

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 965**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2006 E 06090208 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 1920781**

54 Título: **Composiciones que comprenden un microorganismo positivo para Core-1 y su uso para el tratamiento o la profilaxis de tumores**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2015

73 Titular/es:

**GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
ROBERT-RÖSSLE-STRASSE 10
13125 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

GOLETZ, STEFFEN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 533 965 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden un microorganismo positivo para Core-1 y su uso para el tratamiento o la profilaxis de tumores

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales y el cáncer. Más en particular, la presente invención se refiere a la prevención y el tratamiento de carcinomas positivos para Core-1. La invención proporciona nutracéuticos y composiciones farmacéuticas que comprenden microorganismos positivos para Core-1 y fracciones de los mismos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10

Definiciones

15

De acuerdo con la presente invención el término "nutracéutico" significa cualquier nutriente, composición de nutrientes o formulación que puede tomar, por vía oral, un ser humano o un animal, tal como, pero que no se limita a, nutrientes, aditivos nutricionales, aditivos alimentarios, complementos dietéticos, alimentos medicamentosos, alimentos clínicos, alimentos parenterales, alimentos enterales, alimentos para uso dietético especial, alimentos de uso específico sanitario o alimentos funcionales que pueden aplicarse por vía oral en distintas formas, tales como, pero que no se limitan a, cápsulas, comprimidos, emulsiones, polvos, líquidos, así como en forma de cualquier alimento o bebida o como una parte del mismo. En casos especiales el nutracéutico puede darse por vía parenteral (alimento parenteral). El nutracéutico puede darse en sí mismo o mezclarse con al menos un otro ingrediente. El nutracéutico por sí mismo o su mezcla con al menos un otro ingrediente puede darse en sí mismo o mezclarse con otro alimento o bebida. El término nutracéutico también significa cualquier alimento, bebida, cápsula, comprimido emulsión, polvos, o líquido.

20

25

De acuerdo con la presente invención el término "nutracéutico" significa cualquier nutriente, composición de nutrientes o formulación que puede tomar por vía oral un ser humano o un animal, tal como, pero que no se limita a, nutrientes, aditivos nutricionales, aditivos alimentarios, complementos dietéticos, alimentos o nutrición clínica, alimentos o nutrición médica, alimentos enterales, nutrición clínica enteral, nutrición o alimento para el cuidado sanitario, alimentos para uso dietético especial, alimentos de uso específico sanitario o alimentos funcionales que pueden aplicarse por vía oral en distintas formas, tales como, pero que no se limitan a, cápsulas, comprimidos, emulsiones, polvos, líquidos, así como en forma de cualquier alimento o bebida o como una parte de los mismos. En casos especiales, el nutracéutico puede darse por vía parenteral (alimento parenteral). El nutracéutico puede darse en sí mismo o mezclarse con al menos un otro ingrediente. El nutracéutico por sí mismo o su mezcla con al menos un otro ingrediente puede darse en sí mismo o mezclarse con otro alimento o bebida. El término nutracéutico también significa cualquier alimento, bebida, cápsula, comprimido, emulsión, polvos, o líquido.

30

35

De acuerdo con la presente invención la expresión "composición farmacéutica" significa cualquier composición que pueda usarse como un fármaco, o un agente farmacéutico, o un agente biológico, o es un componente de un fármaco o un agente farmacéutico o un agente biológico.

40

De acuerdo con la presente invención el término "Core-1" significa la estructura del hidrato de carbono de galactosa unido con enlaces beta 1-3 a N-Acetil-galactosamina unida con enlace alfa 1 a (Gal beta1-3GalNAc alfa1-; TF alfa, TFa, TFa). En la proteína o polipéptido Core-1 se une covalentemente por medio de un enlace O -glucosídico a los aminoácidos serina o treonina (Gal beta1-3GalNAc alfa1-O-Ser/Thr). Core-1 también puede unirse por medio de diversos enlazadores y a diversas densidades con transportadores naturales o sintéticos, tales como poli(acrilamida) (también denominada PAA en el presente documento), u otras moléculas tales como los materiales del lecho cromatográfico (por ejemplo, sefarosa), biotina o proteínas, tales como la albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (Ova), albúmina de suero humano (HSA) o hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), toxinas, toxoides, esferas o nanopartículas.

45

50

En el sentido de esta invención, el término Core-1 significa también estructuras que imitan a Core-1 tales como polipéptidos, péptidos, lípidos o hidratos de carbono o combinaciones de los mismos o una estructura química distinta de Core-1 pero que tiene una estructura conformacional que puede reconocerse por anticuerpos específicos de Core-1 de la invención.

55

De acuerdo con la presente invención la expresión "anticuerpo específico de Core-1" significa (i) cualquier anticuerpo que se une específicamente a Gal beta1-3GalNAc alfa1-PAA (TFa-PAA, TFa-PAA, Core-1-PAA) pero no a cualquiera de las sustancias de la #lista 1#.

60

#lista 1#

65 GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA (GlcNAc β 1-2' TF)
Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA (H tipo 3)

GalNAc α 1-3Gal β -PAA (A_{di})
Gal α 1-3-GalNAc β -PAA (T_{di β})

que se obtuvieron de Lectinity holdings Inc.

5 Como alternativa, todas las estructuras pueden generarse por un experto en la materia, quien también puede seleccionar otra poliacrilamida adecuada para la conjugación u otra molécula transportadora adecuada así como la conjugación de métodos adecuados para acoplar las estructuras de los hidratos de carbono acordes y la síntesis de los intermediarios necesarios.

10 (ii) o cualquier anticuerpo que se una a asialoglucoforina pero no a glucoforina, y que esta unión sea sensible al peryodato,

15 (iii) más preferentemente cualquier anticuerpo que se una a TFA-PAA y en menor medida o no lo haga con TFB-PAA (Gal betal-3GalNAc betal-PAA) pero no lo haga con ninguna de las sustancias de la #lista 2#:

#lista 2#

proteínas:

20 Glucoforina
BSA (albumina de suero bovino)

Conjugados-PAA:

25 Aminoglucitol
ácido β -N-acetilneuramínico (ácido beta-N-acetilmurámico)
 α -D-glucosa (alfa-D-glucosa)
30 β -glucosa (beta-D-glucosa)
 α -D-galactosa (alfa-D-galactosa)
 β -D-galactosa (beta-D-galactosa)
 α -D-manosa (alfa-D-manosa)
 α -D-manosa-6-fosfato (alfa-D-manosa-6-fosfato)
 α -L-fucosa (alfa-L-fucosa)
35 β -N-acetil-D-glucosamina (beta-N-acetil-D-glucosamina)
 α -N-acetil-D-galactosamina (alfa-N-acetil-D-galactosamina, T_n, T_n)
 β -D-galactosa-3-sulfato (beta-D-galactosa-3-sulfato)
ácido α -N-acetilneuramínico (ácido alfa-N-acetilneuramínico)
 β -N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato (beta-N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato)
40 Lac-di-NAc (GalNAc β 1-4GlcNAc β -, GalNAcbeta1-4GlcNAcbeta-)
GlcNAc β 3Gal (GlcNAc β 1-3Gal β -, GlcNAcbeta1-3Galbeta-)
Gala4GlcNAc (Gala1-4GlcNAc β -, Galalfa1-4GlcNAcbeta)
Maltosa,
Gal β 3Gal (Gal β 1-3Gal β -, Galbeta1-3Galbeta)
45 Le^c (Gal β 1-3GlcNAc β -, Galbeta1-3GlcNAcbeta-)
Lac (Gal β 1-4Glc β -, Galbeta1-4Glcbeta)
LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc β -, Galbeta1-4GlcNAcbeta-)
Fuca3GlcNAc (Fuca1-3GlcNAc β -, Fucalfa1-3GlcNAcbeta-)
Fuca4GlcNAc, (Fuca1-4GlcNAc β -, Fucalfa1-4GlcNAcbeta-)
50 Fs-2 (GalNAc α 1-3GalNAc β -, GalNAcalfa1-3GalNAcbeta)
Core 5 (GalNAc α 1-3GalNAc α -, GalNAcalfa1-3GalNAcalfa-)
Taa (Gal α 1-3GalNAc α -, Galalfa1-3GalNAcalfa-, Talfa alfa)
Gala2Ga1 (Gal α 1-2Gal β -, Galalfa1-2Galbeta-, Gala2Gal)
SiaTn (Neu5Ac α 2-6GalNAc α -; Neu5Acalfa2-6GalNAcalfa sTn)
3'-su-LacNAc (3'-O-su-LacNAc β -, 3'-O-su-LacNAcbeta-)
3'-su-Le^c (3'-O-su-Gal β 1-3GlcNAc β -, 3'-O-su-Galbeta1-3GlcNAcbeta)
melibiosa (Gala1-6Glc β -, Galalfa1-6Glcbeta-)
(Sia)₂ (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α -, Neu5Acalfa2-8Neu5Acalfa)
Gal2 β Gal (Gal β 1-2Gal β -, Galbeta1-2Galbeta-, Galbeta2Gal-)
60 6-O-su-LacNAc (Gal β 1-4(6-O-su)GlcNAc β -, Galbeta1-4(6-O-su)GlcNAcbeta-)
A_{di} (GalNAc α 1-3Gal β -, GalNAcalfa1-3Galbeta-)
B_{di} (Gal α 1-3Gal β -, Galalfa1-3Galbeta)
6'-O-su-LacNAc (6'-su-LacNAc β -, 6'-su-LacNAcbeta-)
H_{di}(Fuca1-2Gal β -, Fucalfa1-2Galbeta)
65 3'-O-su-TF(3'-O-su-Gal β 1-3GalNAc α -, 3'-O-su-Galbeta1-3GalNAcalfa-)
di-GalNAc β (GalNAc β 1-3GalNAc β -, GalNAcbeta1-3GalNAcbeta)

- core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α -, GlcNAc β 1-3GalNAc α)
 core 6 (GlcNAc β 1-3GalNAc α -, GlcNAc β 1-6GalNAc α)
 GA1, GgOsa3 (GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -, GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β)
 Gala1-3'Lac (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -, Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β)
 5 GlcNAc β 1-2'TF (GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -)
 Man₃ Man α 1-6
 Man α -Man α 1-3
 10 3'SLN (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -)
 Pk (Gb3, GbOsa3, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -)
 Le^a Fuca1-4
 GlcNAc β -Gal β 1-3
 15 Le^d (H tipo 1, Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β -)
 Le^x Fuca1-3
 GlcNAc β -Gal β 1-4
 20 3'-SiaLo^c(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -)
 H tipo 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 -)
 25 3'-O-su-Le^a Fuca1-4
 GlcNAc β -O-su-3Gal β 1-3
 3'-O-su-Lex Fuca1-3
 30 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-)
 35 GlcNAc β 1-3'TF(GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -)
 A_{tri} Fuca1-2
 Gal β -GalNAc α 1-3
 40 que se obtuvieron de Lectinity holdings Inc.

Como alternativa, todas las estructuras pueden generarse por un experto en la materia, quien también puede seleccionar otra poliacrilamida adecuada para la conjugación u otra molécula transportadora adecuada así como la conjugación de métodos adecuados para acoplar las estructuras de los hidratos de carbono acordes y la síntesis de los intermediarios necesarios.

(iv) incluso más preferentemente cualquiera de los anticuerpos de los siguientes anticuerpos: HB-T1 (IgM) (DakoCytomation GmbH, Hamburgo; 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 group A associated structure, ga-lactosyl-A: specificity and relation to the Thomsen-Friedenreich antigen. Mol Immunol 25:199-204 (1988)], A78-G/A7 [Glycotope GmbH, Berlín; Karsten U, Butschak G, Cao Y, Goletz S, Hanisch FG. A new monoclonal antibody (A78-G/A7) to the Thomsen-Friedenreich pan-tumor antigen. Hybridoma Feb de 1995 ;14(1):37-44], A68-B/A11 [Gly-cotope GmbH, Berlín, www.glycotope.com], Nemod-TF1 [Glycotope GmbH, Berlín; 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], o Nemod-TF2 [Glycotope GmbH, Berlín; 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],

(v) incluso más preferentemente cualquier anticuerpo que se una a TFa-PAA y lo haga menos o no lo haga a TFb-PAA y no lo haga a ninguna de las proteínas y construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se una a asialoglucoforina y no a glucoforina y que esta unión sea sensible al peryodato,

(vi) incluso más preferentemente cualquier anticuerpo que se una a TFa-PAA y lo haga menos o no lo haga a TFb-PAA y no lo haga a ninguna de las proteínas y construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se una a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se una a al menos una línea celular tumoral fuera de NM-

D4 [DSM ACC2605], NM-F9 [DSM ACC2606], ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión sea sensible al peryodato, tales como NEMOD-TF2 o A78-G/A7,

(vii) más preferentemente cualquier anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se una al trisacárido Core-2 acoplado a PAA, tal como NEMOD-TF1,

(viii) incluso más preferentemente cualquier anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se una al trisacárido Core-2 acoplado a PAA,

(ix) lo más preferente, cualquier anticuerpo que se una a TFa-PAA y lo haga menos o no lo haga a TFb-PAA y no se una al trisacárido Core-2 acoplado a PAA y tampoco a cualquiera de las proteínas y construcciones de X-PAA enumeradas en la #lista 2# y que se una a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se una al menos a las células NM-D4, NM-F9 [DSM ACC2606] y ZR-75-1, y por lo que la unión sea sensible al peryodato, tal como NEMOD-TF1.

Dicho anticuerpo específico de Core-1 puede ser un anticuerpo completo de cualquier animal o ser humano, tal como un anticuerpo murino, de rata, de ser humano, de camello, humanizado o quimérico de distintas clases de anticuerpos tales como, pero que no se limitan a IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD o cualquier fragmento de un anticuerpo siempre que este comprenda la especificidad de unión contra Cor-1, tales como anticuerpos Fab, F(ab)2, de Fv monocatenario, o de un solo dominio. Estos anticuerpos también pueden contener al menos un aminoácido adicional o mutaciones o secuencias polipeptídicas, tales como etiquetas, enlazadores o dominios de multimerización y pueden originarse también de otras fuentes distintas a las animales, tales como las plantas y tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos sintéticos que usan, por ejemplo, exposición a fagos o exposición a ribosomas mediante construcción recombinante.

El tratamiento con peryodato para ensayar la sensibilidad al peryodato de la unión al anticuerpo específico de Core-1 frente a TFa-PAA; TFb-PAA (TFβ-PAA, TF beta-PAA) u otras construcciones de PAA (X-PAA), asialoglucoforina, o las células tumorales están de acuerdo con Woodward *et al.* [Woodward MP *et al.*, (1985) J. Immunol. Methods 78: 143-153] y se describen con detalle en los ejemplos. Los expertos en la materia pueden adoptar la tecnología y optimizar las condiciones para los métodos alternativos que se describen en otras partes del presente documento.

De acuerdo con la presente invención la expresión "sensibilidad al peryodato" significa que la unión de un anticuerpo a un antígeno o célula es menor cuando este antígeno o célula se trató con peryodato que cuando su unión al mismo antígeno o célula no se trató con peryodato, tal como se describe con detalle en el ejemplo 9, en el tratamiento con peryodato. Para determinar la sensibilidad de un anticuerpo al peryodato para su especificidad para Core-1 la sensibilidad de su unión al peryodato se ensaya preferentemente con TFa-PAA, TFb-PAA, asialoglucoforina, NM-D4 [documentos 03018576.3 (EP), PCT/IB2009/009281, WO2005/017130 A2, EP1654353]) y/u otras células tumorales. Preferentemente, la unión reducida después del tratamiento con peryodato del antígeno o de la célula es menor del 50 % del equivalente no tratado con peryodato, e incluso más preferente menor del 20 % de la unión al mismo antígeno o célula que se ha tratado sin peryodato.

Los anticuerpos específicos para Core-1 en el sentido de la invención son NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A76-G/A7, HB-T1, HH8, los anticuerpos preferentes son NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A76-G/A7, y HH8, los más preferentes son NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, y A76-G/A7 (obtenibles de Glycotope GmbH Berlín, Alemania), incluso más preferentes NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2, y el más preferente NEMOD-TF1.

La unión de un anticuerpo a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA, Gal beta 1-3 GalNAc beta 1-PAA, GlcNAc beta1-2 Gal beta 1-3 GalNAc alfa 1-PAA, asialoglucoforina, y glucoforina se determina preferentemente en un ELISA, y la unión a las células tumorales se determina preferentemente en análisis de citometría de flujo o análisis de inmunofluorescencia que se describen con detalle en los ejemplos. Los expertos en la materia pueden usar y adoptar métodos alternativos para ensayar la afinidad de dichos anticuerpos tales como, pero que no se limitan a, análisis de Scatchard para la unión celular, análisis de BIACORE, análisis de transferencia de Western, o análisis de transferencia de puntos para la unión antigénica. Los expertos en la materia pueden usar también otras moléculas que portan Core-1 para ensayar una unión de Core-1 tales como (Gal beta1-3 GalNAc alfa-) acoplada con o sin un enlazador adecuado a KLH, biotina o BSA, sin embargo, las realizaciones preferentes anteriormente descritas se mencionan en el sentido de la invención.

De acuerdo con la presente invención la expresión "microorganismo positivo para Core-1" significa cualquier microorganismo que se una al menos por un anticuerpo específico de Core-1. En otra realización dicho microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos dos lectinas distintas, una lectina es una molécula de unión a hidratos de carbono distinta a una molécula de anticuerpos, que se une a Core-1. En una realización preferente dicho microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico de Core-1 y al menos una proteína distinta a un anticuerpo que se una a Core-1 (lectina) tal como (pero que no se limita a) aglutinina de *Arachis hypogaea* (cacahuete) (PNA), aglutinina de *Amaranthus caudatus* (ACA), lectina de *Artocarpus integrifolia* (Jacalina), lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL), o aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA) [Las lectinas están disponibles a partir de Vector Labs., Burlingame, CA, EE.UU., Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU., u

5 otras fuentes]. En una realización preferente dicho microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos dos anticuerpos específicos de Core-1. En una realización más preferente dicho microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos dos anticuerpos específicos de Core-1 y la unión es sensible al peryodato. En una realización preferente adicional, los anticuerpos específicos de Core-1 que se usan en cualquiera de las realizaciones adicionales son NEMOD-TF1, NEMOD-TF2 o A76-G/A7 y la unión es sensible al peryodato. En la realización más preferente dicho microorganismo positivo para Core-1 se une por NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 o NEMOD-TF1 y A76-G/A7 y la unión es sensible al peryodato.

10 Los métodos para ensayar si un anticuerpo específico de Core-1 se une a un microorganismo de esta invención son ELISA e inmunofluorescencia (véase los ejemplos), pero los expertos en la materia pueden usar otros sistemas de ensayo tales como citometría de flujo o varias técnicas de adsorción con el fin de identificar microorganismos positivos para Core-1.

15 El tratamiento con peryodato para ensayar la sensibilidad al peryodato de la unión a un anticuerpo específico para Core con un microorganismo se describe con detalle en el ejemplo 9. De acuerdo con la presente invención la expresión "Sensibilidad al peryodato de Core-1 de un microorganismo" significa que la unión de un anticuerpo específico de Core-1 para dicho microorganismo es menor o mayor cuando dicho microorganismo se trató con peryodato que su unión al mismo microorganismo cuando no se trató con peryodato tal como se describe con detalle en los ejemplos. En una realización preferente dicha unión de un anticuerpo específico de Core-1 a dicho microorganismo es menor cuando dicho microorganismo se trató con peryodato que su unión al mismo microorganismo que no se trató con peryodato. En una realización más preferente, dicha unión reducida del anticuerpo específico de Core-1 para dicho microorganismo después del tratamiento con peryodato del microorganismo es menor del 80 % del equivalente no tratado con peryodato, e incluso más preferentemente menor del 50 % y lo más preferente menor del 30 %.

25 Un microorganismo positivo para Core-1 puede ser cualquier microorganismo tal como, pero que no se limita a, bacterias, cianobacterias, eubacterias, algas, hongos (setas, levaduras, royas, mohos etc.), virus y protozoos, se prefieren los microorganismos bacterianos tales como, pero que no se limitan a, microorganismos aislados del suelo, de plantas, animales, seres humanos u otros organismos vivos superiores tales como gatos, perros, cerdos, vacas, cabras, conejos, ratones, chimpancés. En una realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 es un microorganismo que se origina a partir del sistema gastrointestinal humano.

35 De acuerdo con la presente invención la expresión fracción de un microorganismo positivo para core-1 significa preparaciones o purificaciones de partes más pequeñas de dichos microorganismos tales como una preparación de pared bacteriana, preparación de envuelta, lisados, preparación de lipopolisacáridos, preparación de cápsula, o preparación de polisacáridos de la cápsula. Estas comprenden preferentemente al menos un componente positivo para Core-1 de dicho microorganismo positivo para Core-1. Estas pueden obtenerse mediante preparaciones o purificaciones de al menos un microorganismo positivo para Core-1. Dichas preparaciones y purificaciones pueden obtenerse por métodos conocidos para los expertos en la materia tales como aquellos que se describen anteriormente, o fraccionamiento único o secuencial, extracciones en fenol-agua, extracciones en éter, digestiones con lisozimas o métodos cromatográficos. El componente positivo para Core-1 o la fracción que contiene el componente positivo para Core-1 se detecta mediante unión de la fracción a al menos un anticuerpo específico de Core-1 en sistemas de ensayo tales como, pero que no se limitan a, ELISA o transferencias de puntos que se conocen por los expertos en la materia. En una realización preferente de la invención la fracción que comprende un componente positivo para Core-1 se obtiene mediante cromatografía de afinidad que usa al menos un anticuerpo específico Core-1. En una realización preferente se usa una sola etapa de preparación o purificación. En otra realización preferente se usa una combinación de al menos dos etapas de preparación o purificación.

50 De acuerdo con la presente invención, la expresión componente positivo para Core-1 significa cualquier componente de un microorganismo positivo para Core-1 que se une al menos por un anticuerpo específico de Core-1. Dicho componente positivo para Core-1 comprende al menos una estructura de hidrato de carbono de Core-1 o estructura que imita a Core-1 que puede estar disponible en forma de su molécula natural donde esta parte del microorganismo, tal como un péptido, oligopéptido, polipéptido, lípido, ceramida, hidrato de carbono, lipoproteína, polisacárido, oligosacárido, polisacárido, proteogluano o glucoproteína, o como una parte de dicha molécula natural, o solo. El componente positivo para Core-1 I puede usarse en el sentido de la invención como una fracción del microorganismo positivo para Core-1 como tal o acoplado a otras estructuras transportadoras no naturales tales como proteínas, lípidos, moléculas químicas tales como poli(acrilamida). Preferentemente se usa en su forma natural. El componente positivo para Core-1 puede comprender una sola estructura de hidrato de carbono de Core-1 o estructura que imita a Core-1 o las unidades de repetición de dichas estructuras y puede contener estructuras de hidratos de carbono adicionales o unidades u otras estructuras biomoleculares. Dicha estructura que imita a Core-1 es una estructura que puede unirse por al menos un anticuerpo específico de Core-1 y/o puede incluir una respuesta inmunitaria contra Core-1, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1 o una respuesta inmunitaria celular contra Core-1, y más preferentemente una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1 y una respuesta inmunitaria celular contra Core-1.

De acuerdo con la presente invención, el término coreótico significa un nutraceutico o formulación nutraceutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 o una fracción del mismo.

5 De acuerdo con la presente invención la expresión "enfermedad positiva para Core-1" significa cualquier enfermedad que está asociada con un virus, microorganismo, célula eucariota, célula tumoral u otro material biológico que pueda unirse por al menos uno de los anticuerpos específicos de Core-1 o que se asocia con un componente del cuerpo o que se da en el cuerpo de un humano o animal tal como, pero que no se limita a una célula, célula tumoral, microorganismo, virus o partícula que se une por al menos uno de los anticuerpos específicos de Core-1.

10 Un "agente terapéutico", tal como se usa en el presente documento, comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 o fracción del mismo y puede comprender además otros componentes o elementos o preferentemente un transportador de una composición farmacéutica, fármaco y medicamento conocido para los expertos en la materia. Dicho transportador es una sustancia que puede asociarse con un compuesto activo antes de la administración a un ser humano o a un paciente, generalmente para controlar la estabilidad o biodisponibilidad del compuesto. Los transportadores para el uso dentro de dichas formulaciones son generalmente biocompatibles y también pueden ser biodegradables. Los transportadores incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como la seroalbúminas (por ejemplo, humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidaminas. Los transportadores incluyen también materiales de soporte sólidos tales como esferas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, poliglucolato de polilactato, poli(láctido-co-glucólido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa o dextrano. Un transportador puede portar los compuestos en una variedad de modos, incluyendo el enlace covalente bien directamente o por medio de un grupo enlazador, interacción no covalente o mezcla.

25 La inducción de una respuesta inmunitaria contra Core-1 tal como se describe en otras partes del presente documento también significa, en el sentido de la invención, la potenciación de una respuesta inmunitaria ya existente contra Core-1.

Antecedentes de la invención

30 La glucosilación aberrante es una marca distintiva típica de las células cancerosas. El antígeno Core-1 está enmascarado por otros componentes de hidratos de carbono en tejido sano y con enfermedad benigna pero no se descubre en una mayor parte de los carcinomas y en algunas malignidades no epiteliales. Por lo tanto, el antígeno core-1 es un antígeno específico de pancarcinoma.

35 Core-1 es el disacárido Gal β 1-3 GalNAc, que se une mediante enlace O-glucosídico a una configuración α -anomérica de los hidroxiaminoácidos serina o treonina de las proteínas de las células de carcinoma. Core-1 se expresa en más del 60 % de los carcinomas de colon y más del 90 % de las metástasis hepáticas de cáncer de colon así como en la mayor parte de los carcinomas de otras indicaciones principales que incluyen mama, pulmón, ovario, próstata, y otros cánceres gastrointestinales tales como los carcinomas gástrico y pancreático. Core-1 es un marcador pronóstico independiente para pacientes con carcinomas de colon, la tasa de mortalidad aumenta y la supervivencia media disminuye de acuerdo con el aumento de la intensidad de la expresión de Core-1. El desarrollo de las metástasis hepáticas se correlaciona con la expresión de Core-1. Los pacientes con carcinomas primarios positivos para Core-1 desarrollan metástasis hepáticas en aproximadamente el 60 % de los casos, mientras que el riesgo de metástasis hepáticas con tumores negativos para Core-1 es significativamente más bajo (menor del 20 %). Además de mediar las metástasis en el hígado Core-1 puede jugar también un papel en las metástasis a través del endotelio.

50 La excepcionalmente alta especificidad pan-carcinómica, relevancia pronóstica e implicación directa en la metástasis hepática hace que Core-1 sea una diana principal para la inmunoterapia del cáncer. Debido a la complejidad y la especificidad de especie de la maquinaria de glucosilación no hay inmunoterapia basada en Core-1 disponible para los pacientes de cáncer. Incluso más importante, no existen agentes disponibles para los pacientes que pueda prevenir el desarrollo de tumores positivos para Core-1. Las terapias convencionales habitualmente comienzan después del diagnóstico tumoral, cuando los tumores a menudo están bien establecidos y son difíciles de tratar. Por lo tanto, las terapias agresivas con efectos secundarios graves (quimioterapia, radioterapia, cirugía) se usan para liberar a los pacientes de la masa tumoral. Las opciones inmunoterapéuticas se aplican principalmente en los ajustes de adyuvante con enfermedad residual mínima.

60 Por el contrario, la presente invención se centra en la prevención del desarrollo de tumores positivos para Core-1 estableciendo un mecanismo de inmunovigilancia que elimina las células tumorales de nueva aparición, impidiendo del mismo modo el crecimiento del tumor primario. Los probióticos y prebióticos convencionales dan como resultado la estimulación total inespecífica del sistema inmune. No está implicado el sistema específico de tumores. Por el contrario, la presente invención activa el sistema inmunitario de un modo específico de tumores induciendo altos niveles de anticuerpos anti-Core-1. Por lo que se sabe, la presente invención es el primer aditivo alimentario/nutraceutico específico de antígeno que es capaz de activar una protección inmuno-específica contra tumores y el primer aditivo alimentario que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica del antígeno de hidrato de carbono de un tumor. Además, no hay terapia inmunitaria sistémica contra los tumores positivos para

Core-1 que comprenda microorganismos positivos para Core-1 en una composición farmacéutica ni métodos disponibles para proporcionar dichos microorganismos.

5 El objeto de la presente invención es proporcionar una enseñanza técnica que podría no implicar las desventajas anteriormente mencionadas de la técnica anterior, permitiendo la profilaxis y el tratamiento fácil, seguro y eficaz de los tumores positivos para Core-1 y los trastornos gastrointestinales.

Sumario de la invención

10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una formulación seleccionada del grupo que comprende un nutracéutico y/o una composición farmacéutica, que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), y/o al menos un lisado o fracción del mismo.

15 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), y/o un lisado o fracción del mismo para el uso como un medicamento y/o nutracéutico para la terapia o profilaxis de un tumor, o para el uso *in vivo* o *in vitro* en un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica para Core-1 y/o para generar células dendríticas funcionales o células T, líneas de células T o clones de células T activados o anticuerpos contra Core-1. En las siguientes, se mencionan AG6 y MU6 también como el/los microorganismo(s) o microorganismo(s) positivo (s) para Core-1 de acuerdo con la invención.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), y/o un lisado o fracción del mismo.

25 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un kit para inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica en un ser humano o animal contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1, que comprende una formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), y/o al menos un lisado o fracción del mismo, o que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), o una fracción del mismo, y una información relacionada con el uso del kit.

30 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un kit para reducir o prevenir la aparición de una enfermedad o un tumor positivo para core-1, que comprende una formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), y/o al menos un lisado o fracción del mismo, o que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), o una fracción del mismo, y una información relacionada con el uso del kit.

35 La presente invención proporciona medios para la inducción o elevación de los niveles de anticuerpo anti-Core-1 en seres humanos por lo que induce una respuesta protectora contra tumores, especialmente tumores positivos para Core-1. Además, la invención proporciona por primera vez medios para la inducción de una respuesta inmunitaria celular específica contra un hidrato de carbono diana y especialmente contra un hidrato de carbono diana específico de un tumor. La presente invención también proporciona por primera vez medios para inducir una respuesta inmunitaria específica y no una tolerancia contra una diana tumoral por medio de la administración oral. La invención también divulga por primera vez métodos para la identificación y el aislamiento de microorganismos adecuados. Otra ventaja de la presente invención es que, debido a la naturaleza de la formulación de la producción, se originan costes muy bajos. Además, la formulación puede producirse rápidamente en fermentadores a gran escala.

40 Fue sorprendente que los anticuerpos anti-Core-1, introducidos por la formulación de la presente invención, sirvan como un mecanismo de inmunovigilancia que previene el desarrollo de tumores primarios y la distribución de metástasis en la mayor parte de los casos (no reconocidos), si la respuesta inmunitaria específica es suficientemente alta. Por lo tanto, el objetivo de la invención es proporcionar los medios para introducir un título anti-Core-1 altamente específico, preferentemente combinado con una respuesta celular específica, mediante el uso de una película de microorganismos positivos para Core-1 de la flora intestinal de donantes sanos como aditivos alimentarios con el fin de construir una protección inespecífica contra tumores o prevenir o reducir la incidencia de tumores positivos para Core-1 y/o sus metástasis.

45 Sorprendentemente, los microorganismos de la invención proporcionados fueron capaces de activar a las células T humanas de un modo específico de Core-1 cuando se presentaban por células dendríticas humanas (*in vitro*). No hay informes que documenten una respuesta inmunitaria celular y especialmente una respuesta inmunitaria celular citotóxica contra un antígeno de hidrato de carbono tumoral y especialmente un hidrato de carbono tumoral pequeño no cargado. No hay informes de presentación de antígenos tumorales de hidratos de carbono humanos en células dendríticas humanas, los reguladores principales del sistema inmune, y especialmente de estructuras de hidratos de carbono no humanos originadas de microorganismos. Por el contrario, la opinión científica general es que los seres

humanos no desarrollan una respuesta inmunitaria celular específica de hidratos de carbono y especialmente no contra antígenos de hidratos de carbono tumorales. Los microorganismos de esta invención se procesaron y presentaron por células dendríticas humanas y esas células dendríticas cargadas de coreóticos podrían usarse para activar células T humanas primarias específicamente contra Core-1. Las células T generadas por sensibilización con lisados de las bacterias positivas para Core-1 de la presente invención mostraron fuertes respuestas inmunes después de la reestimulación con lisados de células tumorales humanas positivas para Core-1 tal como se documenta por la secreción de citocinas que documentan la respuesta específica de células T y especialmente las respuestas de células T citotóxicas.

Es sorprendente que sea posible cargar células dendríticas humanas con los microorganismos positivos para Core-1 de acuerdo con la presente invención o con moléculas que portan Core-1 y alcanzar una activación específica de Core-1 de las células T humanas. Es aún más sorprendente que las células inmunes humanas activadas por las células dendríticas humanas cargadas con dichos microorganismos positivos para Core-1 puedan activarse adicionalmente o reestimularse usando células dendríticas humanas cargadas con moléculas positivas par Core-1 tales como lisados de NM-D4 o NM-F9 o asialoglucoforina mostrando que (i) pueden activarse células T específicas de Core-1 por un microorganismo positivo para Core-1, y que (ii) estas respuestas inmunes comprenden células T específicas de Core-1 que pueden activarse adicionalmente o reestimularse por DC cargadas con moléculas que portan Core-1. Es sorprendente, además, que la estructura de Core-1 pueda detectarse por anticuerpos específicos de Core en DC cargadas con microorganismos positivos para Core-1 así como en DC cargadas con asialoglucoforina. Es sorprendente además que no solamente la secreción de GM-CSF y la proliferación de células T pueda inducirse potentemente usando microorganismos positivos para Core-1 de la invención sino también la secreción de INFgamma (interferón gamma) e incluso más sorprendente la supresión TNFalfa (factor de necrosis tumoral alfa) mostrando la activación de células T citotóxicas específicas de Core-1. Es sorprendente, además, que las células T específicas de Core-1 puedan reestimularse al menos 4 veces *in vitro* lo que indica una respuesta inmunitaria celular fuerte y específica contra el antígeno tumoral y mediada por el tumor mediante las células T. Estas respuestas inmunes son una prueba para los expertos en la materia de que los microorganismos positivos para Core-1 proporcionados por la presente invención son capaces de inducir una potente respuesta inmunitaria celular anti-Core-1 en humanos.

La activación de la inmunidad celular además de la inmunidad humoral potencia fuertemente el potencial profiláctico y terapéutico de los microorganismos de la presente invención. El uso de las bacterias que habitualmente habitan el tracto intestinal de los seres humanos da como resultado un agente profiláctico y terapéutico que no causa efectos secundarios no deseados. La naturaleza del hidrato de carbono es responsable de la falta de tolerogenicidad relevante y no muestra reacciones alérgicas relevantes.

Sorprendentemente, la formulación de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, alimento o fármaco que comprende el microorganismo positivo para Core-1) puede usarse para fines profilácticos y terapéuticos y en el mantenimiento de las actividades inmunológicas. La formulación farmacéutica de la invención contiene un microorganismo positivo para Core-1 y un transportador farmacéuticamente aceptable. La preparación y administración de la formulación de esta invención (por ejemplo, fármaco que comprende un microorganismo positivo para core-1) está de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, la formulación puede combinarse con los adyuvantes galénicos convencionales para formar una composición adecuada para el método deseado de aplicación. Por ejemplo, los compuestos de esta invención pueden emplearse mezclados con excipientes convencionales, es decir, sustancias transportadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la aplicación parenteral o enteral que no reaccionan de modo perjudicial con los compuestos activos. Los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, soluciones salinas, alcoholes, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, parafina viscosa, aceite esencial, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritrol, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, talco, etc.

