



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

**ESPAÑA** 



① Número de publicación: 2 686 313

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 22.08.2012 PCT/EP2012/066360

(87) Fecha y número de publicación internacional: 28.02.2013 WO13026887

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 22.08.2012 E 12753463 (4)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 15.08.2018 EP 2748302

(54) Título: Microorganismos que portan un antígeno tumoral

(30) Prioridad:

22.08.2011 EP 11178322 22.08.2011 US 201161526054 P

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 17.10.2018

(73) Titular/es:

GLYCOTOPE GMBH (100.0%) Robert-Rössle-Strasse 10 13125 Berlin, DE

(72) Inventor/es:

GOLETZ, STEFFEN; ULSEMER, PHILIPPE y TOUTOUNIAN, KAWE

74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

### **DESCRIPCIÓN**

Microorganismos que portan un antígeno tumoral

#### 5 Campo de la invención

10

15

20

35

40

50

55

60

65

La presente invención se refiere a microorganismos presentadores de antígeno. En particular, se proporcionan microorganismos de la especie *Bacteroides xylanisolvens* que portan el antígeno core-1 en su superficie. Además, la presente invención proporciona el uso de estos microorganismos en la medicina así como productos que contienen dichos microorganismos.

#### Antecedentes de la invención

La glicosilación aberrante es una característica típica de las células cancerosas. Los antígenos tumorales de carbohidratos en las glicoproteínas y glicolípidos son por lo tanto objetivos para la inmunoterapia activa y pasiva. Estos antígenos altamente abundantes se expresan de novo o se regulan positivamente debido a cambios en el aparato de glicosilación compleja de las células tumorales. Se describen diversos antígenos tumorales de carbohidratos unidos a lípidos o proteínas, por ejemplo, GM2, GD2, GD3, GM1 fucosilado, H Globo, Le<sup>y</sup> y las estructuras del núcleo de mucina Tn, Sialil-Tn y el antígeno de Thomson Friedenreich.

El antígeno Thomsen-Friedenreich (TF) es una estructura de carbohidratos conocida que se describe como un antígeno tumoral en una serie de informes. TF existe en dos formas, TF alfa y TF beta, que puede unirse a proteínas o glicolípidos.

Core-1 es el disacárido Gal-β1,3-GalNAc que en particular se une O-glicosídicamente en una configuración alfa anomérica a los hidroxiaminoácidos serina o treonina de proteínas en células de carcinoma. Core-1 corresponde a la estructura TF-alfa de Thomsen-Friedenreich y se une solo a proteínas en tumores. Por lo tanto, los términos core-1 y Thomsen-Friedenreich no se refieren necesariamente a estructuras idénticas.

Core-1 se enmascara por otros componentes de carbohidratos en los tejidos sanos y benignos pero se descubre en la mayoría de los carcinomas y en algunos tumores malignos no epiteliales. Por lo tanto, core-1 es un antígeno pancarcinoma específico.

Core-1 es un antígeno tumoral importante. Core-1 se expresa en más del 60 % de los carcinomas primarios de colon y en más del 90 % de las metástasis hepáticas de cáncer de colon así como en la mayoría de los carcinomas de otras indicaciones principales que incluyen el cáncer de mama, pulmón, ovario, próstata y otros cánceres gastrointestinales tales como los carcinomas pancreáticos y gástricos. Core-1 es un marcador de pronóstico independiente para pacientes con carcinomas de colon, la tasa de mortalidad aumenta y la supervivencia media disminuye de acuerdo con la intensidad creciente de la expresión de core-1. El desarrollo de metástasis hepáticas se correlaciona con la expresión de core-1. Los pacientes con carcinomas primarios positivos a core-1 desarrollan metástasis hepáticas en casi el 60 % de los casos, mientras que el riesgo de metástasis hepáticas con tumores core-1 negativos es significativamente menor (menos del 20 %). Además de mediar la metástasis en el hígado core-1 puede desempeñar, además, un papel en la metástasis a través del endotelio.

La especificidad pancarcinómica excepcionalmente alta, la relevancia pronóstica y la implicación directa en la metástasis hepática hacen que Thomsen-Friedenreich y particularmente core-1 sean un objetivo principal para la inmunoterapia del cáncer.

Como resultado de la amplia distribución de core-1, es ventajoso proporcionar un microorganismo positivo a core-1 que tenga una estructura de superficie celular correspondiente a core-1 que puede usarse como producto farmacéutico, por ejemplo, en la prevención y el tratamiento de cáncer, en particular para la vacunación.

Hubo intentos de proporcionar un enfoque de terapia basado en Thomsen-Friedenreich. Por ejemplo, Shigoeka y otros (1999) describen la inhibición de la metástasis hepática a partir de células Colon 26 tratadas con neuramidasa mediante un anticuerpo monoclonal específico anti Thomsen-Friedenreich en un modelo de ratón. Sin embargo, debido a las dificultades para generar anticuerpos anti TF altamente específicos y debido a su naturaleza como isotipos IgM con afinidades intrínsecas comparativamente más bajas de los dominios de unión única, los anticuerpos específicos para TF no se desarrollaron aún más hasta el momento. Además, algunos anticuerpos anti antígeno TF no son clínicamente útiles porque provocan la proliferación indeseable de células tumorales. Además, el documento WO 2006/012626 describe el uso terapéutico de anticuerpos anti antígeno TF. Se demostró que la unión de anticuerpos específicos para TF inhibe la proliferación de células tumorales (Jeschke y otros (2006)).

Además, también hubo intentos de desarrollar vacunas basadas en Thomsen-Friedenreich. La mayoría de ellos se enfocó en la inducción de respuestas de anticuerpos. Por ejemplo, Livingston y Lloyd (2000) utilizaron conjugados de TF no naturales, en donde el TF sintético se acopló aleatoriamente a KLH. Estos conjugados generaron una respuesta inmune humoral contra el TF sintético pero no contra el TF en ligandos naturales (Adluri y otros (1995)). Así, no eran específicos para TF porque no reconocerían TF en una estructura tumoral.

Springer y Desai usaron la vacunación con una vacuna de T/Tn compuesta por glicoproteínas derivadas de los glóbulos rojos de tipo O y MN que dieron como resultado una mejor supervivencia del paciente con cáncer de mama, aunque solo se produjeron pequeñas cantidades de IgM. Sin embargo, la IgM representa una respuesta inmune menos madura y muchos estudios previos relacionados con anticuerpos para TF-Ag implican anticuerpos IgM, por lo tanto, se necesitarían respuestas inmunes altamente específicas para TF más pronunciadas y, preferentemente, una respuesta de IgG.

Se conocen pocos informes que describen microorganismos supuestamente positivos para TF. Por ejemplo, Spring y otros (Brit J Haematol 47 (1981), 453-460; Transfusion 19 (1979), 233-249) informan sobre un microorganismo aerobio (E. coli 086) que puede generar una respuesta de anticuerpos policlonales en pollos y humanos que podría reconocer, además, TF en eritrocitos humanos. Springer usó adsorción de anti-T y ensayos de hemaglutinación con eritrocitos T tratados con sialidasa para determinar aproximadamente la especificidad de la respuesta inmune. Sin embargo, el tratamiento con sialidasa de los eritrocitos humanos da como resultado el desenmascaramiento de varios epítopos de carbohidratos, entre ellos pero no exclusivamente TF y en particular core-1. Por lo tanto, la reacción probada por Springer no muestra una especificidad para TF y en particular core-1 debido a reactividades cruzadas. Un microorganismo no específico respectivo solamente tiene una idoneidad limitada como vacuna debido a su inespecificidad ya que no generaría una respuesta inmune fuerte dirigida específicamente contra TF sino contra estructuras similares a TF y por lo tanto potencialmente también contra células o tejidos no tumorales del cuerpo. Además, las pruebas demostraron que E. coli 086 no es positiva para la expresión de core-1 porque no se une a anticuerpos específicos para core-1.

20 El documento WO 2008/055703 describe microorganismos positivos a core-1, en particular, microorganismos de la especie *Bacteroides ovatus* que expresa un antígeno core-1 en su superficie celular tal como AG6 y MU1 y su uso como productos farmacéuticos. La expresión de un antígeno core-1 se confirmó mediante la unión de anticuerpos específicos para core-1 a dichos microorganismos. Además, el documento WO 2008/055703 describe el uso de los microorganismos respectivos en la terapia.

Cuando se usan microorganismos positivos a core-1 como productos farmacéuticos, es deseable que el microorganismo positivo a core-1 no solo exprese un antígeno core-1, sino que el microorganismo muestre una alta expresión de antígeno core-1 para estimular de manera efectiva una respuesta inmune específica para core-1. Además, es deseable que el microorganismo positivo a core-1 que se elija para usar como fármaco tenga una alta expresión del antígeno core-1 estable y, preferentemente, homogénea. Una expresión del antígeno core-1 alta y estable, asegura que el producto que contiene el microorganismo positivo a core-1 exhiba menos variabilidad lo que es importante para la calidad del producto, en particular en el campo farmacéutico. Una expresión del antígeno core-1 alta y estable, es importante, además, para cumplir los requisitos reglamentarios.

Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar microorganismos alternativos positivos a core-1, en particular microorganismos que tienen una expresión del antígeno core-1 alta y estable en su superficie celular.

Breve descripción de la invención

5

10

15

25

30

Los presentes inventores encontraron microorganismos positivos a core-1 de la especie *Bacteroides xylanisolvens*. Un microorganismo es positivo a core-1 y por consiguiente, expresa un antígeno core-1 en su superficie, si un anticuerpo específico para core-1 después del contacto se une específicamente a dicho microorganismo.

Bacteroides xylanisolvens es una nueva especie del género Bacteroides, que se describió por primera vez por Chassard 45 y otros ("Bacteroides xylanisolvens sp. Nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces"; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2008); 58, 1008-1013). Es una bacteria que degrada el xilano que puede aislarse de las heces humanas y por lo tanto, es un microorganismo comensal humano. Es una bacteria con forma de bacilo Gram negativa que en general tiene una baja patogenicidad. Bacteroides xylanisolvens se depositó como DSM 18836 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) y está disponible al público desde allí. Bacteroides xylanisolvens (DSM 18836) no expresa un antígeno core-1, como 50 se demostró mediante experimentos con anticuerpos específicos para core-1. Dichos anticuerpos específicos para core-1 no reconocieron y por lo tanto no se unieron a Bacteroides xylanisolvens (DSM 18836) lo que demuestra que no expresa un antígeno core-1 y por lo tanto, no es positivo a core-1. Por lo tanto, fue muy sorprendente para los inventores que fueran capaces de identificar microorganismos positivos a core-1 de la especie Bacteroides xylanisolvens. Además, los 55 inventores descubrieron que los microorganismos positivos a core-1 de la especie Bacteroides xylanisolvens muestran un perfil de expresión del antígeno core-1 ventajoso, porque el antígeno core-1 se expresa no solo en altas cantidades, sino que la expresión es, además, muy estable y también homogénea. Como se discutió en la introducción, una expresión alta y estable del antígeno core-1 es una ventaja importante, en particular cuando se usa un microorganismo positivo a core-1 en el campo de los productos farmacéuticos. Por ejemplo, los productos fabricados con microorganismos que tienen una expresión de core-1 alta, estable y homogénea tienen un contenido alto y constante de core-1. Por lo tanto, se 60 necesitan menos microorganismos para producir un producto con el nivel deseado de core-1 y estos microorganismos proporcionan una calidad de producto constante y productos menos deficientes. Por lo tanto, debido a las características especiales con respecto a la expresión del antígeno core-1, el microorganismo positivo a core-1 de la presente invención es especialmente adecuado para su uso en el campo farmacéutico. Lo mismo se aplica a los lisados y/o fracciones de 65 dicho microorganismo positivos a core-1.

Por lo tanto, los microorganismos positivos a core-1 de la presente invención o los lisados o fracciones positivos a core-1 pueden usarse, por ejemplo, en la profilaxis y tratamiento de enfermedades asociadas con una expresión de core-1, en particular cáncer en donde las células cancerosas como, por ejemplo, las células tumorales expresan core-1. Cuando se administran a un paciente, los microorganismos positivos a core-1 de la presente invención o los lisados o fracciones positivos a core-1 de estos son capaces de estimular una respuesta inmune contra core-1 que después se vuelve, además, contra las células positivas a core-1 de la enfermedad. Debido al perfil de expresión del antígeno core-1 alto y estable, la respuesta inmune inducida y/o potenciada es muy fuerte. La expresión del antígeno core-1 alta y estable de los microorganismos de acuerdo con la invención proporciona, además, una expresión/actividad de core-1 constante sin variaciones significativas de lote a lote cuando se usa la misma cantidad de microorganismos positivos a core-1 de acuerdo con la presente invención o fracciones o lisados positivos a core-1 de estos. Esto mejora, además, la calidad de los productos finales, respectivamente conduce a productos menos deficientes, porque los microorganismos de la presente invención tienen una expresión del antígeno core-1 estable y alta y en consecuencia, proporcionan una cantidad bastante constante del antígeno core-1. La cantidad alta y homogénea del antígeno core-1 que proporciona el microorganismo de acuerdo con la presente invención permite, además, reducir la cantidad de microorganismos necesarios para provocar una respuesta inmune.

Además, los microorganismos de acuerdo con la presente invención no tienen patogenicidad y por lo tanto, pueden administrarse sin un alto riesgo de causar efectos secundarios adversos, en particular cuando se administran a seres humanos. Adicionalmente, debido a la baja patogenicidad, no existen restricciones serias para la fabricación, distribución y comercialización de los microorganismos de acuerdo con la presente invención mediante las reglamentaciones legales. que de esta manera pueden cumplirse con poco esfuerzo. En particular, los microorganismos Bacteroides xylanisolvens se clasifican como agentes biológicos del grupo de riesgo 1 de acuerdo con la Directiva Europea 2000/54/EC y la "Biostoffverordnung" alemana. El grupo de riesgo 1 es el más bajo de los cuatro grupos de riesgo y se refiere a los agentes biológicos que es poco probable que causen enfermedades en humanos. Muchos otros microorganismos, que incluyen, además, microorganismos de otras especies de Bacteroides se clasifican en grupos de mayor riesgo (por ejemplo, Bacteroides ovatus es un agente biológico del grupo de riesgo 2). Adicionalmente, como se demuestra en los ejemplos los microorganismos de acuerdo con la presente invención en particular son negativos a material de ADN plasmídico, a los factores de virulencia más importantes y a la mayoría de las enzimas extracelulares y factores patogénicos más relevantes, y no se unen a las células epiteliales del colon humano. Además, los microorganismos de acuerdo con la presente invención no mostraron efectos adversos en estudios toxicológicos en ratones y ningún efecto adverso de cualquier naturaleza en seres humanos al tomar dosis diarias de hasta 8,5\*1011 CTC1 durante tres semanas. Así, los microorganismos de acuerdo con la presente invención cumplen un estándar de seguridad muy alto y pueden consumirse por humanos sin riesgo de efectos secundarios no deseados. Además, los microorganismos de acuerdo con la presente invención son, preferentemente, sensibles a diversos antibióticos y, por lo tanto, pueden eliminarse fácil y efectivamente, si es necesario.

Adicionalmente, la expresión de core-1 estable y homogénea de los microorganismos de acuerdo con la invención puede usarse como marcador para la calidad del producto. Dado que los microorganismos naturales, en particular los microorganismos que no se desean en los productos finales, generalmente no expresan core-1, el contenido de core-1 puede usarse como marcador específico para los microorganismos deseados de acuerdo con la presente invención. En particular, el contenido de core-1 puede usarse como marcador para la homogeneidad de cultivos de microorganismos que contienen el microorganismo de acuerdo con la presente invención, y/o puede usarse como marcador para la cantidad de microorganismos de acuerdo con la presente invención en un cultivo. Además, en comparación con otros microorganismos positivos a core-1, la producción de los microorganismos de acuerdo con la presente invención que tienen una expresión alta, estable y homogénea de core-1 se mejora ya que se obtienen cantidades suficientes de microorganismos positivos a core-1 en menor tiempo y con menos etapas de cultivo. Además, no son necesarias etapas de producción para el enriquecimiento de microorganismos positivos a core-1. En particular, la producción de los microorganismos positivos a core-1 de acuerdo con la presente invención puede realizarse mediante el uso de un cultivo por lotes simple sin una fase de alimentación o mediante el uso de solo una fase de alimentación.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo positivo a core-1 de la especie *Bacteroides xylanisolvens* o un lisado positivo a core-1, en donde dicho microorganismo o lisado de este se reconoce por al menos un anticuerpo específico para core-1; en donde dicho microorganismo positivo a core-1 es de la cepa DSM 25004 (Coreóticos), o un microorganismo derivado de esta, en donde el microorganismo derivado de la cepa DSM 25004 tiene las siguientes características:

a) pertenece a la especie Bacteroides xylanisolvens; y

10

15

20

25

30

35

40

45

50

- b) en un cultivo celular de dicho microorganismo, al menos el 80 % de los microorganismos tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 80 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de la cepa DSM 25004.
- En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende microorganismos positivos a core-1 o un lisado de este positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. De acuerdo con una modalidad, dicha composición es un cultivo celular.
- En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el microorganismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención o la composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención para su uso en la medicina.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un microorganismo positivo a core-1 o un lisado de este positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la invención y/o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

- 5 De acuerdo con un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar un producto positivo a core-1, que comprende las siguientes etapas:
  - a) proporcionar un microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención;
  - b) tratar opcionalmente dicho microorganismo positivo a core-1 con el fin de obtener un lisado o fracción de este positivo a core-1;
- 10 c) usar dicho microorganismo positivo a core-1 y/o dicho lisado o fracción de este positivo a core-1 en la fabricación del producto positivo a core-1.
  - Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción y ejemplos específicos, que indican modalidades preferidas de la aplicación, se dan a modo de ilustración solamente.

#### Descripción detallada

- Los presentes inventores encontraron microorganismos positivos a core-1 de la especie *Bacteroides xylanisolvens*. Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo positivo a core-1 de la especie *Bacteroides xylanisolvens* o a un lisado de este positivo core-1, en donde dicho microorganismo o lisado de este se reconoce por al menos un anticuerpo específico para core-1; en donde dicho microorganismo positivo a core-1 es de la cepa DSM 25004 (Coreóticos), o un microorganismo derivado de esta, en donde el microorganismo derivado de la cepa DSM 25004 tiene las siguientes características:
- a) pertenece a la especie *Bacteroides xylanisolvens*; y
  b) en un cultivo celular de dicho microorganismo, al menos el 80 % de los microorganismos tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 80 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de la cepa DSM 25004.
- Como se discutió anteriormente, se encontró sorprendentemente que existen microorganismos de la especie *Bacteroides xylanisolvens* que expresan un antígeno core-1 y, además, que estos microorganismos muestran un perfil de expresión del antígeno core-1 ventajoso en el sentido de que muestran una expresión alta y estable del antígeno core-1 que, por ejemplo, no se logra por microorganismos positivos a core-1 de otras especies de Bacteroides, tales como, por ejemplo, *Bacteroides ovatus*.
- 35 El microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención porta un antígeno core-1. El término "antígeno core-1", como se usa en la presente descripción en particular se refiere a un antígeno que se reconoce y por lo tanto se une específicamente por un anticuerpo específico para core-1. La unión por un anticuerpo específico para core-1 puede probarse mediante la puesta en contacto del anticuerpo específico para core-1 en condiciones de enlace apropiadas con el antígeno core-1, respectivamente el microorganismo que porta el antígeno core-1 y/o el lisado o fracción de este que 40 porta el antígeno core-1. Los anticuerpos específicos para core-1 adecuados se conocen en la técnica anterior (ver, por ejemplo, el documento WO 2008/055703) y, además, se describen en la presente descripción. Preferentemente, el antígeno core-1 del microorganismo de acuerdo con la presente invención se une por al menos dos anticuerpos específicos para core-1, en donde cada uno de dichos anticuerpos específicos para core-1 reconoce diferentes epítopos del antígeno core-1. Preferentemente, el antígeno core-1 está presente en la superficie del microorganismo de acuerdo con la presente invención en una forma expuesta. Expuesto en particular significa que el antígeno core-1 es accesible 45 desde el medio circundante y por lo tanto, puede unirse a un anticuerpo específico para core-1 después del contacto. Un antígeno core-1 expuesto, por ejemplo, no se incrusta y por lo tanto enmascara por otras estructuras, en particular otras estructuras de carbohidratos. El antígeno core-1 que está presente en el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención no es necesariamente idéntico al core-1 natural que se encuentra en proteínas en tumores (para 50 una descripción del core-1 natural, ver más arriba). Para la presente invención, solo es decisivo que el antígeno core-1 en el microorganismo de acuerdo con la presente invención se una por un anticuerpo específico para core-1 porque esto asegura que dicho antígeno core-1 es capaz de imitar la estructura core-1, por lo tanto, es capaz de estimular una respuesta inmune específica contra core-1. Preferentemente, el antígeno core-1 del microorganismo de acuerdo con la presente invención es o comprende una estructura de carbohidrato. De acuerdo con una modalidad preferida, el antígeno 55 core-1 expresado por el microorganismo de acuerdo con la presente invención comprende la estructura de disacárido de core-1 Gal-beta1,3-GalNAc. El antígeno core-1 se enlaza habitualmente a una estructura principal, preferentemente, una estructura de sacárido, en particular una estructura de oligo o polisacárido. Preferentemente, el enlace entre la estructura de disacárido de core-1 Gal-beta1,3-GalNAc y la estructura de la cadena principal es alfa anomérico. Beta-anomérico es otra opción. Preferentemente, es un enlace glicosídico. El enlace glicosídico (preferentemente, alfa-anomérico) puede, por ejemplo, establecerse entre la estructura Gal-beta1,3-GalNAc del antígeno core-1 y una molécula GalNAc de la 60 estructura de la cadena principal. De acuerdo con una modalidad preferida, el antígeno core-1 está presente dentro de la estructura de ramificación de los polisacáridos capsulares del microorganismo de acuerdo con la presente invención.
- De acuerdo con la presente invención, un microorganismo de la especie *Bacteroides xylanisolvens* en particular se refiere a un microorganismo que pertenece al género Bacteroides y que, preferentemente, tiene una o más de las siguientes características:

- a) en un ensayo de hibridación ADN-ADN, muestra una relación ADN-ADN de al menos 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o al menos 99 % con el *Bacteroides xylanisolvens* depositado como DSM 18836 o DSM 25004;
- b) muestra un nivel de similitud de la secuencia del gen del ARNr 16S de al menos 95 %, preferentemente, al menos 97 %, al menos 98 %, preferentemente, al menos 99 %, con mayor preferencia al menos 99,5 % con el *Bacteroides xylanisolvens* depositado como DSM 18836 o DSM 25004;
  - c) tiene una o más de las siguientes características:
  - i) como el Bacteroides xylanisolvens depositado como DSM 18836, no puede degradar el almidón;
- ii) tiene la capacidad de usar y/o metabolizar manitol, en particular D-manitol, melecitosa y/o sorbitol, en particular D-sorbitol, y/o para producir ácido a partir de glicerol;
- iii) expresa una actividad arilamidasa ácido glutámico glutamilo;
- iv) no puede producir indol;
- v) no muestra actividad de catalasa; y/o
- d) tiene una o más de las siguientes características:
- i) es un microorganismo anaeróbico;
  - ii) no forma esporas;
  - iii) no es móvil; y/o

