-PAA предпочтительно по меньшей мере на 50% выше, желательно на 70% выше, а оптимально на 100% выше.

Предпочтительный вариант теста 2 на гуморальную иммунную реакцию описан в примере 11.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на гуморальную иммунную реакцию (тест на гуморальную иммунную реакцию 3) на Core-1, в котором проверяются связывание антитела, антитела в сыворотке или полученные из сыворотки, плазмы или фекалий, в проточной цитометрии на связывание с клетками, содержащими NM-D4 или NM-F9 и NM-wt или NM-H9 (или NM-H9D8 DSM ACC2806), где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно более сильное связывание антител с NM-D4 или NM-F9 (оба несут антиген Core-1), чем с NM-wt или

NM-H9 (не несут антиген Core-1) и/или существенно более сильное связывание антител с NM-D4 или NM-F9 после введения композиции в соответствии с изобретением.

В указанном тесте на гуморальную иммунную реакцию 3 проверяются связывание антител в сыворотке или антител, полученных из сыворотки, плазмы или фекалий, в проточной цитометрии на связывание с клетками, содержащими NM-D4 или NM-F9 и NM-wt или NM-H9, показывает существенно более сильное связывание антител с NM-D4 или NM-F9, чем с NM-wt или NM-H9. В предпочтительном варианте осуществления доля положительных клеток в NM-D4 или NM-F9 в 2 раза больше, чем в NM-wt или NM-H9, предпочтительно в 5 раз.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения результаты проточной цитометрии рассчитываются по формуле:

$(\% \text{ положительных клеток в NM-D4 или NM-F9 иммунной пробы} - \% \text{ положительных клеток в NM-D4 или NM-F9 доиммунной пробы}) / (\% \text{ положительных клеток в NM-wt или NM-H9 иммунной пробы} - \% \text{ положительных клеток в NM-wt или NM-H9 доиммунной пробы}) = X$, где (% положительных клеток в NM-wt или NM-H9 иммунной пробы - % положительных клеток в NM-wt или NM-H9 доиммунной пробы) ≥ 1 , а тест на гуморальную иммунную реакцию положителен, если $X \geq 10$, предпочтительно $X > 20$, оптимально $X > 30$.

Предпочтительный вариант теста 3 на гуморальную иммунную реакцию описан в примере 11.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на гуморальную иммунную реакцию (тест на гуморальную иммунную реакцию 4) на Core-1, в котором проверяются связывание антитела, антитела в сыворотке или полученные из сыворотки, плазмы или фекалий, в иммунофлуоресцентном анализе на связывание с клетками, содержащими NM-D4 или NM-F9, и NM-wt или NM-H9, а предпочтительно также с обработанной периодатом NM-D4 или NM-F9, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает более сильное связывание данного количества антитела или антител с NM-D4 или NM-F9 (оба несут антиген Core-1), чем с NM-wt или NM-H9 (не несут антиген Core-1) или с обработанной периодатами NM-D4 или NM-F9 (где антиген Core-1 разрушается при обработке периодатом) и/или существенно более сильное связывание антител с NM-D4 или NM-F9 после введения композиции в соответствии с изобретением.

В указанном тесте на гуморальную иммунную реакцию 4 проверяются связывание антител в сыворотке или антител, полученных из сыворотки, плазмы или фекалий, в иммунофлуоресцентном анализе на связывание с клетками, содержащими NM-D4 или NM-F9, и NM-wt или NM-H9, а предпочтительно также с обработанной периодатом NM-D4 или NM-F9, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает более сильное связывание данного количества антитела или антител с NM-D4 или NM-F9, чем с NM-wt или NM-H9 или с обработанной периодатами NM-D4 или NM-F9, а предпочтительно также с обработанной периодатом NM-D4 или NM-F9. В предпочтительном варианте осуществления связывание с NM-D4 или NM-F9 гораздо заметнее по интенсивности свечения и/или доле флуоресцентно положительных клеток среди клеток NM-D4 или NM-F9, чем доля флуоресцентно положительных клеток среди NM-D4 или NM-F9 после обработки периодатом. Флуоресцентный тест можно сделать более количественным путем последовательного разбавления антисывороток и/или фотографирования в одинаковых условиях экспозиции.

Пригодны и такие испытания на Core-1-положительность гуморальной иммунной реакции, как использование различных Core-1-положительных клеток, например, ZR-75-1, САМА-1, КG-1, А-204, и линий Core-1-отрицательных клеток, как ВТ-20, НТ-29, в иммунофлуоресцентном анализе или проточной цитометрии, или других несущих Core-1 молекул, например, Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-BSA или Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-KLN, или гликопептидов с Core-1, с обработкой периодатом клеток или антигенов либо без нее, предпочтительно в сочетании с отрицательными молекулами без Core-1, например, BSA (альбумином бычьей сыворотки), или с сиаилированными структурами Core-1, в соответствующих тест-системах, предпочтительно ELISA, проточной цитометрии или иммунофлуоресценции. В принципе те же углеводные структуры, связанные с полиакриламидом или несущими белками (гликофориновый белок позвончика) или липидами, используемые в вышеописанных тестах 1-4, могут использоваться и в связи с другими несущими молекулами (протеины позвончика, пептиды или полипептиды, липиды) или химическими структурами, как BSA, KLN (гемоцианин лимфы улитки) или укороченные пептиды химических структур, применяемые в хроматографических колонках.

Специалисты легко подберут подходящие несущие молекулы для получения нужных углеводных структур, связанных с несущими молекулами при наличии линкера или без него. Специалистам также нетрудно подобрать те клетки или антигены, обработанные или не обработанные периодатом, и выбрать или модифицировать методику испытаний гуморальной иммунной реакции на Core-1. Однако вышеописанным тестам 1-4 на гуморальную иммунную реакцию и их комбинациям в настоящем изобретении отдается предпочтение ввиду их особой специфичности, подтверждаемой примерами.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на гуморальную иммунную реакцию (тест на гуморальную иммунную реакцию 5) на Core-1, в котором: а) инкубируют необходимое количество ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 и/или NM-wt, меченых необходимым количеством европия или хрома-51, с необходимым количеством антитела, антител в сыворотке или антител, выделенных из

сыворотки, с соответствующим количеством комплемента в течение необходимого времени (обычно от 3 до 5 ч или всю ночь)

b) измеряют лизис клеток, опреобдяля количество европия или хрома-51, выделившихся после инкубации в случаях, когда (а) положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает больший лизис клеток NM-D4 или NM-F9, чем NM-wt или NM-H9, либо более высокий лизис клеток NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, чем лизис без комплемента, и/или лизис без антитела, и/или лизис с антителом или антителами, которые не связываются или меньше связываются с NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1.

В указанном тесте на гуморальную иммунную реакцию 5 проверяется специфичная зависимость от комплемента цитотоксичность против Core-1 (CDC), эффекторный механизм, медируемый определенными антителами, запускающими гуморальную иммунную реакцию, или Core-1-специфичными антителами при испытании лизиса клетки-мишени. Тест заключается в инкубации необходимого количества меченых Core-1-положительных клеток-мишеней, например, ZR75-1, предпочтительно NM-D4 или NM-F9, с соответствующими количествами антител в сыворотке или антител, выделенных из сыворотки, или изолированного антитела против Core-1, с соответствующим количеством комплемента в течение необходимого времени обычно от 3 до 5 ч. Core-1-положительные опухолевые клетки метят европием или хромом-51, что позволяет измерять количество клеток, подвергшихся лизису. Оно определяется предпочтительно по выделению европия или хрома-51 после инкубации. Специалисты легко подберут подходящий контроль, например, Core-1-отрицательные клетки, предпочтительно NM-wt и/или NM-H9, антитело или смесь антител, не связывающихся с клеткой-мишенью, и/или без комплемента. Тест можно оптимизировать по количествам антител, меченых опухолевых клеток, концентрации комплемента, времени инкубации и т.п.

Зависимость от комплемента цитотоксичность (CDC) в соответствии с изобретением предпочтительно определяется тестом по высвобождению европия. Клетки-мишени NM-D4 инкубируют 10 мин при 4°C в 800 мкл буфера с европием (50 мМ HEPES, pH 7,4, 93 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ диэтиленetriаминпентауксусной кислоты, 2 мМ ацетата европия (III)), подвергают электрофорезу (710 В, 1 импульс, 30 мкс) в аппарате Multiprogator (фирмы Eppendorf), а затем инкубируют на льду еще 10 мин. После этого клетки промывают 5 раз в RPMI/5% FCS (фетальная телячья сыворотка) и высевают в 96-луночный планшет с круглым дном (фирмы Munc; 5×10³/лунку). После добавления 20 мкл раствора антитела при разных разбавлениях или соответствующего контроля (средняя изотипичная контрольная среда человеческого IgM), пробы инкубируют 20 мин при комнатной температуре. В соответствующие лунки добавляют 10 мкл разбавленного 1:10 комплемента из крольчат. В контрольные лунки вместо комплемента добавляют 10 мкл RPMI/5% FCS. Для определения спонтанного выделения клетки-мишени инкубируют только со средами, а максимальное выделение устанавливают по полному лизису мишени этанолом. После 4 ч инкубации при 37°C планшет центрифугируют 5 мин 500×g и пипеткой вводят 20 мкл супернатанта из каждой лунки в 200 мкл на лунку стимулирующего раствора (фирмы Perkin-Elmer Wallac) в заранее подготовленный планшет с плоским дном (типа Nunc-Immunoplate Maxisorp). После 15 мин инкубации при комнатной температуре измеряют флуоресценцию (флуорометр Victor² фирмы Perkin-Elmer Wallac). Специфичная цитотоксичность рассчитывается из уравнения (экспериментальный лизис - спонтанный лизис)/(максимальный лизис - спонтанный лизис) ×100%.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на гуморальную иммунную реакцию (тест на гуморальную иммунную реакцию 6) на Core-1, в котором:

a) инкубируют необходимое количество ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 и/или NM-wt, меченых необходимым количеством европия или хрома-51, с необходимым количеством антитела, антител в сыворотке или антител, выделенных из сыворотки, с соответствующим количеством, по меньшей мере, одной иммуноэффекторной клетки или смеси иммуноэффекторных клеток либо периферийных мононуклеарных клеток крови в течение необходимого времени, обычно от 3 до 5 ч или всю ночь,

b) измеряют лизис клеток, определяя количество европия или хрома-51, выделившихся после инкубации в случаях, когда (а) положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает больший лизис клеток NM-D4 или NM-F9, чем NM-wt или NM-H9, либо более высокий лизис клеток NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, чем лизис без антитела, и/или лизис с антителом или антителами, которые не связываются или меньше связываются с NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1.

В указанном тесте на гуморальную иммунную реакцию 6 проверяется специфичная зависимость от Core-1-специфичного антитела цитотоксичность против Core-1 (ADCC), эффекторный механизм, медируемый определенными антителами, запускающими гуморальную иммунную реакцию, или Core-1-специфичными антителами при испытании лизиса клетки-мишени в сочетании с иммуноэффекторными клетками. Тест заключается в инкубации необходимого количества меченых Core-1-положительных клеток-мишеней, например, ZR75-1, предпочтительно NM-D4 или NM-F9, с соответствующими количествами антител в сыворотке или антител, выделенных из сыворотки, или изолированного антитела против Core-1, с соответствующим количеством иммуноэффекторных клеток, например, присутствующих в периферийных мононуклеарных клетках крови (PBMC), в течение необходимого времени, обычно от 3 до 5 ч или всю ночь. Core-1-положительные опухолевые клетки метят европием или хромом-51, что позволя-

ет измерять количество клеток, подвергшихся лизису. Оно определяется предпочтительно по выделению европия или хрома-51 после инкубации. Специалисты легко подберут подходящий контроль, например Core-1-отрицательные клетки (предпочтительно NM-wt и/или NM-H9), антитело или смесь антител, не связывающихся с клеткой-мишенью, и/или без иммуноэффекторных клеток (например, РВМС). Тест можно оптимизировать по количествам антител, меченых опухолевых клеток, иммуноэффекторных клеток, времени инкубации и т.п.

Зависимая от комплемента цитотоксичность (ADCC) в соответствии с изобретением предпочтительно определяется тестом по высвобождению европия. Клетки-мишени NM-D4 инкубируют 10 мин при 4°C в 800 мкл буфера с европием (50 mM HEPES, pH 7,4, 93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2mM MgCl₂, 10 mM диэтиленetriаминпентауксусной кислоты, 2 mM ацетата европия (III)), подвергают электрофорезу (710 В, 1 импульс, 30 мкс) в аппарате Multiporator (фирмы Eppendorf), а затем инкубируют на льду еще 10 мин. После этого клетки промывают 5 раз в RPMI/5% FCS (фетальная телячья сыворотка) и высевают в 96-луночный планшет с круглым дном (фирмы Munc; 5×10³/лунку). После добавления 20 мкл Core1-специфичных антител в разных концентрациях (конечная концентрация от 0,05 до 50 мкг/мл в 200 мкл инкубационного объема) или соответствующего контроля (средняя изотипичная контрольная среда человеческого IgM), вводят эффекторные клетки РВМС (периферийные мононуклеарные клетки крови человека, 80 мкл) при различных соотношениях эффекторные клетки:клетки-мишени от 100:1 до 10:1, предпочтительно 50:1. Для определения спонтанного выделения добавляют 80 мкл раствора RPMI/5% FCS без эффекторных клеток. Максимальное высвобождение устанавливают по полному лизису мишени эталонном.

После 4 ч инкубации при 37°C планшет центрифугируют 5 мин 500×g и пипеткой вводят 20 мкл свободного от клеток супернатанта из каждой лунки в 200 мл на лунку стимулирующего раствора (фирмы Perkin-Elmer Wallace) в заранее подготовленный планшет с плоским дном (типа Nunc-Immunoplate Maxisorp). После 15 мин инкубации при комнатной температуре измеряют флуоресценцию (флуорометр Victor² фирмы Perkin-Elmer Wallac). Специфичная цитотоксичность рассчитывается из уравнения (экспериментальный лизис - спонтанный лизис)/(максимальный лизис - спонтанный лизис) × 100%.

В предпочтительном варианте осуществления в указанных тестах на гуморальную иммунную реакцию 1-6 также проводят до испытания:

- a) введение нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного микроорганизма или его фракции либо содержащих их составов человеку или животному;
- b) выделяют антитело, антитела в сыворотке либо антитела, выделенные из сыворотки, плазмы или фекалий.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает тест на гуморальную иммунную реакцию с целью определения способности состава, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции или лизата, как описано выше, вызывать или усиливать гуморальную иммунную реакцию на Core-1 у человека или животного, в котором:

- a) вводят указанный состав, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию или лизат, как описано выше, человеку или животному;
- b) выделяют антитело, антитела в сыворотке либо антитела, выделенные из сыворотки, плазмы или фекалий;
- c) определяют связывание антитела, антител в сыворотке либо антител, выделенных из сыворотки, плазмы или фекалий, путем:

(i) ELISA (иммунофазного твердоферментного анализа) на гликопротеины, включая азиалогликофорин и гликофорин, или азиалогликофорин и обработанный периодатом азиалогликофорин, или азиалогликофорин и гликофорин и обработанный периодатом азиалогликофорин, при котором положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно большее связывание указанного антитела с азиалогликофорином, чем с гликофорином или обработанным периодатом азиалогликофорином, и существенно большее связывание указанного антитела с азиалогликофорином, чем у антитела или антител, выделенных у того же человека или животного до введения указанной композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции или лизата; и/или

(ii) ELISA (иммунофазного твердоферментного анализа) на углеводные структуры, связанные с полиакриламидом (конъюгаты PAA), включая Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, Gal бета 1-3 GalNAc бета 1-PAA, GlcNAc бета1-2 Gal бета 1-3 GalNAc альфа 1-PAA, и предпочтительно обработанные периодатом Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно более сильное связывание указанных антитела или антител с Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-PAA, чем у антитела или антител, выделенных у того же человека или животного до введения указанной композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции или лизата; и/или

(iii) проточной цитометрии на связывание с клетками, содержащими NM-D4 или NM-F9 и NM-wt или NM-H9, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно более сильное связывание антител с NM-D4 или NM-F9, чем с NM-wt или NM-H9, и существенно более силь-

ное связывание антител с NM-D4 или NM-F9, чем у антитела или антител, выделенных у того же человека или животного до введения указанной композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции или лизата; и/или

(iv) иммунофлуоресцентного анализа на связывание с клетками, содержащими NM-D4 или NM-F9, и NM-wt или NM-H9, а предпочтительно также с обработанными периодатом NM-D4 или NM-F9, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает более сильное связывание данного количества антитела или антител с NM-D4 или NM-F9, чем у антитела или антител, выделенных у того же человека или животного до введения указанной композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции или лизата;

и/или

d) испытания активности антитела, антител в сыворотке либо антител, выделенных из сыворотки, плазмы или фекалий, в котором:

(i) инкубируют необходимое количество ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 и/или NM-wt, меченых необходимым количеством европия или хрома-51, с необходимым количеством антитела, антител в сыворотке или антител, выделенных из сыворотки, плазмы или фекалий, с соответствующим количеством комплемента в течение необходимого времени, обычно от 3 до 5 ч, и измеряют лизис клеток, определяя количество европия или хрома-51, выделившихся после инкубации в случаях, где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает больший лизис клеток NM-D4 или NM-F9, чем NM-wt или NM-H9, либо более высокий лизис клеток NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, чем лизис без комплемента и/или лизис без антитела, и/или лизис с антителом или антителами, которые не связываются или меньше связываются с NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, и/или лизис с антителом или антителами, выделенными у того же человека или животного до введения указанной композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции или лизата; и/или

(ii) инкубируют необходимое количество ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 и/или NM-wt, меченых необходимым количеством европия или хрома-51, с необходимым количеством антитела, антител в сыворотке или антител, выделенных из сыворотки, плазмы или фекалий, с соответствующим количеством по меньшей мере одной иммуноэффекторной клетки или смеси иммуноэффекторных клеток либо периферийных мононуклеарных клеток крови в течение необходимого времени, обычно от 3 до 5 ч или всю ночь, и измеряют лизис клеток, определяя количество европия или хрома-51, выделившихся после инкубации где положительная гуморальная иммунная реакция на Core-1 показывает больший лизис клеток NM-D4 или NM-F9, чем NM-wt или NM-H9, либо более высокий лизис клеток NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, чем лизис без антитела, и/или лизис с антителом или антителами, которые не связываются или меньше связываются с NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, и/или лизис с антителом или антителами, выделенными у того же человека или животного до введения указанной композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции или лизата.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию или лизат, дает гуморальную иммунную реакцию на Core-1, которая является положительной по меньшей мере в двух тестах на гуморальную иммунную реакцию 1-6, описанных выше, предпочтительно положительной в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 6, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5, а оптимально во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию.

Указанная клеточная иммунная реакция на Core-1 представляет собой реакцию Т-клетки Core-1, которая может быть выявлена по меньшей мере одним из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5, описанных здесь. Предпочтительно это цитотоксическая реакция Т-клетки или Т-клетки-хелпера на Core-1. Более предпочтительно это цитотоксическая реакция Т-клетки или Т-клетки-хелпера на Core-1, которая обнаруживается в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5, описанных здесь. Оптимально это цитотоксическая реакция Т-клетки или Т-клетки-хелпера типа Th1 на Core-1, которая обнаруживается в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5.

В указанных тестах на клеточную иммунную реакцию дендритные клетки, нагруженные микроорганизмом Core-1, вводят в контакт с иммунными клетками и культивируют соответствующее время в соответствующих условиях, после чего добавляют для повторной стимуляции дендритные клетки, нагруженные по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулой, культивируют соответствующее время в соответствующих условиях, а затем измеряют количество выделенных GM-CSF, TNF-альфа или INF-гамма, или измеряют пролиферацию Т-клеток, или ингибирование секреции GM-CSF, TNF-альфа или INF-гамма, или пролиферацию антител против Core-1, или представление Core-1 на дендритных клетках, либо измеряют лизис Core-1-положительных клеток активированными иммунными клетками, предпочтительно активированными Т-клетками.

Указанными дендритными клетками, также именуемыми DC, могут быть любые дендритные клетки, или смесь клеток, включающая дендритные клетки, или по меньшей мере одна дендритная клетка. Их

можно получить от здорового донора или от имеющего заболевание, такое как, однако не ограниченное данным перечнем, опухолевое заболевание, или болезнь Крона, или Core-1-положительное заболевание, или любое заболевание, упоминаемое где-либо здесь, либо от животного. Указанные DC можно получать и загружать известными способами, как правило, из CD34-положительных клеток-предшественников или CD14-положительных моноцитарных клеток крови или костного мозга человека, которые дифференцируются от незрелых дендритных клеток (iDC) с использованием определенных комбинаций молекул, известных специалистам. IDC нагружают Core-1-положительным микроорганизмом или несущей Core-1 молекулой, или соответствующим контролем, и дозревают с использованием определенных комбинаций молекул, известных специалистам, с получением нагруженных дендритных клеток, которые соответствуют нагруженным зрелым дендритным клеткам (mDC), способным активировать Т-клетки.

Указанные DC можно также получать из линии дендритных клеток, в частности, из линии человеческих дендритных клеток NEMOD-DC (фирмы Glycotope GmbH, Берлин, Германия; www.glycotope.com) или Mutz-3.

Указанная загрузка дендритных клеток означает, что дендритные клетки инкубируют в соответствующем состоянии дифференциации и дозревания с соответствующими количествами Core-1-положительного микроорганизма, его фракциями или лизатами или по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулой в течение соответствующего времени, как правило, в продолжение вышеописанной стадии дозревания в сочетании с соответствующими молекулами, обычно от 24 до 48 ч, с получением нагруженных дендритных клеток, способных активировать иммунные клетки, преимущественно Т-клетки, содержащие Core-1-специфичные Т-клетки.

Указанные иммунные клетки представляют собой PBMC (периферийные мононуклеарные клетки крови) или другие клеточные популяции, содержащие CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, предпочтительно CD4+ и CD8+ Т-клетки. Специалистам известны способы изъятия этих клеток у человека или животного и получения препаратов фиколл-градиентом из человеческой крови или из кровяных клеток лейкофераз, причем их можно обогащать Т-клетками путем магнитной сортировки.

В предпочтительном варианте осуществления дендритные клетки совпадают по меньшей мере в одной молекуле гистосовместимости с иммунными клетками, предпочтительно в одной молекуле класса гистосовместимости I или II, более предпочтительно по меньшей мере в одной молекуле класса I и одной молекуле класса II, желательнее в большинстве молекул гистосовместимости, а оптимально во всех молекулах гистосовместимости. Последнее обеспечивается получением и дендритных, и иммунных клеток от одного индивидуума.

Указанные соответствующие время и условия для культивации иммунных клеток с нагруженными дендритными клетками с последующим добавлением нагруженных дендритных клеток известны специалистам, и их можно оптимизировать с учетом условий, в которых находятся клетки. Обычно время инкубации составляет от 7 до 10 дней на каждой из двух стадий (первичной активации и повторной стимуляции).

Указанная несущая Core-1 молекула при описанных тестах на клеточную иммунную реакцию означает достаточное количество клеток или опухолевых клеток, несущих Core-1, белок, несущий Core-1, или полипептид, несущий Core-1. Указанная клетка или опухолевая клетка, несущая Core-1, может быть живой или мертвой, или лизатом этих клеток, или его фракцией, предпочтительно лизатом. Нести Core-1 может любой белок, например, протеин-носитель, с которым Core-1 связывается на опухолях. Нести Core-1 может любой полипептид, предпочтительно такой, который может быть представлен с Core-1 на mDC.

Указанный Core-1-положительный микроорганизм при описанных тестах на клеточную иммунную реакцию означает достаточное количество того или иного Core-1-положительного микроорганизма, живого или мертвого, или лизата этих клеток, или его фракции, предпочтительно лизата или фракции.

Контроль служит для подтверждения положительности иммунной реакции.

Специалисты владеют применением соответствующих контрольных препаратов, которые подробно описаны ниже и в примере 12. В примерах показано применение контрольных препаратов, нагруженных на DC, как описано для несущих Core-1 молекул, в том числе для повторной стимуляции; ими могут быть, например (i) отрицательные к Core-1 клетки, предпочтительно очень сходные с Core-1-положительными клетками, как несущие Core-1 молекулы, в соответствующем формате, живые или мертвые, или лизаты этих клеток, или их фракции; (ii) белок, не несущий Core-1, предпочтительно тот же, что и несущая Core-1 молекула, но без Core-1, предпочтительно без гликозилирования или с сиаилированной структурой Core-1, (iii) полипептид, не несущий Core-1, предпочтительно тот же, что и несущая Core-1 молекула, но без Core-1, предпочтительно без гликозилирования или с сиаилированной структурой Core-1 или структурой Tn (CalNAcальфа1-O-Ser/Thr). Дополнительными контрольными препаратами могут быть (iv) ненагруженные mDC, обработанные таким же образом, как и mDC, нагруженные несущими Core-1 молекулами, включая необходимые молекулы и условия для дозревания, но без каких бы то ни было дополнительных молекул, соответствующих несущей Core-1 молекуле или вышеуказанным контрольным препаратам (i-iii). В примерах и предпочтительных вариантах осуществления описаны наиболее приемлемые контрольные препараты, а другие препараты специалисты могут подоб-

рать сами. В предпочтительном варианте осуществления изобретения дендритные клетки представляют собой функциональные дендритные клетки, полученные из клеток лейкемии линии MUTZ-3 (DSMZ ACC295) или производные от MUTZ-3, как, например, NEMOD-DC [описаны в DE 10139428 A1, WO 2003/023023 A1, EP 01419240, US 20040265998, CA 2457287, 10139428.4 (DE), PCT/EP02/09260, 02758474.7 (EP), US 10/486966, CA 2457287], которые поставляет фирма Glycotope GmbH, Берлин, Германия, [www.Glycotope.com]. Это активные дендритные клетки, способные активировать Т-клетки и воздействовать и/или представлять антигены на их поверхности, включая молекулы классов гистосовместимости. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения дендритные клетки представляют собой функциональные дендритные клетки, полученные из MUTZ-3 или производные от MUTZ-3, например, NMD-200, а иммунные клетки совмещены в молекулах класса I гистосовместимости, например, HLA-A2 или HLA-B44, предпочтительно HLA-A2 и HLA-B44. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения лизат NM-D4 или NM-F9 служит несущей Core-1 молекулой, а NM-wt [родительская клетка NM-D4 и NM-F9, как описано в WO 2005/017130 A2 и EP 1654353] или NM-H9 [NM-H9D8, DSM ACC2806], который отличается своим потенциалом по сиалилату и поэтому, в отличие от NM-D4 и NM-F9, не несет Core-1 на своей поверхности, а служит контрольным препаратом в соответствующем формате, в живом или мертвом виде, или в виде лизата из этих клеток или его фракции, предпочтительно в виде лизата, причем оба нагружены на DC и используются при повторной стимуляции. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения контрольными препаратами для азиалогликофорина служат гликофорин или обработанный периодатом азиалогликофорин, причем оба нагружены на DC и используются при повторной стимуляции. В наиболее предпочтительном варианте лизат NM-D4 или NM-F9 и азиалогликофорин служат как несущие Core-1 молекулы при повторной стимуляции, NM-wt [NM-H9] и гликофорин или обработанный периодатом азиалогликофорин и/или не нагруженная DC являются отрицательными контрольными средами.

Ввиду нестабильности результатов экспериментов, что особенно характерно для известных клеточных иммунологических методов, контрольные препараты приходится готовить параллельно испытываемым, что хорошо известно специалистам.

В одном из вариантов осуществления изобретение предусматривает тест на клеточную иммунную реакцию на Core-1 *in vitro*, в котором:

- a) нагружают по меньшей мере одну дендритную клетку первым Core-1-положительным соединением, причем указанное Core-1-положительное соединение несет Core-1;
- b) вводят соответствующее количество указанной по меньшей мере одной дендритной клетки, нагруженной указанным Core-1-положительным соединением, в контакт с соответствующим количеством иммунных клеток, которые активируются или ингибируются дендритной клеткой;
- c) культивируют до взаимодействия указанные иммунные клетки с указанными дендритными клетками;
- d) добавляют соответствующее количество представляющих антиген клеток (APC), нагруженных соответствующим количеством по меньшей мере одного второго несущего Core-1 соединения, отличного от указанного первого Core-1-положительного соединения;
- e) культивируют для повторной стимуляции указанных иммунных клеток;
- f) определяют количество повторно стимулированных иммунных клеток.

Изобретение предусматривает способ определения того, способен ли тот или иной Core-1-положительный микроорганизм или соединение в целом запускать клеточную иммунную реакцию. До сих пор считалось, что углеводы не способны запускать клеточную иммунную реакцию. Однако сейчас установлено, что некоторые углеводные эпитопы могут запускать клеточную иммунную реакцию. Поэтому важно создать тест-системы, определяющие, способен ли тот или иной углеводный эпитоп, в данном случае Core-1, в представленной форме (например, Core-1-положительный микроорганизм в соответствии с изобретением или конъюгат Core-1) запускать соответствующую реакцию, и, следовательно, пригоден ли данное Core-1-положительное соединение в качестве питательного/лечебного средства. В изобретении используются дендритные клетки, потому что они могут примировать и тем самым стимулировать иммунные клетки, например, Т-клетки. Дендритные клетки атакуют соединения, с которыми сталкиваются, и представляют образованные соединения/антигены на их поверхности. Однако несингенные клетки, например дендритные, могут представлять лишь определенные виды антигенов, и потому важно устанавливать, может ли эпитоп Core-1 в своем окружении на микроорганизме или носителе быть представлен дендритными клетками в правильной форме, ибо лишь в таком случае эти соединения/микроорганизмы могут запустить клеточную иммунную реакцию. Принципы этого теста на клеточную иммунную реакцию показаны на фиг. 23.

Итак, дендритные клетки нагружаются интересующим нас Core-1-положительным соединением. Таким соединением может быть описанный здесь микроорганизм, несущий Core-1, опухолевая клетка или любое другое соединение, несущее Core-1. Условия нагружения и подходящие несущие углеводные структуры описаны здесь.

Указанные нагруженные дендритные клетки вступают в контакт с иммунными клетками, в частности лимфоцитами, например Т-клетками. Иммунные клетки можно получить, например, от людей-

доноров. Дендритные клетки, представляющие антигены, соответствующие рецепторам иммунных клеток, активируют и стимулируют лимфоциты, обеспечивая их пролиферацию и выживание. Лимфоциты, не соответствующие антигенам, представленным дендритными клетками, не активируются и отмирают.

В этом первом туре стимуляции активируются лимфоциты, специфичные для любого соответствующего антигена, представленного указанными нагруженными дендритными клетками, включая Core-1, если он представлен. Однако целью нашей методики является определение того, способно ли соединение, представляющее интересующий нас углеводный эпитоп/антиген, в данном случае Core-1, стимулировать специфичную клеточную реакцию на Core-1.

Поэтому предусмотрена стадия отбора, на которой лимфоциты повторно стимулируются с целью определить, стимулирует ли Core-1 лимфоциты, запуская тем самым клеточную реакцию. На этой стадии отбора представляющие антиген клетки, например дендритные клетки, нагружаются вторым соединением, которое также несет Core-1. Однако указанное второе соединение отличается от первого. Например, первое соединение - это микроорганизм, несущий Core-1, а второе - опухолевая клетка, несущая Core-1. Это второе соединение также обрабатывают APC, которые и представляют антигены. Поскольку второе соединение отличается от первого, то и все антигены, кроме Core-1, отличаются от представленных в первом туре. В результате во втором туре стимуляции выживают только те лимфоциты, которые находят соответствующий антиген, представленный этими APC, а именно Core-1. Если и дендритные клетки первого тура, и APC второго тура оба представляют антиген, содержащий или состоящий из Core-1 (или структуры, иммунологически имитирующей Core-1), лимфоциты, распознающие этот антиген, стимулируются и выживают, поскольку стимулируются заново. Те лимфоциты, которые не находят подходящего партнера при контакте с указанными APC, нагруженными указанным вторым Core-1-положительным соединением, отмирают ввиду отсутствия повторной стимуляции. Эта стадия отбора обеспечивает появление клеточной реакции на Core-1.

На последней стадии определяют, действительно ли лимфоциты повторно стимулированы. Это можно выяснить, например, определив

продукты секреции лимфоцитов, которые выделяются лимфоцитами при повторном стимулировании, например интерферон альфа, интерферон гамма или GM-CSF; пролиферацию Т-клеток.

Далее описываются тесты для определения факта повторной стимуляции.

Специфичность данного теста можно повысить, используя связывающую углевод структуру, которая специфически распознает Core-1, представленный дендритными клетками/APC. В этом варианте по меньшей мере часть указанных простимулированных лимфоцитов со стадии с) вводят в контакт с соответствующим количеством представляющих антиген клеток (APC), нагруженных соответствующим количеством по меньшей мере одного второго Core-1-положительного соединения, причем указанное второе соединение отличается от указанного первого углевод-положительного соединения, в присутствии связывающей Core-1 молекулы распознающего Core-1. Указанная связывающая Core-1 молекула блокирует взаимодействие APC с указанными лимфоцитами, тем самым предотвращая повторную стимуляцию и выживание клеток. Эта дополнительная стадия гарантирует, что интересующий нас углевод специфично стимулирует лимфоциты и тем самым запускает специфическую клеточную иммунную реакцию. Эту стадию усиления и подтверждения стимуляции можно проводить либо параллельно, выделив часть простимулированных лимфоцитов со стадии с, либо по окончании теста. Пригодные связывающие Core-1 молекулы описаны здесь.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретение предусматривает тест на клеточную иммунную реакцию (тест на клеточную иммунную реакцию 1) на Core-1, в котором:

а) вводят в контакт соответствующее количество дендритных клеток, а именно по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, содержащей их композиции, нутрицевтическую или фармацевтическую композиции в соответствии с изобретением, с соответствующим количеством иммунных клеток, содержащим по меньшей мере одну иммунную клетку, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку, или периферийные мононуклеарные клетки крови, которые могут активироваться или ингибироваться дендритной клеткой;

б) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях;

с) добавляют соответствующее количество дендритных клеток, содержащее по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулы;

д) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях для повторной стимуляции;

е) измеряют количество выделенного GM-CSF, например, методами ELISA или ELISPOT (иммуноферментный спот-анализ), где положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает более высокую секрецию GM-CSF указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными несущей Core-1 молекулой, по сравнению с секрецией GM-

CSF соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующими ненагруженными дендритными клетками, и/или более высокую секрецию GM-CSF указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными несущей Core-1 молекулой, по сравнению с секрецией GM-CSF соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующей молекулой, не несущей Core-1, и/или более высокую секрецию GM-CSF указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными азиалогликофорином, по сравнению с секрецией GM-CSF соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующими дендритными клетками, нагруженными гликофорином или обработанным периодатом азиалогликофорином, и/или более высокую секрецию GM-CSF указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными лизатом или фракциями NM-D4 или NM-F9, по сравнению с секрецией GM-CSF соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующими дендритными клетками, нагруженными лизатом NM-wt или NM-H9.

"Соответствующие иммунные клетки" означают те же иммунные клетки, представляющие собой или содержащие по меньшей мере одну иммунную клетку, CD4+ T-клетку, CD8+ T-клетку, смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну T-клетку, или периферийные мононуклеарные клетки крови, или упомянутые в других местах клетки или смеси клеток, которые могут быть активированы или ингибированы дендритной клеткой, и служащие в контрольных или сравнительных испытаниях в качестве контрольной или испытуемой молекулы, смеси молекул, клеток, лизатов или фракций клеток, что и "указанные иммунные клетки" в целях сравнения.

"Соответствующие дендритные клетки" означают те же дендритные клетки, представляющие собой или содержащие по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку или упомянутые в других местах клетки или смеси клеток, способных активировать T-клетки, нагруженные соответствующим количеством по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулы, служащие в контрольных или сравнительных испытаниях в качестве контрольной или испытуемой молекулы, смеси молекул, клеток, лизатов или фракций клеток, микроорганизмов или их фракций что и "указанные дендритные клетки" в целях сравнения.

Все это известно специалистам, которые могут осуществить выбор. Более подробно этот аспект рассмотрен в примерах. Поясним, что, например, одинаковое количество иммунных клеток из одного препарата вводят в контакт с одинаковым количеством дендритных клеток из одного препарата, нагруженных одинаковым количеством азиалогликофорина и параллельно таким же количеством гликофорина или обработанного периодатом азиалогликофорина, чтобы обеспечить оптимальную сравнимость.

Специалистам понятны возможные варианты, и они могут сами выбрать их или почерпнуть из примеров данного описания.

В указанном тесте на клеточную иммунную реакцию 1 испытывается активация Core-1-специфичных CD4+ и/или CD8+ активированных T-клеток Core-1-положительным микроорганизмом путем измерения специфичной наведенной секреции GM-CSF, для чего вводят в контакт дендритные клетки, нагруженные Core-1-микроорганизмом, его лизатом или фракцией, с иммунными клетками и культивируют соответствующее время в соответствующих условиях, после чего добавляют дендритные клетки, нагруженные несущей Core-1 молекулой, культивируют соответствующее время в соответствующих условиях и измеряют количество выделенного GM-CSF в ответ на такую повторную стимуляцию. Предпочтительно указанное измерение количества выделенного GM-CSF осуществляют методами ELISA или ELISPOT, оптимально ELISA, как известно специалистам. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения при тесте на клеточную иммунную реакцию 1 вводят в контакт функциональные дендритные клетки, полученные из клеток, выведенных из MUTZ-3, нагруженные Core-1-положительным микроорганизмом, с PBMC (периферийными мононуклеарными клетками крови), совместимыми, по меньшей мере, в классе гистосовместимости I (HLA-A2) и (HLA-B44), культивируют эти клетки соответствующее время в соответствующих условиях, обычно от 7 до 10 дней, а затем добавляют для повторной стимуляции функциональные дендритные клетки, полученные из клеток, выведенных от MUTZ-3, нагруженные лизатом NM-D4 или NM-F9 либо азиалогликофорином, культивируют эти клетки соответствующее время в соответствующих условиях, обычно от 7 до 9 дней, и измеряют количество выделенного GM-CSF методами ELISA или ELISPOT. Анализы ELISA и ELISPOT выделения GM-CSF известны специалистам и подробно описаны в примерах. Положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает более высокую секрецию GM-CSF из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагруженным лизатом NM-D4 или NM-F9, по сравнению с секрецией из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагруженным лизатом NM-wt или NM-H9, и/или более высокую секрецию GM-CSF из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагруженным азиалогликофорином, по сравнению с секрецией из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагруженным гликофорином. В предпочтительном варианте осуществления секреция GM-CSF под действием NM-D4 или NM-F9 в 2 раза выше, чем под действием NM-wt, а более предпочтительно выше в 3 раза. В предпочтительном варианте осуществления секреция GM-CSF под действием азиалогликофорина в 2 раза выше, чем под действием гликофорина, а более предпочтительно выше в 3 раза. Предпочтительный ва-

риант осуществления теста на клеточную иммунную реакцию 1 подробно описан в примере 12.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на клеточную иммунную реакцию (тест на клеточную иммунную реакцию 2) на Core-1, в котором:

а) вводят в контакт соответствующее количество дендритных клеток, а именно по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, содержащей их композиции, нутрицевтические или фармацевтические композиции в соответствии с изобретением, с соответствующим количеством иммунных клеток, содержащим по меньшей мере одну иммунную клетку, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку, или периферийные мононуклеарные клетки крови, которые могут активироваться или ингибироваться дендритной клеткой

б) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях;

с) добавляют соответствующее количество дендритных клеток, содержащее по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулы;

д) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях для повторной стимуляции;

е) измеряют количество выделенного IFN-гамма и/или TNF-альфа методами.

ELISA или ELISPOT, где положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает более высокую секрецию IFN-гамма и/или TNF-альфа указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными несущей Core-1 молекулой, по сравнению с секрецией IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующими ненагруженными дендритными клетками и/или более высокую секрецию IFN-гамма и/или TNF-альфа указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными несущей Core-1 молекулой, по сравнению с секрецией IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующей молекулой, не несущей Core-1, и/или более высокую секрецию IFN-гамма и/или TNF-альфа указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными азиалогликофорином, по сравнению с секрецией IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующими дендритными клетками, нагруженными гликофорином или обработанным периодом азиалогликофорином, и/или более высокую секрецию IFN-гамма и/или TNF-альфа указанными иммунными клетками, повторно стимулированными указанными дендритными клетками, нагруженными лизатом или фракциями NM-D4 или NM-F9, по сравнению с секрецией IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующими иммунными клетками, повторно стимулированными соответствующими дендритными клетками, нагруженными лизатом NM-wt или NM-H9.

В указанном тесте на клеточную иммунную реакцию 2 испытывается активация цитотоксичных Т-клеток, например, CTL (цитотоксичных Т-лейкоцитов) и/или Th1 (цитотоксичных Т-клеток-хелперов) на Core-1-специфичные цитотоксичные Т-клетки, активированные Core-1-положительным микроорганизмом, путем измерения специфично спровоцированной секреции IFN-гамма и/или TNF-альфа при введении в контакт дендритных клеток, нагруженных Core-1-микроорганизмом, и иммунных клеток, культивации соответствующее время в соответствующих условиях, последующем введении дендритных клеток, нагруженных несущей Core-1 молекулой, для повторной стимуляции, культивации соответствующее время в соответствующих условиях и измерении количества выделенного IFN-гамма и/или TNF-альфа в ответ на повторную стимуляцию. Такое измерение количества выделенного IFN-гамма и/или TNF-альфа осуществляют методами ELISA или ELISPOT, оптимально ELISPOT, как известно специалистам. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения при тесте на клеточную иммунную реакцию 2 вводят в контакт функциональные дендритные клетки, полученные из клеток, выведенных из MUTZ-3, нагруженные Core-1-положительным микроорганизмом, с РВМС (периферийными мононуклеарными клетками крови), совместимыми по меньшей мере, в классе гистосовместимости I (HLA-A2) и (HLA-B44), культивируют эти клетки соответствующее время в соответствующих условиях, обычно от 7 до 10 дней, а затем добавляют для повторной стимуляции функциональные дендритные клетки, полученные из клеток, выведенных от MUTZ-3, нагруженные лизатом NM-D4 или NM-F9 либо азиалогликофорином, культивируют эти клетки соответствующее время в соответствующих условиях, обычно от 7 до 9 дней, и измеряют количество выделенного IFN-гамма методом ELISPOT и/или выделенного TNF-альфа методом ELISA. Анализы ELISA и ELISPOT выделения TNF-альфа и IFN-гамма известны специалистам и подробно описаны в примерах. Положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает более высокую секрецию IFN-гамма и/или TNF-альфа из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагруженным лизатом NM-D4 или NM-F9, по сравнению с секрецией из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагруженным лизатом NM-wt или NM-H9, и/или более высокую секрецию IFN-гамма и/или TNF-альфа из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагруженным азиалогликофорином, по сравнению с секрецией из иммунных клеток, повторно стимулированных DC, нагружен-

ным гликофорином. В предпочтительном варианте осуществления секрета под действием IFN-гамма и/или TNF-альфа, нагруженных NM-D4 или NM-F9 в 2 раза выше, чем под действием NM-wt, а более предпочтительно выше в 3 раза. В предпочтительном варианте осуществления секрета GM-CSF под действием азиалогликофорина в 2 раза выше, чем под действием гликофорина, а более предпочтительно выше в 3 раза. Предпочтительный вариант осуществления теста на клеточную иммунную реакцию 2 подробно описан в примере 12.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на клеточную иммунную реакцию (тест на клеточную иммунную реакцию 3) на Core-1, в котором:

а) вводят в контакт соответствующее количество дендритных клеток, а именно по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, содержащей их композиции, нутрицевтические или фармацевтические композиции в соответствии с изобретением, с соответствующим количеством иммунных клеток, содержащим по меньшей мере одну иммунную клетку, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку, или периферийные мононуклеарные клетки крови, которые могут активироваться или ингибироваться дендритной клеткой;

б) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях;

с) добавляют соответствующее количество дендритных клеток, содержащее по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулы;

д) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях для повторной стимуляции;

е) измеряют пролиферацию или наведенную пролиферацию, предпочтительно с применением реакции WST в сочетании с колориметрическим измерением, причем положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает более высокую пролиферацию или количество Т-клеток после определенного времени культивации при повторной стимуляции указанными дендритными клетками, нагруженными несущей Core-1 молекулой, по сравнению с повторной стимуляцией ненагруженными дендритными клетками, и/или более высокую пролиферацию или количество Т-клеток после определенного времени культивации при повторной стимуляции указанными дендритными клетками, нагруженными несущей Core-1 молекулой, по сравнению с повторной стимуляцией соответствующими дендритными клетками, нагруженными не несущей Core-1 молекулой, и/или более высокую пролиферацию или количество Т-клеток после определенного времени культивации при повторной стимуляции указанными дендритными клетками, нагруженными азиалогликофорином, по сравнению с повторной стимуляцией соответствующими дендритными клетками, нагруженными гликофорином или обработанным периодом азиалогликофорина, и/или более высокую пролиферацию или количество Т-клеток после определенного времени культивации при повторной стимуляции указанными дендритными клетками, нагруженными лизатом или фракциями NM-D4 или NM-F9, по сравнению с повторной стимуляцией соответствующими дендритными клетками, нагруженными лизатом NM-wt или NM-H9.