Descripción de la Invención

La invención proporciona nutraceuticos y composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 o fracciones del mismo así como un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 y fracciones del mismo adecuado para inducir respuestas inmunes contra células tumorales que portan Core-1 y moléculas que portan Core-1. Además esta describe métodos para la identificación, selección y aislamiento de un microorganismo positivo para Core-1 que es adecuado como una parte eficaz de composiciones nutraceuticas o farmacéuticas que inducen una respuesta inmunitaria contra Core-1 en seres humanos o animales. Esta describe sistemas de ensayo específicos de la respuesta inmunitaria humoral y celular para ensayar las respuestas inmunes de Core-1 y divulga métodos para la generación de anticuerpos anti-Core-1 y composiciones de anticuerpos así como líneas y clones de células T anti Core-1.

A) Nutracéuticos, composiciones farmacéuticas y ensayos de respuesta inmune

La invención proporciona una formulación seleccionada del grupo que comprende un nutracéutico y/o una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 y/o al menos un lisado o fracción del mismo, donde el microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico de Core-1.

En una realización preferente, dicha formulación induce o potencia una respuesta inmunitaria contra Core-1 en al menos un humano o animal que reconoce el antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1. En una realización preferente dicha formulación induce o potencia una respuesta inmunitaria humoral y/o celular contra Core-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1, preferentemente una respuesta inmunitaria celular de tipo Th1. En una realización preferente, la formulación induce o potencia una respuesta inmunitaria humoral y/o celular contra Core-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1, preferentemente una respuesta inmunitaria celular que comprende la activación de las células T DC4 positivas de Th1 y/o células T DC8+ positivas citotóxicas.

En otra realización preferente, la formulación induce o potencia dicha respuesta inmunitaria específica para Core-1 en al menos un ser o animal cuando se administra, y/o que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 teniendo el potencial para destruir una célula positiva para Core-1 y/o que reduce o previene la aparición de una enfermedad tumor o metástasis positivo para Core-1, y/o que reduce o previene la diseminación o metástasis de una enfermedad o tumor positivo para Core-1, y/o que fortalece el sistema inmunitario y/o mejora una respuesta inmune.

La invención proporciona un nutracéutico o una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 o al menos una fracción del mismo donde el microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico para Core-1.

La invención proporciona un nutracéutico que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU6 o una fracción del mismo que induce una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales que reconocen al antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1 y/o una enfermedad positiva para Core-1. La invención proporciona un nutracéutico que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 o una fracción del mismo donde el microorganismo positivo para Core-1 se une al menos por un anticuerpo específico de Core-1 y que induce o potencia una respuesta inmunitaria contra Core-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU6 o una fracción del mismo que induce una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales que reconocen al antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1 y/o una enfermedad positiva para Core-1. La invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 o una fracción del mismo donde el microorganismo positivo para Core-1 se une al menos por un anticuerpo específico de Core-1 y que induce o potencia una respuesta inmunitaria contra Core-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1. La invención proporciona un nutracéutico o una formulación farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 o una fracción del mismo donde el microorganismo positivo para Core-1 se une al menos por un anticuerpo específico de Core-1 y que induce o potencia una respuesta inmunitaria celular y/o humoral en al menos un ser humano o animal contra Core-1.

Dicho anticuerpo específico de Core-1, anticuerpos específicos de Core-1 preferentes, combinaciones de anticuerpos específicos de Core-1 o combinaciones preferentes de anticuerpos específicos de Core-1 se describen con detalle en las Definiciones y en otras partes del presente documento.

En una realización preferente de la invención se proporcionan el nutracéutico o la formulación farmacéutica tal como se describe anteriormente en la que dicho al menos un microorganismo positivo para Core-1 se une por el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF1, más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y por NEMOD-TF1 y dicha unión es sensible al peryodato, y más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1 pero no por A68-B/A11.

Dicho microorganismo positivo para Core-1, microorganismo positivo para Core-1 preferente, fracción de microorganismo positivo para Core-1 y fracciones preferentes de microorganismos positivos para Core-1 y combinaciones de los mismos se describen con detalle en las Definiciones y en otras partes del presente documento, así como los métodos para identificar y aislar dichos microorganismos o fracciones de los mismos.

El microorganismo positivo para Core-1 o fracción del mismo representa el principio activo que induce la especificidad de la respuesta inmunitaria contra Core-1, el antígeno Core-1 y/o célula tumoral y/o enfermedad positiva para Core-1.

- 5 Dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1 y/o a una respuesta inmunitaria celular contra Core-1.

En una realización preferente de la invención dicho microorganismo positivo para Core-1 se une por

- 10 (i) al menos uno de los anticuerpos específicos para Core-1 de los siguientes anticuerpos: HB-T1 (IgM) (DakoCytomation GmbH, Hamburgo; 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 group A associated structure, ga-lactosyl-A: specificity and relation to the Thomsen-Friedenreich antigen. *Mol Immunol* 25:199-204 (1988)], A78-G/A7 [Glycotope GmbH, Berlín; Karsten U, Butschak G, Cao Y, Goletz S, Hanisch FG. A new monoclonal antibody (A78-G/A7) to the Thomsen-Friedenreich pan-tumor antigen. *Hybridoma* Feb de 1995 ;14(1):37-44], A68-B/A11 [Gly-cotope GmbH, Berlín, www.glycotope.com], NEMOD-TF1 [Glycotope GmbH, Berlín; 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], o NEMOD-TF2 [Glycotope GmbH, Berlín; 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] más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA pero no a cualquiera de las sustancias de la #lista 2#,
- 15 (ii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no lo hace a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y esta unión es sensible al peryodato,
- 20 (iii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no lo hace a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une a al menos una línea celular tumoral fuera de NM-D4, NM-F9 [DSM ACC2606], ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tales como NEMOD-TF2 o A78-G/A7,
- 25 (iv) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA,
- 30 (v) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA y tampoco a cualquiera de las construcciones de X-PAA enumeradas en la #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 [DSM ACC2606] y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tal como, NEMOD-TF1,
- 35 (vi) incluso más preferentemente por al menos dos de los anticuerpos anteriormente descritos,
- 40 (vii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no lo hace a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une a al menos una línea celular tumoral fuera de NM-D4, NM-F9 [DSM ACC2606], ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tales como NEMOD-TF2 o A78-G/A7, y por al menos un anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA,
- 45 (viii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA y tampoco a cualquiera de las construcciones de X-PAA enumeradas en la #lista 2# y que se unen a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 [DSM ACC2606] y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tal como, NEMOD-TF1,
- 50 (ix) incluso más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1,
- 55 (x) y más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1 pero no por A68-B/A11.
- 60

En una realización preferente, la invención proporciona una formulación seleccionada del grupo que comprende un nutracéutico y/o una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 y/o al menos un lisado o fracción del mismo, donde el microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico de Core-1, donde el anticuerpo específico de Core-1 se selecciona de grupo que comprende NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A78-G/A7, A68-B/A11,

65

HB-T1 y/o HH8. En una realización preferente adicional, la invención proporciona dicha formulación, en la que el microorganismo positivo para Core-1 se une por los anticuerpos específicos de Core-1 NEMOD-TF2 y Nemod-TF1, por lo que la unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato mostrando una unión reducida significativamente después del tratamiento con peryodato.

5 En una realización preferente adicional, la invención proporciona un nutraceutico o una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU6 o una fracción del mismo que induce una respuesta inmunitaria humoral y una celular en seres humanos o animales que reconocen al antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1. En una realización preferente de la invención el nutraceutico o la composición farmacéutica induce o potencia una respuesta inmunitaria específica de Core-1 en al menos un ser humano o animal funcionando como una protección contra células cancerosas positivas para Core-1, teniendo el potencial de destruir células cancerosas positivas para Core-1.

15 En una realización preferente de la invención, la composición nutraceutica de acuerdo con la invención se usa para construir una respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1, teniendo el potencial de destruir esas células tal como se muestra en el presente documento, por ejemplo, por la inducción de los anticuerpos específicos para Core-1, por citotoxicidad dependiente del complemento específica de anticuerpos de Core-1 contra las células tumorales positivas para Core-1 destruyéndolas eficazmente, o por la secreción de TNFalfa y/o INF gamma mediante respuestas de células T específicas de Core-1 que son marcadores subrogados reconocidos científicamente por los expertos en la materia para una destrucción de células tumorales mediada por células T citotóxicas para las células tumorales que portan el Core-1, tal como se muestra en los ejemplos y como se describe en el presente documento.

25 En una realización preferente adicional de la invención, la composición nutraceutica de acuerdo con la invención se usa para construir una respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 teniendo el potencial de destruir esas células tal como se muestra en el presente documento por ejemplo por la inducción de los anticuerpos específicos para Core-1, mediante citotoxicidad dependiente del complemento específica de anticuerpos de Core-1 contra las células tumorales positivas para Core-1 destruyéndolas eficazmente, y mediante la secreción de TNFalfa y/o INF gamma mediante respuestas de células T específicas de Core-1 que son marcadores subrogados reconocidos científicamente por los expertos en la materia para una destrucción celular de células tumorales mediada por células citotóxicas para las células tumorales que portan el Core-1, tal como se muestra en los ejemplos y como se describe en el presente documento.

35 En una realización preferente adicional de la invención, la composición nutraceutica de acuerdo con la invención se usa con el fin de construir dicha respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1, que tiene el potencial de destruir esas células tal como se describe anteriormente administrando por vía oral del nutraceutico (al menos una vez) en individuos sanos. En una realización de la invención, la composición nutraceutica de acuerdo con la invención se usa con el fin de reducir o incluso se prefiere adicionalmente para prevenir que aparezca una enfermedad o tumor positivo para Core-1 administrando por vía oral del nutraceutico en (al menos un) individuo sano.

45 En una realización preferente de la invención, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se usa para construir una respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 teniendo el potencial de destruir esas células tal como se muestra en el presente documento. por ejemplo, por la inducción de los anticuerpos específicos para Core-1, la citotoxicidad dependiente del complemento específica de anticuerpos de Core-1 contra las células tumorales positivas para Core-1 destruyéndolas eficazmente, o mediante la secreción de TNFalfa y/o INF gamma mediante respuestas de células T específicas de Core-1 que son marcadores subrogados reconocidos científicamente por los expertos en la materia para una destrucción celular de células tumorales mediada por células citotóxicas para las células tumorales que portan el Core-1, tal como se muestra en los ejemplos y como se describe en el presente documento.

50 El nutraceutico o la composición farmacéutica de la invención se usa para tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 en al menos un humano o animal.

55 En una realización preferente adicional de la invención, la formulación nutraceutica o farmacéutica de acuerdo con la invención se usa con el fin de reducir o incluso se prefiere más para prevenir la aparición de una enfermedad o tumor o metástasis positiva para Core-1. En una realización preferente adicional, la invención proporciona un nutraceutico o una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1 o una fracción del mismo que reduce o previene la diseminación o metástasis de una enfermedad o tumor positivo para Core-1 en al menos un humano o animal cuando se administra. En una realización preferente adicional de la invención, la formulación nutraceutica o farmacéutica comprende al menos dos microorganismos positivos para Core-1 distintos o fracciones de los mismos. En una realización preferente adicional de la invención, el nutraceutico o formulación farmacéutica comprende el al menos un microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención o fracción de la misma combinado con al menos un otro microorganismo beneficioso. En una realización preferente de la invención, la composición nutraceutica de acuerdo con la invención se usa con el fin de tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 por

vía oral administrando el nutracéutico a pacientes que padecen de esta enfermedad.

En una realización preferente de la invención, la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención se usa con el fin de tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 en pacientes que padecen esta enfermedad. En otra realización preferente de la invención de la composición nutracéutica o farmacéutica de la invención anteriormente mencionada comprende el al menos un microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención y al menos una fracción de un microorganismo positivo para Core-1, preferentemente de más de un microorganismo positivo para Core-1.

Las células dendríticas, también denominadas DC (del inglés *dendritic cells*) en el presente documento, pueden ser cualquiera de las células dendríticas o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de células que comprende células dendríticas o al menos una célula dendrítica. Estas pueden derivar de donantes humanos que están sanos o que tienen una enfermedad, tales como, pero que no se limitan a, enfermedad tumoral o enfermedad de Crohn o enfermedad positiva para Core-1 o una de las enfermedades enumeradas en otras partes del presente documento, o de animales. Dichas DC pueden obtenerse y cargarse tal como se conoce por los expertos en la materia y se obtienen típicamente de células precursoras DC34 positivas o células monocíticas DC 14 positivas de sangre humana o médula ósea que se diferencian en células dendríticas inmaduras (DCi) usando determinadas combinaciones de moléculas adecuadas conocidas para los expertos en la materia. Las DCi se cargan con el microorganismo positivo para Core-1 o con la molécula que porta Core-1, o controles apropiados, y se maduran adicionalmente usando determinada combinación de moléculas adecuadas conocidas por los expertos en la materia para obtener células dendríticas que corresponden a células dendríticas cargadas maduras (DCm) que son capaces de activar a las células T.

Dichas DC pueden originarse también a partir de una línea de células dendríticas tal como, pero que no se limita a, la línea de células dendríticas humanas NEMOD-DC (obtenible de Glycotope GmbH Berlín, Alemania; www.glycotope.com) o Mutz-3.

La carga de las células dendríticas significa que las células dendríticas se incuban en el estado de diferenciación y maduración apropiado con cantidades adecuadas de un microorganismo positivo para Core-1, o fracciones o lisados del mismo o al menos una molécula que porta Core-1 durante un tiempo adecuado, típicamente esto se da dentro de la etapa de maduración anteriormente descrita en combinación con moléculas adecuadas, típicamente durante de 24 a 48 horas, conduciendo a las células dendríticas cargadas capaces de activar células inmunes, preferentemente células T auxiliares, que comprenden células T específicas para Core-1.

Las células inmunes pueden ser MCSP (células mononucleares de sangre periférica) u otras poblaciones celulares que comprenden células T DC4+ y /o DC8+ T, preferentemente células T DC4+ y DC8+. Los expertos en la materia saben cómo ganar esas células de un humano o animal y que la generación de esas células puede comprender preparaciones mediante gradiente de ficoll de sangre humana o de células sanguíneas o leucoferesis y puede comprender en el caso del enriquecimiento adicional mediante tecnologías de clasificación magnética específica de células T.

En una realización preferente, las células dendríticas coinciden en al menos una clase de molécula de MHC con respecto a las células inmunes, preferentemente en una molécula de MHC de clase I o molécula de MHC de clase II, más preferentemente en al menos una molécula de MHC de clase I y una molécula de MHC de clase II, más preferentemente en más moléculas de MHC y más preferentemente en todas las moléculas de MHC. Esto último puede alcanzarse obteniendo las células dendríticas y las células inmunes del mismo individuo.

Los tiempos y condiciones apropiados para el cultivo de las células inmunes con las células dendríticas cargadas y para la adición posterior de las células dendríticas cargadas son conocidos por los expertos en la materia y pueden optimizarse por estos tomando en consideración las condiciones en las que están las células. Típicamente el tiempo de incubación es de 7 a 10 días para cada una de las dos etapas (activación primaria y reestimulación).

Preferentemente, las células dendríticas son células dendríticas funcionales obtenidas de la línea de células de leucemia MUTZ-3 o de células derivadas de MUTZ-3 tales como NEMOD-DC [tal como se describen en los documentos DE10139428 A1, WO2003/023023 A1, EP01419240, US20040265998, CA2457287, 10139428.4 (DE), PCT/EP02/09260, 02758474.7 (EP), US10/486.966, CA2.457.287] y obtenibles de Glycotope GmbH Berlín, Alemania [www.glycotope.com]. Esas células dendríticas son células dendríticas activas que son totalmente capaces de activar células T y procesar y/o presentar antígenos en su superficie incluidos en moléculas de clase MHC. En una realización preferente adicional de la invención, las células dendríticas son células dendríticas funcionales obtenidas de MUTZ-3 o células derivadas de MUTZ-3, tales como NMD-200, y las células inmunes coinciden en las moléculas de MHC de clase I tales como HLA-A2 o HLA-B44, preferentemente HLA-A2 y HLA-B44. En una realización preferente adicional se usa un lisado de NM-D4 o NM-F9 como la molécula que porta Core-1 y MN-ts [que es la célula parental de NM-D4 o NM-F9 tal como se describe en los documentos WO2005/017130 A2 y EP1654353] o NM-H9 [NM-H9D8, DSM ACC2806], que difiere en el potencial de sializar y por lo tanto, al contrario que NM-D4 y NM-F9, no porta Core-1 en su superficie, como un control en el correspondiente formato tal como formas vivas o destruidas, o un lisado de las células o una fracción de las mismas, el más preferente es un lisado,

ambos se cargan en las DC y se usan para la reestimulación. En otra realización preferente, cada glucoforina o aialoglucoforina tratada con peryodato como un control para aialoglucoforina se carga en la DC y se usa para la reestimulación. En otra realización preferente adicional, se usa un lisado de NM-D4 o NM-F9 y aialoglucoforina como molécula que porta Core-1 para la reestimulación y NM-ts [NM-H9] y se usan como controles negativos glucoforina o aialoglucoforina tratada con peryodato y/o aialoglucoforina y/o DC sin cargar.

Dicho nutraceutico de la invención puede consistir en al menos un microorganismo positivo para Core-1 o fracción del mismo solamente, tal como, pero que no se limita a, un microorganismo que está vivo o destruido, liofilizado, o pasteurizado, o lisados, o componentes, o fracciones de los mismos, o en una forma al menos parcialmente solubilizada en un líquido, o puede consistir en componentes adicionales tales como, pero que no se limitan a otros nutrientes, aditivos nutricionales o aditivos alimentarios o de bebidas, soluciones o emulsiones conocidos para los expertos en la materia. Dicho nutraceutico puede aplicarse por vía oral en distintas formas, tales como cápsulas, comprimidos, emulsiones, polvos, líquidos. El nutraceutico puede darse en sí mismo o mezclarse con alimentos o bebidas. Dicho nutraceutico también puede ser cualquier alimento, bebida, componente de una bebida o alimento, un aditivo alimentario, o un solo soporte nutraceutico.

En una realización preferente, el nutraceutico se usa como una cápsula o comprimido. En otra realización preferente, el nutraceutico se mezcla con alimentos o bebidas tales como, pero que no se limitan a, los enumerados en otras partes de esa invención.

B) Provisión de microorganismo positivo para Core-1

La invención proporciona al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 y MU1, donde el microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico de Core-1.

El microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención es adecuado para el uso como un componente para un nutraceutico o una composición farmacéutica de la invención en la que el microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico de Core-1.

El microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención induce una respuesta inmunitaria específica contra Core-1, el antígeno Core-1, las células tumorales positivas para Core-1 o la enfermedad positiva para Core-1 en seres humanos o en animales.

El microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención es adecuado para el uso como un componente para un nutraceutico o una composición farmacéutica de la invención en la que el microorganismo positivo para Core-1 induce una respuesta inmunitaria específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales.

El microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención representa el principio activo de la composición nutraceutica o farmacéutica de la invención que induce la especificidad de la respuesta inmunitaria contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales.

El microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención induce o potencia una respuesta inmunitaria específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales cuando se usa en una composición nutraceutica o farmacéutica de la invención. En una realización preferente de la invención, dicho microorganismo positivo para Core-1 se une por

(i) al menos uno de los anticuerpos específicos de Core-1 de los siguientes anticuerpos HB-T1, HH8, A78-G/A7, A68-B/A11, NemoD-TF1, o NemoD-TF2;

(ii) más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une TFa-PAA y, lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA, pero no lo hace a cualquiera de las sustancias de la #lista 2#;

(iii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no lo hace a ninguna de las sustancias enumeradas en la lista #lista 2 # y que se une a aialoglucoforina y no a glucoforina y esta unión es sensible al peryodato,

(iv) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no lo hace a ninguna de las sustancias enumeradas en la lista #lista 2 # y que se une a aialoglucoforina y no a glucoforina y que se une a al menos una línea celular tumoral humana fuera de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato (tales como NEMOD-TF2 o A78-G/A7);

(v) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA, incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no se une al trisacárido Core-2 acoplado a

PAA y tampoco a cualquiera de las construcciones de X-PAA enumeradas en la #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato (tal como NEMOD-TF1);

5 (vi) incluso más preferentemente por al menos dos de los anticuerpos anteriormente descritos;

(vii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace TFb-PAA y tampoco a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une al menos a una línea celular tumoral humana fuera de
10 NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tales como NEMOD-TF2 o A78-G/A7, y por al menos un anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA,

(viii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA y tampoco a cualquiera de las construcciones de X-PAA enumeradas en la #lista 2# y que se unen a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato tal como NEMOD-TF1;

(ix) incluso más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1;

(x) e incluso más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1 pero no por A68-B/A11.

(xii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace TFb-PAA y tampoco a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y esta unión sea sensible al peryodato,

(xiii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no lo hace a TFb-PAA y tampoco a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se una a al menos una línea celular tumoral humana fuera de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tales como NEMOD-TF2 o A78-G/A7,

(xiv) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA;

(xv) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA y tampoco a cualquiera de las construcciones de X-PAA enumeradas en la #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato tal como NEMOD-TF1;

(xvi) incluso más preferentemente por al menos dos de los anticuerpos anteriormente descritos;

(xvii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no lo hace a TFb-PAA y tampoco a ninguna de las construcciones X-PAA enumeradas en la lista #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une a al menos una línea celular tumoral humana fuera de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tales como NEMOD-TF2 o A78-G/A7, y por al menos un anticuerpo de las características de unión anteriores, pero que no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA,

(xviii) incluso más preferentemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA y tampoco a cualquiera de las sustancias enumeradas en la #lista 2# y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato (tal como NEMOD-TF1);

(xix) incluso más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF I;

(xx) e incluso más preferentemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF 1 pero no por A68-B/A11.

60 En una realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se une por al menos dos anticuerpos específicos de Core-1.

65 En una realización preferente el microorganismo positivos para Core-1 de acuerdo con la invención se une por al menos un anticuerpo que se una a TFa-PAA y lo hace menos o no lo hace a TFb-PAA y tampoco a ninguna de las sustancias enumeradas en la lista #lista 2 # y que se une a asialoglucoforina y no a glucoforina y que se una a al menos una línea celular tumoral humana fuera de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, y que se une por al menos un anticuerpo de las características de unión anteriores,

pero que no se une al trisacárido Core-2 acoplado a PAA. En una realización más preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se une por al menos NEMOD-TF2 o A78-G/A7 o NEMOD-TF1. En una realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se une por el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF1 por lo que la unión se ensaya en un ELISA y la señal del ELISA con el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF1 es al menos 3 veces la del fondo cuando se recubre a una concentración de microorganismos de $1 \times 10^7/m$, más preferentemente de $5 \times 10^6/ml$, incluso más preferentemente de $1 \times 10^6/ml$, lo más preferente de $1 \times 10^5/ml$. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se une por el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF2 por lo que la unión se ensaya en un ELISA y la señal del ELISA con el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF2 es al menos 3 veces la del fondo cuando se recubre a una concentración de microorganismos de $1 \times 10^7/m$, más preferentemente de $5 \times 10^6/ml$, incluso más preferentemente de $1 \times 10^6/ml$, lo más preferente de $1 \times 10^5/ml$. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se une por el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF2 por lo que la unión se ensaya en un ELISA y la señal del ELISA con el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF2 es al menos 3 veces la del fondo cuando se recubre a una concentración de microorganismos de $1 \times 10^7/m$, más preferentemente de $5 \times 10^6/ml$, incluso más preferentemente de $1 \times 10^6/ml$, lo más preferente de $1 \times 10^5/ml$ y por lo que la unión es sensible al peryodato mostrando una señal de ELISA reducida después del tratamiento con ácido peryódico, preferentemente la señal de ELISA muestra una reducción de al menos el 30 %, más preferentemente de al menos 50 % y lo más preferente de al menos el 80 %. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se une por el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF1 por lo que la unión se ensaya en un ELISA y la señal del ELISA con el anticuerpo específico de Core-1 NEMOD-TF1 es al menos 3 veces la del fondo cuando se recubre a una concentración de microorganismos de $1 \times 10^7/m$, más preferentemente de $5 \times 10^6/ml$, incluso más preferentemente de $1 \times 10^6/ml$, lo más preferente de $1 \times 10^5/ml$ y por lo que la unión es sensible al peryodato mostrando una señal de ELISA reducida después del tratamiento con ácido peryódico, preferentemente la señal de ELISA muestra una reducción de al menos el 30 %, más preferentemente de al menos 50 % y lo más preferente de al menos el 80 %. En una realización preferente adicional el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se une por los anticuerpos específicos de Core-1 NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 por lo que la unión se ensaya en un ELISA y la señal del ELISA es al menos 3 veces la del fondo cuando se recubre a una concentración de microorganismos de $1 \times 10^7/m$, más preferentemente de $5 \times 10^6/ml$, incluso más preferentemente de $1 \times 10^6/ml$, lo más preferente de $1 \times 10^5/ml$ y por lo que la unión es sensible al peryodato mostrando una señal de ELISA reducida después del tratamiento con ácido peryódico, preferentemente la señal de ELISA muestra una reducción de al menos el 30 %, más preferentemente de al menos 50 % y lo más preferente de al menos el 80 %.

En una realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención induce o potencia una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales.

En una realización preferente de la invención la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 o una respuesta inmunitaria celular contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1.

En una realización preferente adicional de la invención la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 y una respuesta inmunitaria celular contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1.

Dicho anticuerpo específico de Core-1, preferentemente anticuerpos específicos de Core-1, combinaciones de anticuerpos específicos de Core-1 o combinaciones preferentes de anticuerpos específicos de Core-1 se describen con detalle en las Definiciones y en otras partes del presente documento. Dichas composiciones nutracéuticas o farmacéuticas y realizaciones preferentes de las mismas se describen con detalle en otras partes del presente documento.

Dicha respuesta inmunitaria humoral contra Core-1 y dicha respuesta inmunitaria celular contra Core-1 se describe con detalle en otras partes de la presente invención. En una realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención induce o potencia una respuesta inmunitaria humoral y celular específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales que pueden detectarse por al menos un ensayo de respuesta inmunitaria humoral y al menos un ensayo de respuesta inmunitaria celular.

En una realización preferente adicional el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención puede usarse para construir una respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 teniendo el potencial de destruir esas células tal como se muestra en el presente documento por ejemplo por la inducción de los anticuerpos específicos para Core-1, mediante citotoxicidad dependiente del complemento específica de anticuerpos de Core-1 contra las células tumorales positivas para Core-1 destruyéndolas eficazmente, y/o mediante la secreción de TNFalfa y/o INF gamma mediante respuestas de células T específicas de Core-1 que son marcadores subrogados reconocidos científicamente por los expertos en la materia para una destrucción de células tumorales mediada por células T citotóxicas para las células tumorales que portan el Core-1, cuando se usa como un nutracéutico o como una composición farmacéutica de la invención.

5 En una realización preferente adicional el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención puede usarse con el fin de construir dicha respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 que tiene el potencial de degradar esas células tal como se describe en otras partes del presente documento administrando por vía oral del nutraceutico (al menos una vez) en individuos sanos.

10 En una realización preferente adicional el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención puede usarse con el fin de reducir o incluso se prefiere adicionalmente para prevenir que aparezca una enfermedad o tumor positivo para Core-1 administrando por vía oral del mismo un componente del nutraceutico de la invención en (al menos un) individuo sano.

15 En una realización preferente adicional el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención puede usarse con el fin de reducir o incluso se prefiere más para prevenir que aparezca una enfermedad o tumor positivo para Core-1 cuando se administra como un componente de una formulación farmacéutica de la invención en (al menos un) individuo.

20 En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se usa como el principio activo de un nutraceutico para tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 administrando por vía oral el nutraceutico en pacientes que padecen esta enfermedad.

25 En una realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención se usa como el principio activo de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 en pacientes que padecen esta enfermedad administrando la composición farmacéutica tal como se describe en otras partes del presente documento.

30 En una realización preferente la invención proporciona o usa el

- (i) microorganismo positivo para Core-1 de la invención, o
- (ii) el nutraceutico o la formulación farmacéutica que comprende un microorganismo positivo para Core-1

35 que se selecciona del grupo que comprende la nueva cepa de *Bacteroides ovatus* AG6(DSM 18726), y la nueva cepa de *Bacteroides ovatus* MU1(DSM 18728) depositada en la "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" en Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) el 20 de octubre de 2006.

40 En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo positivo para Core-1 (componente activo) del nutraceutico o la formulación farmacéutica es una combinación de microorganismos positivos para Core-1 de cepas distintas. En una realización preferente adicional dicho componente activo es una combinación de microorganismos positivos para Core-1 de distintas cepas seleccionados de las cepas AG6, MU1 y LH2. En una realización preferente adicional la composición nutraceutica o farmacéutica (formulación) de la invención comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención combinado con al menos un otro microorganismo beneficioso, tal como, pero que no se limita a, un lactobacilo y/o una bifidobacteria, incluso más preferentemente una combinación de microorganismos positivos para Core-1 de distintas cepas combinados con otros microorganismos beneficiosos.

45 En una realización preferente de la invención el microorganismo positivo para Core-1 es un microorganismo no patógeno. En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo positivo para Core-1 se aísla de un donante sano. En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo positivo para Core-1 puede aislarse de un donante sano.

50 En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención y/o una fracción del mismo se usa para la fabricación de un medicamento y/o un nutraceutico para la terapia o profilaxis de un tumor, por técnicas que son conocidas por los expertos en la materia.

55 En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo positivo para Core-1 de acuerdo con la invención y/o una fracción del mismo se usa *in vitro* o *in vivo* para inducir o potenciar un respuesta inmunitaria específica de Core-1 y/o para generar células dendríticas funcionales o células T, líneas de células T o clones de células T activados o anticuerpos contra Core-1.

60 En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención se usa en la composición nutraceutica o farmacéutica como un organismo vivo. En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención se usa como un organismo vivo y se administra por vía oral.

65 En una realización preferente adicional de la invención el microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención usado en la composición nutraceutica o farmacéutica es sensible a al menos un antibiótico. En una realización

5 preferente adicional de la invención el microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención usado en el
nutracéutico puede colonizar el intestino. En otra realización preferente de la invención el microorganismo de Core-1
de acuerdo con la invención se usa en la composición nutracéutica o farmacéutica está destruido. En incluso una
realización preferente adicional de la invención el microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención que se usa
10 en la composición nutracéutica o farmacéutica está pasteurizado. En incluso una realización más preferente de la
invención el microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención se usa en la composición nutracéutica o
farmacéutica como un organismo vivo y se aisló de un donante humano sano y puede colonizar el intestino humano
y es sensible a antibióticos. En incluso una realización más preferente de la invención el microorganismo de Core-1
15 de acuerdo con la invención se usa en la composición nutracéutica o farmacéutica en una forma pasteurizada y se
aisló del intestino de un donante humano sano y que es sensible a antibióticos.

En otra realización preferente de la invención el microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención usado en la
composición farmacéutica está destruido o lisado. En una realización preferente adicional de la invención el
microorganismo de Core-1 de acuerdo con la invención que se usa en una composición nutracéutica o farmacéutica
15 está liofilizado.

Las cepas positivas para Core-1 seleccionadas se caracterizaron por su sensibilidad contra distintos antibióticos
(véase la tabla 1) y por su unión para anticuerpos específicos para Core-1 (véase la tabla 2).

Tabla 2

Código/Cepa	Especie	Unión a NEMOD-TF1	Sensibilidad al periodo de la unión a NEMOD-TF1	Unión a NEMOD-TF2	Sensibilidad al periodo de la unión a NEMOD-TF2	Unión a A68-B/A11	Sensibilidad al periodo de la unión A68-B/A11
AG6	<i>Bacterioides ovatus</i>	positivo	Reducción de la señal	positivo	Reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal
MU1	<i>Bacterioides ovatus</i>	positivo	Reducción de la señal	positivo	Reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal
LH2	<i>E.coli</i>	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal	positivo	Reducción de la señal
32	<i>E.coli</i>	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal
52	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal
53	<i>Bacterioides ovatus</i>	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal	positivo	Reducción de la señal
AG3	<i>E.coli</i>	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal	negativo	Sin reducción de la señal

C) Provisión de las fracciones de los microorganismos positivos para Core-1

La invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención donde el microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico de Core-1.

La invención proporciona una fracción adecuada del microorganismo positivo para Core-1 de la invención para el uso como un componente para un nutracéutico o una composición farmacéutica de la invención en la que el microorganismo positivo para Core-1 se une por al menos un anticuerpo específico para Core-1.

La invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que induce una respuesta inmunitaria específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales.

La invención proporciona una fracción adecuada del microorganismo positivo para Core-1 de la invención para el uso como un componente para un nutracéutico o una composición farmacéutica de la invención donde la fracción del microorganismo positivo para Core-1 induce una respuesta inmunitaria específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales.

La invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de invención que representa el principio activo de la composición nutracéutica o farmacéutica de la invención y que induce la especificidad de la respuesta inmunitaria contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales.

La invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que induce o potencia una respuesta inmunitaria específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 en seres humanos o en animales cuando se usa en una composición nutracéutica o farmacéutica de la invención.

Dicho anticuerpo específico de Core-1, preferentemente anticuerpos específicos de Core-1, combinaciones de anticuerpos específicos de Core-1 o combinaciones preferentes de anticuerpos específicos de Core-1 se describen con detalle en las Definiciones y en otras partes del presente documento. Dichos nutracéuticos o composiciones farmacéuticas y realizaciones preferentes de las mismas se describen con detalle en otras partes del presente documento.

Dicha fracción de un microorganismo positivo para core-1 significa preparaciones o purificaciones de partes más pequeñas de dichos microorganismos, tales como, la preparación de pared bacteriana, preparación de envuelta, lisados, preparación de lipopolisacáridos, preparación de cápsulas, o preparación de polisacáridos de la cápsula, que se describen en los ejemplos (ejemplo 10) o que en los que alguien experto en la materia es capaz de optimizar y seleccionar un método adecuado o una combinación de métodos adecuados. Estas comprenden preferentemente al menos un componente positivo para Core-1 de dicho microorganismo positivo para Core-1. Estos pueden obtenerse mediante preparaciones o purificaciones de al menos un microorganismo para Core-1. Dichas preparaciones y purificaciones pueden obtenerse por métodos conocidos para los expertos en la materia tales como aquellos que se describen anteriormente, o fraccionamiento celular único o secuencial, extracciones en fenol-agua, extracciones en éter, digestiones con lisozimas o métodos cromatográficos. El componente positivo para Core-1 o la fracción que contiene el componente positivo para Core-1 se detecta mediante unión de la fracción a al menos un anticuerpo específico de Core-1 en sistemas de ensayo tales como, pero que no se limitan a, ELISA o transferencias de puntos que se conocen por los expertos en la materia. En una realización preferente de la invención la fracción que comprende un componente positivo para Core-1 se obtiene mediante cromatografía de afinidad que usa al menos un anticuerpo específico Core-1. En una realización preferente se usa una sola etapa de preparación o purificación. En otra realización preferente se usa una combinación de al menos las etapas de preparación y purificación. En una realización preferente adicional el componente positivo para Core- está enriquecido en dicha función en comparación con el organismo completo tal como puede determinarse mediante un aumento de la unión de al menos un anticuerpo específico de Core-1 a la fracción en comparación con el microorganismo, por ejemplo mediante ELISA, y preferentemente después cuando el peso del material biológico contenido en el mismo volumen es igual.