10

55

60

65

- iv) es Gram negativo.
- Preferentemente, se cumplen al menos dos o al menos tres, y con mayor preferencia todos los criterios definidos anteriormente del a) al d).
- El término "relación ADN-ADN" en particular se refiere al porcentaje de similitud del ADN genómico o entero de dos microorganismos que se midió por el ensayo de renaturalización / hibridación ADN-ADN de acuerdo con De Ley y otros (1970) Eur. J Biochem. 12, 133-142 o Huß y otros (1983) Syst. Appl. Microbiol. 4, 184-192. En particular, el ensayo de hibridación ADN-ADN se realiza, preferentemente, por el Servicio de identificación DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania). En una modalidad, el ensayo de hibridación ADN-ADN se realiza como se describe en el ejemplo 1.3, a continuación.
- 30 El término "similitud de secuencia del gen del ARNr 16S" se refiere en particular al porcentaje de nucleótidos idénticos entre una región de la secuencia de ácido nucleico del gen del ARN ribosómico 16S (ARNr) de un primer microorganismo y la región correspondiente de la secuencia de ácido nucleico del gen del ARNr 16S de un segundo microorganismo. Preferentemente, la región comprende al menos 100 nucleótidos consecutivos, con mayor preferencia al menos 200 nucleótidos consecutivos, al menos 300 nucleótidos consecutivos o al menos 400 nucleótidos consecutivos, con la máxima preferencia aproximadamente 480 nucleótidos consecutivos. En una modalidad, la región de la secuencia de ácido nucleico del gen del ARNr 16S se flanquea por las secuencias de sec. con núm. de ident. núm.: 20 y 21 o sus secuencias complementarias, respectivamente.
- El término "nivel de expresión de core-1" como se usa en la presente descripción en particular se refiere a la cantidad de 40 antígenos core-1 presentes en el microorganismo de acuerdo con la presente invención y en particular se refiere a la cantidad de antígenos core-1 en la superficie de dicho microorganismo. La expresión del antígeno core-1 puede determinarse, por ejemplo, por la unión de anticuerpos específicos para core-1 (tales como, por ejemplo, Nemod-TF1 y/o Nemod-TF2 (Glycotope GmbH, Berlín); otros anticuerpos específicos para core-1 adecuados se describen a continuación) y mediante la medición de la cantidad de anticuerpos unidos, en particular mediante el uso de un método de ELISA, por 45 ejemplo, un método como se describe en la presente descripción en el ejemplo 2. Cuanto más anticuerpo se una a core-1, mayor será la expresión de core-1. Generalmente, el nivel de expresión del antígeno core-1 se determina mediante el uso de un número definido de células/microorganismos. En particular, en caso de que dos o más niveles de expresión se comparen entre sí, un número similar de células/microorganismos se usa para determinar cada nivel de expresión o los niveles de expresión se ajustan al mismo número de células/microorganismos matemáticamente. Además, cuando se 50 comparan los niveles de expresión de core-1 de diferentes muestras, los microorganismos en estas muestras, preferentemente, se cultivaron en condiciones similares y en particular en condiciones idénticas. Por ejemplo, los microorganismos Bacteroides tales como Bacteroides xylanisolvens y en particular los microorganismos de acuerdo con la invención se cultivan en medio Wilkins-Chalgren (WC) (Oxoid Ltd., Reino Unido) en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante la noche.

El nivel medio de expresión del antígeno core-1 se determina, preferentemente, mediante la siembra en placa de una muestra de un cultivo, la selección de colonias individuales después de la incubación y la determinación del nivel de expresión del antígeno core-1 de las colonias seleccionadas. Por ejemplo, la expresión promedio del antígeno core-1 puede determinarse mediante la selección aleatoria de 10 colonias del cultivo en placa, la determinación del nivel de expresión de core-1 para cada colonia (ver arriba), la suma de los valores obtenidos y la división de los valores sumados por 10. El nivel promedio de expresión de core-1 puede determinarse correspondientemente, además, mediante la medición del nivel de expresión de una o más muestras de uno o más cultivos sin antes sembrar en placas y seleccionar una colonia individual. En este caso, por ejemplo, varias muestras de un cultivo o una muestra de cada uno de varios cultivos que comprenden los microorganismos a analizar, en donde dichas muestras deben contener aproximadamente la misma cantidad de células/microorganismos, se analizan y se determina el nivel de expresión del antígeno core-1 de estas muestras, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo ELISA como se describe en la presente descripción. A partir

de los valores individuales obtenidos, se determina el valor promedio. El nivel de expresión del antígeno core-1 se determina, preferentemente, mediante el uso de un ensayo ELISA. En el ejemplo 2 se describe una prueba ELISA adecuada para determinar la expresión del antígeno core-1. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención alcanza, preferentemente, un valor de absorbancia promedio de al menos 0,2, al menos 0,25, preferentemente, al menos 0,3 y con mayor preferencia al menos 0,35 en un ensayo ELISA, mediante el uso de al menos un anticuerpo específico para core-1, cuando se realiza un ensayo ELISA como se describe en el ejemplo 2, a continuación. Un microorganismo positivo a core-1 que tiene un respectivo nivel de expresión del antígeno core-1 alto es ventajoso ya que es capaz de inducir una respuesta inmune fuerte.

Además, el microorganismo de acuerdo con la invención exhibe, preferentemente, una expresión promedio del antígeno core-1 en su superficie que es de al menos el 80 %, al menos 85 %, preferentemente, al menos 90 %, con la máxima preferencia al menos 95 % de la expresión promedio de core-1 de los Coreóticos (DSM 25004) cuando se cultivan en las mismas condiciones.

Como se discutió anteriormente, el microorganismo de acuerdo con la presente invención se caracteriza en particular por una expresión estable del antígeno core-1. Preferentemente, se alcanzan los siguientes grados de estabilidad. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, en un cultivo del microorganismo de acuerdo con la presente invención, al menos el 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, preferentemente, al menos 90 % y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, con mayor preferencia al menos 75 % y con la máxima preferencia al menos 80 % del nivel de expresión promedio de core-1 de todos los microorganismos de acuerdo con la invención en dicho cultivo celular. Preferentemente, al menos el 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención en el cultivo tienen un nivel de expresión de core-1 que es al menos el 75 %, preferentemente, al menos el 80 % del nivel de expresión promedio de core-1 de todos los microorganismos de acuerdo con la invención en el cultivo. En esencia, solo un pequeño número de los microorganismos en el cultivo no muestra una expresión significativa del antígeno core-1. Al menos el 80 %, preferentemente, al menos 85 %, al menos 90 % y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención en el cultivo tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 80 % del nivel de expresión promedio de core-1 de los Coreóticos depositados como DSM 25004. Preferentemente, al menos el 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención en el cultivo tienen un nivel de expresión de core-1 que es al menos del 75 %, preferentemente, al menos 80 % del nivel de expresión promedio de core-1 de los Coreóticos depositados como DSM 25004. El nivel de expresión de core-1, respectivamente la estabilidad de la expresión de core-1 de un microorganismo en un cultivo puede determinarse, por ejemplo, mediante la colocación de una muestra del cultivo, la selección de colonias individuales después de la incubación y la determinación del nivel de expresión de core-1 de las colonias seleccionadas. En particular, si, por ejemplo, al menos el 90 % de los microorganismos del cultivo debe tener un nivel de expresión específico, entonces al menos 9 de cada 10 colonias analizadas como se describió anteriormente tendrán el nivel de expresión especificado. Los niveles de expresión de core-1 de diferentes clones o cultivos se determinan, preferentemente, en condiciones similares, con mayor preferencia en condiciones idénticas. En particular, los diferentes clones o cultivos se cultivan, preferentemente, en condiciones similares o idénticas, por ejemplo, como se describió anteriormente.

Además, el microorganismo de acuerdo con la presente invención se caracteriza, además, por una expresión homogénea del antígeno core-1. Preferentemente, se alcanzan los siguientes grados de homogeneidad. En un cultivo celular, preferentemente, al menos el 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, preferentemente, al menos 90 % y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención en dicho cultivo celular tiene un nivel de expresión del antígeno core-1 que está en el intervalo de 60 % a 150 %, de 70 % a 140 %, preferentemente, de 70 % a 130 %, de 75 % a 125 %, de 80 % a 120 %, o de 85 % a 115 %, y lo con la máxima preferencia de 90 % a 110 % del nivel de expresión promedio del antígeno core-1 de todos los microorganismos de acuerdo con la invención en dicho cultivo celular. En particular, al menos el 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención en dicho cultivo celular tienen un nivel de expresión de core-1 que está en el intervalo de 75 % a 125 %, preferentemente, de 80 % a 125 % del nivel de expresión promedio de core-1 de todos los microorganismos de acuerdo con la invención en el cultivo. En esencia, solo un pequeño número de los microorganismos en el cultivo muestran una expresión del antígeno core-1 que varía mucho de la expresión promedio de core-1 en el cultivo. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, al menos el 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, preferentemente, al menos 90 % y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención en dicho cultivo tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que está en el intervalo de 60 % a 150 %, de 70 % a 140 %, preferentemente, de 70 % a 130 %, de 75 % a 125 %, de 80 % a 120 %, o de 85 % a 115 %, y con la máxima preferencia de 90 % a 110 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de los Coreóticos depositados como DSM 25004. Preferentemente, al menos el 95 % de los microorganismos de acuerdo con la invención en dicho cultivo celular tienen un nivel de expresión de core-1 que está en el intervalo de 75 % a 125 %, preferentemente, 80 % a 125 % de la expresión promedio del nivel de expresión promedio de core-1 de los Coreóticos depositados como DSM 25004. La homogeneidad se determina, preferentemente, como se describió anteriormente con respecto a la expresión estable del antígeno core-1.

El nivel de expresión del antígeno core-1 se determina, preferentemente, como se describió anteriormente.

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

De acuerdo con una modalidad, el antígeno core-1 del microorganismo de acuerdo con la presente invención comprende al menos una estructura de carbohidrato seleccionada del grupo que consiste en las estructuras núm. 1, núm. 2, núm. 3, núm. 4 y núm. 5 de la figura 4, estructuras análogas de estas, y/o unidades repetidas de estas. Dichas estructuras análogas comprenden la estructura de carbohidratos de core-1 Galβ1,3-GalNAc y, preferentemente, consisten en el mismo número y en particular el mismo tipo y/o posicionamiento de las unidades de monosacáridos de las estructuras núm. 1, núm. 2, núm. 3, núm. 4 y núm. 5 de la figura núm. 4. Sin embargo, las estructuras análogas pueden diferir en particular de las estructuras núm. 1, núm. 2, núm. 3, núm. 4 y núm. 5 de la figura 4 en los enlaces (enlaces anoméricos alfa o beta, posición del enlace) y modificaciones (metilación, acetilación) de las unidades de monosacáridos. Estas estructuras análogas en particular incluyen estructuras idénticas a las de la figura 4, excepto que el disacárido Galβ1,3-GalNAc se une a través de un enlace alfa o beta a la posición 3 o 4 de la unidad de monosacáridos de la estructura sacárida restante y/o que una o más de las unidades de fucosa pueden metilarse (no necesariamente la tercera unidad de fucosa como se muestra en la figura 4). Preferentemente, las estructuras análogas de las estructuras de la figura 4 tienen la siguiente fórmula:

15 L-Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ (3/4)-L-Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ (3/4)-L-Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ (3/4)-(D-Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-D-GalNAc( $\alpha$ / $\beta$ )1 $\rightarrow$ (3/4))-D-HexNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ (3/4)-D-Hex

en donde las unidades de hexosa (Hex y HexNAc) son, preferentemente, unidades de galactosa (Gal y GalNAc, respectivamente), y en donde una o más de las unidades de fucosa pueden metilarse.

De acuerdo con una modalidad, dicho antígeno core-1 comprende la estructura de carbohidratos de core-1 Galbeta 1,3-GalNAc que se enlaza, preferentemente, en una configuración anomérica alfa a una estructura principal, preferentemente, una estructura de carbohidratos. Sin embargo, la estructura Galbeta 1,3-GalNAc puede unirse alternativamente en una configuración anomérica beta a la estructura de la cadena principal. Preferentemente, la estructura de carbohidratos de core-1 Galbeta 1,3-GalNAc está presente como un componente de ramificación dentro de una unidad repetitiva de un oligo o polisacárido. Esta presentación expuesta del antígeno core-1 en el microorganismo de acuerdo con la presente invención tiene efectos ventajosos sobre la respuesta inmune inducida.

Como el microorganismo de acuerdo con la presente invención expresa un antígeno core-1 en su superficie celular, se reconoce y por lo tanto se une por al menos un anticuerpo específico para core-1 si dicho anticuerpo específico para core-1 se pone en contacto con el microorganismo positivo a core-1 en condiciones de unión apropiadas. La unión puede probarse, por ejemplo, mediante el uso de una prueba ELISA. Las condiciones de unión adecuadas se describen, por ejemplo, en el ejemplo 2.

Los anticuerpos específicos para core-1 se describen y definen en el documento WO 2008/055703 y el documento WO 2004/050707. Los anticuerpos específicos para core-1 en particular se unen específicamente a core-1, que en particular es el disacárido Gal-β1,3-GalNAc que está unido O-glicosídicamente en una configuración anomérica alfa a los hidroxiaminoácidos serina o treonina de proteínas en las células de los carcinomas. El término anticuerpo específico para core-1 en particular se refiere a un anticuerpo que reconoce core-1 solamente, o, con menor preferencia, que reconoce core-1 y nuclear-2(Galbeta1-3(GlcNAcbeta1-6)GalNAcalfa). Los anticuerpos específicos para core-1, preferentemente, no exhiben ninguna reactividad cruzada con otros derivados y anómeros de dichas estructuras de carbohidratos tales como los dados en el Ejemplo 7 del documento WO 2004/050707 bajo las condiciones vinculantes descritas en esta. Un anticuerpo específico para core-1 como se usa en la presente descripción en particular se une específicamente a Galβ1-3GalNAcα1-poliacrilamida (TFα-PAA, TFa-PAA, TFalfa-PAA, Core-1-PAA) pero no a ninguna de las sustancias de la lista núm. 1:

### Lista núm. 1

50

55

60

65

10

20

25

- GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcα-PAA (GlcNAcβ1-2' TF)
- Fucα1-2Galβ1-3GalNAcα-PAA (H tipo 3)
- GalNAcα1-3Galβ-PAA (A<sub>di</sub>)
- Galα1-3-GalNAcβ-PAA (T<sub>alfaβ</sub>)

que puede obtenerse, por ejemplo, de Lectinity holdings, Inc. Alternativamente, todas las estructuras pueden generarse por un experto en la técnica, que puede seleccionar, además, otra poliacrilamida adecuada para la conjugación u otra molécula portadora adecuada así como los métodos de conjugación adecuados para el acoplamiento de las estructuras de carbohidratos correspondientes y la síntesis de los productos intermedios necesarios.

Preferentemente, dicho anticuerpo específico para core-1 tiene una o más de las siguientes características:

- a) se une a asialoglicoforina (que porta core-1) pero no a la glicoforina (que no porta core-1), y esta unión es, preferentemente, sensible al peryodato;
- b) se une a TF*alfa*-PAA y menos o nada a TF*beta*-PAA (Gal*beta*1-3GalNAc*beta*1-poliacrilamida) y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y esta unión es, preferentemente, sensible a peryodato;
- c) se une a TF*alfa*-PAA y menos o nada a TF*beta*-PAA y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y que se une a al menos a una línea de células tumorales humanas de NM-D4 [DSM ACC2605], NM-F9 [DSM ACC2606], y con lo cual la unión es, preferentemente, sensible a peryodato; y/o

d) tiene una o más de las características de unión de la a) a la c) pero no se une al trisacárido nuclear-2 acoplado a PAA, tal como, por ejemplo, NEMOD-TF1.

Preferentemente, se cumplen al menos dos, con mayor preferencia al menos tres, con la máxima preferencia todos los criterios definidos anteriormente del a) al d).

Dicho anticuerpo específico para core-1 puede ser un anticuerpo completo de cualquier animal o ser humano tal como un anticuerpo murino, de rata, humano, camello, humanizado o quimérico de diferentes clases de anticuerpos tales como, pero sin limitarse a IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD o cualquier fragmento de un anticuerpo, siempre que comprenda la especificidad de unión contra core-1, como Fab, F(ab)2, Fv de cadena simple o anticuerpos de dominio único. Esos anticuerpos pueden contener, además, al menos un aminoácido adicional o mutaciones o secuencias polipeptídicas, tales como etiquetas, enlazadores o dominios de multimerización y pueden originarse, además, a partir de otras fuentes que no sean animales, tales como plantas y tales como por selección de bibliotecas de anticuerpos sintéticos que usan, por ejemplo, visualización en fagos o visualización en ribosomas o mediante construcción recombinante. El término "anticuerpo" incluye, además, anticuerpos tales como anticuerpos de cadena pesada, es decir, anticuerpos solo compuestos de una o más, en particular dos cadenas pesadas, y nanoanticuerpos, es decir, anticuerpos solo compuestos de un solo dominio variable monomérico, así como fragmentos o derivados de un anticuerpo.

"Unión específica", preferentemente, significa que el anticuerpo se une más fuerte a un objetivo tal como un epítopo para el cual es específico (aquí: core-1) en comparación con la unión a otro objetivo. Un agente se enlaza más fuertemente a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se enlaza al primer objetivo con una constante de disociación (KD) que es menor que la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferentemente, la constante de disociación (KD) para el objetivo al cual se une el agente es más de 2 veces, preferentemente, más de 5 veces, con mayor preferencia más de 10 veces, aún con mayor preferencia más de 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces menor que la constante de disociación (KD) para el objetivo al cual el agente no se une específicamente. Preferentemente, la constante de disociación para el objetivo, aquí core-1, está en el intervalo µM o nM. En modalidades preferidas, la constante de disociación de la unión del anticuerpo a su objetivo específico, aquí core-1, es 10 µM o menos, preferentemente, 5 µM o menos, 2 µM o menos, o 1 µM o menos, con mayor preferencia 500 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, o 20 nM o menos, y con la máxima preferencia 10 nM o menos. La constante de disociación, preferentemente, se determina en condiciones estándar, por ejemplo, a 20 °C o temperatura ambiente y condiciones de tampón fisiológicas, por ejemplo, en solución salina o en una solución acuosa que contenga NaCl 150 mM y Tris 10 mM/HCl pH 7.

Los anticuerpos de unión a core-1 adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO2004/050707 y el documento WO 2008/055703. Ejemplos son HB-T1 (IgM) [obtenible de DakoCytomation GmbH, Hamburg; Giuffre G, 35 Vitarelli E, Tuccari G, Ponz de Leon M, Barresi G: Detection of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Virchows Arch 429:345-352 (1996)], HH8 (IgM) [Clausen H, Stroud M, Parker J, Springer G, Hakomori S: Monoclonal antibodies directed to the blood group A associated structure, galactosyl-A: specificity and relation to the Thomsen-Friedenreich antigen. Mol Immunol 25:199-204 (1988)], Nemod-TF1 [Glycotope GmbH, Berlín; Goletz S, Cao Y, 40 Danielczyk A, Ravn P, Schoeber U, Karsten U. Thomsen-Friedenreich antigen: the "hidden" tumor antigen. Adv Exp Med Biol. 2003;535: 147-62], y 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].

Particularmente adecuado para determinar que un microorganismo es positivo a core-1 y/o para determinar el nivel de expresión del antígeno core-1 es el uso de los anticuerpos mlgM-Karo2, mlgM-Karo4, clgG-Karo4 y/o clgM-Karo4 descrito en las páginas de la 16 a la 18 del listado de secuencias del documento WO2004/050707, o el uso de anticuerpos que tienen una especificidad y afinidad de unión correspondiente. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención o el lisado o fracción de este positivo a core-1 se une por un anticuerpo específico para core-1 que comprende uno de los siguientes conjuntos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

#### Conjunto 1:

5

10

15

20

25

30

45

50

60

65

```
CDR de cadena sec. con núm. de ident.: 1 (CDR-H1); sec. con núm. de ident.: 2 (CDR-H2);
                  pesada:
                                    sec. con núm. de ident.: 3 (CDR-H3); y
55
                  CDR de cadena sec. con núm. de ident.: 4 (CDR-L1); sec. con núm. de ident.: 5 (CDR-L2);
                                    sec. con núm. de ident.: 6 (CDR-L3)
                  ligera:
```

### Conjunto 2:

CDR de cadena sec. con núm. de ident.: 7 (CDR-H1); sec. con núm. de ident.: 8 (CDR-H2); pesada: sec. con núm. de ident .: 9 (CDR-H3); y CDR de cadena sec. con núm. de ident.: 10 (CDR-L1); sec. con núm. de ident.: 11 (CDR-L2); sec. con núm. de ident.: 12 (CDR-L3) ligera:

El anticuerpo que tiene el Conjunto 1 de CDR como se definió anteriormente comprende, preferentemente, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 13 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 16, o una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 14 o 15 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 17. El anticuerpo que tiene el conjunto 2 de CDR como se definió anteriormente comprende, preferentemente, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 18 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 19.

Los anticuerpos específicos para core-1 particularmente adecuados comercialmente disponibles son, por ejemplo, Nemod-TF1 y Nemod-TF2 (disponibles en Glycotope GmbH, Berlín). Estos anticuerpos son altamente específicos para core-1.

15

20

25

30

35

40

55

60

65

Los anticuerpos que comprenden el conjunto 1 de CDR y los anticuerpos que comprenden el conjunto 2 de CDR son ambos específicos para core-1, sin embargo, estos anticuerpos se unen a core-1 desde dos ángulos diferentes y se unen así a diferentes epítopos. Similarmente, también Nemod-TF1 y Nemod-TF2 se unen específicamente a la estructura de carbohidratos de core-1 pero se unen a diferentes epítopos. La unión del microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención o del lisado o fracción de este positivo a core-1 por al menos dos anticuerpos específicos para core-1 diferentes que reconocen diferentes epítopos en la estructura de carbohidratos de core-1 asegura que el antígeno core-1 está presente en una forma expuesta y accesible en la superficie de la célula. Así, de acuerdo con una modalidad, el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención o el lisado o fracción de este positivo a core-1 se une por un anticuerpo que tiene el conjunto 1 de CDR como se definió anteriormente así como por un anticuerpo que tiene el conjunto 2 de CDR como se define anteriormente y/o el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención o el lisado o fracción de este positivo a core-1 se une por Nemod-TF1 y Nemod-TF2.