В указанном тесте на клеточную иммунную реакцию 3 испытывается активация Core-1-специфичных CD4+ и/или CD8+ активированных Т-клеток Core-1-положительным микроорганизмом путем измерения наведенной пролиферации Т-клеток, при котором вводят в контакт дендритные клетки, нагруженные Core-1-положительным микроорганизмом, и иммунные клетки, культивируют соответствующее время в соответствующих условиях, затем вводят дендритные клетки, нагруженные несущей Core-1 молекулой, для повторной стимуляции, культивируют соответствующее время в соответствующих условиях, после чего измеряют пролиферацию. Такое измерение наведенной пролиферации предпочтительно осуществляют с применением реакции WST в сочетании с колориметрическим измерением, а известное специалистам вычитание DC самих по себе и непрестимулированных иммунных клеток самих по себе рассмотрено в примере 12. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения при тесте на клеточную иммунную реакцию 3 вводят в контакт функциональные дендритные клетки, полученные из клеток, выведенных из MUTZ-3, нагруженные Core-1-положительным микроорганизмом, с РВМС (периферийными мононуклеарными клетками крови), совместимыми по меньшей мере в классе гистосовместимости I (HLA-A2) и (HLA-B44), культивируют эти клетки соответствующее время в соответствующих условиях, обычно от 7 до 10 дней, а затем добавляют для повторной стимуляции функциональные дендритные клетки, полученные из клеток, выведенных от MUTZ-3, нагруженные лизатом NM-D4 или NM-F9 либо азиалогликофорином, культивируют эти клетки соответствующее время в соответствующих условиях, обычно от 7 до 9 дней, и измеряют степень пролиферации, как описано выше и более подробно в примере 12. Положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает более высокую степень пролиферации Т-клеток, повторно стимулированных DC, нагруженными несущей Core-1 молекулой, по сравнению с пролиферацией от DC самих по себе и с Т-клетками, имевшими контакт с ненагруженными mDC или с DC, нагруженными соответствующим контрольным препаратом. В предпочтительном варианте осуществления пролиферация Т-клеток, стимулированных нагруженными NM-D4- или NM-F9-DC, в 2 раза больше, чем вызванная NM-wt или NM-H9, а более предпочтительно

выше в 3 раза. Предпочтительный вариант осуществления теста на клеточную иммунную реакцию 3 подробно описан в примере 12.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на клеточную иммунную реакцию (тест на клеточную иммунную реакцию 4) на Core-1, в котором вводят в контакт соответствующее количество дендритных клеток, а именно по меньшей мере одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, содержащей их композиции, нутрицевтические или фармацевтические композиции в соответствии с изобретением, или несущую Core-1 молекулу, смесь, содержащую несущую Core-1 молекулу, Core-1-положительную клетку, ее лизат или фракцию, и соответствующее количество по меньшей мере одного Core-1-специфического антитела, предпочтительно NemoD-TF1, NemoD-TF2 или A78-G/A7, в которых имеет место положительная презентация Core-1 на указанной дендритной клетке или клетках, где связывание Core-1-специфического антитела с указанной дендритной клеткой или клетками, нагруженными несущей Core-1 молекулой, сильнее, чем с соответствующей ненагруженной дендритной клеткой или клетками или с соответствующей дендритной клеткой или клетками, нагруженными не несущей Core-1 молекулой или несущей Core-1 молекулой, обработанной периодатом, и/или связывание Core-1-специфического антитела с указанной дендритной клеткой или клетками, нагруженными Core-1-положительным микроорганизмом, его лизатом или фракцией, с нутрицевтиками или фармацевтической композицией в соответствии с изобретением, сильнее, чем с соответствующей дендритной клеткой или клетками, нагруженными микроорганизмом, не связанным Core-1-специфичным антителом, или с соответствующей дендритной клеткой или клетками, нагруженными Core-1-положительным микроорганизмом после обработки периодатом.

В указанном тесте на клеточную иммунную реакцию 4 испытывается способность дендритных клеток представлять Core-1 на своей поверхности после нагружения Core-1-положительным микроорганизмом, что показывает потенциал нагруженных дендритных клеток усваивать и представлять полученный из микроорганизма Core-1 иммунным клеткам, например, Т-клеткам, причем соответствующие количества Core-1-положительного микроорганизма и дендритных клеток в состоянии дифференциации и созревания сводят вместе, предпочтительно берут незрелые DC, которые затем созревают до mDC, с использованием соответствующего коктейля молекул, известного специалистам, и измеряют представление Core-1 нагруженными DC, связывая Core-1-специфичное антитело в соответствии с изобретением с указанными нагруженными DC. Указанное испытание связывания проводят соответствующими методами, предпочтительно иммуноцитохимией, иммунофлуоресценцией или проточной цитометрией, лучше всего иммуноцитохимией, причем эти методы известны специалистам и разбираются в примерах. Испытания показывают, что положительное представление нагруженных DC выше при связывании Core-1-специфического антитела с DC, нагруженным Core-1-положительным микроорганизмом, чем с ненагруженным DC или с DC, нагруженным микроорганизмом, который не связан Core-1-специфичным антителом, или с DC, нагруженным Core-1-положительным микроорганизмом после периодатной обработки. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения при тесте на клеточную иммунную реакцию 4 вводят в контакт соответствующие количества функциональных незрелых дендритных клеток, полученных из клеток, выведенных от MUTZ-3, с лизатами Core-1-положительного микроорганизма, культивируют и созревают 24-48 часов с использованием соответствующего коктейля молекул, как описано в примере 12, и испытывают представление Core-1 с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии (иммуноцитохимии), используя Core-1-специфичные антитела NemoD-TF1, NemoD-TF2 или A78-G/A7. В предпочтительном варианте осуществления связывание NemoD-TF1, NemoD-TF2 или A78-G/A7 по меньшей мере, в 2 раза выше, чем с DC, нагруженными Core-1-отрицательным микроорганизмом, а более предпочтительно отмечается сильное связывание NemoD-TF1, NemoD-TF2 или A78-G/A7 с DC, нагруженными Core-1-положительным микроорганизмом, тогда как с ненагруженными DC или с DC, нагруженными Core-1-отрицательным микроорганизмом, связывание вообще не поднимается выше фонового уровня.

Предпочтительный вариант осуществления теста на клеточную иммунную реакцию 4 подробно описан в примере 12.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тест на клеточную иммунную реакцию (тест на клеточную иммунную реакцию 5) на Core-1, в котором:

а) инкубируют соответствующее количество клеток-мишеней из линий ZR-75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 и/или NM-wt, меченых соответствующим количеством европия или хрома-51, причем, по меньшей мере, одна иммунная клетка нацелена против Core-1, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере, одну иммунную клетку, нацеленную против Core-1, соответствующее время (обычно 3-6 ч или всю ночь) и в соответствующих условиях, и

б) измеряют лизис клеток-мишеней, определяя выделение европия или хрома-51, причем положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно больший лизис клеток NM-D4 или NM-F9, чем NM-wt или NM-H9, либо показывает значительно больший лизис NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, инкубированных с нацеленными на Core-1 иммунными клетками, чем NM-D4, NM-F9 или ZR-

75-1, инкубированных с соответствующими контрольными иммунными клетками.

В указанном CIRT (тесте на клеточную иммунную реакцию) 5 испытывается Core-1- специфическая цитотоксичность иммунных клеток, нацеленных на Core-1, в том числе Т-клетки, Т-клеток, клонов Т-клеток, линий Т-клеток, CD4-положительных Т-клеток, CD8-положительных Т-клеток, NK (клеток-киллеров) и/или РВМС.

Выработка нацеленных на Core-1 иммунных клеток описана далее.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нацеленные на Core-1 иммунные клетки получают введением состава в соответствии с изобретением, Core-1-положительного микроорганизма или его фракции или лизата человеку или животному с последующим выделением иммунных клеток из организма способами, известными специалистам и описанными здесь, в том числе выделением по градиенту Фиколла иммунных клеток из цельной крови или из кровяных клеток лейкоферезом и/или выделением субпопуляций иммунных клеток по методу иммуномагнитных гранул.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения нацеленные на Core-1 иммунные клетки повторно стимулируют по меньшей мере один раз дендритными клетками, нагруженными составом в соответствии с изобретением, Core-1-положительным микроорганизмом или его фракцией или лизатом, или несущей Core-1 молекулой, или опухолевой клеткой, как описано далее, до их использования в CIRT 5.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения нацеленные на Core-1 иммунные клетки повторно стимулируют по меньшей мере один раз дендритными клетками, нагруженными составом в соответствии с изобретением, Core-1-положительным микроорганизмом или его фракцией или лизатом, или несущей Core-1 молекулой, или опухолевой клеткой, как описано далее, до их использования в CIRT 5, причем Core-1 на разных носителях (в том числе Core-1 на или в микроорганизме, несущая Core-1 молекула, несущий Core-1 протеин или опухолевая клетка) используют на разных стадиях повторной стимуляции.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения активированные Core-1 Т-клетки повторно стимулируются по меньшей мере один раз дендритными клетками, нагруженными другой молекулой, или клеткой, или фракцией клетки, содержащей Core-1 и не присутствующей в Core-1-положительном микроорганизме, например лизате Core-1-положительной опухолевой клетки, который не используется при измерении степени лизиса.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения активацию или выработку нацеленных на Core-1 иммунных клеток, или повторную стимуляцию Core-1-специфичных иммунных клеток, или лизис Core-1-положительных опухолевых клеток ингибируют соответствующим количеством, по меньшей мере, одного Core-1-специфичного антитела.

В ходе теста инкубируют соответствующие количества меченых Core-1-положительных клеток-мишеней, например, ZR75-1, предпочтительно NM-D4 или NM-F9, с соответствующими количествами иммунных клеток, нацеленных на Core-1, соответствующее время, обычно 3-6 ч или всю ночь. Core-1-положительные опухолевые клетки метят европием или хромом-51, что позволяет измерять подвергшиеся лизису клетки. Количество подвергшихся лизису клеток определяют предпочтительно измерением выделения европия или хрома-51 после инкубации. Специалисты могут подобрать соответствующие контрольные препараты, например Core-1-отрицательные клетки (предпочтительно NM-wt или NM-H9) или соответствующие контрольные иммунные клетки, не нацеленные на Core-1. Тест можно оптимизировать по количеству меченых опухолевых клеток, количеству иммуноэффекторных клеток и времени инкубации, что специалист легко осуществит применительно к условиям данного изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления CIRT 5 выполняют с помощью теста по высвобождению европия. Клетки-мишени NM-D4 инкубируют 10 мин при 4°C в 800 мкл буфера с европием (50 мМ HEPES, pH 7,4, 93 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ диэтилентриаминпентауксусной кислоты, 2 мМ ацетата европия (III)), подвергают электрофорезу (710 В, 1 импульс, 30 мкс) в аппарате Multiporator (фирмы Eppendorf), а затем инкубируют на льду еще 10 мин. После этого клетки промывают 5 раз в RPMI/5% FCS и высевают в 96-луночный планшет с круглым дном (фирмы Munc; 5×10³/лунку). Затем добавляют нацеленные на Core-1 иммунные клетки или соответствующие иммунные клетки в качестве эффекторных клеток (100 мкл/лунку) при различных соотношениях эффекторная клетка: клетка мишень от 100:1 до 5:1, предпочтительно от 50:1 до 20:1. Для определения спонтанного выделения добавляют 100 мкл раствора RPMI/5% FCS без эффекторных клеток. Максимальное высвобождение устанавливают по полному лизису мишени этанолом.

После 4 ч инкубации при 37°C планшет центрифугируют 5 мин 500×g и пипеткой вводят 20 мкл свободного от клеток супернатанта из каждой лунки в 200 мкл на лунку стимулирующего раствора (фирмы Perkin-Elmer Wallace) в заранее подготовленный планшет с плоским дном (типа Nunc-Immunoplate Maxisorp). После 15 мин инкубации при комнатной температуре измеряют флуоресценцию (флуорометр Victor² фирмы Perkin-Elmer Wallace). Специфичная цитотоксичность рассчитывается из уравнения (экспериментальный лизис - спонтанный лизис)/(максимальный лизис - спонтанный лизис) ×100%.

В предпочтительном варианте осуществления проводят тест на клеточную иммунную реакцию на

Core-1, в котором:

а) нагружают соответствующее количество незрелых дендритных клеток, а именно, по меньшей мере, одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую, по меньшей мере, одну дендритную клетку, соответствующим количеством Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, или содержащей их композиции, как описано здесь;

б) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях дозревания;

в) вводят в контакт соответствующее количество указанных нагруженных дендритных клеток с соответствующим количеством иммунных клеток, содержащим, по меньшей мере, одну иммунную клетку, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, смесь клеток, содержащую, по меньшей мере, одну Т-клетку, или периферийные мононуклеарные клетки крови, которые могут активироваться или ингибироваться дендритной клеткой;

д) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях для активации или ингибирования;

е) добавляют для повторной стимуляции соответствующее количество дендритных клеток, содержащее, по меньшей мере, одну дендритную клетку, дендритные клетки, или смесь клеток, содержащую, по меньшей мере, одну дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством, по меньшей мере, одного несущего Core-1 антигена или контрольных антигенов;

ф) культивируют соответствующее время в соответствующих условиях для повторной стимуляции;

г) измеряют количество выделенного GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа методом ELISA или ELISPOT, причем положительная клеточная иммунная реакция на Core-1 показывает существенно более высокую секрецию GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными дендритными клетками, нагруженными несущим Core-1 антигеном, по сравнению с секрецией GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующих указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными ненагруженными дендритными клетками, и/или существенно более высокую секрецию GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными дендритными клетками, нагруженными несущим Core-1 антигеном, по сравнению с секрецией GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующих указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными дендритными клетками, нагруженными антигеном, не несущим Core-1, и/или существенно более высокую секрецию GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными дендритными клетками, нагруженными азиалогликофорином, по сравнению с секрецией GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующих указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными дендритными клетками, нагруженными гликофорином или обработанным периодатом азиалогликофорином, и/или существенно более высокую секрецию GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными дендритными клетками, нагруженными лизатом или фракциями NM-D4 или NM-F9, по сравнению с секрецией GM-CSF, IFN-гамма и/или TNF-альфа соответствующих указанных иммунных клеток, повторно стимулированных указанными дендритными клетками, нагруженными лизатом NM-wt или NM-H9.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его лизат или фракцию, вызывает клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в двух тестах на клеточную иммунную реакцию из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его лизат или фракцию, вызывает гуморальную и клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в одном тесте на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в одном тесте на клеточную иммунную реакцию.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его лизат или фракцию, вызывает гуморальную и клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в двух тестах на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в двух тестах на клеточную иммунную реакцию, предпочтительно положительна в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 6 и всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, еще лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5 и всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, а оптимально положительна во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию и всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию.

В другом варианте осуществления изобретения предусматривает тесты на клеточную иммунную реакцию 1-5, где дендритная клетка, дендритные клетки или смесь клеток, содержащая дендритную

клетку, содержит по меньшей мере одну зрелую дендритную клетку при контакте с указанными иммунными клетками.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тесты на клеточную иммунную реакцию 1-5, где дендритная клетка, дендритные клетки или смесь клеток содержат функциональные дендритные клетки, полученные из клеток, выведенных от MUTZ-3.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тесты на клеточную иммунную реакцию 1-5, где указанные иммунные клетки совмещаются с указанными дендритными клетками в, по меньшей мере, одной молекуле класса I гистосовместимости.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает тесты на клеточную иммунную реакцию 1-5, где несущая Core-1 молекула представляет собой лизат или фракцию NM-D4 или NM-F9 или азиалогликофорин.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения любой из вышеописанных тестов на иммунную реакцию на Core-1, вызванную или усиленную нутрицевтической, фармацевтической композицией, Core-1-положительным микроорганизмом или его фракцией, или содержащими их составами в соответствии с изобретением, проводят по меньшей мере на одном человеке или животном.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения любой из вышеописанных тестов на иммунную реакцию используют для испытания естественной иммунной реакции вместо или до введения нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного микроорганизма или его фракции или состава согласно изобретению у, по меньшей мере, одного человека или животного.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения любой из вышеописанных тестов на иммунную реакцию используют для определения и оптимизации эффективного количества, максимального эффективного количества, дозы, режима дозирования, способа введения, состава, носителей и других молекул, используемых в нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительном микроорганизме или его фракции или в содержащих их составах согласно изобретению.

Указанная нутрицевтическая композиция в соответствии с изобретением может содержать по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, в том числе живой или мертвый, лиофилизированный или пастеризованный, или его лизаты, компоненты или фракции, или он может находиться по меньшей мере в частично солиubilizированной форме в жидком виде, или он может включать другие компоненты, в том числе другие нутриенты (питательные вещества), пищевые добавки или добавки к продуктам или напиткам, растворы или эмульсии, известные специалистам. Такая нутрицевтическая композиция может вводиться орально в различных формах, например, в виде капсул, таблеток, эмульсий, порошков, жидкостей. Указанный нутрицевтик может также находиться в составе любого блюда, напитка, компонента блюда или напитка, нутрицевтической добавки или существовать отдельно.

В предпочтительном варианте осуществления нутрицевтическую композицию используют в виде капсул или таблеток. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическую композицию подмешивают в продукты или напитки, в том числе упоминаемые в настоящем описании.

В) Способы испытания способности Core-1-положительного микроорганизма вызывать иммунные реакции, способы выделения Core-1-положительного микроорганизма, способы подбора Core-1-положительного микроорганизма для нутрицевтических и фармацевтических композиций

Изобретение также предусматривает способ испытания способности Core-1-положительного микроорганизма или его фракции вызывать гуморальную иммунную реакцию на Core-1, в котором:

- a) вводят соответствующее количество Core-1-положительного микроорганизма или его фракции по меньшей мере одному человеку или животному;
- b) испытывают иммунную реакцию по меньшей мере одним из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 на Core-1.

Изобретение также предусматривает способ испытания способности Core-1-положительного микроорганизма или его фракции вызывать клеточную иммунную реакцию на Core-1, в котором:

- a) вводят соответствующее количество Core-1-положительного микроорганизма или его фракции по меньшей мере одному человеку или животному;
- b) испытывают иммунную реакцию по меньшей мере одним из тестов на клеточную иммунную реакцию на Core-1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ испытания способности любой нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительных микроорганизмов или их фракций, или содержащих их составов вызывать иммунную реакцию и определения вида вызванной иммунной реакции.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ определения и дозы, режима дозирования, способа введения, состава, носителей или других компонентов, используемых в нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительном микроорганизме или его фракции или в содержащих их составах.

Далее изобретение предусматривает способ испытания способности Core-1-положительного микро-

организма вызывать гуморальную иммунную реакцию, в котором осуществляют, по меньшей мере, один из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6, предпочтительно по меньшей мере два, более предпочтительно три, лучше 4, еще лучше 5, а оптимально все 6 тестов на гуморальную иммунную реакцию, причем, по меньшей мере, одному животному или человеку вводят орально или системно достаточные количества микроорганизма (с дополнительными адьювантами или без), а антитела в сыворотке или антитела, полученные из сыворотки, плазмы или фекалий, испытывают предпочтительно в сравнении с антителами в сыворотке или антителами, полученными из сыворотки, плазмы или фекалий до введения микроорганизмов. Специалисты могут определить нужные количества микроорганизма и способы извлечения антител из крови и контрольных препаратов. Эти испытания подробно описаны здесь и/или в примере 11.

Далее изобретение предусматривает способ испытания способности Core-1-положительного микроорганизма вызывать клеточную иммунную реакцию, в котором осуществляют по меньшей мере один из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5, предпочтительно по меньшей мере два, более предпочтительно три, а оптимально все 5 тестов на клеточную иммунную реакцию.

Далее изобретение предусматривает способ испытания способности Core-1-положительного микроорганизма вызывать цитотоксическую клеточную иммунную реакцию, в котором осуществляют, по меньшей мере, тест на клеточную иммунную реакцию 2, предпочтительно 2 и 1, более предпочтительно 2, 3, а оптимально все 5 тестов на клеточную иммунную реакцию.

В обоих вариантах тесты проводят либо *in vitro*, как описано выше, либо клеточные иммунные тесты 1-3 или 5 осуществляют следующим образом: по меньшей мере одному животному или человеку вводят орально или системно достаточные количества микроорганизма (с дополнительными адьювантами или без), а иммунные клетки отбирают из крови и (i) осуществляют клеточные иммунные тесты 1-3 или 5, как описано выше, либо (ii) осуществляют клеточные иммунные тесты 1-3 или 5, как описано выше, с тем отличием, что иммунные клетки не вводят в контакт с дендритными клетками, нагруженными Core-1-микроорганизмами, и подают на повторную стимуляцию только дендритные клетки, нагруженные несущей Core-1 молекулой. Вариант (i) предпочтительно используют для усиления эффекта *in vivo* и лучшего прочтения при ослабленных реакциях, а к варианту (ii) прибегают предпочтительно при сильных реакциях. Специалисты могут определить нужные количества микроорганизма и контрольных препаратов. Эти испытания подробно описаны в примере 12.

Далее изобретение предусматривает в предпочтительном варианте осуществления способ испытания способности Core-1-положительного микроорганизма вызывать гуморальную и клеточную иммунную реакцию, представляющий собой комбинацию вышеописанных способов, в котором выполняют по меньшей мере один из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 и по меньшей мере один из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-4, предпочтительно по меньшей мере два из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 и по меньшей мере один, желательно по меньшей мере два из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5, более предпочтительно по меньшей мере три из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6, еще более предпочтительно по меньшей мере 4 из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 и все тесты на клеточную иммунную реакцию 1-5, лучше по меньшей мере 5 из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 и все тесты на клеточную иммунную реакцию 1-5, оптимально все 6 тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 и все 5 тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5.

Изобретение также предусматривает способы идентификации Core-1-положительного микроорганизма в смысле, заложенном в настоящем изобретении, и способы выделения Core-1-положительного микроорганизма из смеси Core-1-положительных и отрицательных микроорганизмов.

Изобретение также предусматривает способ выделения Core-1-положительного микроорганизма из смеси микроорганизмов, в котором:

- (a) вводят Core-1-специфичное антитело в контакт со смесью микроорганизмов;
- (b) выделяют микроорганизм, связанный с указанным Core-1-специфичным антителом.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение также предусматривает способы выделения Core-1-положительного микроорганизма из смеси микроорганизмов, где на указанной стадии (b) используют магнитные частицы для отделения микроорганизмов, связанных с указанным Core-1-специфичным антителом. В предпочтительном варианте осуществления изобретение также предусматривает способ выделения Core-1-положительного микроорганизма из смеси микроорганизмов, где указанная смесь содержит микроорганизмы от здорового человека или больного, от животного, из почвы, пищевых продуктов или растений.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение также предусматривает способ выделения Core-1-положительного микроорганизма из смеси микроорганизмов, которая содержит микроорганизмы из человеческого желудочно-кишечного тракта, человеческого стула, человеческой крови, человеческих тканей или жидкостей организма здоровых людей или больных.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение также предусматривает способ выделения Core-1-положительного микроорганизма из смеси микроорганизмов, выполняемый в анаэробных условиях, что позволяет выделять анаэробный Core-1-положительный микроорганизм.

Указанная смесь микроорганизмов может быть любой смесью по меньшей мере двух разных микроорганизмов, не обязательно природного происхождения, в том числе встречаться в почве, пищевых продуктах, растениях, животных, в человеческом желудочно-кишечном тракте, человеческом стуле, человеческой крови, человеческих тканях или жидкостях организма здоровых людей или больных, но наиболее предпочтительна смесь микроорганизмов от здоровых людей. Предпочтительно микроорганизмы помещают в соответствующий раствор перед контактом с Core-1-специфичным антителом. Core-1-специфичное антитело предпочтительно связано с носителем, например, магнитными гранулами, что позволяет отделять микроорганизм, привязанный к такому носителю. После введения Core-1-специфичной молекулы в контакт со смесью микроорганизмов микроорганизмы, связанные с Core-1-специфичным антителом, отделяются от тех, что не связаны с антителом. В другом варианте Core-1-специфичное антитело не связано с носителем, и Core-1-положительный микроорганизм выделяется вместе с Core-1-специфичным антителом методами, специфично изолирующими антитело, например, с использованием протеина А, протеина G, протеина L или антител к IgM или IgG, которые сами привязаны к носителю, например, к хроматографическим магнитным гранулам. В предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительные микроорганизмы, связанные с Core-1-специфичным антителом, тщательно промывают буфером (например, PBS-a) и высевают на селективные или неселективные среды, в том числе MRS, BSM, KF, N, S, WC, BHI, CBA ST (подробно см. табл. 3). Полученные колонии соскребают с планшетов и подвергают дополнительным турам повышения сродства к Core-1-специфичным антителам. Колонии собирают, повторно высевают штрихом и анализируют на экспрессию Core-1- методами ELISA и иммунофлуоресценции (подробнее см. примеры 1-9). Из этого описания и примеров специалист может отладить или оптимизировать методики для различных бактерий из разных источников.

В особом предпочтительном варианте осуществления изобретения способ осуществляют в анаэробных условиях, что позволяет выделять анаэробный Core-1-положительный микроорганизм. Это существенно важно, например, для большинства микроорганизмов из человеческого кишечника. Подробно методика приведена в примерах 1-9.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения микроорганизмы выделяют из пищевых продуктов. В еще более предпочтительном варианте микроорганизмы выделяют из желудочно-кишечной системы, лучше даже из человеческих фекалий. Методика описана в примерах 1-9. Из бактерий, обычно населяющих человеческий желудочно-кишечный тракт, получается терапевтическое и профилактическое средство, не дающее побочных эффектов. Углеводное происхождение приводит к отсутствию толерогенности и аллергических реакций.

Изобретение также предусматривает способ отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе пищевых и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором:

- a) испытывают Core-1-положительный микроорганизм на связывание по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом и
- b) выявляют этот Core-1-положительный микроорганизм, связанный по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, как описано здесь.

Наиболее предпочтительны Core-1-положительные микроорганизмы, связанные Core-1-специфичными антителами NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, причем их связывание с NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2 ослабляется после обработки периодной кислотой.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм испытывают на связывание по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом методом ELISA, причем Core-1-положительный микроорганизм дает сигнал ELISA меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, по меньшей мере в 3 раза, предпочтительно в 5 раз, а наиболее предпочтительно в 10 раз выше фонового сигнала.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм дает положительный ELISA с Core-1-специфичным антителом NEMOD-TF1 при покрытии уже при концентрации микроорганизма 1×10^7 /мл, предпочтительно 5×10^6 /мл, еще более предпочтительно 1×10^6 /мл, оптимально 1×10^5 /мл.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм дает положительный ELISA сигнал с Core-1-специфичным антителом NEMOD-TF2 при покрытии уже при концентрации микроорганизма 1×10^7 /мл, предпочтительно 5×10^6 /мл, еще более предпочтительно 1×10^6 /мл, оптимально 1×10^5 /мл.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм показывает ослабление сигнала ELISA с Core-1-специфичным антителом после обработки периодной кислотой на 30%, предпочтительно на 50% и оптимально по меньшей мере на 80%.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором:

а) испытывают Core-1-положительный микроорганизм на связывание по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом и

б) испытывают его на способность вызывать иммунную реакцию у людей или животных при распознавании антигена Core-1 и/или Core-1-положительной опухолевой клетки,

в) признают этот микроорганизм, связанный по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, как описано выше, способным вызывать иммунную реакцию у людей или животных при распознавании антигена Core-1 и/или Core-1-положительной опухолевой клетки, поскольку он дает положительную реакцию по меньшей мере в одном из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 или тестов на клеточную иммунную реакцию 1-4, описанных здесь. Предпочтение отдается тем Core-1-положительным микроорганизмам, которые положительны к NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, показывают ослабление связывания с NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2 при обработке периодатом, как описано здесь (пример 9) и вызывают по меньшей мере у одного человека или животного положительную иммунную реакцию по меньшей мере в одном тесте на гуморальную и в одном тесте на клеточную иммунную реакцию, особенно те, которые положительны по меньшей мере в тесте на клеточную иммунную реакцию 2. Более предпочтительны те Core-1-положительные микроорганизмы, которые положительны к TF1 и TF2 показывают ослабление связывания с NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2 при обработке периодатом, как описано здесь, а также положительны в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1,2, 3 и 4, как описано здесь. Оптимальными являются те Core-1-положительные микроорганизмы, которые положительны к NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, показывают ослабление связывания с NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2 при обработке периодатом, как описано здесь, а также положительны по меньшей мере в 5 тестах на гуморальную иммунную реакцию и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, как описано здесь.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором выявленный микроорганизм связан по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним веществом из списка № 2 (см. определения).

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором выявленный микроорганизм связан по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним веществом из списка № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином и связывается по меньшей мере с одной из линий человеческих опухолевых клеток NM-D4 (DSM ACC2605), NM-F9 (DSM ACC2606), ZR-75-1 (ATCC CRL-1500), САМА-1 (ATCC HTB-21), KG-1 (DSM ACC 14) или А-204 (DSM ACC 250), причем это связывание чувствительно к периодату. Линии клеток NM-9 и NM-D4 депонированы в DSMZ фирмой Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG, Robert-Rossle-Strasse 10,13125 Берлин, Германия (т.е. депонентом), которая разрешила заявителю ссылаться на описанный здесь депонированный биологический материал и гарантировала заявителю, что описанный здесь депонированный биологический материал публично доступен в соответствии со ст. 28 (1) (d) Европейской патентной конвенции. DSMZ находится по адресу Mascheroder Weg 1b, D-38124 Брауншвейг, Германия. Указанные материалы депонированы там, в соответствии с положениями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной экспертизы. Braunschweig, Germany.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором выявленный микроорганизм связан по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним веществом из списка № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином и связывается по меньшей мере с одной из линий человеческих опухолевых клеток NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, САМА-1, KG-1 или А-204, причем это связывание чувствительно к периодату и связан по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом, которое обладает всеми вышеперечисленными характеристиками, но не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором выявленный микроорганизм связан с NEMOD-TF2, А78-G/А7 или NEMOD-TF1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором выявленный микроорганизм связан согласно (b) с NEMOD-TF2, А78-G/А7 или NEMOD-TF1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических

композиций в соответствии с изобретением, в котором выявленный микроорганизм связан согласно (b) с NEMOD-TF2, A78-G/A7 или NEMOD-TF1, но не с A68-B/A11.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, в котором вызванная иммунная реакция после введения человеку или животному состава в соответствии с изобретением положительна в, по меньшей мере, одном тесте на гуморальную иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере в одном тесте на клеточную иммунную реакцию на Core-1, как описано здесь.

Способы отбора Core-1-положительных микроорганизмов для использования в составе нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением могут использоваться для отбора соответствующих микроорганизмов из существующих штаммов, например, в DSMZ или других коллекциях микроорганизмов, или из Core-1-положительного микроорганизма, выделенного из смеси микроорганизмов в соответствии с изобретением.

Изобретение также относится к способу выделения и выявления Core-1-положительных бактерий, в котором:

- a) выделяют цельные бактерии из образцов фекалий;
- b) обогащают сродство Core-1-положительных бактерий с использованием одного или нескольких из следующих моноклональных антител к Core-1: Nemod-TF1, Nemod-TF2 и A78-G/A7 в аэробных или анаэробных условиях;
- c) высевают обогащенные бактерии на различные селективные среды и проводят скрининг бактерий на связывание с Core-1-специфичными антителами или лектинами.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу выделения и выявления Core-1-положительных бактерий, в котором:

- a) выделяют смесь микроорганизмов, содержащих цельные бактерии, из образцов фекалий;
- b) вводят Core-1-специфичное антитело в контакт со смесью микроорганизмов;
- c) выделяют микроорганизм, который связывается с Nemod-TF1, Nemod-TF2 или A78-G/A7 в аэробных или анаэробных условиях путем сепарации магнитных частиц;
- d) высевают обогащенные бактерии по меньшей мере на одну селективную среду;
- e) выявляют микроорганизм, который связан по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом.

Выработка также означает, что Core-1-положительный микроорганизм вырабатывают, например, химической обработкой из микроорганизма, который содержит структуру Core-1 в скрытой форме. Химическая обработка, например, периодатом может вскрыть структуру Core-1, вырабатывая тем самым Core-1-положительный микроорганизм. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу выделения и выявления Core-1-положительных бактерий, в котором:

- a) вырабатывают чистый бактериальный штамм, который связан по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом; и/или
- b) испытывают указанный чистый бактериальный штамм на способность вызывать или усиливать иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере у одного человека или животного.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ испытания способности Core-1-положительного микроорганизма вызывать Core-1-специфичную иммунную реакцию, в соответствии с которым:

- 1) выявляют Core-1-положительные микроорганизмы и вырабатывают чистые культуры;
- 2) выявляют иммуноэффективные бактериальные штаммы в кишечнике;
- 3) вырабатывают эффективный, иммунологически и токсикологически испытанный, Core-1-положительный препарат как нутрицевтическую добавку, пригодную для испытания на человеке;
- 4) вызывают или усиливают Core-1-специфическую иммунную реакцию у людей; а при необходимости
- 5) выделяют, выявляют и испытывают иммуноэффективную Core-1-положительную фракцию или компонент указанного микроорганизма.

Этот способ подробно описан в примерах 1-10.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выделения Core-1-положительного микроорганизма из смеси микроорганизмов, в котором:

- a) вводят Core-1-специфичное антитело в контакт со смесью микроорганизмов, выбранных из группы, включающей микроорганизмы от здорового человека или больного, от животного, из почвы, пищевых продуктов и/или растений, и/или микроорганизмы из желудочно-кишечного тракта человека, из человеческих фекалий, крови, тканей и/или жидкостей из организма здоровых людей и/или больных и
- b) выделяют микроорганизм, связанный с указанным Core-1-специфичным антителом.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ выделения и выявления Core-1-положительных бактерий, в котором:

- (a) выделяют смесь микроорганизмов, содержащих цельные бактерии, из образцов фекалий,
- (b) вводят Core-1-специфичное антитело в контакт со смесью микроорганизмов,

(с) выделяют микроорганизм, связанный с Core-1-специфичным антителом, в аэробных или анаэробных условиях путем разделения магнитных частиц,

(d) выявляют микроорганизм, связанный NemoD-TF2 или A78-G/A7 и NemoD-TF1, причем связывание существенно ослабляется после обработки периодатом, и

(е) испытывают на способность вызывать или усиливать иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере у одного человека или животного.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ выявления Core-1-положительного микроорганизма для использования в композициях по любому из предшествующих пунктов, в котором:

а) испытывают микроорганизм на связывание, по меньшей мере, одним Core-1-специфичным антителом,

б) испытывают на наведение иммунной реакции у людей или животных с распознаванием антигена Core-1 и/или Core-1-положительной опухолевой клетки,

с) выявление указанного микроорганизма, связанного по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом,

где указанный микроорганизм вызывает или усиливает иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере у одного человека или животного, отличающуюся тем, что она положительна по меньшей мере в одном тесте на гуморальную иммунную реакцию или по меньшей мере в одном тесте на клеточную иммунную реакцию на Core-1, как описано здесь.

Изобретение также относится к способу выработки Core-1-положительных микроорганизмов, в котором:

а) вводят микроорганизм в контакт с агентом, вызывающим мутации под действием химических и/или физических мутагенов, в том числе электромагнитные воздействия, ультрафиолетовое облучение, метотрексат, микроволны, канцерогенные вещества, канцерогены, мутагены или излучения, в условиях, убивающих большинство микроорганизмов;

б) культивируют выжившие микроорганизмы в соответствующих условиях;

с) обогащают, выделяют и/или выявляют Core-1-положительные микроорганизмы, как описано здесь;

д) испытывают указанный микроорганизм на способность вызывать или усиливать иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере у одного человека или животного.

Изобретение также относится к способу выработки Core-1-положительных микроорганизмов методами генной инженерии, в котором:

а) вводят, выбивают или замалчивают гены, фрагменты генов, ДНК, РНК, десенсибилизирующую РНК, олигонуклеотиды, олигопептиды или протеины в микроорганизм, воздействуя тем самым на биосинтез Core-1, деградацию Core-1 или деградацию или биосинтез обрамляющих углеводов;

б) обогащают, выделяют, выявляют и/или испытывают Core-1-положительные микроорганизмы, как описано здесь.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения указанный микроорганизм представляет собой Core-1-отрицательный микроорганизм. В еще одном варианте осуществления указанный микроорганизм является благоприятным для желудочно-кишечного тракта, в том числе *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*. В еще одном варианте осуществления указанный микроорганизм используется для производства продуктов питания, в том числе *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*. В одном из вариантов указанный микроорганизм уже является Core-1-положительным и способ используется для повышения экспрессии Core-1 на поверхности клетки.

С) Предоставление Core-1-положительного микроорганизма

Изобретение также предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, распознаваемый по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом.

Изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм для использования в нутрицевтических и фармацевтических композициях в соответствии с изобретением, причем указанный Core-1-положительный микроорганизм связан по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом. Изобретение также предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который вызывает специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1, Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных.

Изобретение также предусматривает Core-1-положительные микроорганизмы для использования как компоненты в нутрицевтических и фармацевтических композициях в соответствии с изобретением, причем указанный Core-1-положительный микроорганизм вызывает специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1, Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных.

Изобретение также предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который является действующим веществом в нутрицевтических и фармацевтических композициях и вызывает специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1, Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных.

Изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который вызывает или уси-

лирует специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1, Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных при использовании внутрицевтических и фармацевтических композициях в соответствии с изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный Core-1-положительный микроорганизм распознается и связывается при контакте по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом из числа следующих:

НВ-Т1, НН8, А78-Г/А7, Nemod-TF1 или Nemod-TF2, более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из веществ, указанных в списке № 2;

более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из веществ, указанных в списке № 2, и которое связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом;

еще более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из веществ, указанных в списке № 2, и которое связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и которое связывается по меньшей мере с одной человеческой опухолевой клеткой из линий NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, САМА-1, КГ-1 или А-204, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом (например, NEMOD-TF2 или А78-Г/А7), лучше по меньшей мере одно антитело с вышеуказанными характеристиками связывания, которое не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА, оптимально по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА, и ни с одним из конструкторов X-РАА, приведенных в списке № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с клетками NM-D4, NM-F9 и ZR-75-1, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом (например, NEMOD-TF1);

более предпочтительно по меньшей мере два из указанных антител, еще более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из конструкторов X-РАА, приведенных в списке №2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с одной человеческой опухолевой клеткой из линий NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, САМА-1, КГ-1 или А-204, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, например, NEMOD-TF2 или А78-Г/А7, и по меньшей мере одно антитело с вышеуказанными характеристиками связывания, которое не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА;

еще более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА, и ни с одним из конструкторов X-РАА, приведенных в списке № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с одной из клеток NM-D4, NM-F9 и ZR-75-1, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, например, NEMOD-TF1;

еще более предпочтительно NEMOD-TF2 или А78-Г/А7 и NEMOD-TF1;

еще более предпочтительно NEMOD-TF2 или А78-Г/А7 и NEMOD-TF1, но не А68-В/А11;

еще более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из конструкторов X-РАА, приведенных в списке №2, и связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом;

более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и ни с одним из конструкторов X-РАА, приведенных в списке № 2, и который связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с одной человеческой опухолевой клеткой из линий NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, САМА-1, КГ-1 или А-204, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, например NEMOD-TF2 или А78-Г/А7, еще более предпочтительно по меньшей мере одно антитело с вышеуказанными характеристиками связывания, которое не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА, лучше по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА, и ни с одним из конструкторов X-РАА, приведенных в списке № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с клетками NM-D4, NM-F9 и ZR-75-1, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, например, NEMOD-TF1;

более предпочтительно по меньшей мере два из указанных антител, еще более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-РАА, слабо или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА, и ни с одним из конструкторов X-РАА, приведенных в списке № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с одной человеческой опухолевой клеткой из линий NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, САМА-1, КГ-1 или А-204, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, например, NEMOD-TF2

или A78-G/A7, и по меньшей мере одно антитело с вышеуказанными характеристиками связывания, которое не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с PAA;

более предпочтительно по меньшей мере одно антитело, которое связывается с TFa-PAA, слабо или совсем не связывается с TFb-PAA и не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с PAA, и ни с одним из веществ, приведенных в списке № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с клетками NM-D4, NM-F9 и ZR-75-1, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, (например, NEMOD-TF1);

еще более предпочтительно NEMOD-TF2 или A78-G/A7 и NEMOD-TF1;

оптимально NEMOD-TF2 или A78-G/A7 и NEMOD-TF1, но не A68-B/A11.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который распознается по меньшей мере двумя Core-1-специфичными антителами.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, связанный по меньшей мере одним антителом, которое связывается с TFa-PAA, слабо или совсем не связывается с TFb-PAA и не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с PAA, и ни с одним из веществ, приведенных в списке № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается по меньшей мере с одной человеческой опухолевой клеткой из линий NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, САМА-1, КG-1 или А-204, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, и связанный по меньшей мере одним антителом с вышеуказанными характеристиками связывания, которое не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с PAA.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который распознается/связывается NEMOD-TF2, A78-G/A7 или NEMOD-TF1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который распознается/связывается Core-1-специфичным антителом NEMOD-TF1, причем связывание испытывают методом ELISA, и сигнал ELISA от Core-1-специфичного антитела NEMOD-TF1, по меньшей мере, в 3 раза сильнее фонового при покрытии при концентрации микроорганизма 1×10^7 /мл, предпочтительно 5×10^6 мл, еще более предпочтительно 1×10^6 /мл, оптимально 1×10^5 /мл. В другом варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, связанный Core-1-специфичным антителом NEMOD-TF2, причем связывание испытывают методом ELISA, и сигнал ELISA от Core-1-специфичного антитела NEMOD-TF1 по меньшей мере в 3 раза сильнее фонового при покрытии при концентрации микроорганизма 1×10^7 /мл, предпочтительно 5×10^6 мл, еще более предпочтительно 1×10^6 /мл, оптимально 1×10^5 /мл.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, связанный Core-1-специфичным антителом NEMOD-TF2, причем связывание испытывают методом ELISA, и сигнал ELISA от Core-1-специфичного антитела NEMOD-TF1 по меньшей мере в 3 раза сильнее фонового при покрытии при концентрации микроорганизма 1×10^7 /мл, предпочтительно 5×10^6 мл, еще более предпочтительно 1×10^6 /мл, оптимально 1×10^5 /мл, а сигнал ELISA после обработки периодической кислотой ослабевает на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, оптимально по меньшей мере на 80%.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, связанный Core-1-специфичным антителом NEMOD-TF1, причем связывание испытывают методом ELISA, и сигнал ELISA от Core-1-специфичного антитела NEMOD-TF1 по меньшей мере в 3 раза сильнее фонового при покрытии при концентрации микроорганизма 1×10^7 /мл, предпочтительно 5×10^6 мл, еще более предпочтительно 1×10^6 /мл, оптимально 1×10^5 /мл, а сигнал ELISA после обработки периодической кислотой ослабевает на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, оптимально по меньшей мере на 80%.

В другом предпочтительном варианте изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, связанный Core-1-специфичными антителами NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, причем связывание испытывают методом ELISA, и сигнал ELISA от Core-1-специфичного антитела NEMOD-TF1, по меньшей мере, в 3 раза сильнее фонового при покрытии при концентрации микроорганизма 1×10^7 /мл, предпочтительно 5×10^6 мл, еще более предпочтительно 1×10^6 /мл, оптимально 1×10^5 /мл, а сигнал ELISA после обработки периодической кислотой ослабевает на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, оптимально по меньшей мере на 80%.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который вызывает или усиливает специфическую гуморальную и/или клеточную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки или клеточную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки и клеточную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

Указанное Core-1-специфичное антитело, предпочтительные Core-1-специфичные антитела, комбинации Core-1-специфичных антител или предпочтительные комбинации Core-1-специфичных антител рассматриваются в разделе "Определения" и в других местах.

Указанные нутрицевтические или фармацевтические композиции и предпочтительные варианты их осуществления подробно рассматриваются далее.

Указанная гуморальная иммунная реакция на Core-1 и указанная клеточная иммунная реакция на Core-1 подробно описаны в настоящем описании, как и тесты на гуморальную и клеточную иммунную реакцию, позволяющие определить реакцию соответствующих антител или Т-клеток на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

В предпочтительном варианте осуществления Core-1-положительный микроорганизм в соответствии с изобретением вызывает или усиливает специфическую гуморальную и/или клеточную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных, которая может быть обнаружена по меньшей мере одним тестом на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере одним тестом на клеточную иммунную реакцию.