Dicho componente positivo para Core-1 significa cualquier componente de un microorganismo positivo para Core-1 que se une al menos por un anticuerpo específico de Core-1. Dicho componente positivo para Core-1 comprende al menos una estructura de hidrato de carbono de Core-1 o estructura que imita a Core-1 que puede estar disponible a partir la forma de su molécula natural donde es parte del microorganismo, tal como un péptido, oligopéptido, polipéptido, lípido, ceramida, hidrato de carbono, lipoproteína, polisacárido, oligosacárido, polisacárido, proteoglicano, lipopolisacárido o glucoproteína, o como una parte de dicha molécula natural, o sola. El componente positivo para Core-1 puede usarse en el sentido de la invención como una fracción del microorganismo positivo para Core-1 como tal o acoplado a otras estructuras transportadoras no naturales tales como proteínas, lípidos, moléculas químicas tales como poliacrilamida. Preferentemente se usa en su forma natural. El componente positivo para Core-1 puede comprender una sola estructura de hidrato de carbono de Core-1 que imita la estructura o las unidades de

repetición de dichas estructuras y puede contener estructuras de hidratos de carbono adicionales o unidades u otras estructuras biomoleculares. Dicha estructura que imita a Core-1 es una estructura que se une por al menos un anticuerpo específico de Core-1 y/o induce una respuesta inmunitaria contra Core-1, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1 o una respuesta inmunitaria celular contra Core-1, y más preferentemente una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1 y una respuesta inmunitaria celular contra Core-1.

En una realización preferente de la invención la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 o una respuesta inmunitaria celular contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1.

En una realización preferente adicional de la invención la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 y una respuesta inmunitaria celular contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1.

Dicha respuesta inmunitaria humoral contra Core-1 y dicha respuesta inmunitaria celular contra Core-1 se describen con detalle en otras partes de la presente invención.

En una realización preferente adicional la invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que puede usarse para construir una respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 teniendo el potencial de destruir esas células tal como se muestra en el presente documento por ejemplo por la inducción de los anticuerpos específicos para Core-1, mediante la citotoxicidad dependiente del complemento específica de anticuerpos de Core-1 contra las células tumorales positivas para Core-1 destruyéndolas eficazmente, y/o mediante la secreción de TNFalfa y/o INF gamma mediante respuestas de células T específicas de Core-1 que son marcadores subrogados reconocidos científicamente por los expertos en la materia para una destrucción de células tumorales mediada por células T citotóxicas para las células tumorales que portan el Core-1, cuando se usa como un nutraceutico o como una composición farmacéutica de la invención.

En una realización preferente adicional la invención proporciona un fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que puede usarse con el fin de construir dicha respuesta inmunitaria específica de Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 que tiene el potencial de destruir esas células tal como se describe anteriormente administrando por vía oral del nutraceutico (al menos una vez) en individuos sanos.

En una realización preferente adicional la presente invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que puede usarse con el fin de reducir o incluso se prefiere adicionalmente para prevenir que aparezca una enfermedad o tumor positivo para Core-1 administrando por vía oral del mismo como un componente del nutraceutico de la invención en (al menos un) individuo sano.

En una realización preferente adicional la presente invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que puede usarse con el fin de reducir o incluso más preferente para prevenir que aparezca una enfermedad o tumor positivo para Core-1 cuando se administra como un componente de la formulación farmacéutica de la invención en (al menos un) individuo sano.

En otra realización preferente la invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que se usa como el principio activo de un nutraceutico para tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 administrando por vía oral el nutraceutico en pacientes que padecen de esta enfermedad.

En una realización preferente la invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que se usa como el principio activo de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 en pacientes que padecen esta enfermedad administrando la composición farmacéutica tal como se describe en otras partes del presente documento.

En una realización más preferente la presente invención proporciona una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención que es un componente adecuado de una formulación nutraceutica que muestra preferentemente la inducción de una respuesta inmunitaria en seres humanos reconociendo el antígeno Core-1 y/o una célula tumoral positiva para Core-1 siendo positiva después de la administración de la fracción del microorganismo positivo para Core-1 para al menos un ensayo inmunitario humoral o celular descrito en el presente documento y realizaciones preferentes tal como se describe anteriormente.

En otra realización preferente de la invención el componente positivo para Core-1 no es parte del polisacárido bacteriano.

En una realización preferente la invención proporciona o usa

- (iii) la fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención, o
- (iv) el nutrácéutico o la formulación farmacéutica que comprende al menos una fracción de al menos un microorganismo positivo para Core-1 de la invención,

5 por lo que el microorganismo positivo par Core-1 se selecciona del grupo que consiste en las nueva cepas AG6(DSM 18726) y MU1(DSM 18728) depositadas en el "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" en Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) el 20 de octubre de 2006.

10 En una realización preferente adicional de la invención la fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención (componente activo) del nutrácéutico o la formulación farmacéutica comprende una combinación de fracciones de un microorganismo positivo para Core-1 o preferentemente de distintos microorganismos positivos para Core-1 de distintas cepas. Las fracciones pueden ser del mismo o distinto tipo de preparación o purificación, preferentemente es una combinación de componentes positivos para Core-1 que tienen un transportador molecular o

15 estructuras de imitación distintas tales como, pero que no se limitan a un péptido, oligopéptido, polipéptido, lípido, ceramida, hidrato de carbono, lipoproteína, polisacárido, oligosacárido, polisacárido, proteoglicano o glucoproteína, o como una parte de otra molécula natural o sintética.

20 En una realización preferente adicional dicha fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención (componente activo) comprende una combinación de componentes positivos para Core-1 de los microorganismos positivos para Core-1 de al menos dos cepas distintas, preferentemente seleccionadas del grupo que comprende las nuevas cepas AG6(DSM 18726), MU1(DSM 18728) y LH2(DSM 18727). En una realización preferente adicional dicha fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención (componente activo) comprende los componentes de los microorganismos positivos para Core-1 de la cepa AG6.

25 En otra realización preferente de la invención dicha fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención comprende estructuras de hidratos de carbono seleccionadas del grupo que comprende #1, #2, #3 y/o #4 de la figura 19. En otra realización preferente de la invención dicha fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención comprende unidades de repetición de las estructuras de hidratos de carbono seleccionadas del grupo que comprende #1, #2, #3 y/o #4 de la figura 19. En otra realización preferente de la invención, dicha fracción comprende

30 al menos una de las estructuras de hidratos de carbono seleccionados del grupo que comprende #1, #2, #3 y/o #4 de la figura 19 y/o unidades de repetición del mismo.

35 En otra realización preferente de la invención dicha estructura de hidratos de carbono o dicha unidades de repetición de la misma se obtienen mediante enriquecimiento y/o purificación y/o aislamiento de un microorganismo positivo para Core-1 de la invención.

40 En una realización preferente adicional de la invención dicha estructura de hidratos de carbono o dicha unidades de repetición de la misma se obtienen mediante enriquecimiento y/o purificación y/o aislamiento de la cepa AG6. Los detalles se muestran en el ejemplo 10.

45 En una realización preferente adicional dicha fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención (componente activo) comprende los componentes positivos para Core-1 de los microorganismos positivos para Core-1 de la cepa MU1.

50 En otra realización preferente la composición nutrácéutica o farmacéutica la invención comprende al menos una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención y al menos un microorganismo positivo para Core-1 de la invención.

55 En una realización preferente adicional la composición nutrácéutica o farmacéutica la invención comprende al menos una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención y se combina con al menos un otro microorganismo beneficioso, tal como, pero que no se limita a, un lactobacilo y/o una bifidobacteria, incluso más preferentemente una combinación fracciones de los microorganismos positivos para Core-1 de distintas cepas se combinan con otras bacterias beneficiosas.

60 En otra realización preferente la composición nutrácéutica o farmacéutica la invención comprende al menos una fracción del microorganismo positivo para Core-1 de la invención y al menos un microorganismo positivo para Core-1 de la invención combinado con al menos un otro microorganismo beneficioso, tal como, pero que no se limita a, un lactobacilo y/o una bifidobacteria. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o una fracción del mismo induce o potencia una respuesta inmunitaria humoral y/o celular contra Core-1, el antígeno core-1 o una célula tumoral positiva para Core-1 en al menos un ser humano o un animal cuando se administra en una composición o formulación adecuada. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o la fracción del mismo induce o potencia una respuesta inmunitaria específica de Core-1 en al menos un ser humano o un animal funcionando como una protección contra células cancerosas positivas para Core-1, teniendo el potencial de destruir células cancerosas positivas para Core-1 cuando se administra en una

65 composición o formulación adecuada. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la

invención o una fracción del mismo reduce o previene la aparición de una enfermedad, tumor o metástasis positiva para Core-1 en al menos un humano o un animal cuando se administra en una composición o formulación adecuada. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o fracción del mismo reduce o previene la diseminación o metástasis de una enfermedad o tumor positivo para Core-1 en al menos un ser humano o un animal cuando se administra en una composición o formulación adecuada. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o fracción del mismo se usa para tratar una enfermedad o tumor positivo para Core-1 en al menos un ser humano o un animal cuando se administra en una composición adecuada. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o una fracción del mismo se usa como el principio activo de un nutraceutico para prevenir, reducir el riesgo de desarrollar, o reducir la aparición de un tumor positivo para Core-1 administrando por vía oral el nutraceutico en un individuo sano. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o una fracción del mismo se usa como el principio activo de un nutraceutico para prevenir o reducir la diseminación del tumor o metástasis o la diseminación de la metástasis o el tiempo de recaída de un tumor o células tumorales positivas para Core-1, para mejorar la calidad de vida o supervivencia media o tasa de tiempo hasta la recaída, o tratar un paciente tumoral que tiene o tuvo las células tumorales positivas para Core-1 administrando por vía oral el nutraceutico en pacientes que padecen de esta enfermedad. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o una fracción del mismo se usa como el principio activo de una composición farmacéutica para prevenir, reducir el riesgo de desarrollar, o reducir la aparición de un tumor positivo para Core-1 administrando la composición farmacéutica en un individuo sano. En otra realización preferente el microorganismo positivo para Core-1 de la invención o una fracción del mismo se usa como el principio activo de una composición farmacéutica para prevenir o reducir la diseminación del tumor o metástasis o la diseminación de metástasis o el tiempo hasta la recaída de un tumor o células tumorales positivas para Core-1, para mejorar la calidad de vida o supervivencia media o tasa de tiempo hasta la recaída, o tratar un paciente tumoral que tiene o tuvo las células tumorales positivas para Core-1 administrando la composición farmacéutica en pacientes que padecen esta enfermedad.

D) Métodos para inducir una protección inmunitaria contra células cancerosas positivas para Core-1, para prevenir y/o tratar tumores positivos para Core-1 y para tratar o prevenir una enfermedad positiva para Core-1.

Un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden los mismos.

En una realización preferente, el método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1 comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz de la formulación, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción o lisado del mismo tal como se describe en otras partes del presente documento.

En una realización preferente, en el método anteriormente mencionado dicho nutraceutico, o dicha composición farmacéutica, o dicho microorganismo positivo para Core-1, o dicha fracción del mismo, o dichas formulaciones que comprenden a los mismos comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo para Core-1 unido por Nemo-TF1 o A78-G/A7 y Nemo-TF2. En el método, las funciones de respuesta inmunitaria específica para Core-1 inducidas o potenciadas funcionan como una protección contra células cancerosas positivas para Core-1 teniendo el potencial de destruir al menos una célula cancerosa positiva para Core-1. En una realización preferente del método, las funciones de respuesta inmunitaria específica para Core-1 inducidas funcionan como una protección contra células cancerosas positivas para Core-1 teniendo el potencial de destruir esas células tal como se muestra en el presente documento, por ejemplo mediante la inducción de los anticuerpos específicos de Core-1 I, mediante la citotoxicidad dependiente del complemento específica de anticuerpos de Core-1 contra las células tumorales positivas para Core-1 destruyéndolas eficazmente, y/o mediante la secreción de TNFalfa y/o INF gamma mediante respuestas de células T específicas de Core-1 que son marcadores subrogados reconocidos científicamente por los expertos en la materia para una destrucción celular de células tumorales mediada por células T citotóxicas específicas para las células tumorales que portan el Core-1, tal como se muestra en los ejemplos y como se describe en el presente documento, que comprenden administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos.

Un método para reducir o incluso que se prefiere adicionalmente para prevenir la aparición de un tumor, preferentemente un tumor positivo para Core-1, comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos, preferentemente en un individuo sano.

Un método para reducir o incluso que se prefiere adicionalmente para prevenir la diseminación o metástasis de un tumor, preferentemente un tumor positivo para Core-1, comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos.

Un método para tratar un tumor, preferentemente un tumor positivo para Core-1, comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos.

Un método para reducir o incluso que se prefiere adicionalmente para prevenir la aparición de una enfermedad positiva para Core-1 comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos, preferentemente en un individuo sano.

Un método para la vacunación o inmunización de un ser humano o un animal contra Core-1 comprende

- (v) la administración a un ser humano o a un animal de una cantidad eficaz de células dendríticas funcionales o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica funcional dirigida contra Core-1 al menos una vez y la inducción de una respuesta inmunitaria por dichas células dendríticas funcionales en el ser humano o en el animal y
- (vi) el refuerzo de la respuesta inmunitaria mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 y/o una fracción o lisado del mismo al menos una vez.

Un método para la vacunación de un ser humano o un animal contra un epítipo de hidratos de carbono presente en una molécula de una célula humana o animal comprende

- i) la administración a un ser humano o a un animal de una cantidad eficaz de células T, clon de células T, línea de células T o una mezcla de células que comprenda al menos una célula T activada dirigida contra Core-1 al menos una vez y la inducción de una respuesta inmunitaria mediante dichas células T activadas en el ser humano o en el animal y
- ii) el refuerzo de la respuesta inmunitaria mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un microorganismo positivo para Core-1 y/o una fracción o lisado del mismo al menos una vez.

La generación de células dendríticas funcionales, células T, líneas de células T y clones de células T activados se describe en otras partes del presente documento. En una realización preferente la administración de acuerdo con los métodos anteriores bajo (i) se realiza una vez. En otra realización preferente la administración de acuerdo con los métodos anteriores bajo (i) se realiza al menos de tres a cinco veces. En una realización preferente el refuerzo de la respuesta inmunitaria mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con (ii) de los métodos anteriores se realiza una vez, en otra realización preferente el refuerzo se realiza de 2-10 veces, más preferentemente más de 10 veces, más preferentemente hasta 20 veces, lo más preferente es que el refuerzo se realice continuamente a intervalos de tiempo regulares a lo largo de un periodo de varios meses a varios años. En una realización preferente el refuerzo de la respuesta inmunitaria sea realiza de 1-5 veces próximas al cebado y después a intervalos de 3 meses a 1 año o, de 1 año a 10 años. La generación de células dendríticas funcionales, células T, líneas de células T y clones de células T activados se describe en otras partes del presente documento.

Un método para reducir o incluso que se prefiere adicionalmente para prevenir la diseminación de una enfermedad positiva para Core-1 comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos.

Un método para tratar una enfermedad positiva para Core-1 comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos.

Un método para fortalecer el sistema inmunitario o para mejorar una respuesta inmunitaria comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos. Este puede ser, por ejemplo, pero no se limita a, la

mejora general de la condición del sistema inmunitario por ejemplo contra enfermedades infecciosas o tumores, una mejora de la actividad de otros agentes inmunes estimuladores o probióticos o prebióticos, o una acción como adyuvantes.

5 En una realización preferente el nutracéutico, o la composición farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden los métodos anteriormente descritos comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo para Core-1 unido por NemoD-TF1 o A78-G/A7 y/o NemoD-TF2.

10 En una realización preferente el nutracéutico, o la composición farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden los métodos anteriormente descritos comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de la cepa AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728) y/o LH2 (DSM 18727), más preferentemente de la cepa AG6 y/o MU1.

15 El término formulación significa cualquier sustancia o composición de sustancias en una forma adecuada para la administración que comprende al menos uno del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo que puede comprender un transportador farmacéuticamente aceptable o un transportador aceptable para aditivos alimentarios y/o nutracéuticos o el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o fracción del mismo sola.

20 La expresión prevenir la aparición se refiere a usar el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos a un sujeto con el fin de reducir el riesgo o la tasa o la probabilidad de desarrollar un cáncer positivo para Core-1 o una enfermedad positiva para Core-1.

25 La expresión reducir o prevenir la diseminación de un tumor o enfermedad o metástasis de un tumor positivo para Core-1 se refiere a usar el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos en un sujeto con el fin de reducir el riesgo o la tasa o la probabilidad de metástasis o diseminación de la enfermedad a otros órganos u otros sitios en el cuerpo o a otros individuos.

30 El término tratar se refiere a usar el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos en un individuo o sujeto con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, vencer, mejorar, o afectar al cáncer, los síntomas del cáncer, la predisposición para el cáncer, tiempo hasta la supervivencia, o tiempo hasta la progresión.

35 Dicha enfermedad positiva para Core-1 es cualquier enfermedad que se asocia con un virus, microorganismo u otro material biológico que pueda unirse por al menos uno de los anticuerpos específicos de Core-1 o que se asocia con un componente del cuerpo o que ocurre en el cuerpo de un humano o animal tal como, pero que no se limita a, una célula, microorganismo, virus o partícula que se une por al menos uno de los anticuerpos específicos de Core-1.

40 La "cantidad eficaz" de cualquiera del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos comprende microorganismos vivos o destruidos, o lisados o fracciones de los mismos microorganismos que corresponden a o derivan de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente de 1×10^{14} ufc por persona por día (ufc/persona/día) por lo que una ufc es una unidad formadora de colonias como una medida para un microorganismo tal como se conoce y que puede determinarse por los expertos en la materia. En otra realización la cantidad eficaz es la cantidad del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos que induce una respuesta inmunitaria humoral o celular contra Core-1 en al menos un individuo, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral y una respuesta inmunitaria celular contra Core-1, detectable por al menos uno de los ensayos de respuesta inmunitaria contra Core-1 que se describen en otras partes del presente documento. En otra realización la cantidad eficaz es la cantidad del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos donde se requiere para conferir una protección inmunitaria contra células tumorales positivas para Core-1, para que tenga un efecto profiláctico contra el cáncer o para que tenga un efecto terapéutico contra el cáncer, para que tenga un efecto profiláctico o terapéutico contra otra enfermedad positiva para Core-1, cada una en al menos un individuo.

50 La cantidad eficaz para un individuo o un grupo de individuos puede determinarse y/u optimizarse por los expertos en la materia, preferentemente usando al menos un ensayo de respuesta inmunitaria contra Core-1 que se describe en otras partes del presente documento y preferentemente las combinaciones de los ensayos de respuesta inmunitaria contra Core-1 que se describen en otras partes del presente documento como realizaciones preferentes y/o ensayos de respuesta clínica conocidos para los expertos en la materia o que se describen en otras partes del presente documento.

65 Estas cantidades eficaces pueden variar de las cantidades o dosificaciones anteriormente descritas o cantidades o dosificaciones preferentes que se describen en otras partes del presente documento para una persona dependiendo

por ejemplo del sujeto, del número y calendario de dosificaciones, del formato o formulación del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o fracción del mismo, de la vía y plan de administración, del fin para el que se usa tal como para la profilaxis o el tratamiento, del estado de la enfermedad o cáncer positivo para Core-1, y estos pueden variar dependiendo de la especie, raza y entre un individuo animal o individuo humano que reciben el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos. Los expertos en la materia son capaces de determinar la dosificación adecuada y/u óptima, la ruta y el plan de administración para un individuo o un grupo de individuos preferentemente usando la descripción y una realización de la invención que se describe en el presente documento.

Se prefieren las cantidades eficaces y dosificaciones del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos que inducen o potencian dicha respuesta inmunitaria contra Core-1 en más de un individuo, más preferentemente un número significativo de individuos, más preferentemente en al menos el 10 %, más preferentemente en al menos el 20 %, más preferentemente en al menos el 30 %, más preferentemente en al menos el 40 %, más preferentemente en al menos el 50 %, y más preferentemente en la mayor parte de los individuos.

En una realización preferente la cantidad eficaz es la cantidad de dicho nutracéutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo para Core-1 o dicha fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos que induce una respuesta inmunitaria contra Core-1 en al menos un individuo.

En una realización preferente, la cantidad eficaz es la cantidad de dicho nutracéutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo para Core-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden a los a los mismos que se requieren para conferir una protección inmunitaria contra células tumorales positivas para Core-1, para que tenga un efecto profiláctico contra el cáncer o para que tenga un efecto terapéutico contra el cáncer, o para que tengan un efecto profiláctico o terapéutico contra otra enfermedad positiva para Core-1, cada uno en al menos un individuo. En otra realización preferente, la cantidad eficaz es la cantidad de dicho nutracéutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo para Core-1 o dicha fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos que induce la máxima o la respuesta inmunitaria cercana a la máxima contra Core-1 en al menos un individuo.

En una realización preferente, la cantidad eficaz de dicho nutracéutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo para Core-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden a los mismos que comprenden microorganismos vivos o destruidos, o lisados o fracciones de estos microorganismos que corresponde a o deriva de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{14} ufc por individuo por dosis. En una realización más preferente la cantidad eficaz del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos comprenden microorganismos vivos o destruidos, o lisados o fracciones de los estos microorganismos que corresponden a o derivan de 1×10^7 a 1×10^{13} ufc/persona/dosis, más preferentemente de 2×10^8 a 1×10^{12} , y más preferentemente de 1×10^9 - 1×10^{11} ufc/persona/dosis.

Las cantidades o dosis eficaces pueden variar también, tal como reconocen los expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, uso de excipientes, y la posibilidad de uso conjunto con otros agentes, tales como aquellos para potenciar la inmunidad, para inducir una respuesta inmune, o construir una protección inmune, o prevenir o tratar el cáncer. Las cantidades eficaces o dosis eficaces pueden variar también, tal como reconocen los expertos en la materia, dependiendo del formato de uso tal como el uso como el nutracéutico, como la composición farmacéutica, como el microorganismo positivo para Core-1 o como la fracción del mismo o como las formulaciones que comprenden a los mismos así como de si estos comprenden formas vivas, lisados destruidos o fracciones de los mismos, así como en las cantidades de las dosis así como en los intervalos de tiempo entre las dosis. Estos pueden determinarse y optimizarse por los expertos en la materia preferentemente usando la invención proporcionada, los ensayos y los métodos descritos en el presente documento.

En una realización preferente, el nutracéutico se administra por vía oral de más de una dosis diaria, hasta una dosis diaria, semanal, o mensual de un corto intervalo de tiempo a un uso de un año de duración, preferentemente diariamente o semanalmente a lo largo de 4 semanas hasta 4 años. En otra realización preferente, se administra una dosis unitaria a un individuo. En otra realización preferente, se administran dosis múltiples a un individuo. En otra realización preferente, la cantidad eficaz corresponde una dosis unitaria. En otra realización preferente, la cantidad eficaz corresponde a dosis múltiples.

En una realización preferente, la composición farmacéutica puede administrarse por vía sistémica de como mínimo como una sola dosificación hasta muchas dosificaciones, preferentemente de semanalmente a 3 veces al mes o 6 veces al mes o una combinación escalonada de las mismas, y puede combinarse con un refresco de la inmunización, de cada 6 meses a cada año, hasta de cada 5 años a cada 10 años. En otra realización preferente la dosificación eficaz de la formulación nutracéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 o lisado o fracción del mismo en seres humanos es de $0,1 \text{ mg/m}^2$ - 10 g/m^2 , más preferentemente de 10 mg/m^2 - 10 g/m^2 , incluso más preferentemente de $0,1 \text{ g/m}^2$ - 10 g/m^2 .

En otra realización preferente la formulación se administra primero sistémicamente con refrescos orales posteriores de la inmunización.

5 El término administración significa poner en contacto a un ser humano o a un animal con una cantidad eficaz del
nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o
formulaciones que comprenden a los mismos para los que se pueden usar transportadores adicionales. Las vías de
administración incluyen cualquier modo para poner en contacto al ser humano o al animal con el nutracéutico, la
composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que
10 comprenden a los mismos. Se prefieren las vías de administración, tales como, pero que no se limitan a,
administración oral, administración sistémica, administración por medio de inhalación o por medio de poner en
contacto con la piel u otra epidermis, que conduce a una respuesta inmunitaria contra Core-1, una protección
inmunitaria contra Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1, un efecto profiláctico contra el cáncer o un
efecto terapéutico contra el cáncer, que puede determinarse en sus formas preferentes tal como se describe
15 anteriormente o en otras partes del presente documento. Los expertos en la materia pueden seleccionar la vía de
administración más adecuada.

Los ejemplos y las vías preferentes de administración y formulaciones se describen en lo siguiente:

20 Los nutracéuticos se administran preferentemente por vía oral por ejemplo bien como cápsulas, comprimidos,
emulsiones, polvos, líquidos, en forma de cualquier alimento o bebida, o como un componente de un alimento o
bebida tal como un aditivo alimentario. El nutracéutico puede darse en sí mismo o mezclarse con al menos un otro
ingrediente, El nutracéutico por sí mismo o su mezcla con al menos un otro ingrediente puede darse en sí mismo o
mezclarse con otro alimento o bebida.

25 Una formulación para la administración oral del nutracéutico, pero también de la composición farmacéutica, el
microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los mismos pueden
estar en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable o cantidad eficaz del nutracéutico, la composición
farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden a los
mismos incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, nanopartículas, emulsiones y suspensiones acuosas,
30 dispersiones y soluciones. Los transportadores de uso común para comprimidos incluyen lactosa y almidón de maíz.
También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, a los comprimidos. Para la
administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz desecado. Cuando
las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo puede suspenderse o
disolverse en una fase oleosa combinados con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, pueden
35 añadirse determinados edulcorantes, aromatizantes, o agentes colorantes.

Una formulación para la administración oral puede ser una forma de dosificación oralmente aceptable o cantidad
eficaz del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo
o formulaciones que comprenden a los mismos que incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas,
40 nanopartículas, emulsiones y suspensiones acuosas, dispersiones y soluciones. Los transportadores de uso común
para comprimidos incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales
como estearato de magnesio, a los comprimidos. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes
útiles incluyen lactosa y almidón de maíz desecado. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran
por vía oral, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinado con agentes
45 emulsionantes o de suspensión. Si se desea pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes, o
colorantes.

La formulación de la invención puede administrarse por vía oral o vía parenteral. La administración parenteral incluye
inyecciones tales como infusión por goteo, hipodérmicas, inyecciones intravenosas o intramusculares, aplicación
50 transdérmica con una pomada o fármaco transdérmico, y aplicación rectal con un supositorio. Cuando la
composición se administra por vía oral, puede prepararse en la forma de una cápsula dura, cápsula blanda,
gránulos, polvos, gránulos finos, píldora, comprimidos, trociscos, sistema de suministro gradual del principio activo,
líquido y suspensión. La preparación puede llevarse a cabo fácilmente mediante métodos convencionales del campo
farmacéutico. El modo de administración y las formas de dosificación afectarán por supuesto a las cantidades
55 terapéuticas de los compuestos o composiciones que son deseables y eficaces para la aplicación de tratamiento
dada. Cuando la formulación de la presente invención, se prepara en la forma de administración oral, la composición
puede prepararse usando ingredientes farmacéuticos convencionales en un medicamento normal tales como cargas,
extensores, aglutinantes, desintegrantes, tensioactivos, diluyentes tales como lubricantes y excipientes. Los
ejemplos particulares de los ingredientes convencionales incluyen receptáculos tales como el azúcar de la leche,
60 azúcar blanco, cloruro sódico, glucosa, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina y ácido silícico;
aglutinantes tales como agua, etanol, jarabe simple, glucosa líquida, almidón líquido, solución de gelatina,
carboximetilcelulosa, goma laca, metilcelulosa, fosfato de potasio y polivinilpirrolidona; desintegrantes tales como
almidón desecado, alginato sódico, agar en polvo, polvo de laminarano, bicarbonato sódico, carbonato cálcico,
ésteres de ácidos grasos con polioxi-etileno de sorbitán, lauril sulfato de sodio, monoglicérido de ácido esteárico,
65 almidón, y azúcar de la leche, inhibidores del decaimiento tales como el azúcar blanco, ácido esteárico, manteca de
cacao y aceite hidrogenado; absorbefacientes tales como sal cuaternaria de amonio y lauril sulfato de sodio; agentes

humectantes tales como la glicerina y el almidón; absorbentes tales como almidón, azúcar de la leche, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal; y lubricantes tales como talco purificado y estearato. En caso necesario, la preparación además incluye colorante, conservante, perfume, agente aromatizante y agente edulcorante. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen sales básicas de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido fenacético y ácido mandélico. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención también pueden formarse con un catión farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, si un grupo sustituyente comprende un resto carboxilo. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen cationes alcalinos, de tierras alcalinas de amonio y cationes cuaternarios de amonio.

En una realización preferente, la vía de administración de la composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección intracraneal, inyección intratumoral, inyección intraepitelial, suministro transcutáneo, por administración esofágica, administración intraabdominal, administración intrapendicular, administración intraarterial, administración intraarticular, administración intrabronquial, administración intrabucal, administración anticapsular, administración intracardiaca, administración intracartilaginosa, administración intracavitaria, administración intracefálica, administración intracólica, administración intracutánea, administración intraquística, administración intradérmica, administración intraductal, administración intraduodenal, administración intrafascicular, administración intraadiposa, administración intrafilar, administración intratisular, administración intragástrica, administración intraglandular, administración intrahepática, administración intraintestinal, administración intralamelar, administración intralesional, administración intraligamentosa, administración intralingual, administración intramamaria, administración intramedular, administración intrameningea, administración intramiocárdica, administración Intranasal, administración intraocular, administración intraoperatoria, administración intraoral, administración intraósea, administración intraovárica, administración intrapancreática, administración intraparietal, administración intrapélvica, administración intrapericárdica, administración intraperineal, administración intraperitoneal, administración intraplacentaria, administración intrapleural, administración intrapontina, administración intraprostática, administración intrapulmonar, administración intra raquídea, administración intrarrectal, administración intrarrenal administración intraescleral, administración intraescrotal, administración intrasegmental, administración intraselar, administración intraespinal, administración intraesplénica, administración intraestemal, administración intraestromal, administración intrasinovial, administración Intranasal, administración intratesticular, administración intratorácica, administración intratonsilar, administración intratraqueal, administración intratubal, administración intratimpánica, administración intraureteral, administración intrauretral, administración intrauterina, administración intravaginal, administración intravascular, administración intraventricular, administración intravertebral, administración intravesical, y administración intravítrea.

En una realización más preferente de la invención los ejemplos de vías de administración (=contacto) incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, transdérmica (tópica), transmucosal, intraperitoneal, intranasal, rectal enteral y oral.

Una formulación de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen la adición de sales ácidas que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos tales como el acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férrico, y dichas bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares. Los transportadores fisiológicamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de transportadores líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tales como fosfato salino tamponado. Aun adicionalmente, los transportadores acuosos pueden contener más de una sal tamponadora, así como sales tales como los Cloruros de sodio y de potasio, dextrosa, propilenglicol, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas pueden contener también fases líquidas además de y en exclusión del agua. Los ejemplos de dichas fases líquidas acuosas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semillas de algodón, ésteres orgánicos tales como oleato de etilo, y emulsiones de agua en aceite. Una formulación contiene un microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo de la presente invención, típicamente una cantidad de al menos el 0,1 por ciento en peso de un microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo en peso total de la composición. Un porcentaje en peso es una relación en peso de un microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo con respecto a la composición total. Por lo tanto, por ejemplo, el 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de un microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo por 100 gramos de la composición total.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales de los compuestos que retienen la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres y las cuales se obtienen mediante reacción con ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de metales alcalinos, tales como el sodio y el potasio,

sales de tierras alcalinas y sales de amonio.

La formulación comprende como el principio activo el microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo que puede estar en una forma adecuada para el uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas al uso oral pueden prepararse de acuerdo con uno cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para fabricar composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes de conservación con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al gusto. Los comprimidos contienen el principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, que son adecuados para fabricar comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegrantes, por ejemplo almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas que conocidas por retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, de ese modo, proporcionan una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material retardante temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Estos también pueden recubrirse mediante las técnicas descritas en las patentes de EE.UU. N° 4.256.108, 4.166.452; y 4.265.874, para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para la liberación controlada. Una formulación de acuerdo con la presente invención también puede contener, o como alternativa, contiene también uno o más fármacos, que pueden estar ligados a un agente modulador o pueden estar libres en la composición. Prácticamente puede administrarse cualquier fármaco en combinación con un agente modulador tal como se describe en el presente documento, para una variedad de fines tal como se describe más adelante. Los ejemplos de tipos de fármacos que pueden administrarse con un agente modulador incluyen analgésicos, anestésicos, antianginales, antifúngicos, antibióticos, fármacos anticancerígenos (por ejemplo, taxol o mitomicina C), antiinflamatorios (por ejemplo, ibuprofeno e indometracina), antihelmínticos, antidepresivos, antídotos, antieméticos, antihistaminas, antihipertensivos, antimaláricos, agentes antimicrotúbulos (por ejemplo, colchicina o alcaloides de la vinca), agentes antimigraña, antimicrobianos, antipsicóticos, antipiréticos, antisépticos, agentes anti-señalización (por ejemplo, inhibidores de la proteína quinasa C o inhibidores de la movilización intracelular del calcio), antiartríticos, agentes antitrombina, antituberculosos, antitusivos, antivirales, supresores del apetito, fármacos cardioactivos, fármacos para la dependencia química, catárticos, agentes quimioterapéuticos, coronarios, vasodilatadores cerebrales o periféricos, agentes anticonceptivos, depresores, diuréticos, expectorantes, factores de crecimiento, agentes hormonales, hipnóticos, agentes inmunosupresores, antagonistas de narcóticos, parasimpaticomiméticos, sedantes, estimulantes, simpaticomiméticos, toxinas (por ejemplo, toxina del cólera), tranquilizantes y antiinfecciosos urinarios.

Las formulaciones para uso oral pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuets, parafina líquida o aceite de oliva. Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona de alginato sódico, goma tragacanto y goma de acacia; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser una fosfatida de origen natural (por ejemplo, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal un polioxietileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o Sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse mediante suspensión del principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes, tales como los que se han indicado anteriormente y agentes aromatizantes y para proporcionar una preparación oral agradable al gusto. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una Suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo mezclado con un agente de dispersión o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados están ejemplarizados, por ejemplo los agentes edulcorantes, aromatizantes y conservantes adicionales, también pueden estar presentes.

La formulación de la invención puede también estar en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma de acacia o goma tragacanto, fosfatidas de origen natural, por ejemplo, lecitina de semilla de soja, y o ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo el monooleato de sorbitán y los productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán. Las emulsiones pueden contener también agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones pueden contener también un demulcente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una Suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta Suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes de dispersión o humectantes y los agentes de suspensión adecuados que se mencionan anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser en una solución o Suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentra el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, aceites fijos estériles, se emplean convencionalmente como un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran su uso en la preparación de sustancias inyectables. Los niveles de dosificación del orden de desde aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramos de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente (aproximadamente de 2,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día). Por ejemplo, un tumor positivo para Core-1 puede tratarse eficazmente mediante la administración de desde aproximadamente 0,01 a 50 mg del compuesto por kilogramo del peso corporal por día (aproximadamente de 0,5 mg a aproximadamente 3,5 g por paciente por día). La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales transportadores para producir una forma farmacéutica de dosificación unitaria variará dependiendo del hospedador tratado y el modo de administración particular. Por ejemplo, una formulación destinada para la administración oral en seres humanos puede variar de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 95 % de la composición total. Las formas de unidad de dosificación generalmente contienen entre de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g de principio activo. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosificación específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, tiempo de la administración de la dieta, vía de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos y gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia. La cantidad de dosificación eficaz de los compuestos de acuerdo con la invención variará dependiendo de factores que incluyen la toxicidad, y actividad inhibitoria del compuesto particular, la afección tratada y si el compuesto se administra solo o con otras terapias. Típicamente una cantidad de dosificación eficaz variará de aproximadamente 0,0001 mg/kg a 1500 mg/kg, más preferentemente de 1 a 1000 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 1 a 150 mg/kg del peso corporal, y más preferentemente de aproximadamente 50 a 100 mg/kg del peso corporal. La invención se refiere también a un proceso de un método para el tratamiento de las afecciones patológicas anteriormente mencionadas. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse profilácticamente o terapéuticamente, preferentemente en una cantidad que sea eficaz contra los trastornos mencionados, a un animal de sangre caliente, por ejemplo un ser humano, que requiere de dicho tratamiento, los compuestos se usan preferentemente en la forma de composiciones farmacéuticas o nutracéuticos.