De acuerdo con una modalidad, el microorganismo de acuerdo con la presente invención no se une por el anticuerpo A68-B/A11 (Glycotope, Berlín) que une TFbeta. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, la unión del al menos un anticuerpo específico para core-1 al microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención o al lisado o fracción de este positivo a core-1 es sensible al peryodato, ya que la unión del anticuerpo específico para core-1 se reduce o incluso está ausente después del tratamiento con peryodato. Un tratamiento con peryodato conduce a la degradación parcial de los restos de carbohidratos en la superficie. Así, con un microorganismo positivo a core-1 que porta el antígeno core-1 en una forma expuesta y por lo tanto no oculta (no enmascarada), el tratamiento con peryodato destruye la estructura de los antígenos core-1 presentes en la superficie celular que resulta en que los anticuerpos específicos para core-1 ya no pueden unirse después del tratamiento con peryodato porque el antígeno core-1 ya no está presente, respectivamente intacto. Por otro lado, los microorganismos que no portan un antígeno core-1, en particular un antígeno de carbohidratos core-1, sino que simplemente portan antígenos de carbohidratos de core-1 en los que el antígeno core-1, por ejemplo, se enmascara por unidades sacáridas adicionales y que, en consecuencia, no se unen por anticuerpos específicos para core-1 sin un tratamiento previo, pueden revelar un antígeno core-1 después del tratamiento con peryodato. La unión del al menos un anticuerpo específico para core-1 al microorganismo de acuerdo con la presente invención, preferentemente, es sensible a peryodato, es decir, un tratamiento con peryodato da como resultado que el anticuerpo específico para core-1 ya no se une al microorganismo tratado con pervodato o muestra al menos una unión reducida después del tratamiento con peryodato. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, el lisado o fracción del microorganismo de acuerdo con la presente invención tiene las mismas características.

Un tratamiento de peryodato en particular se refiere a la exposición del material a tratar a una solución que contiene peryodato a una concentración efectiva para al menos la oxidación parcial de unidades de sacárido. Por ejemplo, un tratamiento con peryodato puede efectuarse mediante la incubación del material a tratar durante 5 minutos en una solución de tampón de acetato de sodio 50 mM seguido de una incubación durante 1 hora en una solución de peryodato de sodio 10 mM. Después de lavar nuevamente con una solución de tampón de acetato de sodio 50 mM, la acción del peryodato se detiene mediante incubación durante 30 minutos en la oscuridad en una solución de borohidruro de sodio 50 mM.

Además, el antígeno core-1 en la superficie del microorganismo de acuerdo con la presente invención o el lisado o fracción de este es, preferentemente, accesible desde el medio circundante, en particular es accesible para un anticuerpo específico para core-1 en el medio circundante y por lo tanto se expone en la superficie de la célula.

El microorganismo de acuerdo con la invención en particular es un microorganismo aislado que, preferentemente, no está presente en su entorno natural. En particular, el microorganismo no está presente dentro del cuerpo humano, preferentemente, no está presente dentro de un cuerpo humano o animal. De acuerdo con una modalidad, el microorganismo de acuerdo con la invención se aisló a partir de una composición que comprende microorganismos que no son positivos a core-1 y/o que no pertenecen a la especie *Bacteroides xylanisolvens*. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, el microorganismo de acuerdo con la presente invención está presente en, o se obtiene de, un cultivo que comprende al menos el 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, 97 %, 99 %, con la máxima preferencia aproximadamente el 100 % de los microorganismos de acuerdo con la presente invención.

El término "un microorganismo" como se usa en la presente descripción puede referirse a un solo organismo unicelular así como a numerosos organismos unicelulares individuales. Por ejemplo, el término "un microorganismo de la especie

Bacteroides xylanisolvens" puede referirse a una sola célula bacteriana de Bacteroides xylanisolvens de la especie Bacteroides xylanisolvens así como a múltiples células bacterianas de la especie Bacteroides xylanisolvens. Los términos "un microorganismo de la especie Bacteroides xylanisolvens" y "un microorganismo Bacteroides xylanisolvens" se usan en la presente descripción como sinónimos. Preferentemente, el término "un microorganismo" se refiere a numerosas células bacterianas. En particular, dicho término se refiere a al menos 10<sup>3</sup> células bacterianas, preferentemente, al menos 10<sup>4</sup> células bacterianas, al menos 10<sup>5</sup> o al menos 10<sup>6</sup> células bacterianas.

El microorganismo *Bacteroides xylanisolvens* de acuerdo con la presente invención, preferentemente, es capaz de producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos como productos finales de la fermentación microbiana de carbohidratos pueden tener propiedades promotoras de la salud. Como ejemplo, se informó que el propionato tiene posibles efectos reductores del colesterol y efectos antilipogénicos. Puede estimular aún más la saciedad y junto con el acetato y el butirato presenta un efecto anticancerígeno. En modalidades preferidas, el microorganismo de acuerdo con la invención es capaz de producir uno o más AGCC seleccionados del grupo que consiste en propionato, acetato, succinato, formiato y lactato. Preferentemente, es capaz de producir propionato y/o acetato. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, preferentemente, estos AGCC también están presentes en las composiciones de acuerdo con la presente invención que contienen el microorganismo de acuerdo con la invención o un lisado o fracción de este. En ciertas modalidades en las que el microorganismo de acuerdo con la invención se va a administrar al paciente en una forma viable, dicho microorganismo todavía es capaz de producir dichos AGCC dentro del cuerpo del paciente después de la administración.

20

25

30

35

40

50

10

15

En modalidades preferidas, el microorganismo Bacteroides xylanisolvens de acuerdo con la presente invención es capaz de sobrevivir a las condiciones en que se encuentre, en particular, el paso a través del estómago, y preferentemente, también a las condiciones en que se encuentre en particular al paso a través de al menos un parte del intestino de un ser humano después de la ingestión. En particular, sobrevivir a las condiciones en el estómago de un ser humano se refiere a la supervivencia durante al menos 180 minutos de al menos el 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 85 % de los microorganismos Bacteroides xylanisolvens de acuerdo con la presente invención en una composición que comprende los microorganismos en el jugo gástrico. Además, sobrevivir a las condiciones en el intestino de un ser humano se refiere a la supervivencia durante al menos 240 minutos de al menos el 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de los microorganismos Bacteroides xylanisolvens de acuerdo con la presente invención en una composición que comprende los microorganismos en el jugo intestinal. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, preferentemente, los microorganismos de acuerdo con la invención todavía comprenden al menos un antígeno core-1 en su superficie después de dicho tratamiento. Con mayor preferencia, todavía comprenden una cantidad de antígeno core-1 en su superficie que es al menos el 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de la cantidad de antígeno core-1 en su superficie al comienzo del tratamiento. Además, los microorganismos de acuerdo con la invención son capaces de expresar core-1 en su superficie, en particular como se describe en la presente descripción, después de los tratamientos descritos anteriormente. Así, la expresión de core-1 de los microorganismos de acuerdo con la invención no se afecta por las condiciones en el tracto gastrointestinal humano y dichos microorganismos todavía comprenden una densidad de antígeno core-1 alta y estable en su superficie y - si se usan en una forma viable - todavía son capaces de expresar core-1 después de la administración oral. Por lo tanto, los microorganismos de acuerdo con la invención son especialmente ventajosos para el uso como agente terapéutico en formulaciones orales.

En modalidades preferidas, el microorganismo *Bacteroides xylanisolvens* de acuerdo con la presente invención tiene una o más de las siguientes características de seguridad:

- (i) es sensible a los antibióticos metronidazol, meropenem y/o clindamicina;
- (ii) no contiene el plásmido RP4 (DSM 3876) y/o el plásmido pSC101 (DSM 6202);
- (iii) no contiene los genes de β-lactamasa cfiA y/o cfxA;
- (iv) no contiene los factores de virulencia polisacárido A de *Bacteroides fragilis* y/o la enterotoxina Bft de *Bacteroides fragilis* y/o la "proteína de membrana externa ligada a Ton B" codificada por el gen ompW;
  - (v) no muestra actividad de ADNasa extracelular, actividad de condroitinasa extracelular, actividad de hialuronidasa extracelular y/o actividad de la neuraminidasa extracelular; y/o
  - (vi) no se une a las células epiteliales del colon humano.
- 55 El microorganismo Bacteroides xylanisolvens de acuerdo con la presente invención es
  - a) Coreóticos, depositados el 12 de julio de 2011 con el número de registro DSM 25004 de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) disponible de Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (DE), (DSM 25004),
  - b) un microorganismo derivado de Coreóticos que
- i) pertenece a la especie de Bacteroides xylanisolvens; y
  - ii) en un cultivo celular de dicho microorganismo, al menos el 50 % de los microorganismos tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 50 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de la cepa DSM 25004.
- Coreóticos (DSM 25004) pertenece a la especie *Bacteroides xylanisolvens*. Preferentemente, Coreóticos es una bacteria estrictamente anaeróbica, no formadora de esporas, no móvil y Gram negativa en forma de barra de 0,4-0,5 µm de ancho y generalmente de 1-2 µm de longitud, que en particular crece en colonias en agar Wilkins-Chalgren que después de 18

h tienen 2-3 mm de diámetro con una superficie circular, lechosa, elevada y convexa. Coreóticos exhibe una expresión de core-1 fuerte, homogénea y altamente estable en su superficie celular. Como se muestra en el ejemplo 2, los valores de expresión del antígeno core-1 determinados para 10 colonias diferentes de Coreóticos, muestran valores de DO en un ensayo ELISA (ver el ejemplo 2) con poca variabilidad en su expresión del antígeno core-1. De esta manera, se proporciona una cantidad constante, homogénea y alta del antígeno core-1 cuando se usa Coreóticos, por ejemplo, en composiciones farmacéuticas. Este perfil de expresión es único y muestra, además, que Coreóticos tiene ventajas considerables sobre otros microorganismos que expresan el antígeno core-1 tales como por ejemplo, el *Bacteroides ovatus* AG6 DSM 18726 (descrito en el documento WO 2008/055703), que muestra, por ejemplo, una mayor variabilidad en su expresión de core-1 que Coreóticos. Se describen en la presente descripción, además, lisados y fracciones de Coreóticos positivos a core-1.

Un microorganismo derivado de Coreóticos y/o un homólogo de Coreóticos pueden tener una o más de las siguientes características:

a) pertenece a la especie de Bacteroides xylanisolvens como se definió anteriormente;

10

35

40

45

- b) en un ensayo de hibridación ADN-ADN, muestra una relación ADN-ADN de al menos el 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o al menos 99 % con Coreóticos depositados como DSM 25004 y/o con Bacteroides xylanisolvens depositado como DSM 18836.
- c) muestra un nivel de similitud de secuencia del gen ARNr 16S de al menos el 95 %, preferentemente, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, con mayor preferencia al menos 99,5 %, y con la máxima preferencia aproximadamente 100 % con Coreóticos depositados como DSM 25004 y/o *Bacteroides xylanisolvens* depositado como DSM 18836;
  - d) muestra una expresión del antígeno core-1 que tiene una, dos, preferentemente, tres, con mayor preferencia, cuatro, con la máxima preferencia todas las siguientes características:
- i) tiene una expresión promedio del antígeno core-1 de al menos el 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 % o al menos 90 %, con mayor preferencia al menos el 95 % de la expresión promedio de core-1 de Coreóticos depositados como DSM 25004;
  - ii) alcanza en promedio un valor de absorbancia de al menos 0,25, preferentemente, al menos 0,3 y con mayor preferencia al menos 0,35 en un ensayo ELISA como se describe en el ejemplo 2;
- iii) expresa en la superficie celular al menos una estructura de carbohidratos seleccionada del grupo que consiste en las estructuras núm. 1, núm. 2, núm. 3, núm. 4 y núm. 5 de la figura 4, estructuras análogas de estas, y/o unidades repetitivas de estas:
  - iv) en un cultivo celular, al menos el 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, con mayor preferencia aproximadamente 100 % de dichos microorganismos tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 75 %, preferentemente, al menos 80 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de Coreóticos depositados como DSM 25004; y/o
  - v) en un cultivo celular, al menos el 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, con mayor preferencia aproximadamente 100 % de dichos microorganismos tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que está en el intervalo de 70 % a 150 %, de 75 % a 125 %, preferentemente, de 80 % a 115 %, con la máxima preferencia de 90 % a 110 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de Coreóticos depositados como DSM 25004;
  - e) tiene una o más de las características de seguridad descritas anteriormente;
  - f) sobrevive a las condiciones en el estómago y/o intestino de un ser humano y en particular es capaz de expresar core-1 después de sobrevivir a dichas condiciones; y/o
  - g) es capaz de producir ácidos grasos de cadena corta, en particular propionato.

Preferentemente, se cumplen al menos dos, con mayor preferencia al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis, y con la máxima preferencia todos los criterios definidos anteriormente del a) al f).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende microorganismos positivos 50 a core-1 o un lisado de estos positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Los microorganismos positivos a core-1 comprendidos de acuerdo con la presente invención pueden ser idénticos o diferentes. Con respecto a las características del microorganismo positivo a core-1 de la especie Bacteroides xylanisolvens de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se hace referencia a la descripción anterior. Lo mismo aplica con respecto a los lisados positivos a core-1. Preferentemente, el 80 % o más, con mayor preferencia 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % 55 o más o 99 % o más, y lo con la máxima preferencia aproximadamente 100 % de los microorganismos en la composición son microorganismos positivos a core-1 de la especie Bacteroides xylanisolvens de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, preferentemente, los microorganismos positivos a core-1 en la composición de acuerdo con la presente invención se caracterizan por una expresión estable del antígeno core-1. Preferentemente, se obtienen los siguientes grados de estabilidad. De acuerdo con una modalidad, al menos el 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, preferentemente, al menos 90 % 60 y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión de antígeno core-1 que es al menos el 50 %, preferentemente, al menos 60 %, al menos 70 %, con mayor preferencia al menos 75 %, al menos 80 % del nivel de expresión promedio de core-1 de todos microorganismos positivos a core-1 en dicha composición. Preferentemente, al menos el 95 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión de core-1 que es al menos el 75 % del nivel de expresión promedio de core-1 65 de todos los microorganismos positivos a core-1 en la composición. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, al menos el 80 %, preferentemente, al menos 85 %, al menos 90 % y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 80 % del nivel de expresión promedio de core-1 de Coreóticos depositados como DSM 25004. Preferentemente, al menos el 95 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión de core-1 que es al menos el 75 % del nivel de expresión promedio de core-1 de Coreóticos depositados como DSM 25004. Preferentemente, dichos microorganismos positivos a core-1 son de la especie Bacteroides xylanisolvens. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, preferentemente, los microorganismos positivos a core-1 en la composición de acuerdo con la presente invención se caracterizan por una expresión homogénea del antígeno core-1. Preferentemente, se alcanzan los siguientes grados de homogeneidad. Preferentemente, al menos el 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, preferentemente, al menos 90 % y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que está en el intervalo de 60 % a 150 %, de 70 % a 140 %, preferentemente, de 70 % a 130 %, de 75 % a 125 %, de 80 % a 120 %, o del 85 % al 115 %, y con la máxima preferencia del 90 % al 110 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de todos los microorganismos positivos a core-1 en la composición. En particular, al menos el 95 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión de core-1 que está en el intervalo de 75 % a 125 % del nivel de expresión promedio de core-1 de todos los microorganismos positivos a core-1 en la composición. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, al menos el 30 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, preferentemente, al menos 90 % y con mayor preferencia al menos 95 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que está en el intervalo de 60 % a 150 %, de 70 % a 140 %, preferentemente, de 70 % a 130 %, de 75 % a 125 %, de 80 % a 120 %, o de 85 % a 115 %, y lo con la máxima preferencia de 90 % a 110 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de Coreóticos depositados como DSM 25004. En particular, al menos el 95 % de los microorganismos positivos a core-1 de acuerdo con la invención en la composición tienen un nivel de expresión de core-1 que está en el intervalo de 75 % a 125 % del nivel de expresión core-1 promedio de Coreóticos depositados como DSM 25004. Preferentemente, dichos microorganismos positivos a core-1 son de la especie Bacteroides xylanisolvens.

10

15

20

25

35

40

45

50

65

Los medios para determinar el nivel de expresión del antígeno core-1 así como la estabilidad y la homogeneidad se describieron anteriormente.

De acuerdo con una modalidad, la composición de acuerdo con el segundo aspecto es un cultivo celular. Los valores preferidos para un cultivo celular que comprende los microorganismos positivos a core-1 de acuerdo con la presente invención se describen anteriormente junto con el primer aspecto de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con una modalidad, el microorganismo o los microorganismos en la composición están presentes en una forma viable, no reproductiva, no viable o lisada.

Preferentemente, la composición comprende al menos 10<sup>3</sup> microorganismos de acuerdo con la presente invención, con mayor preferencia al menos 10<sup>4</sup>, al menos 10<sup>5</sup> o al menos 10<sup>6</sup> microorganismos de acuerdo con la presente invención; o los lisados positivos a core-1 de esta cantidad de microorganismos de acuerdo con la presente invención.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el microorganismo positivo a core-1 o los lisados positivos a core-1 de este de acuerdo con el primer aspecto de la invención o la composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención para su uso en la medicina. El microorganismo positivo a core-1 o el lisado de este y/o la composición de acuerdo con la presente invención se usa, preferentemente, para inducir y/o potenciar una respuesta inmune contra core-1. La respuesta inmune inducida o potenciada puede ser humoral y/o una respuesta inmune celular y en particular implica la inducción de un título de anticuerpos contra core-1. Por lo tanto, tumores, cánceres, trastornos gastrointestinales positivos a core-1 y/o enfermedades positivas a core-1 pueden tratarse y/o prevenirse. La respuesta inmune específica para core-1 potenciada y/o inducida funciona como un escudo contra, por ejemplo, células cancerosas positivas a core-1, en particular para la prevención, reducción o propagación de tumores o metástasis positivos a core-1. El microorganismo positivo a core-1 o los lisados positivos a core-1 de este de acuerdo con el primer aspecto de la invención o la composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención pueden usarse, además, como vacuna contra el cáncer. Se describen, además, otros usos terapéuticos adecuados de microorganismos positivos a core-1 en el documento WO 2008/055703.

En particular, el microorganismo positivo a core-1 o los lisados positivos a core-1 de este de acuerdo con el primer aspecto de la invención o la composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención pueden administrarse a un paciente con cáncer o en riesgo de desarrollar cáncer. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la invención que expresa un antígeno core-1 en su superficie o el lisado o fracción de este positivo a core-1 es capaz de provocar una respuesta inmune específica contra un antígeno core-1 en el paciente. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune humoral y/o celular y, preferentemente, incluye una respuesta inmune celular, en particular una respuesta del sistema inmune adaptativo, que incluye, preferentemente, la formación de células de memoria del sistema inmune.

El cáncer, preferentemente, es un cáncer que comprende células tumorales que portan el antígeno de carbohidratos core-1 en su superficie (cáncer positivo a core-1). Preferentemente, el cáncer es un carcinoma de colon o una metástasis de un carcinoma de colon. El término "paciente" como se usa en la presente descripción en particular se refiere a un ser humano, un primate no humano u otro animal, en particular un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor como un ratón y rata. Preferentemente, el paciente es un ser humano.

5

10

15

20

25

30

35

40

60

65

El término "cáncer" de acuerdo con la invención en particular comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, suprarrenal, tiroideo, sanguíneo, de piel, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglio linfático, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y sus metástasis. Los ejemplos de estos son carcinomas de colon, carcinomas colorrectales y metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente. El término cáncer de acuerdo con la invención comprende, además, metástasis de cáncer. El término "tumor" en particular se refiere a un grupo de células o tejido que se forma por una proliferación celular mal regulada. Los tumores pueden mostrar una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigna o maligna. El término "metástasis" en particular se refiere a la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y normalmente implica el desprendimiento de las células cancerosas de un tumor primario, que ingresa en la circulación del cuerpo y se establece para crecer dentro de los tejidos normales en otras partes del cuerpo. Cuando las células tumorales sufren metástasis, el nuevo tumor se denomina tumor secundario o metastásico y sus células normalmente se parecen a las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que si el cáncer de mama sufre metástasis a los pulmones, el tumor secundario se compone de células mamarias anormales, no de células de pulmón anormales. El tumor en el pulmón se denomina cáncer de mama metastásico, no cáncer de pulmón.

De acuerdo con la presente invención, el término "enfermedad positiva a core-1" se refiere en particular a cualquier enfermedad que se asocie con una célula eucariótica, célula tumoral, cáncer u otro material biológico que se caracterice por la aparición del antígeno tumoral core-1 (ver más arriba).

La presente invención proporciona, además, en un cuarto aspecto una composición farmacéutica, que comprende i) un microorganismo positivo a core-1 o un lisado positivo a core-1 de este de acuerdo con el primer aspecto de acuerdo con la presente invención (los detalles del microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención se describen anteriormente; se hace referencia a la descripción anterior)

ii) una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención (los detalles de la composición respectiva se describen anteriormente, se hace referencia a la descripción anterior).

El término "composición farmacéutica" se refiere particularmente a una composición que es adecuada para administrar a un humano o animal, es decir, una composición que contiene componentes que son farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende como compuesto activo el microorganismo positivo a core-1 o un lisado positivo a core-1 de este de acuerdo con el primer aspecto y/o la composición de acuerdo con el segundo aspecto de esta junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico tal como tampón, conservante y modificador de la tonicidad. Los usos farmacéuticos adecuados se describen anteriormente; se refiere a la descripción anterior. La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, pero puede administrarse, además, por cualquier otra vía de administración adecuada.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención, preferentemente, comprende el microorganismo positivo a core-1 en una cantidad o concentración que da como resultado una dosis diaria de aproximadamente 10<sup>4</sup> a aproximadamente 10<sup>13</sup> microorganismos para el paciente. Preferentemente, la dosis diaria no excede los 2,8 \*10<sup>12</sup> microorganismos, preferentemente, 2,3\*10<sup>12</sup> microorganismos, y/o es al menos 10<sup>7</sup> microorganismos, preferentemente, al menos 10<sup>9</sup> microorganismos. En particular, la dosis diaria está en el intervalo de aproximadamente 10<sup>10</sup> a aproximadamente 10<sup>12</sup> microorganismos. La composición farmacéutica, preferentemente, está en forma de dosis unitarias únicas que comprenden cada una una dosis diaria del microorganismo positivo a core-1 como se describió anteriormente. Para composiciones farmacéuticas que comprenden un lisado positivo a core-1 del microorganismo positivo a core-1, la cantidad o concentración del lisado positivo a core-1 en la composición es igual a la del microorganismo positivo a core-1 en la composición se obtiene a partir de una cantidad o concentración de microorganismos positivos a core-1 como se describió anteriormente.