В предпочтительном варианте осуществления Core-1-положительный микроорганизм связан NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, вызывает или усиливает иммунную реакцию по меньшей мере у одного человека или животного, причем эта реакция положительна по меньшей мере в двух из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3 и по меньшей мере в одном из тестов на клеточную иммунную реакцию 1, 2 и 3.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в двух из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6, предпочтительно положительна в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше 1, 2, 3, 4 и 6, еще лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5, а оптимально положительна во всех 6 в тестах на гуморальную иммунную реакцию.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в двух из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную и клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в одном из тестов на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в одном из тестов на клеточную иммунную реакцию.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную и клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в двух из тестов на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в двух из тестов на клеточную иммунную реакцию, предпочтительно положительна в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3, и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 6 и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, еще лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5 и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, а оптимально во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который может использоваться для получения Core-1-специфичной иммунной реакции, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток, будучи способным уничтожать такие клетки путем, например, активации Core-1-специфичных антител, Core-1-специфичной зависимой от комплемента цитотоксичности антител к Core-1 против Core-1-положительных опухолевых клеток, которые она эффективно уничтожает, и/или путем секреции TNF-альфа и/или INF-гамма при реакции Core-1-специфичных Т-клеток, которые являются признанными суррогатными маркерами медиаторов специфичными цитотоксичными Т-клетками уничтожения несущих Core-1 опухолевых клеток при использовании в нутрицевтических или фармацевтических композициях в соответствии с изобретением.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, который может использоваться для получения Core-1-специфичной иммунной реакции, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток, будучи способным уничтожать такие клетки, как описано здесь, путем орального введения нутрицевтической композиции (по

меньшей мере одному) здоровому индивидууму.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, способный останавливать, а предпочтительно предотвращать появление Core-1-положительного заболевания путем орального введения нутрицевтической композиции (по меньшей мере одному) здоровому индивидууму.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, способный останавливать, а предпочтительно предотвращать появление Core-1-положительного заболевания путем орального введения фармацевтической композиции (по меньшей мере одному) здоровому индивидууму.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, используемый в качестве действующего вещества в составе нутрицевтической композиции для лечения Core-1-положительного заболевания или опухоли путем орального введения больным.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм, используемый в качестве действующего вещества в составе фармацевтической композиции для лечения Core-1-положительного заболевания или опухоли путем орального введения больным фармацевтической композиции как описано выше.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм в качестве компонента нутрицевтической композиции, которая предпочтительно вызывает у людей иммунную реакцию, распознающую антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку, давая положительные результаты после орального введения Core-1-положительного микроорганизма по меньшей мере в одном тесте на гуморальную или клеточную иммунную реакцию, как описано в предыдущих предпочтительных вариантах осуществления изобретения выше.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный Core-1-положительный микроорганизм положительно связывается Core-1-специфичными антителами NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, причем связывание указанных антител существенно ослабляется после обработки периодной кислотой, как описано выше, и вызывает иммунную реакцию по меньшей мере у одного человека или животного, положительную в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2 и 3, предпочтительно по меньшей мере в 5 тестах на гуморальную иммунную реакцию во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, а оптимально во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает создание или использование:

(i) Core-1-положительного микроорганизма в соответствии с изобретением или

(ii) нутрицевтической или фармацевтической композиции или нутрицевтической добавки, содержащей Core-1-положительный микроорганизм, выбранной из группы, включающей Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Streptococcus, Bacteroides, Rhuminococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Johnsonella, Atopobium, Staphylococcus, Eubacterium, Finegoldia, Clostridium, Eggerthella, Butyribacterium, Citrobacter, Helicobacter, Propionibacterium и Corynebacterium, Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides acidophilus, Bacteroides caccae, AG6 (DSM 18726) и/или MU1 (DSM 18728), причем указанный микроорганизм, выбранный из группы, является Core-1-положительным и специфически распознается по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом.

Поскольку эти микроорганизмы сами по себе не Core-1-положительны, важно отобрать микроорганизм/штамм, способный запускать Core-1-специфичную иммунную реакцию. Поэтому важно, чтобы указанный микроорганизм специфически распознавался по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом и при контакте связывался с ним. Способность запускать Core-1-специфичную иммунную реакцию также можно определить описанными здесь тест-системами на гуморальные и клеточные иммунные реакции. Важность этого отбора по специфичности становится очевидной при сравнении микроорганизмов в соответствии с изобретением с известным уровнем в данной области.

Например, G. F. Springer et al. описывают зарождение Т-антигена после введения E.coli из штамма серотипа 086. В этой работе для оценки антител к Т-антигенам проводили тест на агглютинацию с обработанными сиалидазой эритроцитами. При обработке эритроцитов сиалидазой демаскируется эпитоп Core-1, но вместе с ним много других эпитопов. Поэтому данный анализ не Core-1-специфичен. Core-1-специфичные антитела не использовались. Чтобы установить, Core-1-положительны ли в соответствии с изобретением эти штаммы, мы включили несколько штаммов E.coli в процедуру скрининга, в том числе 7 установленных штаммов E.coli из коллекций культур, в частности, штамм E.coli DSMZ 8697 (штамм 32), который относится к серотипу 086 и очень близок к штамму E.coli, который использовал Шпрингер, поскольку оригинальный штамм мы получить не смогли. Более того, мы испытали 12 E.coli штаммов из образцов фекалий 3 здоровых людей после обогащения сродства TF-специфичными антителами. Однако ни в одном из этих штаммов не отмечалось искомого ослабление связывания TF-специфичных антител

Nemod-TF-1 и Nemod-TF2 после обработки периодатом. Для штамма *E. coli* серотипа 086 (штамм 32) связывание с Nemod-TF1, Nemod-TF2 и В/А11 имело место только после обработки периодатом (разрушения сахарных структур). Это указывает на скрытую экспрессию Core-1, а значит, эпитоп Core-1 недоступен и запустить Core-1-специфичную иммунную реакцию невозможно. Для подтверждения мы также подвергли штамм *E. coli* серотипа 086 (=32) тесту на гуморальную иммунную реакцию после иммунизации мышей. Неожиданно оказалось, что, хотя мы нашли антитела к АРР в сыворотке этих мышей при тесте HIRT 1 (менее специфичном), тесты HIRT 2 и HIRT 3 не дали положительных результатов. Отсюда следует, что Core-1-специфичная иммунная реакция не вызывается этим штаммом *E. coli*, что он не распознает Core-1 в РАА или человеческих опухолевых клетках (подробнее см. примеры). Значит, штамм *E. coli* серотипа 086, который считался TF-положительным, оказался непригодным, поскольку, в отличие от Core-1-положительных микроорганизмов в соответствии с изобретением не в состоянии запустить Core-1-специфичную иммунную реакцию. Поэтому важно подобрать штамм *E. coli*, который был бы Core-1-положительным и специфически распознавался по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом и при контакте связывался с ним. Как отмечалось выше, соответствующие микроорганизмы, которые содержат Core-1 в скрытой форме, можно преобразовать в Core-1-положительные микроорганизмы химической обработкой, например периодатом. Методики тестов для определения того, что микроорганизм после указанной обработки стал Core-1-положительным микроорганизмом, приведены выше.

Подобные результаты получены с *Helicobacter. Klaamas et al. (Immunological Investigations vol. 31, Nos 3&4, pp.191-204, 2002)* описывают штамм *Helicobacter pylori* NCTC 11637 как положительный для связывания антителами, специфичными к Т-антигенам. Параллельно мы использовали штамм *Helicobacter pylori* NCTC 11637 в экспериментах с ELISA в количествах около $5-10 \times 10^6$ бактерий на лунку, что привело к сильному связыванию антител Nemod-TF1 и Nemod-TF2 с Core-1-положительными штаммами AG6 и MU1. Однако мы не смогли обнаружить связывание антител Nemod-TF1 и Nemod-TF2 со штаммом *Helicobacter pylori* NCTC 11637. Только после обработки периодической кислотой штамм *Helicobacter pylori* NCTC 11637 был связан антителом Nemod-TF1, но не Nemod-TF2. Это свидетельствует о скрытой экспрессии Core-1 на *Helicobacter pylori*, которая обнаруживается только после обработки периодатом. Результаты Клаамаса и др. могут объясняться меньшей специфичностью использовавшихся антител или очень высокой концентрацией бактерий (10^8 /пробирку), что могло привести к появлению некоторых продуктов разложения, содержащих Core-1. Более того, *Helicobacter* трудно вводить внутрижелудочные или фармацевтические составы. Колонизация человеческого желудка *Helicobacter pylori* ведет к хроническим инфекциям и играет важную роль в патогенезе язвы двенадцатиперстной кишки, будучи связанной с развитием лимфом В-клеток слизистой желудка. Это затрудняет использование *H. pylori* при профилактике или лечении людей. Вот почему *H. pylori* предпочтительно не используется в соответствии с изобретением.

Более предпочтительно указанный Core-1-положительный микроорганизм отбирается из группы, включающей *Escherichia coli*, *Bacteroides*, например, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides acidophilus* и *Bacteroides caccae*, а с еще большим успехом из группы, включающей новый штамм *Bacteroides* AG6 (DSM 18726), новый штамм *Bacteroides* MU1 (DSM 18728), депонированный в "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" в Брауншвейге (Германия) фирмой Glycotop GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Берлин (Германия) 20 октября 2006 г.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения представлен состав в соответствии с изобретением, в котором Core-1-положительный микроорганизм выбран из группы, включающей *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Rhuminococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Johnsonella*, *Atopobium*, *Staphylococcus*, *Eubacterium*, *Fingoldia*, *Clostridium*, *Eggerthella*, *Butyribacterium*, *Citrobacter*, *Helicobacter*, *Propionibacterium* и *Corynebacterium*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides acidophilus*, *Bacteroides caccae*, AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728).

В предпочтительном варианте осуществления бактериальный штамм выбран из группы, включающей AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728).

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм (действующее вещество)нутрижелудочной или фармацевтической композиции представляет собой сочетание Core-1-положительных микроорганизмов различных штаммов.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанное действующее вещество представляет собой сочетание Core-1-положительных микроорганизмов различных штаммов, выбранных из штаммов AG6 и MU1.

В еще одном предпочтительном варианте осуществлениянутрижелудочная или фармацевтическая композиция (состав) в соответствии с изобретением содержит по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм в сочетании по меньшей мере с одним другим полезным микроорганизмом, в том числе, но, не ограничивая данным перечнем, лактобациллой и/или бифидобактерией, а более предпочтительно представляет собой сочетание Core-1-положительных микроорганизмов различных штаммов с другими полезными микроорганизмами.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм

является непатогенным. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм получен от здорового донора. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм может быть получен от здорового донора.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм и/или его фракция используются для изготовления питательного или лекарственного средства для лечения или профилактики опухоли известными способами.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм и/или его фракция используются *in vivo* или *in vitro* для вызова или усиления Core-1-специфической иммунной реакции и/или для выработки функциональных дендритных клеток или активированных Т-клеток, линий или клонов Т-клеток или антител к Core-1.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный используется в нутрицевтической или фармацевтической композиции как живой организм.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм используется как живой организм и вводится орально.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм, используемый в нутрицевтической или фармацевтической композиции, чувствителен по меньшей мере к одному антибиотику.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм, используемый в нутрицевтической композиции, может колонизовать кишечник.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм используется в нутрицевтической или фармацевтической композиции в мертвом виде.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм используется в нутрицевтической или фармацевтической композиции в пастеризованном виде.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм используется в нутрицевтической или фармацевтической композиции как живой организм, получен от здорового донора, может колонизовать человеческий кишечник и чувствителен к антибиотикам.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм используется в нутрицевтической композиции в пастеризованном виде, получен из кишечника здорового донора-человека и чувствителен к антибиотикам.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм используется в фармацевтической композиции в мертвом виде или в разложенном виде.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный микроорганизм используется в нутрицевтической или фармацевтической композиции в лиофилизированном виде.

Выбранные Core-1-положительные штаммы, а также штаммы, которые не являются Core-1-положительными, характеризуются своей чувствительностью к различным антибиотикам (см. табл. 1 на фиг. 22) и связыванием с Core-1-специфичными антителами (см. табл. 2).

Таблица 2

Штамм	Вид	Связывание с NEMO D-TF1	Чувствительность связывания с NEMOD-TF1 к периоду	Связывание с NEMOD-TF2	Чувствительность связывания с NEMOD-TF2 к периоду	Связывание с A68-B/A11	Чувствительность связывания с A68-B/A11 к периоду
AG6	<i>Bacteroides ovatus</i>	Полож	Ослаб сигн	Полож	Ослаб сигн	Отриц	Сигн не ослаб
MU1	<i>Bacteroides ovatus</i>	Полож	Ослаб сигн	Полож	Ослаб сигн	Отриц	Сигн не ослаб
LN2 (DSM 18727),	<i>E coli</i>	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб	Полож	Ослаб сигн
32	<i>E coli</i>	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб
52	<i>Bacteroides thetaotaomicron</i>	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб
53	<i>Bacteroides ovatus</i>	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб	Полож	Ослаб сигн
AG3	<i>E coli</i>	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб	Отриц	Сигн не ослаб

D) Получение фракций Core-1-положительного микроорганизма

Изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма в соответствии с изобретением, где Core-1-положительный микроорганизм распознается или связывается с по меньшей

мере с одним Core-1-специфичным антителом.

Изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма в соответствии с изобретением для использования в нутрицевтической или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением, где Core-1-положительный микроорганизм распознается или связывается по меньшей мере с одним Core-1-специфичным антителом.

Изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма в соответствии с изобретением, которая вызывает специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных.

Изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма для использования в нутрицевтической или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением, где указанная фракция вызывает специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных.

Изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая является действующим веществом в нутрицевтической или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением и вызывает специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных.

Изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая вызывает или усиливает специфическую иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки у людей или животных при использовании в нутрицевтической или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

Указанное Core-1-специфичное антитело, предпочтительные Core-1-специфичные антитела, комбинации Core-1-специфичных антител или предпочтительные комбинации Core-1-специфичных антител подробно описаны в разделе "Определения" и в других местах.

Указанные нутрицевтические или фармацевтические композиции и их предпочтительные варианты подробно описаны далее.

Указанная фракция Core-1-положительного микроорганизма означает препараты или очищенные формы меньших частей указанных микроорганизмов, например препараты стенок клеток, препараты клеточных оболочек, лизаты, липополисахаридные препараты, препараты капсул или препараты полисахаридных капсул, которые описаны в примерах (пример 10), либо специалист в данной области в состоянии оптимизировать и подобрать подходящую методику или сочетание методик. Они предпочтительно содержат, по меньшей мере, один Core-1-положительный компонент указанного Core-1-положительного микроорганизма. Их можно получить препарированием или очисткой из, по меньшей мере, одного Core-1-положительного микроорганизма. Указанные препараты и очищенные препараты можно получать способами, известными специалистам, которые описаны выше или известны как простое или последовательное фракционирование клеток, фенол-водная экстракция, эфирная экстракция, расщепление лизоцимов или хроматографические методы. Core-1-положительный компонент содержащей его фракции обнаруживают связыванием фракции с, по меньшей мере, одним Core-1-специфичным антителом в таких аналитических системах, как ELISA или дот-блоттинг, известных специалистам. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фракцию, содержащую Core-1-положительный компонент, получают аффинной хроматографией с применением, по меньшей мере, одного Core-1-специфичного антитела.

В предпочтительном варианте осуществления используется однократная стадия препарирования или очистки. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения прибегают к комбинации, по меньшей мере, стадий препарирования и очистки.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления Core-1-положительный компонент обогащают в указанной фракции по сравнению с целым микроорганизмом, что можно определить по повышенному связыванию по меньшей мере одного Core-1-специфичного антитела с фракцией по сравнению с микроорганизмом, например, методом ELISA, при этом предпочтительно массы содержащегося в одинаковом объеме биологического материала равны.

Указанный Core-1-положительный компонент - это любой компонент Core-1-положительного микроорганизма, связанный по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом. Указанный Core-1-положительный компонент содержит по меньшей мере одну углеводную структуру Core-1 или имитирующую Core-1 структуру, которая может выступать в виде ее природной молекулы, если является частью микроорганизма, например пептид, олигопептид, полипептид, липид, церамид, углевод, липопротеин, полисахарид, олигосахарид, протеогликан, липополисахарид или гликопротеин, или части указанной природной молекулы, либо отдельно. Указанный Core-1-положительный компонент можно также получать из компонентов, несущих Core-1 в скрытой форме, например химической обработкой периодатом или иной, которая высвобождает Core-1. Core-1-положительный компонент может использоваться в соответствии с изобретением как фракция Core-1-положительного микроорганизма как такового или связываться с другими неприродными несущими структурами, например протеинами, липидами, химическими молекулами типа полиакриламида.

Предпочтительно он используется в натуральном виде. Core-1-положительный компонент может

содержать одиночную Core-1-углеводную структуру или имитирующую Core-1 структуру либо повторяющиеся единицы указанных структур и может содержать дополнительные углеводные структуры или единицы либо другие биомолекулярные структуры. Указанная имитирующая Core-1 структура - это структура, связанная по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом и/или вызывающая иммунную реакцию на Core-1, предпочтительно гуморальную иммунную реакцию на Core-1 или клеточную иммунную реакцию на Core-1, более предпочтительно гуморальную иммунную реакцию на Core-1 и клеточную иммунную реакцию на Core-1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки или клеточную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки и клеточную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

Указанная гуморальная иммунная реакция на Core-1 и указанная клеточная иммунная реакция на Core-1 подробно описана в данном описании, как и тесты на гуморальную и клеточную иммунную реакцию, которыми можно обнаружить реакцию соответствующего антитела или Т-клетки на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна в, по меньшей мере, двух из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6, предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 6, еще лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5, а оптимально положительна во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в двух из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную и клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в одном из тестов на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в одном из тестов на клеточную иммунную реакцию.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная иммунная реакция представляет собой гуморальную и клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая положительна по меньшей мере в двух из тестов на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в двух из тестов на клеточную иммунную реакцию, предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 6 и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, еще лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5 и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, оптимально во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая может использоваться для создания Core-1-специфической иммунной реакции, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток, будучи способной уничтожать эти клетки, как показано выше, например, посредством Core-1-специфичных антител, зависящей от комплемента Core-1-специфичной цитотоксичности антител к Core-1-положительным опухолевым клеткам, эффективно уничтожая их, и/или секретируя TNF-альфа и/или INF-гамма при Core-1-специфичных реакциях Т-клеток, которые являются признанными суррогатными маркерами медирированной специфичной цитотоксичностью Т-клеток способности к уничтожению этих опухолевых клеток, несущих Core-1, при использовании внутрицевитических или фармацевтических композициях в соответствии с изобретением.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая может использоваться для создания Core-1-специфической иммунной реакции, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток, будучи способной уничтожать эти клетки, как показано выше, путем орального введения внутрицевитической композиции (по меньшей мере одному) здоровому индивидууму.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая может использоваться для ослабления, а предпочтительно недопущения Core-1-положительного заболевания или опухоли путем орального введениянутри-

цветической композиции в соответствии с изобретением (по меньшей мере одному) здоровому индивидууму.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая может использоваться для ослабления, а предпочтительно недопущения Core-1-положительного заболевания или опухоли путем орального введения фармацевтической композиции в соответствии с изобретением (по меньшей мере одному) здоровому индивидууму.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая является действующим веществом нутрицевтической композиции для лечения Core-1-положительного заболевания или опухоли путем орального введения нутрицевтической композиции больным.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая является действующим веществом фармацевтической композиции для лечения Core-1-положительного заболевания или опухоли путем орального введения фармацевтической композиции больным, как описано здесь.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает фракцию Core-1-положительного микроорганизма, которая является компонентом нутрицевтической композиции, предпочтительно вызывающей у людей иммунную реакцию, которая распознает антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку и после орального введения фракции Core-1-положительного микроорганизма дает положительные результаты по меньшей мере в одном тесте на гуморальную или клеточную реакцию, как описано здесь и в вышеприведенных предпочтительных вариантах осуществления изобретения.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления указанная фракция Core-1-положительного микроорганизма положительно связывается с Core-1-специфичными антителами NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, причем связывание указанных антител зависит от обработки периодатом, показывая ослабленное связывание NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2 после обработки периодной кислотой, как описано здесь, и вызывает иммунную реакцию, которая дает положительные результаты в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2 и 3, и даже более предпочтительно во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, как описано здесь.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения Core-1-положительный компонент не является частью бактериального липополисахарида.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предполагает использование фракции Core-1-положительного микроорганизма в соответствии с изобретением, или нутрицевтическую или фармацевтическую композицию или нутрицевтическую добавку, содержащую по меньшей мере одну фракцию по меньшей мере одного Core-1-положительного микроорганизма, где Core-1-положительный микроорганизм выбран из группы, включающей Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Streptococcus, Bacteroides, Rhuminococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Johnsonella, Atopobium, Staphylococcus, Eubacterium, Finegoldia, Clostridium, Eggerthella, Butyribacterium, Citrobacter, Helicobacter, Propionibacterium и Corynebacterium, Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides acidophilus, Bacteroides caccae, AG6 (DSM 18726) и/или MU1 (DSM 18728), причем указанный микроорганизм, выбранный из указанной группы, является Core-1-положительным и специфически распознается по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом. Поскольку Heliobacter представляет собой патоген, указанный Core-1-положительный микроорганизм предпочтительно не является Heliobacter, который опасно использовать без риска в живом виде из-за его патогенной природы.

Более предпочтительно указанный Core-1-положительный микроорганизм выбран из группы, включающей Escherichia coli, Bacteroides, как то Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides acidophilus и Bacteroides caccae, а еще более предпочтительно выбран из группы, включающей новый штамм AG6(DSM 18726), MU1(DSM 18728), депонированный в "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" в Брауншвейге (Германия) фирмой Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Берлин (Германия) 20 октября 2006 г.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения фракция Core-1-положительного микроорганизма (действующий компонент) нутрицевтической или фармацевтической композиции содержит комбинацию фракций от одного Core-1-положительного микроорганизма или предпочтительно от разных Core-1-положительных микроорганизмов различных штаммов. Фракции могут принадлежать к одному или разным препаратам или очищенным препаратам, предпочтительно они представляют собой комбинации Core-1-положительных компонентов на разных молекулярных носителях или имитирующих структурах, в том числе, но, не ограничиваясь этим перечнем, пептидах, олигопептидах, полипептидах, липидах, церамидах, углеводах, липопротеинах, полисахаридах, олигосахаридах, протеогликанах или гликопротеинах, или образуют часть другой природной или синтетической молекулы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанная фракция Core-1-

положительного микроорганизма (действующий компонент) содержит комбинацию Core-1- положительных компонентов Core-1-положительных микроорганизмов, по меньшей мере двух разных штаммов, предпочтительно новых штаммов AG6(DSM 18726) и MU1(DSM 18728).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанная фракция Core-1-положительного микроорганизма (действующий компонент) содержит комбинацию Core-1-положительных компонентов Core-1-положительных микроорганизмов штамма AG6.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная фракция Core-1-положительного микроорганизма содержит углеводные структуры, выбранные из группы, включающей №№ 1, 2, 3, 4 и/или 5 фиг. 19.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная фракция Core-1-положительного микроорганизма содержит повторяющиеся элементы углеводных структур, выбранные из группы, включающей №№ 1, 2, 3, 4 и/или 5 фиг. 19.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная фракция Core-1-положительного микроорганизма содержит углеводные структуры, выбранные из группы, включающей №№ 1, 2, 3, 4 и/или 5 фиг. 19 и/или их повторяющиеся единицы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения указанную углеводную структуру или ее указанные повторяющиеся единицы получают обогащением, и/или очисткой, и/или выделением из Core-1-положительного микроорганизма.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанную углеводную структуру или ее указанные повторяющиеся единицы получают обогащением, и/или очисткой, и/или выделением из штамма AG6.

Подробности описаны в примере 10.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения указанную углеводную структуру или ее указанные повторяющиеся единицы получают химическим синтезом.

Специалисты могут определить надлежащие условия и методику химического синтеза углеводных структур по фиг. 8 или их повторяющихся единиц.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанная фракция Core-1-положительного микроорганизма (действующий компонент) содержит Core-1-положительные компоненты Core-1-положительных микроорганизмов штамма MU1.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением содержит по меньшей мере одну фракцию Core-1-положительного микроорганизма и по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления нутрицевтическая или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением содержит по меньшей мере одну фракцию Core-1-положительного микроорганизма в сочетании по меньшей мере с одним другим полезным микроорганизмом, в том числе, но не ограниченном данным перечнем, лактобактерий и/или бифидобактерий, а предпочтительно комбинацию фракций Core-1-положительных микроорганизмов разных штаммов в сочетании с другими полезными микроорганизмами.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением содержит по меньшей мере одну фракцию Core-1-положительного микроорганизма и по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм в сочетании по меньшей мере с одним другим полезным микроорганизмом, в том числе, но не ограниченным данным перечнем, лактобактериями и/или бифидобактерией.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, которые вызывают или усиливают гуморальную и/или клеточную иммунную реакцию на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительную опухолевую клетку по меньшей мере у одного человека или животного при введении в соответствующей композиции или составе.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, которые вызывают или усиливают Core-1-специфичную иммунную реакцию по меньшей мере у одного человека или животного, служащую защитой от Core-1-положительных раковых клеток, будучи способными уничтожать Core-1-положительные раковые клетки при введении в составе соответствующей композиции.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, которые ослабляют или предотвращают появление Core-1-положительного заболевания, опухоли или метастазов по меньшей мере у одного человека или животного при введении в соответствующей композиции или составе.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, которые ослабляют или предотвращают распространение метастазов Core-1-положительного заболевания или опухоли по меньшей мере у одного человека или животного при введении в соответствующей композиции или составе.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-

положительный микроорганизм или его фракцию, используемые для лечения Core-1-положительного заболевания или опухоли по меньшей мере у одного человека или животного при введении в соответствующей композиции или составе.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, используемые в качестве действующих компонентов нутрицевтика для предотвращения, снижения риска появления или ограничения развития Core-1-положительной опухоли при оральном введении нутрицевтика у здорового индивидуума.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, используемые в качестве действующих компонентов нутрицевтической композиции для предотвращения или ограничения распространения опухоли или метастазов, или времени выздоровления от Core-1-положительной опухоли или опухолевых клеток, улучшения качества жизни, или продления жизни, или ускорения выздоровления, или для лечения больного, имеющего или имевшего Core-1-положительные опухолевые клетки, при оральном введении нутрицевтика соответствующим больным.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, используемые в качестве действующих компонентов фармацевтической композиции для предотвращения, снижения риска появления или ограничения развития Core-1-положительной опухоли путем введения фармацевтической композиции здоровым индивидуумам.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию, используемые в качестве действующих компонентов фармацевтической композиции для предотвращения или ограничения распространения опухоли или метастазов, или распространения метастазов, или времени выздоровления от Core-1-положительной опухоли или опухолевых клеток, улучшения качества жизни, или продления жизни, или ускорения выздоровления, или для лечения больного, имеющего или имевшего Core-1-положительные опухолевые клетки, при оральном введении фармацевтической композиции соответствующим больным.

Е) Способы создания иммунной защиты от Core-1-положительных раковых клеток, профилактики и/или лечения Core-1-положительных опухолей и лечения или профилактики Core-1-положительных заболеваний.

Изобретение предусматривает способ создания или усиления специфической гуморальной и/или клеточной иммунной реакции на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения предусмотрен способ создания или усиления специфической гуморальной и/или клеточной иммунной реакции на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки, в котором человеку или животному вводят эффективное количество композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или лизата, которые описаны здесь.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает, что в указанном способе указанную нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или указанный Core-1-положительный микроорганизм, или его указанную фракцию, или указанные включающие их составы, содержащие по меньшей мере, один микроорганизм, лизат или фракцию Core-1-положительного микроорганизма распознают/связывают Nemo-TF1 или A78-G/A7 и Nemo-TF2.

Изобретение предусматривает способ создания или усиления Core-1-специфичной иммунной реакции, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток, будучи способной уничтожать, по меньшей мере одну Core-1-положительную раковую клетку.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ создания Core-1-специфичной иммунной реакции, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток, будучи потенциально способной уничтожать эти клетки, как показано здесь, например, путем выработки Core-1-специфичных антител, зависящей от комплемента Core-1-специфичной цитотоксичности к Core-1-положительным опухолевым клеткам, эффективно уничтожая их, и/или секретируя TNF-альфа и/или INF-гамма Core-1-специфичными Т-клетками, которые признаны суррогатными маркерами медианного Т-клетками специфичного цитотоксичного уничтожения опухолевых клеток, несущих Core-1, как показано в примерах и описано здесь, путем введения человеку или животному эффективного количества нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, как описано здесь, или содержащих их составов.

Изобретение также предусматривает способ ослабления, а предпочтительно и предотвращения образования опухоли, преимущественно Core-1-положительной опухоли, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов, предпочтительно здоровому индивидууму.

Изобретение также предусматривает способ ослабления, а предпочтительно предотвращения распространения метастазов опухоли, преимущественно CoGe-1-положительной опухоли, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или CoGe-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов.

Изобретение предусматривает способ лечения опухоли, преимущественно CoGe-1-положительной опухоли, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или CoGe-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов.

Изобретение предусматривает способ ослабления, а предпочтительно предотвращения появления CoGe-1-положительного заболевания, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или CoGe-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов, предпочтительно здоровому индивидууму.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ вакцинации или иммунизации человека или животного от CoGe-1, в котором:

i) вводят человеку или животному эффективное количество функциональных дендритных клеток или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну функциональную дендритную клетку, нацеленную на CoGe-1 по меньшей мере один раз, и вызывают иммунную реакцию указанными функциональными дендритными клетками у человека или животного;

ii) усиливают иммунную реакцию путем введения эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один CoGe-1-положительный микроорганизм, и/или его фракцию, и/или лизат по меньшей мере один раз.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ вакцинации или иммунизации человека или животного от эпитопа углевода, присутствующего в молекуле из клетки человека или животного, в котором:

i) вводят человеку или животному эффективное количество активированных Т-клеток, клона Т-клеток, линии Т-клеток или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну активированную Т-клетку, нацеленную на CoGe-1, по меньшей мере один раз и вызывают иммунную реакцию указанными активированными Т-клетками у человека или животного, и

ii) усиливают иммунную реакцию путем введения эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей CoGe-1-положительный микроорганизм, и/или его фракцию, и/или лизат, по меньшей мере один раз.

Выработка функциональных дендритных клеток, активированных Т-клеток, линий и клонов Т-клеток описана далее.

В предпочтительном варианте осуществления в соответствии с изобретением препарат вводят способами, описанными в (i), один раз. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения препарат вводят способами, описанными в (i), два раза. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения препарат вводят способами, описанными в (i), по меньшей мере от трех до пяти раз.

В предпочтительном варианте осуществления в соответствии с изобретением иммунную реакцию усиливают путем введения эффективного количества фармацевтической композиции согласно (ii), как указано выше, один раз, в еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения усиление реакции выполняют 2-10 раз, предпочтительно более 10 раз, более предпочтительно до 20 раз, а оптимально реакцию усиливают постоянно через определенные промежутки времени в течение от нескольких месяцев до нескольких лет.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения усиление иммунной реакции выполняют 1-5 раз в начале, а затем с перерывами от 3 месяцев до 1 года или от 1 года до 10 лет.

Выработка функциональных дендритных клеток, активированных Т-клеток, линий и клонов Т-клеток описана далее.

Изобретение предусматривает способ ослабления, а предпочтительно предотвращения распространения CoGe-1-положительного заболевания, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или CoGe-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов.

Изобретение предусматривает способ лечения CoGe-1-положительного заболевания, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или CoGe-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов.

Изобретение предусматривает способ укрепления иммунной системы или улучшения иммунной реакции, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или CoGe-1-положительного микроорганизма, или его фракции, которые описаны здесь, или содержащих их составов. Например, но это не ограничивается приведенным приме-

ром, это относится к улучшению общего состояния иммунной системы против, например, инфекционных болезней или опухолей, повышению активности других иммуностимулирующих агентов, или пробиотиков, или пребиотиков, или к использованию в качестве адьювантов.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракция, как описано выше, или содержащие их составы, как описано выше, содержат по меньшей мере один микроорганизм, лизат или фракцию Core-1-положительного микроорганизма, распознаваемого и связываемого Nemod-TF1 и/или A78-G/A7 и Nemod-TF2.

В предпочтительном варианте осуществления нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракция, как описано выше, или содержащие их составы, как описано выше, содержат по меньшей мере один микроорганизм, лизат или фракцию штамма AG6(DSM 18726) и/или MUKDSM 18728).

Под композицией имеется в виду любое вещество или смесь веществ в пригодной для введения в организм форме, содержащая по меньшей мере одну нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, которая может образовывать фармацевтически приемлемый носитель или носитель, пригодный для нутрицевтических добавок, и/или нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию.

Термин "предотвращение появления" относится к использованию нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов с целью снижения риска или вероятности развития Core-1-положительного рака или Core-1-положительной болезни.

Термин "ослабление или предотвращение распространения опухоли, или Core-1-положительного заболевания, или метастазов опухоли" относится к использованию нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов с целью снижения риска или вероятности метастазов или распространения болезни на другие органы или другие сайты в организме больного или других индивидуумов.

Термин "лечение" относится к использованию нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов с целью излечить, исцелить, ослабить, изменить, улучшить состояние или воздействовать на рак, симптомы рака, предрасположенность к раку, продлить срок жизни или время до развития опасной стадии болезни.

Указанное Core-1-положительное заболевание - это любое заболевание, связанное с вирусом, микроорганизмом или другим биологическим материалом, которые могут связываться по меньшей мере одним из Core-1-специфичных антител, или которое связано с органом тела или имеет место в теле человека или животного, в том числе связанное с клеткой, микроорганизмом, вирусом или частицей, которые связываются по меньшей мере одним из Core-1-специфичных антител.

"Эффективное количество" любой нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов, содержит живые или мертвые микроорганизмы, или лизаты или фракции этих микроорганизмов, которые соответствуют или выводятся из значений от около 1×10^6 до около 1×10^{14} КОЕ на человека в сутки, где КОЕ - колониеобразующая единица, как мера, соответствующая одному микроорганизму, как известно специалистам или легко определяется ими.

В другом варианте осуществления изобретения "эффективное количество" - это количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов, которое вызывает гуморальную или клеточную иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере у одного индивидуума. Предпочтительно гуморальную или клеточную иммунную реакцию на Core-1, которую можно обнаружить по меньшей мере одним из описанных здесь тестов на иммунную реакцию на Core-1.

В другом варианте осуществления изобретения "эффективное количество" - это количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов, которое необходимо для создания иммунной защиты от Core-1-положительных опухолевых клеток, оказания профилактического действия против рака или профилактического или терапевтического действия против другого Core-1-положительного заболевания по меньшей мере у одного индивидуума.

Специалисты могут определить и/или оптимизировать эффективное количество для индивидуума или группы индивидуумов, предпочтительно с помощью по меньшей мере одного теста на иммунную реакцию на Core-1, описанного здесь, лучше с помощью комбинации тестов на иммунную реакцию на Core-1, описанных здесь, в качестве предпочтительных вариантов и/или тестов на клиническую реакцию, известных специалистам или описанных здесь.

Эти эффективные количества могут отличаться от указанных выше количеств или доз или предпочтительных количеств или доз в зависимости от особенностей индивидуума, количества и расписания приема доз, формы и состава нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного

микроорганизма или его фракции, способа и расписания приема, цели приема, будь то профилактика или лечение, степени тяжести Core-1-положительного заболевания или рака, а также от вида, расы и индивидуальных особенностей человека или животного, принимающего нутрицевтическую, фармацевтическую композицию, Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию либо содержащий их состав. Специалисты могут подобрать приемлемую и/или оптимальную дозировку, способ и схему приема для индивидуума или группы индивидуумов, предпочтительно пользуясь настоящим описанием и описанным здесь вариантом осуществления изобретения.

Предпочтение отдается тем эффективным количествам и дозам нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов, которые вызывают или усиливают указанную иммунную реакцию на Core-1 у более чем одного индивидуума, более предпочтительно у значительного числа индивидуумов, еще более предпочтительно по меньшей мере у 10%, лучше по меньшей мере у 20%, еще лучше по меньшей мере у 30%, по меньшей мере у 40%, по меньшей мере у 50%, а оптимально у большинства индивидуумов.

В предпочтительном варианте осуществления эффективным является такое количество указанной нутрицевтической, указанной фармацевтической композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или указанной его фракции, или содержащих их составов, которое вызывает иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере у одного индивидуума.

В предпочтительном варианте осуществления указанная вызванная или усиленная иммунная реакция представляет собой гуморальную или клеточную иммунную реакцию на Core-1, которая обнаруживается по меньшей мере в одном из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 и в одном из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5. В предпочтительном варианте осуществления эффективным является такое количество указанной нутрицевтической указанной фармацевтической композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или указанной его фракции, или содержащих их составов, которое вызывает иммунную реакцию, положительную по меньшей мере в двух из вышеуказанных тестов на иммунную реакцию на Core-1, предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 6, еще лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5, желательно во всех 6 в тестах на гуморальную иммунную реакцию, предпочтительно по меньшей мере в двух из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5, более предпочтительно по меньшей мере в одном тесте на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в одном тесте на клеточную иммунную реакцию, еще более предпочтительно по меньшей мере в двух из тестов на гуморальную иммунную реакцию и по меньшей мере в двух из тестов на клеточную иммунную реакцию, желательно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1 и 3, более желательно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более желательно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4 и в тестах на клеточную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 6 и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, еще лучше в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3, 4 и 5 и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию, оптимально во всех 6 тестах на гуморальную иммунную реакцию и во всех 5 тестах на клеточную иммунную реакцию.

В предпочтительном варианте осуществления эффективным является такое количество указанной нутрицевтической, указанной фармацевтической композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или указанной его фракции, или содержащих их составов, которое необходимо для создания иммунной защиты от Core-1-положительных опухолевых клеток, для достижения профилактического или терапевтического эффекта против рака или для достижения профилактического или терапевтического эффекта против другого Core-1-положительного заболевания по меньшей мере у одного индивидуума.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения эффективным является такое количество указанной нутрицевтической, указанной фармацевтической композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или указанной его фракции, или содержащих их составов, которое вызывает максимальную или близкую к максимальной иммунную реакцию на Core-1 по меньшей мере у одного индивидуума.

В еще более предпочтительном варианте предпочтительно эффективным является такое количество указанной нутрицевтической, указанной фармацевтической композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или указанной его фракции, или содержащих их составов, которое вызывает максимальную или близкую к максимальной иммунную реакцию на Core-1, обнаруживаемую специалистами в тестах на иммунную реакцию на Core-1, причем эта максимальная иммунная реакция не обязательно положительна во всех тестах на иммунную реакцию, но предпочтительно дает наибольшие реакции антител или титры антител к Core-1 и/или наибольшие реакции Т-клеток на Core-1, а более предпочтительно на Core-1-положительные опухолевые клетки, еще более предпочтительно на те и другие, а оптимально дает положительные результаты по меньшей мере в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3 на Core-1, наибольшие титры антител и/или, по меньшей мере, в тестах на клеточную им-

мунную реакцию 1, 2 или 3 на Core-1 и наибольшую реакцию Т-клеток на Core-1.

В предпочтительном варианте осуществления эффективным является такое количество указанной нутрицевтической, указанной фармацевтической композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или указанной его фракции, или содержащих их составов с живыми или мертвыми микроорганизмами, или лизатов или фракций этих микроорганизмов, которое соответствует или выведено из от около 1×10^6 до около 1×10^{14} КОЕ на индивидуума на дозу.

В более предпочтительном варианте осуществления эффективным является такое количество указанной нутрицевтической, указанной фармацевтической композиции, указанного Core-1-положительного микроорганизма, или указанной его фракции, или содержащих их составов с живыми или мертвыми микроорганизмами, или лизатов или фракций этих микроорганизмов, которое соответствует или выведено из от около 1×10^7 до 1×10^{13} КОЕ/индивидуума/сутки, предпочтительно от 2×10^8 до 1×10^{12} , а оптимально 1×10^9 - 1×10^{11} КОЕ/индивидуума/сутки.

Эффективные количества или эффективные дозы также могут различаться, как понятно специалистам, в зависимости от способа введения, применяемых эксципиентов и возможности использования совместно с другими средствами, например, укрепляющими иммунитет, вызывающими иммунную реакцию, строящими иммунную защиту или служащими для профилактики или лечения рака.

Эффективные количества или эффективные дозы также могут различаться, как понятно специалистам, в зависимости от формата применения (нутрицевтическая композиция, фармацевтическая композиция, Core-1-положительный микроорганизм, его фракция или содержащие их составы), от содержания живых или мертвых лизатов или фракций, от величины доз и промежутков времени между их приемами. Все это специалисты могут определить и оптимизировать, предпочтительно с использованием настоящего изобретения, приведенных в нем тестов и методик в соответствии с изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления нутрицевтические композиции вводят орально более одного раза в день, один раз в день, раз в неделю, в месяц и даже в год, предпочтительно ежедневно или еженедельно на протяжении от 4 недель до 2 лет.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения индивидуум получает только одну дозу. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения индивидуум получает несколько доз. В ином предпочтительном варианте осуществления изобретения эффективное количество соответствует одной дозе. В еще другом предпочтительном варианте осуществления изобретения эффективное количество соответствует нескольким дозам.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическую композицию можно вводить системно в количестве одной или нескольких доз, предпочтительно от еженедельного до ежемесячного до 3 или 6 месяцев, или их шахматной комбинации, а повторять иммунизацию при этом можно раз в 6 месяцев, или 1 год, или 5 лет, или 10 лет.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения эффективная доза нутрицевтической композиции, содержащей по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм, или его лизат, или фракцию, для человека составляет $0,1 \text{ мг/м}^2$ - 10 г/м^2 , предпочтительно 10 мг/м^2 - 10 г/м^2 , более предпочтительно $0,1 \text{ мг/м}^2$ - 10 г/м^2 .

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию вначале вводят системно, а затем лишь орально проводят повторную иммунизацию.

Термин "введение" означает контакт человека или животного с эффективным количеством нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов, в том числе используемых с дополнительными носителями. Способами введения могут быть любые пути контакта человека или животного с нутрицевтической, фармацевтической композицией, Core-1-положительным микроорганизмом, или его фракцией, или содержащими их составами. Предпочтительны, но не ограничены ими, те способы введения, в том числе оральный, системный, ингаляционный или через кожу или другой эпидермис, вызывают иммунную реакцию на Core-1, создают иммунную защиту от Core-1 или Core-1-положительных опухолевых клеток, оказывают терапевтический или лечебный эффект против рака, который поддается определению в описанных выше и далее предпочтительных формах. Специалисты могут выбрать соответствующие способы введения.

Приводим примеры предпочтительных способов введения и составов:

Нутрицевтические композиции предпочтительно вводят орально в виде, например, капсул, таблеток, эмульсий, порошков, жидкостей, в виде любого блюда или напитка или как компонент блюд и напитков, скажем, нутрицевтическая добавка.

Нутрицевтические композиции можно вводить отдельно или в смеси по меньшей мере с одним ингредиентом, сами по себе или примешанные к блюдам и напиткам.

Нутрицевтическая или фармацевтическая композиция для орального приема, Core-1-положительный микроорганизм, его фракция или содержащие их составы могут принимать любую форму, пригодную для орального приема и содержащую эффективную дозу нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов, в том числе принимать вид таблеток, капсул, мелких частиц, эмульсий и водных суспензий, дис-

персий и растворов. К обычным носителям для таблеток относятся лактоза и кукурузный крахмал. Также обычно в таблетки добавляют смазочные агенты, например, стеарат магния. Разбавителями для оральных капсул служат лактоза и сухой кукурузный крахмал. В оральных водных суспензиях или эмульсиях действующее вещество можно суспендировать или растворять в масляной фазе вместе с эмульгаторами или суспендирующими агентами. При желании можно добавлять подсластители, ароматизаторы или красители.

Оральная композиция может представлять собой любую приемлемую дозированную форму или эффективное количество нутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов, в том числе принимать вид таблеток, капсул, мелких частиц, эмульсий и водных суспензий, дисперсий и растворов. К обычным носителям для таблеток относятся лактоза и кукурузный крахмал. Также обычно в таблетки добавляют смазочные агенты, например, стеарат магния. Разбавителями для оральных капсул служат лактоза и сухой кукурузный крахмал. В оральных водных суспензиях или эмульсиях действующее вещество можно суспендировать или растворять в масляной фазе вместе с эмульгаторами или суспендирующими агентами. При желании можно добавлять подсластители, ароматизаторы или красители.

Композиции в соответствии с изобретением можно вводить орально или парентерально. Парентеральное введение осуществляют путем инъекций, в т.ч. капельных инфузий, подкожных, внутривенных и внутримышечных инъекций, нанесения на кожу мазей и трансдермальных средств, или ректально с помощью суппозитория. При оральном введении композиция может иметь вид твердых капсул, мягких капсул, гранул, порошков, мелких гранул, пилюль, саше, систем постепенной доставки действующего вещества, жидкостей и суспензий. Препараты легко готовятся известными фармацевтическими приемами.

Способ введения и дозировочные формы, естественно, влияют на дозировку компонентов или композиций, желательных и эффективных в каждом конкретном случае. Если композиция в соответствии с изобретением предназначена для орального введения, ее можно готовить с обычными фармацевтическими компонентами, как то наполнителями, разбавителями, связующими, дезинтегрантами, поверхностно активными веществами, смазочными агентами и эксципиентами. К обычным ингредиентам относятся, например, реципиенты - молочный сахар, белый сахар, хлорид натрия, глюкоза, мочевины, крахмал, карбонат кальция, каолин, кристаллическая целлюлоза и диоксид кремния; связующие - вода, этанол, простой сироп, жидкая глюкоза, жидкий крахмал, раствор желатина, карбоксиметилцеллюлоза, шеллак, метилцеллюлоза, фосфат калия и поливинилпирролидон; дезинтегранты - сухой крахмал, альгинат натрия, порошок агара, порошок ламинарии, бикарбонат натрия, карбонат кальция, полиоксиэтиленсорбитанэфиры жирных кислот, лаурилсульфат натрия, моноглицерид стеариновой кислоты, крахмал и молочный сахар; ингибиторы разложения - белый сахар, стеариновая кислота, масло какао и гидрогенизованное растительное масло; стимуляторы абсорбции - четвертичные соли аммония и лаурилсульфат натрия; увлажнители - глицерин и крахмал; абсорбенты - крахмал, молочный сахар, каолин, бентонит и коллоидный диоксид кремния; смазочные агенты - очищенный тальк и стеарат. При необходимости препарат содержит также красители, консерванты, отдушки, вкусовые добавки и подсластители.

