

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 045**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2007 PCT/EP2007/009766**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2008 WO08055703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2007 E 07819755 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2099480**

54 Título: **Microorganismos o fracciones de los mismos capaces de activar inmunidad celular contra carbohidratos**

30 Prioridad:

**10.11.2006 EP 06090208
10.11.2006 EP 06090209**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOLETZ, STEFFEN;
ULSEMER, PHILIPPE y
LÖFFLER, ANJA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 715 045 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismos o fracciones de los mismos capaces de activar inmunidad celular contra carbohidratos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales y cáncer. Más particularmente, la presente invención se refiere a la prevención y tratamiento de carcinomas que son positivos al Nuclear-1 y, por lo tanto, portan el antígeno Nuclear-1. La invención proporciona nutracéuticos y composiciones farmacéuticas que comprenden un microorganismo positivo al Nuclear-1 y fracciones del mismo que son adecuadas para inducir respuestas inmunes contra el Nuclear-1 y, por lo tanto, también contra células tumorales portadoras del Nuclear-1 y moléculas portadoras del Nuclear-1. Al inducir o mejorar una respuesta inmune específica contra el Nuclear-1, estas composiciones proporcionan una protección contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1. Además, se describen métodos para la identificación, selección y aislamiento de microorganismos positivos al Nuclear-1 que son adecuados como parte eficaz de las composiciones nutracéuticas o farmacéuticas que inducen una respuesta inmune contra el Nuclear-1 en humanos o animales. Los sistemas de prueba de respuesta inmune humoral y celular específicos para probar las respuestas inmunes específicas del Nuclear-1 y los métodos para la generación de anticuerpos anti-Nuclear-1 y composiciones de anticuerpos, y se describen también las células dendríticas anti-Nuclear-1, las células T activadas, las líneas de células T y los clones.

Antecedentes de la invención

La glicosilación aberrante es un sello característico de las células cancerosas. Los antígenos tumorales de carbohidratos en las glucoproteínas y los glicolípidos son, por lo tanto, objetivos de la inmunoterapia activa y pasiva. Estos antígenos altamente abundantes se expresan de novo o se sobreexpresan debido a los cambios en el complejo aparato de glicosilación de las células tumorales. Se describen diversos antígenos tumorales de carbohidratos unidos a lípidos o proteínas, por ejemplo GM2, GD2, GD3, GM1 fucosilado, Globo H, Le^y y las estructuras del núcleo de mucina Tn, Sialyl-Tn y el antígeno de Thomson Friedenreich.

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

El Nuclear-1 es el disacárido Gal β 1-3 GalNAc, que se une de forma O-glicosídica en una configuración alfa-anomérica a los hidroxiaminoácidos serina o treonina de proteínas en células de carcinoma. Nuclear-1 corresponde a la estructura alfa de TF de Thomsen-Friedenreich y está enlazada solo a proteínas en tumores. Por lo tanto, los términos Nuclear-1 y Thomsen-Friedenreich no se refieren necesariamente a estructuras idénticas.

El antígeno Nuclear-1 está enmascarado por otros componentes de carbohidratos en tejidos sanos y enfermos benignos, pero se descubre en la mayoría de los carcinomas y en algunas neoplasias malignas no epiteliales. Por lo tanto, el antígeno Nuclear-1 es un antígeno de pancarcinoma específico (véase la Figura 20 para una ilustración).

Nuclear-1 es un importante antígeno tumoral. El Nuclear-1 se expresa en más del 60% de los carcinomas primarios de colon y en más del 90% de las metástasis hepáticas por cáncer de colon, así como en la mayoría de los carcinomas de otras indicaciones principales, incluidos cánceres de mama, pulmón, ovario, próstata y otros tipos de cáncer gastrointestinal, como carcinomas gástricos, y pancreáticos. El Nuclear-1 es un marcador de pronóstico independiente para pacientes con carcinomas de colon; la tasa de mortalidad aumenta y la supervivencia del medio disminuye de acuerdo con la intensidad creciente de la expresión del Nuclear-1. El desarrollo de metástasis hepáticas se correlaciona con la expresión del Nuclear-1. Los pacientes con carcinomas primarios positivos al Nuclear-1 desarrollan metástasis hepáticas en casi el 60% de los casos, mientras que el riesgo de metástasis hepáticas con tumores Negativo al Nuclear-1 es significativamente menor (menos del 20%). Además de mediar metástasis en el hígado, Nuclear-1 también puede desempeñar 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 Nuclear-1 sean una diana principal para la inmunoterapia del cáncer.

Hubo intentos de proporcionar un enfoque de terapia basado en Thomsen-Friedenreich. Por ejemplo, Shigoeka et al (1999) describen la inhibición de la metástasis hepática de células Colon 26 tratadas con neuramidasas por 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 dominios de unión única, los anticuerpos específicos de TF no se desarrollaron más hasta el momento. Además, algunos anticuerpos anti-TF-Ag no son clínicamente útiles porque causan una proliferación indeseable de células tumorales. Asimismo, el documento WO2006/012626 describe el uso terapéutico de anticuerpos antígeno-anti-TF. Se ha demostrado que la unión de Abs específica para TF inhibe la proliferación de células tumorales (Jeschke, et.al. 2006).

Además, también hubo intentos de desarrollar vacunas basadas en Thomsen-Friedenreich. La mayoría de ellos se centraron en la inducción de respuestas de anticuerpos. Por ejemplo, Livingston and Lloyd (2000) utilizaron conjugados de TF no naturales, en los que el TF sintético se acopló aleatoriamente a KLH. Estos conjugados generaron una respuesta inmune humoral contra TF sintético, pero no contra TF en ligandos naturales (Adluri et al, 1995). Por lo tanto, no eran específicos de TF ya que no reconocerían TF en una estructura tumoral.

Springer y Desai utilizaron la vacunación con una vacuna T/Tn compuesta por glucoproteínas derivadas de glóbulos rojos de los tipos O y MN que dieron como resultado una mejor supervivencia de las pacientes 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 los anticuerpos contra TF-Ag involucran anticuerpos IgM, por lo tanto, se necesitarían respuestas más específicas de TF más pronunciadas y, preferiblemente, una respuesta IgG.

Se conocen pocos reportes que describan microorganismos supuestamente positivos para TF. Por ejemplo, Springer et al. (Brit. J Haematol, 1 981,47,453-460, Transfusion 1979, vol. 19, no.3 pp. 233-249) informan sobre un microorganismo aeróbico (E. coli 086) que puede generar una respuesta de anticuerpos policlonales en pollos y humanos que también pueden reconocer TF en eritrocitos humanos. Springer utilizó la adsorción de los ensayos anti-T y 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 la aparición de varios epítomos de carbohidratos, entre ellos, pero no exclusivamente el TF. Por lo tanto, la reacción probada por Springer no muestra una especificidad por TF debido a reactividades cruzadas. Un microorganismo no específico respectivo solo tiene una idoneidad limitada como vacuna debido a su falta de especificidad, ya que no generaría una respuesta inmune fuerte que se dirija específicamente contra el TF, pero contra estructuras similares a las del TF y, por lo tanto, potencialmente también contra los tejidos o células no tumorales del cuerpo.

Debido a la complejidad y especificidad de la especie de la maquinaria de glicosilación, aún no hay inmunoterapia basada en Nuclear-1 disponible para pacientes con cáncer. Aun más importante, no hay un agente disponible para los pacientes que pueda prevenir el desarrollo de tumores positivos al Nuclear-1.

Las terapias convencionales generalmente comienzan después del diagnóstico del tumor, cuando los tumores a menudo están bien establecidos y son difíciles de tratar. Por lo tanto, se utilizan terapias agresivas con efectos secundarios graves (quimioterapia, radioterapia, cirugía) para liberar a los pacientes del volumen tumoral. Las opciones inmunoterapéuticas se aplican principalmente en el entorno adyuvante con enfermedad residual mínima.