La formulación de los excipientes farmacéuticamente aceptables y las Soluciones transportadoras es bien conocida por los expertos en la materia, en tanto es el desarrollo de una dosificación y regímenes de tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares que se describen en el presente documento en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, la administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, e intramuscular.

A. Suministro oral

En determinadas aplicaciones, las formulaciones que se divulgan en el presente documento pueden suministrarse por medio de administración oral a un ser humano o a un animal. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un transportador comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de cáscara de gelatina dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

Los compuestos activos pueden incluso incorporarse con excipientes y usarse en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y un agente de edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o Sacarina pueden añadirse o un agente aromatizante, tales como menta, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma de unidad de

dosificación es una cápsula, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un transportador líquido, Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar, o ambas. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, y un colorante y aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material que se use en la preparación de cualquier forma de la unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Típicamente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente el 0,1 % del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del/los principio(s) activo(s) puede, por supuesto, variar y convenientemente estar entre aproximadamente el 1 o el 2 % y aproximadamente el 60 % o el 70 % o más en peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad del/los compuesto(s) activos de cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de un modo tal que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria del compuesto dada. Factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por un experto en la materia de la preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y tales como, una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento pueden ser deseables.

Para la administración oral, las composiciones de la presente invención pueden incorporarse como alternativa junto con uno o más excipientes en la forma de un enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, pulverizador oral, o una formulación de administración por vía oral sublingual. Por ejemplo, puede prepararse un enjuague bucal que incorpore el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (Solución de Dobell). Como alternativa, el principio activo puede incorporarse en una solución oral tal como una que contenga borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o dispersarse en un dentífrico, o añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz/dosis eficaz a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes, y humectantes. Como alternativa las composiciones pueden modelarse en una forma de comprimido o solución que puede colocarse bajo la lengua o disolverse de otro modo en la boca.

B. Suministro en inyección

En determinadas circunstancias será deseable suministrar las formulaciones que se divulgan en el presente documento por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, o incluso intraperitoneal. Las soluciones de los compuestos activos tales como las bases libres o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclándose adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso en inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de las soluciones o dispersiones estériles inyectables. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en el que exista una fácil inyectabilidad. Estas deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben resguardarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Puede mantenerse una fluidez adecuada, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede facilitar por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorbutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o Cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante el uso en las composiciones agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el líquido diluyente ser isotónico con respecto a la glucosa y solución salina fisiológica. Estas Soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede emplearse se conocerá por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y bien añadirse a 100 ml de fluido de hipodermolisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto. Ocurrirá alguna Variación en la dosificación necesariamente dependiendo de la afección del sujeto tratado. La persona responsable de la administración, en todo caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración en seres humanos, las preparaciones deberían cumplir con la esterilidad, pirogenicidad, y las Normas generales de seguridad y pureza siempre que se requiera por las Oficinas nacionales o regionales de Normas biológicas.

Las Soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los demás ingredientes anteriormente enumerados, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los demás ingredientes requeridos de los anteriormente enumerados. En el caso de los polvos estériles para la preparación de Soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío y secado por congelación que dan lugar a un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución anteriormente esterilizada por filtración del mismo.

Las composiciones que se divulgan en el presente documento pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen la adición de sales ácidas (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos tales como el acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos, y dichas bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Después de la formulación, se administrarán las Soluciones de un modo compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como Soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "transportador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, soluciones Transportadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquiera de los medios o agentes convencionales sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en la composición terapéutica. En las composiciones también pueden incorporarse ingredientes activos complementarios.

La frase "farmacéuticamente aceptable" e refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como un principio activo se entiende bien en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, ya sea como Soluciones o suspensiones; también pueden prepararse las formas sólidas adecuadas para la solución, o la Suspensión, en líquido antes de una inyección. La preparación también puede emulsionarse.

En una realización preferente de la invención el nutraceutico o formulaciones del mismo que comprenden al menos un microorganismo positivo par Core-1 o fracción del mismo se aplican en seres humanos como un aditivo alimentario. En una realización preferente de la invención el nutraceutico o formulaciones del mismo que comprenden al menos un microorganismo positivo par Core-1 o fracción del mismo se aplican en seres humanos como un alimento medicamentoso.

La invención se refiere también al nutraceutico o a una formulación del mismo que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 o una fracción del mismo de acuerdo con la invención como un aditivo alimentario o como un alimento como un componente del mismo. Un alimento en el contexto de la invención es cualquier sustancia que se consume por organismos vivos, incluyendo bebidas líquidas. El alimento es la fuente principal de energía y de nutrición para animales/seres humanos, y habitualmente es de origen animal o vegetal. El alimento es preferentemente un alimento vegano son generalmente todos los tipos de alimentos que están de libres de productos animales, como carne, leche o huevos. El alimento del contexto de la invención también son preferentemente alimentos no veganos que contienen productos animales. Un alimento en el contexto de la invención es:

(i) cualquier sustancia o producto, ya sea procesado, parcialmente procesado o no procesado, destinado a ser, o del que se espere que se ingiera razonablemente por seres humanos ya sea de valor nutritivo o no;

(ii) agua y otras bebidas;

(iii) productos de chicle o caramelo; y/o

(iv) artículos y sustancias usadas como un ingrediente o componente en la preparación del alimento. Un alimento en el contexto de la invención se obtiene tradicionalmente a través de la agricultura, ganadería y la pesca, junto con la caza, forrajeo y otros métodos de subsistencia localmente importantes para algunas poblaciones, pero menores para otras. En la era moderna, en las naciones desarrolladas, el suministro de alimentos es cada vez más dependiente de la agricultura, las granjas industriales, acuicultura y las técnicas de piscifactoría que están destinadas para maximizar la cantidad de alimento producido, mientras que se minimiza el coste. Estas incluyen una dependencia de herramientas mecanizadas que se han desarrollado, desde la máquina trilladora, la sembradora, hasta el tractor y la máquina agrícola combinada, etc. Estas se han combinado con el uso de pesticidas para promover altos rendimientos en los cultivos y combatir los insectos o mamíferos que reducen el rendimiento. Más recientemente, ha habido una tendencia creciente hacia prácticas agrícolas más sostenibles. Este enfoque - que se estimula parcialmente por la demanda del consumidor - alienta la biodiversidad,

autosuficiencia local y métodos de agricultura orgánica.

Los tipos de alimentos de manufacturados (alimentos que contienen al menos un microorganismo positivo para Core-1 o fracción del mismo) en el contexto de la invención son:

- 5
- bebidas: cerveza, zumo, refresco, calabaza, vino, bebidas que contienen leche, productos lácteos u otras bebidas alcohólicas o no alcohólicas.; por ejemplo agua, incluyendo sólo agua carbonatada, zumos de fruta y zumos vegetales, refrescos, aguas frescas, limonada, cola, gaseosa de jengibre, irn bru, cerveza de raíz, zarzaparilla, soda con nata, refresco de diente de león y bardana, squash, un jarabe con sabor a frutas diluido en
- 10
- agua, bebidas para deportistas, infusiones, café, té, bebidas diarias, por ejemplo leche, bebida de yogur, leche con chocolate, batido de leche, ponche de huevo, leche de almendras, horchata, bebidas alcohólicas, cócteles-bebidas mezcladas, bebidas calientes, por ejemplo chocolate caliente, sidra caliente, capuchino o té perla de leche
- 15
- el pan es un alimento básico para muchas naciones, está hecho de masa crecida de trigo u otros cereales; por ejemplo centeno y trigo, pan tostado (pan blanco), de grano completo, trigo-centeno, pan blanco, multi-grano, centeno, de semillas de girasol; de semillas de calabaza, pizza, chapatas, tortillas, baguettes, pitas, lavash, bizcochos, galletas saladas, naan, panecillos, puris, tarta, pan integral de centeno, pan de trigo completo, pan de germen de trigo, de grano completo, pan de granero y muchas otras variaciones
- 20
- tartas y galletas; por ejemplo, tarta de cabello de ángel, tarta de manzana, babka, buccellato, tarta de cerezas, pastel de mantequilla, magdalena decorada, tarta de zanahoria, tarta de queso, tarta de chocolate, tarta de navidad, tarta de muselina, croquembouche, magdalena, pastel del diablo, tarta de cereales, bizcochito, tarta de frutas, tarta de chocolate alemán, tarta genovesa, pan de jengibre, masa gutiforme, pastel de mantequilla pegajosa, pastel de leche caliente, tarta helada, tarta de Jaffa, tarta fermentada, pastel de luna, panetone, tarta de piña, bizcocho de tarta, tarta Queen Elisabeth, tarta de habas rojas, tarta terciopelo rojo, tarta Sacher, pastel de frutas, tarta especiada, bizcocho esponjoso, suncake taiwanés, tarta de té, tarta tatín, tarta de pisos de vainilla o tarta nupcial
- 25
- el queso es un producto lácteo cuajado, de los cuales existen muchas variedades; por ejemplo, queso sardo, queso testauri, queso bokmakiri, queso kwaito, queso wookie, queso ackawi, queso canasta, labneh, queso arabieh jibneh, queso kenafa, queso Naboulsi, paneer, affineur, bergkäse, brimsen, dachsteiner, queso gris tirolés, luneberg, queso voorde cheese, queso de Bruselas, queso de Herveo, queso Limburger, queso Maredsous, queso passendale, queso de la meseta de Herveo, queso Postel, queso Remedou, queso azul danés, tilsit danés o Harvati tilsit, queso emmental Allgäu, queso cambozola, queso harzer, queso Limpburger, queso Spundekäs, queso feta, queso halloumi o queso mozzarella
- 30
- el postre es un plato, habitualmente dulce, y que generalmente se sirve después del plato principal, por ejemplo, helado; por ejemplo, bizcochos o galletas, tartas, pasteles calientes, flanes, fruta, postres de gelatina, helados, merengues, pastas, pasteles o empanadas, púdines, sorbetes, suflés o trifes
- 35
- patatas fritas francesas, patatas fritas; por ejemplo fritos de patata o "crisps", tortillas fritas o fritos de maíz
- 40
- alimento funcional (los alimentos funcionales se denominan nutracéuticos, un híbrido entre los agentes nutricionales y los farmacéuticos, y puede incluir alimentos que se hayan modificado genéticamente; la categoría general incluye alimentos procesados hechos a partir de ingredientes de alimentos funcionales, o fortificados con aditivos que promueven la salud, como productos "enriquecidos con vitaminas", y también, alimentos frescos (por ejemplo) que tienen reivindicaciones específicas adjuntas)
- 45
- mermelada y gelatina; por ejemplo, la mermelada de grosellas, grosellas rojas, grosellas negras, frutas cítricas, manzanas, frambuesas, fresas y moras maduras o jalea real
- 50
- pasta; por ejemplo pasta moldeada, campanelle, casarecci, cavatelli, conchiglie, conchiglioni, farfalle, fiori, fusilli, fusilli bucati, gemelli, gigli, gramigna, lumache, lumaconi, maltagliati, orecchiette, pipe, quadrefiore, radiatori, ricciolini, rotelle, rotini, spiralingini, strozzapreti, torchio o trofie
- 55
- pastel; por ejemplo, pastel de beicon y huevo, pastel de pollo con setas, pastel de carne en conserva, pastel de Cornualles, pastel de pescado, kalakukko, kulebjaka, pastel de pizza, pastel de cerdo, pastel de pot, pastel escocés, pastel del pastor, pastel de Stargazy, pastel de carne, pastel de carne y riñones, pastel de manzana, pastel de crema de plátano, pastel de arándanos negros, pastel de arándanos, pastel de crema Boston, pastel de bayas de temporada, pastel de cereza, pastel de crema de chocolate, pastel de crema de coco, tarta de crema, pastel de manzana alemán, tarta de uvas, tarta de lima, pastel de merengue de limón, pastel de limón, pastel de mezcla de bayas, pastel de naranja, pastel de melocotón, pastel de ruibarbo, pastel de ruibarbo con fresa, tarta de fresa o tarta de vinagre
- 60
- pizza; por ejemplo los tipos clásicos y sus aderezos respectivos incluyen: marinara o napolitana: tomate, aceite
- 65

de oliva, orégano, y ajo; margarita: tomate, aceite de oliva, hojas frescas de albahaca, y fior-di-latte (mozzarella hecha de leche de vaca) o mozzarella de búfala; queso y tomate: aceite de oliva, y queso parmesano gratinado, las hojas de albahaca son opcionales; ripieno o calzone: fior-di-latte o mozzarella de búfala, a veces también queso ricotta, aceite de oliva, y salami, otras carnes, verduras, etc o estrómboli: mozzarella, carne, verduras, etc.

5 · carnes procesadas; por ejemplo de anfibios, sapo, carne artificial, carne de imitación, carne *in vitro*, res (bovinos), de búfalo, ganado, filetes, vacuno (terneros), yak, aves de corral (aves), pollo, pato, aves de caza, pavo, cánidos, marisco, pescado, tiburón, crustáceos, cangrejo, conejo, carnero (oveja) cordero, porcina (cerdos), jamón (pernil), beicon (tiras curadas de carne) o insectos

10 · bocadillos; por ejemplo bocadillo sirio, baguette rellena, bocadillo de beicon, bollo, hamburguesa, burrito, rollo de patatas, sándwich club, de queso a la parrilla, döner kebab, sándwich caliente de Georgia, sándwich fundidos: de atún fundido, etc., panini, bocadillo de carne, taco, sándwich de té, sándwich tostado, torta o rollito

15 · ensalada; por ejemplo, ensalada César, ensalada del chef, ensalada de Cobb, ensalada griega, ensalada italiana, ensalada mézclum, ensalada de Nicosia, ensaladas de frijoles como la ensalada de habas verdes, ensalada de siete frijoles, ensalada de pollo, ensalada de huevo, ensalada de frutas (en rodajas, frutas peladas servidas en su propio jugo o con un aderezo), de Larb, ensalada de pasta, ensalada de patata, ensalada somen, som tam, tabulé, ensalada Waldorf o ensalada Watergate

20 · salsa; por ejemplo, salsas blancas, salsa de setas, salsa de almendras, salsa americana, salsa suprema, salsas de eluté de castaña, salsa bordelesa, salsa bourguignon, salsa de Chateaubriand, salsa africana, salsa robert, salsa bechamel, salsa mornay, salsas emulsionadas, salsa bearnesa, salsa holandesa, mayonesa, salsa tártara, crema salada, salsas de mantequilla, mantequilla blanca, café de París, salsas dulces, salsa de pescado, sambal, salsa barbacoa, mole, salsa de tomate o tzatziki

25 · embutido; por ejemplo, andouille, pudín negro, morcilla, boerewors, bratwurst, salchichas de desayuno, butifarra, chorizo, salchichas Cumberland, falukorv, fuet, haggis, kieska, kielbasa, kishka, kishke, knackwurst, kovbasa, landjäger, lin-guiça, salchicha de hígado, lukanka, mettwurst, de carne picada, mortadela, salami, soujouk, thüringer, weißwurst o pudín blanco

30 · alimentos de aperitivo: confitería, patatas fritas, chocolate, galletitas saladas, barras de caramelo, comida rápida, por ejemplo, cacahuets hervidos, barras de caramelo, cheetos, mezcla de Chex, galletas, crackers, combos, galletas rellenas de toffee, aperitivos salados con forma cilíndrica, helado, alfajores, pirate's booty, palomitas de maíz, cortezas de cerdo, patatas fritas, galletas saladas, smart puffs, refrescos, bolas de nieve, alimentos para estudiantes, pastel de rollos suizos, tings, galletitas, bocadillo veggie booty o tartas cebra

35 · sopa; por ejemplo sopas de postre (ginataan, sopa filipina hecha de leche de coco, leche, frutas y perlas de tapioca); oshiruko, una sopa japonesa de semilla de azuki o sopas de frutas, sopa de melón de invierno, sopa miso, pho, ramen, saimin, sopa de patata rumana, avgolemono, borscht, bouillabaisse, callaloo, sopa cock-a-leekie, fanesca, gazpacho, sopa de lentejas, sopa menestrón, sopa mulligatawny, caldo escocés, sopa de guisantes, solyanka, sopa tarator o waterzooi.

40 · azúcar o productos azucarados; por ejemplo miel de caña, caramelos o chocolates.

45 · yogur, cuajada, crema agria, crema batida, por ejemplo lassi, kefir, ayran, doogh o tarator.

· bebidas en polvo o comprimidos; por ejemplo, bebidas de vitaminas o bebidas de minerales

50 · cápsulas o comprimidos

· alimentos terapéuticos (los alimentos terapéuticos son alimentos diseñados para fines específicos, habitualmente nutricionales terapéuticos), alimentos funcionales, alimentos medicamentosos, alimentos enterales, alimentos parenterales, alimentos para uso sanitario especificado.

55 Los ejemplos son Ensure, una bebida de batido de leche fortificado diseñada principalmente para los ancianos, y Plumpy'nut, un alimento basado en cacahuets diseñada para la alimentación de emergencia de los niños con desnutrición grave.

60 En otra realización preferente la formulación de la invención se fabrica como un fármaco de venta libre.

65 En un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica de Core-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva para Core-1; dicho nutraceutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo para Core-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden a los mismos se administran a un individuo sano. En otra realización preferente, en un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica de Core-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva para Core-1, dicho nutraceutico,

dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo para Core-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden a los mismos se administran a un individuo con un cáncer, un tumor, al menos una célula tumoral o cancerosa, o al menos una metástasis.

5 En particular, el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden a los mismos puede usarse para inducir una respuesta inmunitaria
 10 contra un cáncer, tumor, célula cancerosa, o células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas, para inducir una respuesta inmunitaria que funciona como una protección inmunitaria contra células tumorales, un cáncer, tumor, célula cancerosa, o células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas, para tratar un tumor o
 15 cáncer, las metástasis y/o la metástasis, y/o para reducir o prevenir la aparición, diseminación o metástasis de un cáncer, tumor, célula cancerosa, o células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas en individuos sanos o pacientes, respectivamente, cada una de ellas comprende preferentemente al menos una célula tumoral positiva para Core-1, seleccionada de un cáncer, tumor o de enfermedades cancerosas o tumorales tal como se describe más adelante o en otras partes del presente documento. Por ejemplo, el tratamiento se dirige contra tumores o
 20 cánceres primarios, enfermedades tumorales o cancerosas mínimas residuales, recaídas y/o metástasis o partes de las mismas. El tratamiento de los tumores o cánceres también puede efectuarse como un tratamiento adyuvante. El nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo para Core-1 o la fracción del mismo, o dichas formulaciones que comprenden a los mismos pueden usarse también en la profilaxis de enfermedades tumorales positivas para Core-1, tumores o células tumorales. Por ejemplo, el uso profiláctico se dirige a la profilaxis de tumores y metástasis. Estos agentes antitumorales se administran en una forma adecuada de acuerdo con métodos que bien conocidos o tal como se describe en otras partes del presente documento. Una variante preferente es la inyección o administración de los mismos agentes o fármacos antitumorales por vía oral, intravenosa, localmente en las cavidades corporales, por ejemplo, por vía intraperitoneal, intrarrectal, intragastrointestinal, local, por ejemplo, directamente en un tumor, en órganos o vasos linfáticos (intranodal), pero también por vía subcutánea, intradérmica o sobre la piel, y por vía intramuscular. En un modo preferente, también pueden combinarse los tipos de
 25 administración, en cuyo caso la administración puede efectuarse en distintos días del tratamiento o en un día del tratamiento tal como se describe con detalle en otras partes del presente documento. De acuerdo con la invención, también es posible combinar dos o más de los nutracéuticos, composiciones farmacéuticas, microorganismos positivos para Core-1 o las fracciones de los mismos inventivos o formulaciones que comprenden a los mismos así como combinar una combinación de los mismos con uno o más fármacos o tratamientos tumorales, tales como terapias con anticuerpos, quimioterapias o radioterapias, administradas o aplicadas adecuadamente al mismo tiempo o en tiempos separados.

35 El cáncer, tumor, células tumorales, células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas se selecciona del grupo de las enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales de la región otorrinolaringológica, de los pulmones, mediastino, tracto gastrointestinal, sistema urogenital, sistema ginecológico, mama, sistema endocrino, piel, sarcomas óseos y de tejidos blandos, mesoteliomas, melanomas, neoplasmas del sistema nervioso central, enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales durante la infancia, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásicos, metástasis con tipos desconocidos de tumores primario (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneal, malignidades y/o metástasis tumorales relacionadas con la inmunosupresión.

Más específicamente, el cáncer, tumor, células tumorales, células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas puede comprender los siguientes tipos de cáncer: adenocarcinoma de mama, próstata y colon; todas las formas de cáncer de pulmón que comienzan en el tubo bronquial; cáncer de médula ósea, melanoma, hepatoma,
 45 neuroblastoma, papiloma, apudoma, coristoma, branquioma, y síndrome carcinoide maligno; enfermedad cardiaca carcinoide, carcinoma (por ejemplo, carcinoma de Walker, carcinoma de células basales, carcinoma basal escamoso, carcinoma de Brown-Pearce, carcinoma ductal, tumor de Ehrlich, carcinoma *in situ*, carcinoma de cáncer 2, carcinoma de células de Merkel, carcinoma mucoso, carcinoma bronquial no parvicelular, carcinoma de células de avena, carcinoma papilar, carcinoma de escirro, carcinoma bronquio-alveolar, carcinoma bronquial, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transicionales); trastorno funcional histiocítico; leucemia (por ejemplo en conexión con células B de leucemia, leucemia de células mixtas, leucemia de células nulas, leucemia de células T, leucemia crónica de células T, leucemia asociada a HTLV-II, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mastocítica, y leucemia mieloide); histiocitosis maligna. Enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, tumor de células plasmáticas tumorales solitarias; reticuloendoteliosis, condroblastoma; condroma, condrosarcoma;
 55 fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes, histiocitoma; lipoma; liposarcoma; leucosarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; Sarcoma de Ewing; sinovioma; adenofibroma; adenolinfoma; carcinosarcoma; cordoma, craneofaringioma, disgerminoma, hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma; timoma, corioblastoma; adenocarcinoma, adenoma, colangioma, colesteatoma; cilindroma; cistadenocarcinoma, cistadenoma; tumores de células granulosas, ginadroblastoma; hidradenoma; tumor de células de los islotes; tumor de células de Leydig; papiloma, tumor de células de Sertoli; tumor de células tecales; leiomioma; leiomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabdomioma; rabdomyosarcoma; ependimoma, ganglioneuroma, glioma; meduloblastoma, meningioma; neurilemmoma; neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paragangliona no gromafin, angioqueratoma, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia; angioma esclerotizante; angiomatosis; glomangioma; hemangiendotelio; hemangioma; hemangiopericitoma, hemangiosarcoma; linfangioma, linfangioma, linfangiosarcoma, pinealoma; cistosarcoma filoides; hemangiosarcoma; linfangiosarcoma;

5 mixosarcoma, carcinoma de ovario, sarcoma (por ejemplo, sarcoma de Ewing, experimentalmente, sarcoma de Kaposi y sarcoma mastocítico); neoplasmas (por ejemplo, neoplasmas óseos, neoplasmas mamarios, neoplasmas del sistema digestivo, neoplasmas colorrectales, neoplasmas hepáticos, neoplasmas pancreáticos, neoplasmas hipofisarios, neoplasmas testiculares, neoplasmas orbitales, neoplasmas de la cabeza y el cuello, del cerebro y sistema nervioso central, neoplasmas del órgano del oído, pelvis, tracto respiratorio y tracto urogenital); neurofibromatosis y displasia cervical de células escamosas, y/o metástasis derivada de cualquiera de los mismos.

10 En una realización preferente, tumor, células tumorales, células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas se selecciona del grupo de las enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales que comprenden al menos una célula o preferentemente un número significativo de células más preferentemente una mayor parte de las células tumorales que son positivas para Core-1 en la definición de acuerdo con la invención, seleccionadas del grupo de:
 15 tumores de la región otorrinolaringológica, que comprenden la nariz interna, senos nasales, nasofaringe, labios, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, oído, glándulas salivares, y paragangliomas, tumores de los pulmones, que comprenden carcinomas bronquiales no parvicelulares, carcinomas bronquiales parvicelulares, tumores del mediastino, tumores del tracto gastrointestinal, que comprenden tumores del esófago, estómago, páncreas, hígado vesícula biliar y tracto biliar, intestino delgado, carcinomas de colon y rectales y carcinomas anales, tumores urogenitales que comprenden tumores de los riñones, uréter, vejiga, glándula prostática, uretra, pene y testículos, tumores ginecológicos que comprenden tumores del cuello uterino, vagina, vulva, cáncer de útero, enfermedad trofoblástica maligna, carcinoma de ovario, tumores de la trompa uterina (Trompa de Falopio), tumores de la cavidad abdominal, carcinomas mamarios, tumores de los órganos endocrinos, que comprenden tumores del tiroides, paratiroides, corteza adrenal, tumores del páncreas endocrino, tumores carcinoideos y síndrome carcinoide, neoplasias endocrinas múltiples, sarcomas óseos y de tejidos blandos, mesoteliomas, tumores de piel, melanomas que comprenden melanomas cutáneos y melanomas intraoculares, tumores del sistema nervioso central, tumores durante la infancia, que comprenden retinoblastoma, tumor de Wilms, neurofibromatosis, neuroblastoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, linfomas que comprenden linfomas no-Hodgkin, linfomas cutáneos de células T, linfomas primarios del sistema nervioso central, Enfermedad de Hodgkin, leucemias que comprenden leucemias agudas, leucemias mieloides y linfática crónica, neoplasma de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos, síndromes paraneoplásicos, metástasis con tipos desconocidos de tumores primario desconocidos (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneal, malignidad relacionada con la inmunosupresión que comprenden las malignidades relacionadas con el SIDA tales como el sarcoma de Kaposi, linfomas asociados a SIDA, linfomas asociados a SIDA del sistema nervioso central, enfermedad de Hodgkin asociada a SIDA, y tumores urogenitales asociados a SIDA, malignidad relacionada con el trasplante, tumores metastatizados que comprenden metástasis cerebrales, metástasis pulmonares, cáncer de hígado, metástasis hepáticas, metástasis óseas, metástasis pleurales y pericárdicas, y ascitis maligna, y/o metástasis derivada de cualquiera de los mismos.

35 En otra realización preferente el cáncer, tumor, células tumorales, células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas se selecciona del grupo que comprende enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales tales como los carcinomas mamarios, tumores gastrointestinales, incluyendo carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer gástrico temprano, cáncer de intestino delgado, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma maligno, y/o cáncer hepático, y/o metástasis derivada de cualquiera de los mismos.

40 En una realización preferente adicional el cáncer, tumor, células tumorales, células cancerosas o la metástasis derivada de las mismas se selecciona del grupo de las enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales que comprenden al menos una célula, preferentemente un número significativo de células, o más preferentemente una mayor parte de las células tumorales, que son positivas para Core-1 en la definición de acuerdo con la invención, seleccionadas del grupo de carcinomas mamarios, tumores gastrointestinales, incluyendo carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer gástrico temprano, cáncer de intestino delgado, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma maligno, y/o cáncer hepático, y/o metástasis derivada de cualquiera de los mismos.

45 En una realización preferente, en el método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica de Core-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva para Core-1, el cáncer, un tumor, al menos una célula tumoral o cancerosa, o al menos una metástasis comprende al menos una célula que es positiva para Core-1. En una realización preferente adicional, en el método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica de Core-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva para Core-1, el individuo tiene cáncer, un tumor, al menos una célula tumoral o cancerosa, o al menos una metástasis seleccionada del grupo de las enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales que comprenden carcinomas mamarios, tumores gastrointestinales, incluyendo carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer gástrico temprano, cáncer de intestino delgado, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma maligno, y/o cáncer hepático, y/o metástasis derivada de cualquiera de los mismos.

60 En un estudio con voluntarios humanos sanos los títulos de anticuerpos contra Core-1 se determinan determinando la respuesta de anticuerpos existente contra Core-1 antes de la primera aplicación del nutracéutico y preferentemente se seleccionan voluntarios con niveles bajos de o sin anticuerpo anti-Core1 para el ensayo en seres

humanos. A esos voluntarios se les proporciona el nutraceutico por vía oral que comprende AG6 o MU1 o un placebo a lo largo de un periodo de 3 a 30 semanas. Se realiza la aplicación oral de al menos dos dosificaciones adecuadas distintas. Se siguen las respuestas inmunitarias mediante determinación del anticuerpo y/o la respuesta de células T contra Core-1 antes de y en intervalos adecuados después del comienzo de la administración oral del nutraceutico. Hay una elevación significativa de la respuesta del anticuerpo contra Core-1 y/o respuesta de células T contra Core-1 observada en un número significativo de voluntarios en el grupo de voluntarios que recibe el nutraceutico en comparación con el título antes del estudio tal como se ensayó positivamente siendo positivo. En el grupo placebo la elevación del anticuerpo o la respuesta de células T contra Core-1 se observa con menos frecuencia o en un menor grado. Esto muestra la eficacia del nutraceutico en seres humanos para construir una respuesta inmunitaria contra Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 para la prevención, reducción o diseminación de los tumores o metástasis positivos para Core-1 o su tratamiento.

En un estudio con pacientes de cáncer inmunocompetentes con tumores positivos para Core-1 los títulos de anticuerpo contra Core-1 en suero se determinan determinando la respuesta de anticuerpos existente contra Core-1 antes de la primera aplicación de la composición farmacéutica. La composición farmacéutica que comprende AG6 o MU1 o un placebo se administra varias veces por vía oral, vía peritoneal o vía intravenosa a lo largo de un periodo de 3 a 70 semanas. Se realiza la administración de al menos dos dosificaciones adecuadas distintas. Se siguen las respuestas inmunes mediante la determinación del anticuerpo y/o la respuesta de células T contra Core-1 y/o la respuesta clínica se sigue mediante la determinación del tiempo de progresión, supervivencia libre de tumor y/o volúmenes tumorales y/o sitios, cada uno antes de y en intervalos adecuados después del comienzo de la administración de la composición farmacéutica. Hay una elevación significativa de la respuesta de anticuerpos contra Core-1 o de la respuesta de células T contra Core-1 observada en un número significativo de voluntarios del grupo que recibe la formulación de la invención en comparación con el título antes del estudio y/o una respuesta clínica parcial o completa o un tiempo alargado hasta la progresión o tiempo de supervivencia en un número significativo de los pacientes que reciben la formulación. En el grupo placebo la elevación del anticuerpo o la respuesta de células T contra Core-1 se observa con menos frecuencia o en un grado menor y/o no se observa respuesta clínica o se hace en un grado menor.

Esto muestra la eficacia de la composición farmacéutica en seres humanos para construir una respuesta inmunitaria contra Core-1 que funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1 para la prevención, reducción o diseminación de la aparición de tumores o metástasis positivos para Core-1 o su tratamiento.

El contacto del microorganismo positivo para Core-1 o fracción del mismo dentro del cuerpo del organismo vivo (humano/animal) inicia la producción de anticuerpos que se unen a Core-1, el antígeno Core-1, o a células tumorales positivas para Core-1. Sorprendentemente, los anticuerpos contra Core-1 funcionan como un mecanismo de inmunovigilancia contra células cancerosas de nueva aparición.

E) Métodos para tratar o prevenir un trastorno gastrointestinal

Un método para reducir o prevenir la aparición o diseminación de un trastorno o enfermedad gastrointestinal que comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo, o formulaciones que comprenden a los mismos.

Las cantidades eficaces del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo, o formulaciones que comprenden a los mismos se describen en otras partes del presente documento.

En otra realización preferente, en el método para reducir o prevenir la aparición o diseminación de un trastorno o enfermedad gastrointestinal, dicho nutraceutico, o dicha formulación farmacéutica, o dicho microorganismo positivo para Core-1, o dicha fracción del mismo los cuales se describen en otras partes del presente documento, o dichas formulaciones son o comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo para Core-1 unido por Nemod-TF1 o A78-G/A7 y Nemod-TF2.

En otra realización preferente, en el método para reducir o prevenir la aparición o diseminación de un trastorno o una enfermedad gastrointestinal, dicho nutraceutico, o dicha formulación farmacéutica, o dicho microorganismo positivo para Core-1, o dicha fracción del mismo los cuales se describen en otras partes del presente documento, o dichas formulaciones son o comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de la cepa AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728) y LH2 (DSM 18727), más preferentemente de las cepas AG6 o MU1, más preferentemente de la cepa AG6.

En otra realización preferente, un método para tratar una enfermedad o un trastorno gastrointestinal comprende la administración a un ser humano o a un animal de una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo, o formulaciones que comprenden a

los mismos. En otra realización preferente del método para tratar una enfermedad o un trastorno gastrointestinal, la enfermedad gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal o un trastorno funcional del intestino.

5 Un método para reducir o preferentemente para evitar la aparición de un trastorno o enfermedad gastrointestinal, preferentemente una enfermedad inflamatoria intestinal o un trastorno funcional del intestino, comprenden administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo los cuales se describen en otras partes en el presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos, preferentemente a un individuo sano.

10 Un método para reducir o incluso que se prefiere adicionalmente para prevenir la diseminación de un trastorno o enfermedad gastrointestinal, preferentemente una enfermedad inflamatoria intestinal o un trastorno funcional del intestino, comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo los cuales se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos.

15 Un método para tratar un trastorno o enfermedad gastrointestinal, preferentemente una enfermedad inflamatoria intestinal o un trastorno funcional del intestino, comprende administrar a un ser humano o a un animal una cantidad eficaz del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo los cuales se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos.

20 En una realización preferente, el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo los cuales se describen en otras partes en el presente documento, o formulaciones que comprenden aquellos de los métodos anteriormente descritos comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo para Core-1 unido por Nemod-TF1 o A78-G/A7 y Nemod-TF2.

25 En una realización preferente, el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo los cuales se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los métodos anteriormente descritos comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de la cepa AG6 (DSM 18726), la cepa MU 1 (DSM 18728), y/o la cepa LH2 (DSM 18727), más preferentemente de la cepa AG6 y/o MU1, más preferentemente de la cepa AG6.

30 Las vías de administración, dosificaciones eficaces, formulaciones son tales como se describen en otras partes del presente documento, preferentemente aquellas tal como se describen dentro de los métodos para tratar o prevenir las enfermedades o tumores positivos para Core-1. En una realización preferente, se administran dos dosis por día que comprenden de 10^9 a 10^{12} microorganismos positivos para Core-1 a lo largo de al menos dos semanas.

35 Los trastornos gastrointestinales se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en trastornos funcionales del intestino y enfermedades inflamatorias intestinales; por lo que las enfermedades inflamatorias intestinales se seleccionan del grupo que comprende enfermedad de Crohn, ileítis, y/o colitis ulcerosa y los trastornos funcionales del intestino se seleccionan del grupo que comprende reflujo gastroesofágico, dispepsia, síndrome del intestino irritable y/o dolor abdominal funcional. El tracto gastrointestinal en el contexto de la invención consiste de los siguientes componentes: boca (cavidad bucal; incluye las glándulas salivales, mucosa, dientes y lengua), faringe, esófago y cardias, estómago, el cual incluye el antro y el píloro, tracto intestinal o intestino: intestino delgado, el cual tiene tres partes: duodeno, yeyuno, íleo; intestino grueso, el cual tiene tres partes: ciego (el apéndice vermiforme que está unido al ciego); colon (colon ascendente, colon transversal, colon descendente y flexura sigmoidea); recto y/o ano.