К известным специалистам фармацевтически приемлемым солям относятся основные соли органических и неорганических кислот, например, соляная гидробромная, серная, фосфорная, метансульфоновая, этансульфоновая, уксусная, яблочная, винная, лимонная, молочная, щавелевая, янтарная, фумаровая, малеиновая, бензойная, салициловая, фенилуксусная и миндальная кислоты. Кроме того, фармацевтически приемлемые соли соединений в соответствии с изобретением можно получать с фармацевтически приемлемыми катионами, например, если замещающая группа содержит карбоксикомпонент. Подобные фармацевтически приемлемые катионы широко известны и включают катионы щелочных, щелочноземельных металлов, аммония и четвертичного аммония.

В предпочтительном варианте осуществления способы введения фармацевтической композиции выбраны из группы, включающей внутривенные инъекции, внутрибрюшинные инъекции, внутримышечные инъекции, внутричерепные инъекции, внутриопухолевые инъекции, внутриэпителиальные инъекции, чрескожное введение, чреспищеводное введение, внутрибрюшинное введение, внутрипридаточное введение, внутриартериальное введение, внутрисуставное введение, внутрибронхиальное введение, внутрищечное введение, внутрикапсулярное введение, внутрикардиальное введение, внутрихрящевое введение, внутриполостное введение, внутриголовное введение, внутритолстокишечное введение, внутрикожное введение, внутрипузырное введение, внутридермальное введение, интрадуктальное введение, внутрипротоковое введение, внутридуральное введение, внутрипучковое введение, внутрижировое введение, межпетлевое введение, внутрищелевое введение, внутрижелудочное введение, внутрижелезистое введение, внутрипеченочное введение, внутрикишечное введение, внутриламеллярное введение, введение в пораженное место, внутрисвязочное введение, внутриязычное введение, интрамаммарное введение, интрамедуллярное введение, внутрименингеальное введение, внутримиекардиальное введение, внутриназальное введение, внутриглазное введение, внутриоперативное введение, внутриоральное введение, внутрикостное введение, внутрияичниковое введение, внутрипанкреатическое введение, внутритемное введение, внутритазовое введение, внутривнутрикардиальное введение, внутривнутрипромежностное

введение, внутривагинальное введение, внутриматочное введение, внутримочевое введение, внутримозговое введение, внутримышечное введение, внутрисуставное введение, внутриспинальное введение, внутриселезеночное введение, подкожное введение, внутримышечное введение, внутрисуставное введение, внутриспинальное введение, внутриселезеночное введение, внутритестискулярное введение, внутриторакальное введение, внутритонзиллярное введение, внутритрахеальное введение, внутритрубно-вещное введение, введение в барабанную полость, внутриуретральное введение, внутриматочное введение, внутривагинальное введение, внутрисосудистое введение, внутрижелудочковое введение, внутривертебральное введение, внутрипузырное введение и введение в стекловидное тело.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения к способам введения (=контакта) относятся парентеральное, например, внутривенное, внутридермальное, подкожное, оральное, трансдермальное (местное), мукозальное, внутрибрюшинное, внутриназальное, ректальное, энтеральное и оральное введение.

Композиция в соответствии с изобретением может включать фармацевтически приемлемые соли своих компонентов. К фармацевтически приемлемым относятся кислые аддуктные соли неорганических кислот, например, соляной или фосфорной, или таких органических кислот, как уксусная, винная, миндальная и т.п. Соли со свободными карбоксильными группами можно также вывести из неорганических оснований, например, натрия, калия, аммония, кальция или гидроксидов железа, и из таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиоаминэтанол, гистидин, прокаин и т.п. Физиологически переносимые носители широко известны. В качестве жидких носителей пригодны стерильные водные растворы, не содержащие никаких компонентов, кроме действующего вещества и воды, или содержат буфер, например, фосфат натрия, с физиологически допустимым значением pH, физиологический раствор или то и другое, например, забуференный фосфатом физиологический раствор. Далее, жидкие носители могут содержать несколько буферных солей, а также такие соли, как хлориды натрия и калия, декстрозу, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и другие растворенные компоненты. Жидкие композиции могут содержать жидкие фазы, кроме воды или вместо воды. Примеры таких дополнительных жидких фаз - глицерин, растительные масла, например, хлопковое, органические эфиры вроде этилолеата и водно-масляные эмульсии. Композиция содержит Core-1-положительный микроорганизм, лизат или его фракцию в соответствии с изобретением, в количестве обычно по меньшей мере 0,1 вес.% Core-1-положительного микроорганизма, лизата или его фракции от общей массы композиции. Весовой процент это отношение Core-1-положительного микроорганизма, лизата или его фракции к общей массе композиции. Например, 0,1 мас.% - это 0,1 г Core-1-положительного микроорганизма, лизата или его фракции на 100 г композиции.

"Фармацевтически приемлемыми" являются те соли соединений, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства последних и получены реакцией с неорганическими кислотами (соляной, гидробромной, серной, азотной, фосфорной, метансульфоной, этансульфоной, толуолсульфоной, салициловой и т.п.) К фармацевтически приемлемым относятся, например, соли щелочных металлов, как натрия и калия, щелочно-земельных металлов и аммония.

Композиция, содержащая в качестве действующего вещества Core-1-положительный микроорганизм, его лизат или фракцию, может иметь форму, пригодную для орального приема, например таблетки, пилюли, лозенжи, водные или масляные суспензии, дисперсные порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, сиропы или эликсиры. Композиции, предназначенные для орального приема, могут быть получены любым известным способом и могут содержать один или несколько компонентов, выбранные из группы, включающей подсластители, вкусовые добавки, красители, и консерванты, для придания надлежащего внешнего вида и приемлемого вкуса. Таблетки содержат действующее вещество в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми наполнителями, пригодными для изготовления таблеток. Например, инертными разбавителями (карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия), гранулирующими агентами и дезинтегрантами (кукурузный крахмал или альгиновая кислота), связующими (крахмал, желатин, смола акации) и смазочными агентами (стеарат магния, стеариновая кислота или тальк). Таблетки могут быть непокрытыми или иметь покрытие, нанесенное известными способами, чтобы не допустить разложения и поглощения в желудочно-кишечном тракте и сохранить действие таблетки в течение более или менее продолжительного периода. Например, можно применять материалы, придающие продолженное действие, как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат. Их также можно покрывать способами, описанными в патентах США 4256108; 4166452 и 4265874, для получения осмотических таблеток с контролируемым выделением. Композиция может также содержать одно или несколько лекарственных средств самих по себе или в связке с модулирующими агентами. В принципе любое лекарство можно вводить с модулирующим агентом, как описано здесь, для различных целей, рассмотренных ниже. К таким лекарствам относятся, например, обезболивающие, анестетики, средства от ангины, противогрибковые средства, антибиотики, противораковые средства (например, таксол или митомидин С), противовоспалительные (например, ибупрофен и индометацин), средства против глистов, антидепрессанты, противоядия, противорвотные средства, антигистамины, средства

от гипертензии, противомаларийные, противомикротрубочковые средства (например, колхицин или алкалоиды барвинка), средства от мигрени, противомикробные, антипсихозные, жаропонижающие, антисептики, средства против передачи сигналов (например, ингибиторы протеинкиназы С или ингибиторы внутриклеточной мобилизации кальция), противоартритные, средства против тромбообразования, против туберкулеза, противокашлевые, противовирусные, подавляющие аппетит, сердечные, средства против химической зависимости, слабительные, химиотерапевтические агенты, расширители коронарных, мозговых или периферийных сосудов, контрацептивы, депрессанты, диуретики, отхаркивающие, факторы роста, гормональные агенты, гипнотические средства, иммуноподавляющие средства, антагонисты наркотиков, парасимпатомиметики, успокаивающие, симулирующие, симпатомиметики, токсины (например, холерный токсин), транквилизаторы и средства от уринарных инфекций.

Композиции для орального приема могут также иметь форму твердых желатиновых капсул, в которых действующее вещество смешано с инертным твердым разбавителем, например карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или мягких желатиновых капсул, в которых действующее вещество смешано с водой или маслом, например, арахисовым, оливковым, или с жидким парафином. В водных суспензиях действующее вещество смешано с наполнителем, пригодным для изготовления водных суспензий. Такие наполнители являются суспендирующими агентами, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозой, метилцеллюлозой, гидроксипропилметилцеллюлозой, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном, гуммитрагакантом или смолой акации; диспергатором или смачивателем, которым может быть природный фосфатид, например лецитин, или продукт конденсации оксида алкилена с жирными кислотами, например, полиоксиэтиленстеарат, или продукт конденсации оксида этилена с алифатическим спиртом с длинной цепочкой, например, гептадекаэтиленоксицетанол, или продукт конденсации оксида этилена с частичными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, например, полиоксиэтилен, с частичными эфирами из жирных кислот и гекситолангидридов, например полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Водные суспензии могут также содержать один или несколько консервантов, например этил, *n*-пропил, *p*-гидроксibenзоат, один или несколько красителей, одну или несколько вкусовых добавок и один или несколько подсластителей, например, сахарозу или сахарин.

Масляные суспензии можно получать суспендированием действующего вещества в растительном масле, например, арахисовом, оливковом, кунжутном или кокосовом, или в минеральном масле, например, жидком парафине. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт, а для получения приемлемого орального препарата можно вводить вкусовые добавки. Эти композиции могут быть законсервированы добавлением антиоксиданта, например, аскорбиновой кислоты.

В диспергируемых порошках и гранулах, пригодных для приготовления водной суспензии путем добавления воды, содержат действующее вещество в смеси с диспергатором или смачивателем, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Примеры диспергаторов или смачивателей приведены выше; могут также присутствовать, например, подсластители, вкусовые добавки и красители.

Композиция в соответствии с изобретением может также иметь форму водно-масляной эмульсии. Масляной фазой служит растительное масло, например, оливковое или арахисовое, или минеральное масло, например, жидкий парафин, или их смеси. Эмульгаторами могут служить природные смолы (смола акации, гуммитрагакант), природные фосфатиды (соевые бобы, лецитин) и эфиры или частичные эфиры, полученные из жирных кислот и гекситолангидридов, например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Эмульсии могут также содержать подсластители и вкусовые добавки.

Сиропы и эликсиры можно готовить с подсластителями, например, глицерином, пропиленгликолем, сорбитолом или сахарозой. Такие композиции могут также содержать деэмульгатор, консервант, вкусовую добавку и краситель. Фармацевтическая композиция может выступать в форме стерильной водной или масляной суспензии для инъекций. Эту суспензию можно получать известными способами с помощью указанных диспергаторов, смачивателей и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой раствор или суспензию в нетоксичном растворителе или разбавителе, пригодном для парентерального введения, например, раствор в 1,3-бутандиоле. Пригодными носителями или растворителями служат вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Также применяются в качестве растворителей или суспендирующих агентов любые стерильные нелетучие масла, включая синтетические моно-или диглицериды. Кроме того, в композиции для инъекций входят жирные кислоты, например, масляная кислота. Для лечения вышеперечисленных состояний пригодны дозы от около 0,01 до около 140 мг на кг массы тела в сутки (от 2,5 мг до около 7 г на больного в сутки). Например, Coe-1-положительная опухоль эффективно лечится дозами от около 0,01 до 50 мг соединения на кг массы тела в сутки (от около 0,5 мг до около 3,5 г на больного в сутки). Количество действующего вещества, которое можно сочетать с носителями для получения единичной дозы, зависит от особенностей организма и способа введения. Например, в лекарственной форме для орального введения человеку композиция может составлять от 5 до 95% общей массы. Выпускные формы обычно содержат от 1 мг до 10 г действующего вещества. Понятно, однако, что конкретная доза для данного больного зависит от множества факторов, включая активность применяемого действующего вещества, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, время приема, способ введения, скорость выведения из организ-

ма, сочетание лекарств и степень тяжести заболевания, которое лечится. Эффективное количество соединений в соответствии с изобретением меняется в зависимости от вида соединения, токсичности, ингибирующей активности, состояния, которое лечится, и того, вводится ли лекарство одно или в сочетании с другими. Обычно эффективное количество составляет от 0,0001 до 1500 мг/кг, предпочтительно от 1 до 1000 мг/кг, более предпочтительно от около 1 до 150 мг/кг массы тела, а оптимально от около 50 до 100 мг/кг массы тела. Изобретение также относится к способам лечения вышеуказанных патологических состояний. Соединения в соответствии с изобретением можно вводить в профилактических или терапевтических целях, предпочтительно в количествах, эффективных против указанных расстройств, теплокровным животным, например, людям, причем соединения преимущественно используются в виде фармацевтических или нутрицевтических композиций.

Подбор фармацевтически приемлемых наполнителей и растворов-носителей не представляет трудности для специалистов, как и разработка режимов дозировки и лечения при использовании описываемых здесь композиций, включая, например, оральное, парентеральное, внутривенное, внутриназальное и внутримышечное введение и составление композиций.

А. Оральное введение

В определенных случаях заявленные композиции можно вводить людям и животным оральным путем. С этой целью композиции могут включать инертные разбавители или совместимые съедобные носители, либо заключаться в твердые или мягкие желатиновые капсулы, либо прессоваться в таблетки, либо вводиться прямо в пищевые продукты.

Действующие соединения можно даже вводить в наполнители и использовать в виде проглатываемых таблеток, сосательных таблеток, саше, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и т.п. Таблетки, саше, пилюли, капсулы и подобные могут также содержать связующие (гуммитрагакант, смола акации, кукурузный крахмал или желатин), наполнители (дикальцийфосфат), дезинтегранты (кукурузный или картофельный крахмал, альгиновая кислота и т.п.), смазочные агенты (стеарат магния), подсластители (сахароза, лактоза, сахарин), вкусовые добавки (мята, зимилюбка, вишневая эссенция). В капсулы, кроме перечисленных, можно добавлять жидкий носитель. Множество других материалов можно использовать для покрытия или иного изменения физической формы лекарства. Например, таблетки, пилюли или капсулы можно покрывать шеллаком, сахаром или теми и другим. Сироп или эликсир могут содержать действующее вещество, подсластитель - сахарозу, консерванты - метил и пропилпарабены, краситель и вкусовую добавку - вишневую или апельсиновую эссенцию. Разумеется, материалы, используемые в любой выпускной форме, должны быть фармацевтически чистыми и по существу нетоксичными в применяемых количествах. Кроме того, действующие вещества могут включаться в композиции пролонгированного действия.

Как правило, такие композиции содержат по меньшей мере около 0,1% действующего соединения, причем содержание действующего вещества (веществ) колеблется в пределах от около 1 или 2% до около 60 или 70% и более от массы композиции. Естественно, в любой данной дозировочной единице при любом способе приготовления должна содержаться необходимая доза действующего вещества. Специалисты учитывают такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полураспада, способ введения, срок хранения и прочие фармакологические соображения при приготовлении таких фармацевтических композиций, а величина доз и режим дозировки могут быть самыми различными.

Для орального введения композиции в соответствии с изобретением можно также включать вместе с каким-либо наполнителем в состав жидкостей для полоскания рта, зубных паст, сосательных таблеток, оральных спреев или таблеток под язык. Например, можно приготовить жидкость для полоскания рта, содержащую действующий компонент в необходимом количестве с подходящим растворителем, например, раствором бората натрия (раствором Добелла). Либо можно включить действующий компонент в раствор для полоскания рта, содержащий борат натрия, глицерин и бикарбонат калия, или диспергировать в зубной пасте, либо добавить в терапевтически эффективном количестве (эффективной дозе) к композиции, содержащей воду, связующие, абразивы, вкусовые добавки, вспениватели и увлажнители. Из этой композиции можно сделать таблетку, которая помещается под язык или иным образом растворяется во рту.

В. Введение путем инъекций

В определенных случаях желательно вводить описанные здесь композиции парентерально, внутривенно, внутримышечно и даже внутрибрюшинно. Растворы действующих веществ в виде свободных оснований или фармацевтически приемлемых солей можно готовить в воде, смешанной с ПАВ, например, гидроксипропилцеллюлозой. Можно также готовить дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, их смесях и в маслах. В обычных условиях хранения и применения такие препараты содержат консервант для недопущения роста микроорганизмов.

К фармацевтическим формам для инъекций относятся стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления на месте стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и достаточно текучей для набора шприцем. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и предохраняться от воздействия микроорганизмов, например, бактерий и грибов. Носителем может быть растворитель или диспергатор, например, во-

да, этанол, полиол (глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их смеси и/или растительное масло. Необходимо поддерживать надлежащую текучесть, например, с помощью покрытия типа лецитина при сохранении необходимого размера частиц в случае дисперсии или при использовании ПАВ. Для борьбы с микроорганизмами применяют различные антибактериальные и противогрибковые средства, например парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимерозал и т.п. Во многих случаях предпочтительны изотонические компоненты, например сахара или хлорид натрия. Для продления абсорбции в состав композиций для инъекций можно вводить соответствующие агенты, например моностеарат алюминия и желатин.

Водный раствор, например, для парентерального введения должен быть надлежащим образом буферен при необходимости, а жидкий разбавитель сделан изотоническим путем добавления достаточного количества физраствора или глюкозы. Именно такие водные растворы особо предпочтительны для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривнутрибрюшинного введения. В этой связи специалисту понятно указание на применение стерильной водной среды согласно изобретению. Например, можно растворить одну дозу в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл гиподермоклитической жидкости, либо прямо уколоть в точку инфузии. Неизбежны расхождения в величине доз в зависимости от состояния больного. Ответственный за введение композиции в любом случае должен определить необходимую дозу для каждого индивидуума. Более того, вводимые людям препараты должны отвечать требованиям к стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоте национальных или региональных биологических стандартов.

Стерильные растворы для инъекций готовят введением действующих компонентов в необходимое количество соответствующего растворителя с различными другими перечисленными компонентами с последующей фильтрацией и стерилизацией. Дисперсии обычно готовят введением различных стерилизованных действующих компонентов в стерильный носитель, содержащий основную диспергирующую среду и другие перечисленные компоненты. Стерильные порошки, из которых готовят стерильные растворы для инъекций, получают преимущественно методами вакуумной сушки и сушки вымораживанием, получая порошок действующего вещества плюс любые дополнительные компоненты из ранее стерильно профильтрованного раствора.

Рассмотренные композиции могут существовать в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают кислые аддуктные соли (образованные со свободными аминогруппами протеина), и соли неорганических (соляной, фосфорной) или органических (уксусной, щавелевой, винной, миндальной и т.п.) кислот. Соли свободных карбоксильных групп можно получать и из неорганических оснований (гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа) и органических оснований (изопропиламина, триметиламина, гистидина, прокаина и т.п.) Приготовленные растворы вводят соответственно их дозировочной форме в терапевтически эффективных количествах. Они вводятся в разных дозировочных формах - растворы для инъекций, капсулы с легким выделением действующего вещества и т.п.

Под "носителем" здесь понимаются любые растворители, диспергаторы, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферы, несущие растворы, суспензии, коллоидные растворы и т.п. Применение таких сред и веществ с фармацевтически активными веществами широко известно. Если только среда или агент не являются несовместимыми с действующим веществом, их применение в терапевтических композициях оправдано. В композиции можно вводить также дополнительные действующие ингредиенты.

"Фармацевтически приемлемыми" являются вещества и композиции, которые не вызывают аллергических или других нежелательных реакций при введении в человеческий организм. Приготовление водных композиций, в которых действующим веществом служит протеин, общеизвестно. Обычно они готовятся в виде растворов или суспензий для инъекций, а также твердых форм, которые растворяют или суспендируют непосредственно перед инъекцией. Препарат можно также эмульгировать.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтики или содержащие их композиции, содержащие по меньшей мере один CoGe-1-положительный микроорганизм или его фракцию, вводятся людям в виде нутрицевтических добавок.

Изобретение также относится к нутрицевтической композиции или содержащему ее составу, которые содержат, по меньшей мере, один CoGe-1-положительный микроорганизм или его фракцию в виде нутрицевтической добавки, или пищевого продукта, или компонента продукта. Пищевым продуктом здесь является любое вещество, употребляемое живыми организмами, включая напитки. Пища основной источник энергии для животных и людей и имеет обычно растительное или животное происхождение. Предпочтительно это вегетарианская пища, не содержащая животных продуктов - мяса, молока и яиц. Также в настоящем изобретении рассматривается невегетарианская пища, содержащая животные продукты. Пищей в настоящем изобретении являются:

- (i) любое вещество или продукт, обработанный, частично обработанный или не обработанный, предназначенный для потребления людьми, независимо от питательной ценности;
- (ii) вода и другие напитки;
- (iii) жевательная резинка или кондитерские изделия; и/или
- (iv) изделия и вещества, используемые как ингредиенты или компоненты при приготовлении пищи.

Пища в понимании настоящего изобретения традиционно добывается путем земледелия, животноводства, рыболовства, охоты, кормопроизводства и других средств, иногда существенных для определенных популяций, но не имеющих значения для других. В современную эпоху в развитых странах продовольственное снабжение все в большей степени зависит от сельского хозяйства, высокотехнологичных ферм, промышленного разведения рыб и морепродуктов с целью максимально увеличить производство продовольствия при минимальных издержках. Сюда входит возрастающее применение сельскохозяйственной техники - от сеялок и молотилок до тракторов и комбайнов и т.п. Это сочетается с применением пестицидов для повышения урожайности и уничтожения насекомых и млекопитающих, которые поедают урожай. В последнее время намечается переход к более щадящей практике сельского хозяйства. Этот подход, частично подстегиваемый потребительским спросом, поощряет биологическое разнообразие, опору на местные ресурсы и органичные методы ведения сельского хозяйства.

Пищей промышленного изготовления (содержащей по меньшей мере один Coге-1-положительный микроорганизм или его фракцию) в соответствии с изобретением являются

напитки: пиво, соки, безалкогольные напитки, соки с мякотью, вина, молочные напитки, молочные продукты, прочие алкогольные и безалкогольные напитки, например, вода, газированная вода, фруктовые и овощные соки, мягкие напитки, прохладительные напитки, лимонад, кола, имбирное пиво, ирландское пиво, ароматизированное пиво, сарсапарилла, крем-сода, напитки из одуванчиков и лопухов, соки с мякотью, разбавленный сироп с фруктовой эссенцией, спортивные напитки, настои, кофе, чай, молочные напитки, в том числе молоко, йогурт, шоколадное молоко, молочный коктейль, яично-винный напиток с сахаром и сливками, миндальное молоко, оршад, спиртные напитки, смешанные коктейли, горячие напитки, например, горячий шоколад, горячий сидр, капуччино или чай с молоком;

хлеб - основная пища многих народов, делается из выбродившего теста муки пшеницы или других зерновых, например ржаной хлеб, хлеб для тостов (белый хлеб), хлеб из обойной муки, ржано-пшеничный хлеб, белый хлеб, хлеб из смешанной муки, хлеб с семенами подсолнечника, хлеб с тыквенными семенами, пицца, чапати, тортильи, багет, пита, лаваш, бисквиты, преслики, индийский наан, булочки, пури, кекс, хлеб из ржаного шрота, хлеб из ржаной муки, хлеб из муки цельнозернового зерна, амбарный хлеб и множество других сортов;

кондитерские изделия, например бисквитный торт, яблочное суфле, бабка, буччеллато, кекс в форме бабочки, бундт, масляный кекс, морковный пирог, творожный пирог, шоколадный кекс, рождественский пирог, кекс из взбитого теста на масле, выпеченный в гофрированной бумажной формочке кекс, шоколадный кекс с какао и содой, эксская слойка, волшебный кекс, фруктовый торт, немецкий шоколадный пирог, гемуэзский кекс, имбирный кекс, кекс в форме колокола, липкий масляный кекс, горячий молочный кекс, торт из мороженого, яффский торт, дрожжевой пирог, лунный кекс, панеттоне, ананасный торт, круглый фунтовый кекс, кекс "Королева Елизавета", кекс из красных бобов, шелковый торт, торт "Захер", сливовый пирог, кекс с пряностями, бисквит, солнечный пирог, кекс к чаю, торт "Татен", ванильный кекс, свадебный торт;

сыр - продукт из створоженного молока, имеющий множество сортов, например, сардо, тестури, бокмакири, кваито, вуки, акави, баскет, лабне, джибне арабие, кенафа, набулси, панир, аффинер, горский сыр, брынза, дахштейнер, тирольский серый сыр, люнеберг, боворде, брюссельский сыр, эрве, лимбургский сыр, маредсу, пашендейл, плато де эрве, постель, ремеду, датский синий сыр, датский тильзит, альгейский, эмментальский, камбодзола, грацкий сыр, шпунде, фета, аллуми или моццарелла;

десерт - блюдо, обычно сладкое, подаваемое после главного блюда, например мороженое, бисквит или пирожные, кекс, крошки, сладкий соус, фрукты, желе, меренги, печенье, пирог или торт, пудинг, шербет, суфле или бисквит со взбитыми сливками;

жареный картофель, чипсы, например, картофельные чипсы или хрустящий картофель, чипсы-тортильи или кукурузные чипсы;

пища с добавками (пищу с добавками называют нутрицевтиками, гибрид пищевых и фармацевтических продуктов, может содержать генетически модифицированные продукты; к этой категории относятся готовая пища из ингредиентов обогащенной пищи или с добавками, которые считаются здоровыми, например, обогащенная витаминами, или свежая пища, например, овощи, которой приписываются особые достоинства);

джемы и желе, например джемы из крыжовника, красной смородины, черной смородины, цитрусовых, фруктов, яблок, малины, клубники или королевское желе;

макаронные изделия, например фигурные изделия, кампанелле, казареччи, кавателли, конкилье, конкильони, фарфалле, фьори, фузилли, фузилли букати, джемелли, джилы, граминья, лумаке, лумако-ни, мальтальяти, ореккьетте, трубочки, квадрефьоре, радиатори, риччолини, ротелле, ротини, спираллини, строццапрети, торкьо и трюфие;

пироги, например пирог с беконом и яйцами, пирог из курицы с грибами, пирог с солониной, корнуэльский пирожок с мясом, почками, картофелем и капустой, рыбный пирог, фефекалийикукко, кулебяка, пицца, пирог со свиной, пирог в горшочке, шотландский пирог, пастушья запеканка, штаргази, пирог из вырезки, пирог из вырезки с почками, яблочный пирог, пирог из бананов со сливками, пирог с черникой, пирог с голубикой, бостонский пирог со сливками, вишневый пирог, шоколадный пирог со

сливками, кокосовый пирог со сливками, ватрушки, голландский яблочный пирог, виноградный пирог, лаймовый пирог, лимонный пирог с меренгами, лимонный пирог, пирог из смеси ягод, апельсиновый пирог, персиковый пирог, пирог с ревенем, пирог с ревенем и клубникой, клубничный пирог, уксусный пирог;

пицца, например, классические типы с соответствующими намазками: морская или неаполитанская-томат, оливковое масло, орегано и чеснок; маргерита - томат, оливковое масло, свежие листья базилика и фьор-ди-латте (сыр моццарелла из коровьего или буйволиного молока); формаджо-э-помодоро-томат, оливковое масло, тертый сыр пармезан, по желанию листья базилика; рипьено или кальционе-фьор-ди-латте или моццарелла из буйволиного молока, иногда также сыр рикотта, оливковое масло, салями, другие виды мяса, овощи и т.п.; стромболи - моццарелла, мясо, овощи и т.п.;

готовые мясные блюда из мяса земноводных, лягушек, искусственного мяса, имитации мяса, мяса, выращенного *in vitro*, говядины, буйволятины, вырезки, телятины, яка, птицы, курицы, утки, дикой птицы, индейки, собаки, морских животных, рыбы, акулы, моллюсков, крабов, кролика, баранины, ягнятины, свинины, ветчины, копченого бекона или насекомых;

сэндвичи, например арам, багет с мясом, бутерброд с беконом, сдобная булочка, бургер, буррито, бутерброд с чипсами, клубный сэндвич, с тертым сыром, дёнер-кебаб, горячий бургер по-джорджийски, топленый сэндвич (с тунцом и т.п.), панини, сэндвич со стейком, тако, сэндвич к чаю, поджаренный сэндвич, торта, сэндвич в обертке;

салаты, например, салат "Цезарь", салат "Шеф", салат на скорую руку, греческий салат, итальянский салат, салат "Мескун", ниццкий салат, салат из зеленых бобов, салат из семи видов бобов, салат из курицы, фруктовый салат (нарезанные кусочки фруктов без кожуры в собственном соку или с поливой), салат со сливочным маслом, салат из макарон, картофельный салат, салат "Сомен", сом-там, табули, салат "Уолдорф" или салат "Уотергейт";

соусы, например белый соус, грибной соус, немецкий соус, американский соус, всем соусам соус, коричневые соусы "Элуте", бордоский соус, соус "Бургиньон", соус "Шатобриан", африканский соус, соус "Робер", соус бешамель, соус "Морнэ", соусы-эмульсии, беарнский соус, голландский соус, майонез, соус тартар, сливочная приправа для салата, масляные соусы, соус из белых ягод, соус "Кафе де Пари", сладкие соусы, рыбный соус, самбаль, соус для барбекю, соус моль, томатный соус, цацки;

колбасы, например андуй, черный пудинг, кровяная колбаса, бурворс, свино-телячий братвурст, закусочная колбаса, бутифарра, коризо, камберлендская колбаса, фалукурв, фуэт, хаггис, клеска, польская колбаса, кишечная колбаса, кнаквурст, украинская колбаса, ландегер, языковая колбаса, мягкий метвурст, рубленая колбаса, мортаделла, салями, суджук, тюрингенская колбаса, белая колбаса, белый пудинг;

закусочные продукты: кондитерские изделия, картофельные чипсы, шоколад, галеты, чито, суррогаты (вареный арахис, сладкие плитки, чито, подушечки "Чекс", пирожные, крекеры, комбинированные сухие завтраки), шоколадные круглые кексы, хула-хуп, мороженое, "лунные пирожные", пиратские бутерброды, попкорн, беконные шкурки, преслики, слойки, мягкие напитки, слабоалкогольный напиток "снежок", "студенческие закуски", швейцарские булочки, колокольчики, вегетарианские бутерброды или кексы "зебра";

супы, например десертные супы (гинатаан, филиппинский суп из кокосового молока, коровьего молока, фруктов и муки тапиоки); осироко, японский суп из бобов адзуки или фруктовые супы, зимний дынный суп, суп мисо, пхо, рамен, саймин, румынский картофельный суп, авголемоно, борщ, буйябес, каллалу, шотландский куриный суп, фанеска, гаспачо, чечевичный суп, минестроне, индийский суп маллигатони, шотландский мясной суп, снерт, солянка, таратор, ватерзой;

сахар и продукты из него (золотой сироп, конфеты, шоколад);

йогурт, творог, сметана, взбитые сливки, например ласси, кефир, айран, дуг, таратор;

сухие напитки или таблетки (витаминные, минерализованные напитки);

лечебные продукты в капсулах или таблетках, обогащенная полезными компонентами продукты, вводимые энтерально или парентерально, например, Ensure (обогащенный витаминами молочный коктейль для пожилых), и Plumpru'nut (продукт на основе арахиса для детей, страдающих от недоедания).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию в соответствии с изобретением производят как готовую лекарственную форму.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ создания или усиления Core-1-специфичной иммунной реакции и/или профилактики или лечения Core-1-положительного заболевания, в котором указанную нутрицевтическую композицию, указанную фармацевтическую композицию, указанный Core-1-положительный микроорганизм или указанную его фракцию, или указанные содержащие их составы вводят здоровому индивидууму.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ создания или усиления Core-1-специфичной иммунной реакции и/или профилактики или лечения Core-1-положительного заболевания, в котором указанную нутрицевтическую композицию, указанную фармацевтическую композицию, указанный Core-1-положительный микроорганизм или указанную его фракцию, или указанные содержащие их составы вводят больному, имеющему рак, опухоль, по меньшей мере одну раковую или

опухолевую клетку или по меньшей мере один метастаз.

В частности, нутрицевтическую композицию, фармацевтическую композицию, Coqe-1-положительный микроорганизм или его фракцию, или содержащие их составы можно использовать для создания иммунной реакции на рак, опухоль, раковую клетку или клетки или метастазы от них, для создания иммунной реакции как иммунной защиты от рака, опухоли, раковой клетки или клеток или метастазов от них, для лечения рака, опухоли, раковой клетки или клеток или метастазов от них, для ослабления или предотвращения появления рака, опухоли, раковой клетки или клеток или метастазов от них, выведенные от здоровых индивидуумов или от больных соответственно, предпочтительно содержащие по меньшей мере одну Coqe-1-положительную раковую клетку, выбранную из рака, опухоли, раковых или опухолевых заболеваний, как описано ниже или в других местах настоящего описания. Например, лечение нацелено на первичные опухоли или раковые опухоли, минимальные остаточные опухоли или раковые опухоли, их рецидивы и/или их метастазы или части. Лечение опухолей или раковых опухолей также может служить вспомогательной терапией. Нутрицевтическую композицию, фармацевтическую композицию, Coqe-1-положительный микроорганизм или его фракцию, или содержащие их составы можно также использовать при профилактике Coqe-1-положительных раковых опухолей, опухолей или опухолевых клеток. Например, профилактика нацеливается на предотвращение появления опухолей и метастазов. Эти противоопухолевые препараты вводят в подходящей форме известными способами, как описано здесь. Предпочтительно эти противоопухолевые средства вводят путем инъекций или орально, внутривенно, локально в полости тела, например внутрибрюшинно, внутриванально, в желудочно-кишечный тракт, прямо в опухоль, в органы или лимфатические сосуды (внутринодально), а также подкожно, интратраншеально, поверх кожи и внутримышечно. В предпочтительном варианте осуществления способы введения можно комбинировать, чередуя их в разные дни лечения или в один день, как подробно описано далее. В соответствии с изобретением можно также комбинировать две или несколько нутрицевтических, фармацевтических композиций, Coqe-1-положительных микроорганизмов или их фракций, или содержащих их составов, а также чередовать их разные комбинации в разные дни лечения опухоли или с другими приемами лечения, например, терапией антителами, химиотерапией или радиотерапией, совмещая процедуры во времени или проводя их раздельно.

Раковые опухоли, опухоли, опухолевые клетки, раковые клетки или их метастазы выбирают из группы раковых или опухолевых заболеваний уха-горло-носа, легких, средостения, желудочно-кишечного тракта, урогенитальной системы, гинекологической системы, груди, эндокринной системы, кожи, сарком костей и мягких тканей, мезотелиом, меланом, новообразований центральной нервной системы, детских раковых или опухолевых заболеваний, лимфом, лейкемии, паранеопластических синдромов, метастазов от неизвестной первичной опухоли (CUP синдрома), брюшинного канцероматоза, злокачественных опухолей, связанных с иммуноподавлением, и/или метастазов опухолей.

В частности, раковые опухоли, опухоли, опухолевые клетки, раковые клетки или их метастазы могут представлять следующие виды рака: аденокарцинома груди, простаты или толстой кишки; все формы рака легких, возникшие в бронхиальной трубе; рак костного мозга, меланомы, гепатомы, нейробластома; папиллома; апудомы, хористомы, бранхиогенный рак; злокачественный карциноидный синдром; карциноидная болезнь сердца, карцинома (например, карцинома Уокера, карцинома базальных клеток, чешуйчатобазальная карцинома, карцинома Брауна-Пирса, проточная карцинома, опухоль Эрлиха, локальная карцинома, карцинома клеток Меркеля, рак слизистой, мелкоклеточная бронхиальная карцинома, овсяно-клеточный рак легкого, папиллярная карцинома, фиброзный рак, бронхоальвеолярная карцинома, бронхиальная карцинома, карцинома чешуйчатых клеток и карцинома переходных клеток); гистоцитные функциональные расстройства; лейкемия (например, в связи с лейкемией В-клеток, лейкемией смешанных клеток, лейкемией нулевых клеток, лейкемией Т-клеток, хронической лейкемией Т-клеток, лейкемией, связанной с HTLV-II, острой лейкоцитной лейкемией, хронической острой лейкоцитной лейкемией, мастоцитной лейкемией и миелоидной лейкемией); злокачественный гистоцитоз, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, опухоль одиночных клеток плазмы; ретикулоэндотелиоз, хондробластома; хондрома, хондросаркома; фиброма; фибросаркома; гигантоклеточный рак; гистiocитомы; липома; липосаркома; лейкосаркома; мезотелиома; миксома; миксосаркома; остеома; остеосаркома; саркома Юинга; синовиома; аденофиброма; аденолимфома; саркокарцинома, хордома, краниофарингиома, дисгерминома, гамартома; мезенхимомы;

мезонефрома, миосаркома, амелобластома, цементома; одонтома; тератома; тимомы, хориобластома; аденокарцинома, аденома; холангиома; холестеатома; цилиндрома; цистаденокарцинома, цистаденома; фолликулома; гинадробластома; гидраденома;

инсулома; рак клеток Лейдига; папиллома; тубулярная аденома яичка, текома, лейомиома; лейомиосаркома; миобластома: миома; миосаркома; рабдомиома; рабдомиосаркома; эпендимомы;

ганглионейрома, глиома; медуллобластома, менингиома;

нейрилеммома; нейробластома; нейроэпителиома, нейрофиброма, нейрома, параганглиома, нехромафинная параганглиома,

ангиокератома, ангиолимфоидная гиперплазия с эозинофилией; склеротирующая ангиома; ангиоматоз; гломангиома;

гемангиоэндотелиома; гемангиома; гемангиоперицитомы, гемангиосаркома; лимфангиома, лимфангиомиома, лимфангиосаркома; пинеалома; листообразная цистосаркома; гемангиосаркома;

лимфангиосаркома; миксосаркома, карцинома яичника; саркома (например, саркома Юинга, экспериментально саркома Капоши и мастоцитная саркома); новообразования (например, костные неоплазмы, неоплазмы груди, неоплазмы пищеварительной системы, колоректальные неоплазмы, неоплазмы печени, неоплазмы поджелудочной железы, гипофизарные неоплазмы, неоплазмы яичек, орбитальные неоплазмы, неоплазмы головы и шеи, центральной нервной системы, неоплазмы органов слуха, таза, дыхательных путей и урогенитального тракта); неврофиброматоз и дисплазия чешуйчатых клеток шейки матки и/или метастазы от любой из этих опухолей.

В предпочтительном варианте осуществления раковые опухоли, опухоли, опухолевые клетки, раковые клетки или их метастазы выбраны из группы раковых или опухолевых заболеваний, при которых по меньшей мере одна клетка, предпочтительно значительное количество клеток, еще более предпочтительно большинство клеток опухоли являются Core-1-положительными в соответствии с изобретением и выбраны из группы: опухоли области ухо-горло-носа, а именно опухоли внутреннего носа, носовых пазух, носоглотки, губ, полости рта, ротоглотки, гортани, подглоточника, уха, слюнных желез, параганглиомы, опухоли легких, включая немелкоклеточные бронхиальные карциномы, мелкоклеточные бронхиальные карциномы, опухоли средостения, опухоли желудочно-кишечного тракта, включая опухоли пищевода, желудка, поджелудочной железы, печени, желчного пузыря и желчных путей, тонкой кишки, карциномы толстой и прямой кишки, анальные карциномы, урогенитальные опухоли, в том числе опухоли почек, мочеочника, мочевого пузыря, предстательной железы, уретры, пениса и яичек, гинекологические опухоли, включая опухоли шейки матки, вагины, вульвы, рак матки, злокачественная трофобластическая опухоль, карцинома яичника, опухоли фаллопиевых труб, опухоли брюшной полости, рак молочной железы, опухоли эндокринных органов, в том числе щитовидной железы, околощитовидной железы, коры надпочечника, опухоли поджелудочной железы, ракоподобные опухоли и синдромы, множественные эндокринные неоплазии, саркомы костей и мягких тканей, мезотелиомы, опухоли кожи, меланомы, в том числе кожные и глазные, опухоли центральной нервной системы, детские опухоли, включая ретинобластому, опухоль Вильмса, неврофиброматоз, нейробластома, семейство сарком Юинга, рабдомиосаркома, лимфомы, включая неходжкиновские лимфомы, болезнь Ходжкина, лимфомы кожных Т-клеток, первичные лимфомы центральной нервной системы, болезнь Ходжкина, лейкемии, в том числе острые лейкемии, хронические миелоидные и лимфатические лейкемии, неоплазмы клеток плазмы, синдром миелодисплазии, паранеопластический синдром, метастазы от неизвестной первичной опухоли (синдром CUP), брюшинный карциноматоз, злокачественные новообразования, связанные с иммуноподавлением, включая связанные со СПИДом (саркома Капоши, связанные со СПИДом лимфомы, связанные со СПИДом лимфомы центральной нервной системы, связанная со СПИДом болезнь Ходжкина, связанные со СПИДом аногенитальные опухоли), злокачественные новообразования, связанные с трансплантацией, метастазы в мозгу и легких, рак печени, метастазы в печени, костные метастазы, плевральные и перикардальные метастазы, злокачественные асциты и/или метастазы от любой из этих опухолей.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения раковые опухоли, опухоли, опухолевые клетки, раковые клетки или их метастазы выбраны из группы раковых или опухолевых заболеваний, включающей рак молочной железы, желудочно-кишечные опухоли, в том числе карциному толстой кишки, рак толстой кишки, рак желудка, рак поджелудочной железы, раннюю стадию рака желудка, рак тонкой кишки, рак яичника, рак шейки матки, рак легких, рак простаты, карциному почечных клеток, злокачественную меланому и/или рак печени, и/или метастазы от любой из этих опухолей.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления раковые опухоли, опухоли, опухолевые клетки, раковые клетки или их метастазы выбраны из группы раковых или опухолевых заболеваний, при которых, по меньшей мере, одна клетка, предпочтительно значительное количество клеток, еще более предпочтительно большинство клеток опухоли являются Core-1-положительными в соответствии с изобретением и выбраны из группы раковых или опухолевых заболеваний, включающей рак молочной железы, желудочно-кишечные опухоли, в том числе карциному толстой кишки, рак толстой кишки, рак желудка, рак поджелудочной железы, раннюю стадию рака желудка, рак тонкой кишки, рак яичника, рак шейки матки, рак легких, рак простаты, карциному почечных клеток, злокачественную меланому и/или рак печени, и/или метастазы от любой из этих опухолей.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ создания или усиления Core-1-специфичной иммунной реакции и/или предотвращения или лечения Core-1-положительного заболевания, рака, опухоли, по меньшей мере, одной раковой или опухолевой клетки или по меньшей мере одного метастаза, содержащих по меньшей мере одну Core-1-положительную клетку.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ создания или усиления Core-1-специфичной иммунной реакции и/или предотвращения или лечения Core-1-положительного заболевания, при котором индивидуум имеет рак, опухоль, по меньшей мере, одну раковую или опухолевую клетку или, по меньшей мере, один метастаз, выбранные из группы раковых или опухолевых заболеваний, включающей рак молочной железы, желудочно-кишечные опухоли, в том числе карциному толстой кишки, рак толстой кишки, рак желудка, рак поджелудочной железы, раннюю ста-

дию рака желудка, рак тонкой кишки, рак яичника, рак шейки матки, рак легких, рак простаты, карциному почечных клеток, злокачественную меланому и/или рак печени, и/или метастазы от любой из этих опухолей.

В исследовании на здоровых добровольцах титр антител сыворотки к Core-1 определяют с помощью по меньшей мере одного из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6, когда проверяется реакция существующих антител на Core-1 до первого использования нутрицевтической композиции, причем отобранные добровольцы предпочтительно не имеют или почти не имеют антител к Core-1. Этим добровольцам вводят орально нутрицевтическую композицию, содержащую AG6 или MU1, или плацебо на протяжении от 3 до 30 недель. Орально вводят по меньшей мере две разные дозы. Иммунную реакцию отслеживают, определяя уровень антител и/или реакцию Т-клеток на Core-1 с помощью по меньшей мере одного из тестов на гуморальную реакцию 1-6 и/или тестов на клеточную реакцию 1-5 до начала и через определенные промежутки времени после начала орального приема нутрицевтической композиции. У значительного числа добровольцев, получавших нутрицевтическую композицию, реакция антител или Т-клеток на Core-1 существенно возросла по сравнению с титром до начала исследования, что подтверждается по меньшей мере одним из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 или по меньшей мере одним из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5. У получавших плацебо повышенная реакция антител или Т-клеток на Core-1 почти или совсем не наблюдалась.

Это показывает эффективность нутрицевтической композиции при создании у людей иммунной реакции на Core-1, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток с целью предотвращения, ослабления или недопущения распространения Core-1-положительных опухолей или метастазов либо их уничтожения.

В исследовании на иммунокомпетентных людях с Core-1-положительными опухолями титр антител сыворотки к Core-1 определяют с помощью по меньшей мере одного из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6, когда проверяется реакция существующих антител на Core-1 до первого использования фармацевтической композиции. Этим добровольцам вводят орально, внутривенно или внутривенно фармацевтическую композицию, содержащую AG6 или MU1, или плацебо несколько раз на протяжении от 3 до 70 недель. Вводят по меньшей мере две разные дозы. Иммунную реакцию отслеживают, определяя уровень антител, и/или реакцию Т-клеток на Core-1, и/или клиническую реакцию с помощью по меньшей мере одного из тестов на гуморальную реакцию 1-6 и/или тестов на клеточную реакцию 1-5, а затем определяют время распространения, время жизни без опухоли, и/или размер опухоли, и/или количество сайтов опухоли до начала и через определенные промежутки времени после начала орального приема фармацевтической композиции. У значительного числа добровольцев, получавших композицию в соответствии с изобретением, реакция антител или Т-клеток на Core-1 существенно возросла по сравнению с титром до начала исследования, что подтверждается по меньшей мере одним из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 или по меньшей мере одним из тестов на клеточную иммунную реакцию 1-5, и/или полной или частичной клинической реакцией, и/или возросшим временем распространения или временем жизни без опухоли у больных, получавших состав. У получавших плацебо повышенная реакция антител или Т-клеток на Core-1 и/или клиническая реакция почти или совсем не наблюдалась.