El microorganismo positivo a core-1 según la invención y los microorganismos positivos a core-1 en la composición de acuerdo con la invención pueden usarse en una forma viable, no reproductiva, no viable o lisada. En ciertas modalidades, el microorganismo positivo a core-1 se usa en una forma viable. En particular, cuando se usa en una forma viable, el microorganismo todavía es capaz de producir ácidos grasos de cadena corta tales como propionato en el cuerpo del paciente, y proporciona de esta manera un beneficio adicional para la salud como se describió anteriormente. Preferentemente, los microorganismos se usan en una forma no patógena, una forma no reproductiva, no viable o lisada. Además, también pueden usarse fracciones positivas a core-1 de dichos microorganismos. De acuerdo con la invención, los lisados positivos a core-1 de los microorganismos comprenden al menos un antígeno core-1 que, preferentemente, es accesible para anticuerpos específicos para core-1 como se describió anteriormente y/o es sensible a peryodato como se describió anteriormente.

Una ventaja específica del microorganismo positivo a core-1 y de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención es su capacidad para inducir un título de anticuerpos contra core-1 en el cuerpo humano o animal. Este título de anticuerpo anti core-1 en particular proporciona una protección general contra enfermedades positivas a core-1, en particular cáncer que comprende células tumorales o cancerosas positivas a core-1. Así, como se describe adicionalmente en la presente descripción, preferentemente, el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la invención o el lisado o fracción de este positivo a core-1 o las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son capaces de inducir un título de anticuerpos contra el antígeno core-1 en el cuerpo humano o animal cuando se administra. El título de anticuerpos inducido, preferentemente, es al menos detectable por métodos de detección comunes y, preferentemente, es suficiente para reducir el riesgo de adquirir una enfermedad positiva a core-1, en particular cáncer que comprende células cancerosas o tumorales positivas a core-1.

De acuerdo con un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar un producto positivo a core-1, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención;
- b) tratar opcionalmente dicho microorganismo positivo a core-1 con el fin de obtener un lisado o fracción de este positivo a core-1;
  - c) usar dicho microorganismo positivo a core-1 y/o dicho lisado o fracción de este positivo a core-1 en la fabricación del producto positivo a core-1.
- El producto puede ser cualquier producto e incluye, pero no se limita a productos farmacéuticos. Con respecto a la fabricación de los respectivos productos y los detalles de los microorganismos positivos a core-1 de acuerdo con la presente invención, también se hace referencia a la descripción anterior. El microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención puede usarse en forma viable o no viable. El producto fabricado puede, además, procesarse más.
- El término "fracción de un microorganismo positivo a core-1" y términos similares como se usan en la presente descripción en particular se refieren a preparaciones o purificaciones de partes más pequeñas de dichos microorganismos tales como, por ejemplo, una preparación de pared celular, preparación de envoltura, lisados, preparación de lipopolisacáridos, preparación de cápsulas o preparaciones de polisacáridos capsulares de componentes positivos a core-1 de dicho microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención. Dichas fracciones deberían comprender al menos un componente positivo a core-1 de dicho microorganismo positivo a core-1 con el fin de poder inducir la respuesta inmune deseada. Pueden obtenerse a partir de preparaciones o purificaciones a partir de al menos un microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención. Dichas preparaciones y purificaciones pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como fraccionamiento(s) de células secuenciales o individuales, extracciones de agua con fenol, extracciones de éter, digestiones enzimáticas tales como digestiones con lisozima o métodos cromatográficos. Además, el término fracción de un microorganismo positivo a core-1 también comprende componentes positivos a core-1 producidos artificialmente que también se encuentran en microorganismos positivos a core-1 de la presente invención.
- De acuerdo con una modalidad, el producto positivo a core-1 que se produce de acuerdo con el método de acuerdo con el quinto aspecto es una célula presentadora de antígeno, preferentemente, una célula dendrítica. En este caso, la etapa c) del método de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención comprende, preferentemente, cargar dicha célula presentadora de antígeno con el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con la presente invención y/o el lisado o fracción de este positivo a core-1. Preferentemente, la célula presentadora de antígeno es humana. Preferentemente, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas que se obtienen de la línea celular de leucemia MUTZ-3 (DSM ACC295) o células derivadas de MUTZ-3, tales como NEMOD-DC (ver el documento WO 2003/023023).
- En el documento WO 2008/055703 se describe que los microorganismos y lisados y/o fracciones de estos positivos a core-1 son capaces de activar células T humanas de una manera específica para core-1 cuando se presentan mediante una célula presentadora de antígeno funcional, en particular células dendríticas in vitro, lo que abre así nuevas oportunidades terapéuticas (ver el documento WO2008/055703, en particular página 77, línea 26 a la página 85, línea 20).
- Por lo tanto, de acuerdo con una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para fabricar una célula presentadora de antígeno funcional, preferentemente, una célula dendrítica, contra core-1, que comprende las siguientes etanas:
  - a) proporcionar un microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención (ver también las reivindicaciones de la 1 a la 5)
  - b) tratar opcionalmente dicho microorganismo positivo a core-1 con el fin de obtener un lisado o fracción de este positivo a core-1;
    - c) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula presentadora de antígeno, preferentemente, una célula dendrítica, con una cantidad adecuada de
    - i) dicho microorganismo positivo a core-1 y/o

5

10

25

- ii) dicho lisado o fracción de este positivo a core-1,
- 65 para obtener de esta manera una célula presentadora de antígeno funcional, preferentemente, una célula dendrítica, contra core-1.

El contacto en la etapa c) tiene lugar durante un tiempo adecuado y en condiciones adecuadas para generar al menos una célula presentadora de antígeno funcional, preferentemente, una célula dendrítica, contra core-1. Preferentemente, la célula presentadora de antígeno que se pone en contacto en la etapa c) con los compuestos positivos a core-1 es una célula presentadora de antígeno inmadura tal como una célula dendrítica inmadura que después se madura para obtener la célula presentadora de antígeno funcional contra core-1. Los detalles de dicha etapa de contacto c) se describen, además, en el documento WO 2008/055703; se refiere a la descripción respectiva.

El hecho de que se obtenga una célula presentadora de antígeno funcional contra core-1 puede comprobarse mediante el uso de anticuerpos específicos para core-1 como se describió anteriormente. Las células presentadoras de antígenos funcionales contra core-1 se cargan con el antígeno core-1 del microorganismo positivo core-1 usado de acuerdo con la presente invención (o el lisado o fracción de este positivo a core-1, ver anteriormente). Así, el antígeno core-1 puede detectarse por anticuerpos específicos para core-1 en las células presentadoras de antígeno cargadas respectivamente. La célula presentadora de antígeno funcional que se obtuvo contra core-1 (que también puede ser una mezcla de células presentadoras de antígeno, preferentemente, células dendríticas), puede activar las células T, en particular las células T humanas primarias, específicamente contra core-1 y así, puede estimular una respuesta inmune celular específica contra core-1. La activación de células T puede probarse, por ejemplo, mediante una prueba de respuesta inmune celular como se describe en el documento WO 2008/055703.

Un método para producir una célula T activada, células T, un clon de células T o una línea de células T contra core-1 puede comprender

- a) obtener al menos una célula presentadora de antígeno funcional, preferentemente, una célula dendrítica, contra core-1 mediante el uso del método de acuerdo con el sexto aspecto de la invención;
- b) poner en contacto una cantidad adecuada de la célula presentadora de antígeno funcional contra core-1 con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprenda al menos una célula T; y
- c) cultivar dicha célula T o mezcla de células T contra core-1 para junto con dichas células presentadoras de antígeno funcional cargadas activar y/o cebar una célula T o células T contra core-1.
- Los detalles de un método de producción correspondiente que también puede usarse se describen, además, en el documento WO 2008/055703; este se refiere a la descripción respectiva.
  - Se describe, además, una célula presentadora de antígeno funcional, preferentemente, una célula dendrítica, contra core-1, una célula T activada o células T contra core-1, una composición celular que comprende células T contra core-1, una línea de células T contra core-1, o un clon de células T contra core-1 producido por un método como se describe en la presente descripción, que induce una respuesta inmune humoral y/o celular contra enfermedades y/o células positivas a core-1. Las células respectivas son adecuadas para fabricar un medicamento para la profilaxis o la terapia de enfermedades positivas a core-1, tal como en particular tumores positivos a core-1.
- La invención se refiere, además, al uso de un microorganismo positivo a core-1 y/o un lisado de este positivo a core-1 de acuerdo con el primer aspecto de la invención in vivo o in vitro para inducir o potenciar una respuesta inmune específica para core-1 y/o para generar células presentadoras de antígenos funcionales, preferentemente, células dendríticas, y/o células T activadas, líneas de células T o clones de células T o anticuerpos contra core-1.
- La expresión "comprende", como se usa en la presente descripción, en adición a su significado literal incluye y se refiere específicamente a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en". Por lo tanto, la expresión "comprende" se refiere a modalidades en donde el sujeto que "comprende" los elementos enumerados específicamente no comprende elementos adicionales así como también modalidades en donde el sujeto que "comprende" los elementos enumerados específicamente puede y/o verdaderamente abarca elementos adicionales. Igualmente, la expresión "tiene" debe entenderse como la expresión "comprende", que incluye además, y se refiere específicamente a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en".

Figuras.

10

15

25

35

La Figura 1 muestra un análisis de restricción del microorganismo Coreóticos de acuerdo con la invención y de diferentes microorganismos de referencia. Los resultados respaldan que Coreóticos es de la especie *Bacteroides xylanisolvens*. La Figura 2 muestra un estudio de unión de antígeno ELISA de Coreóticos (DSM 25004) y AG6 (DSM 18726) mediante el uso de anticuerpos específicos para core-1. Diferentes colonias de Coreóticos o AG6 se introdujeron en pocillos de microtitulación y se unieron a un anticuerpo específico para core-1. La unión se visualizó mediante el uso de un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. El ensayo ELISA muestra que Coreóticos tiene una expresión estable y homogénea del antígeno core-1, mientras que AG6 tiene una expresión de core-1 menos estable y por consiguiente menos homogénea. La expresión promedio del antígeno core-1 de AG6 también fue menor que la de Coreóticos. La figura 3 muestra la unión de un anticuerpo anti core-1 a Coreóticos (DSM 25004) mediante el uso de un ensayo ELISA. Un tratamiento con peryodato precedente abolió la unión del anticuerpo. Se obtuvieron los mismos resultados para un control positivo a core-1 (PK). La cepa de referencia de *Bacteroides xylanisolvens* DSM 18836 no mostró ninguna unión del anticuerpo anti core-1.

La figura 4 muestra diferentes estructuras de carbohidratos que portan un motivo de disacárido similar a core-1 que puede estar presente en la superficie de la célula de los microorganismos Coreóticos.

La figura 5 muestra la determinación de los genes del plásmido y β-lactamasa *cfiA*, *cfxA* y *cepA*. (*A*) *Plásmido*: Se cargaron 20 μg de cada ADN plasmídico aislado. Carriles: 1, patrón de ADN de 1kb; 2, *E. coli*DSM 3876; 3, *E. coli* DSM 6202; 4, *Bacteroides xylanisolvens*DSM 25004. (*B*) *gen cfiA*: Carriles: 1, patrón de ADN de 100bp; 2, *Bacteroides fragilis* TAL 3636; 3, *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004; 4, control negativo. (*C*) *gen cfxA*: Carriles: 1 y 6, patrón de ADN de 1 kb; 2, *Bacteroides ovatus* MN7; 3, *Bacteroides ovatus*MN23; 4, *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004; 5, control negativo. (*D*) *gen cepA*: Carriles: 1 y 6, patrón de ADN de 100 pb; 2, *Bacteroides fragilis* DSM 1396; 3, *Bacteroides ovatus* MN23; 4, *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004; carril 5, control negativo.

- La figura 6 muestra la determinación de los genes codificantes de virulencia bft, wcfR, wcfS, y ompW. (A) gen bft: Carriles: 1, patrón de ADN de 100 pb; 2, Bacteroides xylanisolvens DSM 25004; 3, Bacteroides fragilis ATCC 43858; 4, control negativo. (B) gen wcfR: Carriles: 1, patrón de ADN de 1 kb; 2, Bacteroides fragilis DSM 1396; 3, Bacteroides fragilis DSM 2151; 5, Bacteroides xylanisolvens DSM 25004; 6, Bacteroides fragilis TAL 3636; 7, control negativo. (C) gen wcfS: Carriles: Carriles: 1, patrón de ADN de 1 kb; 2, Bacteroides fragilis DSM 1396; 3, Bacteroides fragilis ATCC 43858; 4, Bacteroides fragilis DSM 2151; 5, Bacteroides xylanisolvens DSM 25004; 6, Bacteroides fragilis TAL 3636; 7, control negativo. (D) gen ompW: Carriles: 1, patrón de ADN de 100 pb; 2, Bacteroides xylanisolvens DSM 25004; 3, Bacteroides caccae DSM 19024; 4, control negativo.
- La figura 7 muestra el análisis molecular de la unión de la cepa DSM 25004 a células Caco-2. (*A*) GAPDH e isomaltasa de sacarosa. Carriles: 1, patrón de ADN de 100 pb (Bioline); 2, 1er día; 3, 3er día; 4, 6to día; 5, 8to día; 6, 10mo día; 7, 13to día; 8, 14to día, 9, control negativo. (*B*) Detección de la cepa DSM 25004 y Bacteroides fragilis DSM 1396. Carriles: 1, patrón de ADN de 100 pb; 2, cepa DSM 25004 después de la 1era etapa de lavado; 3, cepa DSM 25004 después de la 6ta etapa de lavado; 4, cepa DSM 25004 + células Caco-2; 5, Bacteroides fragilis DSM 1396 después de la 1era etapa de lavado; 6, Bacteroides fragilis DSM 1396 después de la 6ta etapa de lavado; 7, Bacteroides fragilis DSM 1396 + células Caco-2; 8, células Caco-2; 9, cepa DSM 25004; 10, Bacteroides fragilis DSM 1396; 11, control negativo. (*C*) Detección de Lactobacillus acidophilus. Carriles: 1, Lactobacillus acidophilusDSM 9126 después de la 1era etapa de lavado; 2, Lactobacillus acidophilus DSM 9126 después de la 6ta etapa de lavado; 3, Lactobacillus acidophilus DSM 9126 + células Caco-2; 4, células Caco-2; 5, Lactobacillus acidophilus DSM 9126; 6, control negativo; 7, patrón de ADN de 100 pb.
- La figura 8 muestra el peso corporal y el consumo de alimento de los ratones durante el estudio de toxicidad oral de 90 días. (A) Pesos corporales de Crl masculinos: Ratones NMRI. (B) Pesos corporales de Crl femeninos: Ratones NMRI. (C)

  Consumo de alimentos de Crl masculinos: ratones NMRI. (D) Consumo de alimentos de Crl femeninos: ratones NMRI. Valores medios por grupo: Grupo 1 (0), Grupo 2 (1x10<sup>6</sup>), Grupo 3 (1x10<sup>7</sup>), Grupo 4 (1x10<sup>8</sup>) UFC Bacteroides xylanisolvens DSM 25004 y Grupo 5 (1x10<sup>11</sup>) Bacteroides xylanisolvens DSM 25004 pasteurizado / animal / día. Significación estadística indicada por *P* ≤ 0,01. Valores acordados con la prueba de Dunnett.
- La figura 9 muestra la detección de contaminación en soluciones inyectadas por PCR específica de especie múltiple.

  Carriles: 1, control positivo (*Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004); 2, Solución 2 (1x10<sup>9</sup> *Bacteroides fragilis* RMA 6791/ml); 3, Solución 3 (1x10<sup>9</sup> *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004/ml); 4, Solución 4 (1,5x10<sup>8</sup> *Bacteroides fragilis* RMA 6791/ml); 5, Solución 5 (1,5x10<sup>8</sup> *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004/ml); 6, Solución 6 (5x10<sup>6</sup> *Bacteroides fragilis* RMA 6791/ml); 7, Solución 7 (5x10<sup>6</sup> *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004/ml), 8, control positivo (*Bacteroides fragilis* RMA 6791); 9, Solución 1 (grupo control). Controles de contaminación: Carril 10, mezcla de 90 % de *Bacteroides fragilis* RMA 6791 y 10 % de *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004; Carril 11, mezcla de 10 % de *Bacteroides fragilis* RMA 6791 and 90 % de *Bacteroides xylanisolvens* DSM 25004. Carril 12, patrón de ADN de 1 kb (Fermentas).
  - La figura 10 muestra la PCR específica de especie de ADN aislado de abscesos puncionados. (A) Detección de Bacteroides xylanisolvens en abscesos de animales, que se inyectaron con Bacteroides xylanisolvens DSM 25004. Carriles: 1, patrón de ADN de 100 pb (Fermentas); 2-3, Grupo 3 (4,6x109 Bacteroides xylanisolvens DSM 25004/kg bw);
- 4-5, Grupo 5 (6,9x108 Bacteroides xylanisolvens DSM 25004/kg bw); 6-7, Grupo 7 (2,3x107 Bacteroides xylanisolvens DSM 25004/kg bw); 8, control positivo (Bacteroides xylanisolvens DSM 25004); 9, control negativo (agua). (B) Detección de Bacteroides fragilis en abscesos de animales, que se inyectaron con Bacteroides fragilis RMA 6791. Carriles: 1, patrón de ADN de 100 pb (Fermentas); 2-3, Grupo 2 (4,6x109 Bacteroides fragilis RMA 6791/kg bw); 4-5, Grupo 4 (6,9x108 Bacteroides fragilis RMA 6791/kg bw); 6-7, Grupo 6 (2,3x107 Bacteroides fragilis RMA 6791/kg bw), 8, control positivo (Bacteroides fragilis RMA 6791); 9, control negativo (Agua); 10, patrón de ADN de 1 kb (fermentas).

## **EJEMPLOS**

55

60

65

Ejemplo 1: El microorganismo positivo a core-1 es una cepa distinta de la especie Bacteroides xylanisolvens

1.1 Enriquecimiento selectivo y aislamiento de bacterias de muestras fecales humanas

Para el enriquecimiento de bacterias positivas a core-1 a partir de muestras fecales humanas, se prepararon perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para core-1 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega). Las muestras fecales de sujetos humanos sanos que no tomaron antibióticos durante los últimos tres meses se utilizaron en el estudio. Las muestras fecales se diluyeron en PBS reducido (PBS<sub>rojo</sub>: 8,5 g de NaCl, 0,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 g de peptona y 0,25 g de cisteína·HCl por L, pH 7.0), se homogeneizaron y centrifugaron (300 xg, 1 min, 21 °C). El sobrenadante se lavó una vez (8000 xg, 5 min, 21 °C) y se resuspendió en PBS<sub>rojo</sub>. Se adicionó un volumen de 20  $\mu$ l de la suspensión bacteriana a 180  $\mu$ l de PBS<sub>rojo</sub> y 5  $\mu$ l de las perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, y la mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las perlas se suspendieron en 1 ml de PBS<sub>rojo</sub> y se lavaron tres veces. Se extendieron alícuotas (100  $\mu$ l)

sobre agar selectivo y no selectivo. Las colonias se suspendieron en PBS<sub>rojo</sub> según los estándares de turbidez McFarland 3 a 5 (Smibert y Krieg 1994), y se adicionó nuevamente una alícuota de 20 µl de esta suspensión a perlas recubiertas con anticuerpo anti core-1. Las colonias se seleccionaron aleatoriamente de placas de agar y se volvieron a sembrar por estrías varias veces en medios no selectivos. Las colonias se cultivaron en medio de caldo apropiado en condiciones apropiadas. Los cultivos se congelaron parcialmente y se fijaron parcialmente. Los cultivos fijados se usaron para analizar la unión de los anticuerpos NM-TF1, NM-TF2 y B/A11-68 a cada cepa. Solo la cepa Coreóticos presentó un perfil de unión a anticuerpo similar a una estructura de core-1 humano inmunoaccesible, una unión fuerte y sensible a peryodato de NM-TF1 y NM-TF2 y no unión de B/A11-68. La posible afiliación taxonómica de Coreóticos a una especie de bacteria se caracterizó mediante ensayos bioquímicos (estuches bioquímicos rápidos ID 32A y API 20A (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Como resultado, Coreóticos podría clasificarse como perteneciente al grupo *Bacteroides spp.* Para realizar más análisis taxonómicos, se obtuvo un cultivo puro de Coreóticos mediante la siembra en placa de un cultivo de Coreóticos en medios selectivos y posteriormente

Etapa 1: seleccionar colonias que presenten una población celular homogénea bajo el microscopio,

Etapa 2: Fuera de la etapa 1: seleccionar colonias que presenten una expresión de core-1 adecuada (perfil descrito anteriormente).

Etapa 3: Fuera de las colonias seleccionadas en la etapa 2: cultivar durante la noche seguido de la siembra en placas de 200 a 500 unidades formadoras de colonias (ufc), y

Etapa 4: Selección de placas que presentan una población homogénea de colonias.

- 20 El proceso de selección (etapas de la 1 a la 4) se repitió varias veces. Después de varias rondas de purificación, la cepa Coreóticos pura se sometió a análisis taxonómico.
  - 1.2 Análisis taxonómico 1: similitud de secuencia del ARNr 16S

10

15

45

50

55

60

65

La secuencia del gen de ARNr 16S (480 bases) de la cepa Coreóticos se amplificó por PCR mediante el uso de los 25 iniciadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (sec. con núm. de ident.: 20)) y 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3' (sec. con núm. de ident.: 21)). Los productos de PCR se purificaron mediante el uso del estuche High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Indianápolis, EE. UU.) y se estimó la concentración de ADN y el tamaño del producto mediante el uso de un patrón de masa de ADN baja (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.). Los productos 30 de PCR se secuenciaron mediante el uso de un estuche DYEnamicTM ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience) y un secuenciador capilar ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La identificación de vecinos filogenéticos se llevó a cabo inicialmente por los programas BLAST (Altschul y otros, 1997) y megaBLAST (Zhang y otros, 2000) contra la base de datos de cepas tipo con nombres procarióticos publicados válidamente (Chun y otros, 2007). Las 50 secuencias con las puntuaciones más altas se seleccionaron después para el cálculo de la similitud de secuencia por pares mediante el uso del algoritmo de alineamiento 35 global, que se implementó en el servidor EzTaxon (http://www.eztaxon.org/; Chun y otros, 2007). El alineamiento resultante de secuencias múltiples se corrigió manualmente mediante el uso del programa MEGA versión 5 (Tamura, 2007) para eliminar las interrupciones del alineamiento y las bases ambiguas y se construyó un árbol filogenético de acuerdo con el método de unión de vecinos (Saitou y Nei, 1987) con el programa MEGA versión 5 (Tamura, 2007). 40

El análisis de secuencia del ARNr 16S de la cepa Coreóticos mostró que esta cepa se agrupaba con *Bacteroides xylanisolvens* DSM 18836 (similitud de secuencia del ARNr 16S 100 %), con *Bacteroides ovatus* ATCC 8483 (97,5 %), con *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148 (94,2 %) y con *Bacteroides finegoldii* DSM 17565 (92,2 %). Se reconoce generalmente que los valores de similitud ≥ 97 % en la divergencia de la secuencia del gen del ARNr 16S son significativos para la delineación de especies (Stackebrandt y Goebel, 1994). Sin embargo, Stackebrandt y Ebers (2006) hicieron la recomendación de que este valor puede aumentarse a 98,7-99 % sin sacrificar la calidad y precisión de una descripción de "especie", y como una ayuda para los taxonomistas.