40 En un estudio con pacientes humanos que tienen el síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn (EC), ileítis o colitis ulcerosa, el nutraceutico o la composición farmacéutica que comprende AG6 o MU1 o un placebo, se administra por vía oral durante un período de 3 a 30 semanas. Se realiza la administración de al menos dos dosificaciones adecuadas distintas. Las respuestas clínicas tales como la reducción de la hinchazón o las flatulencias, el mantenimiento de la remisión en la EC, la mejora de la calidad de vida, la reducción del tiempo o la gravedad de un brote, la disminución de la diarrea, el mantenimiento de la remisión de la bursitis, inducción o mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa activa, se siguen, respectivamente antes y en intervalos adecuados después del comienzo de la administración del nutraceutico o de la composición farmacéutica. Hay una mejora significativa en al menos uno de los síntomas anteriores o respuestas clínicas observadas en un número significativo de pacientes que reciben el nutraceutico o la composición farmacéutica que en aquellos del grupo con placebo. Esto muestra la eficacia del nutraceutico o la composición farmacéutica en seres humanos para la prevención, reducción, diseminación o tratamiento de trastornos gastrointestinales.

F) Generación de células dendríticas, células T, clones de células T y líneas de células T específicas de Core-1

65 Un método para la generación de una célula dendrítica funcional contra Core-1 puede comprender poner ésta en contacto con una cantidad adecuada de una célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de

células que comprende al menos una célula dendrítica con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo para Core-1 I, lisado, o fracción del mismo, tal como se describe en otras partes del presente documento, o una molécula que porta Core-1 o una célula tumoral positiva para Core-1 I, el lisado o fracción de la misma, durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para generar al menos una célula dendrítica funcional contra Core-1.

5 Un método para la generación de una célula dendrítica funcional contra Core-1 puede comprender poner en contacto una cantidad adecuada de una célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo para Core-1, lisado, o fracción del mismo, tal como se describe en otras partes del presente documento durante un
10 tiempo adecuado en condiciones adecuadas para generar al menos una célula dendrítica funcional cargada con Core-1.

15 Un método para la generación de una célula dendrítica funcional contra Core-1 puede comprender poner en contacto una cantidad adecuada de una célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de células que comprende al menos una célula dendrítica con una cantidad adecuada de al menos una molécula que porta Core-1 o una célula tumoral positiva para Core-1, el lisado o fracción de la misma, tal como se describe en otras partes del presente documento, durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para generar al menos una célula dendrítica funcional cargada con Core-1.

20 En una realización preferente de la invención, la célula dendrítica funcional contra Core-1 se obtuvo poniendo en contacto una célula dendrítica inmadura o una mezcla de células dendríticas inmaduras o una mezcla de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica inmadura con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo para Core-1, lisado, o fracción del mismo, tal como se describe en otras partes del presente documento durante un tiempo adecuado y en condiciones adecuadas para madurar dicha célula dendrítica usando
25 condiciones adecuadas tal como se describe en otras partes del presente documento y tal como se conoce por los expertos en la materia, que comprende por ejemplo las moléculas TNFalfa (factor de necrosis tumoral alfa), LPS (Lipopolisacárido) o BCG (Guerina de Bacilo Calmette), INFgamma (interferón gamma), dexametasona, y/o TGFbeta (factor del crecimiento transformante beta), a una célula dendrítica funcional cargada con Core-1. En una realización preferente de la invención, la célula dendrítica deriva de MUTZ-3 o NemoDC (obtenible de Glycotope GmbH Berlín, Alemania; www.glycotope.com), y las células dendríticas inmaduras preferentes adicionales se generaron de células
30 MUTZ-3 o DCNemo en condiciones adecuadas que comprenden usar IL-4 y GM-CSF típicamente durante aproximadamente una semana, las células dendríticas inmaduras resultantes o iNMDc se ponen en contacto con dicha cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo para Core-1, lisado, o fracción del mismo, las células se maduran usando unas condiciones adecuadas que comprenden por ejemplo, TNFalfa, LPS, BCG, IFNgamma, dexametasona, o TGFbeta, preferentemente TNFalfa, típicamente durante aproximadamente de uno a dos días dando como resultado células dendríticas maduras cargadas con el Core-1 correspondiente a dicha célula dendrítica funcional contra Core-1.

40 Las realizaciones preferentes de la presente invención se describen en los ejemplos.

Un método para la generación de una célula T o células T activadas contra Core-1 puede comprender

- 45 (a) poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas funcionales o una mezcla de células que contiene al menos una célula dendrítica funcional, cargada con cantidades adecuadas del microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo con al menos una célula T o células T
(b) el cultivo de dicha célula T o células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Core-1.

50 Un método para la generación de una célula T o células T activadas contra Core-1 puede comprender

- (a) poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas funcionales o una mezcla de células que contiene al menos una célula dendrítica funcional cargada con cantidades adecuadas de una molécula que porta Core-1 o una célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma con una de célula T o células T o una mezcla de células que contienen al menos una célula T
55 (b) el cultivo de dicha célula T o células T o mezcla de células que contiene al menos una célula T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula o células T contra Core-1.

60 En una realización preferente el método para la generación de una célula T o células T activadas contra Core-1 comprende

- (a) poner en contacto cantidades adecuadas de células dendríticas funcionales cargadas con cantidades adecuadas del microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo con una célula T o células T
65 (b) el cultivo de dicha célula T o células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Core-1
(c) la adición de células dendríticas funcionales cargadas con una molécula que porta Core-1 o una célula

tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación
(d) el cultivo durante tiempos y condiciones apropiadas.

5 En una realización preferente del método para la generación de una célula T o células T activadas contra Core-1 comprende

- 10 a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprenden al menos una célula T
b) cultivar dicha célula T o mezcla de células T o mezcla de células que comprenden al menos una célula T con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Core-1.

15 En una realización preferente del método para la generación de una célula T o células T activadas contra Core-1 comprende

- 20 a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula que porta Core-1 o una célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprenden al menos una célula T
b) cultivar dicha célula T o mezcla de células T o mezcla de células que comprenden al menos una célula T con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Core-1.

25 En otra realización preferente del método para la generación de una célula T o células T activadas contra Core-1 comprende las etapas (a) y (b) de los métodos anteriores y posteriormente comprende,

- 30 (c) añadir una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula que porta Core-1 o una célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación;
o añadir una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo para la reestimulación; y
35 (d) el cultivo durante un tiempo apropiado y en condiciones apropiadas;

En otra realización preferente del método para la generación de una línea de células T contra Core-1 comprende las etapas (a), (b), (c) y (d) del método anterior y posteriormente comprende al menos una ronda adicional de reestimulación por lo que una ronda de reestimulación comprende bien las etapas (e) y (f) o etapas (g) y (h), con

- 40 (e) la adición de una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula que porta Core-1 o célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación;
(f) cultivo durante un tiempo apropiado y en unas condiciones apropiadas y
(g) adición de una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad
45 adecuada de al menos un microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo para la reestimulación
(h) cultivo durante un tiempo apropiado y en unas condiciones apropiadas.

50 En una realización preferente adicional, el método para generación de una línea de células T contra Core-1 adicionalmente comprende dos rondas adicionales de dicha ronda de estimulación. En una realización más preferente, el método para la generación de una línea de células T contra Core-1 comprende tres rondas adicionales de dicha ronda de reestimulación. En una realización aún más preferente, el método para la generación de una línea de células T contra Core-1 comprende cinco rondas adicionales de dicha ronda de reestimulación.

55 En una realización preferente adicional, en el método para la generación de un clon de células T contra Core-1 se realiza una etapa adicional de clonación de las células al menos antes de una ronda de dichas rondas de reestimulación. En una realización preferente, la célula T o células T activadas son una línea de células T contra Core-1, por lo que preferentemente (c) y (d) que corresponden a una ronda de reestimulación se realizan dos veces, más preferentemente tres veces, más preferentemente 4 veces, y más preferentemente una línea de células T para la cual se realizan más de 4 rondas de reestimulación.
60

65 En una realización preferente la célula T o células T activadas son un clon de células T contra Core-1, por lo que preferentemente (c) y (d) que corresponden con una ronda de reestimulación se realizan dos veces, más preferentemente tres veces, más preferentemente 4 veces, más preferentemente una línea de células T para la cual se realizan más de 4 rondas de reestimulación, y las células se clonan al menos una vez, por ejemplo mediante dilución de una sola célula, antes de la reestimulación.

En una realización preferente adicional, en el método para la generación de un clon de células T contra Core-1 dicha célula dendrítica funcional es una célula dendrítica madura. En una realización preferente adicional, el método para la generación de un clon de células T contra Core-1 dicha célula dendrítica funcional y la célula T o células T son células humanas.

5 En una realización preferente adicional, en el método para la generación de una célula T, línea de células T o clon de células T activado contra Core-1 dicha célula dendrítica funcional deriva de MUTZ-3 [solicitudes de patente 10139428.4 (DE), PCT/EP02/09260, 02758474.7 (EP), US10/486,966, CA2,457,287, DE10139428A1, WO2003/023023A1, EP01419240, US20040265998, CA2457287] tales como Nemod-DC (obtenible de Glycotope GmbH Berlín, Alemania, www.glyco-tope.com).

10 En una realización preferente adicional, en el método para la generación de una célula T, una línea de células T o clon de células T activado contra Core-1 dicha célula dendrítica funcional y la célula T o células T coinciden en al menos una clase de molécula de MHC.

15 En una realización preferente, el método para generación de una célula T, células T, clon de células T o línea de células T activada contra Core-1 comprende

- 20 a. poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional contra Core-1 tal como se describe en otras partes del presente documento con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprenden al menos una célula T; y
 b. cultivo de dicha célula T o mezcla de células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en unas condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Core-1.

25 En una realización preferente el método para la generación de una célula T, células T, clon de células T o línea de células T activada contra Core-1, comprende bien

- 30 a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional contra Core-1 cargada con dicho microorganismo positivo para Core-1, lisado, o fracción del mismo, con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprenden al menos una célula T; y
 b) el cultivo de dicha célula T o mezcla de células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en unas condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Core-1; y
 35 c) añadir una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con dicha molécula que porta Core-1 o célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación; y
 d) el cultivo durante un tiempo apropiado y bajo unas condiciones apropiadas;

40 o

- 45 a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional contra Core-1 cargada con dicha molécula que porta Core-1 o célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprende al menos una célula T; y
 b) el cultivo de dicha célula T o mezcla de células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Core-1; y
 50 c) añadir una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con dicho microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la reestimulación; y
 d) el cultivo durante un tiempo apropiado y en unas condiciones apropiadas.

55 Las realizaciones preferentes de la invención se describen en los ejemplos.

En una realización preferente adicional la célula T o células T activadas contra Core-1, la composición de células que comprende las células T contra Core-1, la línea de células T contra Core-1, o en el clon de células T contra Core-1 tal como se describe anteriormente comprende al menos una célula CD4+ auxiliar contra Core-1.

60 En una realización preferente adicional la célula T o células T activadas contra Core-1, la composición de células que comprende las células T contra Core-1, la línea de células T contra Core-1, o en el clon de células T contra Core-1, tal como se describe anteriormente comprende al menos una célula T citotóxica contra Core-1.

65 En una realización preferente adicional la célula T o células T activadas contra Core-1, la composición celular que comprende al menos una célula T contra Core-1, la línea de células T contra Core-1, o el clon de células T contra Core -1 tal como se describe anteriormente destruyen al menos una célula tumoral positiva para Core-1 o secretan

moléculas que median la destrucción de al menos una célula tumoral.

La célula T o células T activadas contra Core-1, la composición de células que comprende células T contra Core-1, la línea de células T contra Core-1, o el clon de células T contra Core-1 que destruyen al menos una célula tumoral positiva para 1-Core o secretan moléculas que median la destrucción de al menos una célula tumoral significa, que dicha célula o células T citotóxicas contra Core-1 destruyen una célula tumoral positiva para Core-1, lo cual puede determinarse ya sea mediante el uso del ensayo de respuesta inmunitaria celular acorde que se describe en otras partes del presente documento, midiendo de la secreción de IFN γ o TNF alfa o mediante un ensayo de citotoxicidad donde al menos una célula tumoral positiva marcada con Core-1 se lisa por dichas células T principalmente conocidas para los expertos en la materia mediante el uso de las células T de la invención, por ejemplo LTC o de la respuesta Th1 o mediante la inducción de una respuesta específica de T CD4 auxiliares que media la activación de respuestas inmunes de humorales y celulares acordes que dan como resultado la destrucción de al menos una de célula tumoral positiva para Core-1.

Un método para tratar un paciente de cáncer puede comprender la administración de una cualquiera de la célula T o células T activadas contra Core-1, la composición celular que comprende al menos una célula T contra Core-1, la línea de células T contra Core-1, o en el clon de células T contra Core-1 tal como se describe anteriormente o una composición que comprende a las mismas. En una realización preferente el método para tratar un cáncer comprende la administración de una cantidad adecuada de al menos una de las células dendríticas funcionales contra Core-1 tal como se describe anteriormente o una composición que comprende a las mismas. En una realización preferente, en el método para tratar un paciente de cáncer el paciente tiene o ha tenido una célula cancerosa positiva para Core-1. En una realización más preferente, en el método para tratar un paciente de cáncer la célula dendrítica funcional es de origen autólogo. En otra realización preferente, en el método para tratar un paciente de cáncer la célula dendrítica funcional es de origen alogénico a partir de un donante. En una realización preferente, en el método para tratar a un paciente de cáncer la célula dendrítica funcional deriva de MUTZ-3. En una realización preferente, en el método para tratar a un paciente de cáncer la célula dendrítica funcional comparte al menos una clase de molécula de MHC con dicho paciente.

Un método para tratar un paciente de cáncer puede comprender la administración de cualquiera de la célula T o las células T activadas contra Core-1, la composición celular que comprende al menos una célula T contra Core-1, la línea de células T contra Core-1, o en el clon de célula T contra Core-1 que se describe en otras partes del presente documento o una composición que comprende al menos uno de los mismos. Un método para tratar un paciente de cáncer puede comprender la administración de una cantidad adecuada de al menos una de las células dendríticas funcionales contra Core-1 que descritas en otra parte del presente documento o una composición que comprende la misma. En una realización preferente, al menos uno de dichos métodos se usa para un paciente que tiene o ha tenido una célula cancerosa positiva para Core-1 que es detectable por al menos un anticuerpo específico de Core-1 y está en su realización preferente descrita en otras partes del documento. Se prefieren adicionalmente dichos métodos donde las células dendríticas funcionales son autólogas, se prefieren adicionalmente donde las células dendríticas funcionales son alogénicos, se prefieren adicionalmente cuando las células dendríticas funcionales se originan a partir de un donante, incluso más preferentemente cuando la célula dendrítica funcional deriva de MUTZ-3, incluso más preferentemente cuando cualquiera de las células dendríticas funcionales descritas comparte al menos una clase de molécula de MHC con el individuo al que se le administra.

Los expertos en la materia son capaces de realizar las funciones descritas usando los métodos y el material descritos en el presente documento. Estos pueden determinar las mejores condiciones para obtener aquellas células dendríticas funcionales o células T, la mejor vía de administración, y/o las composiciones adecuadas que comprenden a las mismas y/o que se describen adicionalmente en las realizaciones preferentes para la generación y uso en las solicitudes de patente DE10139428A1, WO2003/023023A1, EP01419240, US20040265998, CA2457287.

Preferentemente, dicha célula T o células T activadas contra Core-1 comprenden al menos una célula DC4+ auxiliar, e incluso más preferentemente al menos una célula T citotóxica capaz de destruir al menos una célula tumoral positiva para Core-1.

Dicha célula T o células T que se usan para poner en contacto es al menos una célula T DC4+ positiva y/o DC8+ que se aisló o se enriqueció antes por métodos convencionales o es una composición celular que comprende al menos una célula T DC4+ y/o DC8+. Dicho lisado puede ser cualquier lisado de un microorganismo positivo para Core-1 o de una célula tumoral positiva para Core-1, respectivamente, tal como, pero que no se limita a, un lisado generado por congelación y descongelación repetitiva mediante sonicación, mediante fuerza mecánica o por inducción térmica.

Para los detalles de la generación de las células T específicas de Core-1 véase el ejemplo 12.

Una célula dendrítica funcional es una célula que puede activar una célula T. La activación de una célula T significa la estimulación de la proliferación y/o conversión de una célula virgen a una célula T activa. Una célula T activa secreta moléculas que inducen o ayudan a una respuesta inmunitaria contra la diana Core-1 o las células tumorales que portan Core-1, preferentemente esas células T citotóxicas que median la destrucción de una célula tumoral

positiva para Core-1.

En una realización preferente, dicha célula dendrítica funcional es una célula dendrítica madura. Más preferentemente la célula dendrítica precursora de la cual deriva de la célula madura se obtiene de un ser humano, más preferentemente de un ser humano del cual se obtienen también la célula T o las células T o en el que coinciden al menos con clase de molécula MHC. En una realización más preferente la célula dendrítica funcional deriva de MUTZ-3, e incluso las células preferentes adicionales MUTZ-3 o células derivadas de las mismas se diferenciaron usando Il-4 y GM-CSF, se cargaron con cantidades apropiadas del microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo o la molécula que porta Core-1 o la célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma, y se maduraron adicionalmente usando por ejemplo cantidades adecuadas de TNF-alfa para madurar las células dendríticas que se corresponden con las células dendríticas funcionales de la invención. En una realización incluso más preferente las células dendríticas funcionales cargadas se usan junto con CMSP (células mononucleares de sangre periférica) coincidentes al menos en las MHC de clase I (HLA-A2) y (HLA-B44).

Los expertos en la materia son capaces de determinar las condiciones adecuadas para generar células dendríticas funcionales cargadas con el microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo o la molécula que porta Core-1 o la célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma, así como las cantidades adecuadas y los procedimientos de enriquecimiento o purificación de una célula T o células T y las condiciones adecuadas para cultivar ambas células conjuntamente, tales como las que comprenden los tiempos, los medios, las condiciones de cultivo y los factores adicionales necesarios. Las células dendríticas funcionales se diferencian típicamente a partir de células precursoras dentro de los 6-10 días y se cargan y se maduran durante otros de 1 a 2 días. El cultivo de dicha célula T o células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas es típicamente durante de 7 a 10 días, y la adición y el cultivo de células dendríticas cargadas funcionales para la reestimulación típicamente durante de 7 a 9 días para cada ronda de reestimulación. Los detalles adicionales se muestran en el ejemplo 12.

En otra realización preferente las células dendríticas o células dendríticas funcionales de distintas fuentes, tales como las células dendríticas derivadas de MUTZ-3 y derivadas un donante humano, se usan para las distintas etapas del cebado y la reestimulación. Los expertos en la materia son capaces de seleccionar la mejor combinación.

La descripción usada aquí para las células dendríticas, su uso y condiciones adecuadas y moléculas para su uso también son válidos para los ensayos de respuesta inmunitaria descritas en otras partes del presente documento y viceversa y serán válidos para el resto de las partes de la invención.

En una realización preferente la línea de células T o el clon de células T se generó usando células dendríticas funcionales derivadas de MUTZ-3 cargadas con el microorganismo positivo para Core-1, lisado o fracción del mismo en combinación con al menos una ronda de reestimulación con células dendríticas funcionales derivadas de MUTZ-3 cargadas con al menos una molécula que porta Core-1 o una célula tumoral positiva para Core-1, lisado o fracción de la misma de un donante, e incluso más preferentemente de un paciente tumoral, e incluso más preferentemente de un paciente tumoral cuyo tumor es positivo para la unión con un anticuerpo específico de Core-1.

Un método para generar al menos una célula T activada para el uso como una terapia tumoral puede comprender administrar las células T activadas contra las células tumorales positivas para Core-1 en un paciente. En una realización preferente la célula dendrítica funcional contra Core-1, la célula o células T activadas contra Core-1, la composición celular que comprende las células T contra Core-1, la línea de células T contra Core-1, o en el clon de células T contra Core-1 producidas mediante un método tal como se describe anteriormente inducen una respuesta humoral y/o celular contra las células y/o enfermedades positivas para Core-1.

En otra realización preferente de la formulación y/o la célula dendrítica funcional y/o la célula T, células T, clon de células T o línea de células T activadas tal como se describe anteriormente se usa para la fabricación un medicamento y/o un nutraceutico para la profilaxis o terapia de un tumor mediante técnicas que son conocidas por los expertos en la materia.

Las realizaciones preferentes de la invención se describen en los ejemplos.

G) KITS

La invención se refiere también a un kit para inducir la respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica en un ser humano o animal contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1, tal como se describe en otras partes del presente documento que comprende un nutraceutico, o un agente farmacéutico que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), y/o al menos un lisado o fracción del mismo, o que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), o la fracción del mismo, o formulaciones que comprenden a los mismos, y una información relacionada con el uso del kit.

En una realización más preferente dicha respuesta inmunitaria específica de Core-1 funciona como una protección contra las células cancerosas positivas para Core-1.

5 La invención se refiere también a un kit para reducir o prevenir la aparición de una enfermedad o un tumor positivo para Core-1, preferentemente un tumor positivo para Core-1, que comprende un nutracéutico, o un agente farmacéutico que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1, seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), y/o al menos un lisado o fracción del mismo, o que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en AG6 (DSM 18726) y MU1 (DSM 18728), o la fracción del mismo, o formulaciones que comprenden a los mismos, y una información relacionada con el uso del kit.

15 Un kit para reducir o prevenir la diseminación de una enfermedad o metástasis de un tumor positivo para Core-1, preferentemente de un tumor positivo para Core-1, puede comprender el nutracéutico o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones del mismo los cuales se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos y una información relacionada con el uso del kit.

20 Un kit para tratar una enfermedad o un tumor positivo para Core-1, preferentemente un tumor positivo para Core-1, comprende el nutracéutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones del mismo que se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos, y una información relacionada con el uso del kit.

25 Un kit para la prevención y el tratamiento de los trastornos gastrointestinales puede comprender el nutracéutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones del mismo los cuales se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos, y una información relacionada con el uso del kit.

30 Un kit para fortalecer el sistema inmunitario o para mejorar una respuesta inmunitaria tal como se describe otras partes del presente documento puede comprender el nutracéutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones del mismo lo cuales se describen en otras partes del presente documento, o formulaciones que comprenden a los mismos, y una información relacionada con el uso del kit.

35 El nutracéutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones comprendidas en los kits anteriormente descritos comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de la cepa AG6 (DSM 18726), y/o la cepa MU1 (DSM 18728), y más preferentemente de la cepa AG6.

40 El kit puede incluir información (folleto de instrucciones, dirección de internet) que explica cómo combinar los componentes del kit. Dicha información también puede relacionarse con un esquema terapéutico.

45 Un kit para generar un anticuerpo o una composición de anticuerpo anti Core-1 tal como se describe en otras partes del presente documento, puede comprender el nutracéutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones del mismo que se describen en otras partes del presente documento o formulaciones que comprenden a los mismos, y una información relacionada con el uso del kit.

50 Un kit para generar al menos una célula dendrítica funcional contra Core-1, puede comprender el nutracéutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden los mismos, y una información relacionada con el uso del kit. En una realización preferente el kit para generar al menos una célula dendrítica funcional contra Core-1 comprende además las células dendríticas inmaduras derivadas de una línea de células dendríticas tal como, pero que no se limita a MUTZ-3 o Nemod-DC.

55 Un kit para generar al menos una célula T, células T, clon de células T o línea de células T activada contra Core-1, puede comprender el nutracéutico, o la composición farmacéutica, o el microorganismo positivo para Core-1, o la fracción del mismo o formulaciones del mismo, o formulaciones que comprenden a los mismos, y una información relacionada con el uso del kit.

La invención tiene las siguientes ventajas:

- 60
- se aparta del camino ya explorado
 - una nueva percepción del problema
 - satisfacción de una necesidad prolongada en el tiempo o deseada
 - hasta ahora todos los esfuerzos de los expertos fueron en vano
 - la simplicidad de una solución prueba la acción inventiva, especialmente si ésta reemplaza una doctrina más compleja
 - 65 - el desarrollo de tecnología científica siguiendo otra dirección

- el alcance hacia del desarrollo
- concepciones erróneas acerca de la solución del problema acordado (prejuicio)
- progreso técnico, tal como: mejora, rendimiento mejorado, reducción de precio, ahorro de tiempo, material, etapas de trabajo, costes o recursos que son difíciles de obtener, facilidad mejorada, remedio de defectos, cualidad mejorada, sin mantenimiento, eficacia aumentada, mejor rendimiento, aumento de las posibilidades técnicas, provisión de otro producto, apertura de una segunda vía, apertura de un nuevo campo, primera solución de una función, racionalización económica de un producto, alternativas, posibilidad de racionalización, automatización o miniaturización o enriquecimiento del fondo farmacéutico
- elección especial (dado que se eligió a pesar de una determinada posibilidad del resultado de la cual no fuera el esperable, se eligió entre un gran número de posibilidades, es una elección patentable acertada)
- error en una cita
- campo joven de la tecnología
- invención combinada; combinación de una serie de elementos conocidos, con un efecto sorprendente
- concesión de licencia
- elogio de expertos y
- éxito comercial

Sin destinarse a ser limitantes, la invención se explicará en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

20 Leyendas de las figuras

Fig. 1.

Árbol sin raíz basado en las secuencias alineadas de modo no ambiguo (1248 pares de bases) de los aislados de AG6, MU1, sus parientes más próximos y la cepa tipo de *E. coli* obtenido con el método del vecino más próximo (7).

Fig. 2

2a: Los productos de PCR de la cepa LH de *E. coli* se obtuvieron después de la amplificación con el cebador OPL07 - línea 1 - marcador en escalera de 1-1 kb, líneas de 2-11-cepas LH de 2-5, 8, de 13-16, 18; línea 12 - cepa 32 de *E. coli* DSMZ 8697 2B: cepas MU y AG6 obtenidas después de la amplificación con el cebador OPA18 - línea 1 - marcador en escalera de 1 kb; líneas de 2-5 - cepas MU 1, de 3-5; línea 6 - AB12; línea 7 - *B. thetaiotaomicron* DSMZ 2079; línea 8 - *B. ovatus* DSMZ 1896; línea 9 - *B. vulgatus* DSMZ 1447; línea 10 - *B. acidifaciens* DSMZ 15896; líneas de 11-13 - AG6.

Fig.3:

ELISA con las cepas bacterianas recubiertas AG6, LH2 y MU1 (5×10^6 bacterias/ml) y los anticuerpos monoclonales específicos de Core-1 Nemo-TF1, Nemo-TF2 y A68-B/A11 y el anticuerpo control A63-B/C2.

Fig.4:

Análisis de SDS-PAGE y transferencia de western de una preparación de cápsula de la cepa AG6

- A) Colorante azul alciano del gel de SDS-poliacrilamida
- B) Tinción de DIG-glycan de la transferencia de western
- C) Tinción de la transferencia de western con Nemo-TF2.

Fig. 5:

Enriquecimiento de polisacáridos positivos para Core-1 mediante cromatografía en fase inversa.

Fig. 6:

Secuencia de las unidades de repetición del polisacárido capsular positivo para Core-1 de *B. ovatus* de la cepa AG6

Fig. 7:

Estructura de las unidades de repetición del polisacárido capsular positivo para Core-1 de *B. ovatus* AG6 (L-Fuc: L-fucosa, D-Gal: D-galactosa, HexNAc: N-acetilhexosamina, D-Hex: D-hexosa, OMe: grupo O-metilo)

Fig. 8:

Estructura de unidades de repetición del polisacárido capsular positivo para Core-1 de *B. ovatus* AG6 (L-Fuc: L-fucosa, D-Gal: D-galactosa, HexNAc: N-acetilhexosamina, D-Hex: D-hexosa, OMe: grupo O-metilo).

Fig. 9:

Análisis de los sueros de ratón mediante el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 1
Los anticuerpos IgM contra AGP y el AGP tratado con ácido peryódico se determinaron mediante ELISA en sueros de ratones inmunizados con PBS (grupo L), bacterias negativas para Core-1 (grupo I) y bacterias positivas para Core-1 (grupo K)
Dilución del suero 1:200, día 21

Fig. 10:

Señales de ELISA de los sueros inmunes en los conjugados hidrato de carbono-PAA
valor medio de las señales de ELISA de 4 ratones C3H contra el conjugado PAA Gal beta-3GalNAc alfa-PAA con
respecto a la señal de ELISA contra GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA (dilución de los sueros 1:100)

5

Fig. 11:

Análisis por FACS de los sueros de ratón de ratones inmunizados con PBS (grupo L), bacterias negativas para
Core-1 (grupo I) y bacterias positivas para Core-1 (AG6, grupo K) en el día 21

10

- A) intensidad media de fluorescencia del análisis de FACS
B) superposición de histogramas (negro: grupo L, azul: grupo I, rojo: grupo K)

Fig. 12:

Ensayo de respuesta inmunitaria humoral 1 de los sueros de los ratones libres de gérmenes (ratón control y 3
ratones distintos inmunizados con la cepa de bacterias AG6)

15

Fig. 13:

Ensayo de respuesta inmunitaria humoral 1 de sueros de ratones C3H inmunizados con A) 2×10^{11} (grupo A) o B)
 2×10^{10} (grupo B) bacterias pasteurizadas de la cepa AG6 diariamente en los días de 0 a 28. Se muestran las
señales de ELISA en el día 21 contra glucoforina (GP), asialoglucoforina (AGP) y AGP tratada con peryodato
(AGP + PJ) de los ratones individuales.

20

Fig. 14:

Ensayo de respuesta inmunitaria humoral 3 de sueros de ratones C3H inmunizados por vía oral con bacterias
positivas para Core-1 (cepa AG6). Los sueros del día 0 al día 28 se diluyeron 1:300 y se analizaron en citometría
de flujo para la unión a las líneas celulares NM-ts y NM-D4.

25

Fig. 15

Producción de citocinas por células T generadas para los lisados de bacterias positivas para Core-1 (AG6 y
MU1) después de la reestimulación con DC cargadas con lisados celulares MN-D4 (DC/D4) positivas para Core-
1 o NMts (DC/ts) negativas de líneas celulares tumorales humanas. Inhibición de la producción de citocinas a
través de la pre-incubación de los lisados cargados con NM-DC con anticuerpo específico de Core1 (DC/D4+Ak).

30

- A) Producción de GM-CSF por las células T (CIRT 1)
B) Producción de TNF alfa por las células T (CIRT 2)

35

Fig. 16:

Ensayo de respuesta inmunitaria celular 2: Resultados del ensayo ELISPOT para la producción de IFN-gamma
por células T respondedoras después de la reestimulación con DC cargadas con los lisados celulares positivos
(DC/D4) o negativos para Core-1 (DC/ts) de líneas celulares tumorales humanas y la inhibición de la producción
de citocinas a través de la pre-incubación del lisado cargado con las DC-NM con anticuerpo específico de Core1
(DC/D4+Ak).

40

Fig.17:

Ensayo de respuesta inmunitaria celular 3: ensayo de proliferación de células T (WST) en células respondedoras
(R) después de la reestimulación con DC cargadas con lisados celulares positivos (DC/D4) o negativos para
Core1 (DC/ts) de celulares tumorales humanas e inhibición de la proliferación a través de la pre-incubación de las
NM-DC cargadas con el lisado con el anticuerpo específico de Core-1 (DC/D4+Ak).

45

Fig. 18:

Ensayo de respuesta inmunitaria celular 4: ensayo de inmunofluorescencia de NMC-DC cargadas con bacterias
negativas para Core-1 (AG3) o positivas para Core-1 (AG6) o la línea celular humana negativa para Core-1 (NM-
ts) o positiva para Core-1 (NM-D4).

50

Figura 19:

Estructuras de los hidratos de carbono de los componentes positivos para Core-1
L-Fuc: L-fucosa, D-GalNAc: N-acetilgalactosamina, D-Gal: D-galactosamina, Hex: hexosa, HexNAc: N-
acetilhexosamina, OMe: metilación O.

55

Ejemplos

60

Ejemplo 1 Técnicas y medio de cultivo anaeróbico

Las técnicas anaeróbicas empleadas en el cultivo de las bacterias se basaron en métodos anteriormente descritos
(3, 5, 9, 11), que se han resumido por Breznak y Costilow (4). Los medios preparados con cisteína·HCl como un
agente reductor se dispensaron en tubos de cultivos anaeróbicos (Ochs, Bovenden, Alemania) o botellas de cristal

65

con suero, dejando aproximadamente de la mitad a un tercio del volumen total del recipiente como espacio superior gaseoso, y sellando con tapones de goma butílica. Las soluciones preparadas sin agentes reductores (por ejemplo, PBS-a) se hirvieron antes de dispensarse. Antes de la esterilización por autoclave, la fase gaseosa se reemplazó por N_2/CO_2 (80/20, v/v). Para alcanzar esto, se pincharon agujas a través de las botellas tapadas con goma butílica y las botellas se evacuaron por medio de una bomba de vacío (Vacuubrand, Wertheim, Alemania). Después de la evacuación, las botellas, que se agitaron repetidamente durante el proceso completo, se gasearon con N_2/CO_2 (80/20, v/v). Este proceso de evacuación y gaseado se llevó a cabo tres veces en total. Antes de entrar en los recipientes, la mezcla gaseosa pasó a lo largo de un catalizador de paladio caliente para eliminar las trazas residuales de oxígeno presentes en la mezcla gaseosa. Se usó resaurcina (1 mg l^{-1}) como un indicador redox.

Los medios para sembrar se vertieron bajo una campana de flujo laminar y se almacenaron en condiciones anóxicas durante al menos 24 h antes del uso. Esto se alcanzó bien presurizando ($1,5 \times 10^3 \text{ Pa}$) jarras anaeróbicas con un AnaeroGen 3.5 1 (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) o lavando repetidamente con $N_2/CO_2/H_2$ (80/10/10, v/v/v) en una cámara anaeróbica estanca (Don Whitley Scientific, Shipley, Inglaterra). La manipulación de las muestras se llevó a cabo en una cámara anaeróbica (estación de trabajo de atmósfera variable MACS, Don Whitley Scientific, Shipley, Inglaterra o Coy Laboratory Products, Grass Lake, EE.UU.).

Las soluciones no estériles y los materiales se esterilizaron mediante esterilización por autoclave (121 C , $1,2 \times 10^5 \text{ Pa}$, 15 min). Los compuestos lábiles al calor se hicieron como soluciones de reserva concentradas en agua mili Q, esterilizada por filtración ($0,22 \mu\text{m}$, éster de celulosa mixta, Roth, Karlsruhe, Alemania) y se añadieron a los medios a las concentraciones requeridas.

Ejemplo 2: enriquecimiento por afinidad de los microorganismos positivos para core-1

2.1 Preparación de las Dynabeads® recubiertas de TF1 y TF2

Se colocó un volumen de $100 \mu\text{l}$ de cada una de las Dynabeads® (IgM M-450 de Rata Anti-Ratón, Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega) en tubos Eppendorf de 2 ml con Cierre de Seguridad (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se lavó dos veces con 2 ml de fosfato salino tamponado a (PBS-a: $8,1 \text{ g l}^{-1}$ de NaCl, $0,16 \text{ g l}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0,98 \text{ g l}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g l^{-1} de BSA, pH 7,4) usando el Concentrador de Partículas Magnéticas Dynal®-S (MPC®-S, Dynal Biotech, Oslo, Noruega) y se suspendieron en $25 \mu\text{l}$ de PBS-a. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de TF1 o TF2 liofilizados se disolvieron en 1 ml de agua de uso para la síntesis mili-Q (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Los sobrenadantes de cultivo celulares TF1 o TF2 disueltos (1 ml) se añadieron a los tubos con Dynabeads® y se incubaron durante 30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en un rotador de tubos de ensayo (modelo 34528, Snijders Scientific, Holanda). Los tubos se colocaron en el MPC®-S y se dejaron reposar durante 3 min antes de recoger el fluido con una pipeta. Las Dynabeads® se resuspendieron en 2 ml de PBS-a, se colocaron en el MPC®-S y el fluido se recogió mediante pipeteo. Esta etapa de lavado se realizó tres veces. Las Dynabeads® lavadas se resuspendieron en su volumen original de $100 \mu\text{l}$ de PBS-a. Las Dynabeads preparadas de esta manera se usaron bien inmediatamente o dentro de las dos semanas después de la preparación después de una etapa de lavados repetidos tres veces con 2 ml de PBS-a.