El objeto de la presente invención es proporcionar medios para el tratamiento o la prevención de tumores positivos al Nuclear-1 y trastornos gastrointestinales, así como herramientas adecuadas para obtener los medios respectivos.

Descripción de la invención

La siguiente especificación describe los nutraceuticos y las composiciones farmacéuticas que comprenden un microorganismo positivo al Nuclear-1 o sus fracciones, así como los microorganismos positivos al Nuclear-1 y sus fracciones adecuadas para inducir respuestas inmunitarias contra las células tumorales portadoras del Nuclear-1 y las moléculas portadoras del Nuclear-1. Además, describe métodos para la identificación, selección y aislamiento de microorganismos positivos al Nuclear-1 que son adecuados como parte efectiva de composiciones nutraceuticas o farmacéuticas que inducen una respuesta inmune contra el Nuclear-1 en humanos o animales. También describe sistemas específicos de prueba de respuesta inmune humoral y celular para probar las respuestas inmunes del Nuclear-1. También describe métodos para la generación de anticuerpos anti-Nuclear-1 y composiciones de anticuerpos, así como líneas celulares y clones anti-Nuclear-1 y células dendríticas funcionales que presentan Nuclear-1.

La presente invención proporciona los siguientes aspectos:

- Una formulación seleccionada del grupo que consiste en una composición nutraceutica y/o farmacéutica, que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides y/o al menos una fracción positiva al Nuclear-1 o un lisado del mismo, en donde un microorganismo positivo y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su lisado es reconocido por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1; en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su lisado por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 es sensible a la peryodación y muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato.

- Un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides y/o una fracción positiva al Nuclear-1 o un lisado del mismo para usar en un método de tratamiento o prevención de tumores; en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido y, por lo tanto, se une por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 al contacto, y en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 por el al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 es sensible al peryodato y muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato.

• Un método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides de una mezcla de microorganismos, que comprende

- 5 (a) poner en contacto un anticuerpo específico del Nuclear-1 con una mezcla de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en microorganismos de un ser humano y/o paciente sano, un animal, suelo, alimentos y/o plantas, y/o microorganismos del tracto gastrointestinal humano, heces humanas, sangre humana, tejido humano y/o fluidos corporales humanos de individuos y/o pacientes sanos; y
- (b) aislar un microorganismo del género Bacteroides unido por dicho anticuerpo específico del Nuclear-1; y
- (c) seleccionar el microorganismo que muestra una unión reducida del anticuerpo específico Nuclear-1 después del tratamiento con peryodato.

10 • Un método para generar una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1, que comprende poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas con una cantidad adecuada de microorganismos positivos al Nuclear-1 de acuerdo con la invención y/o un lisado positivo al Nuclear-1 o una fracción de los mismos para generar al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1.

15 • Un método para generar una célula T activada, células T, clon de células T o línea de células T contra el Nuclear-1, que comprende poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas funcionales contra el Nuclear-1 obtenida por el método de acuerdo con la invención con una cantidad adecuada de al menos una célula T; y cultivar dichas células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas para activar o cebar dichas células T contra el Nuclear-1.

El alcance de la invención está determinado por las reivindicaciones adjuntas.

20 Por lo tanto, la presente invención proporciona los medios para la inducción o elevación de niveles específicos de anticuerpos anti-Nuclear-1 en humanos, induciendo así una respuesta inmune protectora contra tumores, especialmente tumores positivos al Nuclear-1s. Además, la invención proporciona los medios para la inducción de una respuesta inmune celular específica contra una diana de carbohidratos y especialmente contra una diana de carbohidratos específica de tumor tal como Nuclear-1. La invención también proporciona métodos para la

25 identificación y el aislamiento de microorganismos positivos al Nuclear-1 adecuados. Otra ventaja de la presente invención es que, debido a la naturaleza de la formulación, la producción es posible a costes muy bajos. Además, la formulación puede producirse rápidamente en fermentadores a gran escala.

Los anticuerpos anti-Nuclear-1, inducidos por la formulación de la presente invención, sirven como un mecanismo de inmunovigilancia que puede prevenir el desarrollo de tumores primarios y la distribución de metástasis en la mayoría de los casos (no reconocidos), sin embargo, solo si la respuesta inmune es suficientemente alta. Por lo tanto, el

30 objetivo de la invención es proporcionar los medios para inducir un alto título anti-Nuclear-1 específico, preferiblemente combinado con una respuesta celular específica, utilizando microorganismos positivos a Nuclear-1, preferiblemente de la flora intestinal de donantes sanos como aditivos alimentarios para crear un escudo inmunitario específico contra los tumores o prevenir o reducir la incidencia de tumores positivos al Nuclear-1s y/o sus

35 metástasis.

A) Nutracéuticos, composiciones farmacéuticas y pruebas de respuesta inmune.

Según un primer aspecto, la invención proporciona una formulación seleccionada del grupo que consiste en un nutracéutico y/o una composición farmacéutica, que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides y/o al menos una fracción positiva para el Nuclear-1 o lisado del mismo, en donde el

40 microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o la fracción positiva para el Nuclear-1 o lisado del mismo es reconocido por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1; en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su lisado por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 es sensible a la peryodación y muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato. La invención proporciona así un nutracéutico o una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo

45 positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides o al menos una fracción positiva para el Nuclear-1 o un lisado del mismo, en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido y, por lo tanto, unido por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 en contacto; en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su lisado por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 es sensible a la peryodación y muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato.

50 Un aspecto importante de la presente invención es que el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o el lisado positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo es reconocido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1. Por lo tanto, el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o el lisado positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo se une específicamente por un anticuerpo específico para el Nuclear-1 cuando se pone en contacto con dicho anticuerpo. La estructura Nuclear-1 es, por lo tanto, accesible para dicho anticuerpo específico para el Nuclear-1 en el

55 microorganismo positivo al Nuclear-1 de la presente invención y no está "oculta" por otras estructuras. Esta importante característica que puede determinarse después de la prueba -las pruebas adecuadas se describen a continuación- garantiza que el microorganismo específico del Nuclear-1 y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su

lisado lleve el Nuclear-1 y, por lo tanto, sea al menos inmunoquímicamente virtualmente idéntico al Nuclear-1 y no es un epítopo que sea simplemente similar a Nuclear-1. Esta característica es importante para garantizar que una respuesta inmune sea activada por dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 que sea suficientemente específico para el Nuclear-1. Dichos anticuerpos específicos del Nuclear-1 que pueden usarse para determinar que un microorganismo transporta Nuclear-1, reconocen específicamente la estructura del Nuclear-1 en un tumor relevante. Por lo tanto, estos anticuerpos pueden usarse para determinar que los microorganismos positivos al Nuclear-1 de la presente invención portan estructuras Nuclear-1 que imitan específicamente el antígeno Nuclear-1 presente en trastornos y tumores gastrointestinales humanos. Esta característica, la especificidad Nuclear-1, delinea los microorganismos positivos al Nuclear de la presente invención de los microorganismos conocidos en la técnica anterior que supuestamente portan el antígeno Thomsen-Friedenreich. Como se describió anteriormente y se mostrará en los ejemplos comparativos a continuación, los microorganismos conocidos en la técnica anterior transportaban estructuras de carbohidratos que eran simplemente similares a Thomsen-Friedenreich (o Nuclear-1) y, por lo tanto, reaccionaban de manera cruzada, por ejemplo, con PNA que se utilizó para determinar supuestamente la especificidad de TF. Sin embargo, la PNA no es específica de TF ya que reacciona de forma cruzada con muchos epítomos de carbohidratos diferentes. Por lo tanto, no se produjo ninguna diferenciación entre estructuras similares a TF (reactivas cruzadas) e idénticas a TF. Estos microorganismos conocidos tampoco son reconocidos y, por lo tanto, no están específicamente unidos por los anticuerpos específicos del Nuclear-1 (ver más abajo). Esto demuestra que no portaban el antígeno Nuclear-1 y, por consiguiente, tampoco eran capaces de inducir una respuesta inmune específica del Nuclear-1 en un ser humano o animal en la administración ya que no tenían las características inmunoquímicas/inmunológicas del Nuclear-1 en orden para poder obtener una respuesta respectiva. Sin embargo, tal respuesta específica es necesaria para desencadenar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 y, por lo tanto, el efecto terapéutico o profiláctico.