1.3 Análisis taxonómico 2: Hibridación de ADN-ADN del genoma completo

La hibridación ADN-ADN se considera el estándar de oro en taxonomía. El genoma completo de la cepa Coreóticos se sometió a hibridación con el genoma completo de Bacteroides xylanisolvens DSM 18836. Bacteroides ovatus DSM 1896, Bacteroides thetaiotaomicron DSM 2079 y Bacteroides finegoldii DSM 17565 (esos análisis se realizaron en y por el DMSZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares). Brevemente, se usaron 3 g de biomaterial de cada cepa a comparar para la preparación de ADN. Se analizó la pureza del ADN aislado y se cortó el ADN mediante el uso de una prensa francesa y se desnaturalizó a alta temperatura (100 °C, 10 min). El ADN, preferentemente, se corta en fragmentos que tienen un tamaño de entre 200 y 600 kDa, la fracción principal era de aproximadamente 450 +/- 100 kDa. Se midió espectrofotométricamente la renaturalización del ADN de cada cepa así como de una mezcla de ADN de ambas cepas en concentraciones iguales (las concentraciones finales de ADN en las muestras son esencialmente idénticas y, preferentemente, se encuentran entre aproximadamente 20 y 100 µg/ml, in particular aproximadamente 30 µg/ml) mediante el uso de absorbancia a 260 nm. La renaturalización se inició mediante el enfriamiento rápido de la solución a una temperatura de 25 °C por debajo de la temperatura de fusión del ADN y las mediciones se realizaron durante 30 minutos. La relación de ADN se calculó a partir de las diferentes pendientes de las curvas de renaturalización del ADN de cada una de las cepas bacterianas individuales y la mezcla de ADN de ambas cepas. En particular, las tasas de renaturalización v' se determinaron como una disminución en la absorbancia/min ( $\Delta A/t$ ), y el grado de unión (D), es decir, la relación de ADN, se calculó de acuerdo con la fórmula proporcionada por De Ley y otros (ver anteriormente):

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

donde D es el grado de unión (%),  $v'_m$  es la tasa de renaturalización de la mezcla,  $v'_A$  es la tasa de renaturalización del ADN de la primera cepa, y  $v'_B$  es la tasa de renaturalización del ADN de la segunda cepa.

Los resultados de la hibridación completa del genoma se muestran en la Tabla 1:

#### Tabla 1

5

10

15

20

25

30

35

40

| Cepa de referencia                    | Relación de ADN para Coreóticos |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Bacteroides xylanisolvens DSM 18836   | 98,65 %                         |
| Bacteroides ovatus DSM 1896           | 26,9 %                          |
| Bacteroides thetaiotaomicron DSM 2079 | 28,65 %                         |
| Bacteroides finegoldii DSM 17565      | 25,2 %                          |

### 1.4 Análisis taxonómico 3: Caracterización microbiológica y bioquímica

La cepa DSM 25004 podría identificarse como estrictamente anaeróbica, no formadora de esporas, no móvil y Gram negativa. Las células con forma de barra o barras cortas tenían 0,4-0,5 µm de ancho y una longitud variable; generalmente en el intervalo de 1-2 µm. Las colonias cultivadas en agar Wilkins-Chalgren (Oxoid) después de 18 h tenían 2 - 3 mm de diámetro, con una superficie circular, lechosa, elevada y convexa. El análisis bioquímico inicial mostró un 91 % de similitud con las especies de Bacteroides ovatus (Databank BioMérieux). En contraste con Bacteroides ovatus, la cepa DSM 23964 no pudo utilizar almidón, para producir indol, y no mostró actividad de catalasa. La identificación bioquímica de las bacterias aisladas y sus enzimas constitutivas y los perfiles de utilización del sustrato se realizaron mediante el uso de estuches bioquímicos rápidos ID 32A y API 20A (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados de los análisis quimiotaxonómicos de la cepa Bacteroides xylanisolvens Coreóticos, Bacteroides xylanisolvens DSM 18836, Bacteroides finegoldii DSM 17565, Bacteroides ovatus DSM 1896, Bacteroides thetaiotaomicron DSM 2079 v Bacteroides fragilis DSM 1396 se resumen en la Tabla 2. Ambas cepas Bacteroides xylanisolvens Coreóticos y Bacteroides xylanisolvens DSM 18836 tenían idénticos perfiles bioquímicos. Bacteroides xylanisolvens Coreóticos podrían diferenciarse de Bacteroides ovatus DSM 1896 mediante la utilización de glicerol, Dsorbitol. D-manitol y D-melecitosa. En adición. Bacteroides xvlanisolvens Coreóticos mostró actividad arilamidasa ácido glutámico glutamilo, en contraste con los resultados para Bacteroides ovatus DSM 1896. En el otro sitio, Bacteroides ovatus DSM 1896 fue capaz de expresar la actividad leucina arilamidasa, mientras que Bacteroides xylanisolvens Coreóticos no. Por lo tanto, Bacteroides xylanisolvens Coreóticos podrían diferenciarse de Bacteroides finegoldii DSM 17565, Bacteroides thetaiotaomicron DSM 2079 y Bacteroides fragilis DSM 1396 (Tabla 2). En contraste con los resultados de Bacteroides xylanisolvens Coreóticos y Bacteroides xylanisolvens DSM 18836, Bacteroides thetaiotaomicron DSM 2079 mostró una gran cantidad de resultados positivos en pruebas de actividades enzimáticas.

45

50

55

60

Tabla 2

|    | Característica bioquímica             | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| _  | Formación de Indol                    | - | - | - | + | + | - |
| 5  | Actividades enzimáticas               |   |   |   |   |   |   |
|    | N-Acetil-β-Glucosaminidasa            | + | + | + | - | + | + |
|    | Decarboxilasa ácido glutámico         | + | + | + | - | + | + |
| 10 | α-Fucosidasa                          | + | + | - | + | + | + |
|    | Producción de Indol                   | - | - | - | + | + | + |
|    | Arginina arilamidasa                  | - | - | - | - | + | - |
| 45 | Fenilalanina arilamidasa              | - | - | - | - | + | + |
| 15 | Leucina arilamidasa                   | - | - | - | + | + | + |
|    | Tirosina arilamidasa                  | - | - | - | - | + | + |
|    | Glicina arilamidasa                   | - | - | - | - | + | - |
| 20 | Histidina arilamidasa                 | - | - | - | - | + | + |
|    | Arilamidasa ácido glutámico glutamilo | + | + | + | - | + | + |
|    | Serina arilamidasa                    | - | - | - | - | + | - |
| 25 | Producción de ácido a partir de:      |   |   |   |   |   |   |
| 23 | D-Manitol                             | + | + | - | - | - | - |
|    | Salicina                              | + | + | + | + | - | - |
|    | Hidrólisis de esculina                | + | + | + | + | + | - |
| 30 | Glicerol                              | + | + | - | - | - | - |
|    | D-Melezitosa                          | + | + | - | - | - | - |
|    | D-Sorbitol                            | + | + | - | - | + | - |
| 35 | D-Trehalosa                           | + | + | - | + | + | - |
| 33 | Actividades catalasas                 | - | - | + | + | + | + |

Cepas: 1: Bacteroides xylanisolvens Coreóticos; 2: Bacteroides xylanisolvens DSM 18836; 3: Bacteroides finegoldii DSM 17565; 4: Bacteroides ovatus DSM 1896; 5: Bacteroides thetaiotaomicron DSM 2079; 6: Bacteroides fragilis DSM 1396. Las características se califican como: '+': reacción positiva; '-': reacción negativa.

### 1.5 Patrón de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) y análisis de genotipo

Para probar si Coreóticos es una cepa distinta de la especie *Bacteroides xylanisolvens*, se realizó un ensayo RAPD. Se usaron cuatro iniciadores aleatorios diferentes en reacciones separadas (mediante el uso de solo un iniciador en cada reacción) para la amplificación del ADN molde. La mezcla de reacción de PCR (50 μl) contenía: Tampón de Taq (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris HCl), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada dNTP, 1 μM de iniciador, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq y 2 μl de molde de ADN. El programa de PCR fue: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 95 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, y finalmente 72 °C durante 6 min. Los patrones de bandas para todos los iniciadores se analizaron en geles de agarosa al 1 %. Así, para cada molde de ADN, se obtuvieron cuatro patrones de bandas diferentes (uno para cada iniciador).

La Coreóticos positiva a core-1 se sometió al análisis RAPD y los resultados se compararon con los de las bacterias de referencia de la especie *Bacteroides xylanisolvens* (DSM 18836), *Baceroides finegoldii* (DSM 17565) y *Bacteroides ovatus* (DSM 1896) (ver la fig. 1 para un iniciador ilustrativo). Los resultados demuestran que Coreóticos es una cepa distinta que no es idéntica a la cepa conocida *Bacteroides xylanisolvens* DSM 18836.

### 1.6 Resumen

40

- 60 Los resultados de la similitud de la secuencia del ARNr 16S, la hibridación de ADN-ADN del genoma completo y la caracterización bioquímica demostraron que el microorganismo aislado Coreóticos es de la especie *Bacteroides xylanisolvens*. Además, el análisis de RAPD mostró que Coreóticos es una cepa de *Bacteroides xylanisolvens* específica y distinta que es diferente de las cepas conocidas de *Bacteroides xylanisolvens*.
- 65 Ejemplo 2: Expresión estable y homogénea del antígeno core-1

### 2.1 Expresión de core-1 de Coreóticos en comparación con AG6

10

15

20

25

35

40

50

60

Las células bacterianas fijas se ajustaron a una concentración celular de 1\*107 células/ml con PBS. Se aplicaron 50 µl por duplicado a los pocillos de una placa de microtitulación PolySorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania) y se recubrieron durante la noche a 37 °C. Antes de todos los pasos adicionales de incubación, las placas se lavaron tres veces con 200 µl de solución salina tamponada con Tris con Tween 20 (8,78 g de NaCl, 6,06 g de Tris por L, y 0,05 % [v/v] de Tween 20, pH 7,6). Los pasos del método adicional se realizaron a temperatura ambiente. Los sitios de unión residuales se bloquearon mediante la incubación de los pocillos con 200 µl de albúmina sérica bovina (BSA) al 2 % en PBS durante 20 minutos. Se aplicó un anticuerpo monoclonal específico para core-1 (Nemod-TF1) como anticuerpo primario en 50 µl de BSA al 1 % que contenía PBS y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de solución salina tamponada con Tris con Tween 20 antes de la incubación con anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario (peroxidasa-conejo-anti-ratón IgG/IgM P0260, DAKO, Hamburgo, Alemania) se diluyó 1/5000 en BSA al 1 % en PBS, y se aplicaron 50 µl por pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con 200 ul de solución salina tamponada con Tris con Tween 20 v se desarrollaron durante de 5 a 20 minutos en la oscuridad y se adicionaron 100 µl de solución de desarrollo (1 mg/ml de tetrametilbenzidina en DMSO al 1 % [v/v] en tampón acetato de sodio 50 μM) a cada pocillo. Subsecuentemente, se adicionaron 50 μl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M para detener la reacción, y se midió la absorbancia (E<sub>450/630</sub>) en un lector de ELISA (Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA, EE. UU.). Un cultivo fijado de AG6 DSM 18726, descrito en el documento WO 2008/055703) también se ajustó a una concentración celular de 1\*107 células/ml con PBS sirvió como control positivo. Alternativamente, asialoglicoforina y glicoforina (100 ng/pocillo en PBS, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) sirvieron como controles positivos y negativos para el antígeno core-1, respectivamente. Los ensayos se realizaron por duplicado en al menos dos ocasiones distintas.

Ensayos ELISA de diez colonias de Coreóticos diferentes (DSM 25004) y 10 AG6 diferentes (DSM 18726, descrito en el documento WO 2008/055703) revelaron que Coreóticos (*Bacteroides xylanisolvens*) exhibe una expresión de core-1 alta y muy estable y homogénea en su superficie celular, mientras que AG6 (*Bacteroides ovatus*) muestra una mayor variabilidad y una expresión promedio de core-1 más baja (ver fig. 2).

2.2 Expresión de core-1 de Coreóticos en comparación con una cepa de referencia de B. xylanisolvens

La expresión de core-1 se analizó mediante la unión del anticuerpo específico para core-1 Nemod-TF1 (Glycotope GmbH, Alemania) en experimentos de ELISA. Se podría identificar una fuerte unión de TF1 para el control positivo (PK) y la cepa Coreóticos. Esto reveló la presencia de estructuras de core-1 en su superficie. El pretratamiento con peryodato abolió por completo la unión del anticuerpo anti core-1. La cepa de referencia *Bacteroides xylanisolvens* DSM 18836 no presentó ninguna unión del anticuerpo específico para core-1. Los resultados se muestran en la fig. 3.

Ejemplo 3: Efecto del jugo gástrico simulado y tratamientos térmicos en la expresión de core-1

Para simular el paso a través del tracto gastrointestinal, las bacterias Coreóticos se sometieron a la acción de jugos gástricos e intestinales simulados. La tasa de supervivencia de la cepa Coreóticos en el jugo gástrico fue superior al 90 % después de 180 minutos y superior al 96 % después de 240 minutos de exposición al jugo intestinal. Curiosamente, ninguno de los tratamientos tuvo ningún efecto sobre la exposición al antígeno core-1 en la superficie de la cepa Coreóticos. Además, la pasteurización no influyó en la densidad del antígeno core-1 que se mantuvo estable durante 12 meses cuando se almacenó a temperatura ambiente, 4 o -20 °C.

45 Ejemplo 4: Producción de ácidos grasos de cadena corta

En base a los análisis de HPLC, se demostró que la cepa *Bacteroides xylanisolvens* CTC1 puede producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como propionato y acetato, así como otras sustancias como succinato, formiato y lactato. En dependencia de las condiciones de crecimiento y composición del medio, la concentración de productos metabólicos medida en el sobrenadante varió de 2,5 mM a 44,7 mM para succinato, de 5,8 mM a 29,3 mM para propionato, de 3,4 mM a 38,3 mM para acetato, de 0 mM a 45 mM para formiato y de 0,88 mM a 8,6 mM para lactato, respectivamente.

Ejemplo 5: Análisis de factores de virulencia

55 5.1 Resistencia a los antibióticos de Coreóticos

El análisis de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de varios antibióticos reveló que la cepa *Bacteroides xylanisolvens* Coreóticos era resistente a los fármacos  $\beta$ -lactámicos como penicilina G, ampicilina y meziocilina. Sin embargo, era sensible a los antibióticos habituales, como metronidazol, meropenem y clindamicina, y la adición de inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa restauró la sensibilidad a los fármacos  $\beta$ -lactámicos.

5.2 Detección de plásmidos en Coreóticos

Para investigar la posible presencia de plásmidos en la cepa Coreóticos, el material de ADN plasmídico se aisló de Coreóticos y de ambas cepas de control, *E. coli* DSM 3876, y *E. coli* DSM 6202, respectivamente, que contienen los plásmidos de bajo número de copias RP4 (60 kb) y pSC101 (9,4 kb). Las mediciones de la concentración de ADN

plasmídico a 260 nm no revelaron la presencia de ADN en la preparación de plásmidos de Coreóticos. La corrida de las preparaciones de plásmido en un gel de agarosa confirmó el aislamiento tanto de plásmidos de bajo número de copias de las cepas control como de la ausencia de material plasmídico detectable de *Bacteroides xylanisolvens* Coreóticos (figura 5A).

5.3 Identificación de los genes de β-lactamasa cfxA, cepA y cfiA en el genoma de Coreóticos

Con el fin de caracterizar la actividad de  $\beta$ -lactamasa de la cepa Coreóticos, se realizaron ensayos de PCR específicos para cada uno de los genes de  $\beta$ -lactamasa cfiA, cfxA y cepA conocidos para el género *Bacteroides*. Los resultados indican que la cepa Coreóticos contiene exclusivamente el gen cepA (figuras 5B-D).

5.4 Genes que codifican factores de virulencia en el género Bacteroides

El polisacárido A (PS A) de *Bacteroides fragilis* y la enterotoxina Bft de *Bacteroides fragilis* son los factores de virulencia más importantes del género *Bacteroides*. Para investigar la presencia de la enterotoxina Bft, se realizó una PCR específica para el gen bft. En el caso del PS A, se diseñaron PCR específicas para los marcos de lectura abiertos altamente conservados upaY, upaZ, situados corriente arriba de los genes de biosíntesis del PS A, y para los genes más importantes wcfR que codifican una aminotransferasa y wcfS que codifica una glicosiltransferasa. A diferencia de *Bacteroides fragilis* ATCC 43858, la cepa Coreóticos no posee el gen bft. Además, los genes wcfR, wcfS y ambos marcos de lectura abiertos upaY y upaZ no se pudieron detectar (figura 6A-C).

Además, se analizó la presencia del gen ompW que codifica el factor de virulencia "proteína de membrana externa ligada a Ton B", que puede participar en el desarrollo de IBD. No pudo detectarse ningún gen codificante para ompW en la cepa Coreóticos (figura 6D).

5.5 Determinación de enzimas extracelulares y factores patogénicos de Coreóticos

En adición a la neuraminidasa, varias cepas del género *Bacteroides* se describieron para producir exoenzimas no deseadas que incluyen colagenasa, ADNasa y algunas proteasas que pueden participar en los procesos de infección. Las actividades exoenzimáticas más relevantes se analizaron mediante PCR (neuraminidasa) o ensayos enzimáticos. La cepa Coreóticos no muestra actividades de ADNasa, condroitinasa, hialuronidasa y neuraminidasa, y solo actividades débiles β-hemolítica y colagenasa.

5.6 Adherencia de Coreóticos a células Caco-2

Se cultivaron células Caco-2 y se indujo la diferenciación. Los resultados demuestran que el nivel de expresión de GAPDH fue constante durante la diferenciación, mientras que el nivel de sacarasa isomaltasa aumentó durante la diferenciación. La observación del microscopio confirmó que las células Caco-2 se diferenciaron bien como monocapa después de 14 días. La unión de bacterias a células de Caco-2 diferenciadas después de 3 horas de coincubación en condiciones anaeróbicas se analizó por medio de una PCR específica de especie realizada en sobrenadantes de etapas sucesivas de lavado, y finalmente en las células Caco-2 raspadas. En contraste con los controles positivos, las células de Coreóticos, que por supuesto podrían detectarse en el sobrenadante de la primera etapa de lavado, ya no podrían detectarse en sobrenadantes posteriores o en células Caco-2 raspadas, lo que indica que las células de Coreóticos no se unen a células epiteliales del colon humano (Figura 7).

Ejemplo 6: Estudios toxicológicos

6.1 Ensayo de viabilidad

5

10

25

30

35

40

45

55

60

La viabilidad de *Bacteroides xylanisolvens* Coreóticos (DSM 25004) después de la liofilización y la rehidratación se analizó en varios experimentos independientes. La tasa de supervivencia identificada más baja indicó una concentración mínima de 4x10<sup>9</sup> UFC / g de bacteria viable. Esta concentración se aceptó como la "concentración disponible".

6.2 Estudio de mutagenicidad in vitro (prueba de Ames)

Esta prueba se realizó para detectar cualquier efecto tóxico o mutagénico de Coreóticos o sus productos de fermentación. Cinco dosis de bacterias viables que varían de 0,28 a 28,5 mg de bacterias / placa o una dosis de 59 mg de bacterias pasteurizadas / placa se empleó en dos experimentos independientes, cada uno llevado a cabo con y sin activación metabólica. No se observaron signos de citotoxicidad ni aumento del número de colonias revertidas en comparación con los recuentos de control para ninguna concentración de las 5 cepas de prueba con y sin activación metabólica, y, además, en ambos formatos de prueba, incorporación de placa y modo de preincubación, respectivamente.

- 6.3 Evaluación in vitro de la actividad clastogénica (ensayo de aberración cromosómica in vitro)
- La concentración máxima de Coreóticos empleada en el estudio fue de 2,8 mg de bacterias viables / ml medio de cultivo y 5,9 mg de bacterias pasteurizadas / ml de medio de cultivo, que se consideraron como la concentración máxima

razonable. En ausencia de activación metabólica, la incidencia media de aberraciones cromosómicas (excluidas las interrupciones) observadas en el control negativo fue de 1,0 % o 0,5 % después de una exposición de 4 horas y 24 horas, respectivamente. Ninguna de las concentraciones de Coreóticos, ya sea viable o pasteurizada, produjo un aumento estadísticamente significativo en células aberrantes después de una exposición de 4 horas y 24 horas (0,5 % a 2,5 %). Por el contrario, el control positivo presentó un aumento del 10,5 % y del 17,5 % en las células aberrantes después de una exposición de 4 horas y 24 horas, respectivamente. En presencia de activación metabólica, la incidencia media de aberraciones cromosómicas (excluidas las interrupciones) observadas en el control negativo fue del 0,5 % después de una exposición de 4 horas. Nuevamente, ninguna de las concentraciones de Coreóticos viables o pasteurizadas produjo ningún aumento estadísticamente significativo en las células aberrantes, y da como resultado 0,0 % y 1,5 % en dos experimentos independientes, respectivamente. El control positivo presentó 13,5 % y 16,5 % de células aberrantes después de 4 horas en dos experimentos, respectivamente. Para todas las concentraciones de Coreóticos probadas, no se observó poliploidía o endoreduplicación relacionada con los elementos en los experimentos con o sin activación metabólica. Además, como confirmación de los resultados precedentes, no se observaron signos de citotoxicidad en ninguna concentración probada de Coreóticos en los experimentos con y sin activación metabólica.

6.4 Estudio de toxicidad oral de 90 días en ratones

10

15

20

25

30

40

45

50

55

60

65

El objetivo de este estudio fue determinar si la ingesta oral de Coreóticos tendría algún efecto toxicológico. Crl: Se asignaron ratones NMRI (50 machos y 50 hembras) a 5 grupos de prueba (10 machos y 10 hembras por grupo) y se administraron dosis diarias de bacterias oralmente mediante alimentación forzada durante 90 días. Probamos el efecto de 1x106 a 1x108 UFC o 1x1011 de Coreóticos pasteurizados por animal por día. Los resultados se muestran en la figura 8. Durante los 90 días de prueba no se observó mortalidad en ningún grupo tratado con Coreóticos viable o pasteurizado, como en el grupo de control. Ninguno de los ratones tratados o no tratados reveló ningún cambio en su comportamiento o apariencia externa. Además, la observación funcional no reveló ninguna influencia relacionada con el elemento de prueba: la motilidad, la consistencia de las heces y el consumo de agua, así como la ganancia de peso corporal y el consumo de alimentos no presentaron diferencias significativas durante el período experimental entre los grupos tratados y el grupo de control. El examen hematológico no mostró influencia relacionada con el elemento de prueba en ninguno de los niveles de dosis probadas de Coreóticos viables y pasteurizados, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de control y los grupos de ratones tratados. Los valores de la bioquímica clínica y el examen oftalmológico no revelaron cambios relacionados con los elementos de la prueba en ningún grupo a ningún nivel de dosis tanto para los Coreóticos viables como para los pasteurizados. Además, los análisis macroscópicos posmortem no revelaron lesiones o anomalías relacionadas con el elemento de prueba. Finalmente, un análisis histopatológico extenso y detallado de todos los órganos no reveló diferencias entre los grupos tratados y con el grupo control.