2.2 Recogida y procesamiento de las muestras fecales para el enriquecimiento de las Dynabeads®

Se recogieron las muestras fecales de ocho voluntarios (Tabla 3) en tubos de plástico perforados, se mantuvieron en condiciones anóxicas usando un AnaeroGen Compact (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) y se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un máximo de 4 h antes del procesamiento. Los voluntarios fueron adultos sanos que no habían tomado antibióticos durante al menos 3 meses antes de la fecha del muestreo y consumieron sus dietas habituales.

Tabla 3: parámetros individuales en el tiempo de la recogida de las muestras fecales

Número de sujeto	Edad	Género
1-GH	24	mujer
2-RM	26	mujer
3-TC	25	varón
4-AG	27	mujer
5-AB	37	mujer
6-MU	36	mujer
7-LH	24	mujer
8-CA	50	varón

Se preparó una dilución de diez veces (p/v) de las muestras fecales en PBS-b (PBS-b: $8,5 \text{ g l}^{-1}$ de NaCl, $0,3 \text{ g l}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,6 \text{ g l}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , pH 7,0 que contiene $0,1 \text{ g l}^{-1}$ de peptona y $0,25 \text{ g l}^{-1}$ de cisteína-HCl). Se añadieron seis esferas estériles de 3 mm de diámetro de vidrio y las muestras diluidas se homogeneizaron mediante agitación vorticial a baja velocidad. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron ($300 \times \text{g}$, 1 min, $21 \text{ }^\circ\text{C}$) para sedimentar

los restos celulares. Una porción de 200 µl del sobrenadante resultante se añadió a 1,8 ml de PBS-b dando como resultado una dilución de aproximadamente 100 veces de la muestra fecal original. Estas diluciones se lavaron una vez con 2 ml de PBS-b (8000 x g, 5 min, 21 °C) y los sedimentos se suspendieron en 2 ml de PBS-b.

5 **2.3 Procedimiento de enriquecimiento de las Dynabeads®**

Se añadió un volumen de 20 µl de la dilución de 100 veces a un tubo de 2 ml que contenía 180 µl de PBS-a y 5 µl de Dynabeads® recubiertas bien de anticuerpo TF1 o TF2. Los tubos se incubaron durante 30 min a 4 °C en un rotador de tubos de ensayo. Los tubos se colocaron en el MPC®-S y se dejaron reposar durante 3 min antes de recoger el mayor sobrenadante posible mediante aspiración con una jeringa y una aguja. Las muestras se lavaron tres veces con 2 ml de PBS-a, recogiendo de nuevo la mayor parte posible del sobrenadante.

2.4 Siembra en medios selectivos y no selectivos

15 Las muestras lavadas se suspendieron en 1 ml de PBS-b y se diseminaron-sembraron alícuotas de 100 µl en diversos medios selectivos y no selectivos (Tabla 4) y se incubaron durante 48 h a 37 °C en una cámara anaeróbica.

Tabla 4: medios empleados para la diseminación/siembra

Medios	Fabricante	Selectivo para	Abreviatura
de Man, Rogosa y Sharpe	Merck, Darmstadt, Alemania	lactobacilos, bacterias ácido láctico	de MRS
Medio Selectivo de Bifidus	Fluka, St. Gallen, Suiza	bifidobacterias	BSM
Agar K-F de Streptococcus	Oxoid	estreptococos	KF
Agar de Nutrientes	Oxoid	no-selectivo	N
Agar Anaeróbico de Schaedler	Oxoid	no-selectivo	S
Agar Anaeróbico de Wilkins Chalgren	Oxoid	no-selectivo	WC
Agar de Infusión de Cerebro y Corazón	Biomdrieux, Marcy l'Etoile, Francia	no-selectivo	BHI
Agar Columbia con el 5 % de sangre de oveja	Biomérieux	no-selectivo	CBA
Agar Stamm		no-selectivo	ST

20 Se prepararon los medios sólidos de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La composición del agar ST fue la siguiente: 1 g l⁻¹ de proteasa de peptona, 9 g l⁻¹ de peptona de carne, 3 g l⁻¹ de NaCl, 2 g l⁻¹ de Na₂HPO₄·2H₂O, 3 g l⁻¹ de extracto de carne, 4 g l⁻¹ de extracto de levadura, 6 g l⁻¹ D (+)-glucosa, 0,5 ml l⁻¹ de Tween 80, 0,25 g l⁻¹ de cisteína·HCl, 1 mg l⁻¹ de resaurcina, 0,1 g l⁻¹ de MgSO₄·7 H₂O, 5 mg l⁻¹ de FeSO₄·7 H₂O, 0,5 g l⁻¹, 3,4 mg l⁻¹ de MnSO₄·2H₂O, 1,5 g l⁻¹ de agar bacteriológico, pH 7,0.

25 Para los sujetos del 1 al 4, las colonias de un procedimiento de enriquecimiento se seleccionaron para la exploración basada en ELISA. Para los sujetos de 5 a 8, el procedimiento de enriquecimiento de Dynabeads® se repitió dos veces del siguiente modo: después de una incubación de 48 h, las colonias se rasparon de las placas, se suspendieron en PBS-b en el intervalo de los patrones de turbidez de McFarland del 3 al 5 (preparados tal como en (13)). Tal como se hizo anteriormente, una alícuota de 20 µl de esta suspensión se añadió a 180 µl de PBS-a. El procedimiento de enriquecimiento y siembra se realizó tres veces en total, tal como se describe anteriormente.

30 Las muestras fecales de unos cuatro sujetos adicionales (5 AB, 6 MU, 7 LH y 8 CA) se enriquecieron para bacterias positivas para Core 1. El procedimiento de enriquecimiento se modificó ligeramente por que el enriquecimiento se llevó a cabo tres veces en total, es decir, las colonias obtenidas después del aislamiento inicial se rasparon de las placas y se sometieron a un enriquecimiento adicional. Se obtuvieron sesenta nuevos aislados del mismo modo.

3 Identificación de aislados

40 **3.1 Bioquímica**

Las bacterias se identificaron con el sistema VITEK (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las bacterias se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las tarjetas de identificación se usaron del siguiente modo: las tarjetas ANI para los aislados anaeróbicos y las tiras para los anaeróbicos facultativos Gram positivos capaces de crecer en caldo MRS (lactobacilos sospechosos), las tarjetas GPI para aislados Gram-positivos y las tarjetas GNI+ para aislados aeróbicos Gram negativos.

La identidad bioquímica de los aislados obtenidos usando el sistema VITEK (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia) se resume en la Tabla 5. Los aislados anaeróbicos AG6, MU (1, 3 - 5) y AB12 pertenecen todos al grupo de los *Bacteroides fragilis*, mientras que los aislados aeróbicos son todos miembros de las *Enterobacteriaceae*; ambos son Gram-negativos.

5

Tabla 5: identificación de las cepas aisladas basándose en las características bioquímicas (VITEK)

Cepa	Identificación	Probabilidad
AG6 MU (1, 3 - 5) AB12	<i>Bacteroides ovatus</i>	82-95 %
AG3 LH (2 - 5, 8, 13-1 6, 18)	<i>Escherichia coli</i>	89 - 99 %

3.2 (Secuenciación) molecular

10 El ADN se extrajo con el Kit de ADN Genómico Invisorb III (Invitex, Berlín, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante para el protocolo III B con los sedimentos celulares lavados obtenidos de los cultivos líquidos suspendidos en 1 ml de tampón de lisis D. Los cebadores 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y 1492r (5' TAC CTT GTT ACG ACT T) (10) se usaron para amplificar el gen del ARN ribosómico de 16S bacteriano.

15 Cada PCR se realizó por triplicado y la mezcla de reacción (50 µl) contenía: KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,25 mM de cada dNTP, 1 mM de cada cebador, 1 µM de cada cebador, 2,5 unidades de la ADN polimerasa Taq (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y 1 µl del ADN molde. El programa de PCR fue: 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, y finalmente 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se purificaron con el Kit de Purificación de Productos de PCR High Pure (Roche, Indianápolis, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (4,84 g l⁻¹ de Tris, 1,142 ml l⁻¹ de ácido acético glacial 0,372 g l⁻¹ de EDTA, pH 8,0). La concentración del ADN se estimó usando el Marcador en Escalera de Masa de ADN Low (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.).

25 Para la secuenciación, se usó bien el cebador 27f, 338f (5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT) (2), 338r (5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC), 968f (5' AAC GCG AAG AAC CTT AC) (14) o 1492r. Las reacciones de secuenciación se realizaron con el Kit Colorante de Terminación de los Ciclos de Secuenciación DYEnamic™ ET (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Inglaterra) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron con el Sistema MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EE.UU.). Se ensamblaron las secuencias y se ajustaron manualmente usando la función ContigExpress del paquete informático Vector NTI 9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Se alinearon posteriormente con secuencias altamente similares (92 % de similitud o más) obtenidas con la función BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1). Los porcentajes de similitud se calcularon a partir de las secuencias alineadas de modo no ambiguo usando la función de Matriz de Identidad de Secuencia del programa informático Bioedit versión 5.0.9 o la Matriz de Similitud versión 1.1 del Ribosomal Database Project. Los resultados de secuenciación se confirmaron mediante comparación con las secuencias obtenidas de un proveedor de servicios de secuenciación génica del ARNr de 16S (AMODIA, Braunschweig, Alemania).

40 La identidad de los aislados se representa en la Tabla 6 y un árbol filogenético sin raíz basado en las secuencias de los aislados de AG6, MU1, sus parientes más relativos y la cepa tipo de *E. coli* ATCC 11755 se representa en la Fig. 1.

Tabla 6: identificación de las cepas aisladas basándose en las secuencias alineadas de un modo no ambiguo de los genes del ARNr de 16S usando la función de matriz de similitud versión 1.1 de la base de datos del Ribosomal Database Project (5)

45

Cepa	Identidad	Similitud (%) para la cepa	Número de referencia
AG6	<i>Bacteroides ovatus</i>	98,2	ATCC 8483T X83952
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	97,1	ATCC 29148T L18489
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>toterans</i>	99,4	JCM 1171T D16550
96	<i>Staphylococcus wamneri</i>	99,2	ATCC 27836T L37603
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99,0	ATCC 51129T AF041361

Cepa	Identidad	Similitud (%)	para la cepa	Número de referencia
TC7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,6	JCM 1136T	D16552
	<i>Lactobacillus zese</i>	98,7	ATCC 15820	D86516

3.3 ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (APAA)

5 Algunos aislados positivos para Core 1 obtenidos con el procedimiento de enriquecimiento repetido de Dynabead® parecían muy similares en su morfología celular y de colonias, a pesar de aislarse de distintos medios. Las cepas también fueron similares con respecto a sus perfiles bioquímicos obtenidos con el sistema VITEK. La pregunta que surge, es si las bacterias aisladas son cepas idénticas. La APAA es un método que no requiere la información de secuencia, que puede aplicarse para distinguir cepas. Brevemente, el ADN genómico total se amplifica por PCR con un cebador de 10 pares de bases a una rigurosidad baja de modo que las secuencias aleatorias de ADN se amplifican basándose en secuencias homólogas con respecto al cebador que está presente en el ADN diana. Los productos de PCR resultantes pueden separarse mediante electroforesis en gel de agarosa y el patrón resultante puede compararse entre las cepas. Los patrones de bandas resultantes para todas las cepas LH fueron análogos para los cinco cebadores de RAPD empleados (OPL07, M13, OPX14, OPA16, OPA18). El patrón claramente difiere de la cepa de *E. coli* DSMZ 8697 (Fig. 2a), una cepa de la que se ha notificado que tiene actividad para el grupo sanguíneo B. Las cepas MU también parecen muy similares (Fig. 2b); sin embargo su patrón de bandas difiere claramente del de las otras cepas de *Bacteroides*, incluyendo AG6. Podría parecer que una cepa positiva para Core 1 se enriqueció repetidamente de cada donante positivo durante el proceso de aislamiento. Las cepas aisladas diferían entre los individuos.

Ejemplo 4 crecimiento y fijación de bacterias para la exploración basada en ELISA

Se escogieron aleatoriamente colonias bien separadas de las placas de agar selectivo y no selectivo y se sembraron en estría tres veces en medios no selectivos. Las colonias aisladas se escogieron y se inocularon en caldo ST (tal como se hizo anteriormente, omitiendo el agar), WC o MRS, dependiendo de cuales alcanzaron el mejor crecimiento, y crecieron durante toda la noche a 37 °C. Estos cultivos se inocularon (1 %) en 300 ml de caldo reciente ST, WC o MRS y crecieron durante toda la noche a 37 °C. Las células se sedimentaron (8000 x g, 15 min, 4 °C) y se resuspendieron en 10 ml de PBS-c (8 g l⁻¹ de NaCl, 0,2 g l⁻¹ de KCl, 1,44 g l⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,24 g l⁻¹ de KH₂PO₄) (12). Esta suspensión se fijó de 3 a 4 h a 4 °C mediante la adición de una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % preparada de acuerdo con (8) en PBS-c. A continuación, se lavaron las muestras con 40 ml de PBS-c (8000 x g, 15 min, 4 °C) y los sedimentos se suspendieron en 15 ml de PBS-c, seguidos por la adición de un volumen igual de etanol al 96 % enfriado en hielo. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.

La pureza de los cultivos se comprobó comparando la morfología celular, así como el comportamiento en la tinción de Gram. Los cultivos se sembraron en aerobiosis en CBA para determinar su capacidad de crecer en presencia de oxígeno y para comprobar la ausencia de contaminantes anaeróbicos.

Ejemplo 5 mantenimiento de los aislados

Se mantuvieron las reservas madre criogenizadas en tubos Microbank (MAST Diagnostica, Reinfeld, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenaron a -80 °C. Las reservas madre de trabajo se mantuvieron en caldo WC, ST o MRS. Estos se subcultivaron cada 14 días. La pureza de los cultivos se comprobó mediante la observación del comportamiento en la tinción de Gram, la morfología celular y la comparación periódica de las morfologías de las colonias en las placas sembradas en estría de CBA en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas.

Ejemplo 6 crecimiento, fijación y liofilización de bacterias para experimentos en animales

Para el uso en experimentos en animales las bacterias crecieron y se fijaron tal y como se describe en la sección 3 con las siguientes modificaciones: el volumen de cultivo inicial constituyó una cantidad de aproximadamente 4 l. Antes de la fijación, las bacterias se lavaron una vez con 100 ml de PBS-b (8000 x g, 15 min, 4 °C) y se resuspendieron en el mínimo volumen posible de PBS-b. Esta suspensión se separó en dos porciones iguales, una para la fijación (7.1), la otra para la liofilización (7.2).

6.1 Fijación

La porción para la fijación se lavó (8000 x g, 15 min, 4 °C) y se resuspendió en 30 ml de PBS-c. Esta suspensión se añadió a 90 ml de la solución de PFA al 4 % en PBS-c y se fijó durante 3 a 4 h a 4 °C. Para mejorar la eliminación del PFA, las muestras se lavaron tres veces con 120 ml de PBS-c (8000 x g, 15 min, 4 °C). Los sedimentos celulares se suspendieron en 45 ml de PBS-c, seguidos por la adición de un volumen igual de etanol al 96 % enfriado en hielo. Las muestras se almacenaron a -20 °C. Antes de la administración a los animales, las bacterias fijadas se liofilizaron en condiciones estériles en tubos Lid_{Bac} (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para evaporar el etanol. Para asegurar la inviabilidad de las bacterias fijadas, estas se inocularon (1 %) en caldo WC y se sembraron en CBA y se controló la

ausencia de crecimiento durante el periodo de una semana.

6.2 Pasteurización

- 5 Las suspensiones bacterianas se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en un volumen pequeño de PBS. Las suspensiones bacterianas se incubaron a 72 °C durante 30 min. Como un control para la inactivación exitosa las bacterias se incubaron en un medio de cultivo adecuado tal como se describe en el ejemplo 4.

6.3 Liofilización

- 10 La porción para la liofilización se añadió a un volumen igual de sacarosa esterilizada por filtración al 24 % y se hicieron alícuotas en porciones de 300 µl en tubos Lid_{Bac} de 2 ml. Estas alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido durante 1 h y se liofilizaron (Alfa 2-4, Christ, Osterode, Alemania) después de colocarlas en gradillas preenfriadas a -80 °C. Después de la liofilización, las tapas de los tubos se cerraron y estos se almacenaron a 4 °C usando el sistema de generador de gases mini Anaerocult® C (Merck, Darmstadt, Alemania) con la adición de gel de sílice naranja (Roth, Karlsruhe, Alemania) como un desecante.

6.4 Enumeración de las preparaciones de bacterias

- 20 Los números totales de células de las preparaciones de bacterias fijadas y liofilizadas se determinaron con una cámara Thoma de 0,41 mm de profundidad (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, Alemania). Para las bacterias liofilizadas, las unidades formadoras de colonias (UFC) se determinaron sembrando diluciones seriadas de 10 veces en agar WC de los cultivos procedentes de toda la noche e inmediatamente antes y después de la liofilización. Para este fin, el liofilizado se disolvió en 300 µl de caldo WC, se le dejó reposar durante 15 minutos, se resuspendió mediante agitación vorticial a baja velocidad y se hicieron diluciones seriadas. Las UFC de las preparaciones liofilizadas se enumeraron antes y después del uso en experimentos en animales para asegurar la viabilidad. La pureza de las preparaciones se comprobó después tal como se describe en la sección 4.

Ejemplo 7 Muestras de suero

- 30 La sangre se recogió con el sistema S-monvette (Sarstedt, Numbrecht, Alemania) y el suero se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero se almacenaron en alícuotas a -80 °C antes del análisis.

Ejemplo 8 Extracción de la IgA Fecal

- 35 Las muestras fecales se recogieron, se almacenaron a -80 °C. Las heces se liofilizaron y se registraron sus pesos secos. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en hielo. La IgA fecal se extrajo de acuerdo con Grewal (6) con algunas modificaciones. Las muestras liofilizadas (~30 mg) se suspendieron a una relación de 15 µl/mg en peso seco en un tampón de extracción de IgA (PBS-Dulbecco (Biochrom, Berlín, Alemania) con 1 g l⁻¹ de BSA con inhibidores de proteasas (5 µg ml⁻¹ de leupeptina (Calbiochem, Merck), 48 µg ml⁻¹ de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonil florida (Merck), 1 µg ml⁻¹ de aprotinina, 2 µg ml⁻¹ de bestatina (Sigma, Steinheim, Alemania) y se homogeneizaron. Las mezclas se mezclaron mediante agitación vorticial cada 10 min. Después de un periodo de incubación de 1 h, las muestras se centrifugaron (16000 x g, 10 min, 4 °C) y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo. El sedimento restante se suspendió a una relación de 10 µl/mg en peso seco en tampón de extracción de IgA y se homogeneizó. 45 El procedimiento de extracción se repitió y el sobrenadante resultante se combinó con el sobrenadante de la primera etapa de extracción. Estos sobrenadantes se centrifugaron (16000 x g, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante resultante se dispensó en nuevos tubos, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta análisis.

Ejemplo 9 Exploración de las cepas bacterianas mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

- 50 Las bacterias fijadas se diluyeron en PBS, los números celulares se ajustaron a 1x10³, 1x10⁶, 5x 10⁶, 1x10⁷, 1x10⁸ o 5x10⁸ células/ml. Se recubrió una placa de titulación de 96 pocillos con 50 µl de una solución bacteriana por pocillo durante toda la noche a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,02 % (se realizaron etapas de lavado idénticas después de cada etapa de incubación). Después de bloquear las placas con PBS/BSA al 2 %, las placas ELISA se incubaron con los sobrenadantes de cultivo de hibridomas que contenían distintos anticuerpos monoclonales que reconocían Core-1 (Nemod-TF1, Nemod-TF2 o A68/BA11,) o anticuerpo control (A63-B/C2) en distintas soluciones. Como anticuerpo secundario sirvió una inmunoglobulina de ratón anti-cabra policlonal conjugada peroxidasa (Dako P0260). El ensayo se reveló con TMB como sustrato, la reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 2,5 N y la extinción se midió a 450 / 630 nm. Para la determinación de la sensibilidad al peryodato en la unión de los anticuerpos, las placas recubiertas de ELISA se incubaron con peryodato de sodio antes de la incubación con los anticuerpos. Por lo tanto, las placas se lavaron con tampón de acetato de sodio (50 mM, pH 4,5) durante 5 min y después se incubaron con ácido peryódico 10 mM en tampón de acetato de sodio durante 1 h en la oscuridad. Las placas se lavaron con tampón de acetato de sodio (5 min) y la reacción se detuvo mediante la adición de borhidrato de sodio 50 mM en PBS (30 min).

65

En la Figura 3 se muestra un ejemplo de los resultados de dicho ELISA.

Ejemplo 10: Preparación de componentes bacterianos que contienen Core-1

5 10.1. Análisis de las preparaciones de cápsulas en crudo mediante análisis de SDS-PAGE y transferencia de Western

Las preparaciones de cápsulas en crudo de la cepa AG6 se realizaron de acuerdo con Pantosti *et al.* (1991, Infect. Immun. 59, 2075-2082).

10 La preparación de las cápsulas se analizó mediante SDS-PAGE y los polisacáridos de la preparación se detectaron mediante tinción con azul alciano posterior a Karlyshev *et al.* (2001, J. Clin. Microbiol. 39, 279-284) mostrando una variedad de bandas que contenían hidratos de carbono y un alto porcentaje de hidratos de carbono de alto peso molecular dentro de la preparación (Fig. 4A). Después del análisis de transferencia, se detectaron los polisacáridos mediante el Kit de Detección DIG-glycan (LaRoche Diagnostics). Mostrando bandas fuertes a los 37 y 26 kDa. (Fig. 4B). La detección del polisacárido que contenía Core-1 en la transferencia de Western se realizó usando el anticuerpo específico de core-1 NEMOD-TF2 (sobrenadante de cultivo) que mostraba una banda positiva para core-1 a 37 kDa (Fig. 4C).

20 10.2. Enriquecimiento cromatográfico de los polisacáridos positivos para core-1

Dentro de la preparación de la cápsula de la cepa AG6 aún había contaminantes de los polisacáridos tal como se muestra mediante las mediciones del contenido en KDO de 11,2 pmol/μg posterior a Harae *et al.* 1989, Anal. Biochem. 179, 162-166) y mediante SDS-PAGE.

25 Por lo tanto, los polisacáridos y los lipopolisacáridos de la cápsula se separaron mediante cromatografía de fase inversa en una columna C18 que usaba un gradiente de propanol/metanol (véase Fig. 5) de acuerdo con Hashimoto *et al.* (2001, Eur. J. Biochem. 268, 3139-3144). Los polisacáridos se eluyeron mediante un gradiente de eluyente B (propanol al 72 %/ metanol al 8 % en acetato de amonio 0,1 M a pH 4,5). La detección de polisacáridos en las fracciones se realizó mediante transferencia de puntos y el Kit DIG-glycan. La detección de core-1 se realizó usando los anticuerpos específicos de core-1 NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2. Los polisacáridos se eluyeron a concentraciones de propanol del 14-19 % y 25-43 %. El hidrato de carbono específico para core-1 solamente se detectó en el 29-29,4 % del propanol (RP1) y el 39-42 % del propanol (RP2), véase la Fig. 5 que muestra un fuerte enriquecimiento de los polisacáridos positivos para core-1 mediante este método.

35 Las fracciones positivas para core-1 se usaron para separaciones cromatográficas adicionales mediante hidrólisis en ácidos débiles seguida de cromatografía de DEAE usando un gradiente de NaCl 0-0,5 M de acuerdo con Tzianabos *et al.* (1992, J. Biol. Chem. 267, 18230-18235). Mediante este método los polisacáridos positivos para core-1 se separaron en tres fracciones eluidas a NaCl 0 M (D1), NaCl 0,04 M (D2) y NaCl de 0,9-0,17 M (D3), dando como resultado un enriquecimiento adicional de los polisacáridos positivos para core-1.

45 Se purifican los polisacáridos capsulares de *B. ovatus* AG6 y se analiza la estructura mediante espectrometría de masas. Preferentemente, los polisacáridos capsulares de *B. ovatus* AG6 se acumulan en la extracción en fenol/agua seguida de la extracción en éter tal como se ya se ha descrito por Pantosti *et al.* 1991. Después, el polisacárido positivo para core-1 se acumula de la preparación capsular bruta (CPS) mediante cromatografía de fase inversa (C18 Synergi 4 μ Fusion-RP 80i, 250 mm x 10 mm, Phenomenex). El contenido de monosacáridos del extracto de polisacáridos capsulares bruto y el polisacárido positivo para core-1 purificado se determinan mediante análisis de HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico a pH alto, detección amperométrica pulsada). Finalmente la estructura del polisacárido capsular positivo para core-1 se analiza mediante espectrometría de masas.

50 10.3 Análisis de monosacárido del extracto de la preparación capsular bruto y el extracto capsular purificado de *B. ovatus* AG6

55 En la primera etapa, el polisacárido positivo para core-1 de la preparación capsular bruta de *B. ovatus* AG6 se acumuló mediante cromatografía de fase inversa tal como ya se ha descrito anteriormente. Después, se determinó el rendimiento de la purificación así como el contenido de monosacáridos del polisacárido positivo para core-1 mediante análisis de HPAEC-PAD.

60 Antes de que ocurriera el análisis de los monosacáridos, los extractos de polisacáridos se hidrolizaron completamente mediante ácido trifluoroacético (TFA) 2 N a 100 °C durante 4 h. Durante la hidrólisis con TFA se perdieron los grupos acetilo. Por lo tanto, los monosacáridos glucosamina y galactosamina (GlcNH₂ y GalNH₂) no pudieron distinguirse de la *N*-acetilglucosamina y la *N*-acetilgalactosamina (GlcNAc y GalNAc). Los monosacáridos se separaron por cromatografía de aniones a pH alto y se detectaron mediante amperometría pulsada tal como ya se ha descrito anteriormente. Para identificar los monosacáridos y determinar sus concentraciones, se usaron patrones internos y externos de monosacáridos.

65

El contenido proporcional en monosacáridos del extracto bruto de CPS, que se determinó para la comparación de LPS y CPS (anteriormente mencionado), obviamente del contenido proporcional de monosacáridos del extracto bruto de CPS determinado por esta comparación varía. Ambos extractos brutos de CPS se prepararon de cultivos distintos de *B. ovatus* AG6, lo que puede ser una explicación para la variedad mencionada de los contenidos de monosacáridos.

El rendimiento de los polisacáridos positivos para core-1 acumulados mediante cromatografía de fase inversa fue del 30 %. La comparación de los contenidos de monosacáridos proporcionales de los extractos capsulares brutos y purificados revelaron una cantidad aumentada de fucosa, GalNAc/GalNH₂, galactosa y glucosa, mientras que la glucosa podía ser una contaminación (tabla 7). El contenido proporcional en ramnosa, GlcNH₂/GlcNAc y manosa podría reducirse mediante la cromatografía de fase inversa (tabla 7). El contenido de ácido galacturónico y ácido glucurónico, que son componentes característicos de los polisacáridos capsulares, no podía identificarse en el extracto de polisacáridos positivo para core-1 purificado. Esto podría indicar, que *B. ovatus* AG6 tiene más de un polisacárido capsular. Ambos polisacáridos capsulares pueden separarse entre sí mediante cromatografía de fase inversa. Tzianabos *et al.* (1992) también describía, que la cápsula de *B. fragilis* consiste en dos polisacáridos distintos.

Tabla 7: Análisis de los monosacáridos del extracto capsular de polisacáridos bruto (CPS) y polisacáridos positivos para core-1 del extracto purificado mediante cromatografía de fase inversa. El contenido proporcional de monosacáridos es con respecto a la cantidad total de monosacáridos.

Monosacáridos	Extracto-CPS crudo (%)	Extracto-CPS purificado (%)
Fucosa	9,5	11,4
Ramnosa	17,7	3,1
GalNH ₂ /GalNAc	5,2	14,9
GlcNH ₂ /GlcNAc	14	3,5
Galactosa	4,6	6,9
Glucosa	44,2	50
Manosa	18,2	6,9
Ácido Galacturónico	10	0
Ácido Glucurónico	0,5	0
a. d.	3	2

La acumulación de fucosa, GalNH₂/GalNAc y galactosa puede ser una indicación, de que estos monosacáridos son componentes de las unidades de repetición del polisacárido positivo para core-1. Mientras que los monosacáridos fuertemente reducidos podrían ser contaminaciones bajas.

10.4 Análisis de estructura del polisacárido positivo para core-1 mediante espectrometría de masas

La estructura del polisacárido positivo para core-1 se analizó mediante espectrometría de masas láser de tiempo de vuelo asistido por una matriz (MALDI-TOF-MS) tal como ya se describe anteriormente y mediante espectrometría de masas de electropulverizador de Trampa iónica (ESI-Ion-Trap-MS).

Para la espectrometría de masas ESI-Ion-Trap se fragmentó el polisacárido positivo para core-1 acumulado bien mediante hidrólisis con ácido acético al 1 % (1,5 h, a 100 °C) o digestión enzimática con condroitinasa ABC (escisión de los enlaces β 1-4GalNAc/GlcNAc) o con β 1-3 galactosidasa. Además, ocurrió la fragmentación mediante doble digestión con condroitinasa ABC/ α 1-3,4 fucosidasa o ácido acético al 1 % / β 1-3 galactosidasa (todas las enzimas se recibieron de Glyko GmbH). Todas las digestiones enzimáticas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Los análisis de espectrometría de masas (MS así como MS/MS) se llevaron a cabo en el modo positivo y en el negativo. Antes de que ocurrieran los análisis, todas las muestras se desalinizaron mediante un Carbógrafo SPE (Aalltech Associates Inc.) tal como se describe mediante el manual de los fabricantes y se diluyeron en NH₃ 2,5 mM / acetonitrilo al 40 %.

La estructura de los glucanos positivos para core-1, que ya se habían identificado mediante los análisis por MALDI-MS podría verificarse por determinación por ESI-Ion-Trap. Los fragmentos adicionales podrían identificarse también mediante espectrometría de masas ESI-Ion-Trap (tabla 8).

Tabla 8: Análisis de la estructura mediante espectrometría de masas ESI-Ion-Trap (modo positivo). El polisacárido positivo para core-1 purificado se fragmentó mediante hidrólisis con el 1 % de ácido acético durante 1,5 h a 100 °C.

MS		MS/MS	
Masas determinadas (M+H ⁺ / M+NH ₄ ⁺)	Secuencia identificada	Masas determinadas (M+Na ⁺)	Secuencia identificada
425/442	HexNAc-HexNAc		
573/590	HexNAc(HexNAc)-Hex	390	HexNAc-Hex
749/766	HexNAc(HexNAc-Hex)-Hex	595	HexNAc-HexNAc-Hex
529/545	DesHex-desHexM-HexNAc		
690/706	DesHex-desHexM-HexNAc-Hex		
733/750	DesHex-HexNAc(HexNAc)-Hex		
674/591	DesHex-desHex-desHexM-HexNAc	493	DesHex-desHex-desHexM
633/650	Hex-desHex-desHex-desHexM		

HexNAc: N-acetilhexosamina, Hex: hexosa, desHex: desoxihexosa, M: grupo metilo

5 La secuencia de las unidades de repetición del polisacárido capsular positivo para core-1 se determinó mediante la superposición de los segmentos (Figura 6).

10 El análisis de espectrometría de masas de los polisacáridos positivos para core-1 digeridos enzimáticamente dio indicaciones de los enlaces glucosídicos entre los monosacáridos. Además podrían identificarse la galactosa (escisión exitosa mediante β 1-3 galactosidasa) y la fucosa (escisión exitosa mediante α 1-3,4 fucosidasa) (Figura 7).

Este resultado está de acuerdo con el análisis de los monosacáridos anteriormente mencionados, que reveló una acumulación de fucosa, galactosa y GalNAc.

15 10.5 Verificación de la estructura de core-1 como un disacárido ramificado de unidades repetidas del polisacárido capsular

20 La estructura ramificada de core-1, Gal β 1-3GalNAc, en las unidades de repetición debería identificarse mediante la doble digestión con las exoglucosidasas β 1-3 galactosidasa y HexNAcasa (escisión de β 1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc) seguida del análisis de los monosacáridos tal como se describe anteriormente.

25 Dos muestras que contenían cantidades iguales de polisacárido positivo para core-1 se filtraron para purificarlas de los monosacáridos libres. Después, una de ambas muestras se digirió con β 1-3 galactosidasa a 37 °C durante toda la noche. Ambas muestras se filtraron una vez más para separar la galactosa libre de la muestra digerida, mientras que la muestras nos digeridas se usaron como un control negativo. Posteriormente, se recogieron los retenidos y se digirieron con HexNAcasa. Finalmente ambas muestras se filtraron nuevamente. Todos los eluatos se analizaron por HPAEC-PAD.

30 Para controlar, si la estructura de core-1 se eliminó por la doble digestión pero permanecía intacta por la digestión mediante HexNAcasa (control negativo), los retenidos se analizaron por transferencia de puntos usando el Kit de Detección DIG-Glucono (Roche Diagnostics) para detectar polisacáridos y el anticuerpo específico de core-1 Nemo-TF1 para identificar la estructura de core-1.

35 En ambos eluatos la muestra digerida doblemente con galactosa (primer eluato) y GalNAc (segundo eluato) pudo identificarse mediante el análisis de monosacáridos. Mientras que en el eluato del control negativo, digerido únicamente con la exoglucosidasa HexNAcasa, no pudieron identificarse ni la galactosa ni la GalNAc. Ésta es una indicación fuerte de la estructura ramificada de core-1, Gal β 1-3GalNAc.

40 Los análisis de transferencia de puntos del retenido doblemente digerido y de la muestra digerida con HexNAcasa usando el Kit de detección DIG-Glucono revelaron concentraciones similares de polisacáridos, lo que se aplicó en la membrana de nitrocelulosa. La estructura de core-1 ya no pudo detectarse en la muestra doblemente digerida, mientras que en la muestra digerida con HexNAcasa la estructura de core-1 aún se identificaba mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo Nemo-TF I.

10.6 Verificación de la estructura del polisacárido positivo para core-1 mediante el análisis de sus fragmentos separados.

5 Para la verificación adicional de la estructura del polisacárido positivo para core-1, el glucano se fragmentó mediante hidrólisis con ácido acético al 1 % (1,5 h, 100 °C). Los fragmentos de glucano se marcaron mediante el floró 2-amino benzamida (2-AB) tal como ya se ha descrito por J.C. Bigge *et al.* (1995). Para este procedimiento se rindieron muestras libres de partículas y libres de sales mediante purificación en una columna Carbograph SPE (Alltech Associates Inc.) y se liofilizaron. El sedimento se disolvió en 5 µl de 2-AB en DMSO/ácido acético glacial/cianoborhidruro de sodio y se incubaron a 60 °C durante 2 h. Los fragmentos marcados con 2-AB se separaron de la 2-AB libre mediante cromatografía en papel. Finalmente, los fragmentos conjugados con 2-AB se eluyeron con agua. Después de la liofilización el sedimento se disolvió en acetonitrilo al 50 %. Basándose en su tamaño, los fragmentos se separaron mediante HPLC de fase normal (columna: Luna 3m NH2 A100, Phenomenex, eluyente A: acetato de NH4 de 15 mM, eluyente B: acetonitrilo) con detección por fluorescencia. La secuencia de los fragmentos se analizó mediante espectrometría de masas ESI. Finalmente, para la verificación de los enlaces glucosídicos y una identificación mejor de los monosacáridos que son componentes de los fragmentos, los oligosacáridos se digirieron con la exoglucosidasa β1-3 galactosidasa, α1-3,4 fucosidasa y HexNAcasa tal como ya se ha descrito anteriormente. El éxito de la digestión se controló mediante espectrometría de masas ESI y la eliminación de los monosacáridos terminales se identificó mediante HPAEC-PAD tal como ya se ha descrito anteriormente.