Debido al hecho de que los microorganismos de la presente invención son verdaderamente positivos al Nuclear-1 (lo que puede determinarse mediante el uso de anticuerpos específicos para el Nuclear-1, la invención proporciona formulaciones que comprenden microorganismos positivos al Nuclear-1 que inducen o mejoran una respuesta inmune específica y, por lo tanto, potente contra el antígeno Nuclear-1. La formulación de la presente invención activa el sistema inmunológico de una manera específica para el tumor al inducir altos niveles de anticuerpos anti-Nuclear-1 que son específicos para el Nuclear-1. Por lo que sabemos, la presente invención es el primer aditivo alimentario/nutracéutico o farmacéutico específico para el antígeno que puede activar un escudo inmunitario específico contra los tumores y el primer aditivo alimentario que es capaz de inducir un carbohidrato y, en particular, la respuesta inmunitaria específica del antígeno del tumor Nuclear-1.

El término anticuerpo específico del Nuclear-1, así como los anticuerpos específicos del Nuclear-1 preferidos, combinaciones de anticuerpos específicos del Nuclear-1 o combinaciones preferidas de anticuerpos específicos del Nuclear-1 se describen en detalle en las Definiciones y en otras partes del presente documento.

De acuerdo con una realización, el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o el lisado positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo es reconocido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 que se selecciona del grupo que consiste en

Nemod - TF1

Nemod - TF2

A78-G/A7

HB-T1

HH8.

Estos anticuerpos demostraron ser altamente específicos del Nuclear-1 al mostrar poca o ninguna reactividad cruzada con otras estructuras de carbohidratos además del Nuclear-1. Estos anticuerpos reconocen el Nuclear-1 (ya sea en forma alfa o beta anomérica) en las proteínas de una manera relevante para el tumor, preferiblemente HH8, A78-G/A7, Nemod-TF2, Nemod-TF1; más preferiblemente A78-G/A7, Nemod-TF2, Nemod-TF1. Con el fin de mejorar la especificidad, uno puede usar dos o más de estos anticuerpos para determinar/probar que un microorganismo es positivo al Nuclear-1 y, por lo tanto, un microorganismo positivo al Nuclear-1 de acuerdo con la presente invención.

La unión del anticuerpo específico del Nuclear-1 es específica para la estructura de carbohidratos y, por lo tanto, la estructura de carbohidratos tiene los mismos criterios de unión y, por lo tanto, las mismas características inmunoquímicas que el Nuclear-1 asociado al cáncer humano pueden determinarse analizando si la unión de anticuerpo específico Nuclear-1 es sensible al peryodato. El tratamiento con peryodato destruye el anillo externo de carbohidratos de las estructuras de carbohidratos, incluido el Nuclear-1, destruyendo así el epítopo Nuclear-1. Una disminución de la unión del anticuerpo se observa generalmente después de la oxidación con peryodato. Por lo tanto, cuando la unión del anticuerpo específico del Nuclear-1 es específica del Nuclear-1, la unión se reduce después del tratamiento con peryodato. Sorprendentemente, para muchos organismos que no eran positivos al Nuclear-1 inicialmente se encontró que el tratamiento con peryodato produce un aumento en la unión de Ab. Esto,

como la oxidación con peryodato, descubre nuevas estructuras de carbohidratos que aparentemente son similares a TF. Sin embargo, un aumento en la unión después de la oxidación con peryodato es un fuerte indicador de que un microorganismo no es originalmente positivo al Nuclear-1, ya que el tratamiento con peryodato debería destruir el epítipo Nuclear-1 si el epítipo Nuclear-1 ya está disponible para el anticuerpo específico del Nuclear-1 contra el microorganismo positivo Nuclear-1. Sin embargo, tales microorganismos que no son naturalmente positivos al Nuclear-1 pero pueden convertirse en un microorganismo positivo al Nuclear-1 mediante un tratamiento químico tal como un tratamiento con peryodato también están comprendidos en el alcance de la presente invención y pueden ser utilizados, por ejemplo, después del tratamiento con peryodato (descubriendo el Nuclear-1) como componentes de las formulaciones de la presente invención.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona un nutraceutico o la formulación farmacéutica como se describió anteriormente, en donde se usa al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 que es reconocido/unido por el anticuerpo específico para el Nuclear-1 NEMOD-TF1, preferiblemente por una combinación de NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y por NEMOD-TF1 y dicha unión es sensible al peryodato, y más preferiblemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1, pero no por A68-B/A11. Este perfil es muy favorable ya que se asemeja a los criterios de unión de la estructura Nuclear-1 asociada al cáncer humano.

En una realización preferida, dicha formulación induce o mejora una respuesta inmune contra el Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1. Debido al hecho de que el microorganismo es positivo al Nuclear-1, se induce/mejora una respuesta inmune contra el antígeno Nuclear-1 tras la administración. Por lo tanto, se establece un mecanismo de inmunovigilancia que puede, por ejemplo, elimine o reduzca el número de células tumorales nuevas que surgen que llevan Nuclear-1, lo que evita o reduce el crecimiento del tumor primario. La formulación de acuerdo con la presente invención induce o mejora dicha respuesta inmune específica del Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal cuando se administra, y/o que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas del Nuclear-1 al tener el potencial de destruir un Nuclear-1 célula cancerosa positiva y/o que reduce o previene la aparición de una enfermedad, tumor o metástasis positiva al Nuclear-1 y/o que reduce o previene la diseminación o metástasis de una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 y/o que fortalece el sistema inmunológico y/o mejora una respuesta inmune.

Por lo tanto, la invención proporciona un nutraceutico que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo que induce una respuesta inmune en humanos o animales que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 y/o enfermedad positiva para el Nuclear-1. Los probióticos y los prebióticos convencionales dan como resultado una estimulación inespecífica general del sistema inmunológico. No hay ningún sistema específico de tumor involucrado en los sistemas de la técnica anterior y especialmente ninguno contra el Nuclear-1.

Dichos microorganismos positivos al Nuclear-1, microorganismos positivos al Nuclear-1 preferidos, fracciones de microorganismos positivos al Nuclear-1 y fracciones preferidas de microorganismos positivos al Nuclear-1 y combinaciones de los mismos se describen en detalle en Definiciones y en cualquier otra parte del presente documento. Dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido específicamente por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1. En el presente documento también se describen métodos para identificar y aislar dichos microorganismos o fracciones de los mismos.

El microorganismo positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo representa el ingrediente activo que induce la especificidad de la respuesta inmune contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 y/o una enfermedad debida al hecho de que lleva un antígeno parecido al Nuclear-1.

Dicho microorganismo específico del Nuclear-1 y/o lisado positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo efectúa una inmunización específica contra el Nuclear-1 tras la administración de dicho microorganismo específico del Nuclear-1. La capacidad de causar una inmunización específica del Nuclear-1 puede determinarse por al menos uno de los siguientes métodos:

a) dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido específicamente por al menos uno, preferiblemente dos anticuerpos específicos para el Nuclear-1 seleccionados del grupo que consiste en

Nemod - TF1

Nemod - TF2

A78-G/A7

HH8

HB-T1

en donde la unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato que muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato

b) dicho microorganismo específico Nuclear-1 y/o lisado positivo Nuclear-1 o fracción del mismo se caracteriza por ser positivo en al menos una prueba de respuesta inmune humoral como se describe en el presente documento;

c) dicho microorganismo específico del Nuclear-1 y/o lisado positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo se caracteriza por ser positivo en al menos una prueba de respuesta inmunitaria celular contra el Nuclear-1 como se describe en el presente documento.