Это показывает эффективность фармацевтической композиции при создании у людей иммунной реакции на Core-1, служащей защитой от Core-1-положительных раковых клеток с целью предотвращения, ослабления или недопущения распространения Core-1-положительных опухолей или метастазов либо их уничтожения.

Контакт Core-1-положительного микроорганизма или его фракции с живым человеческим или животным организмом инициирует выработку антител, связывающих Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки. Как неожиданно оказалось, антитела к Core-1 служат механизмом иммунного контроля вновь зарождающихся раковых клеток.

F) Способы профилактики или лечения желудочно-кишечных расстройств

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ ослабления или предотвращения появления желудочно-кишечного расстройства или заболевания, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов.

Эффективные количества нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов рассмотрены далее.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ ослабления или предотвращения появления желудочно-кишечного расстройства или заболевания, в котором указанная нутрицевтическая или указанная фармацевтическая композиция, или указанный Core-1-положительный микроорганизм, или указанная его фракция, которые рассмотрены выше, или указанные содержащие их составы содержат по меньшей мере один микроорганизм, его лизат или фракцию, распознаваемые и связываемые NemoD-TF1, или A78-G/A7 и NemoD-TF2.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ ослабления или предотвращения появления желудочно-кишечного расстройства или заболевания, в котором указанная нутри-

цветическая или указанная фармацевтическая композиция, или указанный Core-1-положительный микроорганизм, или указанная его фракция, которые рассмотрены выше, или указанные содержащие их составы содержат по меньшей мере один микроорганизм, его лизат или фракцию штамма AG6(DSM 18726), MU1(DSM 18728) и LH2(DSM 18727), предпочтительно штаммов AG6 или MU1, более предпочтительно штамма AG6.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения желудочно-кишечного расстройства или заболевания, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, или содержащих их составов.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения желудочно-кишечного расстройства или заболевания, в котором желудочно-кишечным заболеванием является воспалительное расстройство кишечника или функциональное расстройство кишечника.

Изобретение предусматривает способ ослабления или преимущественно предотвращения появления желудочно-кишечного расстройства или заболевания, предпочтительно воспалительного расстройства кишечника или функционального расстройства кишечника, в котором человеку или животному, предпочтительно здоровому индивидууму, вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, описанных выше, или содержащих их составов.

Изобретение предусматривает способ ослабления, а преимущественно предотвращения распространения желудочно-кишечного расстройства или заболевания, предпочтительно воспалительного расстройства кишечника или функционального расстройства кишечника, в котором человеку или животному, вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, описанных выше, или содержащих их составов.

Изобретение предусматривает способ лечения желудочно-кишечного расстройства или заболевания, предпочтительно воспалительного расстройства кишечника или функционального расстройства кишечника, в котором человеку или животному вводят эффективное количество нутрицевтической или фармацевтической композиции, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, описанных выше, или содержащих их составов.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракция, которые рассмотрены выше, или содержащие их составы содержат по меньшей мере один микроорганизм, его лизат или фракцию, распознаваемые и связываемые NemoD-TF1, или A78-G/A7 и NemoD-TF2.

В предпочтительном варианте осуществления нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракция, которые рассмотрены выше, или содержащие их составы содержат по меньшей мере один микроорганизм, его лизат или фракцию штамма AG6(DSM 18726), MUKDSM 18728) и LH2(DSM 18727), предпочтительно штаммов AG6 или MU1, более предпочтительно штамма AG6.

Способы введения, эффективные дозы, составы описаны выше, предпочтительно для профилактики и лечения Core-1-положительных заболеваний или опухолей. В предпочтительном варианте осуществления вводят по две дозы в день, содержащих 10^9 - 10^{12} Core-1-положительных микроорганизмов, в течение по меньшей мере двух недель.

Желудочно-кишечные расстройства предпочтительно выбраны из группы, включающей функциональные расстройства кишечника и воспалительные расстройства кишечника, причем воспалительные расстройства кишечника выбраны из группы, включающей болезнь Крона, воспаление подвздошной кишки и/или язвенный колит, а функциональные расстройства кишечника выбраны из группы, включающей желудочно-пищеводный рефлюкс, диспепсию, спастический колит и/или функциональные боли в животе. Желудочно-кишечный тракт в соответствии с изобретением включает полость рта (включая слюнные железы, слизистую, зубы и язык), гортань, пищевод и кардию, желудок (включая полость и пилорус), кишечник в составе тонкой кишки, которая имеет три отдела - двенадцатиперстную, тощую и подвздошную кишку, толстую кишку из трех отделов - слепой кишки с червеобразным отростком, ободочной кишки с восходящим, поперечным, нисходящим участками и сигмовидным изгибом, прямой кишки и/или ануса.

В исследовании больным спастическим колитом, болезнью Крона (CD), воспалением подвздошной кишки или язвенным колитом вводят орально нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую AG6 или MU1, или плацебо несколько раз на протяжении от 3 до 30 недель. Вводят по меньшей мере две разные дозы. Изучают клинические реакции, например снижение вздутия или скопления газов, сохранение ремиссии CD, улучшение качества жизни, уменьшение времени или тяжести гиперемии, ослабление диареи, сохранение ремиссии пучита, появление или сохранение ремиссии острого язвенного колита, до и через соответствующие промежутки времени после начала приема нутрицевтической или фармацевтической композиции. Отмечается существенное улучшение по меньшей мере одного из перечисленных симптомов или клинических реакций у получавших нутрицевтическую или фармацевтическую композицию по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Это показывает эффективность нутрицевтической или фармацевтической композиции при профилактике, ослаблении, предотвращении распространения или лечении желудочно-кишечных расстройств.

G) Способы выработки антител

Изобретение предусматривает способ выработки антитела, или композиции антител к Core-1, или поликлональной сыворотки, в котором

вводят нутрицевтическую, фармацевтическую композицию, Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию в контакт с человеком или животным;

вызывают или усиливают гуморальную иммунную реакцию с распознаванием антигена Core-1 и/или Core-1-положительной опухолевой клетки;

выделяют указанное антитело или композицию антител к Core-1.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки клетки, дающей антитело или композицию антител к Core-1, в котором:

(a) вводят композицию Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию по любому из предшествующих пунктов в контакт с человеком или животным;

(b) вызывают или усиливают гуморальную иммунную реакцию на Core-1;

(c) вырабатывают по меньшей мере одну клетку, дающую указанное антитело или композицию антител к Core-1.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки антитела или композиции антител к Core-1, в котором:

(a) вводят нутрицевтическую, фармацевтическую композицию, Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию в соответствии с изобретением в контакт с человеком или животным;

(b) вызывают или усиливают гуморальную иммунную реакцию на Core-1;

(c) вырабатывают по меньшей мере одну клетку, дающую указанное антитело или композицию антител к Core-1.

Указанную последнюю стадию (c) можно осуществлять различными способами, например в способе:

(i) иммортализируют по меньшей мере одну клетку, производящую антитело к Core-1, предпочтительно путем слияния с иммортализованной линией клеток по методу гибридомы, или предпочтительно путем заражения вирусом, например вирусом Эпштейна-Барра (EBV), или рекомбинантной трансфекцией по меньшей мере с одним геном, вызывающим иммортализацию клетки, например E1 от EBV; или

(ii) анализируют последовательность пептидов по меньшей мере переменных областей антитела к Core-1 или по меньшей мере региона связывания антитела к Core-1, ответственного за специфичность антитела к Core-1 и трансформируют клетки ДНК, кодирующей антитело к Core-1 в целом, или любой его изотип или фрагмент, или слитый протеин, или фрагмент антитела к Core-1, или антитело в целом по меньшей мере одной другой последовательностью аминокислот или полипептидов.

Предпочтение отдается клеткам, способным стабильно производить антитела, т.е. выдерживающим соответствующее количество циклов выработки антител, в частности гибридомным клеткам и иным образом иммортализованным клеткам, или рекомбинантно стабильно трансформированным клеткам, например, CHO, NS0, SP2, Y0, PerC.6, Hec293. Однако временная экспрессия, например экспрессия в клетках COS, или Hec293, или В-клетках, также входит в объем изобретения.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки моноклонального антитела к Core-1, в котором:

(a) выращивают по меньшей мере одну указанную клетку, вырабатывающую антитело или композицию антител к Core-1 в надлежащих условиях;

(b) выделяют указанное антитело или композицию антител к Core-1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанное моноклональное антитело к Core-1 выделяют из супернатанта культуры.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанную клетку, производящую моноклональное антитело к Core-1, получают клонированием из одной клетки.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки последовательности ДНК, кодирующей антитело, моноклональное антитело к Core-1 или его фрагмент, в котором:

(a) вводят нутрицевтическую, фармацевтическую композицию, Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию в контакт с человеком или животным;

(b) вызывают или усиливают гуморальную иммунную реакцию на Core-1;

(c) выделяют клетку или клон клетки, вырабатывающей антитело к Core-1;

(d) анализируют генетический материал, кодирующий антитело к Core-1 или его фрагмент, или анализируют последовательности пептидов антитела к Core-1 или его фрагментов.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает кодирование нуклеиновой кислотой антитела, моноклональное антитела к Core-1 или его фрагмента.

В другом варианте осуществления изобретения предусматривает кодирование последовательностью ДНК моноклонального антитела к Core-1 или его фрагмента.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает композицию или поли-

клональную сыворотку антитела, моноклональное антитело к Core-1 или по меньшей мере один его фрагмент.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает моноклональное антитело к Core-1 или его фрагменты.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает клетку, вырабатывающую антитело или композицию антител к Core-1 или по меньшей мере один его фрагмент.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает моноклональное антитело к Core-1 или его фрагмент, представляющее собой гуманизованное антитело или человеческое антитело от трансгенной мыши.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает клетку, вырабатывающую антитело или композицию антител к Core-1, моноклональное антитело к Core-1 или по меньшей мере один его фрагмент, как описано выше.

Указанным антителом к Core-1 в соответствии с изобретением может быть любое антитело, индуцируемое в организм человека или животного, распознающее антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку, предпочтительно Core-1-специфичные антитела, отвечающие критериям связывания или специфичности, приведенным в разделе "Определения" или в других местах, более предпочтительно антитела, которые связываются с TFa-РАА и почти или совсем не связываются с TFb-РАА, связываются с трисахаридом Core-2, привязанным к РАА, и не связываются ни с одним конструктом X-РАА из перечисленных в списке № 2, связываются с азиалогликофорином, но не с гликофорином и связываются по меньшей мере с одной из опухолевых клеток NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, причем это связывание зависит от периодата, еще более предпочтительно антитело, которое связывается с TFa-РАА и почти или совсем не связывается с TFb-РАА, не связываются с трисахаридом Core-2, привязанным к РАА, и не связываются ни с одним конструктом X-РАА из перечисленных в списке № 2, связываются с азиалогликофорином, но не с гликофорином и связываются по меньшей мере с одной из опухолевых клеток NM-D4, NM-F9 или ZR-75-1, причем это связывание зависит от периодата.

Указанной композицией антител к Core-1 в соответствии с изобретением может быть любая смесь антител, индуцируемая в организм человека или животного, распознающая антиген Core-1 и/или Core-1-положительную опухолевую клетку. Указанным антителом или композицией антител к Core-1 в соответствии с изобретением может быть одно антитело или смесь антител, в том числе моноклональное антитело, смесь моноклональных антител, смесь поликлональных антител, например сыворотка антител или ее фрагмент, или смесь по меньшей мере одного моноклонального антитела со смесью поликлональных антител. Указанное антитело или композиция антител к Core-1 может представлять собой или содержать любой индуцируемый формат антител, например IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, или любой фрагмент, полученный из них известными специалистами методами, в том числе Fab, F(ab)₂, одноцепочечные антитела, одноподоменные антитела, мультитела, антитела со слитыми протейнами, биспецифичные антитела, гуманизованные или химеризованные антитела.

Антитела или композиции антител к Core-1, полученные способами в соответствии с изобретением, обладают преимуществами перед известными Core-1-специфичными антителами или композициями Core-1-специфичных антител, поскольку обладают по меньшей мере одной из следующих характеристик:

Можно получать антитела к Core-1, которые:

- (i) имеют формат, отличный от IgM;
- (ii) быстрее вырабатываются или выделяются;
- (iii) могут вырабатываться в больших количествах;
- (iv) распознают больше видов опухолей;
- (v) имеют повышенное сродство;
- (vi) показывают более высокие сигналы связывания в иммунных анализах, например ELISA, вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, иммуногистохимия или иммуноцитохимия;
- (vii) обладают цитотоксичностью по отношению по меньшей мере к одной Core-1-положительной опухолевой клетке;
- (viii) ингибируют рост или пролиферацию по меньшей мере одной Core-1-положительной опухолевой клетки при инкубации с достаточным количеством антител;
- (ix) вызывают смерть, например апоптоз по меньшей мере одной Core-1-положительной опухолевой клетки при инкубации с достаточным количеством антител;
- (x) представляют собой IgG.

Можно получать композиции антител к Core-1, которые:

- (i) содержат антитела к Core-1 формата, отличного от IgM;
- (ii) содержат IgG антитела к Core-1;
- (iii) содержат IgG антитела как основную фракцию антител к Core-1;
- (iv) содержат повышенное количество антител, распознающих антиген Core-1 или Core-1-положительную опухолевую клетку;
- (v) содержат повышенное количество антител к Core-1;

(vi) показывают более высокие сигналы связывания в иммунных анализах, например ELISA, вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, иммуногистохимия, иммуноцитохимия или иммунофлуоресценция;

(vii) имеют повышенное сродство;

(viii) обладают цитотоксичностью по отношению по меньшей мере к одной Core-1-положительной опухолевой клетке;

(ix) ингибируют рост или пролиферацию по меньшей мере одной Core-1-положительной опухолевой клетки при инкубации с достаточным количеством антител;

(x) вызывают смерть, например апоптоз, по меньшей мере одной Core-1-положительной опухолевой клетки при инкубации с достаточным количеством антител.

Предпочтительны те антитела или композиции антител к Core-1, которые обладают по меньшей мере двумя, более предпочтительно по меньшей мере тремя, предпочтительнее по меньшей мере четырьмя, еще предпочтительнее по меньшей мере пятью, еще более предпочтительно по меньшей мере шестью, лучше по меньшей мере семью, еще лучше по меньшей мере восьмью, по меньшей мере девятью, а оптимально всеми перечисленными свойствами.

В предпочтительном варианте осуществления антитело к Core-1 представляет собой моноклональное антитело.

В предпочтительном варианте осуществления смесь антител к Core-1 представляет собой поликлональную сыворотку.

Любое животное или человек может быть введено в контакт снутрицевтической, фармацевтической композицией, Core-1-положительным микроорганизмом и/или его фракцией, предпочтительными являются люди, мыши, крысы, кролики, козы, верблюды, куры, хомяки, морские свинки или обезьяны, еще более предпочтительны животные, которых специалисты рассматривают как наиболее удобных для получения реакции антител, в том числе кролики, козы, крысы, люди, шимпанзе и мыши для поликлональной сыворотки и мыши, крысы, люди для моноклональных антител, тогда как трансгенные мыши несут по меньшей мере часть генов человеческих антител, как и люди.

Введение в контакт означает введениенутрицевтической, фармацевтической композиции, Core-1-положительного микроорганизма и/или его фракции, способных вызвать гуморальную реакцию на Core-1, любым из описанных выше способов. Можно использовать любые известные специалистам дополнительные средства для повышения иммуногенности. Из способов введения предпочтительны оральный и системный, т.е. внутривенный, внутридермальный, подкожный, а лучше всего внутрибрюшинный.

Создание гуморальной иммунной реакции на Core-1 можно проверить тестами на гуморальную иммунную реакцию в соответствии с изобретением, причем по меньшей мере один из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6 должен быть положительным, как описано здесь, причем в предпочтительном варианте осуществления указанные антитела, полученные из сыворотки, плазмы и фекалий, включают также антитела, полученные из клеток, вырабатывающих антитела к Core-1, например В-клеток, immortalized В-клеток или клеток с рекомбинантной экспрессией антител к Core-1. Эти антитела можно получать многими известными способами, в предпочтительном варианте осуществления из сыворотки крови, или фракций сыворотки, или сыворотки, предварительно очищенной абсорбцией Core-1-отрицательных микробных антигенов, предпочтительно Core-1-отрицательных микроорганизмов, или антитела из производящих антитела клеток, например, описанных здесь, в виде цельных или фракционированных клеточных супернатантов, или очищенные антитела, и они применяются, как и указанные антитела, полученные из сыворотки, плазмы и фекалий, по меньшей мере в один из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает антитело или композицию антител к Core-1 или поликлональную сыворотку, моноклональное антитело к Core-1 или по меньшей мере один его фрагмент, дающие положительный результат по меньшей мере в пяти из тестов на гуморальную иммунную реакцию 1-6.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает антитело или композицию антител к Core-1 или поликлональную сыворотку, моноклональное антитело к Core-1 или по меньшей мере один его фрагмент, предпочтительно один его фрагмент, дающие положительный результат в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1 и 3, более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3, еще более предпочтительно в тестах на гуморальную иммунную реакцию 1, 2, 3 и 4, лучше в тесте на гуморальную иммунную реакцию 5, а оптимально в тестах на гуморальную иммунную реакцию 6.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает антитело или композицию антител к Core-1 или поликлональную сыворотку, моноклональное антитело к Core-1 или по меньшей мере один его фрагмент, которое связывается с TF α -PAA и почти или совсем не связывается с TF β -PAA, не связывается ни с одним из веществ, перечисленных в списке № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, связывается по меньшей мере с клетками NM-D4, NM-F9 и ZR-75-1, причем это связывание зависит от периода и представляет собой или происходит от IgG.

В предпочтительном варианте осуществления антителом к Core-1 является моноклональное антите-

ло к Core-1 или по меньшей мере один его фрагмент, которое Core-1-специфично связывается с TFa-РАА и почти или совсем не связываются с TFb-РАА, не связывается ни с одним из веществ, перечисленных в № списка № 2, связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, связывается с по меньшей мере клетками NM-D4, NM-F9 и ZR-75-1, причем это связывание зависит от периода, и представляет собой или происходит от IgG, и предпочтительно моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело или человеческое антитело от трансгенной мыши или от человека, причем более предпочтительно антитело является цитотоксичным по отношению к Core-1-положительным опухолевым клеткам.

Специалисты могут пользоваться описанными методиками и подбирать соответствующие условия для достижения вышеприведенных целей. Например, специалисты могут подбирать подходящих животных или людей и условия иммунизации, отбирать нужные клетки и иммортализовать их, анализировать последовательности пептидов или кодировать ДНК последовательности пептидов в антителе или его фрагменте или части, подбирать нужные форматы или фрагменты антител и задавать векторы рекомбинантной трансфекции клеток, подбирать и постоянно или временно трансформировать подходящие клетки для выработки антител, отбирать и выращивать клетки или клоны клеток, выделять и очищать антитела или их фрагменты.

В другом варианте осуществления изобретения антитела к Core-1 можно вырабатывать с использованием по меньшей мере одного из Core-1-положительных микроорганизмов или их фрагментов с целью выделения антитела к Core-1 или смеси антител из библиотеки антител с применением таких методик, как отображение фагов или отображение рибосом.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу выработки антител к Core-1 или композиций антител, в котором:

а) вводят нутрицевтическую, фармацевтическую композицию, Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию в контакт с библиотекой фагов антител (например, библиотекой фагемидов или векторов фагов) или библиотекой отображения рибосом антител, полученной от человеческих, животных или химерических антител;

б) выделяют указанное антитело к Core-1 или композицию антител путем связывания с указанной нутрицевтической, фармацевтической композицией, Core-1-положительным микроорганизмом или его фракцией.

В предпочтительном варианте осуществления используют гены из библиотек синтетических антител человеческого, гуманизированного, химерического или животного происхождения. В более предпочтительном варианте осуществления библиотеки формируют из репертуара по меньшей мере одного животного и/или человека, которые были иммунизированы нутрицевтической, фармацевтической композицией, Core-1-положительным микроорганизмом или его фракцией. Специалисты умеют конструировать такие библиотеки и использовать их для выработки или отбора специфичных антител.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения описаны в примерах.

Н) Выработка Core-1-специфичных дендритных клеток, Т-клеток, клонов Т-клеток и линий Т-клеток

Как неожиданно оказалось, Core-1-положительные микроорганизмы в соответствии с изобретением способны также активировать человеческие Т-клетки Core-1-специфичным образом при презентации человеческими дендритными клетками (*in vitro*). В литературе нет сообщений о клеточной иммунной реакции, в частности, цитотоксичной клеточной иммунной реакции на углеводный антиген опухоли, в частности, на небольшой незаряженный углевод вроде Core-1. Не сообщалось и о презентации углеводных антигенов человеческих опухолей на человеческих дендритных клетках - ключевых регуляторах иммунной системы, в частности человеческих углеводных структур, происходящих от микроорганизма. Напротив, общепринятым является мнение, что у людей не может вырабатываться углевод-специфичная клеточная иммунная реакция, в частности, на углеводные антигены опухолей. Core-1-положительные микроорганизмы в соответствии с изобретением были процессированы и представлены человеческими дендритными клетками, и эти соответственно нагруженные дендритные клетки могут использоваться для активации первичных человеческих Т-клеток специфично против Core-1. Эти Т-клетки, выработанные путем сенсибилизации лизатами от Core-1-положительных бактерий в соответствии с изобретением, показывают сильную иммунную реакцию после повторной стимуляции лизатами Core-1-положительных человеческих опухолевых клеток, что подтверждается секрецией цитокинов, характеризующей специфичную реакцию Т-клеток, в частности, цитотоксичную реакцию Т-клеток.

Оказывается, что возможно нагружать человеческие дендритные клетки Core-1-положительным микроорганизмом в соответствии с изобретением или несущими Core-1 молекулами вообще и получать Core-1-специфичную активацию человеческих Т-клеток. Более того, оказывается, что иммунные клетки, активированные человеческими дендритными клетками, нагруженными указанными Core-1-положительными микроорганизмами, можно снова активировать или повторно стимулировать человеческими дендритными клетками, нагруженными несущими Core-1 молекулами, например, лизатами NM-D4 или NM-F9 или азиалогликофорином, что свидетельствует о том, что (i) Core-1-специфичные Т-клетки можно активировать Core-1-положительным микроорганизмом и (ii) в этой иммунной реакции

задействованы Core-1-специфичные Т-клетки, которые можно снова активировать или повторно стимулировать DC, нагруженными несущими Core-1 молекулами. Далее оказывается, что не только секрецию GM-CSF и пролиферацию Т-клеток можно вызвать при использовании Core-1-положительного микроорганизма в соответствии с изобретением, но и секрецию INF-гамма (интерферона гамма) и даже TNF-альфа (фактора некроза опухоли альфа), что свидетельствует об активации Core-1-специфичных цитотоксичных Т-клеток. К тому же оказывается, что Core-1-специфичные Т-клетки можно повторно стимулировать не менее 4 раз *in vitro*, что является признаком сильной и специфичной клеточной иммунной реакции на антиген опухоли и саму опухоль, медиированной Т-клетками. Эти иммунные реакции доказывают специалистам, что Core-1-положительный микроорганизм, обеспечиваемый настоящим изобретением, способен вызывать мощную клеточную иммунную реакцию на Core-1 у людей.

Соответственно изобретение предусматривает способ выработки функциональной дендритной клетки против Core-1, в котором вводят в контакт соответствующее количество дендритной клетки, или смеси дендритных клеток, или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну дендритную клетку, с соответствующим количеством по меньшей мере одного Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, как описано здесь, или несущей Core-1 молекулы, или Core-1-положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции, соответствующее время в соответствующих условиях с целью выработки по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки против Core-1.

Изобретение предусматривает способ выработки функциональной дендритной клетки против Core-1, в котором вводят в контакт соответствующее количество дендритной клетки, или смеси дендритных клеток, или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну дендритную клетку, с соответствующим количеством по меньшей мере одного Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, как описано здесь, соответствующее время в соответствующих условиях с целью выработки по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной Core-1.

Изобретение предусматривает способ выработки функциональной дендритной клетки против Core-1, в котором вводят в контакт соответствующее количество дендритной клетки, или смеси дендритных клеток, или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну дендритную клетку, с соответствующим количеством по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулы, или Core-1-положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции, соответствующее время в соответствующих условиях с целью выработки по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной Core-1.

Указанная функциональная дендритная клетка против Core-1 представляет собой дендритную клетку или смесь дендритных клеток, которая активирует по меньшей мере одну Т-клетку против Core-1, что предпочтительно проверяют одним из тестов на клеточную иммунную реакцию на Core-1 в соответствии с изобретением, причем по меньшей мере один тестов на клеточную иммунную реакцию дает положительный результат. В предпочтительном варианте осуществления функциональная дендритная клетка представляет Core-1 на своей поверхности и распознается Core-1-специфичным антителом, как описано при рассмотрении теста на клеточную иммунную реакцию 4. В предпочтительном варианте осуществления изобретения функциональная дендритная клетка против Core-1 получена контактом незрелой дендритной клетки, или смеси незрелых дендритных клеток, или смеси дендритных клеток, содержащей по меньшей мере одну незрелую дендритную клетку, с соответствующим количеством по меньшей мере одного Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, как описано здесь, соответствующее время и в соответствующих условиях, для созревания указанной дендритной клетки в соответствующих условиях, как описано здесь и известно специалистам, с содержанием, например, молекул TNF-альфа (фактор некроза опухоли альфа), LPS (липолисахарид) или BCG (бацилла Кальметта-Герена), INF- (интерферон гамма), дексаметазона и/или TGF-бета (трансформирующий фактор роста бета), в функциональную дендритную клетку, нагруженную Core-1. В предпочтительном варианте осуществления изобретения дендритная клетка выведена из MUTZ-3 или NemoDC (предоставляются фирмой Glycotope GmbH, Берлин, Германия; www.glycotope.com), а предпочтительные незрелые дендритные клетки выработаны из клеток MUTZ-3 или NemoDC в соответствующих условиях, когда применяют IL-4 и GM-CSF обычно в течение одной недели, а полученные незрелые дендритные клетки (iNMDc) вводят в контакт с указанным соответствующим количеством по меньшей мере одного Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, клетки созревают в соответствующих условиях с участием, например, TNF-альфа, LPS, BCG, INF-гамма, дексаметазона или TGF-бета, предпочтительно TNF-альфа, обычно в течение 1-2 дней, что приводит к получению зрелых дендритных клеток, нагруженных Core-1, которые соответствуют указанным функциональным дендритным клеткам против Core-1.

Предпочтительные варианты в соответствии с изобретением описаны в примерах.

Изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки или Т-клеток против Core-1, в котором:

(а) вводят в контакт соответствующее количество функциональных дендритных клеток или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну функциональную дендритную клетку, нагруженную соответствующим количеством Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции по меньшей мере с одной Т-клеткой или Т-клетками;

(b) культивируют указанные Т-клетку или Т-клетки вместе с указанными нагруженными функцио-

нальными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1.

Изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1, в котором:

(a) вводят в контакт соответствующее количество функциональных дендритных клеток или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну функциональную дендритную клетку,

нагруженную соответствующим количеством несущей CoGe-1 молекулы или CoGe-1-положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции, с по меньшей мере одной Т-клеткой, или Т-клетками, или смесью клеток, содержащей по меньшей мере одну Т-клетку;

(b) культивируют указанные Т-клетку, или Т-клетки, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку, вместе с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1, в котором:

(a) вводят в контакт соответствующее количество функциональных дендритных клеток, нагруженных соответствующим количеством CoGe-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, с Т-клеткой или Т-клетками;

(b) культивируют указанные Т-клетку или Т-клетки вместе с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1;

(c) добавляют функциональные дендритные клетки, нагруженные несущей CoGe-1 молекулой или CoGe-1-положительной опухолевой клеткой, ее лизатом или фракцией, для повторной стимуляции;

(d) культивируют соответствующее время и в соответствующих условиях.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1, в котором:

a) вводят в контакт соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной соответствующим количеством CoGe-1-положительного микроорганизма его лизата или фракции, с соответствующим количеством по меньшей мере одной Т-клетки, или смеси Т-клеток, или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну Т-клетку;

b) культивируют указанную Т-клетку, или смесь Т-клеток,

или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку, с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1, в котором:

a) вводят в контакт соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной соответствующим количеством несущей CoGe-1 молекулы или CoGe-1-положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции по меньшей мере с одной Т-клеткой, или Т-клетками, или смесью клеток, содержащей по меньшей мере одну Т-клетку;

b) культивируют указанную Т-клетку, или смесь Т-клеток, или смесь клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку, с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1, включающий стадии (a) и (b) предыдущих способов, в котором затем:

(c) добавляют соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной соответствующим количеством по меньшей мере одной несущей CoGe-1 молекулы или CoGe-1-положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции, для повторной стимуляции;

или добавляют соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной соответствующим количеством по меньшей мере одного CoGe-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, для повторной стимуляции;

(d) культивируют соответствующее время и в соответствующих условиях.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки или Т-клеток против CoGe-1, включающий стадии (a), (b), (c) и (d) предыдущего способа, в котором затем осуществляют по меньшей мере еще один тур повторной стимуляции на стадиях (e) и (f) либо на стадиях (g) и (h), где

(e) культивируют соответствующее время и в соответствующих условиях несущей CoGe-1 молекулы или CoGe-1-положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции, для повторной стимуляции;

(f) культивируют соответствующее время и в соответствующих условиях;

(g) добавляют соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной

клетки, нагруженной соответствующим количеством по меньшей мере одного Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, для повторной стимуляции;

(h) культивируют соответствующее время и в соответствующих условиях.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки линии Т-клеток против Core-1, в котором осуществляют еще два тура указанной повторной стимуляции. В более предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки линии Т-клеток против Core-1, в котором осуществляют еще три тура указанной повторной стимуляции. В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки линии Т-клеток против Core-1, в котором осуществляют еще пять туров указанной повторной стимуляции.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки клона Т-клетки против Core-1, в котором осуществляют дополнительную стадию клонирования клеток по меньшей мере перед одним туром указанной повторной стимуляции.

В предпочтительном варианте осуществления активированной Т-клеткой или Т-клетками является линия Т-клеток против Core-1, причем предпочтительно стадии (c) и (d), соответствующие одному туру повторной стимуляции, осуществляют два раза, более предпочтительно три раза, еще более предпочтительно 4 раза, а оптимальной является линия Т-клеток, подвергнутая более чем 4 турам повторной стимуляции.

В предпочтительном варианте осуществления активированной Т-клеткой или Т-клетками является клон Т-клетки против Core-1, причем предпочтительно стадии (c) и (d), соответствующие одному туру повторной стимуляции, осуществляют два раза, более предпочтительно три раза, еще более предпочтительно 4 раза, а оптимальной является линия Т-клеток, подвергнутая более чем 4 турам повторной стимуляции, причем клетки клонируют по меньшей мере один раз, например, разбавлением одной клетки, перед повторной стимуляцией.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки клона Т-клетки против Core-1, в котором указанная функциональная дендритная клетка представляет собой зрелую дендритную клетку.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки клона Т-клетки против Core-1, в котором указанная функциональная дендритная клетка и Т-клетка или Т-клетки являются человеческими клетками.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки, линии Т-клеток или клона Т-клетки против Core-1, в котором указанная функциональная дендритная клетка выведена из MUTZ-3 [заявки 10139428.4 (DE), PCT/EP 02/09260, 02758474.7 (EP), US 10/486,966, CA 2457287, DE 10139428A1, WO 2003/023023A1, EP 01419240, US 20040265998, CA 2457287], например, NemoD-DC (от фирмы Glycotope GmbH, Берлин, Германия, www.glycotope.com).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки, линии Т-клеток или клона Т-клетки против Core-1, в котором указанная функциональная дендритная клетка и Т-клетка или Т-клетки совмещены по меньшей мере в одном классе гистосовместимости.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки, Т-клеток, линии Т-клеток или клона Т-клетки против Core-1, в котором:

a) вводят в контакт соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки против Core-1, как описано выше, с соответствующим количеством по меньшей мере одной Т-клетки, или смеси Т-клеток, или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну Т-клетку;

b) культивируют указанную Т-клетку, или смесь Т-клеток с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против Core-1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ выработки активированной Т-клетки, Т-клеток, линии Т-клеток или клона Т-клетки против Core-1, в котором или:

A) вводят в контакт соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки против Core-1, нагруженной указанным Core-1-положительным микроорганизмом, его лизатом или фракцией, с соответствующим количеством по меньшей мере одной Т-клетки, или смеси Т-клеток, или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну Т-клетку, и

B) культивируют указанную Т-клетку, или смесь Т-клеток с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против Core-1, и

C) добавляют соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной соответствующим количеством по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулы или Core-1-положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции, для повторной стимуляции, и

D) культивируют соответствующее время и в соответствующих условиях или:

a) вводят в контакт соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной соответствующим количеством несущей Core-1 молекулы или Core-1-

положительной опухолевой клетки, ее лизата или фракции, с соответствующим количеством по меньшей мере одной Т-клеткой, или Т-клеток, или смеси клеток, содержащей по меньшей мере одну Т-клетку;

b) культивируют указанную Т-клетку, или смесь Т-клеток с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками соответствующее время и в соответствующих условиях для активации или примирования Т-клетки или Т-клеток против Coxe-1;

c) добавляют соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки, нагруженной соответствующим количеством по меньшей мере одного Coxe-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, для повторной стимуляции;

d) культивируют соответствующее время и в соответствующих условиях.

Предпочтительные варианты в соответствии с изобретением описаны в примерах.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает активированную Т-клетку или Т-клетки против Coxe-1, композицию, содержащую Т-клетки против Coxe-1, линию Т-клеток против Coxe-1 или клон Т-клетки против Coxe-1, как описано выше.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает активированную Т-клетку или Т-клетки против Coxe-1, композицию, содержащую Т-клетки против Coxe-1, линию Т-клеток против Coxe-1 или клон Т-клетки против Coxe-1, как описано выше, содержащие по меньшей мере одну клетку-хелпер CD4+ против Coxe-1.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает активированную Т-клетку или Т-клетки против Coxe-1, композицию, содержащую Т-клетки против Coxe-1, линию Т-клеток против Coxe-1 или клон Т-клетки против Coxe-1, как описано выше, содержащие по меньшей мере одну цитотоксичную Т-клетку против Coxe-1.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает активированную Т-клетку или Т-клетки против Coxe-1, композицию, содержащую Т-клетки против Coxe-1, линию Т-клеток против Coxe-1 или клон Т-клетки против Coxe-1, как описано выше, уничтожающую по меньшей мере одну Coxe-1-положительную опухолевую клетку или вырабатывающую молекулы, которые медируют при уничтожении по меньшей мере одной опухолевой клетки.

Активированная Т-клетка или Т-клетки против Coxe-1, композиция, содержащая Т-клетки против Coxe-1, линия Т-клеток против Coxe-1 или клон Т-клетки против Coxe-1 в соответствии с изобретением, уничтожающие по меньшей мере одну Coxe-1-положительную опухолевую клетку или вырабатывающие молекулы, которые медируют при уничтожении по меньшей мере одной опухолевой клетки означают, что указанная цитотоксичная Т-клетка или Т-клетки против Coxe-1 уничтожают Coxe-1-положительную опухолевую клетку, что можно определить либо с помощью теста на клеточную иммунную реакцию, описанного здесь, измеряя секрецию INF-гамма или TNF-альфа, или с помощью теста на цитотоксичность (например, теста на клеточную иммунную реакцию 5), где по меньшей мере одна меченая Coxe-1-положительная опухолевая клетка подвергается лизису со стороны указанных Т-клеток, что известно специалистам, использующим Т-клетки в соответствии с изобретением, например, с помощью реакции CTL или Th1, либо вызывая специфичную реакцию Т-хелпера CD4, который медирует активацию соответствующей гуморальной или клеточной иммунной реакции, что приводит к уничтожению по меньшей мере одной Coxe-1-положительной опухолевой клетки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения большого раком, в котором больному вводят активированную Т-клетку или Т-клетки против Coxe-1, композицию клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку против Coxe-1, линию Т-клеток против Coxe-1 или клон Т-клетки против Coxe-1, как описано выше, или содержащую их композицию.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения большого раком, в котором больному вводят соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки против Coxe-1, как описано выше, или содержащую их композицию.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения большого раком, в котором больной имеет или имел Coxe-1-положительную раковую клетку.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения большого раком, в котором функциональная дендритная клетка аутологична. В другом варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения большого раком, в котором функциональная дендритная клетка аллогенного происхождения от донора.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения большого раком, в котором способ лечения большого раком, в котором функциональная дендритная клетка выведена от MUTZ-3.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает способ лечения большого раком, в котором способ лечения большого раком, в котором функциональная дендритная клетка совпадает по молекуле по меньшей мере одного класса гистосовместимости с указанным больным.

Изобретение также предусматривает способ лечения большого раком, в котором больному вводят активированную Т-клетку или Т-клетки против Coxe-1, композицию клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку против Coxe-1, линию Т-клеток против Coxe-1 или клон Т-клетки против Coxe-1, как описано выше, или композицию, содержащую по меньшей мере одно из указанных.

Изобретение также предусматривает способ лечения больного раком, в котором больному вводят соответствующее количество по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки против Core-1, как описано выше, или содержащую их композицию.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере один из указанных способов применяют к больному, имеет или имел Core-1-положительную раковую клетку, распознаваемую по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом в описанном здесь предпочтительном варианте. Далее, предпочтение отдается указанным способам, где функциональная дендритная клетка аутологична, или где функциональная дендритная клетка является аллогенной, или где функциональная дендритная клетка происходит от донора, еще более предпочтительно, когда функциональная дендритная клетка выведена от MUTZ-3, еще лучше, когда любая из указанных функциональных дендритных клеток совпадает по молекуле по меньшей мере одного класса гистосовместимости с указанным больным, которому она вводится.

Специалисты могут выполнить описанную задачу, пользуясь приведенными здесь методиками и материалами. Они могут определить оптимальные условия для получения функциональных дендритных клеток или Т-клеток, лучший способ введения и/или композиции, которые содержат их и/или описаны в предпочтительных вариантах осуществления их выработки и использования согласно заявкам DE 10139428 A1, WO 2003/023023 A1, EP 01419240, US 20040265998, CA 2457287.

Указанная активированная Т-клетка или Т-клетки против Core-1 означают, что выработанная Т-клетка, Т-клетки или композиция, содержащая Т-клетки, дает положительный результат по меньшей мере в одном из тестов на клеточную иммунную реакцию в соответствии с изобретением, предпочтительно в двух, более предпочтительно в трех, оптимально во всех 4. Предпочтительно они содержат по меньшей мере одну клетку-хелпер CD4+, а более предпочтительно по меньшей мере одну цитотоксичную Т-клетку, способную уничтожить по меньшей мере одну Core-1-положительную опухолевую клетку.

Указанная Т-клетка или Т-клетки, предназначенные для введения в контакт, представляют собой по меньшей мере одну Т-клетку CD4+ и/или CD8+, выведенные или обогащенные известными способами, или входят в композицию клеток, содержащую по меньшей мере одну Т-клетку CD4+ и/или CD8+.

Указанный лизат может быть любым лизатом Core-1-положительного микроорганизма или Core-1-положительной опухолевой клетки, полученным, например, многократным замораживанием-оттаиванием, обработкой ультразвуком, механическим выдавливанием или температурной индукцией.

Подробно о выработке Core-1-специфичных Т-клеток см. пример 12.

Функциональной является дендритная клетка, способная активировать Т-клетку. Активация Т-клетки означает стимуляцию пролиферации и/или конверсию из наивной в активную Т-клетку. Активная Т-клетка вырабатывает молекулы, которые вызывают или способствуют иммунной реакции на целевую Core-1 или на несущую Core-1 опухолевую клетку, предпочтительно цитотоксичные Т-клетки, которые медируют уничтожение Core-1-положительной опухолевой клетки.

В предпочтительном варианте осуществления указанная функциональная дендритная клетка является зрелой дендритной клеткой. Более предпочтительно прекурсор дендритной клетки, из которого выводят зрелую клетку, получают от человека, предпочтительно от того же, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, или от которого те и другие совпадают по молекуле по меньшей мере одного класса гистосовместимости. В более предпочтительном варианте осуществления функциональная дендритная клетка выведена от MUTZ-3, лучше, когда клетки MUTZ-3 или выведенные от них дифференцированы с помощью И-4 и GM-CSF, нагружены соответствующими количествами Core-1-положительного микроорганизма, его лизата или фракции, или несущей Core-1 молекулой, или Core-1-положительной опухолевой клеткой, ее лизатом или фракцией, а затем созревают с использованием, например, соответствующих количеств TNF-альфа в зрелые дендритные клетки, которые соответствуют функциональным дендритным клеткам в соответствии с изобретением. В еще более предпочтительном варианте нагруженные функциональные дендритные клетки используют вместе с РВМС (периферийными мононуклеарными клетками крови), совпадающими по меньшей мере в классах гистосовместимости I (HLA-A2) и (HLA-B44).

Специалисты могут определить соответствующие условия для выработки функциональных дендритных клеток, нагруженных Core-1-положительным микроорганизмом, его лизатом или фракцией, или несущей Core-1 молекулой, или Core-1-положительной опухолевой клеткой, ее лизатом или фракцией, а также соответствующие количества и режимы обогащения или очистки Т-клетки или Т-клеток и условия совместной культивации обеих клеток продолжительность, среды, режим культивации и необходимые дополнительные факторы. Функциональные дендритные клетки обычно дифференцируют от клеток-прекурсоров 6-10 дней и нагружают и созревают еще 1-2 дня. Культивация указанной Т-клетки или Т-клеток вместе с указанными нагруженными функциональными дендритными клетками обычно занимает от 7 до 10 дней, а добавление и культивация нагруженных функциональных дендритных клеток для повторной стимуляции - от 7 до 9 дней в каждом туре повторной стимуляции. Подробно см. пример 12.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения различные дендритные клетки или функциональные дендритные клетки из разных источников, например, выведенные от MUTZ-3 и полученные от донора-человека, используют на разных стадиях примирования и повторной стимуляции.

Специалисты могут подобрать оптимальное сочетание.

Успешность выработки Т-клетки, Т-клеток или композиций, содержащих Т-клетку, Т-клетки, Т-клетки CD4+ и/или CD8+ против Core-1, можно проверить по меньшей мере одним тестом на клеточную иммунную реакцию в соответствии с изобретением. Подробности описаны здесь. Предпочтительно по меньшей мере два теста на клеточную иммунную реакцию дают положительные результаты, более предпочтительно три, желательно четыре, а оптимально все пять.

Приведенное описание дендритных клеток, их применения, необходимых для этого условий и молекул также действительны для тестов на клеточную иммунную реакцию, рассмотренных выше, и наоборот, и действительны также для всех остальных разделов изобретения.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает активированную Т-клетку против Core-1.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает Т-клетки, содержащие по меньшей мере одну активированную Т-клетку против Core-1.

В другом варианте осуществления изобретение предусматривает линию Т-клеток против Core-1. В другом варианте осуществления изобретение предусматривает клон Т-клетки против Core-1.

В предпочтительном варианте осуществления линию Т-клеток или клон Т-клетки вырабатывают с помощью выведенных из MUTZ-3 функциональных дендритных клеток, нагруженных Core-1-положительным микроорганизмом, его лизатом или фракцией в сочетании по меньшей мере с одним туром повторной стимуляции выведенными из MUTZ-3 функциональными дендритными клетками по меньшей мере одной несущей Core-1 молекулой или Core-1-положительной опухолевой клеткой, ее лизатом или фракцией, от донора, еще более предпочтительно от больного с опухолью, а оптимально от больного, опухоль которого положительно связывается Core-1-специфичным антителом.

Изобретение также предусматривает способ выработки по меньшей мере одной активированной Т-клетки для применения при лечении опухолей, в котором больному вводят активированные Т-клетки против Core-1-положительных опухолевых клеток.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение предусматривает функциональную дендритную клетку против Core-1, активированную Т-клетку против Core-1, композицию, содержащую Т-клетки против Core-1, линию Т-клеток против Core-1 или клон Т-клетки против Core-1, полученные способом, описанным выше, которые вызывают и/или клеточную иммунную реакцию на Core-1-положительные клетки и/или заболевания.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция, и/или функциональная дендритная клетка, и/или активированная Т-клетка, Т-клетки, клон Т-клетки или линия Т-клеток, как описано выше, используются для изготовления лекарственного средства и/или нутрицевтической композиции для профилактики или лечения опухоли известными способами.

Предпочтительные варианты в соответствии с изобретением описаны в примерах.

1) Наборы

Изобретение относится также к лекарственному набору для создания специфичной гуморальной и/или клеточной иммунной реакции у человека или животного на Core-1, антиген Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки, как описано здесь, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

В более предпочтительном варианте осуществления указанная Core-1-специфичная иммунная реакция служит защитой от Core-1-положительных раковых клеток.