35 6.5 Patogenicidad in vivo de Coreóticos (formación de abscesos)

El modelo de formación de abscesos intraperitoneales in vivo es un modelo bien aceptado para investigar las propiedades patológicas de cepas bacterianas oportunistas (McConville y otros, 1981; Onderdonk y otros 1984; Thadepalli y otros 2001). Se usaron cultivos bacterianos nocturnos frescos de Bacteroides fragilis RMA 6971 o Bacteroides xylanisolvens DSM 25004 (Coreóticos). Una mezcla que contiene 2,3x10<sup>7</sup> a 4,6x10<sup>9</sup> UFC por kg de peso corporal, 50 % (p/p) de heces de rata autoclaveadas, y 10 % (p/v) de sulfato de bario se inyectó intraperitonealmente en ratones. La viabilidad, la concentración bacteriana y la pureza de cada elemento se determinaron retrospectivamente después de la inyección en el material restante. Para identificar la presencia de Bacteroides fragilis y / o Bacteroides xylanisolvens, una PCR específica de la especie múltiple como la descrita por Liu y otros (2003) se estableció. Esta PCR múltiple permitió, además, identificar ambas especies en situaciones de contaminación en las que una especie estaría fuertemente subrepresentada. Confirmamos que cada elemento de prueba individual contenía la cepa bacteriana deseada y no se contaminó con las otras especies (ver figura 9). Se analizaron contaminaciones potenciales adicionales mediante el recubrimiento de cada elemento de prueba en agar apropiado y se incubó en condiciones aeróbicas. No pudo detectarse una sola colonia después de 48 horas de incubación. En dos experimentos separados, los ratones inyectados con una dosis alta de Coreóticos no indujeron el desarrollo de más o más grandes abscesos como el control negativo (heces de rata estériles de sulfato de bario). En contraste, altas concentraciones de Bacteroides fragilis RMA 6971 indujeron la formación de más y más grandes abscesos. Después de 7 días, se tomaron 2 abscesos por animal en condiciones estériles, se pinchó el contenido y se sometió a extracción de ADN. Evaluamos la presencia de Coreóticos o Bacteroides fragilis RMA 6791 en los abscesos por medio de PCR específicas de especie (figura 10). Bacteroides fragilis RMA 6971 podría detectarse en todos los abscesos aislados de los grupos 2, 4 y 6 inyectados con de 2,3x107 a 4,6x109 Bacteroides fragilis por kg de peso corporal, respectivamente. Por el contrario, independientemente de la concentración bacteriana inyectada, no pudo detectarse Coreóticos en ninguno de los abscesos analizados. Estos resultados para ratones inyectados con Coreóticos indicaron claramente que esta cepa no induce la formación de abscesos, y que en realidad es rápida y completamente erradicada por el sistema inmune después de una inyección intraperitoneal.

Ejemplo 7: Modelo de ratón

Los sueros de ratones pueden contener anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con las estructuras de carbohidratos. Después de la inmunización, una unión aumentada observada en cualquier molécula o célula portadora de core-1 puede relacionarse, además, con tales anticuerpos de reacción cruzada, lo que da lugar a señales falsas positivas. Con el fin de analizar específicamente el título de anticuerpos específicos para core-1, el nivel de anticuerpos específicos

para core-1 en cada punto de tiempo se expresó como la relación: "Core- $1_R$  = señal en core-1 portador / señal en el portador-ref". La estructura de referencia puede ser cualquier estructura de carbohidrato que no esté presente en la superficie de Coreóticos, preferentemente, un disacárido. Un aumento en la proporción después de la administración de Coreóticos indica un aumento en el título de anticuerpos específicos para core-1.

5

10

15

Se administraron oralmente ratones C3H machos de 7 a 9 semanas con 5\*10<sup>9</sup> Coreóticos al día durante un período de 4 semanas. Como control negativo, 4 ratones se trataron con NaCl y 4 ratones se trataron con la cepa core-1-negativa *B.ovatus* DSM 1896. Se tomaron sueros antes de comenzar la inmunización y el día 21 y el día 28. El suero se diluyó 1/100 y su contenido en anticuerpos IgM específicos de core-1 se analizó en glicoconjugados PAA-core-1 y PAA-ref (Galβ1-3GlcNAc) de la siguiente manera.

Los glicoconjugados poliacrilamida-Gal $\beta$ 1-3GalNAc (PAA-core-1) y poliacrilamida-Gal $\beta$ 1-3GlcNAc (PAA-ref) se ajustaron a una concentración de 5  $\mu$ g/ml en tampón de recubrimiento (4,2 g NaHCO $_3$ , 1,78 g Na $_2$ CO $_3$  y 1 L con Millipore-H $_2$ O, pH 9,6). Se aplicaron 50  $\mu$ l de cada glicoconjugado por duplicado a los pocillos de una placa de microtitulación MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden, Alemania) y se recubrieron durante la noche a 4 °C. Antes de todas las etapas adicionales de incubación, las placas se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de solución salina tamponada con Tris con Tween 20 (8,78 g de NaCl, 6,06 g de Tris por L, y 0,05 % [v/v] de Tween 20, pH 7,6). Los sitios de unión residuales se bloquearon mediante la incubación de los pocillos con 200  $\mu$ l de albúmina sérica bovina (BSA) al 2 % en PBS durante 20 minutos.

20

25

30

Se diluyeron apropiadamente los sueros animales (de 1/50 a 1/200) con BSA al 1 % que contenía PBS y se aplicaron 50 μl por duplicado en pocillos recubiertos con PAA-core-1 y PAA-ref y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 200 μl de solución salina tamponada con Tris con Tween 20 antes de la incubación durante 1 h con 50 μl de una dilución 1/5000 en BSA al 1 % en PBS del anticuerpo secundario (peroxidasa-cabra-anti-lgM de ratón 115-035-075, Jackson ImmunoResearch). Las placas se lavaron nuevamente tres veces con 200 μl de solución salina tamponada con Tris con Tween 20 y se desarrollaron durante de 5 a 20 minutos en la oscuridad y se adicionaron 100 μl de solución de desarrollo (1 mg/ml de tetrametilbenzidina en DMSO al 1 % [v/v] en tampón acetato de sodio 50 μM) a cada pocillo. Posteriormente, se adicionaron 50 μl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M para detener la reacción, y la absorbancia (E<sub>450/630</sub>) se midió. El nivel de anticuerpo específico para core-1 se expresó como la relación: "E<sub>450/630</sub> en PAA-ref". La comparación de la relación antes y después de la inmunización permitió analizar específicamente el cambio en el título de anticuerpos específicos para core-1.

Como resultado, podría mostrarse la inducción de un título de anticuerpos específicos para core-1 en ratones por la cepa *Bacteroides xylanisolvens* cepa CTC1. Así, se demostró que los microorganismos de acuerdo con la invención son capaces de inducir una respuesta inmune contra el antígeno core-1.

35

Listado de secuencias

```
<110> Glycotope GmbH
      <120> Microorganismos que portan un antígeno tumoral
40
      <130> 53 810 K
      <150> EP 11178322.1
      <151> 2011-08-22
      <150> US 61/526,054
      <151> 2011-08-22
      <160> 21
45
      <170> PatentIn versión 3.3
      <210> 1
      <211> 5
      <212> PRT
50
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR H1
      <400> 1
        Asn Tyr Trp Leu Gly
55
        1
      <210> 2
      <211> 17
      <212> PRT
60
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR H2
      <400> 2
```

```
Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
                                        5
                                                             10
 5
                       Gly
      <210> 3
      <211> 10
      <212> PRT
10
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR H3
      <400> 3
15
                                   Tyr Asp Ala Ala Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
                                                     5
      <210> 4
      <211> 16
20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR L1
      <400> 4
25
                      Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
      <210> 5
      <211> 7
30
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR L2
      <400> 5
35
                                         Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
                                                           5
      <210> 6
      <211> 9
40
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR L3
      <400> 6
45
                                     Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
                                     1
                                                       5
      <210> 7
      <211> 5
50
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR H1
      <400> 7
55
                                              Asn Tyr Trp Leu Gly
                                              1
                                                                5
      <210>8
      <211> 17
60
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR H2
      <400> 8
65
```

```
Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 5
                      Gly
     <210>9
      <211> 8
     <212> PRT
10
     <213> Artificial
      <220>
      <223> CDR H3
     <400> 9
15
                                       Tyr Asp Asn His Tyr Phe Asp Tyr
20
     <210> 10
     <211> 16
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
     <223> CDR L1
25
      <400> 10
                     Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
                                       5
                                                            10
30
     <210> 11
     <211>7
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
     <223> CDR L2
35
      <400> 11
                                         Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
     <210> 12
40
     <211>9
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
     <223> CDR L3
45
      <400> 12
                                     Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
50
     <210> 13
     <211> 573
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
55
      <223> cadena pesada de IgMm
      <400> 13
60
```

26

|    | Gln<br>1   | Val        | Gln        | Leu        | Lys<br>5   | Glu               | Ser        | Gly        | Ala        | Glu<br>10  | Leu        | Val        | Arg        | Pro        | Gly<br>15  | Thr        |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 5  | Ser        | Val        | Lys        | Ile<br>20  | Ser        | Cys               | Lys        | Ala        | Ser<br>25  | Gly        | Tyr        | Thr        | Phe        | Thr<br>30  | Asn        | Tyr        |
| 10 | Trp        | Leu        | Gly<br>35  | Trp        | Val        | Lys               | Gln        | Arg<br>40  | Pro        | Gly        | His        | Gly        | Leu<br>45  | Glu        | Trp        | Ile        |
| 15 | Gly        | Asp<br>50  | Ile        | Tyr        | Pro        | Gly               | Gly<br>55  | Gly        | Tyr        | Thr        | Asn        | Tyr<br>60  | Asn        | Glu        | Lys        | Phe        |
| 13 | Lys<br>65  | Gly        | Lys        | Ala        | Thr        | Leu<br>70         | Thr        | Ala        | Asp        | Thr        | Ser<br>75  | Ser        | Ser        | Thr        | Ala        | Tyr<br>80  |
| 20 | Met        | Gln        | Leu        | Ser        | Ser<br>85  | Leu               | Thr        | Ser        | Glu        | Asp<br>90  | Ser        | Ala        | Val        | Tyr        | Phe<br>95  | Cys        |
| 25 | Ala        | Tyr        | Tyr        | Asp<br>100 | Ala        | Ala               | Gly        | Pro        | Trp<br>105 | Phe        | Ala        | Tyr        | Trp        | Gly<br>110 | Gln        | Gly        |
|    | Thr        | Thr        | Val<br>115 | Thr        | Val        | Ser               | Glu        | Ser<br>120 | Gln        | Ser        | Phe        | Pro        | Asn<br>125 | Val        | Phe        | Pro        |
| 30 | Leu        | Val<br>130 | Ser        | Cys        | Glu        | Ser               | Pro<br>135 | Leu        | Ser        | Asp        | Lys        | Asn<br>140 | Leu        | Val        | Ala        | Met        |
| 35 | Gly<br>145 | Cys        | Leu        | Ala        | Arg        | <b>Asp</b><br>150 | Phe        | Leu        | Pro        | Ser        | Thr<br>155 | Ile        | Ser        | Phe        | Thr        | Trp<br>160 |
| 40 | Asn        | Tyr        | Gln        | Asn        | Asn<br>165 | Thr               | Glu        | Val        | Ile        | Gln<br>170 | Gly        | Ile        | Arg        | Thr        | Phe<br>175 | Pro        |
|    | Thr        | Leu        | Arg        | Thr<br>180 | Gly        | Gly               | Lys        | Tyr        | Leu<br>185 | Ala        | Thr        | Ser        | Gln        | Val<br>190 | Leu        | Leu        |
| 45 |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
| 50 |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|    |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
| 55 |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
| 60 |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|    |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |

|    | Ser        | Pro                | Lys<br>195 | Ser        | Ile        | Leu        | Glu                | Gly<br>200 | Ser        | Asp               | Glu               | Tyr                | Leu<br>205        | Val        | Cys               | Lys               |
|----|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|
| 5  | Ile        | His<br>210         | Tyr        | Gly        | Gly        | Lys        | <b>A</b> sn<br>215 | Arg        | Asp        | Leu               | His               | Val<br>220         | Pro               | Ile        | Pro               | Ala               |
| 10 | Val<br>225 | Ala                | Glu        | Met        | Asn        | Pro<br>230 | Asn                | Val        | Asn        | Val               | Phe<br>235        | Val                | Pro               | Pro        | Arg               | Asp<br>240        |
|    | Gly        | Phe                | Ser        | Gly        | Pro<br>245 | Ala        | Pro                | Arg        | Lys        | Ser<br>250        | Lys               | Leu                | Ile               | Cys        | G1u<br>255        | Ala               |
| 15 | Thr        | Asn                | Phe        | Thr<br>260 | Pro        | Lys        | Pro                | Ile        | Thr<br>265 | Val               | Ser               | Trp                | Leu               | Lys<br>270 | Asp               | Gly               |
| 20 | Lys        | Leu                | Val<br>275 | Glu        | Ser        | Gly        | Phe                | Thr<br>280 | Thr        | Asp               | Pro               | Val                | Thr<br>285        | Ile        | Glu               | Asn               |
| 25 | Lys        | Gly<br>290         | Ser        | Thr        | Pro        | Gln        | Thr<br>295         | Tyr        | Lys        | Val               | Ile               | Ser<br>300         | Thr               | Leu        | Thr               | Ile               |
| 25 | Ser<br>305 | Glu                | Ile        | Asp        | Trp        | Leu<br>310 | Asn                | Leu        | Asn        | Val               | <b>Tyr</b><br>315 | Thr                | Cys               | Arg        | Val               | <b>Asp</b><br>320 |
| 30 | His        | Arg                | Gly        | Leu        | Thr<br>325 | Phe        | Leu                | Lys        | Asn        | <b>Val</b><br>330 | Ser               | Ser                | Thr               | Суз        | <b>Ala</b><br>335 | Ala               |
| 35 | Ser        | Pro                | Ser        | Thr<br>340 | Asp        | Ile        | Leu                | Thr        | Phe<br>345 | Thr               | Ile               | Pro                | Pro               | Ser<br>350 | Phe               | Ala               |
|    | Asp        | Ile                | Phe<br>355 | Leu        | Ser        | Lys        | Ser                | Ala<br>360 | Asn        | Leu               | Thr               | Cys                | <b>Leu</b><br>365 | Val        | Ser               | Asn               |
| 40 | Leu        | <b>Al</b> a<br>370 | Thr        | Tyr        | Glu        | Thr        | Leu<br>375         | Asn        | Ile        | Ser               | Trp               | <b>A</b> la<br>380 | Ser               | Gln        | Ser               | Gly               |
| 45 | Glu<br>385 | Pro                | Leu        | Glu        | Thr        | Lys<br>390 | Ile                | Lys        | Ile        | Met               | Glu<br>395        | Ser                | His               | Pro        | Asn               | Gly<br>400        |
|    | Thr        | Phe                | Ser        | Ala        | Lys<br>405 | Gly        | Val                | Ala        | Ser        | Val<br>410        | Cys               | Val                | Glu               | Asp        | Trp<br>415        | Asn               |
| 50 | Asn        | Arg                | Lys        | Glu<br>420 | Phe        | Val        | Cys                | Thr        | Val<br>425 | Thr               | His               | Arg                | Asp               | Leu<br>430 | Pro               | Ser               |
| 55 | Pro        | Gln                | Lys<br>435 | Lys        | Phe        | Ile        | Ser                | Lys<br>440 | Pro        | Asn               | Glu               | Val                | His<br>445        | Lys        | His               | Pro               |
| 60 |            |                    |            |            |            |            |                    |            |            |                   |                   |                    |                   |            |                   |                   |

|    |  | Pro        | Ala<br>450 | Val        | Tyr        | Leu        | Leu            | Pro<br>455 | Pro        | Ala        | Arg        | Glu               | Gln<br>460 | Leu        | Asn         | Leu        | Arg        |                  |
|----|--|------------|------------|------------|------------|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------------|
| 5  |  | Glu<br>465 | Ser        | Ala        | Thr        | Val        | Thr<br>470     | Cys        | Leu        | Val        | Lys        | Gly<br>475        | Phe        | Ser        | Pro         | Ala        | Asp<br>480 |                  |
| 10 |  | Ile        | Ser        | Val        | Gln        | Trp<br>485 | Leu            | Gln        | Arg        | Gly        | Gln<br>490 | Leu               | Leu        | Pro        | Gln         | Glu<br>495 | Lys        |                  |
| 45 |  | Tyr        | Val        | Thr        | Ser<br>500 | Ala        | Pro            | Met        | Pro        | Glu<br>505 | Pro        | Gly               | Ala        | Pro        | Gly<br>510  | Phe        | Tyr        |                  |
| 15 |  | Phe        | Thr        | His<br>515 | Ser        | Ile        | Leu            | Thr        | Val<br>520 | Thr        | Glu        | Glu               | Glu        | Trp<br>525 | Asn         | Ser        | Gly        |                  |
| 20 |  | Glu        | Thr<br>530 | Tyr        | Thr        | Cys        | Val            | Val<br>535 | Gly        | His        | Glu        | Ala               | Leu<br>540 | Pro        | His         | Leu        | Val        |                  |
| 25 |  | Thr<br>545 | Glu        | Arg        | Thr        | Val        | <b>Asp</b> 550 | Lys        | Ser        | Thr        | Gly        | <b>Lys</b><br>555 | Pro        | Thr        | Leu         | Tyr        | Asn<br>560 |                  |
|    |  | Val        | Ser        | Leu        | Ile        | Met<br>565 | Ser            | Asp        | Thr        | Gly        | Gly<br>570 | Thr               | Cys        | Tyr        |             |            |            |                  |
| 30 | <210> 14<br><211> 448<br><212> PRT<br><213> Artificial |            |            |            |            |            |                |            |            |            |            |                   |            |            |             |            |            |                  |
| 35 | <220><br><223> cadena pe<br><400> 14                   | esada      | de lo      | уGс        |            |            |                |            |            |            |            |                   |            |            |             |            |            |                  |
|    |  |            | Gln<br>1   | Val        | Gln        | Leu        | Lys<br>5       | Glu        | Ser        | Gly        | Ala        | Glu<br>10         | Leu        | ı Val      | Arg         | Pro        | Gly<br>15  | Thr              |
| 40 |  |            | Ser        | Val        | . Lys      | 11e<br>20  | . Ser          | Cys        | Lys        | Ala        | Ser<br>25  | Gly               | Tyr        | Thr        | r Phe       | Thr<br>30  | : Asn      | Туг              |
| 45 |  |            | Trp        | Leu        | Gly<br>35  | Trp        | Val            | Lys        | Gln        | Arg<br>40  | Pro        | Gly               | His        | Gly        | 7 Leu<br>45 | ı Glu      | ı Trp      | Ile              |
| 50 |  |            | Gly        | Asp<br>50  | ) Ile      | Tyr        | Pro            | Gly        | Gly<br>55  | Gly        | Tyr        | Thr               | Asn        | тут<br>60  | Asr         | Glu        | ı Lys      | Phe              |
|    |  |            | Lys<br>65  | Gly        | Lys        | Ala        | Thr            | Leu<br>70  | Thr        | Ala        | . Asp      | Thr               | Ser<br>75  | Ser        | Ser         | Thr        | Ala        | <b>Tyr</b><br>80 |
| 55 |  |            |            |            |            |            |                |            |            |            |            |                   |            |            |             |            |            |                  |
| 60 |  |            |            |            |            |            |                |            |            |            |            |                   |            |            |             |            |            |                  |

|    | Met        | Gln        | Leu        | Ser        | Ser<br>85  | Leu        | Thr               | Ser        | Glu        | Asp<br>90  | Ser        | Ala        | Val        | Tyr        | Phe<br>95         | Cys               |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|-------------------|
| 5  | Ala        | Tyr        | Tyr        | Asp<br>100 | Ala        | Ala        | Gly               | Pro        | Trp<br>105 | Phe        | Ala        | Tyr        | Trp        | Gly<br>110 | Gln               | Gly               |
| 10 | Thr        | Thr        | Val<br>115 | Thr        | Val        | Ser        | Gly               | Ser<br>120 | Thr        | Lys        | Gly        | Pro        | Ser<br>125 | Val        | Phe               | Pro               |
|    | Leu        | Ala<br>130 | Pro        | Ser        | Ser        | Lys        | <b>Ser</b><br>135 | Thr        | Ser        | Gly        | Gly        | Thr<br>140 | Ala        | Ala        | Leu               | Gly               |
| 15 | Cys<br>145 | Leu        | Val        | Lys        | Asp        | Tyr<br>150 | Phe               | Pro        | Glu        | Pro        | Val<br>155 | Thr        | Val        | Ser        | Trp               | Asn<br>160        |
| 20 | Ser        | Gly        | Ala        | Leu        | Thr<br>165 | Ser        | Gly               | Val        | His        | Thr<br>170 | Phe        | Pro        | Ala        | Val        | <b>Leu</b><br>175 | Gln               |
| 25 | Ser        | Ser        | Gly        | Leu<br>180 | Tyr        | Ser        | Leu               | Ser        | Ser<br>185 | Val        | Val        | Thr        | Val        | Pro<br>190 | Ser               | Ser               |
| 25 | Ser        | Leu        | Gly<br>195 | Thr        | Gln        | Thr        | Tyr               | Ile<br>200 | Cys        | Asn        | Val        | Asn        | His<br>205 | Lys        | Pro               | Ser               |
| 30 | Asn        | Thr<br>210 | Lys        | Val        | Asp        | Lys        | Lys<br>215        | Val        | Glu        | Pro        | Lys        | Ser<br>220 | Cys        | Asp        | Lys               | Thr               |
| 35 | His<br>225 | Thr        | Cys        | Pro        | Pro        | Cys<br>230 | Pro               | Ala        | Pro        | Glu        | Leu<br>235 | Leu        | Gly        | Gly        | Pro               | Ser<br>240        |
|    | Val        | Phe        | Leu        | Phe        | Pro<br>245 | Pro        | Lys               | Pro        | Lys        | Asp<br>250 | Thr        | Leu        | Met        | Ile        | Ser<br>255        | Arg               |
| 40 | Thr        | Pro        | Glu        | Val<br>260 | Thr        | Cys        | Val               | Val        | Val<br>265 | Asp        | Val        | Ser        | His        | Glu<br>270 | Asp               | Pro               |
| 45 | Glu        | Val        | Lys<br>275 | Phe        | Asn        | Trp        | Tyr               | Val<br>280 | Asp        | Gly        | Val        | Glu        | Val<br>285 | His        | Asn               | Ala               |
|    | Lys        | Thr<br>290 | Lys        | Pro        | Arg        | Glu        | Glu<br>295        | Gln        | Tyr        | Asn        | Ser        | Thr<br>300 | Tyr        | Arg        | Val               | Val               |
| 50 | Ser<br>305 | Val        | Leu        | Thr        | Val        | Leu<br>310 | His               | Gln        | Asp        | Trp        | Leu<br>315 | Asn        | Gly        | Lys        | Glu               | <b>Tyr</b><br>320 |
| 55 | Lys        | Cys        | Lys        | Val        | Ser<br>325 | Asn        | Lys               | Ala        | Leu        | Pro<br>330 | Ala        | Pro        | Ile        | Glu        | Lys<br>335        | Thr               |
| 60 |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |            |                   |                   |