Esto garantiza que el microorganismo utilizado sea verdaderamente positivo al Nuclear-1 y, por lo tanto, capaz de desencadenar la respuesta inmune específica deseada contra el antígeno Nuclear-1.

Con el fin de mejorar la especificidad del Nuclear-1 de la formulación, se puede usar un microorganismo que es positivo al Nuclear-1 y es reconocido específicamente por al menos dos anticuerpos específicos del Nuclear-1 seleccionados del grupo que consiste en

Nemod - TF1

Nemod - TF2

A78-G/A7

en donde la unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato que muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato.

Un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo puede comprender al menos una de las estructuras de carbohidratos seleccionadas del grupo que comprende #1, #2, #3, #4 y/o #5 de la figura 19 y/o unidades de repetición en esto. Como puede verse, los organismos positivos al Nuclear-1 pueden estar enlazados en configuraciones anoméricas alfa o beta.

Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que cepas Bacteroides positivas al Nuclear-1 tales como, por ejemplo, Bacteroides ovatus existen. Esto era desconocido. Por lo tanto, se proporciona un Bacteroides positivo al Nuclear-1 y también se puede usar en la formulación de acuerdo con la presente invención, en donde dicho Bacteroides positivo al Nuclear-1 es reconocido por al menos uno, preferiblemente dos anticuerpos específicos para el Nuclear-1 seleccionados del grupo que consiste en

Nemod - TF1

Nemod - TF2

A78-G/A7

HB-T1

HH8

La unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato, mostrando una unión reducida después del tratamiento con peryodato.

Preferiblemente, dichos Bacteroides positivos al Nuclear-1 se aíslan de un donante sano. Dicho Bacteroides positivo al Nuclear-1 puede estar o está, por ejemplo, relacionado con Bacteroides ovatus como las nuevas cepas AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728) y/o un homólogo de AG6 o MU1, en donde dicho homólogo se caracteriza porque es un Bacteroides y es reconocido por al menos dos anticuerpos específicos para el Nuclear-1 seleccionados del grupo que consiste en

Nemod - TF1

Nemod - TF2

A78-G/A7

HB-T1

HH8

en donde la unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato que muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato. Como se demuestra en los ejemplos, estas cepas provocan una respuesta inmune muy fuerte contra el Nuclear-1 y están relacionadas con Bacteroides ovatus. Muestran una expresión de Nuclear-1 muy fuerte y, por lo tanto, comprenden muchos epítomos del Nuclear-1 y se unen a mAbs específicos del Nuclear-1 (TF1 y TF2), en donde la unión es sensible al peryodato, lo que indica que el Nuclear-1 se presenta accesible en la superficie. La expresión/detección de Nuclear-1 tampoco cambia después de la digestión enzimática, la pasteurización y/o la liofilización, lo que la convierte en un componente adecuado para una formulación farmacéutica

oral. Además, para AG6, demostramos una estructura Nuclear-1 asociada a un tumor en una configuración alfa-anomérica como un componente de ramificación dentro de la unidad de repetición (véase también el número 5 de la Fig. 19). Este resultado es muy importante porque la localización expuesta del antígeno TF dentro del polisacárido capsular podría aumentar la inducción de las respuestas inmunes humorales contra el Nuclear-1 en humanos mediante un mejor reconocimiento y unión de los anticuerpos específicos del Nuclear-1.

En una realización preferida, la invención proporciona una formulación seleccionada del grupo que consiste en una composición nutracéutica y/o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género *Bacteroides* y/o al menos un lisado positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo, en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 o lisado o fracción positivo al Nuclear-1 es reconocido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1, en donde el anticuerpo específico para el Nuclear-1 se selecciona del grupo que comprende NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A78-G/A7, HB-T1 y/o HH8, y en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su lisado por el al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 es sensible al peryodato que muestra la unión reducida después del tratamiento con peryodato.

En una realización preferida adicional, la invención proporciona dicha formulación, en la que el microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por los anticuerpos NEMOD-TF2 y NEMOD-TF1 específicos del Nuclear-1, por lo que la unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato y muestra una unión significativamente reducida después de tratamiento con peryodato.

La formulación de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un alimento o un fármaco que comprende un microorganismo positivo al Nuclear-1) se puede usar para propósitos profilácticos y terapéuticos y para apoyar actividades inmunológicas. La formulación farmacéutica de la invención contiene al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1, que también puede ser positivo al Nuclear-1 mediante un tratamiento químico como un tratamiento con peryodato, y un portador farmacéuticamente aceptable. La preparación y administración de una formulación de esta invención (por ejemplo, un medicamento que comprende un microorganismo positivo al Nuclear-1) está de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, la formulación se puede combinar con adyuvantes galénicos convencionales para formar una composición adecuada para el método de aplicación deseado. Por ejemplo, los compuestos de esta invención pueden emplearse en mezcla con excipientes convencionales, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para aplicación parenteral o enteral que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, entre otros, agua, soluciones salinas, alcoholes, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos de ácidos grasos y diglicéridos, ésteres de ácidos grasos pentaeritritol, hidroximetilcelulosa, la polivinilpirrolidona, el talco, etc. Los detalles se describen a continuación.

Dicha formulación puede inducir o mejorar una respuesta inmune humoral y/o celular contra el Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, preferiblemente una respuesta inmune celular de tipo Th1. En una realización preferida, la formulación induce o mejora una respuesta inmune humoral y/o celular contra el Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, preferiblemente una respuesta inmune celular que comprende la activación de células T CD4 positivas de células Th1 y/o células T citotóxicas CD8 positivas.

La invención también proporciona un nutracéutico como se describe anteriormente, que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 y que induce o potencia una respuesta inmune contra el Nuclear-1 en al menos un humano o animal que reconoce el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1.

La invención también proporciona una composición farmacéutica como se describe anteriormente, que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo que induce una respuesta inmune en humanos o animales que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 y/o enfermedad positiva para el Nuclear-1.

La invención proporciona una formulación farmacéutica como se describe anteriormente, que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido y, por lo tanto, se une a al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 si se pone en contacto con un anticuerpo respectivo y que induce o mejora una respuesta inmunitaria contra el Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal que reconoce el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva al Nuclear-1.

La invención proporciona una formulación nutracéutica o farmacéutica como se describe anteriormente, que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 y que induce o mejora una respuesta inmune humoral y/o celular en al menos un ser humano o animal contra el Nuclear-1.

Dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 y/o una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1. La activación de la inmunidad celular además de la inmunidad humoral aumenta fuertemente el potencial profiláctico y terapéutico de la formulación/coreóticos de la presente invención.

5 En una realización adicional de la invención, la formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo induce una respuesta inmune humoral y celular en seres humanos o animales que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o célula tumoral positiva para el Nuclear-1.

10 En una realización preferida de la invención, el nutracéutico o la composición farmacéutica induce o mejora una respuesta inmune específica del Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas del Nuclear-1 al tener el potencial de destruir células cancerígenas positivas al Nuclear-1.

15 La composición nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo puede usarse para construir una respuesta inmune específica para el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1 al tener el potencial de destruir las células que se muestran en este documento, por ejemplo, mediante la inducción de los anticuerpos específicos del Nuclear-1, mediante la citotoxicidad dependiente del complemento específico del Nuclear-1 de los anticuerpos del Nuclear-1 contra las células tumorales positivas al Nuclear-1, que las destruyen de manera efectiva o por la secreción de TNFalfa y/o INFgamma por respuestas de células T específicas del Nuclear-1 que son marcadores sustitutos reconocidos científicamente por los expertos en la técnica para una muerte de células tumorales mediada por células T citotóxicas específicas para aquellas células tumorales que llevan el Nuclear-1, como se muestra en los ejemplos y se describe en este documento.