Изобретение относится также к лекарственному набору для ослабления или предотвращения появления Core-1-положительного заболевания или опухоли, предпочтительно Core-1-положительной опухоли, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к лекарственному набору для ослабления или предотвращения распространения Core-1-положительного заболевания или метастазов опухоли, предпочтительно Core-1-положительной опухоли, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к лекарственному набору для лечения Core-1-положительного заболевания или метастазов опухоли, предпочтительно Core-1-положительной опухоли, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к лекарственному набору для профилактики и лечения желудочно-кишечных расстройств, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к лекарственному набору для укрепления иммунной системы или

усиления иммунной реакции, как описано здесь, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нутрицевтическая или фармацевтическая композиция, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракция, или содержащие их составы, входящие в указанные наборы, содержат по меньшей мере один микроорганизм, его лизат или фракцию от Core-1-положительного микроорганизма, связанного NemoD-TF1 и/или A78-G/A7 и NemoD-TF2, предпочтительно из штамма AG6 (DSM 18726), штамма MU1 (DSM 18728), и/или штамма LH2 (DSM 18727), более предпочтительно из штаммов AG6 и/или MU1, оптимально из штамма AG6.

Набор может включать информацию (инструкцию, адрес в интернете), поясняющую, как сочетать компоненты набора. Указанная информация может также содержать схему лечения.

Изобретение относится также к набору для определения иммунной реакции на Core-1, содержащему по меньшей мере один из описанных здесь тестов на иммунную реакцию на Core-1, предпочтительно по меньшей мере два, более предпочтительно по меньшей мере один тест на гуморальную и один на клеточную иммунную реакцию, содержащие по меньшей мере один из описанных материалов для соответствующего теста на иммунную реакцию, и информацию о применении набора. В предпочтительном варианте осуществления набор дополнительно содержит средства контроля, а более предпочтительно по меньшей мере одну из нутрицевтических или фармацевтических композиций, или Core-1-положительного микроорганизма, или его фракции, описанных здесь, или содержащих их составов.

Изобретение относится также к набору для выработки антитела или композиции антител к Core-1, описанных здесь, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к набору для выработки по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки против Core-1, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

В предпочтительном варианте осуществления набору для выработки по меньшей мере одной функциональной дендритной клетки против Core-1 содержит также незрелые дендритные клетки, полученные от линии дендритных клеток, в том числе MUTZ-3 или NemoD-DC.

Изобретение относится также к набору для выработки по меньшей мере одной активированной Т-клетки, Т-клеток, клона Т-клетки или линии Т-клеток против Core-1, содержащему нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, или Core-1-положительный микроорганизм, или его фракцию, или содержащие их составы, описанные здесь, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к набору для выделения Core-1-положительного микроорганизма или фракции микроорганизма, содержащего по меньшей мере одну молекулу Core-1 или структуру, содержащую по меньшей мере одно Core-1-специфичное антитело, или антитело к Core-1, или композицию антител, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к набору для идентификации Core-1-положительного микроорганизма или фракции микроорганизма, содержащего по меньшей мере одну молекулу Core-1 или структуру, содержащую по меньшей мере одно Core-1-специфичное антитело, или антитело к Core-1, или композицию антител, и информацию о применении набора.

Изобретение относится также к набору для идентификации или выделения Core-1-положительного микроорганизма или фракции микроорганизма, содержащего по меньшей мере одну молекулу или структуру Core-1 и для идентификации приемлемого Core-1-положительного микроорганизма для использования в качестве компонента нутрицевтических и фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, содержащих одно Core-1-специфичное антитело, или антитело к Core-1, или композицию антител, и информацию о применении набора.

В предпочтительных вариантах в соответствии с изобретением используются предпочтительно Core-1-специфичные антитела, как описано здесь, наиболее предпочтительно NemoD-TF1, NemoD-TF2 и/или A78-G/A7.

В предпочтительных вариантах осуществления набор содержит по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм, его лизат или фракцию в качестве средства положительного контроля.

Предпочтительные варианты в соответствии с изобретением описаны в примерах.

Определения

В соответствии с настоящим изобретением термин "нутрицевтик или нутрицевтическая композиция" означает любое питательное вещество, композицию или состав питательных веществ, которые можно вводить orally человеку или животному, в том числе, но не ограничиваясь этим перечнем, питательные вещества, нутрицевтические добавки, питательные добавки, диетические добавки, медицинскую пищу, клиническую пищу, парентерально принимаемую пищу, энтерально принимаемую пищу, пищу для специальных диет, пищу лечебного назначения или функциональную пищу, которые могут вводиться orally в различных формах, в том числе, но не ограничиваясь этим перечнем, в виде капсул,

таблеток, эмульсий, порошков, жидкостей, а также в виде любых пищевых продуктов или напитков или в их составе. В особых случаях пища может приниматься парентерально (парентеральная пища). Нутрицевтическую композицию можно вводить отдельно либо в смеси с по меньшей мере одним другим ингредиентом. Нутрицевтическую композицию отдельно либо в смеси с по меньшей мере одним другим ингредиентом можно вводить отдельно или подмешивать в пищу или напиток. Термин "нутрицевтическая композиция" охватывает любой пищевой продукт, напиток, капсулы, таблетки, эмульсии, порошки или жидкости.

В соответствии с настоящим изобретением термин "фармацевтическая композиция" означает любую композицию, которая может использоваться в качестве лекарственного, фармацевтического или биологического средства или является компонентом лекарственного, фармацевтического или биологического средства.

В соответствии с настоящим изобретением термин "Core-1" означает углеводную структуру галактоза бета 1-3, сцепленную с N-ацетилагалактозаминном альфа 1- сцепленным (Gal бета1-3GalNAc альфа1/TF альфа, TFa). На протеине или полипептиде Core-1 ковалентно связывается через O-гликозидную связь с аминокислотами серином или треонином (Gal бета1-3GalNAc альфа1-O-Ser/Thr). Core-1 может также связываться через различные линкеры и различные плотности с природными или синтетическими носителями, например, полиакриламидом (здесь также называется PAA), или другими молекулами, например, материалами хроматографического слоя (например, сефарозой), биотином или протеинами, например, альбумином бычьей сыворотки (BSA), яичным белком (Ova), человеческим сывороточным альбумином (HSA) или гемоцианином лимфы улитки (KLH), токсинами, токсоидами, гранулами или частицами наноразмера. В изобретении под Core-1 понимаются также имитирующие Core-1 структуры, как полипептиды, пептиды, липиды или углеводы или их комбинации, химическая структура которых отличается от Core-1, но которые имеют конформационные структуры, которые могут распознаваться Core-1-специфичными антителами в соответствии с изобретением и потому иммунохимически рассматриваются как идентичные Core-1. Термин Core-1 также охватывает Core-1 в бета-аномерной конфигурации (см. также фиг. 19).

В соответствии с настоящим изобретением термин "Core-1-специфичное антитело" означает любое антитело, которое специфично связывается с Gal бета1-3GalNAc альфа1-PAA (TFa-PAA, TF-альфа-PAA, Core-1-PAA), но ни с одним веществом из списка № 1.

Список № 1.

GlcNAc β -2Gal β 1-3GalNAc-альфа-PAA (GlcNAc β 1-2' TF)

Fuc-альфа1-2Gal β 1-3GalNAc-альфа-PAA (H тип 3)

GalNAc-альфа1-3Gal β -PAA (A_{d1})

Gal альфа1-3-GalNAc β -PAA (T_{альфа β})

полученные от фирмы Lectinity holdings, Inc.

В качестве альтернативы все эти структуры могут быть выработаны специалистами, которые могут также подобрать другой подходящий полиакриламид для конъюгации или любую другую подходящую несущую молекулу, а также способы конъюгации для связывания соответствующих углеводных структур и синтеза необходимых промежуточных соединений.

Core-1-специфичное антитело - это, например, антитело, которое связывается с азиалогликофоринном (несущим Core-1) но не с гликофоринном (не несущим Core-1), и это связывание чувствительно к обработке периодатом, более предпочтительно любое антитело, которое связывается с TFa-PAA, почти или совсем не связывается с Tfb-PAA (Gal бета1-3GalNAc бета1-PAA) и не связывается ни с одним веществом из списка № 2:

протеины:

гликофорин

BSA (альбумин бычьей сыворотки)

Конъюгаты PAA:

аминоглицитол

β -N-ацетилнейраминавая кислота (бета-N- ацетилнейраминавая кислота)

альфа-D-глюкоза (альфа-D-глюкоза)

β -D-глюкоза (бета-D-глюкоза)

альфа-D-галактоза (альфа-D-галактоза)

β -D-галактоза (бета-D-галактоза)

альфа-D-манноза (альфа-D-манноза)

альфа-D-манноза-6-фосфат (альфа-D-манноза-6-фосфат)

альфа-L-фукоза (альфа-b-фукоза)

β -N-ацетил-D-глюкозамин (бета-N-ацетил-D-глюкозамин)

альфа-N-ацетил-D-галактозамин (альфа-ацетил-D-галактозамин, T_n, T_n)

β -D-галактоза-3-сульфат (бета-D-галактоза-3-сульфат) альфа-N-ацетилнейраминавая кислота (альфа-N-ацетилнейраминавая кислота)

β -N-ацетил-D-глюкозамин-6-сульфат (бета-N-ацетил-D-глюкозамин-6-сульфат)
 Lac-di-NAc (GalNAc β 1-4GlcNAc α -, GalNAc-бета1-4GlcNAc-бета-)
 GlcNAc β 3Gal (GlcNAc β 1-3Gal β -, GlcNAc-бета1-3Galбета-)
 Gala4GlcNAc (Gal α 1-4GlcNAc β -, Gal-альфа1-4GlcNAc-бета)
 мальтоза
 Gal β 3Gal (Gal β 1-3Gal β -, Gal-бета1-3Gal-бета)
 Le^c (Gal β 1-3GlcNAc β -, Gal-бета1-3GlcNAc-бета-)
 Lac (Gal β 1-4Glc β -, Gal-бета1-4Glc-бета)
 LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc β -, Gal-бета1-4GlcNAc-бета-)
 Fuca3GlcNAc (Fuca α 1-3GlcNAc β -, Fuc-альфа1-3GlcNAc-бета-)
 Fuca4GlcNAc, (Fuca α 1-4GlcNAc β -, Fuc-альфа1-4GlcNAc-бета-)
 Fs-2 (GalNAc α 1-3GalNAc β -, GalNAc-альфа1-3GalNAc-бета)
 Core 5 (GalNAc α 1-3GalNAc α -, GalNAc-альфа1-3GalNAc-альфа-)
 Тальфаальфа..Gal α 1-3GalNAc α -, Gal-альфа1-3GalNAc-альфа-,
 Тальфа альфа)
 Gal-альфа2Gal1 (Gal α 1-2Gal β -, Gal-альфа1-2Gal-бета-, Gala2Gal)
 SiaTn (Neu5Ac α 2-6GalNAc α -, Neu5Ac-альфа2-6GalNAc-альфа sTn)
 3'-su-LacNAc (3'-O-su-LacNAc β -, 3'-O-su-LacNAc-бета-),
 3'-su-Le^c (3'-O-su-Gal β 1-3GlcNAc β -, 3'-O-su-Gal-бета1-3GlcNAc-бета)
 мелибиоза (Gal α 1-6Glc β -, Gal-альфа1-6Glc-бета-)
 (Sia)₂ (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α -, Neu5Ac-альфа2-8Neu5Ac-альфа)
 Gal2 β Gal (Gal β 1-2Gal β -, Gal-бета1-2Gal-бета-, Gal-бета2Gal-)
 6-O-su-LacNAc (Gal β 1-4 (6-O-su) GlcNAc β -, Gal-бета1-4 (6-O-su)GlcNAc-бета-)
 A_{di} (GalNAc α 1-3Gal β -, GalNAc-альфа1-3Gal-бета-)
 B_{di} (Gal α 1-3Gal β -, Gal-альфа1-3Gal-бета)
 6'-O-su-LacNAc (6'-su-LacNAc β -, 6'-su-LacNAc-бета-)
 H_{di} (Fuca α 1-2Gal β -, Fuc-альфа1-2Gal-бета)
 3'-O-su-TF (3'-O-su-Gal β 1-3GalNAc α -, 3'-O-su-Gal-бета1-3GalNAc-альфа-)
 di-GalNAc β (GalNAc β 1-3GalNAc β -, GalNAc-бета1-3GalNAc-бета)
 core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α -, GlcNAc-бета1-3GalNAc-альфа)
 core 6 (GlcNAc β 1-6GalNAc α -, GlcNAc-бета1-6GalNAc-альфа)
 GA1, GgOse3 (GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -, GalNAc-бета1-4Galбета1-4Glc-бета)
 Gala1-3' Lac (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -, Gal-альфа1-3Gal-бета1-4Glc-бета)
 GlcNAc β 1-2'TF (GlcNAc-бета1-2Gal-бета1-3GalNAc-альфа-)
 Man₃ (Man α 1-6 Man α -Man α 1-3)
 3'SLN (Neu5Ac-альфа2-3Gal-бета1-4GlcNAc-бета-)
 Pk (Gb3, GbOse3, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -)
 Le^a (Fuca1-4 GlcNAc β -Gal β 1-3)
 Le^d (H тип 1, Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β -)
 Le^x (Fuca1-3 GlcNAc β -Gal β 1-4)
 3'-SiaLe^c (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -)
 H тип 3 (Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α -)
 3'-SL (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -)
 6'-SL (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -)
 3'-O-su-Le^a (Fuca1-4 GlcNAc β -O-su-3Gal β 1-3)
 3'-O-su-Lex (Fuca1-3 GlcNAc β -O-su-3Gal β 1-4)
 Gala1-3' LacNAc (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -)
 (Sia)₃ (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-)
 GlcNAc β 3'TF (GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -)
 A_{III} (Fuca1-2 Gal β -GalNAc α 1-3,
 полученные от фирмы Lectinity holdings, Inc.

В качестве альтернативы все эти структуры могут быть выработаны специалистами, которые могут также подобрать другой подходящий полиакриламид для конъюгации или любую другую подходящую несущую молекулу, а также подходящие способы конъюгации для связывания соответствующих углеводных структур и синтеза необходимых промежуточных соединений.

Еще более предпочтительно антитело, выбранное из нижеследующих антител: HB-T1 (IgM) [от фирмы DakoCytomation GmbH, Гамбург; Giuffrè G, Vitarelli E, Tuccari G, Ponz de Leon M, Barresi G: Detection of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Virchows Arch 429:345-352 (1996)], HH8 (IgM) [Clausen H., Stroud M., Parker J., Springer G., Hakomori S.: Monoclonal antibodies

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

предпочтительнее антитело, которое связывается с TFa-РАА, почти или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из конструкторов X-РАА, перечисленных в списке № list2 №, и которое связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и это связывание чувствительно к обработке периодатом,

еще предпочтительнее любое антитело, которое связывается с TFa-РАА почти или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из конструкторов X-РАА, перечисленных в списке № list2 №, и которое связывается с азиалогликофорином, но не с гликофорином, и связывается с по меньшей мере одной из линий человеческих опухолевых клеток NM-D4 [DSM ACC2605], NM-F9 [DSM ACC2606], ZR-75-1, САМА-1, КG-1 или А-204, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, например, NEMOD-TF2 или А78-G/A7,

еще лучше любое антитело с любой из перечисленных выше характеристик связывания, которое не связывается с трисахаридом Core-2, связанным с РАА, например, NEMOD-TF1,

оптимально же любое антитело, которое связывается с TFa-РАА почти или совсем не связывается с TFb-РАА и не связывается ни с одним из протеинов и конструкторов X-РАА, перечисленных в списке № 2, и которое связывается с азиалогликофорином, но не с

гликофорином, и связывается по меньшей мере с клетками NM-D4, NM-F9 [DSM ACC2606] и ZR-75-1, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом, например, NEMOD-TF1.

Указанное Core-1-специфичное антитело может быть цельным антителом от любого животного или человека, например, мыши, крысы, человека, верблюда, гуманизированным или химерическим антителом, может принадлежать к различным классам антител, в том числе IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD, или любым фрагментом антитела постольку, поскольку сохраняет специфичность связывания с Core-1, например, Fab, F(ab)2, одноцепочечные Fv или однодоменные антитела. Эти антитела могут также содержать по меньшей мере одну дополнительную аминокислоту, или мутации, или полипептидные последовательности, например метки, линкеры или домены мультимеризации, и могут происходить из иных источников, нежели животные, растения и отбор из библиотек синтетических антител, используя, например, демонстрацию фагов, или демонстрацию рибосом, либо рекомбинантное конструирование.

Обработка периодатом для испытания чувствительности к обработке периодатом связывания Core-1-специфичным антителом TFa-РАА; TFb-РАА (TFβ-РАА, TF бета- РАА) или других РАА-конструкторов (X-РАА), азиалогликофоринона или опухолевых клеток выполняется по методике Вудварда и др. [Woodward MP et al., (1985) *J. Immunol. Methods* 78: 143-153] и подробно рассматривается в примерах. Специалисты могут принять эту технологию и оптимизировать условия для описанных здесь других методик.

Термин "чувствительность к обработке периодатом" в соответствии с настоящим изобретением означает, что связывание антитела с антигеном или клеткой ослабляется, если этот антиген или клетка обработаны периодатом, по сравнению со связыванием с тем же антигеном или клеткой без обработки периодатом, как подробно описано в примере 9. Для определения чувствительности к обработке периодатом специфичности антитела к Core-1 предпочитают испытывать чувствительность к обработке периодатом его связывания с TFa-РАА, TFb-РАА, азиалогликофорином, NM-D4 [03018576.3 (EP), PCT/EP2004/009281, WO2005/017130 A2, EP1654353]) и/или другими опухолевыми клетками. Предпочтительно уменьшение связывания после обработки периодатом антигена или клетки составляет менее 50% от значения без обработки периодатом, а еще более предпочтительно менее 20% величины связывания того же антигена или клетки без обработки периодатом.

Предпочтительными Core-1-специфичными антителами в соответствии с настоящим изобретением являются NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, А78-G/A7, НВ-Т1, НН8, более предпочтительны NEMOD-TF1, NEMOD-TF2 и А78-G/A7, еще более предпочтительны NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2, а оптимально NEMOD-TF1. NEMOD-TF1 и NEMOD-TF2 описаны также в DE 10256900.2, PCT/DE2003/003994, EP 03788853.4, US 10/536,834. NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, А78-G/A7, а также А68 В/А11 можно закупить у Glycotope GmbH, Берлин, Германия.

Связывание антитела с Gal бета 1-3 GalNAc альфа1-РАА, Gal бета 1-3 GalNAc бета 1-РАА, GlcNAc бета1-2 Gal бета 1-3 GalNAc альфа 1-РАА, азиалогликофорином и гликофорином предпочтительно определяют методом ELISA, а связывание с опухолевыми клетками - проточной цитометрией или иммунофлуоресценцией, как описано в примерах. Специалисты могут воспользоваться и другими методами для испытания связывания таких антител, такими как, но не ограничиваясь данным перечнем, анализом Скотчарда на связывание клеток, анализом BIACORE, вестерн-блоттингом или дот-блоттингом на свя-

зывание антигенов. Специалисты могут также использовать другие несущие Core-1 молекулы для испытания связывания Core-1, например, (Gal бета1-3 GalNAc альфа1-), соединенную с KLN соответствующим линкером или без него, биотин или BSA, однако вышеприведенные предпочтительные варианты являются предпочтительными в соответствии с изобретением.

В соответствии с настоящим изобретением термин "Core-1-положительный микроорганизм" означает любой микроорганизм, который связывается по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом, если указанный микроорганизм контактирует с указанным антителом. Главным фактором при определении того, является ли данный микроорганизм Core-1-положительным, служит распознавание указанного микроорганизма Core-1-специфичным антителом. Это свидетельствует о том, что микроорганизм несет эпитоп, который представляет собой Core-1 или структура которого специфически напоминает Core-1 (имитирующие Core-1 структуры), а потому способен вызывать Core-1-специфическую иммунную реакцию. Это касается и микроорганизмов, в которых Core-1 связан в бета-форме (см. также фиг. 19). Микроорганизм может быть Core-1-положительным от природы или может быть сделан Core-1-положительным путем обработки химическим веществом, обнажающим Core-1, например, периодатом в некоторых вариантах осуществления. В таких случаях возникает Core-1-положительный микроорганизм, специфически связываемый по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом; если указанный микроорганизм контактирует с указанным антителом, он представляет собой Core-1-положительный микроорганизм в соответствии с изобретением. Однако в качестве альтернативы предпочтительны натуральные Core-1-положительные микроорганизмы.

Существуют и другие структуры, кроме антител, которые при контакте распознают и связывают Core-1. Например, лектин-связывающая углеводы молекула не является антителом, но может связывать Core-1. Арахисовый агглютинин (PNA) давно считается классическим реактивом для обнаружения антигена Томсена-Фриденрайха. Однако он не специфичен к антигену Томсена-Фриденрайха, к тому же связывает и другие гликаны с концевыми структурами Gal-бета и довольно активно реагирует с нормальными тканями (Cao et al, 1996). В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения указанный Core-1-положительный микроорганизм отличается тем, что он распознается/связывается по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом и по меньшей мере одним связывающим Core-1 протеином, не являющимся антителом (лектин), таким как (но не ограничиваясь данным перечнем), *Arachis hypogaea* (арахисовый) агглютинин (PNA), агглютинин *Amaranthus caudatus* (ACA), лектин *Artocarpus integrifolia* (жакалин), лектин *Bauhinia purpurea* (BPL) или агглютинин *Agaricus bisporus* (ABA) [Пектины можно получить от фирмы Vector Labs., Берлингем, Калифорния, США, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США, или из других источников]. В предпочтительном варианте осуществления указанный Core-1-положительный микроорганизм отличается тем, что он распознается и связывается по меньшей мере двумя Core-1-специфичными антителами. В более предпочтительном варианте осуществления указанный Core-1-положительный микроорганизм отличается тем, что он распознается и связывается по меньшей мере двумя Core-1-специфичными антителами и это связывание чувствительно к обработке периодатом. В еще одном предпочтительном варианте осуществления, Core-1-положительный микроорганизм отличается тем, что он распознается и связывается Core-1-специфичными антителами NEMOD-TF1, NEMOD-TF2 или A78-G/A7, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом. В наиболее предпочтительном варианте осуществления указанный Core-1-положительный микроорганизм распознается и связывается NEMOD-TF1 and NEMOD-TF2 или NEMOD-TF1 и A78-G/A7, причем это связывание чувствительно к обработке периодатом. Эти антитела также очень удобны для выработки Core-1-положительных микроорганизмов с достаточной Core-1-специфичностью в одном из описанных здесь способов отбора и выявления.

Для испытания Core-1-специфичных антител на связывание микроорганизма в настоящем изобретении наиболее удобны ELISA и иммунофлуоресцентный анализ (см. примеры), но специалисты могут воспользоваться другими испытательными системами, например, проточной цитометрией или несколькими приемами абсорбции для выявления Core-1-положительных микроорганизмов.

Обработка периодатом для испытания чувствительности связывания микроорганизма Core-1-специфичным антителом к обработке периодатом подробно рассмотрена в примере 9.

В соответствии с настоящим изобретением термин "чувствительность микроорганизма Core-1 к обработке периодатом" означает, что связывание Core-1-специфичного антитела с указанным микроорганизмом изменяется (например, в меньшую или большую сторону) при обработке указанного микроорганизма периодатом по сравнению со связыванием того же микроорганизма без такой обработки, как подробно описано в примерах. В предпочтительном варианте осуществления указанное связывание Core-1-специфичным антителом указанного микроорганизма меньше, т.е. ослабляется при обработке указанного микроорганизма периодатом по сравнению со связыванием того же микроорганизма без такой обработки. Как отмечалось выше, периодат разрушает специфическую структуру антигена Core-1. В более предпочтительном варианте осуществления уменьшение связывания Core-1-специфичным антителом указанного микроорганизма после обработки периодатом микроорганизма составляет менее 80% от значения без обработки периодатом, более предпочтительно менее 50%, а еще более предпочтительно менее 30%.

Core-1-положительным может быть любой микроорганизм, такой как, но не ограничиваясь данным

перечнем, бактерия, цианобактерия, зубактерия, водоросли, грибки (грибы, дрожжи, головни, плесень и т.п.), вирусы и протозоа. Предпочтительными являются бактериальные микроорганизмы, такие как, но не ограничиваясь данным перечнем, микроорганизмы, выделенные из почвы, растений, животных, людей и других высших живых организмов, например, кошек, собак, свиней, коров, коз, кроликов, мышей, шимпанзе. В предпочтительном варианте осуществления Core-1-положительный микроорганизм происходит из желудочно-кишечной системы человека.

В соответствии с настоящим изобретением термин "фракция Core-1-положительного микроорганизма" означает препарат или очищенный препарат меньших частей указанных микроорганизмов, например, препарат стенок клетки, препарат оболочки, лизат, препарат липосахарида, препарат капсул, препарат капсул полисахарида или Core-1-положительные компоненты указанного Core-1-положительного микроорганизма. Они должны представлять собой или содержать по меньшей мере один Core-1-положительный компонент указанного Core-1-положительного микроорганизма, чтобы быть в состоянии вызывать требуемую иммунную реакцию. Их можно получать препаратированием или очисткой из по меньшей мере одного Core-1-положительного микроорганизма. Указанные препараты и очищенные препараты можно получать способами, известными специалистам, которые описаны здесь, или такими, как простое или последовательное фракционирование клеток, фенол-водная экстракция, эфирная экстракция, дигерирование лизоцимов или хроматографические приемы. Более того, под фракцией Core-1-положительного микроорганизма также понимается искусственно созданный Core-1-положительный компонент Core-1-положительного микроорганизма в соответствии с изобретением. На фиг. 19 показаны некоторые Core-1-положительные компоненты, т.е. фракции Core-1-положительного микроорганизма (здесь AG6). Эти Core-1-положительные компоненты или фракции Core-1-положительного микроорганизма AG6 можно получить и химическим путем. Core-1-положительный компонент или фракция, содержащая Core-1-положительный компонент, обнаруживаются путем связывания фракции по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом в таких системах, как, например, ELISA или дот-блоттинг, которые известны специалистам. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фракцию, содержащую Core-1-положительный компонент, получают аффинной хроматографией с использованием по меньшей мере одного Core-1-специфичного антитела. В предпочтительном варианте осуществления достаточно одной стадии препаратирования или очистки. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения прибегают к по меньшей мере двум стадиям препаратирования или очистки.

В соответствии с настоящим изобретением термин "Core-1-положительный компонент" означает любой компонент Core-1-положительного микроорганизма, который связывается по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом. Указанный Core-1-положительный компонент содержит по меньшей мере одну углеводную структуру Core-1 или структуру, имитирующую Core-1, которая может выступать в виде природной молекулы, являющейся частью микроорганизма, например, пептид, олигопептид, полипептид, липид, церамид, углевод, липопротеин, полисахарид, олигосахарид, протеогликан или гликопротеин, или части указанной природной молекулы, либо сам по себе. Core-1-положительный компонент можно использовать в соответствии с изобретением как фракцию Core-1-положительного микроорганизма или в сочетании с другими природными или несущими структурами, например, протеинами, липидами, химическими молекулами, как полиакриламидами. Предпочтительно его используют в натуральной форме. Core-1-положительный компонент может содержать одиночную Core-1-положительную углеводную структуру, или имитирующую Core-1 структуру, или повторяющиеся единицы указанных структур, а также дополнительные углеводные структуры или единицы других биомолекулярных структур. Указанная имитирующая Core-1 структура может связываться по меньшей мере одним Core-1-специфичным антителом и/или может вызывать иммунную реакцию на Core-1, предпочтительно гуморальную иммунную реакцию на Core-1, или клеточную иммунную реакцию на Core-1, а более предпочтительно гуморальную и клеточную иммунную реакцию на Core-1.

В соответствии с настоящим изобретением защищенный товарным знаком термин coreotic™ означает нутрицевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую по крайней мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию.

В соответствии с настоящим изобретением термин "Core-1-положительное заболевание" означает любое заболевание, связанное с вирусом, микроорганизмом, эукариотной клеткой, опухолевой клеткой или иным биологическим материалом, которое отличается присутствием антигена Core-1, который распознается и может быть связан по меньшей мере одним из Core-1-специфичных антител, или который связан с органом тела, или присутствует в теле человека или животного, такой как, но не ограничиваясь данным перечнем, клетки, опухолевые клетки, микроорганизмы, вирусы или частицы, отличающиеся наличием антигена Core-1, который распознается и может быть связан по меньшей мере одним из Core-1-специфичных антител.

Термин "лекарственное средство" здесь означает по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм или его фракцию и может также означать другие компоненты или элементы, или предпочтительно носитель фармацевтической композиции, лекарства или медикамента, известного специалистам.

Носитель - это вещество, которое может быть связано с действующим веществом до его введения

здоровому или больному человеку, как правило, с целью улучшения стабильности или биодоступности соединения. Носители для таких композиций, как правило, биосовместимы и могут также быть биоразложимыми. К носителям относятся, например, одновалентные или многовалентные молекулы, например, альбумин сыворотки (человеческой или бычьей), яичный белок, пептиды, полилизин и полисахариды, как аминокислоты и полиамидамины. К носителям также относятся твердые опорные материалы, например, гранулы или микрочастицы, содержащие, например, полилактат полигликолят, сополимер лактида с гликолидом, полиакрилат, латекс, крахмал, целлюлозу или декстран. Носитель может нести соединения разными способами, включая ковалентную связь - прямую или через линкерную группу, нековалентное взаимодействие или механическую смесь.

Создание иммунной реакции на Core-1, как описано здесь, означает в соответствии с изобретением также усиление уже имеющейся иммунной реакции на Core-1.

Без каких бы то ни было ограничений изобретение далее подробно поясняется со ссылкой на ниже следующие примеры.

Обозначения на фигурах

Фиг. 1:

Неукорененное филогенетическое древо на основе однозначно структурированных последовательностей (1248 базовых пар) изолятов AG6, MU1, их ближайших родственников и штамма типа E. Coli, полученных методом Neighbor-Joining (7).

Фиг. 2:

2a: Продукты полимерно-цепной реакции штамма LH E. coli, полученные после амплификации праймером OPL07 - дорожка 1-лестница 1kb; дорожки 2-11- LH штаммы 2-5, 8, 13-16, 18; дорожка 12 - штамм 32 E. coli DSMZ 8697.

2b: Штаммы MU и AG6, полученные после амплификации праймером OPA18 - дорожка 1 - лестница 1kb; дорожки 2-5 - MU штаммы 1, 3-5; дорожка 6 - AB12; дорожка 7 - B. thetaiotaomicron DSMZ 2079; дорожка 8 - B. ovatus DSMZ 1896; дорожка 9 - B. vulgatus DSMZ 14 47; дорожка 10 - B. acidifaciens DSMZ 15896; дорожки 11-13 - AG6.

Фиг. 3:

Анализ ELISA: покрытые бактериальные штаммы AG6, LH2 и MU1 (5×10^6 бактерия/мл) и Core-1 специфичные моноклональные антитела Nemo-TF1, Nemo-TF2 и менее специфичные A68-B/A11 и контрольное антитело A63-B/C2.

Фиг. 3a:

Анализ ELISA: покрытые бактериальные штаммы Helicobacter pylori NCTC 11637, E.coli штамм DSMZ 8697(штамм 32) и Bacteroides ovatus штамм MU1 (каждый при плотности, соответствующей $10 \times OD_{650nm} 0,1$) и моноклональные антитела Nemo-TF1, Nemo-TF2 и A68-BA11 ($OD_{450/630nm}$ минус $OD_{450/630nm}$ контрольного антитела A63-B/C2).

Фиг. 4:

Анализ SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле-додецилсульфате натрия) и вестерн-блоттинг препарата капсулы штамма AG6.

A) краситель альциановый синий полиакриламидного геля-додецилсульфата натрия.

B) Окрашивание DIG-гликаном при вестерн-блоттинге.

C) окрашивание вестерн-блот Nemo-TF2.

Фиг. 5:

Обогащение Core-1-положительного полисахарида обращенно-фазовой хроматографией.

Фиг. 6:

Последовательность повторяющихся единиц Core-1-положительного капсульного полисахарида B. ovatus штамм AG6.

Фиг. 7:

Структура повторяющихся единиц Core-1-положительного капсульного полисахарида B. ovatus AG6 (L-Fuc: L-фукоза, D-Gal: D-галактоза, HexNAc: N-ацетилгексозамин, D-Hex: D-гексоза, OMe: O-метиловая группа).

Фиг. 8:

Структура повторяющихся единиц Core-1-положительного капсульного полисахарида B. ovatus AG6 (L-Fuc: L-фукоза, D-Gal: D-галактоза, HexNAc: N-ацетилгексозамин, D-Hex: D-гексоза, OMe: O-метиловая группа).

Фиг. 9:

Анализ сыворотки мышей в тесте на гуморальную иммунную реакцию 1.

IgM антитела к AGP и обработанную периодной кислотой AGP определяют методом ELISA в сыворотке мышей, иммунизированных PBS (группа L), Core-1-отрицательной бактерией (группа I) и Core-1-положительной бактерией (группа K).

Разбавление сыворотки 1:200, 21-й день.

Фиг. 10:

Сигналы ELISA иммунной сыворотки на конъюгаты углевод-РАА: среднее значение сигналов ELISA от 4 мышей СЗН на конъюгат PAA Gal beta1-3GalNAc альфа1-РАА по сравнению с сигналом ELISA на GlcNAcM-2Galβ1-3GalNAc-альфа-РАА (разбавление сыворотки 1:100).

Фиг. 11 а-е:

Анализ FACS (клеточный сортер с возбуждением флуоресценции) сыворотки мышей, иммунизированных PBS (группа L), Core-1-отрицательной бактерией (группа I) и Core-1-положительной бактерией (группа K) на 21-й день

А) средняя интенсивность флуоресценции при FACS анализе

В) наложение гистограмм (черная - группа L, синяя - группа I, красная - группа K).

Фиг. 11с показывает результаты теста на гуморальную иммунную реакцию 1 с сывороткой мышей, иммунизированных штаммами бактерий *Bacteroides ovatus* MU-1, *E.coli* LH2, *E.coli* AG3, *E.coli* 086 DSMZ 8697=32 (показаны средние значения для 4 мышей на группу).

Фиг. 11d показывает результаты теста на гуморальную иммунную реакцию 2 с сывороткой мышей, иммунизированных штаммами бактерий *Bacteroides ovatus* MU-1, *E.coli* LH2, *E.coli* AG3, *E.coli* 086 DSMZ 8697=32 (показаны средние значения для 4 мышей на группу).

Фиг. 11е показывает результаты теста на гуморальную иммунную реакцию 3 с сывороткой мышей, иммунизированных штаммами бактерий *Bacteroides ovatus* MU-1, *E.coli* LH2, *E.coli* AG3, *E.coli* 086 DSMZ 8697=32 (показаны средние значения для 4 мышей на группу).

Фиг. 12:

Тест на гуморальную иммунную реакцию 1 сыворотки мышей, свободных от патогенных организмов (контрольные мыши и 3 разные мыши, иммунизированные бактериальным штаммом AG6).

Фиг. 13:

Тест на гуморальную иммунную реакцию 1 сыворотки мышей СЗН, орально иммунизированных А) 2×10^{11} (А) или В) 2×10^{10} (группа В) пастеризованными бактериями штамма AG6 ежедневно с 0 по 28-й день. Показаны сигналы ELISA на 21-й день против гликофорина (GP), азиалогликофорина (AGP) и обработанного периодатом AGP (AGP+PJ) от отдельных мышей.

Фиг. 14:

Тест на гуморальную иммунную реакцию 3 сыворотки мышей СЗН, орально иммунизированных пастеризованной Core-1-положительной бактерией (штамм AG6). Сыворотки на 0-й и 28-й день разбавляют 1:300 и анализируют проточной цитометрией на связывание линий клеток NM-wt и NM-D4.

Фиг. 15:

Выработка цитокинов Т-клетками, порожденными лизатами Core1-положительных бактерий (AG6 и MU1) после повторной стимуляции DC, нагруженными лизатами Core1-положительных MN-D4 (DC/D4) или отрицательных NMwt (DC/wt) клеток из линий человеческих опухолевых клеток. Ингибирование выработки цитокинов вследствие предварительной инкубации нагруженных лизатом NM-DC с Core1-специфичным антителом (DC/D4+Ak).

А) Выработка GM-CSF Т-клетками (CIRT 1)

В) Выработка TNF альфа Т-клетками (CIRT 2)

Фиг. 16:

Тест на клеточную иммунную реакцию 2: Результаты анализа ELISpot на выработку IFN-гамма иммунореактивными Т-клетками после повторной стимуляции нагруженными лизатами Core1-положительных MN-D4 (DC/D4) или отрицательных NMwt (DC/wt) клеток из линий человеческих опухолевых клеток, и ингибирование выработки цитокинов вследствие предварительной инкубации нагруженных лизатом NM-DC с Core1-специфичным антителом (DC/D4+Ak).

Фиг. 17:

Тест на клеточную иммунную реакцию 3: Анализ пролиферации Т-клеток (WST) на иммунореактивных клетках (R) после повторной стимуляции нагруженными лизатами Core1-положительных MN-D4 (DC/D4) или отрицательных NMwt (DC/wt) клеток из линий человеческих опухолевых клеток и ингибирование пролиферации вследствие предварительной инкубации нагруженных лизатом NM-DC с Core1-специфичным антителом (DC/D4+Ak).

Фиг. 18:

Тест на клеточную иммунную реакцию 4: Иммунофлуоресцентный анализ mNM-DC, нагруженных Core-1-отрицательными (AG3) или Core-1-положительными (AG6) бактериями, на Core-1-отрицательные (NM-wt) или Core-1-положительные (NM-D4) линии человеческих клеток.

Фиг. 19:

Углеводные структуры Core-1-положительных компонентов L-Fuc: L-фукоза, D-GalNAc: N-ацетилгалактозамин, D-Gal: D-галактозамин, Hex: гексоза, HexNAc: N-ацетилгексозамин, OMe: O-метилирование.

Подобные структуры присутствуют, например, на AG6.

Фиг. 20:

Скрытый и обнаженный антиген Core-1.

Фиг. 21:

На фиг. 21 показаны сигналы ELISA на конъюгат PAA Gal β 1-3 GalNAc a -PAA и конъюгат PAA Gal β 1-3 GlcNAc-a-PAA на 21-й день. Сыворотки считаются положительными, если сигнал от PAA 48 по меньшей мере на 30% сильнее, чем от PAA 43. С учетом этого критерия у 5 (A1, A2, A3, B1 и B5) из 6 мышей развилась Core-1-специфичная гуморальная иммунная реакция.

Фиг. 22:

Таблица 1, в которой избранные Core-1-положительный штаммы, а также штаммы, не являющиеся Core-1-положительными, характеризуются чувствительностью к различным антибиотикам.

Фиг. 23:

Обзор теста на клеточную иммунную реакцию в соответствии с изобретением.

Примеры

Пример 1. Методики и среды анаэробных культур

Используемые при анаэробной культивации бактерий приемы основаны на известных методиках, обзор которых представили Брезнак и Костилов. Среда, приготовленная с цистеином-HCl в качестве восстановителя, помещают в анаэробные культуральные пробирки (фирмы Ochs, Бовенден, Германия) или стеклянные колбы для сывороток, оставая от трети до половины объема свободным пространством для газа, и запечатывают пробками из бутилкаучука. Растворы, приготовленные без восстановителя (например, PBS-a), перед размещением в пробирках кипятят. Перед помещением в автоклав газовую фазу замещают N₂/CO₂ (80/20 об.%). Для этого пробку пробивают шприцем и откачивают пробирку вакуум-насосом (фирмы Vacuubrand, Вертгейм, Германия). После откачки в пробирку, которую в ходе процесса непрерывно встряхивают, закачивают N₂/CO₂ (80/20 об.%). Этот цикл откачки-заполнения повторяют трижды. До помещения в пробирки газовую смесь пропускают над горячим палладиевым катализатором, чтобы удалить остаточные следы кислорода. Индикатором окисления-восстановления служит ресазурин (1 мг л⁻¹).

Среды для посева выливают под колпаком ламинарного течения и хранят в бескислородных условиях по меньшей мере 24 ч до использования. Это делается либо в анаэробных сосудах под давлением (1,5×10⁵ Па) с 3,5 л состава AnaeroGen (фирмы Oxoid, Бейсингсток, Англия), либо при регулярной прокачке смеси N₂/CO₂/H₂ (80/10/10 об.%) через шлюз анаэробной камеры (фирмы Don Whitley Scientific, Шипли, Англия). Манипуляции с образцами осуществляют в анаэробной камере (рабочая станция с переменной атмосферой MACS фирмы Don Whitley Scientific, Шипли, Англия или фирмы Coy Laboratory Products, Грасс-Лейк, США).

Нестерильные растворы и материалы стерилизуют в автоклаве (121°C, 1,2×10⁵ Па, 15 мин). Нестойкие к высоким температурам соединения получают в виде концентрированных основных растворов в деминерализованной воде, пропускают через стерильный фильтр (0,22 мкм, смешанный целлюлозный эфир, фирмы Roth, Карлсруэ, Германия) и добавляют к средам в необходимых концентрациях.

Пример 2. Аффинное обогащение Core-1-положительных микроорганизмов

2.1 Приготовление покрытых TF1 и TF2 гранул Dynabeads®

По 100 мкл гранул Dynabeads® (M-450 крысиный антимышиный IgM, фирмы DYNAL Biotech ASA, Осло, Норвегия) помещают в 2 мл пробирки Safe-Lock Eppendorf (фирмы Eppendorf, Гамбург, Германия), дважды промывают 2 мл забуференного фосфатом физраствора (PBS-a: 8,1 г л⁻¹ NaCl, 0,16 г л⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 0,98 г л⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 1 г л⁻¹ BSA, pH 7,4) с помощью концентратора магнитных частиц Dynal Magnetic Particle Concentrator®-S (MPC®-S, фирмы DYNAL Biotech, Осло, Норвегия) и суспендируют в 25 мкл PBS-a. Лиофилизованные супернатанты культур клеток TF1 или TF2 растворяют в 1 мл деминерализованной воды сорта для анализов (фирмы Millipore, Биллерика, Массачусетс, США). Растворенные супернатанты культур клеток TF1 или TF2 Т (1 мл) добавляют в пробирки с Dynabeads® и инкубируют 30 мин при 4°C на ротаторе пробирок (модель 34528, фирмы Snijders Scientific, Нидерланды). Пробирки помещают в MPC®-S, оставляют на 3 мин, затем отбирают жидкость пипеткой. Dynabeads® повторно суспендируют в 2 мл PBS-a, помещают в MPC®-S и отбирают жидкость пипеткой. Эту стадию промывки повторяют трижды. Промытые Dynabeads® суспендируют в их исходном объеме 100 мкл PBS-a. Dynabeads®, подготовленные таким способом, используют немедленно или в течение двух недель после повторной трехкратной промывки 2 мл PBS-a.

2.2 Сбор и обработка образцов фекалий для обогащения Dynabeads®

Образцы фекалий от восьми добровольцев (табл. 3) собирают в перфорированные пластиковые пробирки, выдерживают в бескислородных условиях с помощью состава AnaeroGen Compact (фирмы Oxoid, Бейсингсток, Англия) и хранят при 4°C не более 4 ч до обработки. В добровольцы принимают здоровых взрослых людей, которые не принимали антибиотиков в течение по меньшей мере 3 месяцев до сдачи образцов и питались обычной пищей.

Таблица 3. Индивидуальные параметры на момент сдачи образцов фекалий

Номер субъекта	Возраст	Пол
1-GH	24	жен.
2-RM	26	жен.
3-TC	25	муж.
4-AG	27	жен.
5-AB	37	жен.
6-MU	36	жен.
7-LH	24	жен.
8-CA	50	муж.

Десятикратное (по массе) разбавление фекальных образцов выполняют в PBS-b (PBS-b: 8,5 г л⁻¹ NaCl, 0,3 г л⁻¹ КН₂РO₄, 0,6 г л⁻¹ Na₂НРO₄, рН 7,0 с содержанием 0,1 г л⁻¹ пептона и 0,25 г л⁻¹ цистеина·НCl). Добавляют шесть стерильных стеклянных шариков диаметром 3 мм и гомогенизируют разбавленные образцы в медленном вихре. Гомогенизированные образцы центрифугируют (300×g, 1 мин, 21°C) для осаждения осколков. Порцию в 200 мкл полученного супернатанта добавляют к 1,8 мл PBS-b, добиваясь примерно 100-кратного разбавления исходных образцов фекалий. Их промывают один раз 2 мл PBS-b (8000×g, 5 мин, 21°C) и суспендируют гранулки в 2 мл PBS-b.

2.3 Методика обогащения Dynabeads®

20 мкл материала после 100-кратного разбавления добавляют в 2 мл пробирку, содержащую 180 мкл PBS-a и 5 мкл покрытых антителами TF1 или TF2 Dynabeads®. Пробирки инкубируют 30 мин при 4°C на ротаторе пробирок. Пробирки помещают в MPC®-S, дают постоять 3 мин, а затем удаляют как можно больше супернатанта отсосом через шприц. Образцы трижды промывают 2 мл PBS-a, опять-таки отбирая как можно больше супернатанта.

2.4 Посев на селективных и неселективных средах

Промытые образцы суспендируют в 1 мл PBS-b, порциями по 100 мкл высевают на различных селективных и неселективных средах (табл. 4) и инкубируют 48 ч при 37°C в анаэробной камере.