|    |  | Ile        | Ser               | Lys        | Ala<br>340 | Lys        | Gly               | Gln        | Pro        | Arg<br>345 | Glu                | Pro        | Gln               | Val        | Tyr<br>350 | Thr        | Leu        |
|----|--|------------|-------------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| 5  |  | Pro        | Pro               | Ser<br>355 | Arg        | Asp        | Glu               | Leu        | Thr<br>360 | Lys        | Asn                | Gln        | Val               | Ser<br>365 | Leu        | Thr        | Cys        |
| 10 |  | Leu        | <b>Val</b><br>370 | Lys        | Gly        | Phe        | Tyr               | Pro<br>375 | Ser        | Asp        | Ile                | Ala        | <b>Val</b><br>380 | Glu        | Trp        | Glu        | Ser        |
| 45 |  | Asn<br>385 | Gly               | Gln        | Pro        | Glu        | <b>Asn</b><br>390 | Asn        | Tyr        | Lys        | Thr                | Thr<br>395 | Pro               | Pro        | Val        | Leu        | Asp<br>400 |
| 15 |  | Ser        | Asp               | Gly        | Ser        | Phe<br>405 | Phe               | Leu        | Tyr        | Ser        | Lys<br><b>4</b> 10 | Leu        | Thr               | Val        | Asp        | Lys<br>415 | Ser        |
| 20 |  | Arg        | Trp               | Gln        | Gln<br>420 | Gly        | Asn               | Val        | Phe        | Ser<br>425 | Cys                | Ser        | Val               | Met        | His<br>430 | Glu        | Ala        |
| 25 |  | Leu        | His               | Asn<br>435 | His        | Tyr        | Thr               | Gln        | Lys<br>440 | Ser        | Leu                | Ser        | Leu               | Ser<br>445 | Pro        | Gly        | Lys        |
| 30 | <210> 15<br><211> 571<br><212> PRT<br><213> Artificial<br><220><br><223> IgMc de c<br><400> 15 | adena      | a pesa            | ada        |            |            |                   |            |            |            |                    |            |                   |            |            |            |            |
| 35 |  | Gln<br>1   | val               | . Glr      | Leu        | Lys<br>5   | Glu               | Ser        | Gly        | Ala        | Glu<br>10          | Leu        | Val               | . Arg      | Pro        | Gly<br>15  | Thr        |
| 40 |  | Ser        | Val               | . Lys      | 11e<br>20  | Ser        | Cys               | Lys        | Ala        | Ser<br>25  | Gly                | Tyr        | Thr               | Phe        | Thr<br>30  | : Asn      | Tyr        |
| 45 |  | Trp        | Leu               |            |            |            |                   |            |            | Pro        |                    |            |                   |            |            | ı Trp      | Ile        |
|    |  | Gly        | Asp<br>50         | Il∈        | Tyr        | Pro        | Gly               | Gly<br>55  | Gly        | Tyr        | Thr                | Asn        | Туг<br>60         | Asn        | Glu        | . Lys      | Phe        |
| 50 |  | Lys<br>65  | Gly               | ' Lys      | Ala        | Thr        | Leu<br>70         | Thr        | Ala        | Asp        | Thr                | Ser<br>75  | Ser               | Ser        | Thr        | Ala        | Tyr<br>80  |
| 55 |  | Met        | . Gln             | Leu        | . Ser      | Ser<br>85  | Leu               | Thr        | Ser        | Glu        | 90                 | Ser        | · Ala             | . Val      | Туг        | Phe<br>95  | Cys        |
| 60 |  |            |                   |            |            |            |                   |            |            |            |                    |            |                   |            |            |            |            |

|    | Ala        | Tyr        | Tyr        | Asp<br>100         | Ala        | Ala        | Gly        | Pro        | Trp<br>105        | Phe        | Ala        | Tyr        | Trp        | Gly<br>110 | Gln               | Gly        |
|----|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|
| 5  | Thr        | Thr        | Val<br>115 | Thr                | Val        | Ser        | Gly        | Ser<br>120 | Ala               | Ser        | Ala        | Pro        | Thr<br>125 | Leu        | Phe               | Pro        |
| 10 | Leu        | Val<br>130 | Ser        | Cys                | Glu        | Asn        | Ser<br>135 | Pro        | Ser               | Asp        | Thr        | Ser<br>140 | Ser        | Val        | Ala               | Val        |
|    | Gly<br>145 | Cys        | Leu        | Ala                | Gln        | Asp<br>150 | Phe        | Leu        | Pro               | Asp        | Ser<br>155 | Ile        | Thr        | Leu        | Ser               | Trp<br>160 |
| 15 | Lys        | Tyr        | Lys        | Asn                | Asn<br>165 | Ser        | Asp        | Ile        | Ser               | Ser<br>170 | Thr        | Arg        | Gly        | Phe        | Pro<br>175        | Ser        |
| 20 | Val        | Leu        | Arg        | Gly<br>180         | Gly        | Lys        | Tyr        | Ala        | <b>Ala</b><br>185 | Thr        | Ser        | Gln        | Val        | Leu<br>190 | Leu               | Pro        |
| 25 | Ser        | Lys        | Asp<br>195 | Val                | Met        | Gln        | Gly        | Thr<br>200 | Asp               | Glu        | His        | Val        | Val<br>205 | Cys        | Lys               | Val        |
| 25 | Gln        | His<br>210 | Pro        | Asn                | Gly        | Asn        | Lys<br>215 | Glu        | Lys               | Asn        | Val        | Pro<br>220 | Leu        | Pro        | Val               | Ile        |
| 30 | Ala<br>225 | Glu        | Leu        | Pro                | Pro        | Lys<br>230 | Val        | Ser        | Val               | Phe        | Val<br>235 | Pro        | Pro        | Arg        | Asp               | Gly<br>240 |
| 35 | Phe        | Phe        | Gly        | Asn                | Pro<br>245 | Arg        | Lys        | Ser        | Lys               | Leu<br>250 | Ile        | Cys        | Gln        | Ala        | Thr<br>255        | Gly        |
|    | Phe        | Ser        | Pro        | <b>A</b> rg<br>260 | Gln        | Ile        | Gln        | Val        | Ser<br>265        | Trp        | Leu        | Arg        | Glu        | Gly<br>270 | Lys               | Gln        |
| 40 | Val        | Gly        | Ser<br>275 | Gly                | Val        | Thr        | Thr        | Asp<br>280 | Gln               | Val        | Gln        | Ala        | Glu<br>285 | Ala        | Lys               | Glu        |
| 45 | Ser        | Gly<br>290 | Pro        | Thr                | Thr        | Tyr        | Lys<br>295 | Val        | Thr               | Ser        | Thr        | Leu<br>300 | Thr        | Ile        | Lys               | Glu        |
|    | Ser<br>305 | Asp        | Trp        | Leu                | Gly        | Gln<br>310 | Ser        | Met        | Phe               | Thr        | Cys<br>315 | Arg        | Val        | Asp        | His               | Arg<br>320 |
| 50 | Gly        | Leu        | Thr        | Phe                | Gln<br>325 | Gln        | Asn        | Ala        | Ser               | Ser<br>330 | Met        | Cys        | Val        | Pro        | <b>Asp</b><br>335 | Gln        |
| 55 | Asp        | Thr        | Ala        | Ile<br>340         | Arg        | Val        | Phe        | Ala        | Ile<br>345        | Pro        | Pro        | Ser        | Phe        | Ala<br>350 | Ser               | Ile        |
| 60 |            |            |            |                    |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |                   |            |

|    |   | Phe        | Leu               | Thr<br>355 | Lys        | Ser               | Thr        | Lys        | Leu<br>360 | Thr        | Cys                | Leu        | Val        | Thr<br>365 | Asp        | Leu        | Thr        |
|----|---|------------|-------------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 5  |   | Thr        | <b>Tyr</b><br>370 | Asp        | Ser        | Val               | Thr        | Ile<br>375 | Ser        | Trp        | Thr                | Arg        | Gln<br>380 | Asn        | Gly        | Glu        | Ala        |
| 10 |   | Val<br>385 | Lys               | Thr        | His        | Thr               | Asn<br>390 | Ile        | Ser        | Glu        | Ser                | His<br>395 | Pro        | Asn        | Ala        | Thr        | Phe<br>400 |
|    |   | Ser        | Ala               | Val        | Gly        | Glu<br>405        | Ala        | Ser        | Ile        | Cys        | Glu<br><b>4</b> 10 | Asp        | Asp        | Trp        | Asn        | Ser<br>415 | Gly        |
| 15 |   | Glu        | Arg               | Phe        | Thr<br>420 | Cys               | Thr        | Val        | Thr        | His<br>425 | Thr                | Asp        | Leu        | Pro        | Ser<br>430 | Pro        | Leu        |
| 20 |   | Lys        | Gln               | Thr<br>435 | Ile        | Ser               | Arg        | Pro        | Lys<br>440 | Gly        | Val                | Ala        | Leu        | His<br>445 | Arg        | Pro        | Asp        |
| 25 |   | Val        | Tyr<br>450        | Leu        | Leu        | Pro               | Pro        | Ala<br>455 | Arg        | Glu        | Gln                | Leu        | Asn<br>460 | Leu        | Arg        | Glu        | Ser        |
|    |   | Ala<br>465 | Thr               | Ile        | Thr        | Cys               | Leu<br>470 | Val        | Thr        | Gly        | Phe                | Ser<br>475 | Pro        | Ala        | Asp        | Val        | Phe<br>480 |
| 30 |   | Val        | Gln               | Trp        | Met        | Gln<br>485        | Arg        | Gly        | Gln        | Pro        | Leu<br>490         | Ser        | Pro        | Glu        | Lys        | Tyr<br>495 | Val        |
| 35 |   | Thr        | Ser               | Ala        | Pro<br>500 | Met               | Pro        | Glu        | Pro        | Gln<br>505 | Ala                | Pro        | Gly        | Arg        | Tyr<br>510 | Phe        | Ala        |
| 40 |   | His        | Ser               | Ile<br>515 | Leu        | Thr               | Val        | Ser        | Glu<br>520 | Glu        | Glu                | Trp        | Asn        | Thr<br>525 | Gly        | Glu        | Thr        |
|    |   | Tyr        | Thr<br>530        | Cys        | Val        | Val               | Ala        | His<br>535 | Glu        | Ala        | Leu                | Pro        | Asn<br>540 | Arg        | Val        | Thr        | Glu        |
| 45 |   | Arg<br>545 | Thr               | Val        | Asp        | Lys               | Ser<br>550 | Thr        | Gly        | Lys        | Pro                | Thr<br>555 | Leu        | Tyr        | Asn        | Val        | Ser<br>560 |
| 50 |   | Leu        | Val               | Met        | Ser        | <b>Asp</b><br>565 | Thr        | Ala        | Gly        | Thr        | Cys<br>570         | Tyr        |            |            |            |            |            |
| 55 | <210> 16<br><211> 219<br><212> PRT<br><213> Artificial<br><220><br><223> cadena lig<br><400> 16 | jera d     | e IgN             | 1m         |            |                   |            |            |            |            |                    |            |            |            |            |            |            |
| 60 |   |            |                   |            |            |                   |            |            |            |            |                    |            |            |            |            |            |            |

|    |  | Asp<br>1   | Ile        | Gln        | Met        | Thr<br>5   | Gln        | Thr        | Pro        | Leu        | Ser<br>10         | Leu        | Pro        | Val        | Ser        | Leu<br>15          | Gly        |
|----|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|
| 5  |  | Asp        | Gln        | Ala        | Ser<br>20  | Ile        | Ser        | Cys        | Arg        | Ser<br>25  | Ser               | Gln        | Ser        | Ile        | Val<br>30  | His                | Ser        |
| 10 |  | Asn        | Gly        | Asn<br>35  | Thr        | Tyr        | Leu        | Glu        | Trp<br>40  | Tyr        | Leu               | Gln        | Lys        | Pro<br>45  | Gly        | Gln                | Ser        |
|    |  | Pro        | Lys<br>50  | Leu        | Leu        | Ile        | Tyr        | Lys<br>55  | Val        | Ser        | Asn               | Arg        | Phe<br>60  | Ser        | Gly        | Val                | Pro        |
| 15 |  | Asp<br>65  | Arg        | Phe        | Ser        | Gly        | Ser<br>70  | Gly        | Ser        | Gly        | Thr               | Asp<br>75  | Phe        | Thr        | Leu        | Lys                | Ile<br>80  |
| 20 |  | Ser        | Arg        | Val        | Glu        | Ala<br>85  | Glu        | Asp        | Leu        | Gly        | Val<br>90         | Tyr        | Tyr        | Cys        | Phe        | Gln<br>95          | Gly        |
| 25 |  | Ser        | His        | Val        | Pro<br>100 | Tyr        | Thr        | Phe        | Gly        | Gly<br>105 | Gly               | Thr        | Lys        | Leu        | Glu<br>110 | Ile                | Lys        |
|    |  | Arg        | Ala        | Asp<br>115 | Ala        | Ala        | Pro        | Thr        | Val<br>120 | Ser        | Ile               | Phe        | Pro        | Pro<br>125 | Ser        | Ser                | Glu        |
| 30 |  | Gln        | Leu<br>130 | Thr        | Ser        | Gly        | Gly        | Ala<br>135 | Ser        | Val        | Val               | Cys        | Phe<br>140 | Leu        | Asn        | Asn                | Phe        |
| 35 |  | Tyr<br>145 | Pro        | Lys        | Asp        | Ile        | Asn<br>150 | Val        | Lys        | Trp        | Lys               | Ile<br>155 | Asp        | Gly        | Ser        | Glu                | Arg<br>160 |
| 40 |  | Gln        | Asn        | Gly        | Val        | Leu<br>165 | Asn        | Ser        | Trp        | Thr        | <b>Asp</b><br>170 | Gln        | Asp        | Ser        | Lys        | <b>As</b> p<br>175 | Ser        |
|    |  | Thr        | Tyr        | Ser        | Met<br>180 | Ser        | Ser        | Thr        | Leu        | Thr<br>185 | Leu               | Thr        | Lys        | Asp        | Glu<br>190 | Tyr                | Glu        |
| 45 |  | Arg        | His        | Asn<br>195 | Ser        | Tyr        | Thr        | Cys        | Glu<br>200 | Ala        | Thr               | His        | Lys        | Thr<br>205 | Ser        | Thr                | Ser        |
| 50 |  | Pro        | Ile<br>210 | Val        | Lys        | Ser        | Phe        | Asn<br>215 | Arg        | Asn        | Glu               | Cys        |            |            |            |                    |            |
| 55 | <210> 17<br><211> 219<br><212> PRT<br><213> Artificial<br><220><br><223> cadena li | gera o     | de la(     | G/Mc       |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |                    |            |
| 60 | <400> 17   | •          | 5          |            |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |                    |            |

|    |  | Asp<br>1   | Ile        | Gln        | Met        | Thr<br>5   | Gln        | Thr        | Pro        | Leu        | Ser<br>10  | Leu        | Pro        | Val        | Ser               | Leu<br>15  | Gly        |
|----|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|
| 5  |  | Asp        | Gln        | Ala        | Ser<br>20  | Ile        | Ser        | Cys        | Arg        | Ser<br>25  | Ser        | Gln        | Ser        | Ile        | Val<br>30         | His        | Ser        |
| 10 |  | Asn        | Gly        | Asn<br>35  | Thr        | Tyr        | Leu        | Glu        | Trp<br>40  | Tyr        | Leu        | Gln        | Lys        | Pro<br>45  | Gly               | Gln        | Ser        |
|    |  | Pro        | Lys<br>50  | Leu        | Leu        | Ile        | Tyr        | Lys<br>55  | Val        | Ser        | Asn        | Arg        | Phe<br>60  | Ser        | Gly               | Val        | Pro        |
| 15 |  | Asp<br>65  | Arg        | Phe        | Ser        | Gly        | Ser<br>70  | Gly        | Ser        | Gly        | Thr        | Asp<br>75  | Phe        | Thr        | Leu               | Lys        | Ile<br>80  |
| 20 |  | Ser        | Arg        | Val        | Glu        | Ala<br>85  | Glu        | Asp        | Leu        | Gly        | Val<br>90  | Tyr        | Tyr        | Cys        | Phe               | Gln<br>95  | Gly        |
| 25 |  | Ser        | His        | Val        | Pro<br>100 | Tyr        | Thr        | Phe        | Gly        | Gly<br>105 | Gly        | Thr        | Lys        | Leu        | Glu<br>110        | Ile        | Lys        |
|    |  | Arg        | Thr        | Val<br>115 | Ala        | Ala        | Pro        | Ser        | Val<br>120 | Phe        | Ile        | Phe        | Pro        | Pro<br>125 | Ser               | Asp        | Glu        |
| 30 |  | Gln        | Leu<br>130 | Lys        | Ser        | Gly        | Thr        | Ala<br>135 | Ser        | Val        | Val        | Cys        | Leu<br>140 | Leu        | Asn               | Asn        | Phe        |
| 35 |  | Tyr<br>145 | Pro        | Arg        | Glu        | Ala        | Lys<br>150 | Val        | Gln        | Trp        | Lys        | Val<br>155 | Asp        | Asn        | Ala               | Leu        | Gln<br>160 |
| 40 |  | Ser        | Gly        | Asn        | Ser        | Gln<br>165 | Glu        | Ser        | Val        | Thr        | Glu<br>170 | Gln        | Asp        | Ser        | Lys               | Asp<br>175 | Ser        |
|    |  | Thr        | Tyr        | Ser        | Leu<br>180 | Ser        | Ser        | Thr        | Leu        | Thr<br>185 | Leu        | Ser        | Lys        | Ala        | <b>Asp</b><br>190 | Tyr        | Glu        |
| 45 |  | Lys        | His        | Lys<br>195 | Val        | Tyr        | Ala        | Cys        | Glu<br>200 | Val        | Thr        | His        | Gln        | Gly<br>205 | Leu               | Ser        | Ser        |
| 50 |  | Pro        | Val<br>210 | Thr        | Lys        | Ser        | Phe        | Asn<br>215 | Arg        | Gly        | Glu        | Cys        |            |            |                   |            |            |
| 55 | <210> 18<br><211> 571<br><212> PRT<br><213> Artificial<br><220><br><223> cadena pe<br><400> 18 | esada      | de Ig      | ıMm        |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |
| 60 |  |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |

|    | Gln<br>1   | Val        | Gln        | Leu        | Lys<br>5   | Gln        | Ser        | Gly        | Ala        | Glu<br>10  | Leu        | Val        | Arg        | Pro        | Gly<br>15  | Thr        |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 5  | Ser        | Val        | Lys        | Ile<br>20  | Ser        | Cys        | Lys        | Ala        | Ser<br>25  | Gly        | Tyr        | Thr        | Phe        | Thr<br>30  | Asn        | Tyr        |
| 10 | Trp        | Leu        | Gly<br>35  | Trp        | Val        | Lys        | Gln        | Arg<br>40  | Pro        | Gly        | His        | Gly        | Leu<br>45  | Glu        | Trp        | Ile        |
|    | Gly        | Asp<br>50  | Ile        | Tyr        | Pro        | Gly        | Gly<br>55  | Ser        | Tyr        | Thr        | Asn        | Tyr<br>60  | Asn        | Glu        | Lys        | Phe        |
| 15 | Lys<br>65  | Gly        | Lys        | Ala        | Thr        | Leu<br>70  | Thr        | Ala        | Asp        | Thr        | Ser<br>75  | Ser        | Ser        | Thr        | Ala        | Tyr<br>80  |
| 20 | Met        | Gln        | Leu        | Ser        | Ser<br>85  | Leu        | Thr        | Ser        | Glu        | Asp<br>90  | Ser        | Ala        | Val        | Tyr        | Phe<br>95  | Cys        |
| 25 | Ala        | Arg        | Tyr        | Asp<br>100 | Asn        | His        | Tyr        | Phe        | Asp<br>105 | Tyr        | Trp        | Gly        | Gln        | Gly<br>110 | Thr        | Thr        |
|    | Leu        | Thr        | Val<br>115 | Ser        | Glu        | Ser        | Gln        | Ser<br>120 | Phe        | Pro        | Asn        | Val        | Phe<br>125 | Pro        | Leu        | Val        |
| 30 | Ser        | Cys<br>130 | Glu        | Ser        | Pro        | Leu        | Ser<br>135 | Asp        | Lys        | Asn        | Leu        | Val<br>140 | Ala        | Met        | Gly        | Cys        |
| 35 | Leu<br>145 | Ala        | Arg        | Asp        | Phe        | Leu<br>150 | Pro        | Ser        | Thr        | Ile        | Ser<br>155 | Phe        | Thr        | Trp        | Asn        | Tyr<br>160 |
| 40 | Gln        | Asn        | Asn        | Thr        | Glu<br>165 | Val        | Ile        | Gln        | Gly        | Ile<br>170 | Arg        | Thr        | Phe        | Pro        | Thr<br>175 | Leu        |
| 40 | Arg        | Thr        | Gly        | Gly<br>180 | Lys        | Tyr        | Leu        | Ala        | Thr<br>185 | Ser        | Gln        | Val        | Leu        | Leu<br>190 | Ser        | Pro        |
| 45 | Lys        | Ser        | Ile<br>195 | Leu        | Glu        | Gly        | Ser        | Asp<br>200 | Glu        | Tyr        | Leu        | Val        | Cys<br>205 | Lys        | Ile        | His        |
| 50 | Tyr        | Gly        | Gly        | Lys        | Asn        | Arg        | Asp        | Leu        | His        | Val        | Pro        | Ile        | Pro        | Ala        | Val        | Ala        |
|    |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
| 55 |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
| 60 |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |

## ES 2 686 313 T3

|    |            | 210        |            |            |            |                   | 215        |            |            |                   |            | 220        |            |            |                            |            |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|----------------------------|------------|
| 5  | Glu<br>225 | Met        | Asn        | Pro        | Asn        | Val<br>230        | Asn        | Val        | Phe        | Val               | Pro<br>235 | Pro        | Arg        | Asp        | Gly                        | Phe<br>240 |
| 10 | Ser        | Gly        | Pro        | Ala        | Pro<br>245 | Arg               | Lys        | Ser        | Lys        | <b>Leu</b><br>250 | Ile        | Cys        | Glu        | Ala        | Thr<br>255                 | Asn        |
| 10 | Phe        | Thr        | Pro        | Lys<br>260 | Pro        | Ile               | Thr        | Val        | Ser<br>265 | Trp               | Leu        | Lys        | Asp        | Gly<br>270 | Lys                        | Leu        |
| 15 | Val        | Glu        | Ser<br>275 | Gly        | Phe        | Thr               | Thr        | Asp<br>280 | Pro        | Val               | Thr        | Ile        | Glu<br>285 | Asn        | Lys                        | Gly        |
| 20 | Ser        | Thr<br>290 | Pro        | Gln        | Thr        | Tyr               | Lys<br>295 | Val        | Ile        | Ser               | Thr        | Leu<br>300 | Thr        | Ile        | Ser                        | Glu        |
|    | Ile<br>305 | Asp        | Trp        | Leu        | Asn        | Leu<br>310        | Asn        | Val        | Tyr        | Thr               | Cys<br>315 | Arg        | Val        | Asp        | His                        | Arg<br>320 |
| 25 | Gly        | Leu        | Thr        | Phe        | Leu<br>325 | Lys               | Asn        | Val        | Ser        | Ser<br>330        | Thr        | Cys        | Ala        | Ala        | Ser<br>335                 | Pro        |
| 30 | Ser        | Thr        | Asp        | Ile<br>340 | Leu        | Thr               | Phe        | Thr        | Ile<br>345 | Pro               | Pro        | Ser        | Phe        | Ala<br>350 | Asp                        | Ile        |
| 35 | Phe        | Leu        | Ser<br>355 | Lys        | Ser        | Ala               | Asn        | Leu<br>360 | Thr        | Cys               | Leu        | Val        | Ser<br>365 | Asn        | Leu                        | Ala        |
|    | Thr        | Tyr<br>370 | Glu        | Thr        | Leu        | Asn               | Ile<br>375 | Ser        | Trp        | Ala               | Ser        | Gln<br>380 | Ser        | Gly        | Glu                        | Pro        |
| 40 | Leu<br>385 | Glu        | Thr        | Lys        | Ile        | <b>Lys</b><br>390 | Ile        | Met        | Glu        | Ser               | His<br>395 | Pro        | Asn        | Gly        | Thr                        | Phe<br>400 |
| 45 | Ser        | Ala        | Lys        | Gly        | Val<br>405 | Ala               | Ser        | Val        | Cys        | Val<br>410        | Glu        | Asp        | Trp        | Asn        | <b>As</b> n<br><b>4</b> 15 | Arg        |
| F0 | Lys        | Glu        | Phe        | Val<br>420 | Cys        | Thr               | Val        | Thr        | His<br>425 | Arg               | Asp        | Leu        | Pro        | Ser<br>430 | Pro                        | Gln        |
| 50 | Lys        | Lys        | Phe<br>435 | Ile        | Ser        | Lys               | Pro        | Asn<br>440 | Glu        | Val               | His        | Lys        | His<br>445 | Pro        | Pro                        | Ala        |
| 55 | Val        | Tyr<br>450 | Leu        | Leu        | Pro        | Pro               | Ala<br>455 | Arg        | Glu        | Gln               | Leu        | Asn<br>460 | Leu        | Arg        | Glu                        | Ser        |
| 60 |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |                   |            |            |            |            |                            |            |
|    |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |                   |            |            |            |            |                            |            |

## ES 2 686 313 T3

|    |   | Ala<br>465 | Thr        | Val        | Thr        | Cys            | Leu<br>470 | Val        | Lys        | Gly        | Phe        | Ser<br>475        | Pro        | Ala        | Asp        | Ile        | Ser<br>480 |
|----|---|------------|------------|------------|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 5  |   | Val        | Gln        | Trp        | Leu        | Gln<br>485     | Arg        | Gly        | Gln        | Leu        | Leu<br>490 | Pro               | Gln        | Glu        | Lys        | Tyr<br>495 | Val        |
| 10 |   | Thr        | Ser        | Ala        | Pro<br>500 | Met            | Pro        | Glu        | Pro        | Gly<br>505 | Ala        | Pro               | Gly        | Phe        | Tyr<br>510 | Phe        | Thr        |
| 45 |   | His        | Ser        | Ile<br>515 | Leu        | Thr            | Val        | Thr        | Glu<br>520 | Glu        | Glu        | Trp               | Asn        | Ser<br>525 | Gly        | Glu        | Thr        |
| 15 |   | Tyr        | Thr<br>530 | Cys        | Val        | Val            | Gly        | His<br>535 | Glu        | Ala        | Leu        | Pro               | His<br>540 | Leu        | Val        | Thr        | Glu        |
| 20 |   | Arg<br>545 | Thr        | Val        | Asp        | Lys            | Ser<br>550 | Thr        | Gly        | Lys        | Pro        | Thr<br>555        | Leu        | Tyr        | Asn        | Val        | Ser<br>560 |
| 25 | <210> 19<br><211> 219   | Leu        | Ile        | Met        | Ser        | <b>Asp</b> 565 | Thr        | Gly        | Gly        | Thr        | Cys<br>570 | Tyr               |            |            |            |            |            |
| 30 | <212> PRT <213> Artificial <220> <223> cadena ligera de IgMm <400> 19 |            |            |            |            |                |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |
| 35 |   | Asp<br>1   | Ile        | Val        | Ile        | Thr<br>5       | Gln        | Thr        | Pro        | Leu        | Ser<br>10  | Leu               | Pro        | Val        | Ser        | Leu<br>15  | Gly        |
|    |   | Asp        | Gln        | Ala        | Ser<br>20  | Ile            | Ser        | Cys        | Arg        | Ser<br>25  | Ser        | Gln               | Ser        | Leu        | Leu<br>30  | His        | Ser        |
| 40 |   | Asn        | Gly        | Asn<br>35  | Thr        | Tyr            | Leu        | His        | Trp<br>40  | Tyr        | Leu        | Gln               | Lys        | Pro<br>45  | Gly        | Gln        | Ser        |
| 45 |   | Pro        | Lys<br>50  | Leu        | Leu        | Ile            | Tyr        | Lys<br>55  | Val        | Ser        | Asn        | Arg               | Phe<br>60  | Ser        | Gly        | Val        | Pro        |
| 50 |   | Asp<br>65  | Arg        | Phe        | Ser        | Gly            | Ser<br>70  | Gly        | Ser        | Gly        | Thr        | <b>As</b> p<br>75 | Phe        | Thr        | Leu        | Lys        | Ile<br>80  |
|    |   | Ser        | Arg        | Val        | Glu        | Ala<br>85      | Glu        | Asp        | Leu        | Gly        | Val<br>90  | Tyr               | Phe        | Cys        | Ser        | Gln<br>95  | Ser        |
| 55 |   | Thr        | His        | Val        | Pro        | Tyr            | Thr        | Phe        | Gly        | Gly        | Gly        | Thr               | Lys        | Leu        | Glu        | Ile        | Lys        |
| 60 |   |            |            |            |            |                |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |

## ES 2 686 313 T3

|    |  |            |            |            | 100        |            |            |            |            | 105        |                   |            |            |            | 110        |            |            |
|----|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 5  |  | Arg        | Ala        | Asp<br>115 | Ala        | Ala        | Pro        | Thr        | Val<br>120 | Ser        | Ile               | Phe        | Pro        | Pro<br>125 | Ser        | Ser        | Glu        |
| 10 |  | Gln        | Leu<br>130 | Thr        | Ser        | Gly        | Gly        | Ala<br>135 | Ser        | Val        | Val               | Cys        | Phe<br>140 | Leu        | Asn        | Asn        | Phe        |
|    |  | Tyr<br>145 | Pro        | Lys        | Asp        | Ile        | Asn<br>150 | Val        | Lys        | Trp        | Lys               | Ile<br>155 | Asp        | Gly        | Ser        | Glu        | Arg<br>160 |
| 15 |  | Gln        | Asn        | Gly        | Val        | Leu<br>165 | Asn        | Ser        | Trp        | Thr        | <b>Asp</b><br>170 | Gln        | Asp        | Ser        | Lys        | Asp<br>175 | Ser        |
| 20 |  | Thr        | Tyr        | Ser        | Met<br>180 | Ser        | Ser        | Thr        | Leu        | Thr<br>185 | Leu               | Thr        | Lys        | Asp        | Glu<br>190 | Tyr        | Glu        |
| 25 |  | Arg        | His        | Asn<br>195 | Ser        | Tyr        | Thr        | Cys        | Glu<br>200 | Ala        | Thr               | His        | Lys        | Thr<br>205 | Ser        | Thr        | Ser        |
|    |  | Pro        | Ile<br>210 | Val        | Lys        | Ser        | Phe        | Asn<br>215 | Arg        | Asn        | Glu               | Cys        |            |            |            |            |            |
| 30 | <210> 20<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Artificial                                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |
| 35 | <220> <223> iniciador de <400> 20 agagtttgat cmtggc                                  |            | Nr 16      | S<br>20    |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |
| 40 | <210> 21<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Artificial<br><220><br><223> iniciador de | e ARN      | Nr 16      | S          |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |
| 45 | <400> 21<br>gwattaccgc ggckg   | ctg        | 1          | 18         |            |            |            |            |            |            |                   |            |            |            |            |            |            |

## Reivindicaciones

5

10

15

20

25

35

40

45

50

55

- 1. Un microorganismo positivo a core-1 de la especie *Bacteroides xylanisolvens* o un lisado de este positivo a core-1, en donde dicho microorganismo o lisado de este se reconoce por al menos un anticuerpo específico para core-1; en donde dicho microorganismo positivo a core-1 es de la cepa DSM 25004 (Coreóticos), o un microorganismo derivado de este, en donde el microorganismo derivado de la cepa DSM 25004 tiene las siguientes características: a) pertenece a la especie *Bacteroides xylanisolvens*; y
  - b) en un cultivo celular de dicho microorganismo, al menos el 80 % de los microorganismos tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 80 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de la cepa DSM 25004.
- 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo derivado de la cepa DSM 25004 tiene dos o más de las siguientes características:
  - a) en un ensayo de hibridación ADN-ADN, muestra una relación ADN-ADN de al menos el 50 %, preferentemente, al menos 70 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 %, con la máxima preferencia al menos 99 % con la cepa DSM 25004 y/o el *Bacteroides xylanisolvens* depositado como DSM 18836;
  - b) muestra un nivel de similitud de la secuencia del gen de ARNr 16S de al menos el 98 %, preferentemente, al menos 99 % o al menos 99,5 %, con mayor preferencia 100 % con la cepa DSM 25004 y/o *Bacteroides xylanisolvens* depositado como DSM 18836; y/o
  - c) muestra una expresión de antígeno core-1 que tiene una o más de las siguientes características:
- i) tiene una expresión promedio de antígeno core-1 de al menos el 80 %, preferentemente, al menos 85 %, o al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 95 % de la expresión promedio de core-1 de la cepa DSM 25004;
  - ii) alcanza en promedio un valor de absorbancia de al menos 0,3, preferentemente, al menos 0,35 en un ensayo ELISA como se describe en el ejemplo 2;
  - iii) expresa en la superficie celular al menos una estructura de carbohidratos seleccionada del grupo que consiste en las estructuras núm. 1, núm. 2, núm. 3, núm. 4 y núm. 5 de la figura 4, estructuras análogas de estas, y/o
  - iv) en un cultivo celular de dicho microorganismo, al menos el 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia aproximadamente 100 % de dichos microorganismos tienen un nivel de expresión del antígeno core-1 que es al menos el 80 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de la cepa DSM 25004.
- 30 3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho microorganismo tiene una expresión de antígeno core-1 que tiene una o más de las siguientes características:
  - a) tiene en promedio un valor de absorbancia de al menos 0,3 y con mayor preferencia de al menos 0,35 en un ensayo ELISA como se describe en el ejemplo 2; y/o
  - b) es capaz de producir ácidos grasos de cadena corta.
  - 4. El microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en donde el microorganismo o lisado de este se reconoce y se une por lo menos a un anticuerpo específico para core-1 cuando el anticuerpo específico para core-1 se pone en contacto con el microorganismo o lisado de este bajo condiciones apropiadas de unión, en donde dicha unión del anticuerpo específico para core-1 al microorganismo o al lisado de este cumple una o más de las siguientes características:
    - a) el anticuerpo específico para core-1 se selecciona del grupo de los siguientes anticuerpos:
    - i) un anticuerpo que tiene un conjunto de CDR que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1 como CDR-H1, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2 como CDR-H2, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 como CDR-H3, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 4 como CDR-L1, la secuencia de
    - secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 4 como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 5 como CDR-L2 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 6 como CDR-L3; ii) un anticuerpo que tiene un conjunto de CDR que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la
    - sec. con núm. de ident.: 7 como CDR-H1, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 8 como CDR-H2, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 9 como CDR-H3, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 10 como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 11 como CDR-L2 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 12 como CDR-L3;
    - iii) el anticuerpo Nemod-TF1 y
    - iv) el anticuerpo Nemod-TF2;
      - b) el microorganismo o el lisado de este se une por al menos dos anticuerpos específicos para core-1, donde dichos al menos dos anticuerpos diferentes reconocen epítopos diferentes y se seleccionan, preferentemente, del grupo de anticuerpos definidos en la reivindicación 4 a), en particular anticuerpos i) y ii) o anticuerpos iii) y iv);
    - c) la unión de al menos un anticuerpo específico para core-1 al microorganismo o el lisado de este es sensible al peryodato ya que la unión se reduce o está ausente después del tratamiento con peryodato; y/o
    - d) el microorganismo o el lisado de este comprende el antígeno core-1 en una forma expuesta, en donde dicho antígeno core-1 expuesto no se enmascara por otras estructuras, en particular por otras estructuras de carbohidrato.

- 5. Una composición que comprende microorganismos positivos para core-1 o un lisado de estos positivo a core-1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4.
- 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los microorganismos positivos para core-1 de la especie *Bacteroides xylanisolvens* en la composición se caracterizan por una expresión del antígeno core-1 como se define en la reivindicación 3 y/o 4.
- 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde al menos el 90 %, preferentemente, al menos el 95 %, con mayor preferencia aproximadamente el 100 % de los microorganismos positivos a core-1 en la composición tienen un nivel de expresión del antígeno del core-1 que es
  - a) al menos el 75 % del nivel de expresión promedio del antígeno core-1 de todos los microorganismos positivos a core-1 en la composición, y/o al menos el 75 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de la cepa DSM 25004; y/o
  - b) en el intervalo del 70 % al 150 %, preferentemente, del 75 % al 125 % del nivel de expresión promedio del antígeno core-1 de todos los microorganismos positivos a core-1 en el cultivo, y/o en el intervalo del 70 % al 150 %, preferentemente, del 75 % al 125 % de la expresión promedio del antígeno core-1 de la cepa DSM 25004.
  - 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 7, que tiene una o más de las siguientes características:
    - a) dicha composición es un cultivo celular y/o
    - b) el microorganismo positivo a core-1 o los microorganismos positivos a core-1 en la composición están presentes en una forma viable, no reproductiva, no viable o lisada.
  - 9. Una composición farmacéutica que comprende:

15

20

45

- i) un microorganismo positivo a core-1 o un lisado de este positivo a core-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4.
  - ii) una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 8.
- 30 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para inducir y/o potenciar una respuesta inmune contra el antígeno core-1.
- El microorganismo o lisado de este positivo a core-1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 8, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 para uso en medicina, preferentemente, para el tratamiento o prevención de tumores positivos core-1, cánceres, trastornos gastrointestinales y/o enfermedades positivas a core-1.
  - 12. Un método para fabricar un producto positivo core-1, que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar el microorganismo positivo a core-1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4;
  - b) tratar opcionalmente dicho microorganismo positivo a core-1 con el fin de obtener un lisado o fracción de este positivo a core-1;
  - c) usar dicho microorganismo positivo a core-1 y/o dicho lisado o fracción de este positivo a core-1 en la fabricación del producto positivo a core-1.
  - 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el producto positivo a core-1 es una célula presentadora de antígeno, preferentemente, una célula dendrítica, y en el que la etapa c) comprende cargar dicha célula presentadora de antígeno con dicho microorganismo positivo a core-1 y/o dicho lisado o fracción de este positivo a core-1.
- 14. El uso de un microorganismo positivo a core-1 y/o de un lisado de este positivo a core-1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4 *in vitro* para inducir o potenciar una respuesta inmune específica para core-1 y/o para inducir un título de anticuerpos contra core-1 y/o para generar células presentadoras de antígenos funcionales, preferentemente, células dendríticas, y/o células T activadas, líneas de células T o clones de células T o anticuerpos contra core-1.

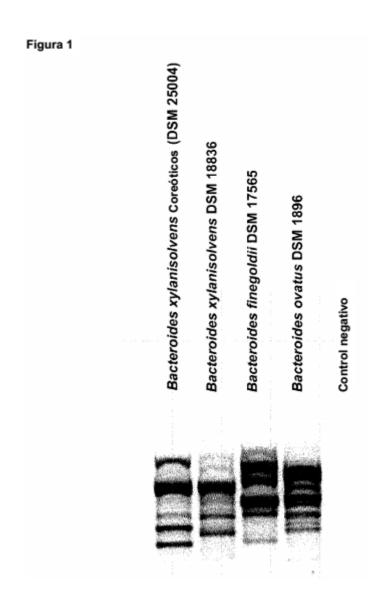
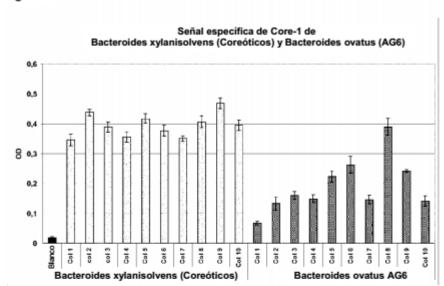
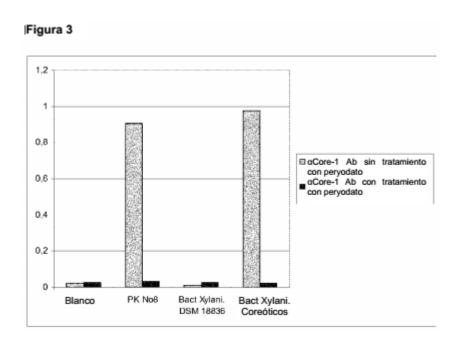
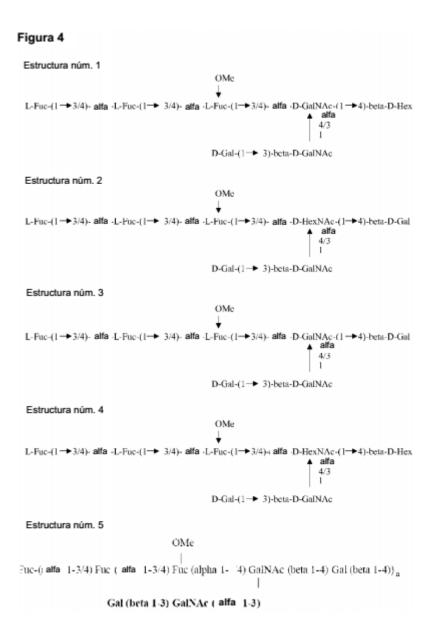
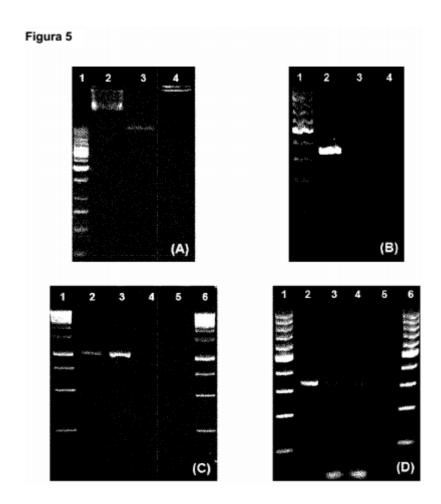


Figura 2









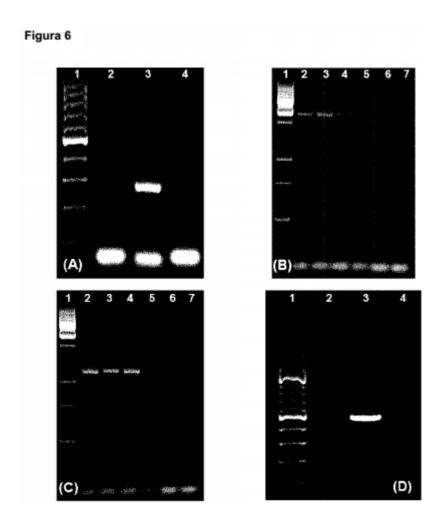
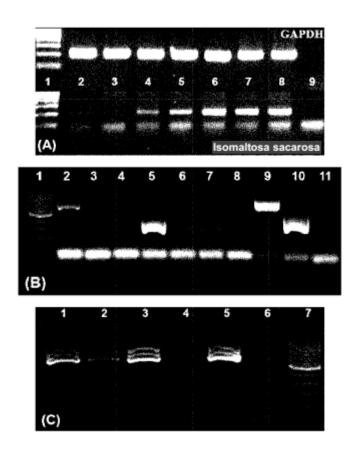
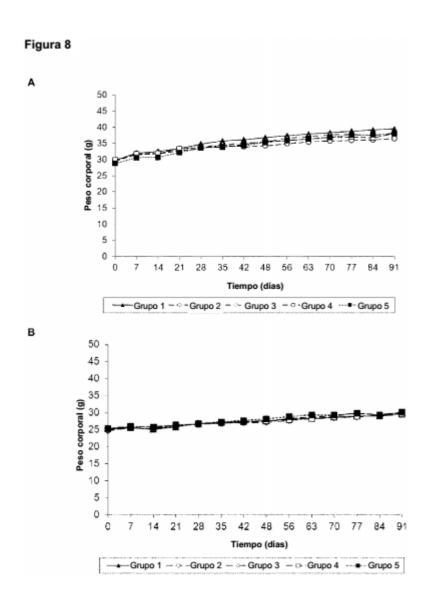
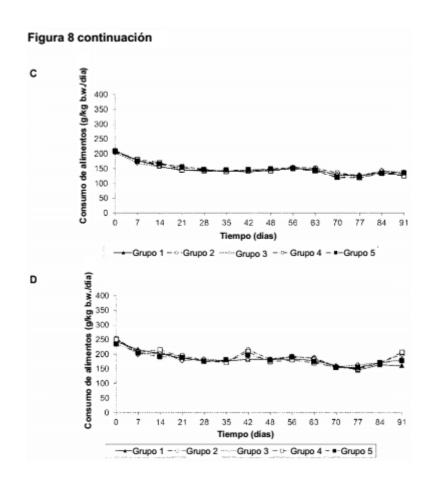


Figura 7







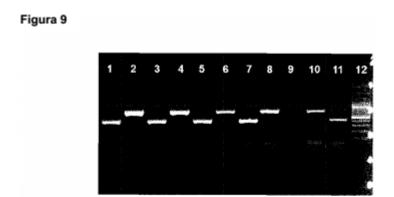


Figura 10