20 En una realización preferida adicional de la invención, la composición nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa para construir dicha respuesta inmune específica para el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra células cancerígenas positivas al Nuclear-1 que tienen el potencial de destruir esas células como se describió anteriormente al administrar por vía oral el nutracéutico a (al menos una) persona sana.

25 En una realización preferida adicional de la invención, la composición nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa para reducir o incluso se prefiere aun más para prevenir la aparición de una enfermedad positiva para el Nuclear-1 o tumor mediante la administración oral del nutracéutico a (al menos uno) individuo sano.

30 La composición nutracéutica o farmacéutica de la invención se usa para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal. En una realización preferida adicional de la invención, la formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa para reducir o incluso más preferible para prevenir la aparición de una enfermedad o tumor o metástasis positivos al Nuclear-1.

35 En una realización adicional de la invención, la composición nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo reduce o previene la diseminación o metástasis de una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal cuando se administra.

En una realización adicional de la invención, la formulación nutracéutica o farmacéutica comprende al menos dos microorganismos positivos al Nuclear-1 diferentes o fracciones de los mismos.

40 En una realización preferida adicional de la invención, la formulación nutracéutica o farmacéutica comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo combinado con al menos otro microorganismo beneficioso que induce o potencia una respuesta inmune.

45 En una realización adicional de la invención, el nutracéutico que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 mediante la administración oral del nutracéutico en pacientes que padecen esta enfermedad.

En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 en pacientes que padecen esta enfermedad.

50 En otra realización de la invención, la composición nutracéutica o farmacéutica mencionada anteriormente de la invención comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 y al menos una fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1, preferentemente de más de un microorganismo positivo al Nuclear-1.

Dicha respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 es una respuesta de anticuerpos contra el Nuclear-1 que puede detectarse mediante al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4, 5 o 6 que se describen en detalle más adelante.

- Una prueba de respuesta inmune humoral (prueba de respuesta inmune humoral 1) contra el Nuclear-1 comprende probar la unión de un anticuerpo, anticuerpos en suero, o anticuerpos obtenidos de suero, plasma o heces, en un ELISA a glicoproteínas que comprenden asialoglicoforina y glicoforina o asialoglicoforina y la asialoglicoforina tratada con peryodato o asialoglicoforina y la glucoforina y la asialoglicoforina tratada con peryodato, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión significativamente mayor de los anticuerpos a la asialoglicoforina que a la glucoforina y/o el peryodato tratado como asialoglicofirina. La asialoglicoforina comprende la estructura Nuclear-1, pero la glicoforina no. Por lo tanto, una respuesta inmune humoral positiva desencadenada por un microorganismo positivo al Nuclear-1 de la presente invención daría como resultado una unión detectable a asialoglicoforina, pero una unión menor o nula a glicoforina. La asialoglicoforina tratada con peryodato también pierde el epítipo Nuclear-1 y, por lo tanto, también es un sistema de prueba para determinar si una respuesta inmune humoral positiva es activada por el microorganismo/formulación positivo al Nuclear-1 de acuerdo con la presente invención. En una realización más preferida, esta unión es significativamente mayor después de la administración del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden.
- Dicha prueba de respuesta inmunitaria humoral 1 prueba la unión de los anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos de suero, plasma o heces en un ELISA a glicoproteínas que comprenden asialoglicoforina y glicoforina o asialoglicoforina tratada con peryodato, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor unión de los anticuerpos a la asialoglicoforina que a la glicoforina y/o asialoglicoforina tratada con peryodato. En una realización preferida, dicho ensayo comprende asialoglicoforina y glicoforina y asialoglicoforina tratada con peryodato. En una realización preferida, la señal de asialoglicoforina es al menos un 50% más alta que la de la glicoforina y al menos un 30% más alta que la de la asialoglicoforina tratada con peryodato. En una realización preferida, la señal a la asialoglicoforina es al menos el doble que la de la glucoforina y/o 1.5 veces la de la asialoglicoforina tratada con peryodato, e incluso se prefiere aun más al menos 3 veces la de la glicoforina y/o el doble de la asialoglicoforina tratada con peryodato y aun más preferida al menos 5 veces la de la glucoforina y/o 4 veces la de la asialoglicoforina tratada con peryodato. En una realización preferida, la señal a la asialoglicoforina aumenta significativamente después de la administración de una formulación de acuerdo con esta invención y es al menos un 30% más alta que la de la asialoglicoforina tratada con peryodato. En una realización preferida, la señal a asialoglicoforina es 50% más alta, preferiblemente 80% más alta y aun más preferida 100% más alta después de la administración de una formulación de acuerdo con esta invención y es al menos 30% más alta que la de la asialoglicoforina tratada con peryodato.

Una realización preferida de la prueba 1 de respuesta inmune humoral se describe en detalle en el ejemplo 11.

- En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmune humoral (prueba de respuesta inmune humoral 2) contra el Nuclear-1 comprende, probar la unión de un anticuerpo, anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos de suero, plasma o heces, en un ELISA para estructuras de carbohidratos acopladas a poliácridamida (conjugados de PAA) que comprenden Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA, Gal beta 1-3 GalNAc beta 1-PAA, GlcNAc beta1-2 Gal beta 1-3 GalNAc alfa 1-PAA, y preferiblemente tratadas con peryodato Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión significativamente mayor del anticuerpo o anticuerpos contra Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA que con Gal beta 1-3 galNAc tratado con peryodato. alfa1-PAA y, preferiblemente, también una unión más alta del anticuerpo o anticuerpos a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA que a Gal beta 1-3 GalNAc beta 1-PAA o una unión significativamente mayor a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1- PAA de anticuerpos obtenidos de un humano o un animal después de la inmunización con un formulación de acuerdo con esta invención (por ejemplo, sueros inmunes) en comparación con los anticuerpos obtenidos de un ser humano o un animal antes de la inmunización (por ejemplo, sueros preinmunes). Estas estructuras artificiales de poliácridamida también comprenden la estructura Nuclear-1, respectivamente, estructuras estrechamente relacionadas y, por lo tanto, pueden utilizarse para determinar la especificidad de la respuesta inmune humoral desencadenada.

- Dicha prueba de respuesta inmune humoral 2 prueba la unión de los anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos de suero, plasma o heces en un ELISA a estructuras de carbohidratos acopladas a poliácridamida (conjugados de PAA) que comprenden Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA, Gal beta 1 -3 GalNAc beta 1-PAA, GlcNAc beta1-2 Gal beta 1-3 GalNAc alfa 1-PAA y, preferiblemente, Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA tratados con peryodato, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión significativa mayor de los anticuerpos a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA que a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA tratados con peryodato y preferiblemente también a Gal beta 1-3 GalNAc beta 1-PAA. En una realización preferida, la unión a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA es al menos el doble de la unión a Gal beta 1-3 galNAc alfa1-PAA tratados con peryodato y a, Gal beta 1-3 GalNAc beta 1-PAA.
- En una realización preferida, la señal ELISA contra Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA en relación con la señal ELISA contra GlcNAc beta1-2 Gal beta 1-3 GalNAc alfa 1-PAA es 50% mayor después de la inmunización con una formulación de acuerdo con a esta invención en comparación con la señal ELISA contra Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA en relación con la señal ELISA contra GlcNAc beta1-2 Gal beta 1-3 GalNAc alfa 1-PAA antes de la inmunización, más preferido al menos un 70% más alto y aun más preferido es 100% más alto.
- En una realización preferida, después de la inmunización con una formulación de acuerdo con esta invención, la señal ELISA contra Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA es 30% mayor en comparación con la señal ELISA contra Gal

beta1-3 GlcNAc alfa 1-PAA, más preferido al menos 50% más alto, más preferido al menos 70% e incluso más preferido 100% más alto.

Una realización preferida de la prueba de respuesta inmune humoral 2 se describe en detalle en el ejemplo 11.