20 La estructura ya identificada de unidades de repetición del polisacárido positivo para core-1 se confirmó por ambos análisis dando los fragmentos de oligosacáridos y monosacáridos escindidos esperados (tabla 9).

Tabla 9:

Fragmentos de oligosacáridos	exoglucosidasa	Análisis ESI-MS	Análisis de monosacáridos
HexNAc-Hex	β1-3 galactosidasa	HexNAc Hex HexNAc-Hex	GalNAc/GalNH2 galactosa
DesHex-desHex-desHexM	α1-3,4 fucosidasa	desHexM DesHex-desHexM DesHex-desHex	fucosa
DesHex-desHex	α 1-3,4 fucosidasa	desHex	fucosa
DesHex-desHexM-HexNAcM-HexNAc	HexNAcasa (α1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc)	HexNAc DesHex-desHexM-HexNAc	n.d

25 En conclusión, la estructura de unidades de repetición del polisacárido capsular positivo para core-1 (Fig. 8) se confirmó por una variedad de análisis.

Ejemplo 11 modelo animal

30 11.1 Inmunización intraperitoneal de ratones con bacterias destruidas

11-1.1 Análisis del suero de los ratones mediante el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 1

35 Los ratones hembra Balb/c (Charles River, 4 por grupo) se trataron con Ciclofosfamida a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal en el día -1. En los días 0, 7 y 14 se les inyectaron 5×10^8 bacterias a los ratones por vía intraperitoneal (cepas AG3 negativas para core-1 (grupo I), 32 o 53 o cepa AG6 positivo para core-1 (grupo K)) en PBS o con PBS solamente (grupo L). Las muestras de suero se tomaron a los días -4, 21, 27 y 30.

40 Los sueros de los ratones se analizaron para la unión a core-1 en ELISA. La asialoglucoforina sirvió como antígeno que portaba Core-1. La asialoglucoforina tratada con ácido peryódico se usó como un control negativo. El tratamiento con peryodato degrada el anillo externo de los hidratos de carbono del Core-1 degradando del mismo modo el epítipo Core-1.

45 Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con asialoglucoforina A (AGP) a una concentración de 2 µg/ml. La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween.

La mitad de la placa se trató con peryodato del siguiente modo:

5 Los pocillos se incubaron durante 5 minutos con tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4,5 seguido de una incubación de 1 hora con ácido peryódico 10 mM en tampón acetato en la oscuridad. Los pocillos se incubaron durante 5 minutos con tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4,5. La reacción se detuvo mediante la incubación con borhidrato de sodio (50 mM en PBS, 30 min). A continuación, se lavaron las placas 5 veces con PBS/Tween.

Las placas se bloquearon después mediante la adición de BSA al 2 % durante 30 min.

10 La incubación con distintas diluciones de los sueros de ratón se realizó durante 1,5 h. La inmunoglobulina de ratón unida se detectó con un anticuerpo de IgM de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa (1:5000 en PBS/BSA al 1 %). El ensayo se reveló con TMB como sustrato y la reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 2,5 N.

15 La Fig. 9 muestra la unión de los anticuerpos de IgM al suero para la AGP positiva para core-1 y para la AGP negativa para core-1 (AGP+PJ). Solamente los sueros de tres de los 4 ratones inmunizados con bacterias positivas para Core-1 (grupo K) mostraron una fuerte unión a AGP, mientras que la señal se reduce después de la escisión de Core-1 con PJ.

20 Por lo tanto, las bacterias positivas para core-1 son capaces de inducir la inmunidad humoral dirigida a core-1 en ratones.

11.1.2 Análisis de los sueros de los ratones mediante el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 2

25 Los machos de los ratones C3H (Charles River, 4 por grupo) se inmunizaron por vía intraperitoneal con 5×10^8 bacterias pasteurizadas de cepas positivas para Core-1 y negativas para Core-1 en 200 μ l de PBS los días 0, 7 y 14. Los sueros se recogieron antes de la inmunización y en los días 13, 21 y 28 y se analizaron en el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 2.

30 Las placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano se recubrieron con distintos conjugados hidrato de carbono-PAA (GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA, Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA, GalNAc α 1-3Gal β -PAA, Gal α 1-3-GalNAc β -PAA, Gal beta1-3GalNAc alfa-PAA) a 5 μ g/ml en tampón de recubrimiento (8,4 g/l de NaHCO₃, 3,56 g/l de Na₂CO₃, pH=9,49) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C.

35 La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween.

Las placas se bloquearon después mediante la adición de BSA al 2 % durante 30 min.

40 Las incubaciones con distintas diluciones de sueros de ratón se realizaron durante 1,5 h. La inmunoglobulina de ratón unida se detectó con un anticuerpo de IgM de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:5000 en PBS/BSA al 1 %). El ensayo se reveló con TMB como sustrato y la reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 2,5 N.

45 La Figura 10 muestra el valor medio de las señales de ELISA contra el conjugado PAA Gal beta1-3GalNAc alfa-PAA con respecto a la señal de ELISA contra GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA, para los sueros de 4 ratones por grupo en el día 0 (suero preinmune) y día 21 [la señal de ELISA relativa se calcula a partir de la ecuación: (señales de ELISA contra Gal beta1-3GalNAc alfa-PAA) * 100/ (señal de ELISA contra GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -PAA)]. Los sueros se calcularon como positivos si el suero inmune mostraba un aumento de al menos el 50 % en comparación con el suero preinmune. Podría mostrarse que solamente las cepas positivas para Core-1 AG6 y MUI indujeron una respuesta inmunitaria humoral específica para Core-1 en ratones.

50 11.1.3 Análisis de los sueros de los ratones mediante el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 3

55 Las hembras de los ratones Balb/c (Charles River, 4 por grupo) se trataron con Ciclofosfamida a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal en el día -1. A los días 0, 7 y 14 se les inyectó a los ratones por vía intraperitoneal con 5×10^8 bacterias (cepas negativas para core-1 AG3 (grupo I), 32 o 53 o la cepa positiva para core-1 AG6 (grupo K)) en PBS o solamente con PBS (grupo L). Las muestras de suero se tomaron en los días -4, 21, 27 y 30.

60 Los análisis por citometría de flujo se realizaron con el fin de analizar la unión de los sueros de ratón a las líneas celulares tumorales humanas positivas para core-1 y negativas para core-1 (NM-ts y NM-D4, respectivamente; NM-ts es la célula parental de NM-D4 tal como se describe en los documentos WO2005/017130 A2 y EP1654353, NM-D4 se deposita en la DSMZ con la referencia DSM ACC2605). Se sedimentaron 3×10^5 células por tubo y el sedimento se resuspendió en 50 μ l de suero murino (diluido 1:50 en PBS/FCS al 10 %), anticuerpo control o solamente PBS/FCS al 10 %. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4 °C, se lavaron con PBS y se centrifugaron. A continuación, se incubaron las células con anticuerpo de IgM de cabra anti ratón conjugado con Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:200 en PBS/FCS al 10 %) durante 20 min a 4 °C, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 65 200 μ l de PBS para el análisis por citometría de flujo.

La Fig. 11 muestra la unión de los anticuerpos de IgM de los sueros de ratón a las líneas celulares humanas NM-ts (negativa para Core-1) y NM-D4 (positiva para core-1). Mientras que la unión a la línea NM-ts negativa para Core-1 es comparable entre los ratones inmunizados con bacterias negativas para Core-1 (grupo I) y las bacterias positivas para Core-1 (grupo K), hay una unión significativamente más fuerte de 3 de los 4 ratones del grupo K a la línea NM-D4 positiva para Core-1. Esto es indicativo de la especificidad para Core-1 de la respuesta inmunitaria humoral de los ratones inmunizados con bacterias positivas para Core-1.

11.2. Inmunización oral de los ratones libres de gérmenes con bacterias positivas para Core-1 vivas

Se inmunizó a los ratones C3H libres de gérmenes por vía oral con 2×10^9 bacterias vivas de la cepa AG6 en los días 2,3,4, 9,10,11, 16, 17 y 18. Las muestras de suero se tomaron en el día 0 (sueros preinmunes) y en los días 14 y 21 y se analizaron para los anticuerpos de IgM específicos de AGP en el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 1.

Los ratones inmunizados mostraron un aumento de los títulos de anti-core-1 en comparación con los ratones control tal como se muestra mediante la unión de los sueros de ratón a las placas de microtitulación recubiertas con AGP. La detección de la IgM de ratón unida se realizó con anticuerpos de IgM anti-ratón acoplados a peroxidasa. La especificidad de la señal para core-1 se mostró mediante la disminución de la señal de ELISA después del tratamiento con ácido peryódico (destruye la estructura del hidrato de carbono). Después de 14 o 21 días 3 de los 3 ratones tenían niveles elevados de anticuerpos IgM para Core-1 mientras que los ratones control no mostraban ningún aumento de las señales de ELISA para AGP en comparación con AGP + PJ tal como se muestra en la figura 12.

11.3 Inmunización oral de los ratones C3H con bacterias positivas para Core-1 pasteurizadas

Se inmunizó por vía oral a los ratones C3H con 2×10^{11} (grupo A) o 2×10^{10} (grupo B) bacterias pasteurizadas de la cepa AG6 diariamente los días de 0 a 28. Las muestras de suero se tomaron en el día -1 (suero preinmune) y en los días 13, 21, 28 y 35 y se analizó para los anticuerpos de IgM específicos de AGP en el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 1.

Los ratones inmunizados mostraron títulos aumentados de anti-Core-1 en comparación con los ratones control tal como se muestra mediante la unión de los sueros de los ratones a las placas de microtitulación recubiertas con GP o con AGP (con o sin tratamiento con ácido peryódico). La detección de la IgM de ratón unida se realizó con anticuerpos de IgM anti ratón de acoplados a peroxidasa. La especificidad de la señal para core-1 se mostró mediante la disminución de la señal de ELISA después del tratamiento con ácido peryódico (destruyendo las estructuras de hidratos de carbono, disminución de al menos el 30 %) y mediante la señal más baja contra GP (aumento de señal de AGP de al menos el 50 %).

Se mostró que 5 de 6 los ratones del grupo A y 5 de 8 los ratones del grupo B desarrollaron anticuerpos específicos para Core-1 en el día 21 (fig. 13).

En el ensayo de respuesta inmunitaria humoral 3 los sueros de ratón se analizaron para la unión a la línea celular tumoral positiva para Core-1 NM-D4 en comparación con la línea celular NM-ts negativa para Core-1 mediante citometría de flujo. Se sedimentaron 3×10^5 células por tubo y el sedimento se resuspendió en 50 μ l de suero murino (diluido 1:300 en PBS/BSA al 1 %), anticuerpo control o solamente PBS/BSA al 1 %. Las muestras se incubaron durante 60 min a 4 °C, se lavaron con PBS y se centrifugaron. A continuación, se incubaron las células con anticuerpos IgM de cabra anti-ratón, conjugados con biotina (Jackson Immuno Research; 1:200 en PBS/BSA al 1 %) durante 60 minutos a 4 °C y se lavaron con PBS. Después se incubaron las células con estreptavidina conjugada con Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:200 en PBS/BSA al 1 %) durante 60 min a 4 °C y se resuspendieron en 200 μ l de PBS para el análisis por citometría de flujo.

Los resultados se calcularon a partir de la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\% \text{ de células positivas en NM-D4}_{\text{suero inmune}} - \% \text{ de células positivas en NM-D4}_{\text{suero pre-inmune}}}{\% \text{ de células positivas en NM-ts}_{\text{suero inmune}} - \% \text{ de células positivas en NM-ts}_{\text{suero pre-inmune}}} \right) = X$$

Los sueros de ratón con un cociente $X \geq 10$ se vieron cómo positivos (con un % de células positivas en NM-ts_{suero inmune} - % de células positivas NM-ts_{suero preinmune} ≥ 1).

En el día 28, 11 de 13 ratones se habían desarrollado una respuesta inmunitaria humoral contra la línea celular tumoral humana positiva para Core-1 NM-D4 tal como se muestra en la fig. 14.

Ejemplo 12. Potencial de las bacterias positivas para Core-1 para la inducción de una respuesta inmunitaria celular (*in vitro*)*12. Generación de células dendríticas funcionales*

La línea de células dendríticas NemodDC (pNM-DC) se ha usado como una fuente para células presentadoras de antígenos (CPA). Las pNM-DC se diferenciaron en iNM-DC, después de cargarse con lisados bacterianos (BaLy) de las siguientes cepas de bacterias: AG6, MU1, 52 y 53. Se añadieron 50 µg/ml de cada BaLy junto con citocinas de maduración al medio de cultivo y las iNM-DC se diferenciaron a su estado maduro (mNM-DC).

En más detalle, en la primera etapa de pNM-DC (1×10^5 /ml) se diferenciaron en iNM-DC mediante una incubación de 7 días en medio NemodDC (MEM- α al 70 %, FCS al 20 %, CM5637 al 10 %) con la adición de 1000 U/ml de GM-CSF, 100 U/ml de IL-4 y 2,5 ng/ml de TNF- α . A continuación, se cargaron 1×10^6 /ml de NM-DC inmaduras (iNM-DC) bien con lisados de bacterias (50 µg/ml), lisados de células tumorales (1×10^6 células tumorales lisadas para la carga en 1×10^6 NM-DC) o AGP- y proteína GP (20 µg/ml) y maduras durante 2 días mediante la adición de 75 ng/ml de TNF- α .

El fenotipo de maduración de las mNM-DC es muy importante para la activación exitosa de las células T y se ensayó por medio de citometría de flujo para la expresión de CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD35, CD80, CD83, CD86, CD116, HLA-ABC y HLA-DR. Solamente aquellas DC que tenían un fenotipo correspondiente al fenotipo de las DC maduras se usaron para la activación de las células T.

12.2 Generación de células T activadas contra Core-1 y detección de producción de GM-CSF (ensayo de respuesta inmunitaria celular 1) y TNF- α (ensayo de respuesta inmunitaria celular 2) usando ELISA

De 7-10 días después del cebado de los linfocitos T con NM-DC cargadas con lisados bacterianos positivos para Core-1, las células T resultantes ($0,7-1 \times 10^6$ /ml) se reestimularon con mNM-DC (1×10^5 /ml) cargadas con los lisados de células tumorales positivas para Core1 (50 µg/ml). Después de 48 horas de incubación los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron usándose para la evaluación de la producción de citocinas en respuesta a la línea celular tumoral humana positiva para Core-1 en NM-D4 los Kits de GM-CSF y TNF- α - BD OptEIA™.

Las placas de 96 pocillos se pre-recubrieron con 50 µl de anticuerpo apropiado de captura anti humano (GM-CSF o TNF- α) diluido 1:250 en tampón de recubrimiento. Después de las etapas de lavado y de bloqueo, se añadieron 100 µl de sobrenadantes o patrones a los micropocillos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la curva patrón se usaron el GM-CSF en concentraciones de 0; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 pg/ml y el TNF- α recombinante humano a concentraciones de 0; 4,7; 9,4; 18,8; 37,5; 75; 150; 300 pg/ml. Después de lavar, se añadieron 100 µl de solución de Detección de Trabajo por pocillo, y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. En la siguiente etapa se añadieron 100 µl de Reactivo de Sustrato de Una Sola Etapa TMB por pocillo. Después de una incubación final durante 30 minutos y la adición de 50 µl de Solución de Detención las extensiones se leyeron a 450 nm.

Los resultados demostrados en las figuras 15A y B muestran pruebas claras de que las células T generadas para los lisados de bacterias positivas para Core1 son capaces de reconocer a las DC cargadas con los lisados de células positivas para Core1 de la línea celular humana NM-D4 mediante la producción de citocinas inhibitoras de tumores tales como TNF-alfa y GM-CSF. Por el contrario, se liberó un bajo nivel de citocinas en respuesta a los lisados celulares negativos para Core-1. Además, este reconocimiento se inhibió específicamente a través de la preincubación de las NM-DC cargadas con lisados con anticuerpo específico de Core1.

12.3 Ensayo ELISPOT para la evaluación de la secreción de IFN- γ por linfocitos T activados dirigidos contra Core-1 (ensayo de respuesta celular inmunitaria 2)

El ensayo ELISpot se usó para la evaluación de la secreción de IFN- γ en respuesta a la estimulación específica de antígeno. Este ensayo permite la cuantificación de la capacidad funcional de las células T presensibilizadas para reconocer antígenos de Core1 de un modo específico de antígeno.

Los linfocitos T se activaron primero *in vitro* co-cultivándose con DC cargadas con lisados bacterianos. Después de 7 a 10 días de cebado, las células T se recogieron y se reestimularon con DC (en una relación de células T con respecto a DC 10:1) cargadas con lisados celulares tumorales humanos positivos para Core-1 (NM-D4) y negativos para Core1 (NM-ts).

Los pocillos de la placa de ELISpot se pre-recubrieron con anticuerpo de ratón anti-humano de IFN- γ (Kit Mabtech) que se une a la base de nitrocelulosa de la placa de ELISpot. Las células reestimuladas se transfirieron a los pocillos, y las citocinas se liberaron durante el periodo de incubación. El IFN- γ que se liberó localmente alrededor de cada célula T se une a, y por lo tanto se "captura" por el anticuerpo específico. Se recogieron las células 24 horas

después de la incubación. Se añadió un segundo anticuerpo anti-IFN- γ anti humano a los pocillos en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$; este anticuerpo biotinilado se acopla a una enzima que es capaz de convertir un sustrato en un producto coloreado insoluble. Las placas se lavan una vez más, y se añade la estreptavidina conjugada con una enzima-AP a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente se añade un sustrato precipitante BCIP+NBT y la placa se incuba hasta que los puntos emergen al lado de las células T correspondientes. Los puntos coloreados se cuentan y se analizan usando un sistema de imagen digital.

Los resultados mostraron que las células T generadas para los lisados bacterianos positivos para Core-1 (AG6 y MU1) son capaces de reconocer DC cargadas con lisados celulares positivos para Core1 de la línea celular tumoral humana NM-D4 mediante la producción de la citocina inhibidora de tumores IFN-gamma (Fig. 16). Se liberaron niveles muy bajos de citocinas en respuesta a los lisados celulares negativos para Core1 (R+DC/ts). Además, la especificidad de reconocimiento del lisado celular positivo para Core1 (R+DC/D4) se probó mediante el bloqueo de la liberación de citocinas con el anticuerpo específico de Core-1 Nemod-TF1 (R+DC/D4+Ak).

12.4 Ensayo de respuesta inmunitaria celular 3: ensayo de proliferación de células T

Las células T sensibilizadas y reestimuladas tal como se describe anteriormente para el análisis ELISpot, se transfirieron después de la incubación de una placa ELISpot a una placa de 96 pocillos y se ensayaron usando el Reactivo de Proliferación Celular colorimétrico WST-1 (Roche Molecular Biochemicals), cuya sal de tetrazolio se escinde por enzimas mitocondriales de modo que la cantidad de colorante revelado (leído a 450 nm) se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. La absorbancia del medio de cultivo más wst-1 en ausencia de células fue la posición del blanco para el lector de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. El procedimiento consiste en una adición de una etapa de 10 μl por pocillo de reactivo de Proliferación WST (Roche) y la incubación durante 3 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ y la medición posterior a 450 nm.

Los resultados demostrados en la figura 17, muestran la prueba clara de que las células T generadas para los lisados de bacterias positivas para Core-1, reconocen DC cargadas con el lisado de celular positivo para Core1 de la línea celular tumoral humana NM-D4 tal como se muestra mediante la proliferación específica. Además, este reconocimiento se inhibió específicamente a través de la preincubación de las NM-DC cargadas el lisado con anticuerpos específicos de Core1.

12.5 Ensayo de respuesta inmunitaria celular 4: ensayo de inmunofluorescencia para la presentación de Core-1 en DC cargadas con lisados de bacterias

Con el fin de analizar el procesamiento y la presentación de Core-1 mediante las NM-DC cargadas con lisados de bacterias, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales específicos de core-1 (Nemod-TF1, NEMOD-TF2). La presentación del antígeno Core1 en la superficie de las DC maduras se demostró con la ayuda de la inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia (IF) es una técnica que permite la visualización de un antígeno específico (Core1) en las células mediante la unión de un anticuerpo específico de Core-1 después de la adición de un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo, que se usa para reconocer un anticuerpo primario.

En la primera etapa las pNM-DC (1×10^5 /ml) se diferenciaron en iNM-DC mediante una incubación de 7 días en medio NemodDC (MEM- α al 70 %, FCS al 20 %, CM5637 al 10 %) con la adición de 1000 U/ml de GM-CSF, 100 U/ml de IL-4 y 2,5 ng/ml de TNF- α . A continuación, se cargaron 1×10^6 /ml de NM-DC inmaduras (iNM-DC) bien con lisados de bacterias (50 $\mu\text{g/ml}$), lisados celulares tumorales (1×10^6 células tumorales lisadas para cargar en 1×10^6 NM-DC) o proteínas APG- y GP- (20 $\mu\text{g/ml}$) y se maduraron durante 2 días mediante la adición de 75 ng/ml de TNF- α .

Las DC maduras y cargadas con antígeno se lavaron y se colocaron 1×10^6 células por 50 μl en la placa de microtitulación para la tinción de inmunofluorescencia. Se incubaron 3 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo específico de Core-1 (Nemod-TF1) diluido en medio de cultivo (FCS al 10 %) con la suspensión celular durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de las etapas de lavado se añadieron 50 μl de anticuerpo secundario de IgM de cabra anti ratón 1:200, anticuerpo marcado con Cy3 (Jackson/Dianova) y se incubaron durante 30 minutos. Después de las etapas de lavado, se colocaron 20 μl de la suspensión celular en cada pocillo de un portaobjetos Multiensayo (10 pocillos, Roth).

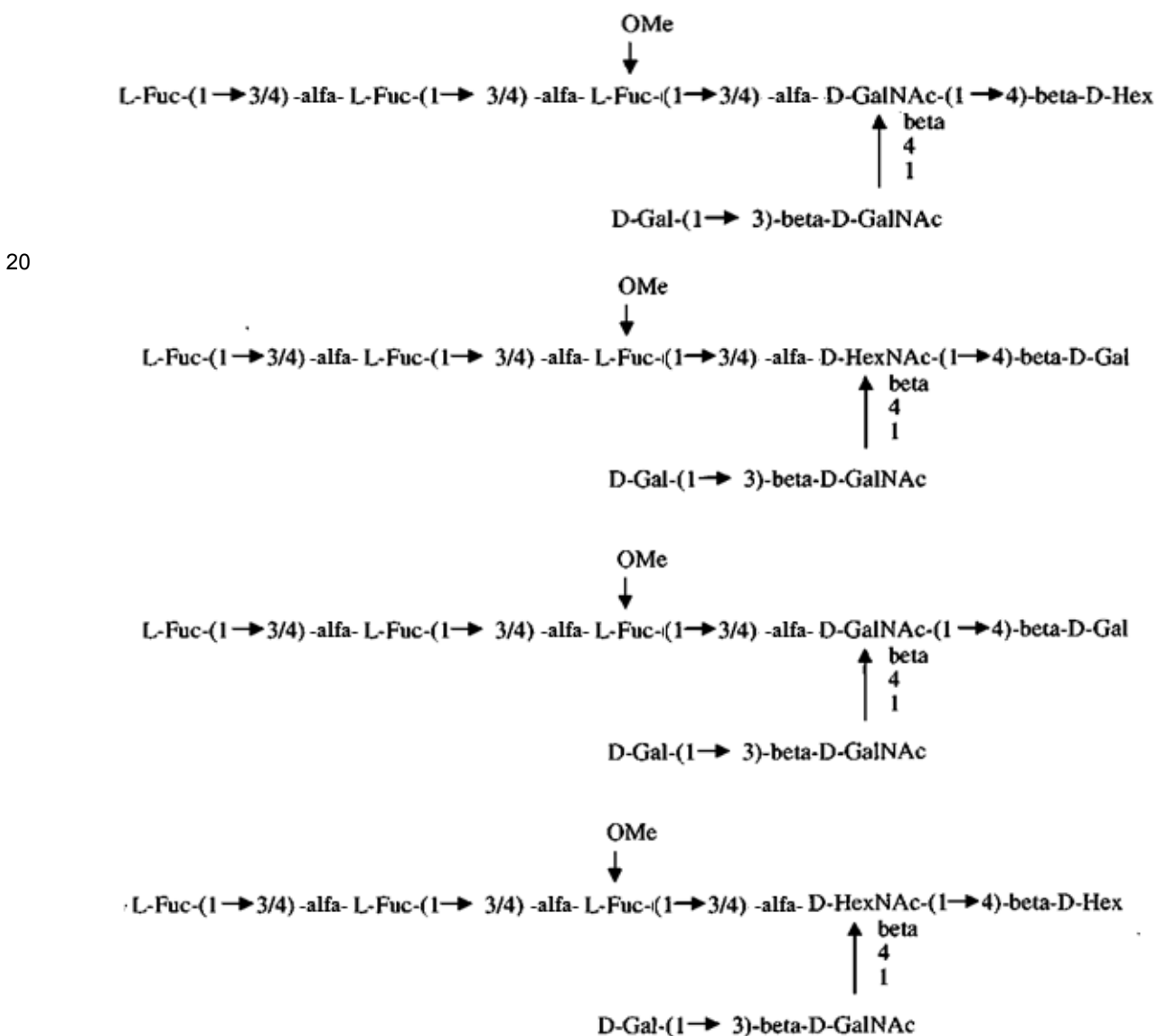
Las muestras de inmunofluorescencia teñidas se examinaron con un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 equipado con la cámara digital AxioCam (Zeiss).

La Fig. 18 muestra la tinción específica positiva para Core-1 de las mNM-DC maduras, que han procesado lisados de AG6 y NM-D4 positivos para Core1; y la inmunofluorescencia negativa en mNM-DC cargadas con lisados negativos para Core1 (AG3 y NM-ts).

5 Mientras que la invención se ha descrito en términos de las realizaciones preferentes, el experto en la materia apreciará que pueden hacerse diversas modificaciones, sustituciones, omisiones y cambios. Por consiguiente, se pretende que el alcance de la presente invención se limite solamente por el alcance de las siguientes reivindicaciones. Las realizaciones particulares de la presente invención, descritas anteriormente, se consideran por lo tanto en todos los aspectos como ilustrativas y no como restrictivas. El alcance de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas se limita más bien a los ejemplos contenidos en la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación seleccionada del grupo que comprende un nutraceutico y/o una composición farmacéutica, que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1), y/o al menos un lisado o una fracción del mismo que comprende al menos un componente positivo para Core-1.
2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, que cuando se administra induce o potencia una respuesta inmunitaria específica para Core-1 en al menos un ser humano o animal.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que reduce o previene la aparición de un tumor o una metástasis positivo/a para Core-1, o la diseminación o metástasis de un tumor positivo para Core-1.
4. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que fortalece el sistema inmunitario y/o mejora una respuesta inmunitaria.
5. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, mediante la cual dicha fracción comprende al menos una de las estructuras de hidratos de carbono seleccionadas del grupo que consiste en



y/o unidades de repetición de las mismas.

6. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1, en la que la formulación es para la administración a un ser humano o a un animal en una cantidad eficaz.
- 5
7. Un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1), y/o un lisado o una fracción del mismo que comprende al menos un componente positivo para Core-1, para su uso como un medicamento y/o nutracéutico para la terapia o profilaxis de un tumor.
- 10
8. Un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1), y/o una fracción o un lisado del mismo para su uso *in vivo* o *in vitro* en un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica para Core-1 y/o para generar células dendríticas funcionales o células T, líneas de células T o clones de células T activados o anticuerpos contra Core-1.
- 15
9. Cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1) y/o una fracción o un lisado de la misma.
- 20
10. Un kit para inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica en un ser humano o animal contra Core-1, el antígeno Core-1 o las células tumorales positivas para Core-1, que comprende una formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1), y/o al menos un lisado o fracción del mismo, o que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1), o una fracción del mismo, y una información sobre el uso del kit.
- 25
11. Un kit para reducir o prevenir la aparición de una enfermedad o un tumor positivo para Core-1, que comprende una formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1), y/o al menos un lisado o una fracción del mismo, o que comprende al menos un microorganismo positivo para Core-1 seleccionado del grupo que consiste en DSM 18726 (AG6) y DSM 18728 (MU1), o una fracción del mismo, y una información sobre el uso del kit.
- 30