Таблица 4. Среда, используемые для посева

Среда	Изготовитель	Селективна к	Сокращение
de Man, Rogosa and Sharpe	Merck, Дармштадт, Германия	Лактобациллы, молочнокислые бактерии	MRS
Селективная среда Bifidus	Fluka, Санкт-Галлен, Швейцария	бифидобактерии	BSM
K-F Streptococcus agar	Oxoid	стрептококки	KF
Питательный agar	Oxoid	неселективная	N
Schaedler анаэробный agar	Oxoid	неселективная	S
Wilkins Chalgren анаэробный agar	Oxoid	неселективная	WC
Brain Heart инфузионный agar	Biomérieux, Марси л'Этуаль, Франция	неселективная	BHI
Columbia Agar с 5% овечьей крови	Biomérieux	неселективная	CBA
Штамм агара		неселективная	ST

Твердые среды готовят по указаниям производителей. Состав ST агар следующий: 1 г л⁻¹ пептона протеозы, 9 г л⁻¹ пептона из мяса, 3 г л⁻¹ NaCl, 2 г л⁻¹ Na₂НРO₄·2Н₂O, 3 г л⁻¹ мясного экстракта, 4 г л⁻¹ дрожжевого экстракта, 6 г л⁻¹ D (+)-глюкозы, 0,5 мл л⁻¹ Tween 80, 0,25 г л⁻¹ цистеина·НCl, 1 мг л⁻¹ ресазурина, 0,1 г л⁻¹ MgSO₄·7Н₂O, 5 мг л⁻¹ FeSO₄·7Н₂O, 0,5 г л⁻¹, 3,4 мг л⁻¹ MnSO₄·2Н₂O, 1,5 г л⁻¹ бактериологического агара, рН 7,0.

Для субъектов 1-4 колонии с одной процедуры обогащения отбирались для скрининга на основе ELISA. Для субъектов 5-8 процедура обогащения Dynabeads® повторялась дважды следующим образом: после 48 ч инкубации колонии соскребают с планшетов, суспендируют в PBS-b в пределах 3-5 единиц мутности по шкале Макфарленда (готовят как в (13)). Как и ранее, порции по 20 мкл этой суспензии добавляют к 180 мкл PBS-a. Операции обогащения и посева повторяют три раза, как описано выше.

Образцы фекалий от четырех других субъектов (5 AB, 6 MU, 7 LH и 8 CA) обогащают Core-1-положительными бактериями. В данном случае обогащение проводят в целом три раза, т.е. колонии, полученные после первоначального выделения, соскребают с планшетов и снова обогащают. Таким обра-

зом получают 60 новых изолятов.

Пример 3. Идентификация изолятов

3.1 Биохимическая

Бактерии идентифицируют в системе VITEK (фирмы Biomerieux, Марси л'Этуаль, Франция). Бактерии готовят согласно инструкциям изготовителя, пользуясь такими идентификационными картами: карты ANI для анаэробных изолятов и факультативно для анаэробных грам-положительных палочек, способных к росту в бульоне MRS (подозреваемые лактобациллы), карты GPI - для грам-положительных изолятов и карты GNI+ для грам-негативных аэробных изолятов.

Биохимические характеристики изолятов, полученных в системе VITEK (фирмы Biomerieux, Марси л'Этуаль, Франция), сведены в табл. 5. Анаэробные изоляты AG6, MU (1, 3-5) и AB12 все относятся к группе *Bacteroides fragilis*, тогда как аэробные изоляты принадлежат к семейству Enterobacteriaceae; те и другие грам-негативны.

Таблица 5. Идентификация выделенных штаммов по биохимическим характеристикам (VITEK)

Штамм	Идентификация	Вероятность
AG6	<i>Bacteroides ovatus</i>	82-95%
MU (1, 3-5)		
AB12		
AG3	<i>Escherichia coli</i>	89-99%
LN (2-5, 8, 13-16, 18)		

3.2 Молекулярная (секвенирование)

ДНК извлекают с помощью геномного набора ДНК Invisorb III (фирмы Invitrogen, Берлин, Германия) согласно инструкциям изготовителя по протоколу III B, причем промытые гранулы клеток получены от жидких культур, суспендированных в 1 мл лизисного буфера D. Праймеры 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) и 1492g

(5' TAC CTT GTT ACG ACT T) (10) служат для амплификации бактериального 16S рибосомного гена рНК.

Каждую PCR (полимеразную цепную реакцию) выполняют трижды, и реакционная смесь содержит (50 мкл): 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, по 0,25 mM каждого dNTP, по 1 мкМ каждого праймера, 2,5 единицы Taq ДНК-полимеразы (фирмы Invitrogen, Карлсруэ, Германия) и 1 мкл матричной ДНК. Программа PCR следующая: 94°C на 5 мин, 30 циклов с 94°C по 1 мин, 55°C на 1 мин, 72°C на 1 мин и, наконец, 72°C на 10 мин. Продукты PCR очищают набором для высокой степени очистки продуктов PCR (фирмы Roche, Индианаполис, США) согласно инструкции изготовителя. Продукты анализируют электрофорезом на 1% (мас.) агарозном геле в буфере Tris-Acetate-EDTA (4,84 г л⁻¹ Tris, 1,142 мл л⁻¹ ледяной уксусной кислоты, 0,372 г л⁻¹ EDTA, pH 8,0). Концентрацию ДНК оценивают с помощью лестницы масс для низкого содержания ДНК (фирмы Invitrogen, Карлсбад, США).

Для секвенирования используют либо праймер 27f, 338f (5' GCTGCCCTCCCGTAGGAGT) (2), 338 g (5' ACTCCTACGGGAGGCAGC), 968f (5' AACGCGAAGAACCCTTAC) (14), либо 1492g. Реакции секвенирования выполняют с помощью терминаторного набора цикла секвенирования DYEnamic™ ET (фирмы Amersham Biosciences, Литл-Чалфонт, Англия) согласно инструкции изготовителя. Продукты секвенирования анализируют системой MegaBACE 1000 (фирмы Molecular Dynamics, Саннивейл, США). Последовательности собирают и подгоняют вручную с помощью функции ContigExpress прибора Vector NTI Suite 9.0.0 (фирмы Invitrogen, Карлсбад, США). Затем их совмещают с близкородственными последовательностями (не менее 92% совпадений), полученными от функции BLAST Национального центра биотехнологии (NCBI) (1). Процент подобия рассчитывают от однозначных последовательностей с помощью функции Матрица идентичности последовательностей программы Bioedit, версия 5.0.9, или функции Матрица подобия версии 1.1 проекта База данных рибосом. Результаты секвенирования подтверждают сравнением с последовательностями, полученными от службы секвенирования генов 16S rRNA (AMODIA, Брауншвейг, Германия).

Идентичности изолятов приведены в табл. 6, а неукорененное филогенетическое древо на основе последовательностей изолятов AG6, MU1, их ближайших родственников и штамма типа E. Coli ATCC 11755, показано на фиг. 1.

Таблица 6. Идентификация выделенных штаммов на основе однозначных последовательностей генов 16S rRNA с помощью функции Матрица подобия версии 1.1 проекта База данных рибосом (5)

Штамм	Идентификация	Подобие (%)	штамму	Код доступа
AG6	<i>Bacteroides ovatus</i>	98,2	ATCC 8483T	X83952
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	97,1	ATCC 29148T	L16489
MU1	<i>Bacteroides ovatus</i>	98,0	ATCC 8483T	X83952
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	97,1	ATCC 29148T	L16489
AG3	<i>Escherichia coli</i>	99,5	k12 MG1655	AE000460
GH1	<i>Lactobacillus paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	99,4	JCM 8130T	D79212
	<i>L. paracasei</i> sp. <i>tolerans</i>	99,4	JCM 1171T	D16550
96	<i>Staphylococcus warneri</i>	99,2	ATCC 27836T	L37603
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99,0	ATCC 51129T	AF041361
TC7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,6	JCM 1136T	D16552
	<i>Lactobacillus zeae</i>	98,7	ATCC 15820	D86516

3.3 Произвольно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD)

Некоторые Core-1-положительные изоляты, полученные при многократном обогащении Dynabead®, оказываются весьма сходными по морфологии клеток и колоний, несмотря на происхождение из разных источников. Штаммы также очень похожи по биологическому профилю, полученному в системе VITEK. Встает вопрос, являются ли выделенные бактерии идентичными штаммами. Метод RAPD не требует информации о последовательностях, чтобы различать штаммы. Вкратце, всю геномную ДНК подвергают PCR-амплификации праймером из 10 базовых пар при низком напряжении, так что произвольные последовательности ДНК амплифицируются на основе гомологичных праймеру последовательностей, имеющих в целевой ДНК. Полученные в результате PCR продукты можно разделить электрофорезом в агарозном геле и сравнить полученную картину между штаммами. Полученные картины исчерченности для всех штаммов LH оказываются аналогичными для пяти использованных праймеров RAPD (OPL07, M13, OPX14, OPA16, OPA18). Они резко отличаются от штамма *E. coli* DSMZ 8697 (фиг. 2a), известного активностью по отношению к группе крови В. Штаммы MU также выглядят очень похоже (фиг. 2b); однако их картины исчерченности резко отличаются от остальных штаммов *Bacteroides*, включая AG6. Похоже на то, что этот Core-1-положительный штамм многократно обогащается от каждого положительного донора в процессе выделения. Выделенные штаммы у разных индивидуумов не совпадают.

Пример 4. Рост и фиксация бактерий для скрининга на основе ELISA

Четко разделенные колонии произвольно снимают с селективных и неселективных агаровых планшетов и трижды повторно высевают штрихом на неселективные среды. Одиночные колонии отбирают и инокулируют в бульон ST (как описано выше, без агара), WC или MRS в зависимости от того, где лучше рост, и выращивают ночь при 37°C. Эти культуры инокулируют (1%) в 300 мл свежего бульона ST, WC или MRS и выращивают ночь при 37°C. Клетки превращают в дебрис (8000×g, 15 мин, 4°C) и повторно суспендируют в 10 мл PBS-с (8 г л⁻¹ NaCl, 0,2 г л⁻¹ KCl, 1,44 г л⁻¹ Na₂HPO₄, 0,24 г л⁻¹ KH₂PO₄) (12). Эту суспензию фиксируют 3-4 ч при 4°C добавлением 30 мл 4% раствора параформальдегида (PFA) (приготовленного согласно (8)) в PBS-с. Затем образцы промывают 40 мл PBS-с (8000×g, 15 мин, 4°C) и дебрис суспендируют в 15 мл PBS-с, далее добавляют равный объем 96% ледяного этанола. Образцы хранят при -20°C до анализа.

Чистоту культур проверяют сравнением морфологии клеток и картиной грам-окрашивания. Культуры аэробно высевают на СВА для определения их способности к росту в присутствии кислорода и для проверки на отсутствие аэробных загрязнений.

Пример 5. Хранение изолятов

Криоматериалы хранят в пробирках Microbank (фирмы MAST Diagnostica, Рейнфельд, Германия) согласно инструкции изготовителя при -80°C. Рабочие материалы выдерживают в бульонах WC, ST или MRS. Их субкультивируют каждые 14 дней. Чистоту культур проверяют наблюдением грам-окрашивания, морфологии клеток и периодически сравнивают морфологии колоний на штрих-планшетах СВА как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Пример 6. Рост, фиксация и лиофилизация бактерий для опытов на животных

Для использования в опытах на животных бактерии выращивают и фиксируют, как в разделе 3, со следующими изменениями: объем исходной культуры доводят до примерно 4 л. Перед фиксацией бакте-

рии промывают один раз 100 мл PBS-b (8000×g, 15 мин, 4°C) и повторно суспендируют в как можно меньшем объеме PBS-b. Эту суспензию делят на две равные части - одну для фиксации (7.1), другую для лиофилизации (7.2).

6.1 Фиксация

Часть, предназначенную для фиксации, промывают (8000×g, 15 мин, 4°C) и повторно суспендируют в 30 мл PBS-с. Эту суспензию добавляют к 90 мл 4% раствора PFA в PBS-с и фиксируют 3-4 ч при 4°C. Для удаления PFA образцы промывают трижды 120 мл PBS-с (8000×g, 15 мин, 4°C). Дебрис клеток суспендируют в 45 мл PBS-с, далее добавляют равный объем 96% ледяного этанола. Образцы хранят при -20°C.

Перед введением животным фиксированные бактерии лиофилизируют в стерильных условиях в пробирках Lid_{vac} (фирмы Eppendorf, Гамбург, Германия) для испарения этанола. Чтобы гарантировать целостность фиксированных бактерий, их инокулируют (1%) в бульон WC, высевая на СВА и контролируют отсутствие роста в течение 1 недели.

6.2 Пастеризация

Бактериальные суспензии дважды промывают PBS и повторно суспендируют в малом объеме PBS. Бактериальные суспензии инкубируют при 72°C 30 мин. Для контроля успешности инактивации бактерий инкубируют в соответствующей культурной среде, как описано в примере 4.

6.3 Лيوфилизация

Часть, предназначенную для лиофилизации, добавляют к равному объему 24% стерильно профильтрованного раствора сахарозы и разливают порциями по 300 мкл в 2 мл пробирки Lid_{vac}. Эти порции замораживают в жидком азоте на 1 ч и лиофилизируют (Альфа 2-4 фирмы Christ, Остероде, Германия), поместив их в предварительно охлажденные до -80°C держатели. После лиофилизации пробирки запечатывают и хранят при 4°C с помощью мини-газогенераторной системы Anaerocult® С (фирмы Merck, Дармштадт, Германия) с добавлением в качестве десикканта силикагель-оранжа (фирма Roth, Карлсруэ, Германия).

6.4 Подсчет бактериальных препаратов

Общее количество клеток фиксированных и лиофилизованных препаратов бактерий определяют в камере Тома глубиной 0,01 мм (фирмы LO-Laboroptik, Фридрихсдорф, Германия). Для лиофилизованных бактерий число колониеобразующих единиц (КОЕ) определяют высеванием 10-кратных последовательных разбавлений выращиваемых за ночь культур на WC агар и немедленно до и после лиофилизации. Для этого лиофилят растворяют в 300 мкл бульона WC, дают постоять 15 мин, повторно суспендируют в медленном вихре и последовательно разбавляют. КОЕ лиофилизованных препаратов подчитывают до и после использования в опытах на животных, чтобы гарантировать чистоту. Чистоту препаратов определяют, как описано в разделе 4.

Пример 7. Образцы сыворотки

Кровь собирают системой S-monvette (фирмы Sarstedt, Нюмбрехт, Германия), сыворотку готовят согласно инструкциям изготовителя. Образцы сыворотки до анализа хранят порциями при -80°C.

Пример 8. Извлечение фекального IgA

Образцы фекалий собирают и хранят при -80°C. Фекалии лиофилизируют и отмечают чистый сухой вес. Все манипуляции проводят на льду. Фекальный IgA извлекают по Гревалою (6) с некоторыми модификациями. Лيوфилизованные образцы (~30 мг) суспендируют в отношении 15 мкл/мг сухого веса в буферном растворе для экстракции IgA (модифицированный по Дульбекко PBS (фирмы Biochrom, Берлин, Германия) с 1 г л⁻¹ BSA (альбумина бычьей сыворотки) с ингибиторами протеазы (5 мкг мл⁻¹ леупетина (Calbiochem фирмы Merck), 48 мкг мл⁻¹ 4-(2-аминэтил)бензолсульфонилфторида (Merck), 1 мкг мл⁻¹ апротинина, 2 мкг мл⁻¹ бестатина (фирмы Sigma, Штейнгейм, Германия) и гомогенизируют. Образцы перемешивают в вихре каждые 10 мин. После 1 ч инкубации образцы центрифугируют (16000×g, 10 мин, 4°C) и супернатант собирают в новую пробирку. Остаточный дебрис суспендируют в отношении 10 мкл/мг сухого веса в буфере для экстракции IgA и гомогенизируют. Экстракцию повторяют, полученный супернатант соединяют с полученным при первой экстракции. Эти супернатанты центрифугируют (16000×g, 10 мин, 4°C) и разливают в новые пробирки, замораживают в жидком азоте и хранят до анализа при -80°C.

Пример 9. Скрининг бактериальных штаммов твердофазным иммуноферментным анализом

Фиксированные бактерии разбавляют PBS, количество клеток устанавливают на уровне, 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 или 5×10^8 клеток/мл.

50 мкл бактериального раствора размещают по лункам 96-луночного микротитровального планшета на ночь при 37°C. Планшеты трижды промывают PBS с 0,02% Tween 20 (такую промывку повторяют после каждого этапа инкубации.). Планшеты блокируют PBS с 2% BSA, планшеты для ELISA инкубируют супернатантами гибридомной культуры, содержащими различными распознающими Coe-1 моноклональными антителами (Nemod-TF1, Nemod-TF2 или менее специфичные A68/BA11) или контрольные антитела (A63-B/C2) с разной степенью разбавления. Вторичным антителом служит конъюгированный с пероксидазой поликлональный козий антимишинный иммуноглобулин (Dako P0260). Субстратом при

анализе служит TMB, реакцию останавливают добавлением 2,5 N H₂SO₄ и измеряют ее затухание на волне 450/630 нм. Для определения чувствительности связывания антителом к обработке периодатом покрытые планшеты ELISA инкубируют с периодатом натрия до инкубации с антителами. Затем планшеты промывают натрийацетатным буфером (50мМ, рН 4,5) 5 мин и инкубируют с периодатом натрия в натрийацетатном буфере 1 ч в темноте. Планшеты промывают натрийацетатным буфером (5 мин) и останавливают реакцию добавлением раствора 50 мМ борогидрида натрия в PBS (30 мин).

Примеры таких результатов ELISA показаны на фиг. 3 и 3а.

Пример 10. Приготовление Core-1-содержащих компонентов бактерий

10.1. Анализ сырых капсульных препаратов методами SDS-PA6E и вестерн-блоттинг

Сырые капсульные препараты штамма AG6 готовят по методике Pantosti et al. (1991, *Infect. Immun.* 59, 2075-2082).

Капсульные препараты анализируют методом SDS-PAGE, полисахарид в препарате обнаруживают с помощью красителя альциановый синий по методике Karlyshev et al. (2001, *J. Clin. Microbiol.* 39, 279-284), которые показывают различные углеводсодержащие полосы и большую долю высокомолекулярных углеводов в препарате (фиг. 4А). После вестерн-блоттинга полисахариды обнаруживают с помощью детекторного набора DIG-Glycan (фирмы LaRoche Diagnostics), который показывает мощные полосы на 37 и 26 кДа (фиг. 4В). При вестерн-блоттинге Core-1-содержащие полисахариды обнаруживают с помощью Core-1-специфичного антитела NEMOD-TF2 (супернатант культуры) с Core-1-положительной полосой на 37 кДа (фиг. 4С).

10.2. Хроматографическое обогащение Core-1-положительных полисахаридов

Капсульный препарат штамма AG6 еще загрязнен липополисахаридами, как показывает измеренное содержание KDO 11,2 пмоль/мкг по Naga et al. 1989, *Anal. Biochem.* 179, 162-166) и методом SDS-PAGE.

Поэтому капсульные полисахариды и липополисахариды разделяют обращенно-фазовой хроматографией на колонке C18 с пропанол-метанольным градиентом (см. фиг. 5) по Hashimoto et al. (2001, *Eur. J. Biochem.* 268, 3139-3144). Полисахариды элюируют градиентом элюента В (72% пропанол/8% метанол в 0,1М ацетате аммония, рН 4,5). Внутри фракций полисахариды обнаруживают дот-блоттингом и с помощью набора DIG-Glycan-Kit. Core-1 обнаруживают Core-1-специфичными антителами NemoD-TF1 и NemoD-TF2. Полисахариды элюируют при концентрациях пропанола 14-19% и 25-43%. Core-1-специфичный углевод обнаруживается только при 29-29,4% пропанола (RP1) и 39-42% пропанола (RP2); на фиг. 5 показано сильное обогащение Core-1-положительного полисахарида по этой методике.

Core-1-положительные фракции используют для дополнительных хроматографических разделений мягким кислым гидролизом с последующей DEAE-хроматографией, где применяется градиент 0-0,5М NaCl согласно Tzianabos et al. (1992, *J. Biol. Chem.* 267, 18230-18235). По этой методике Core-1-положительные полисахариды разделяют на три фракции, которые элюируют при 0 М NaCl (D1), 0,04 М NaCl (D2) и 0,9-0,17 М NaCl (D3), что ведет к дальнейшему обогащению Core-1-положительных полисахаридов.

В способе по изобретению капсульные полисахариды *V. ovatus* AG6 очищают и структуру анализируют масс-спектрометрией. Предпочтительно капсульные полисахариды *V. ovatus* AG6 аккумулируют фенол-водной экстракцией, как описано Pantosti et al. 1991. После этого Core-1-положительный полисахарид аккумулируют из сырого капсульного препарата (CPS) обращенно-фазовой хроматографией (C18 Synergi 4 Fusion-RP 80i, 250 мм × 10мм, фирмы Phenomenex). Содержание моносахарида в экстракте сырых капсульных полисахаридов и в очищенном Core-1-положительном полисахариде определяют методом НРАЕС-PAD (анионообменная хроматография с высоким рН-импульсный амперометрический анализ). Наконец, структуру Core-1-положительного капсульного полисахарида анализируют масс-спектрометрией.

10.3 Анализ моносахаридов в экстракте сырого капсульного препарата и в очищенном капсульном экстракте *V. ovatus* A66

На первой стадии Core-1-положительный полисахарид экстракта сырого капсульного препарата *V. ovatus* AG6 аккумулируют обращенно-фазовой хроматографией, как описано выше. После этого очищенный продукт и содержание моносахаридов в аккумулированном Core-1-положительном полисахариде определяют методом НРАЕС-PAD.

До начала анализа на моносахариды экстракты полисахарида полностью гидролизуют 2 N трифторуксусной кислотой (TFA) при 100 °С 4 часа. В ходе гидролиза TFA ацетильные группы теряются. Поэтому моносахариды глюкозамин и галактозамин (GlcNH₂ и GalNH₂) нельзя различить от N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина (GlcNAc и GalNAc). Моносахариды разделяют анионообменной хроматографией с высоким рН и детектируют импульсной амперометрией, как описано выше. Для идентификации моносахаридов и определения их концентраций используют внешние и внутренние стандарты моносахаридов.

Содержание моносахаридов в сыром экстракте CPS, определенное сравнением LPS и CPS (см. выше), заметно отличается от содержания моносахаридов в сыром экстракте CPS, определенном при этом сравнении. Оба сырых экстракта CPS приготовлены из разных культур *V. ovatus* AG6, чем и объясняется указанное расхождение в концентрациях моносахаридов.

Выход Core-1-положительных полисахаридов, аккумулированных обращенно-фазовой хроматографией, составляет 30%. Сравнение содержания моносахаридов в сыром и очищенном капсульных экстрактах показывает повышенное содержание фукозы, GalNAc/GalNH₂, галактозы и глюкозы, хотя глюкоза может быть примесью (табл. 7). Содержание рамнозы, GlcNH₂/GlcNAc и маннозы можно уменьшить обращенно-фазовой хроматографией (табл. 7). Галактуроновая и глюкуроновая кислоты, характерные компоненты капсульных полисахаридов, в очищенном экстракте Core-1-положительных полисахаридов не обнаруживаются. Это может свидетельствовать о том, что *V. ovatus* AG6 может содержать более одного капсульного полисахарида. Разделить оба капсульных полисахарида можно обращенно-фазовой хроматографией, Tzianabos et al. (1992) также отмечают, что капсула *V. fragilis* состоит из двух разных полисахаридов.

Таблица 7. Содержание моносахаридов в сыром экстракте капсульного полисахарида (CPS) и в экстракте Core-1-положительного полисахарида, очищенном обращенно-фазовой хроматографией.

Содержание моносахаридов дано по отношению к суммарному количеству моносахаридов

Моносахариды	Сырой экстракт CPS (%)	Очищенный экстракт CPS (%)
Фукоза	9,5	11,4
Рамноза	17,7	3,1
GalNH ₂ /GalNAc	5,2	14,9
GlcNH ₂ /GlcNAc	14	3,5
Галактоза	4,6	6,9
Глюкоза	44,2	50
Манноза	18,2	6,9
Галактуроновая кислота	10	0
Глюкуроновая кислота	0,5	0
Не определены	3	2

Аккумуляция фукозы, GalNH₂/GalNAc и галактозы может указывать на то, что эти моносахариды являются компонентами повторяющихся единиц Core-1-положительного полисахарида, а сильно восстановленные моносахариды оказываются просто незначительными примесями.

10.4 Анализ структуры Core-1-положительного полисахарида масс-спектрометрией

Структуру Core-1-положительного полисахарида анализируют лазерной матричной времяпроточной масс-спектрометрией (MALDI-TOF-MS), как описано выше, и электрораспылительной масс-спектрометрией с ионной ловушкой (ESI-Ion-Trap-MS).

Для ESI масс-спектрометрии с ионной ловушкой аккумулированный Core-1-положительный полисахарид фрагментируют либо гидролизом 1% уксусной кислотой (1,5 ч при 100°C), либо ферментным дигерированием хондроитиназой ABC (расщепление полосы бета-1-4GalNAc/GlcNAc) или бета-1-3-галактозидазой. Более того, имеет место двойное расщепление хондроитиназой ABC/альфа-1-3,4-фукозидазой или 1% уксусной кислотой/бета-1-3-галактозидазой (все ферменты получены от Glyco GmbH). Все дигерированные ферментами препараты инкубируют за ночь при 37°C. Масс-спектрометрические анализы (MS, а также MS/MS) проводят в положительном и отрицательном режимах. До выполнения анализов все образцы обессоливают Carbograph SPE (фирмы Aaltech Associates Inc.) согласно инструкции изготовителя и разбавляют в 2,5 mM NH₃/ 40% ацетонитрила.

Структуру Core-1-положительных гликановых фрагментов, уже идентифицированных анализом MALDI-MS, можно подтвердить определением ESI масс-спектрометрией с ионной ловушкой. Дополнительные фрагменты также можно исследовать ESI масс-спектрометрией с ионной ловушкой (табл. 8).

Таблица 8. Анализ структур ESI масс-спектрометрией с ионной ловушкой (положительный режим). Очищенный Core-1-положительный полисахарид фрагментирован гидролизом 1% уксусной кислотой 1,5 ч при 100°C.

MS		MS/MS	
Определенные массы (M+H ⁺ /M+NH ₄ ⁺)	Установленная последовательность	Определенные массы (M+Na ⁺)	Установленная последовательность
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		

HexNAc: N-ацетогексозамин, Hex: гексоза, desHex: дезоксигексоза, M: метильная группа

Последовательность повторяющихся единиц Core-1-положительного капсульного полисахарида определяют взаимоналожением фрагментов (фиг. 6).

Масс-спектрометрический анализ Core-1-положительных полисахаридов, дигерированных ферментами, указывает на гликозидные разделительные полосы между моносахаридами. Более того, можно идентифицировать галактозу (успешное расщепление бета1-3-галактозидазой) и фукозу (успешное расщепление альфа1-3,4-фукозидазой) (фиг. 7).

Этот результат согласуется с вышеописанными анализами, которые установили аккумуляцию фукозы, галактозы и GalNAc.

10.5 Подтверждение структуры Core-1 как ответвляющегося дисахарида повторяющейся единицы капсульного полисахарида

Ответвляющаяся Core-1-структура, Gal-бета1-3GalNAc, в повторяющейся единице идентифицируется двойным дигерированием с экзогликозидазами бета-1-3-галактозидазой и HexNAcазой (расщепление бета-1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc) с последующим анализом на моносахариды, как описано выше.

Два образца, содержащие равные количества Core-1-положительного полисахарида, фильтруют для удаления свободных моносахаридов. Затем один из образцов дигерируют с бета-1-3-галактозидазой при 37°C всю ночь. Оба образца снова фильтруют для удаления свободной галактозы из дигерированного образца, тогда как недигерированный образец служит отрицательным контролем. Затем оба фильтра отбирают и дигерируют с HexNAcазой. Наконец, оба образца вновь фильтруют. Все элюаты анализируют методом НРАЕС-PAD.

Чтобы проверить, действительно ли Core-1-структура была удалена двойным дигерированием, но уцелела при дигерировании HexNAcазой (отрицательный контроль), фильтраты анализируют дот-блоттингом с помощью детекторного набора DIG-Glykan (фирмы Roche Diagnostics) для обнаружения полисахаридов и Core-1-специфичного антитела Nemo-TF1, идентифицирующих структуру Core-1.

В обоих элюатах дважды дигерированного образца анализом на моносахариды можно обнаружить галактозу (первый элюат) и GalNAc (второй элюат). В контрольном элюате, который дигерировался только экзогликозидазой HexNAcазой, не обнаруживаются ни галактоза, ни GalNAc. Это убедительное доказательство ответвленной Core-1-структуры Gal-бета1-3GalNAc.

Дот-блоттингом дважды дигерированного элюата и дигерированного только HexNAcазой образца с использованием детекторного набора DIG-Glykan установлены концентрации полисахарида, сходные с полученными на нитроцеллюлозной мембране. Core-1-структура больше не обнаруживается в дважды дигерированном образце, тогда как в образце, дигерированном HexNAcазой, структура Core-1 еще выявляется иммуноблоттингом с использованием антитела Nemo-TF1.

10.6 Подтверждение структуры Core-1-положительного полисахарида анализом его отделенных фрагментов

Для дальнейшего подтверждения Core-1-положительной полисахаридной структуры гликан фрагментируют гидролизом 1% уксусной кислотой (1,5 ч при 100°C). Фрагменты гликана метят фторофор-2-аминобензамидом (2-AB), как описано у J.C. Bigge et al. (1995). С этой целью образцы освобождают от частиц и обессоливают путем очистки в колонке Carbohydrate SPE (фирмы Alltech Associates Inc.) и лиофилизируют. Дебрис растворяют в 5 мл 2-AB в растворе DMSO/ледяной уксусной кислоты/цианоборогидрида натрия и инкубируют 2 ч при 60°C. Меченые 2-AB фрагменты отделяют от свободного 2-AB бумажной хроматографией. Наконец, конъюгированные с 2-AB фрагменты элюируют водой. После лиофилизации дебрис растворяют в 50% ацетонитриле. Исходя из размера, фрагменты разде-

ляют нормальнофазной жидкостной хроматографией (колонка: Luna 3 μ . NH₂ A100, Phenomenex, элюент А: 15 мМ NH₄-ацетат, элюент В: ацетонитрил) с обнаружением флуоресценции. Последовательность фрагментов анализируют ESI масс-спектрометрией. Наконец, для подтверждения гликозидных связей и уточненной идентификации моносахаридов в составе фрагментов олигосахариды дигерируют с экзогликозидазой бета-1-3-галактозидазой, альфа-1-3,4-фукозидазой и HexNAcазой, как описано выше. Успешность дигерирования контролируют ESI масс-спектрометрией, а удаление остаточных моносахаридов проверяют НРАЕС-РАD, как описано выше.

Уже идентифицированную структуру повторяющихся единиц Core-1-положительного полисахарида проверяют обоими методами, получая ожидаемые фрагменты олигосахаридов и расщепленных моносахаридов (табл. 9).

Таблица 9

Фрагменты олигосахаридов	Экзогликозидаза	Анализ ESI-MS	Анализ на моносахариды
HexNAc-Hex	бета1-3 галактозидаза	HexNAc Hex HexNAc-Hex	GalNAc/GalNH ₂ галактоза
DesHex-desHex-desHexM	альфа1-3,4 фукозидаза	desHexM DesHex- desHexM DesHex- desHex	фукоза
DesHex-desHex	альфа1-3,4 фукозидаза	desHex	фукоза
DesHex-desHexM-HexNAcM-HexNAc	HexNAcаза (альфа1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc)	HexNAc DesHex- desHexM- HexNAc	Не определен

В заключение структуру повторяющихся единиц Core-1-положительного капсульного полисахарида (фиг. 8) подтверждают несколькими методами анализа.

Более того, результатами установлено (см. также фиг. 19, особенно № 5), что гликозидное сцепление между Gal-GalNAc и ядром молекулы GalNAc является альфа-аномерным. Это подтверждается дот-блоттингом с mAb TF1, TF2 и HH8, которые специфичны к альфа-аномеру TF. Использовались также mAb A68-E/A2 и A68-E/E3, специфичные к TF-бета. Итак, специфичное к опухоли Ад TF-альфа выявлено в отвечающей структуре капсульного полисахарида *V. ovatus* AG6.

Пример 11. Животная модель

11.1 Внутривентрикулярная иммунизация мышей мертвыми бактериями

11.1.1 Анализ мышинной сыворотки тестом на гуморальную иммунную реакцию 1

Самки мышей Balb/c (Charles River, 4 на группу), получившие циклофосфамид в дозе 50 мг/кг массы тела в день -1, в дни 0, 7 и 14 получают внутривентрикулярные инъекции 5×10^8 бактерий (Core-1-отрицательные штаммы AG3 (группа I), 32 или 53 либо Core-1-положительные штаммы AG6 (группа K)) в PBS, или только PBS (группа L). Образцы сыворотки берут в дни-4, 21, 27 и 30.

Мышиную сыворотку анализируют на связывание с Core-1 методом ELISA. В качестве несущего Core-1 антигена служит азиалогликофорин. В роли отрицательного контроля выступает обработанный периодной кислотой Core-1. Обработка периодатом разрушает внешнее углеводное кольцо Core-1, уничтожая тем самым эпитоп Core-1.

96-луночные микротитровальные планшеты с плоским дном покрывают азиалогликофорином А (AGP) в концентрации 2 мкг/мл. Планшет трижды промывают PBS/Tween.

Половину планшета обрабатывают периодатом следующим образом:

Лунки инкубируют 5 мин с 50 мМ натрийацетатного буфера, pH 4,5, затем инкубируют 1 час 10 мМ периодной кислоты в ацетатном буфере в темноте. Лунки инкубируют 5 мин с 50 мМ натрийацетатного буфера, pH 4,5. Реакцию останавливают инкубацией с борогидридом натрия (50 мМ в PBS, 30 мин.). Затем планшеты промывают 5 раз PBS/Tween.

Далее планшеты блокируют добавлением 2% BSA на 30 мин.

Инкубацию с различными разбавлениями мышинной сыворотки ведут 1,5 ч. Связанный мышинный иммуноглобулин выявляют конъюгированным с пероксидазой козьим антимышиным IgM антителом (1:5000 в PBS/1% BSA). Анализ ведут с TMB в качестве субстрата, реакцию останавливают добавлением 2,5 N H₂SO₄.

На фиг. 9 показано связывание IgM-антител сыворотки с Core-1-положительным AGP и Core-1-отрицательным AGP (AGP+PJ). Только у 3 из 4 мышей, иммунизированных Core-1-положительными бактериями (группа K) , отмечалось сильное связывание с AGP, причем сигнал слабеет после расщепления Core-1 PJ.

Итак, Core-1-положительные бактерии способны вызвать направленный на Core-1 гуморальный иммунитет у мышей.

11.1.2 Анализ мышинной сыворотки тестом на гуморальную иммунную реакцию 2

Самцы мышей C3H (Charles River, 4 на группу), в дни 0, 7 и 14 получают внутрибрюшинные инъекции 5×10^8 пастеризованных бактерий Core-1-отрицательных и Core-1-положительных штаммов в 200 мкл PBS. Образцы сыворотки берут до иммунизации и в дни 13, 21 и 28 и анализируют тестом на гуморальную иммунную реакцию 2.

96-луночные микротитровальные планшеты с плоским дном покрывают различными конъюгатами углевод-РАА (GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc-альфа-РАА, Fuc-альфа1-2Gal β 1-3GalNAc-альфа-РАА, GalNAc-альфа1-3Gal β -РАА, Gal-альфа1-3-GalNAc β -РАА, Gal-бета1-3GalNAc альфа1-РАА) с концентрацией 5 мкг/мл в покрывном буфере (8,4 г/л NaHCO₃, 3,56 г/л Na₂CO₃, pH=9,49) и инкубируют на ночь при 4°C.

Планшеты промывают 3 раза PBS/Tween.

Далее планшеты блокируют добавлением 2% BSA на 30 мин.

Инкубацию с различными разбавлениями мышинной сыворотки ведут 1,5 ч. Связанный мышинный иммуноглобулин выявляют конъюгированным с пероксидазой козьим антимышиным IgM антителом (1:5000 в PBS/1% BSA). Анализ ведут с TMB в качестве субстрата, реакцию останавливают добавлением 2,5 N H₂SO₄.

На фиг. 10 показаны средние значения сигналов ELISA от конъюгата PAA с Gal бета1-3GalNAc альфа1-РАА относительно сигнала ELISA от GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc-альфа-РАА для сыворотки от 4 мышей на группу в день 0 (сыворотка до иммунизации) и в день 21 [относительный сигнал ELISA рассчитывается из уравнения: (сигналы ELISA от Gal бета1-3GalNAc альфа1-РАА) · 100/ (сигналы ELISA от GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc-альфа-РАА)]. Сыворотка считается положительной, если иммунная сыворотка показывает увеличение на по меньшей мере 50% по сравнению с доиммунной. Как видно, только Core-1-положительные штаммы AG6 и MU1 вызывают Core-1-специфичную иммунную реакцию у мышей.

11.1.3 Анализ мышинной сыворотки тестом на гуморальную иммунную реакцию 3

Самки мышей Balb/c (Charles River, 4 на группу), получившие циклофосамид в дозе 50 мг/кг массы тела в день -1, в дни 0, 7 и 14 получают внутрибрюшинные инъекции 5×10^8 бактерий (Core-1-отрицательные штаммы AG3 (группа I), 32 или 53 либо Core-1-положительные штаммы AG6 (группа K)) в PBS, или только PBS (группа L). Образцы сыворотки берут в дни-4, 21, 27 и 30.

Выполняют проточную цитометрию с целью анализа связывания мышинной сыворотки с Core-1-положительными и Core-1-отрицательными линиями человеческих опухолевых клеток (NM-wt и NM-D4 соответственно; NM-wt - родительская клетка NM-D4, как описано в WO 2005/017130 A2 и EP 1654353, NM-D4 депонирован в DSMZ под № DSM ACC2605). 3×10^5 клеток на пробирку гранулируют, дебрис снова суспендируют в 50 мкл мышинной сыворотки (разбавление 1:50 в PBS/10%FCS), с контрольным антителом или только PBS/10%FCS. Образцы инкубируют 20 мин при 4°C, промывают PBS и центрифугируют. Затем клетки инкубируют с конъюгированным с Cy3 козьим антимышиным IgM антителом (фирмы Jackson Intmuno Research, 1:200 в PBS/10%FCS) 20 мин при 4°C, промывают PBS и заново суспендируют в 200 мкл PBS для проточной цитометрии.

На фиг. 11 а и b показано связывание IgM антител из мышинной сыворотки с линиями человеческих клеток NM-wt (Core-1-отрицательная) и NM-D4 (Core-1-положительная). В то время как связывание с Core-1-отрицательной линией NM-wt сравнимо у мышей, иммунизированных Core-1-отрицательными бактериями (группа I) и Core-1-положительными бактериями (группа K), у 3 из 4 мышей группы K заметно сильнее связывание с Core-1-положительной линией NM-D4. Это свидетельствует о специфичности к Core-1 гуморальной иммунной реакции у мышей, иммунизированных Core-1-положительными бактериями.

11.1.4 Анализ мышинной сыворотки тестами на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3

Мышей C3H (Charles River, 4 на группу) внутрибрюшинно иммунизируют 1×10^9 пастеризованных бактерий Core-1-положительного штамма *Bacteroides ovatus* MU-1, A68-BA11-положительного штамма *E. coli* LH2 и Core-1-отрицательных штаммов *E. coli* (AG3, *E. coli* 086 DSMZ 8697=32) в 200 мкл PBS в дни 0, 7 и 14. Образцы сыворотки берут до иммунизации и в дни 13, 21 и 28 и анализируют тестами на гуморальную иммунную реакцию 1, 2 и 3, как описано выше.

В то время как AG3 дает отрицательные результаты во всех тестах на гуморальную иммунную реакцию, сыворотка мышей, иммунизированных штаммами *E. coli* 086 и LH2, показывает AGP-реактивные антитела в HIRT 1. Тем не менее, только Core-1-положительный штамм MU-1 показывает сильную специфичную гуморальную иммунную реакцию на Core-1 в конъюгатах Core-1 с PAA (HIRT 2) и на человеческие опухолевые клетки (HIRT 3) помимо того, что порождает AGP-специфичные антитела в HIRT.

Отсюда можно заключить, что сильную специфичную гуморальную иммунную реакцию на Core 1 могут вызвать только Core-1-положительные микроорганизмы *Bacteroides ovatus* (MU-1).

Результаты показаны на фиг. 11 с-е.

11.2. Оральная иммунизация безмикробных мышей живыми Core1-положительными бактериями

Безмикробных мышей СЗН орально иммунизируют 2×10^9 живых бактерий штамма AG6 в дни 2,3,4, 9,10,11, 16, 17 и 18. Образцы сыворотки берут в день 0 (до иммунизации) и в дни 14 и 21 и анализируют на AGP-специфичные IgM антитела тестом на гуморальную иммунную реакцию 1.

У иммунизированных мышей анти-Core-1 титры выше, чем у контрольных, что показывает связывание мышьиной сыворотки с покрытыми AGP микротитровальными планшетами. Связанный мышьиный IgM обнаруживают связанными с пероксидазой антителами против мышьиного IgM. Специфичность сигнала на Core-1 демонстрируется ослаблением сигнала ELISA после обработки периодной кислотой (разрушения углеводной структуры). На 14-й или 21-й день у 3 из 3 мышей отмечался повышенный уровень IgM-антител на Core-1, тогда как у контрольных мышей сигналы ELISA на AGP и на AGP+PJ оставались неизменными, как видно из фиг. 12.

11.3 Оральная иммунизация обычных мышей пастеризованными и живыми Core-1-положительными бактериями

Мышей СЗН орально иммунизируют 1×10^{11} (группа А) или 1×10^{10} (группа В) пастеризованных бактерий штамма AG6 ежедневно с 0 по 28-й день. Образцы сыворотки берут в день -1 (до иммунизации) и в дни 13, 21, 28 и 35 и анализируют на AGP-специфичные IgM антитела тестом на гуморальную иммунную реакцию 1.

Сыворотка мышей после иммунизации показывает повышенные анти-Core-1 титры, что показывает связывание мышьиной сыворотки с покрытыми GP или AGP микротитровальными планшетами (с обработкой периодной кислотой или без). Связанный мышьиный IgM обнаруживают связанными с пероксидазой антителами против мышьиного IgM. Специфичность сигнала на Core-1 демонстрируется ослаблением сигнала ELISA после обработки периодной кислотой (разрушения углеводной структуры на по меньшей мере 30%) и ослаблением сигнала на GP (сигнал на AGP сильнее по меньшей мере на 50%).

У 5 из 6 мышей группы А и у 5 из 8 мышей группы В выработались Core-1-специфичные антитела к 21-му дню (фиг. 13).

В тесте на гуморальную иммунную реакцию 3 мышьиную сыворотку анализируют на связывание с Core-1-положительной линией опухолевых клеток NM-D4 по сравнению с Core-1-отрицательной линией клеток NM-wt методом проточной цитометрии. 3×10^5 клеток на пробирку гранулируют, дебрис снова суспендируют в 50 мкл мышьиной сыворотки (разбавление 1:300 в PBS/1%BSA), с контрольным антителом или только PBS/1%BSA. Образцы инкубируют 60 мин при 4°C, промывают PBS и центрифугируют. Затем клетки инкубируют с конъюгированным с биотином козьим антимышиным IgM антителом (фирмы Jackson Immuno Research, 1:200 в PBS/1%BSA) 60 мин при 4°C, промывают PBS и заново суспендируют в 200 мкл PBS для проточной цитометрии.

Результаты рассчитывают по следующей формуле:

$$\left(\frac{\% \text{ положительных клеток на NM-D4}_{\text{иммунной сыворотке}} - \% \text{ положительных клеток на NM-D4}_{\text{до-иммунной сыворотке}}}{\% \text{ положительных клеток на NM-wt}_{\text{иммунной сыворотке}} - \% \text{ положительных клеток на NM-wt}_{\text{доиммунной сыворотке}}} \right) = X$$

Мышиные сыворотки с отношением $X \geq 10$ рассматриваются как положительные (с % положительных клеток на NM-wt_{иммунной сыворотке} - % положительных клеток на NM-Wt_{доиммунной сыворотке} ≥ 1).

К 28-му дню 11 из 13 мышей развили гуморальную иммунную реакцию на Core-1-положительную линию человеческих опухолевых клеток NM-D4, как показано на фиг. 14.

В тесте на гуморальную иммунную реакцию 2 мышьиные сыворотки за 28-й день анализируют на связывание с Galβ1-3 GalNAc α-PAA (PAA 48) или Galβ1-3 GlcNAc α-PAA (PAA 43).

96-луночные микротитровальные планшеты с плоским дном покрывают либо Galβ1-3 GalNAc α-PAA (PAA 48), либо Galβ1-3 GlcNAc α-PAA (PAA 43) с концентрацией 5 мкг/мл в покрывном буфере (8,4 г/л NaHCO₃, 3,56 г/л Na₂CO₃, pH=9,49) и инкубируют на ночь при 4°C. После блокировки сыворотки инкубируют 1,5 ч. Связанный мышьиный иммуноглобулин выявляют конъюгированным с пероксидазой козьим антимышиным IgM антителом (1:5000 в PBS/1% BSA). Анализ ведут с TMB в качестве субстрата, реакцию останавливают добавлением 2,5 N H₂SO₄.