En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmune humoral (prueba de respuesta inmune humoral 3) contra el Nuclear-1 comprende, probar la unión de un anticuerpo, anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces, en una prueba de citometría de flujo para su unión a células que comprenden NM-D4 o NM-F9 y NM-wt o NM-H9 (o NM-H9D8 DSM ACC2806), por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión significativamente mayor de los anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 (ambos portadores del antígeno Nuclear-1) que NM-wt o NM-H9 (que no portan el antígeno Nuclear-1) y/o una unión significativamente mayor de los anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 después de la administración de una formulación de acuerdo con esta invención.

Dicha prueba de respuesta inmune humoral 3 prueba la unión de los anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces en una prueba de citometría de flujo para determinar su unión a células que comprenden NM-D4 o NM-F9 y NM-wt o NM-H9, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión significativamente mayor de los anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 que a NM-wt o NM-H9. En una realización preferida, el porcentaje de células positivas en NM-D4 o NM-F9 es el doble que el de NM-wt o NM-H9 e incluso se prefiere 5 veces más.

En otra realización preferida de la invención, los resultados de la citometría de flujo se calculan después de la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\% \text{ células positivas a NM-D4 o NM-F9 de la muestra inmune} - \% \text{ células positivas a NM-D4 NM-F9 de la muestra preinmune}}{\% \text{ células positivas a NM-wt o NM-H9 de la muestra inmune} - \% \text{ células positivas a NM-wt o NM-H9 de la muestra preinmune}} \right) = X, \text{ en donde } (\% \text{ células positivas a NM-wt o NM-H9 de la muestra inmune} - \% \text{ células positivas a NM-wt o NM-H9 de la muestra preinmune}) \geq 1 \text{ y en donde la prueba de respuesta inmune humoral es positiva si } X \geq 10, \text{ más preferido } X > 20 \text{ y aun más preferido } X > 30.$$

Una realización preferida de la prueba de respuesta inmune humoral 3 se describe en detalle en el ejemplo 11.

En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmune humoral (prueba de respuesta inmune humoral 4) contra el Nuclear-1 comprende, probar la unión de un anticuerpo, anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces, en una prueba de fluorescencia inmunitaria para determinar su unión a células que comprenden NM-D4 o NM-F9, y a NM-wt o NM-H9, y preferiblemente también a NM-D4 o NM-F9 tratados con peryodato, por lo que se muestra una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 una unión mayor de una cantidad particular del anticuerpo o anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 (ambos portadores del antígeno Nuclear-1) que a NM-wt o NM-H9 (que no portan el antígeno Nuclear-1) o NM-D4 o NM-F9 tratado con peryodato (en donde el antígeno Nuclear-1 se destruye debido al tratamiento con peryodato) y/o una unión significativamente mayor de los anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 después de la administración de una formulación de acuerdo con esta invención.

Dicho ensayo de respuesta inmune humoral 4 prueba la unión de los anticuerpos en suero, plasma o heces o anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces en un ensayo de fluorescencia inmunitaria para determinar su unión a células que comprenden NM-D4 o NM-F9 y a NM-wt o NM-H9, y preferiblemente también a NM-D4 o NM-F9 tratados con peryodato, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor unión de los anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 que a NM-wt o NM-H9 o NM-D4 o NM-F9 tratados con peryodato. En una realización preferida, la unión a NM-D4 o NM-F9 es visiblemente mayor en intensidad de fluorescencia y/o en el porcentaje de células positivas para fluorescencia entre las células NM-D4 o NM-F9 es mayor que el porcentaje de células positivas para fluorescencia entre NM-D4 o NM-F9 después del tratamiento con peryodato. La prueba de inmunofluorescencia se puede hacer más cuantitativa mediante diluciones en serie de los antisueros y/o tomando fotografías en condiciones de exposición idénticas.

Otras pruebas adecuadas para la positividad del Nuclear-1 de una respuesta inmune humoral son el uso de varias células positivas al Nuclear-1, tales como ZR-75-1, CAMA-1, KG-1, A-204 y líneas celulares negativas al Nuclear-1, tal como BT-20, HT-29, en análisis de inmunofluorescencia o citometría de flujo, u otras moléculas portadoras del Nuclear-1 como Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-BSA o Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-KLH, o glicopéptidos con Nuclear-1, con o sin tratamiento con peryodato de las células o antígenos, y preferiblemente con combinaciones con moléculas negativas de acuerdo con Nuclear-1 como BSA, o con estructuras Nuclear-1 sialiladas, en sistemas de prueba adecuados, preferentemente en ELISA, citometría de flujo, o fluorescencia inmune. En principio, las mismas estructuras de hidratos de carbono acopladas a poliácridamida o proteínas portadoras como la proteína de la glicoforina o los lípidos que se usan en el ensayo 1 a 4 descrito anteriormente también se pueden usar cuando se acoplan a otras moléculas portadoras como las cadenas principales de proteínas, péptidos o polipéptidos, o lípidos, o estructuras químicas, como BSA, KLH o péptidos más cortos definidos o estructuras químicas como las que se utilizan para el lecho de una columna en cromatografía. Los expertos en la técnica pueden identificar moléculas portadoras adecuadas y acoplar estructuras adecuadas para obtener la estructura de carbohidrato deseada acoplada a las moléculas portadoras con o sin enlazador. Los expertos en la técnica también pueden seleccionar

esas células o antígenos, con o sin tratamiento con peryodato, y seleccionar y modificar los métodos adecuados para probar la respuesta inmune humoral para el Nuclear-1. Sin embargo, las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 4 mencionadas anteriormente y especialmente las combinaciones preferidas de las mismas proporcionadas por la presente invención son claramente preferidas y tienen claras ventajas con respecto a la especificidad como también se ve en los ejemplos.

En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmune humoral (prueba de respuesta inmune humoral 5) contra el Nuclear-1 comprende:

a.) Incubar una cantidad adecuada de ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 y/o NM-wt, marcado con una cantidad adecuada de europio o cromo-51, con una cantidad adecuada de un anticuerpo, de anticuerpos en suero, o de anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces, con una cantidad adecuada de complemento por un tiempo adecuado (típicamente entre 3 a 5 horas o durante la noche)

b.) Medir la lisis de las células mediante la determinación de la liberación de europio o cromo-51 después de la incubación en (a), por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una lisis más alta de NM-D4 o NM-F9 células que de NM-wt o NM-H9 o muestran una lisis más alta de NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1, que una lisis sin complemento y/o que una lisis sin el anticuerpo y/o que una lisis con un anticuerpo o anticuerpos que no se unen o que se unen menos a NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1.

Dicha prueba de respuesta inmune humoral 5 prueba la citotoxicidad dependiente del complemento específico del Nuclear-1 (CDC), un mecanismo efector mediado por ciertos anticuerpos, de la respuesta inmune humoral inducida o anticuerpos específicos del Nuclear-1 en una prueba de lisis de células diana. La prueba comprende incubar cantidades adecuadas de células diana positivas marcadas con Nuclear-1 como ZR75-1, preferiblemente NM-D4 o NM-F9, con cantidades adecuadas de anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos del suero, o un anticuerpo aislado Nuclear-1 con cantidades adecuadas de complemento durante un tiempo adecuado, típicamente entre 3 y 5 horas. Las células tumorales de núcleo positivo están marcadas con europio o cromo-51, lo que permite la medición de las células que están lisadas. La cantidad de células lisadas se determina, preferiblemente midiendo la liberación de europio o cromo-51 después de la incubación. Un control adecuado puede ser determinado por los expertos en la técnica, tales como las células negativas para el Nuclear-1, preferiblemente NM-wt y/o NM-H9, un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos que no se une a la célula diana, y/o sin complemento. Los expertos en la técnica pueden optimizar la prueba con respecto a las cantidades adecuadas de anticuerpos, el número de células tumorales marcadas, la concentración del complemento y el tiempo de incubación para su uso en la invención y como se describe.