Figura 1

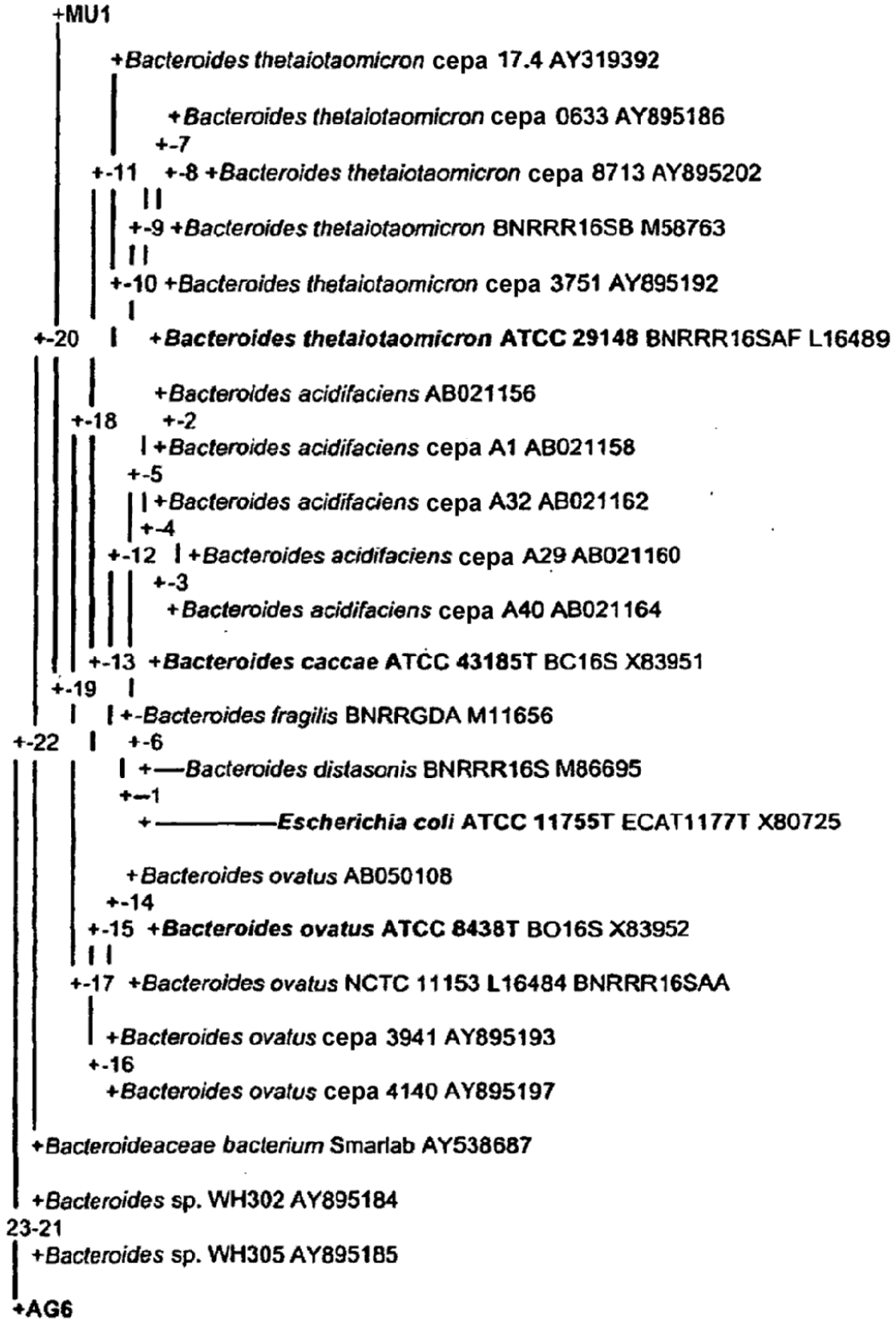


Figura 2

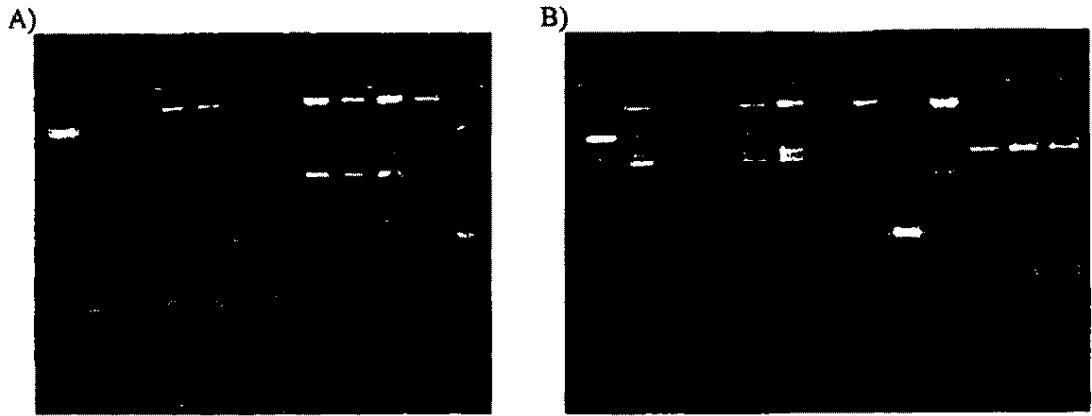


Figura 3

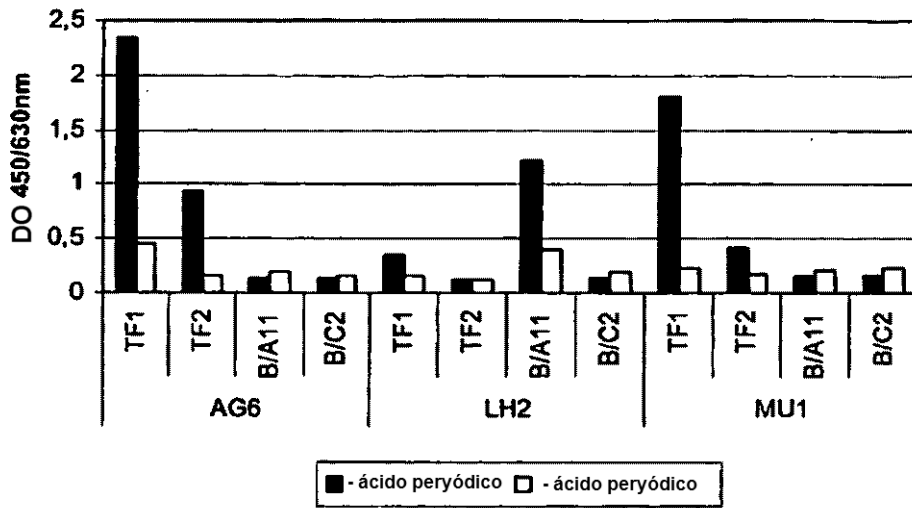


Figura 4

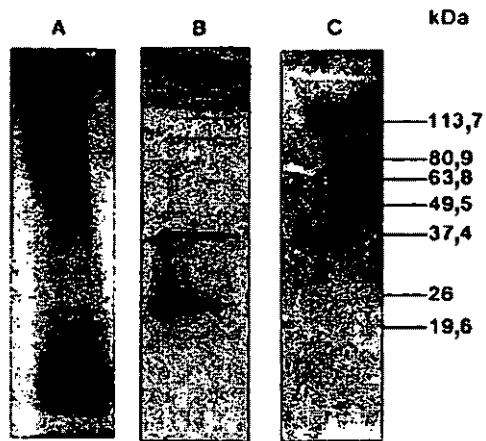


Figura 5

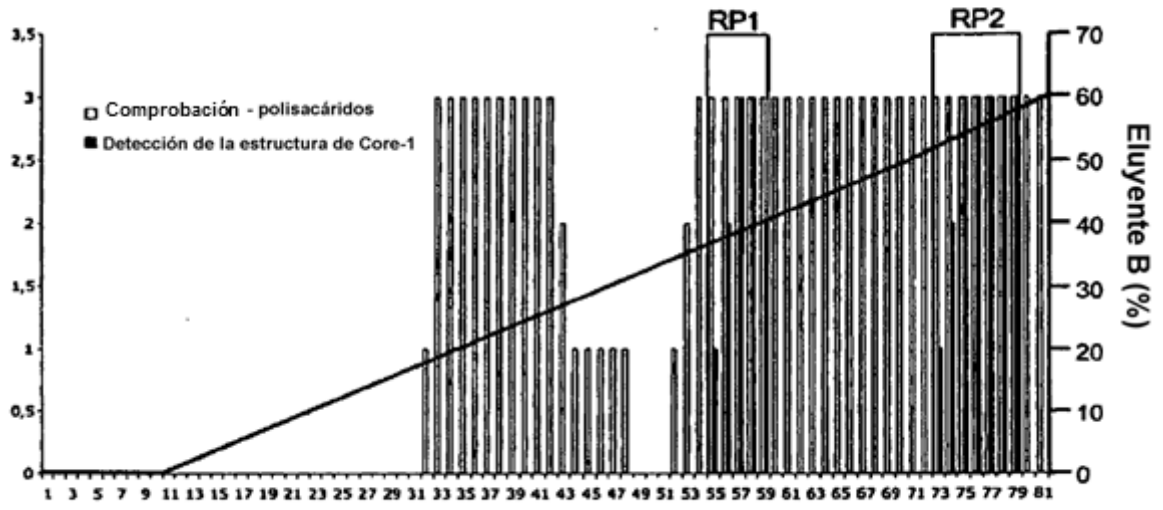


Figura 6

-desHex-desHex-desHexM-HexNAc(HexNAc-Hex)-Hex-

Figura 7

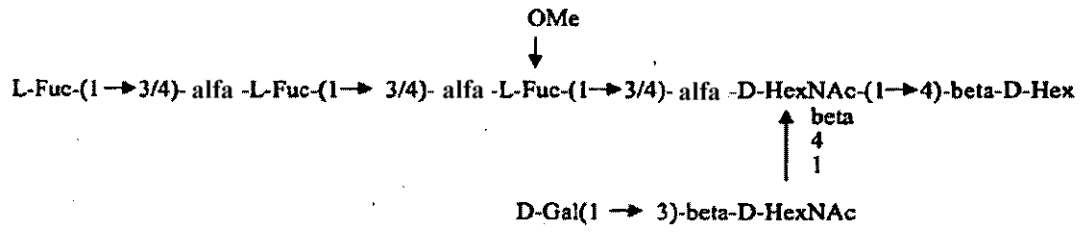


Figura 8

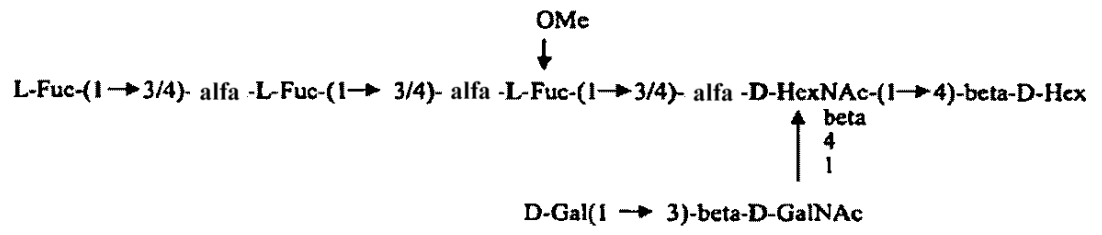


Figura 9

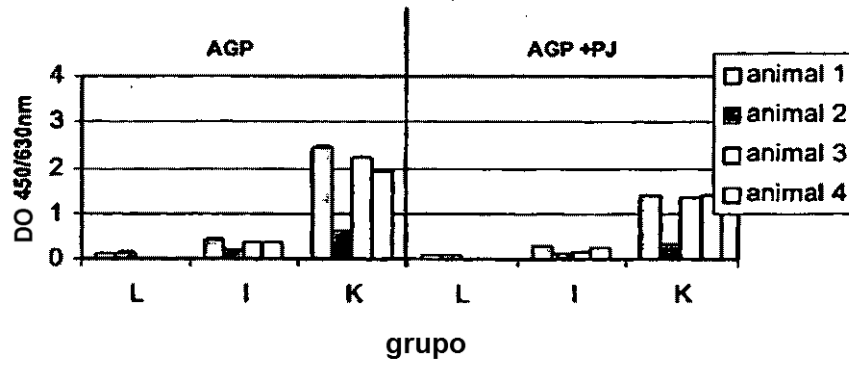
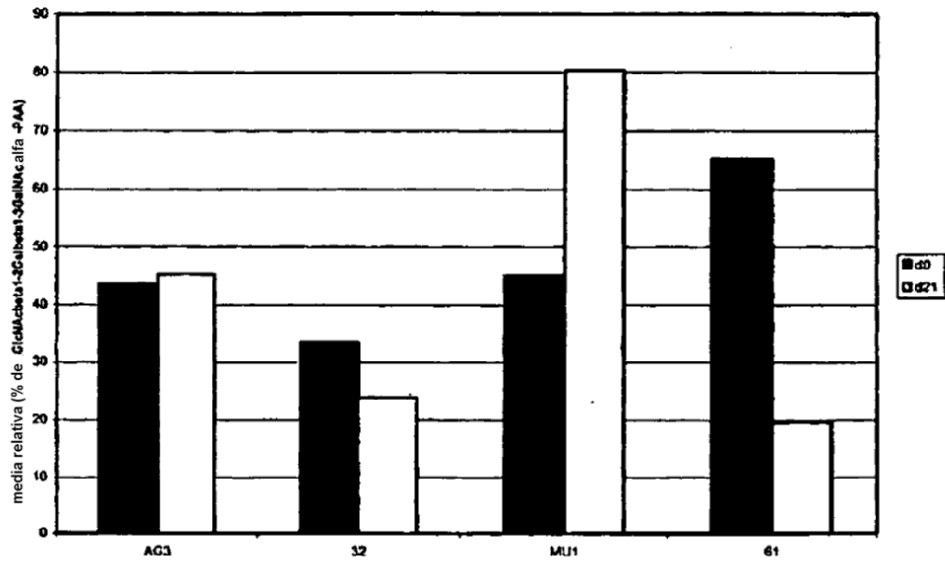


Figura 10

A)



B)

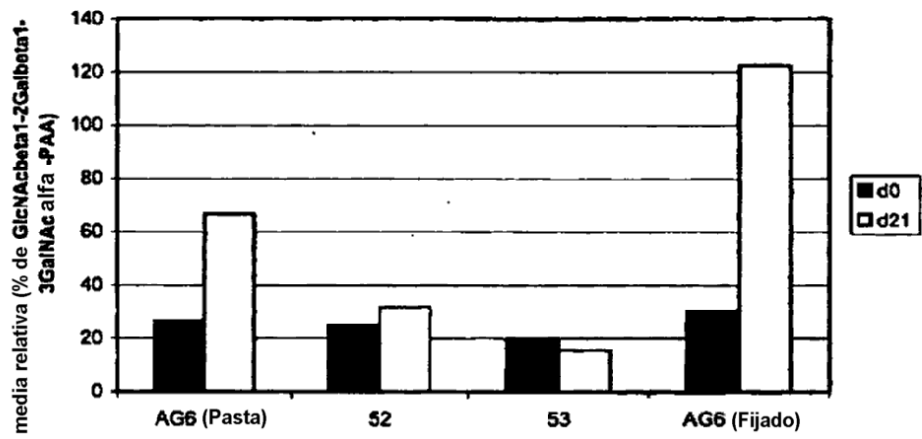


Figura 11

A)

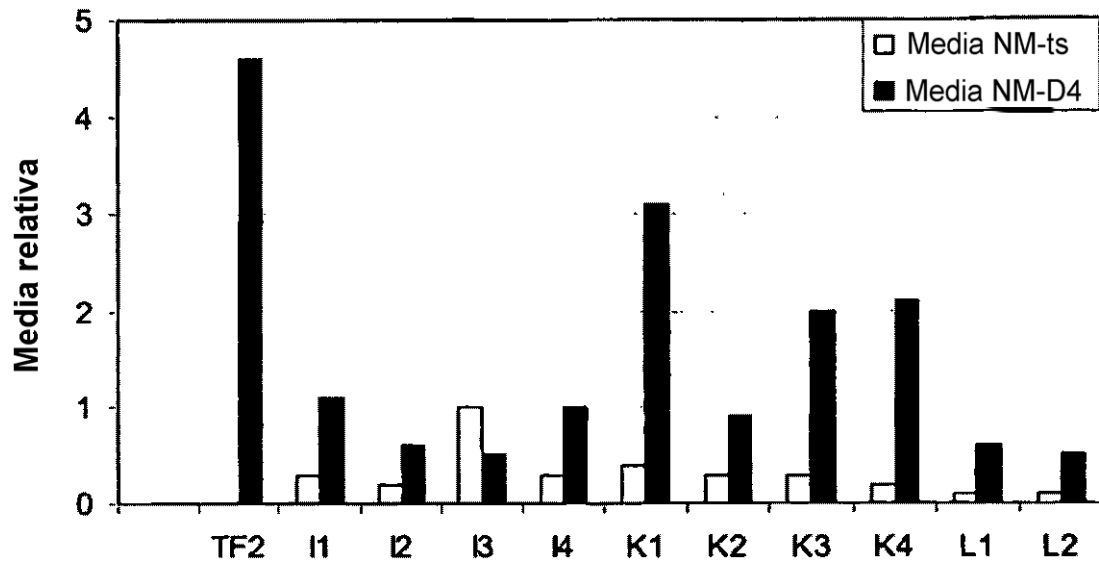


Figura 11B)

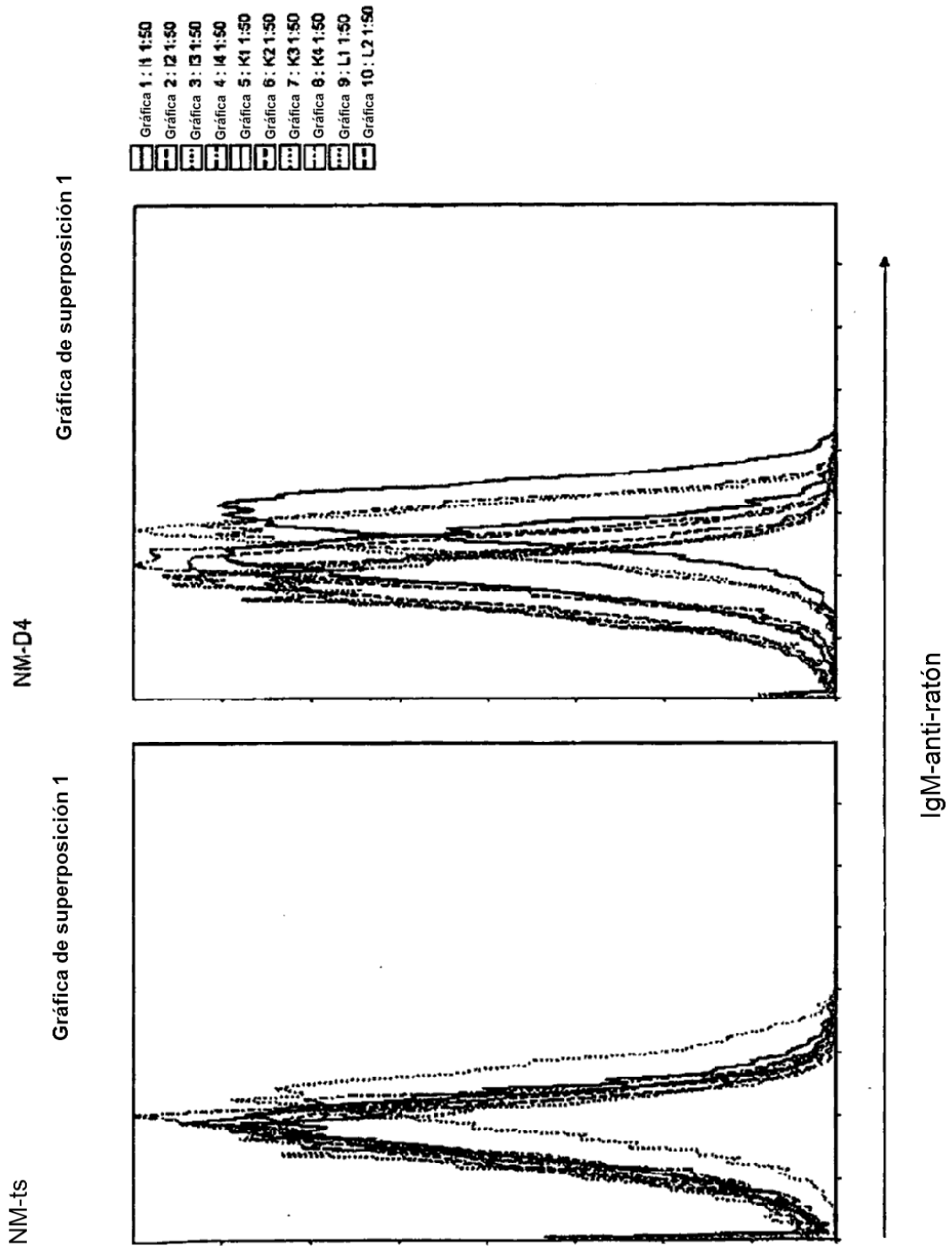


Figura 12

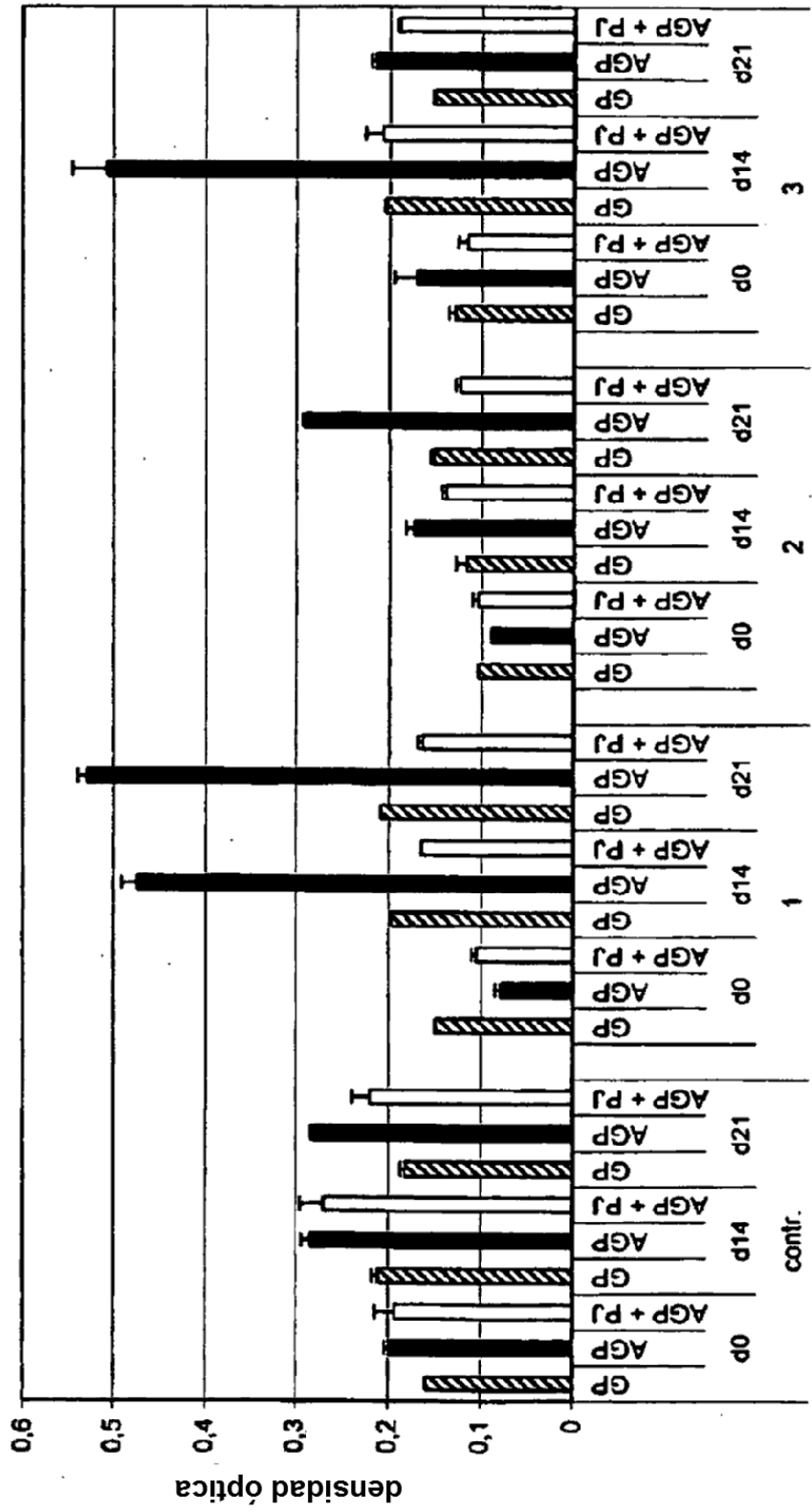
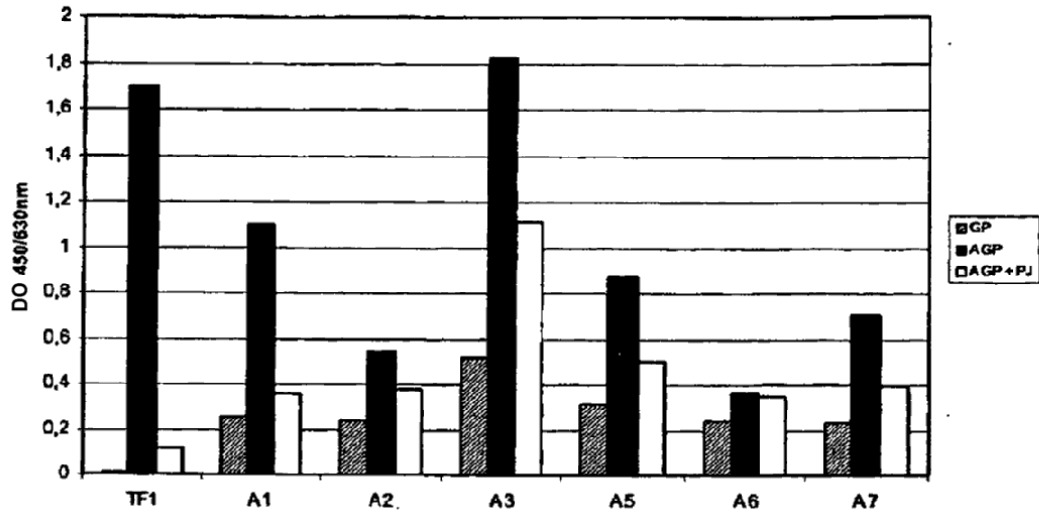


Figura 13

A)



B)

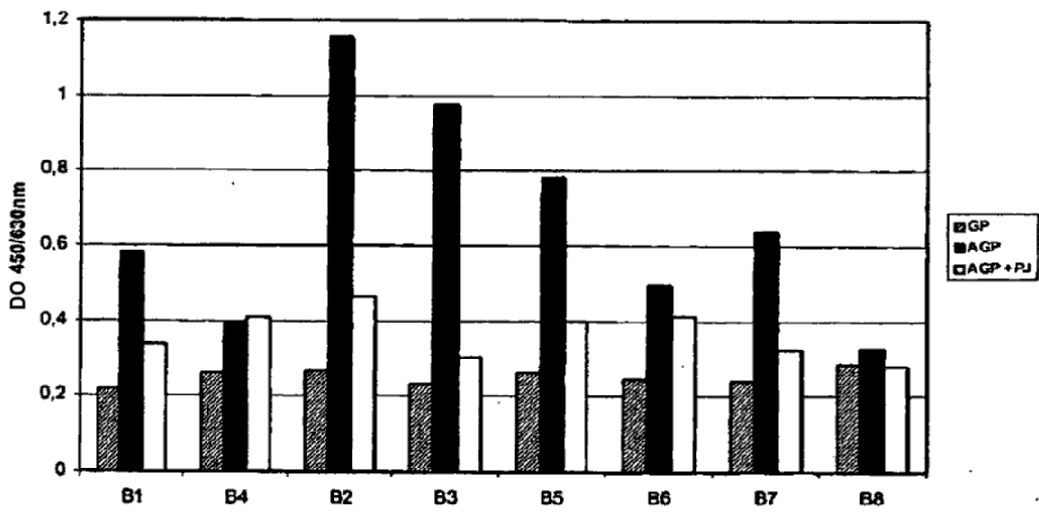


Figura 14

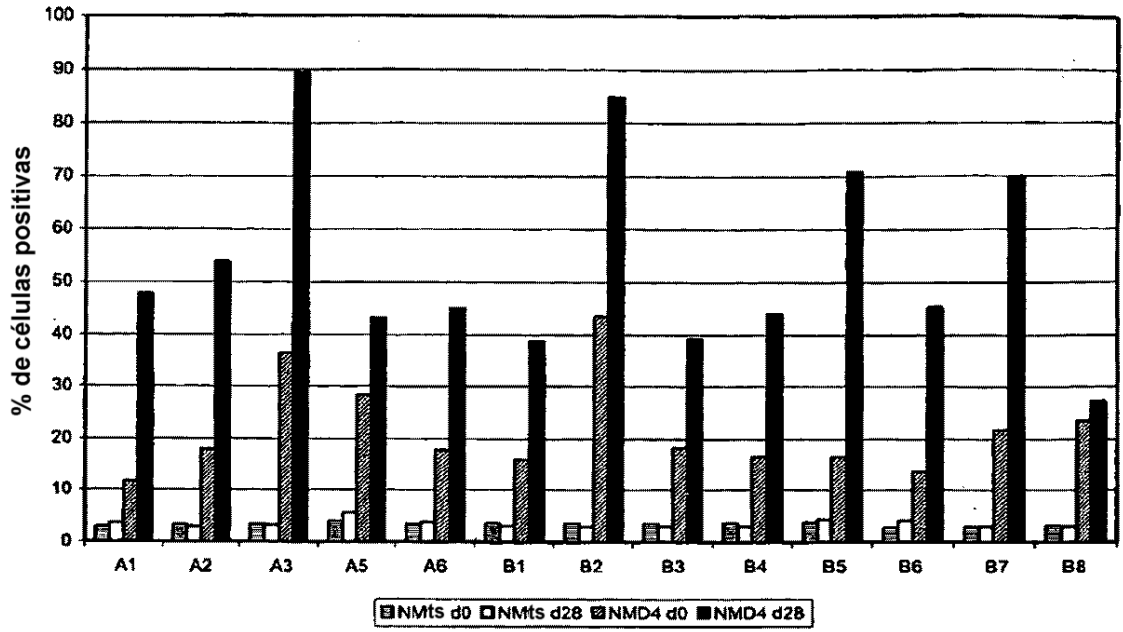


Figura 15

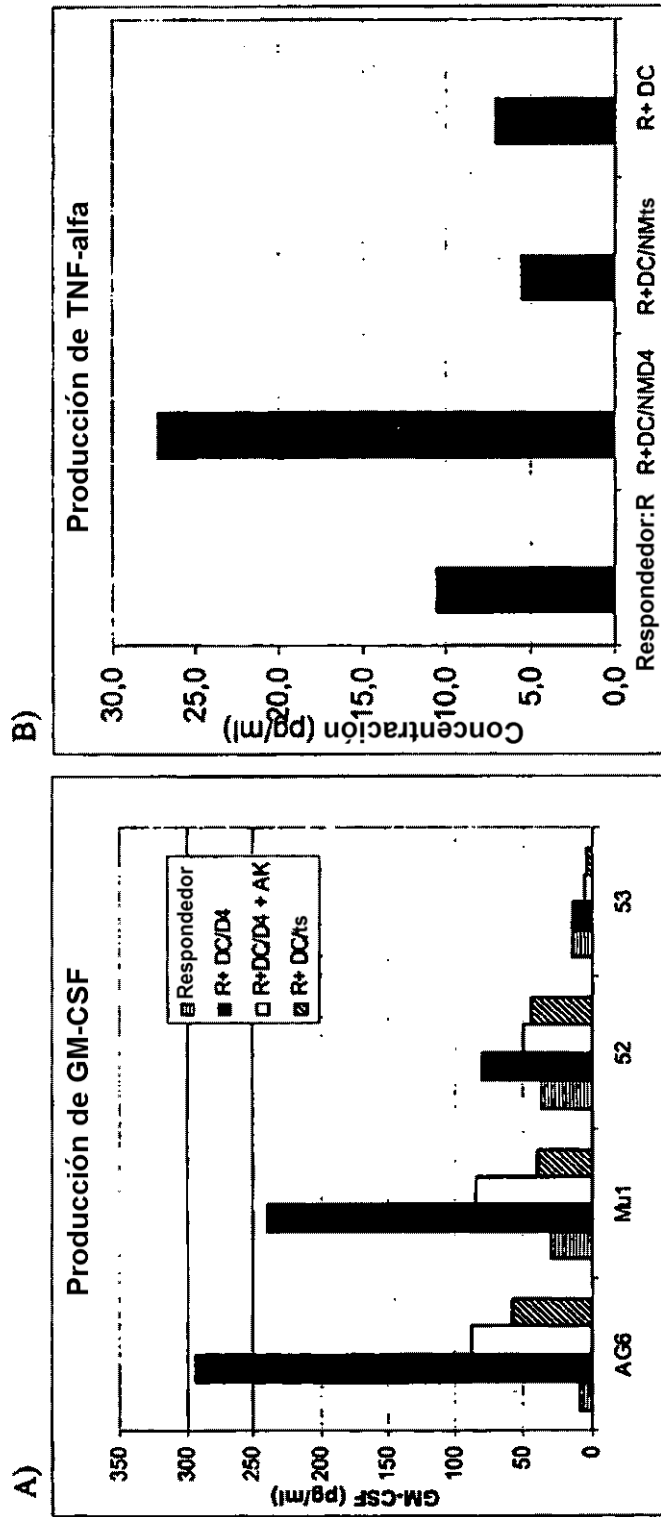


Figura 16

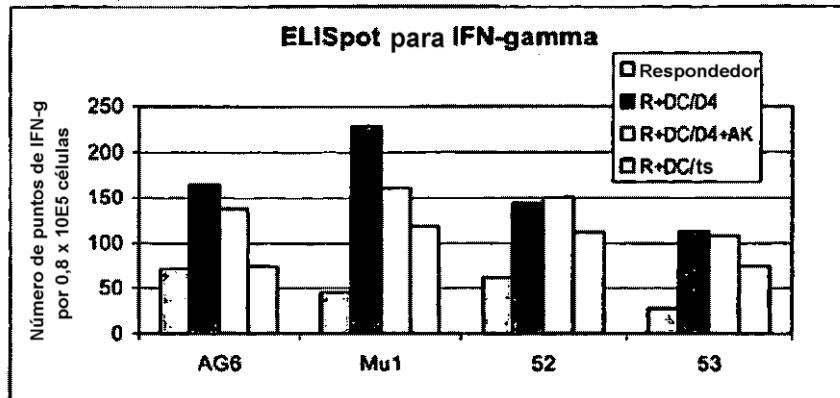


Figura 17

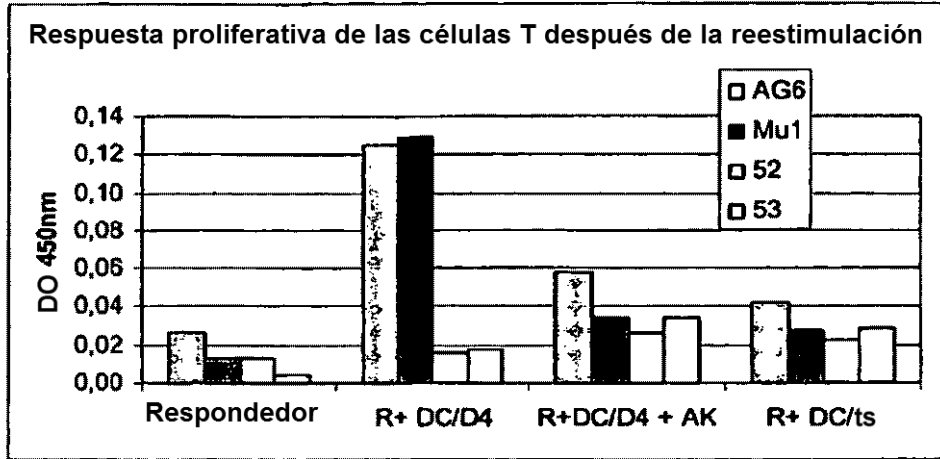


Figura 18

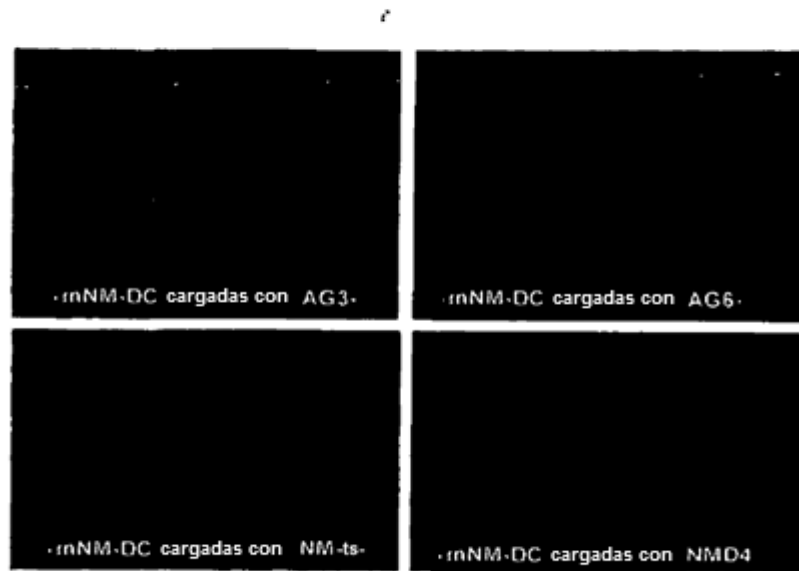
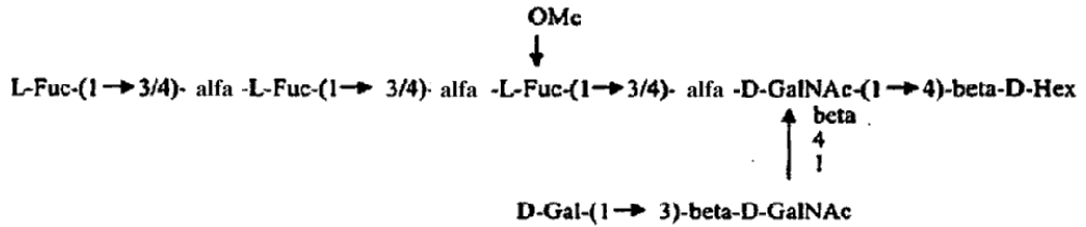
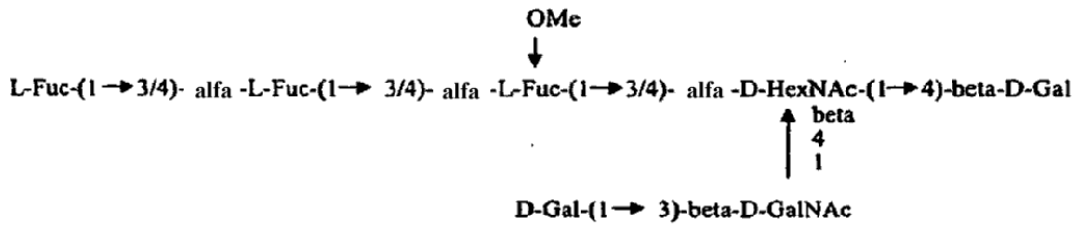


Figura 19

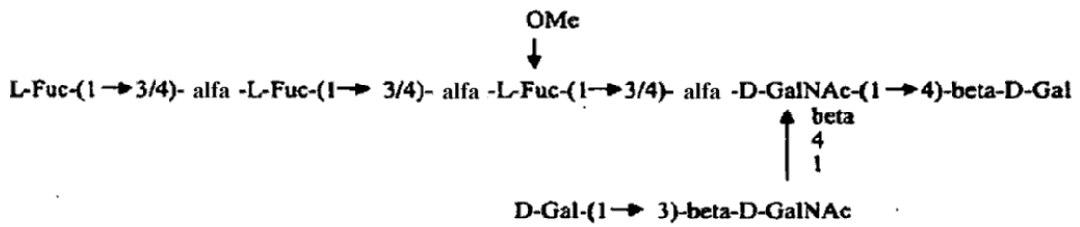
#1



#2



#3



#4

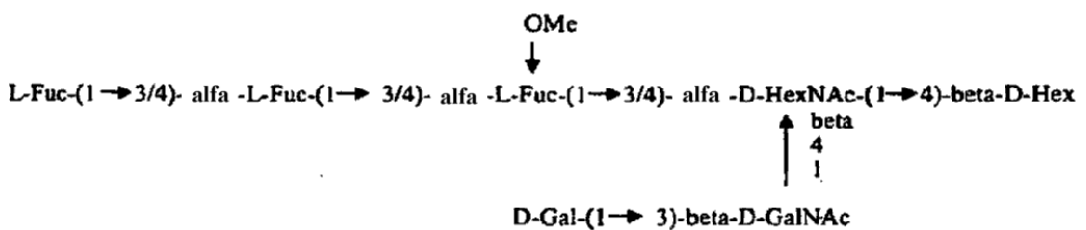


Tabla 1 (Figura 20)

Antibiótico/cepa	53	52	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32
Especie	<i>B. ovelus</i> DSMZ 1896	<i>B. theiaitaomicron</i> DSMZ 2079	<i>B. ovelus</i>	<i>B. ovelus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> DSMZ 8897
Cepa			AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	
Penicilina				SM					
Mezlocilina			SM	SM		S			S
Ampicilina					S	S	S	S	S
Ampicilina + Sulbactam			S	S					
Piperacilina + Tazobactam	S	SM	S	S					
Meropenem									
Clindamicina		SM	S						
Metronidazol	S	S							

Antibiótico/cepa	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32	53	52	AG6	MU1
Especie	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. ovelus</i> DSMZ 1896	<i>B. theiaitaomicron</i> DSMZ 2079	<i>B. ovelus</i>	<i>B. ovelus</i>
Cepa	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697	DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1
Ampicilina	S	S	S	S	S				
sulfametoxazol + trimetoprima									
Gentamicina		S	S						
Tobramicina	S	S	S	S				SM	SM
Mezlocilina					S				
Cefotiam									
Cefotaxina									
Meropenem									
Ceftriaxon									
Cefuroxim	SM	SM	SM	SM					
Cefixim									
Tetraciclina	SM	SM	SM	ISM	SM				

Oxacilina																	
Eritromicina																	
Vancomicina																	
Ampicilina +																	
Linezolid																	
Piperacilina																	
Piperacilina + Tazobactam																	
Amikacina							S										
Ceftazidim							S										
Imipenem																	
Ritampicina								SM									
Ciprofloxacina									SM								
Fosfomicina							S										
Penicilina																	SM
Telcoplanina																	
Clindamicina																S	
Bacitracina																	
Neomicina	S						S										
Colistina	S						S										
Fucidinaur																	
Metronidazol																	

SM = sensibilidad media

S = Sensible