Результаты показаны на фиг. 21. У 5 из 13 мышей к 28-му дню развились Core-1-специфичные антитела.

Пример 12. Потенциал Core-1-положительных бактерий в создании клеточной иммунной реакции (in vitro)

12.1 Выработка функциональных дендритных клеток

Линия дендритных клеток NemoDC (pNM-DC) служит источником представляющих антиген клеток (APC). Дендритные клетки pNM-DCs дифференцируют на iNM-DC, а затем нагружают лизатами бактерий (BaLy) следующих штаммов: AG6, MU1, 52 и 53. 50 мкг/мл каждого BaLy добавляют вместе с цитокинами дозревания в культурную среду и дифференцируют iNM-DC в зрелое состояние (mNM-DC).

На первой стадии pNM-DC (1×10^5 /мл) дифференцируют в iNM-DC за 7 дней инкубации в среде NemoDC (70% MEM-альфа, 20% FCS, 10% CM5637) с добавлением 1000 ед./мл GM-CSF, 100 ед./мл IL-4 и 2,5 нг/мл TNF-альфа. Затем загружают 1×10^6 /мл незрелых NM-DC (iNM-DC) с лизатами бактерий (50

мкг/мл), лизатами опухолевых клеток (1×10^6 лизированных опухолевых клеток для загрузки на 1×10^6 NM-DC) или AGP- и GP-протеинами (20 мкг/мл) и дозревают 2 дня с добавлением 75 нг/мл TNF-альфа.

Фенотип дозревания mNM-DC очень важен для успешной активации Т-клеток и испытывается методами проточной цитометрии для экспрессии CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD35, CD80, CD83, CD86, CD116, HLA-ABC и HLA-DR. Только те DC, фенотип которых соответствует фенотипу зрелых DC, используются для активации Т-клеток.

12.2 Выработка активированных Т-клеток против Core-1 и обнаружение выработки GM-CSF (тест на клеточную иммунную реакцию 1) и TNF-альфа (тест на клеточную иммунную реакцию 2) с помощью ELISA

После 7-10 дней примирования Т-лимфоцитов с NM-DC, нагруженными Core-1-положительными лизатами бактерий, полученные Т-клетки ($0,7-1 \times 10^6$ /мл) повторно стимулируют mNM-DC (1×10^5 /мл), нагруженными лизатами Core1-положительных опухолевых клеток (50 мкг/мл). После 48 ч инкубации собирают и испытывают супернатанты, причем выработку цитокинов как реакцию на линию человеческих Core-1-положительных опухолевых клеток NM-D4 оценивают с помощью наборов GM-CSF- и TNF-альфа- BD OptEIA™.

96-луночные планшеты предварительно покрывают 50 мкл соответствующих антител (GM-CSF или TNF-альфа), разбавленных 1:250 в покрывном буфере. После промывки и блокировки в микролунки добавляют по 100 мкл супернатантов или стандартных образцов и инкубируют 2 ч при комнатной температуре. Для стандартной кривой используют рекомбинантный человеческий GM-CSF в концентрациях 0; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 пг/мл и рекомбинантный человеческий TNF-альфа в концентрациях 0; 4,7; 9,4; 18,8; 37,5; 75; 150; 300 пг/мл. После промывки добавляют по 100 мкл приготовленного рабочего детекторного раствора на лунку и инкубируют планшет 1 ч при комнатной температуре. На следующем этапе добавляют по 100 мкл одностадийного субстрата-реагента на лунку. После 30 мин окончательной инкубации и введения 50 мкл стопорного раствора считывают распространение на волне 450 нм.

Результаты, приведенные на фиг. 15 А и В, четко показывают, что Т-клетки появляются в ответ на лизаты Core1-положительных бактерий в линии человеческих клеток NM-D4 путем выработки ингибирующих опухоль цитокинов, например, TNF-альфа и GM-CSF. Напротив, в ответ на лизаты Core1-отрицательных клеток цитокинов появляется очень мало. Более того, их распознавание специфически ингибируется путем преинкубации нагруженных лизатами NM-DC с Core1-специфичным антителом.

12.3 Оценка методом ELISPOT секреции IFN-гамма активированными Т-лимфоцитами, направленной против Core-1 (тест на клеточную иммунную реакцию 2)

Метод ELISpot служит для оценки секреции IFN-гамма в ответ на специфическую стимуляцию антигеном. Он позволяет количественно определить функциональную способность пресенсиitized Т-клеток специфично распознавать антигены Core 1.

Т-лимфоциты сначала активируют совместной культивацией с DC, нагруженными лизатами бактерий. После 7-10 дней примирования активированные Т-клетки собирают и повторно контрольно заражают DC (в отношении Т-клетки к DC 10:1), нагруженными лизатами Core-1-положительных (NM-D4) и Core-1-отрицательных (NM-wt) человеческих опухолевых клеток.

Лунки планшета ELISpot предварительно порывают мышиним противочеловеческим антителом IFN-гамма (набор Mabtech-Kit), которые связываются с нитроцеллюлозной основой планшета ELISpot. Повторно контрольно зараженные Т-клетки переносят в лунки, и в ходе инкубации выделяются цитокины. IFN-гамма, локально выделяющийся вокруг каждой Т-клетки, связывается и "поглощается" специфическим антителом. После 24 ч инкубации клетки удаляют. В лунки добавляют еще по 1 мкг/мл противочеловеческого антитела IFN-гамма; это биотинированное антитело связывается с ферментом, способным преобразовать субстрат в нерастворимый окрашенный продукт. Планшеты снова промывают и добавляют 1 мкг/мл конъюгата стрептавидина с ферментом AP. Наконец, вводят осадительный субстрат BCIP+NBT и инкубируют планшет до появления пятен со стороны реагирующих Т-клеток. Цветные пятна подсчитывают и анализируют с помощью цифровой системы отображения.

Результаты показывают, что Т-клетки, выработанные под действием лизатов Core1-положительных бактерий (AG6 и MU1), способны распознавать DC, нагруженные лизатом Core1-положительных линий человеческих опухолевых клеток NM-D4 путем выработки ингибирующего опухоль цитокина IFN-гамма (фиг. 16). В ответ на лизаты Core1-отрицательных клеток вырабатывается очень мало цитокинов (R+DC/wt). Более того, специфичность распознавания лизатов Core1-положительных клеток (R+DC/D4) доказывается блокированием выделения цитокинов Core-1-специфичным антителом Nemod-TF1 (R+DC/D4+Ak).

12.4 Тест на клеточную иммунную реакцию 3: Анализ пролиферации Т-клеток

Сенсиitized и повторно стимулированные Т-клетки, как описано выше для анализа ELISpot, переносят после инкубации с планшета ELISpot в 96-луночный планшет и испытываются на пролиферацию клеток с помощью колориметрического реагента WST-1 (фирмы Roche Molecular Biochemicals), тетразолиевая соль которого расщепляется митохондриальными ферментами таким образом, что количество проявившегося красителя (на волне 450 нм) прямо пропорционально количеству метаболически активных

клеток в культуре. Поглощательная способность культурной среды и WST-1 таковы, что в отсутствие клеток связанный с ферментами иммуносорбент остается незадействованным. Процедура заключается в одноразовой загрузке по 10 мкл на лунку реагента WST (Roche) и в инкубации 3 ч при 37°C с последующим считыванием на 450 нм.

Результаты на фиг. 17 показывают, что Т-клетки, выработанные под действием лизатов Core-1-положительных бактерий, способны распознавать DC, нагруженные лизатом Core-1-положительных линий человеческих опухолевых клеток NM-D4, о чем свидетельствует специфическая пролиферация. Более того, их распознавание специфически ингибируется путем преинкубации нагруженных лизатами NM-DC с Core-1-специфичным антителом.

12.5 Тест на клеточную иммунную реакцию 4: Иммунофлуоресценция в ответ на представление Core-1 на DC, нагруженных лизатами бактерий

Для анализа обработки и представления Core-1 нагруженными лизатами бактерий NM-DC, выполняют иммунофлуоресцентный анализ с использованием Core-1-специфичных моноклональных антител (Nemod-TF1, NEMOD-TF2). Представление обработанного антигена Core1 на поверхности зрелой DC демонстрируют с помощью иммунофлуоресценции. Иммунофлуоресценция (IF) - это прием, позволяющий визуально представлять специфический антиген (Core1) на клетках путем связывания Core-1-специфичного антитела с последующим добавлением вторичного антитела, меченого фторохромом и служащего для распознавания первого антитела.

На первом этапе рNM-DC (1×10^5 /мл) дифференцируют в iNM-DC 7-дневной инкубацией в среде NemodDC (70% MEM-альфа, 20% FCS, 10% CM5637) с добавлением 1000 ед./мл GM-CSF, 100 ед./мл IL-4 и 2,5 нг/мл TNF-альфа. Затем загружают 1×10^6 /мл незрелых NM-DC (iNM-DC) с лизатами бактерий (50 мкг/мл), лизатами опухолевых клеток (1×10^6 лизированных опухолевых клеток для загрузки на 1×10^6 NM-DC) или AGP- и GP-протеинами (20 мкг/мл) и дозревают 2 дня с добавлением 75 нг/мл TNF-альфа.

Созревшие и нагруженные антигенами DC промывают и помещают 1×10^6 клеток на 50 мкл на микротитровальный планшет для иммунофлуоресцентного окрашивания. 3 мкг/мл Core-1-специфичного антитела (Nemod-TF1), разбавленного в культурной среде (10%FCS), инкубируют с суспензией клеток 1 ч при комнатной температуре. После промывки добавляют 50 мкл разбавленного 1:200 вторичного козьего антимышиного IgM, меченого Cy3 Ab (фирмы Jackson/Dianova), и инкубируют 30 мин. После промывки по 20 мкл суспензии клеток помещают в каждую лунку предметного стекла Multitest (10 лунок, фирмы Roth).

Иммунофлуоресцентно окрашенные образцы изучают на флуоресцентном микроскопе AxioPlan 2 с цифровой камерой AxioCam (фирмы Zeiss).

На фиг. 18 показано положительное Core-1-специфичное окрашивание зрелых mNM-DC, которые обработали AG6- и NM-D4-Core1-положительные лизаты; наблюдается также отрицательная иммунофлуоресценция на mNM-DC, нагруженных Core1-отрицательными лизатами (AG3 и NM-wt).

Хотя изобретение описано в предпочтительных вариантах его осуществления, специалисту понятно, что в него могут быть внесены всевозможные модификации, замены, исключения и изменения при сохранении существа изобретения. Соответственно утверждается, что объем изобретения ограничивается исключительно нижеследующей формулой с учетом эквивалентов. Отсюда специалистам, которым изобретение адресовано, становится понятно, что изобретение может быть осуществлено в иных формах, нежели изложенные здесь, без отхода от существа изобретения в рамках его принципиальных решений. Конкретные варианты осуществления, приведенные здесь, рассматриваются во всех отношениях как иллюстративные, которые не устанавливают никаких ограничений. Объем изобретения устанавливается его формулой, а не примерами, которые содержатся в данном описании.

Следует понимать, что при осуществлении изобретения в описанные варианты его осуществления могут быть внесены всевозможные альтернативы. Нижеследующая формула определяет объем изобретения и охватывает способ и устройство в рамках этой формулы с возможными эквивалентами.

Перечень последовательностей

- <110> GlycoTape GmbH
- <120> МИКРООРГАНИЗМЫ ИЛИ ИХ ФРАКЦИИ,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АКТИВАЦИЮ КЛЕТОЧНОГО
ИММУНИТЕТА ПРОТИВ УГЛЕВОДОВ
- <130> 48 602
- <140> PCT/EP07/009766
- <141> 2007-11-12
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Праймер 27f для амплификации бактериального 16S
рибосомного гена РНК
- <400> 1
agagtttgat cctggctcag
- <210> 2
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Праймер 1492r для амплификации бактериального
16S рибосомного гена РНК
- <400> 2
taccttgta cgactt

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Секвенирующий праймер 338f

<400> 3
 gctgcctccc gtaggagt

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Секвенирующий праймер 338г

<400> 4
 actcctacgg gaggcagc

<210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Секвенирующий праймер 968f

<400> 5
 aacgcgaaga accttac

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный Core-1-положительный микроорганизм для генерации иммунного ответа на Core-1, который распознается и связывается по меньшей мере одним Core-1 специфичным антителом, где Core-1 означает углеводную структуру галактозу бета 1-3, связанную с N-ацетилагалактозамином.

2. Core-1-положительный микроорганизм по п.1, где указанное Core-1-специфичное антитело выбирается из группы, состоящей из

Nemod-TF1,
 Nemod-TF2,
 A78-G/A7,
 НВ-Т1и
 НН8.

3. Core-1-положительный микроорганизм по п.1 или 2, который распознается и соответственно связывается двумя Core-1 специфичными антителами Nemod-TF1 и Nemod-TF2.

4. Core-1-положительный микроорганизм по любому из пп.1-3, где распознавание Core-1-положительного микроорганизма Core-1 специфичным антителом чувствительно к периодату и показывает ослабление связывания после обработки периодатом.

5. Core-1-положительный микроорганизм по любому из пп.1-4, где указанный Core-1-положительный микроорганизм выбран из группы, включающей Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Streptococcus, Bacteroides, Rhuminococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Johnsonella, Atopobium, Staphylococcus, Eubacterium, Finegoldia, Clostridium, Eggerthella, Butyrivacterium, Citrobacter, Propionibacterium и Corynebacterium, Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides acidophilus, Bacteroides caccae, AG6 (DSM 18726) или MU1 (DSM 18728).

6. Core-1-положительный микроорганизм по п.5, в котором указанный Core-1-положительный микроорганизм представляет собой Bacteroides.

7. Core-1-положительный микроорганизм по п.6, в котором указанный Bacteroides представляет собой AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728) или гомолог AG6 или MU1, причем указанный гомолог отличается тем, что распознается по меньшей мере двумя Core-1-специфичными антителами, выбранными из группы, включающей

Nemod-TF1,
Nemod-TF2,
A78-G/A7,
HB-T1 и
HN8,

где связывание указанных антител чувствительно к периодату и показывает ослабление связывания после обработки периодатом.

8. Core-1-положительный микроорганизм по любому из пп.1-3, где указанный Core-1-положительный микроорганизм получают химической обработкой, за счет которой обнажают структуру Core-1.

9. Композиция для генерации или усиления гуморального и/или клеточного иммунного ответа на Core-1 у человека или животного, выбранная из группы, состоящей изнутрицевтической и фармацевтической композиции, содержащая по меньшей мере один Core-1-положительный микроорганизм по любому из пп.1-8 и/или его по меньшей мере одну Core-1-положительную фракцию или лизат, где Core-1 означает углеводную структуру галактозу бета 1-3, связанную с N-ацетилагалактозаминном.

10. Применение Core-1-положительного микроорганизма по любому из пп.1-8 и/или его Core-1-положительной фракции или лизата для изготовления лекарственного средства илинутрицевтика для лечения или профилактики Core-1-положительных опухолей.

11. Применение Core-1-положительного микроорганизма по любому из пп.1-8 или его Core-1-положительной фракции или лизата для генерации или усиления гуморального и/или клеточного иммунного ответа на Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

12. Применение композиции по п.9 для генерации или усиления гуморального и/или клеточного иммунного ответа на Core-1 или Core-1-положительные опухолевые клетки.

13. Применение по п.11 или 12, согласно которому обеспечивается возможность уничтожения Core-1-положительных опухолевых клеток, и/или ослабления или предотвращения возникновения Core-1-положительной опухоли или метастаза, и/или ослабления или предотвращения распространения метастаза Core-1-положительной опухоли.

14. Способ выделения Core-1-положительного микроорганизма по любому из пп.1-8 из смеси микроорганизмов, согласно которому:

(а) приводят Core-1-специфичное антитело в контакт со смесью микроорганизмов, выбранной из группы, включающей микроорганизмы, полученные из почвы, пищевых продуктов и/или растений, и/или микроорганизмы из желудочно-кишечного тракта, фекалий, крови, тканей и/или жидкостей из организма здорового или больного человека или животного, и

(б) выделяют микроорганизм, связанный указанным Core-1-специфичным антителом.

15. Способ по п.14, в котором указанное Core-1-специфичное антитело выбрано из группы, состоящей из

Nemod-TF1,
Nemod-TF2,
A78-G/A7,
HB-T1,
HN8.

16. Способ по п.14 или 15, согласно которому:

(а) выделяют микроорганизмы из образцов фекалий,

(б) приводят Core-1-специфичное антитело в контакт с указанными микроорганизмами,

(в) выделяют микроорганизм, который связывается с Core-1-специфичным антителом путем магнитного разделения частиц, и

(г) идентифицируют микроорганизм, который связан антителами Nemod-TF2 или A78-G/A7 и Nemod-TF1, причем связывание указанных антител чувствительно к периодату и ослабевает после обработки периодатом.

17. Способ идентификации Core-1-положительного микроорганизма для использования в качестве ингредиента композиции по п.9, согласно которому:

(а) тестируют микроорганизм на способность к связыванию по меньшей мере с одним Core-1 специфичным антителом и

(б) оценивают генерацию или усиление иммунного ответа против Core-1 у людей или животных после введения им микроорганизма, который связывается по меньшей мере одним Core-1 специфичным антителом, полученного на стадии (а), и

идентифицируют тем самым микроорганизм, который генерирует или усиливает иммунный ответ на Core-1 по меньшей мере у одного человека или животного на основании положительных результатов по меньшей мере в одном тесте на гуморальный иммунный ответ на Core-1, выбранный из тестов 1-6, на клеточный иммунный ответ на Core-1, выбранный из тестов 1-5, раскрытых в описании.

18. Способ получения функциональной дендритной клетки, презентирующей Core-1, которая способна активировать иммунные клетки, включающий приведение в контакт дендритных клеток с Core-1-положительным микроорганизмом по любому из пп.1-8 и/или его Core-1-положительным лизатом или фракцией и отбор дендритной клетки, презентирующей Core-1.

19. Функциональная дендритная клетка, презентирующая Core-1, которая способна активировать иммунные клетки, полученная способом по п.18.

20. Способ получения активированной Т-клетки, клона Т-клетки или линии Т-клеток против Core-1, согласно которому

приводят в контакт по меньшей мере одну функциональную дендритную клетку, презентирующую Core-1, по п.19 по меньшей мере с одной Т-клеткой, или смесью Т-клеток, или смесью клеток, содержащих по меньшей мере одну Т-клетку; и

культивируют указанную Т-клетку или смесь Т-клеток вместе с указанной функциональной дендритной клеткой, презентирующей Core-1, для активации или примирования Т-клетки или клона или линии Т-клеток против Core-1.

21. Активированная Т-клетка против Core-1, или линия Т-клеток против Core-1, или клон Т-клеток Core-1, полученные способом по п.20, вызывающие гуморальный и/или клеточный иммунный ответ на Core-1-положительные клетки.

22. Применение функциональной дендритной клетки по п.19 для изготовления лекарственного средства или нутрицевтика для профилактики или лечения Core-1-положительных опухолей.

23. Применение активированной Т-клетки, или клона Т-клетки, или линии Т-клеток по п.21 для изготовления лекарственного средства и/или нутрицевтика для профилактики или лечения Core-1-положительных опухолей.

24. Применение Core-1 положительного микроорганизма по любому из пп.1-8 и/или его Core-1-положительный фракции *in vivo* или *in vitro* для генерации или усиления Core-1-специфичного иммунного ответа, и/или для выработки функциональных дендритных клеток, или активированных Т-клеток, линий Т-клеток или клонов Т-клеток, или антител против Core-1.

25. Core-1-положительный микроорганизм, представляющий собой штамм *Bacteroides* AG6 (DSM 18726).

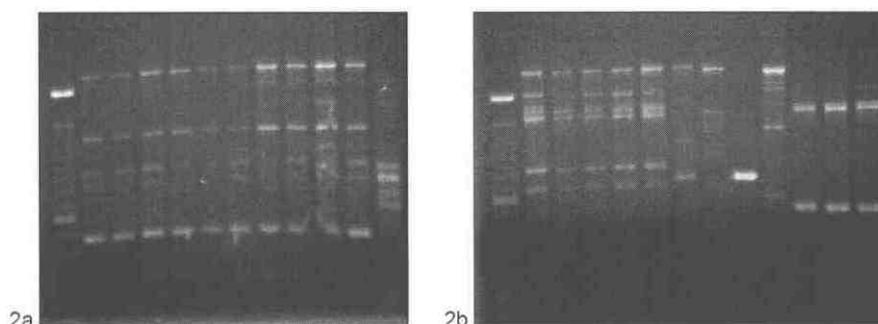
26. Core-1-положительный микроорганизм, представляющий собой штамм *Bacteroides* MU1 (DSM 18728).

```

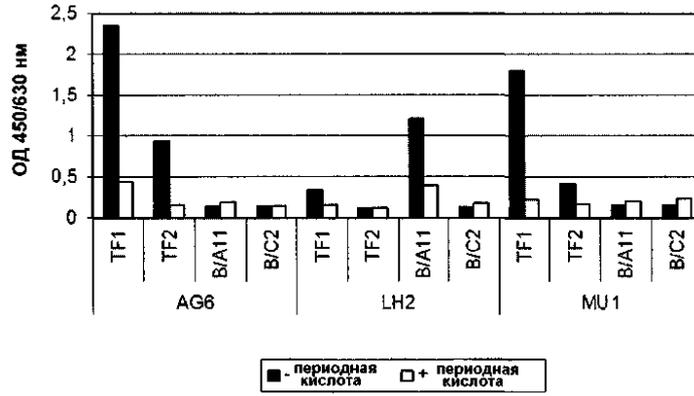
+MU1
|
| | +Bacteroides thetaiotaomicron штамм 17 4 AY319392
| | |
| | | +Bacteroides thetaiotaomicron штамм 0633 AY895186
| | | |
| | | | +7
| | | | +11 +8 +Bacteroides thetaiotaomicron штамм 8713 AY895202
| | | | |
| | | | | +9 +Bacteroides thetaiotaomicron BNRRR16SB M58763
| | | | |
| | | | | +10 +Bacteroides thetaiotaomicron штамм 3751 AY895192
| | | | |
+20 | | +Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29148 BNRRR16SAF L16489
| | | |
| | | | +Bacteroides acidifaciens AB021156
| | | | |
| | | | | +18 +2
| | | | | | +Bacteroides acidifaciens штамм A1 AB021158
| | | | | |
| | | | | | +5
| | | | | | | +Bacteroides acidifaciens штамм A32 AB021162
| | | | | | | |
| | | | | | | | +4
| | | | | | | | +12 +Bacteroides acidifaciens штамм A29 AB021160
| | | | | | | | |
| | | | | | | | | +3
| | | | | | | | | +Bacteroides acidifaciens штамм A40 AB021164
| | | | | | | | |
| | | | | | | | | +13 +Bacteroides caccae ATCC 43185T BC16S X83951
| | | | | | | | |
| | | | | | | | | +19 |
| | | | | | | | | +Bacteroides fragilis BNRRGDAM1 1656
+22 | | | +6
| | | | | +Bacteroides distasonis BNRRR16S M86695
| | | | | |
| | | | | | +1
| | | | | | | .....Eschenchia coli ATCC 11755T ECAT1177T X80725
| | | | | | |
| | | | | | | +Bacteroides ovatus AB050108
| | | | | | | |
| | | | | | | | +14
| | | | | | | | +15 +Bacteroides ovatus ATCC 8438T BO16S X83952
| | | | | | | | |
| | | | | | | | | +17 +Bacteroides ovatus NCTC 11153 L16484 BNRRR16SAA
| | | | | | | | |
| | | | | | | | | +Bacteroides ovatus штамм 3941 AY895193
| | | | | | | | | +16
| | | | | | | | | +Bacteroides ovatus штамм 4140 AY895197
| | | | | | | | |
| | | | | | | | | +Bacteroidaceae bacterium Smarlab AY538687
| | | | | | | | |
| | | | | | | | | +Bacteroides sp WH302 AY895184
23-21 | | | +Bacteroides sp WH305 AY895185
| | | |
+AG6

```

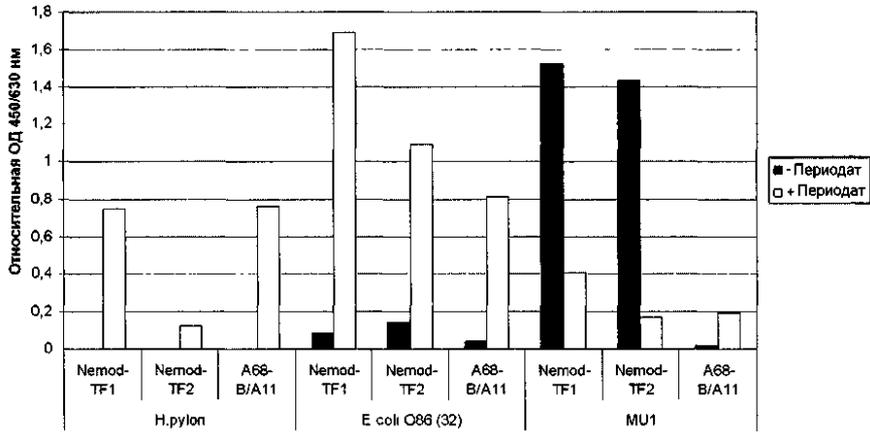
Фиг. 1



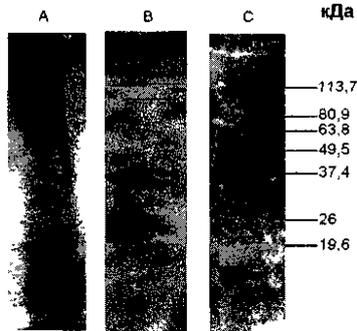
Фиг. 2



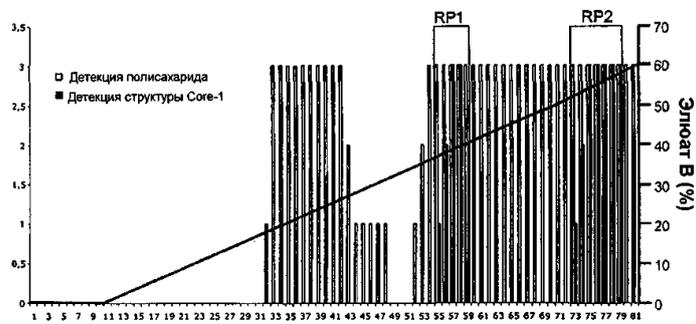
Фиг. 3



Фиг. 3а



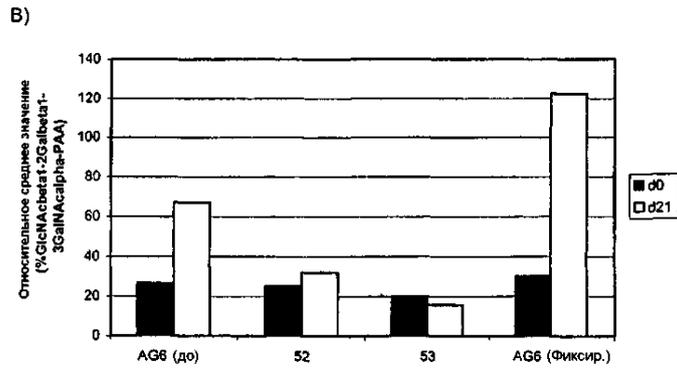
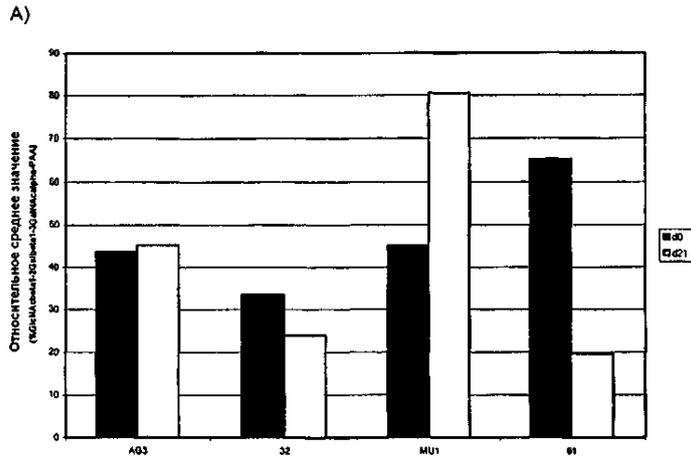
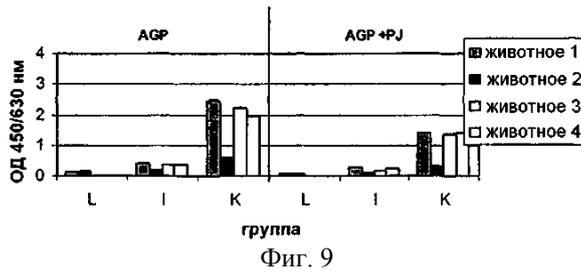
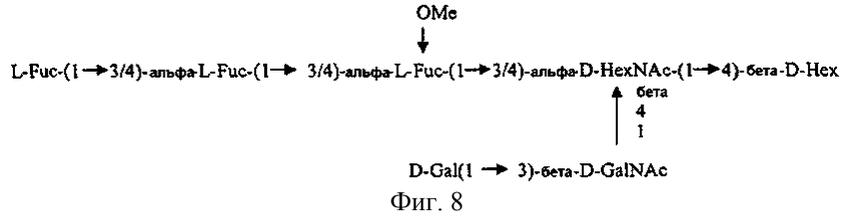
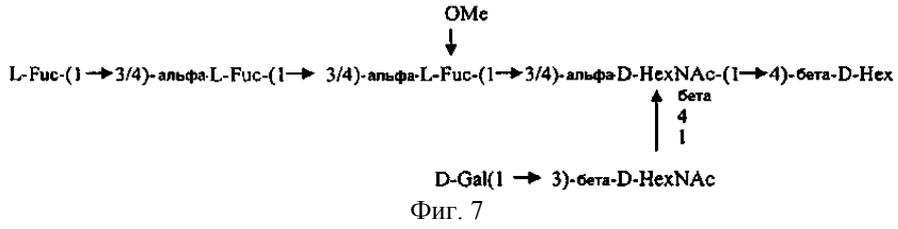
Фиг. 4



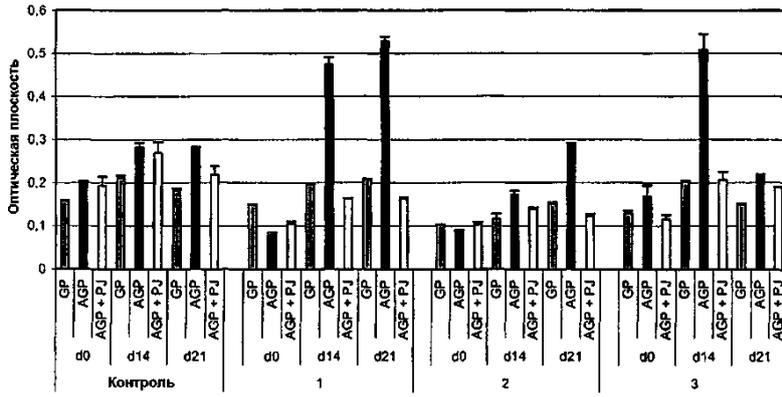
Фиг. 5

-desHex-desHex-desHexM-HexNAc(HexNAc-Hex)-Hex-

Фиг. 6

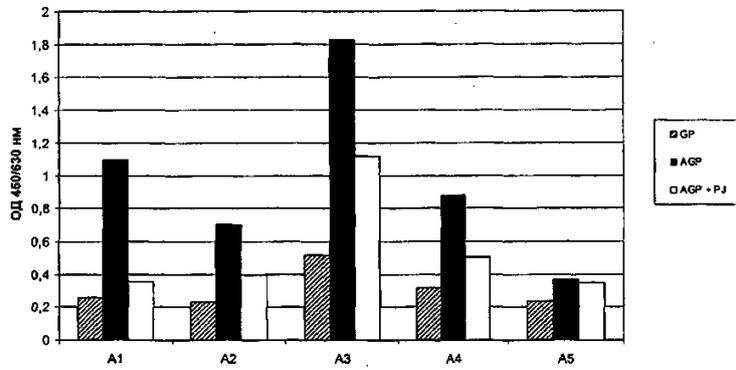


Фиг. 10

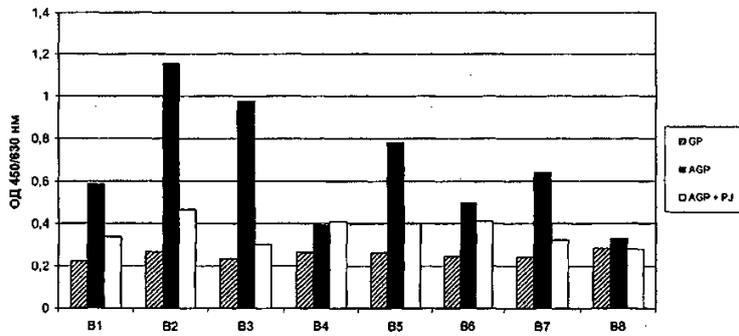


Фиг. 12

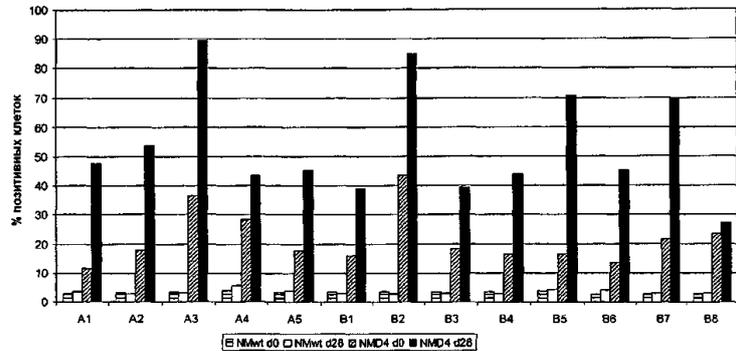
А)



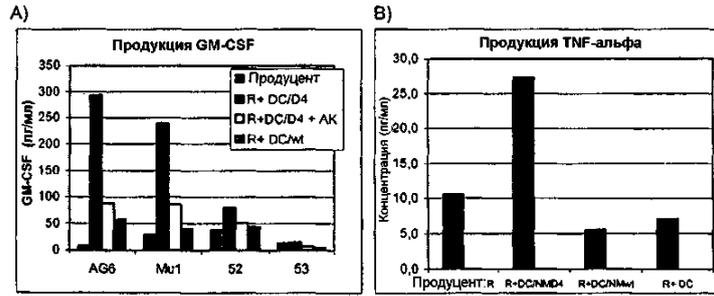
В)



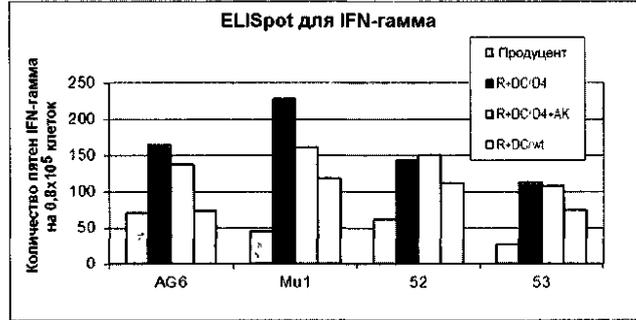
Фиг. 13



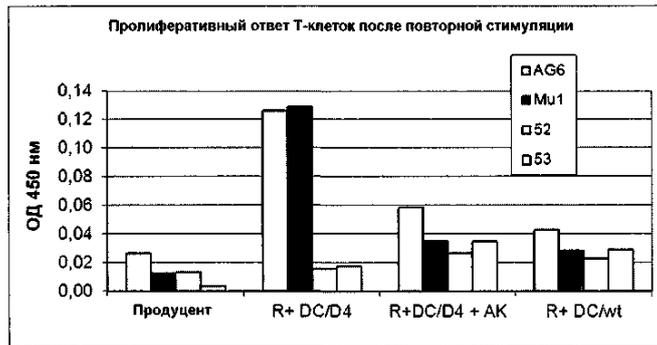
Фиг. 14



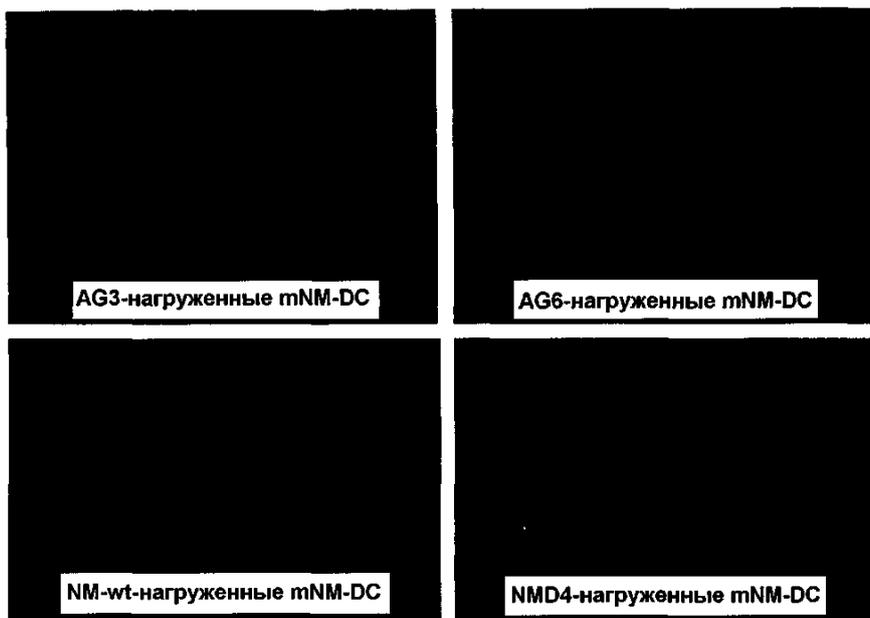
Фиг. 15



Фиг. 16

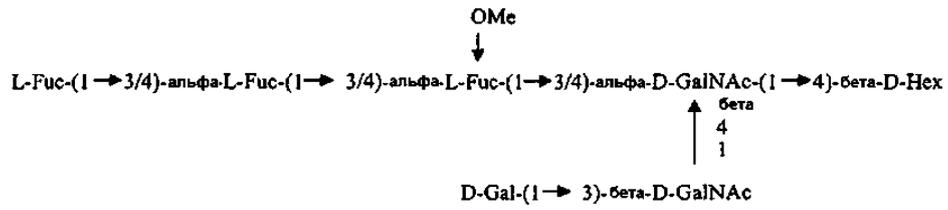


Фиг. 17

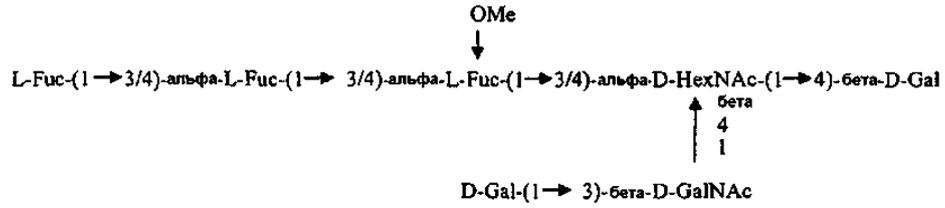


Фиг. 18

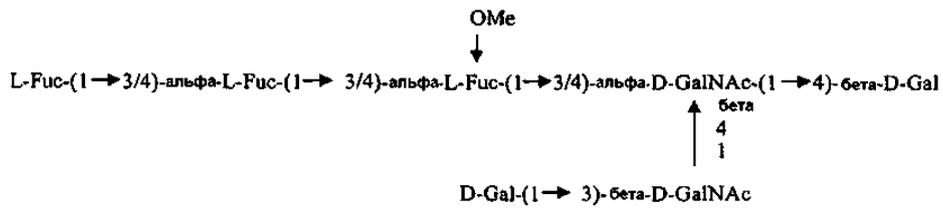
#1



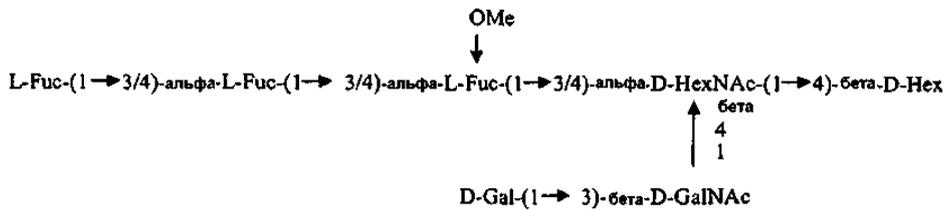
#2



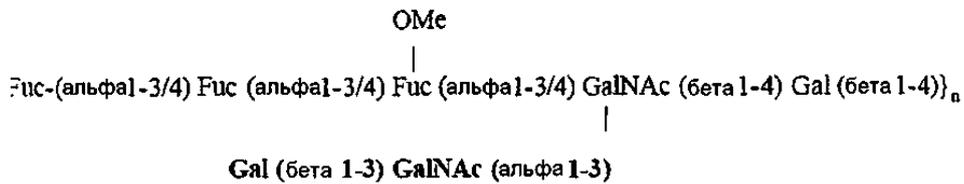
#3



#4



#5



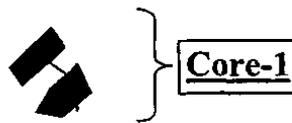
Фиг. 19

Нормальные ткани



Белок

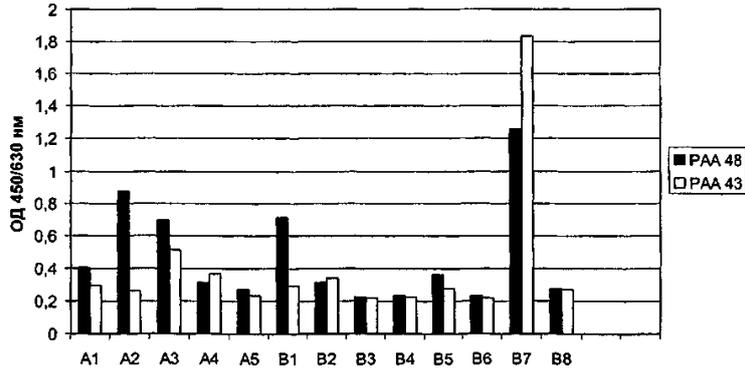
Раковая ткань



Белок

Gal β 1-3GalNAc α 1-O-P

Фиг. 20



Фиг. 21

Таблица 1

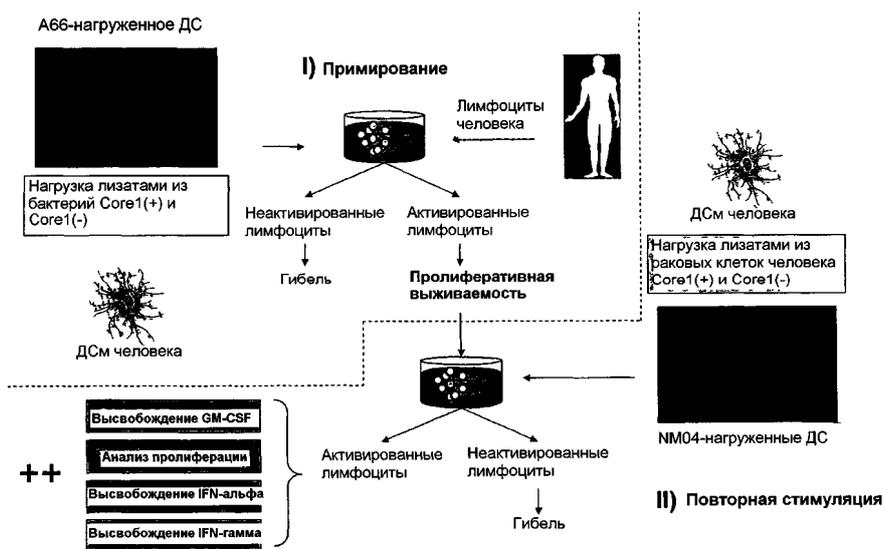
Антибиотик/Штамм	53	52	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32
Виды	<i>B. ovatus</i>	<i>B. thetaioaomicron</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>E. coli</i>				
Штамм	DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697
Пенициллин				MS					
Мезлоциллин			MS	MS		S			S
Ампициллин					S	S	S	S	S
Ампициллин + Сульбактам									
Пиперациллин + Тазобактам	S	MS	S	S					
Меропенем									
Клиндамицин		MS	S						
Метронидазол	S	S							

Антибиотик/Штамм	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32	53	52	AG6	MU1
Виды	<i>E. coli</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. thetaioaomicron</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>				
Штамм	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697	DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1
Ампициллин	S	S	S	S	S				
сульфаметоксазол + триметоприм									
Гентамицин		S	S						
Тобрамицин	S	S	S	S					
Мезлоциллин		S			S			MS	MS
Цефотиам									
Цефотаксим									
Меропенем									
Цефтриаксон									
Цефуроксим	MS	MS	MS	MS					

Цеффиксим									
Тетрациклин	MS	MS	MS	MS	MS				
Оксациллин									
Эритромицин									
Ванкомицин									
Ампициллин + Сульбактам									
Линезолид									
Пиперациллин									
Пиперациллин + Тазобактам						S	MS	S	S
Амикацин	S	S	S						
Цефтазидим									
Имипенем									
Рифампицин			MS	MS					
Ципрофлоксацин									
Фосфомицин			S						
Пенициллин									MS
Тейкопланин									
Клиндамицин							MS	S	
Бацитрацин									
Неомицин	S	S	S	S	S				
Колистин	S	S	S	S	S				
Фуцидин-соль									
Метронидазол						S	S		

S=чувствительный
MS=средняя чувствительность

Фиг. 22



Фиг. 23