La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de la invención se determina preferiblemente usando un ensayo de liberación de europio. Las células diana NM-D4 se incuban durante 10 minutos a 4°C en 800 µl de regulador de europio (HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 93 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, ácido dietilentriaminopentaacético 10 mM, acetato de europio (III) 2 mM), sometido a electroporación (710 V, 1 pulso, 30 µs) en un Multiporator (Eppendorf) y posteriormente se incuban en hielo durante otros 10 minutos. Posteriormente, las células se lavan 5 veces en RPMI/5% de FCS y se siembran en una placa de fondo redondo de 96 pozos (Munc; 5x10³/pozo). Después de la adición de 20 µl de solución que contiene anticuerpo en diluciones variables o los controles correspondientes (medio, control de isotipo de IgM humana), las muestras se incuban 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 10 µl de complemento diluido 1:10 (complemento de conejo bebé) a los pozos correspondientes. En los pozos de control, se agregan 10 µl de RPMI/5% de FCS en lugar de la solución de complemento. Para la determinación de la liberación espontánea, las células diana se incuban con medios solos, y la liberación máxima se determina mediante la lisis completa de la diana con etanol. Después de la incubación a 37°C durante 4 horas, la placa se centrifuga a 500 x g durante 5 minutos, y se pipetea 20 µl de sobrenadante libre de células de cada pozo en 200 µl por pozo de solución de mejora (Perkin-Elmer Wallac) en la placa de fondo plano preparada anteriormente (Nunc-Immunoplate Maxisorp). Después de la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se determina la fluorescencia (fluorómetro Victor², Perkin-Elmer Wallac). La citotoxicidad específica se obtiene de la ecuación (lisis experimental - lisis espontánea)/(lisis máxima - lisis espontánea) x100%.

En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmune humoral (prueba de respuesta inmune humoral 6) contra el Nuclear-1 comprende:

a) incubar una cantidad adecuada de ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 y/o NM-wt, marcado con una cantidad adecuada de europio o cromo-51, con una cantidad adecuada de anticuerpo, de anticuerpos en suero, o de anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces, con una cantidad adecuada de al menos una célula efectora inmune o mezcla de células que comprenden células efectoras inmunes o células mononucleares de sangre periférica durante un tiempo adecuado, típicamente entre 3 a 5 horas o durante la noche y

b) medir la lisis de las células mediante la determinación de la liberación de europio o cromo-51 después de la incubación en (a), por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una lisis significativamente mayor de NM-D4 o NM-F9 células que de NM-wt o NM-H9 o muestran una lisis significativamente mayor de NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1, que una lisis sin el anticuerpo y/o una lisis con un anticuerpo o anticuerpos que no se une o que se une menos a NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1.

Dicha prueba de respuesta inmune humoral 6 prueba la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos específicos Nuclear-1 (ADCC), un mecanismo efector mediado por ciertos anticuerpos, de la respuesta inmune humoral inducida o anticuerpos específicos Nuclear-1 en una prueba de lisis de células diana en combinación con células efectoras inmunes. La prueba comprende incubar cantidades adecuadas de células diana positivas marcadas con Nuclear-1 como ZR75-1, preferiblemente NM-D4 o NM-F9, con cantidades adecuadas de anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos del suero, o un anticuerpo aislado Nuclear-1 con cantidades adecuadas de células efectoras inmunitarias, como las presentes en las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) durante un tiempo adecuado, generalmente entre 3 y 5 horas o durante la noche. Las células tumorales positivas para el núcleo están marcadas con europio o cromo-51, lo que permite la medición de las células que están lisadas. La cantidad de células lisadas se determina, preferiblemente midiendo la liberación de europio o cromo-51 después de la incubación. Los expertos en la técnica pueden determinar un control adecuado, como las células negativas al Nuclear-1 (preferiblemente NM-wt y NM-H9), un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos que no se unen a la célula diana y/o sin células efectoras inmunes (por ejemplo, PBMC). La prueba puede optimizarse con respecto a cantidades adecuadas de anticuerpos, números de células tumorales marcadas, números de células efectoras inmunes y tiempo de incubación por los expertos en la técnica para su uso en la invención.

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de la invención se determina preferiblemente usando un ensayo de liberación de europio. Las células diana NM-D4 se incuban durante 10 minutos a 4°C en 800 µl de regulador de europio (HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 93 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, ácido dietilentiainopentaacético 10 mM, acetato de europio (III) 2 mM), sometido a electroporación (710 V, 1 pulso, 30 µs) en un Multiporator (Eppendorf) y posteriormente se incuba en hielo durante otros 10 minutos. Posteriormente, las células se lavan 5 veces en RPMI/5% de FCS y se siembran en una placa de fondo redondo de 96 pozos (Nunc; 5x10³/pozo). Luego de la adición de 20 µl de anticuerpos específicos para Nuclear-1 en concentraciones variables (concentración final de 0.05 a 50 µg/ml en 200 µl de volumen de incubación) o los controles correspondientes (medio, control de isotipo IgG), PBMC (células mononucleares de sangre periférica humana, 80 µl) se agregan como células efectoras, utilizando diferentes relaciones de célula efectora/célula diana de 100:1 a 10:1, preferiblemente de 50:1. Para determinar la liberación espontánea, se agregan 80 µl de RPMI/5% de FCS sin células efectoras. La liberación máxima se determina después de la lisis completa del objetivo con etanol.

Después de la incubación a 37°C durante 4 horas, la placa se centrifuga a 500 x g durante 5 minutos, y se pipetea 20 µl de sobrenadante libre de células de cada pozo en 200 µl por pozo de solución de mejora (Perkin-Elmer Wallac) en la placa de fondo plano preparada anteriormente (Nunc-Immunoplate Maxisorp). Después de la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se determina la fluorescencia (fluorómetro Victor², Perkin-Elmer Wallac). La citotoxicidad específica se obtiene de la ecuación (lisis experimental - lisis espontánea)/(lisis máxima - lisis espontánea) x100%.

En una realización preferida, dichas pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 comprenden además antes de la prueba

a. la administración del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que comprenden a un humano o animal b. aislamiento del anticuerpo, anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces.

En una realización preferida, una prueba de respuesta inmune humoral para probar la capacidad de la formulación, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción o el lisado de la misma como se describe en otra parte en el presente documento para inducir o mejorar una respuesta inmune humoral contra Nuclear-1 en un humano o un animal comprende,

a) administrar dicha formulación, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicho lisado o fracción del mismo, como se describe en otra parte del presente documento, a un ser humano o animal; y

b) aislar el anticuerpo, los anticuerpos en suero, o los anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces; y

c) probar la unión del anticuerpo, anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos de suero, plasma o heces, en

(i) un ELISA para glicoproteínas que comprende asialoglicoforina y glicoforina o asialoglicoforina y asialoglicoforina tratada con peryodato o asialoglicoforina y glicoforina y peryodato tratada con asialoglicoforina tratada con peryodato, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión de dicho anticuerpo a la glucoforina y/o asialoglicoforina tratada con peryodato, y una unión significativamente mayor a la asialoglicoforina que un anticuerpo o anticuerpos aislados en consecuencia del mismo animal o humano antes de la administración de dicha formulación, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicho lisado o fracción en esto; y/o

(ii) un ELISA para estructuras de carbohidratos acopladas a poliacrilamida (conjugados de PAA) que comprenden Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA, Gal beta 1-3 GalNAc beta 1-PAA, GlcNAc beta1-2 Gal beta 1-3 GalNAc alfa 1-PAA, y preferiblemente tratado con peryodato Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión significativamente mayor de dicho anticuerpo o anticuerpos a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA que de un anticuerpo o anticuerpos en consecuencia aislados del mismo animal o

humano antes de la administración de dicha formulación, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicho lisado o fracción del mismo; y/o

5 (iii) una prueba de citometría de flujo para la unión a células que comprenden NM-D4 o NM-F9 y NM-wt o NM-H9, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una unión significativamente mayor de los anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 que a NM-wt o NM-H9, y una unión significativamente mayor a NM-D4 o NM-F9 que un anticuerpo o anticuerpos aislados en consecuencia del mismo animal o humano antes de la administración de dicha formulación, dicho al microorganismo positivo Nuclear-1 o dicho lisado o fracción del mismo; y/o

10 (iv) una prueba de fluorescencia inmune para determinar su unión a células que comprenden NM-D4 o NM-F9, y a NM-wt o NM-H9, y preferiblemente también a NM-D4 o NM-F9 tratadas con peryodato, por lo que la respuesta inmune contra el Nuclear-1 muestra una unión significativamente mayor de una cantidad particular del anticuerpo o anticuerpos a NM-D4 o NM-F9 que a NM-wt o NM-H9 o NM-D4 o NM-D4 tratados con peryodato y NM-F9, y la unión significativamente más alta a NM-D4 o NM-F9 que un anticuerpo o anticuerpos aislados en consecuencia del mismo animal o humano antes de la administración de dicha formulación, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicho lisado o fracción del mismo;

15 y/o

d) probar la actividad del anticuerpo, anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos de suero, plasma o heces, que comprende

20 (i) incubar una cantidad adecuada de ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 y/o NM-wt, marcado con una cantidad adecuada de europio o cromo-51, con una cantidad adecuada de un anticuerpo, de anticuerpos en suero, o de anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces, con una cantidad adecuada de complemento por un tiempo adecuado, típicamente entre 3 a 5 horas, y midiendo la lisis de las células mediante la determinación de la liberación de europio o cromo-51 después de la incubación, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una lisis significativamente mayor de células NM-D4 o NM-F9 que de NM-wt o NM-H9 o muestra 25 una mayor lisis de NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1, que una lisis sin complemento y/o que una lisis sin el anticuerpo y/o que una lisis con un anticuerpo o anticuerpos que no se une o que se une menos a NM-D4, NM-F9, o ZR-75-1, y/o que una lisis de NM-D4, NM-F9, o ZR-75-1 con un anticuerpo o anticuerpos aislados en consecuencia del mismo animal o humano antes de la administración de dicha formulación, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicho lisado o fracción del mismo; y/o

30 (ii) incubar una cantidad adecuada de ZR75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 y/o NM-wt, marcado con una cantidad adecuada de europio o cromo-51, con una cantidad adecuada de un anticuerpo, de anticuerpos en suero, o de anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces, con una cantidad adecuada de al menos una célula efectora inmune o una mezcla de células que comprenden células efectoras inmunes o células mononucleares de sangre periférica durante un tiempo adecuado, típicamente entre 3 a 5 horas o durante la noche, y midiendo la lisis de las 35 células mediante la determinación de la liberación de europio o cromo-51 después de la incubación, por lo que una respuesta inmune humoral positiva contra el Nuclear-1 muestra una lisis significativamente mayor de NM-D4 o NM-F9 células que de NM-wt o NM-H9 o muestra una lisis más alta de NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1, que una lisis sin el anticuerpo y/o una lisis con un anticuerpo o anticuerpos que no se unen o que se unen menos a NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1, y/o que una lisis de NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1 con el anticuerpo o los anticuerpos se aislaron en 40 consecuencia del mismo animal o humano antes de la administración de dicha formulación, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicho lisado o fracción del mismo.

En una realización preferida adicional de la invención, la formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción o un lisado del mismo, induce una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmune humoral a partir de 45 pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 descritas anteriormente, preferiblemente positivas para pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3, y más preferiblemente para pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3, y más preferiblemente para pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 6, y aun más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 5, y lo más preferiblemente positivo para las 6 pruebas de respuesta inmunes humoral.

50 Dicha respuesta inmunitaria celular contra el Nuclear-1 es una respuesta de células T contra el Nuclear-1 que puede ser, por ejemplo, detectada por al menos una de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5 descritas aquí. Más preferiblemente, es una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 que es una respuesta de células T citotóxicas o una respuesta de células T auxiliares contra el Nuclear-1. Aun más preferiblemente es una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 que es una respuesta de células T citotóxicas y una respuesta de células T auxiliares 55 contra el Nuclear-1 que puede detectarse mediante las pruebas de respuesta inmune celular 1, 2, 3, 4 y 5 descritas en este documento. Lo más preferiblemente es una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 que es una respuesta de células T citotóxicas y una respuesta de células T auxiliares de tipo Th1 contra el Nuclear-1 que puede detectarse mediante las pruebas de respuesta inmune celular 1, 2, 3, 4 y 5.

Dichas pruebas de respuesta inmune celular comprenden poner en contacto células dendríticas cargadas con un microorganismo Nuclear-1 junto con células inmunes y el cultivo durante tiempos apropiados y en condiciones apropiadas y luego agregar para la reestimulación de células dendríticas cargadas con al menos un Nuclear-1 que lleva molécula y cultivo para tiempos y condiciones apropiados y posteriormente medir la cantidad de GM-CSF, TNFalfa o INFgamma secretada, o medir la proliferación de células T, o la inhibición de la secreción de GM-CSF, TNFalfa, o INFgamma la proliferación por anticuerpos contra el Nuclear-1 o la medición de la presentación del Nuclear-1 en las células dendríticas o la medición de la lisis de las células positivas del Nuclear-1 por las células inmunes activadas, preferiblemente por las células T activadas.

Dichas células dendríticas, en este documento también denominadas DC, pueden ser cualquier célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de células que comprenden células dendríticas o al menos una célula dendrítica. Pueden derivarse de donantes humanos que están sanos o que tienen una enfermedad, como la enfermedad tumoral o enfermedad de Crohn o enfermedad positiva al Nuclear-1 o una de las enfermedades enumeradas en este documento, o de animales. Dichas DC pueden obtenerse y cargarse como saben los expertos en la técnica y se obtienen típicamente a partir de células precursoras positivas para CD34 o células monocíticas positivas para CD14 de sangre humana o médula ósea que se diferencian en células dendríticas inmaduras (iDC) usando cierta combinación de adecuadas moléculas conocidas por los expertos en la técnica. Los iDC se cargan con el microorganismo positivo al Nuclear-1 o con la molécula portadora del Nuclear-1, o controles apropiados, y se maduran aun más utilizando cierta combinación de moléculas adecuadas conocidas por los expertos en la técnica para obtener células dendríticas cargadas que corresponden a células dendríticas maduras cargadas (mDC) que son capaces de activar células T.

Dichas CD también pueden originarse a partir de una línea celular dendrítica tal como, entre otras, la línea celular dendrítica humana NEMOD-DC (que se puede obtener de Glycotope GmbH Berlin, Alemania; www.glycotope.com) o Mutz-3.

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

Dichas células inmunes pueden ser PBMC (células mononucleares de sangre periférica) u otras poblaciones celulares que comprenden células T CD4+ y/o CD8+, preferiblemente células T CD4+ y CD8+. Los expertos en la materia saben cómo obtener esas células de un humano o animal y la generación de esas células puede comprender preparaciones por gradiente de Ficoll de sangre humana o de células sanguíneas de leucaferasas y puede comprender en caso de enriquecimiento adicional mediante tecnologías de clasificación magnética específicas de células T.

En una realización preferida, las células dendríticas se emparejan en al menos una molécula de clase MHC con las células inmunes, preferiblemente en una molécula de clase I de MHC o molécula de clase II de MHC, más preferible en al menos una molécula de clase I de MHC y una clase de MHC II, más preferiblemente en más moléculas MHC y más preferiblemente en todas las moléculas MHC. Esto último se puede lograr obteniendo las células dendríticas y las células inmunes del mismo individuo.

Dichos tiempos y condiciones apropiados para el cultivo de las células inmunes con las células dendríticas cargadas y para la posterior adición de las células dendríticas cargadas son conocidos por los expertos en la técnica y pueden ser optimizados por ellos teniendo en cuenta las condiciones en que se encuentren las células. Normalmente, el tiempo de incubación es de 7 a 10 días para cada uno de los dos pasos (activación primaria y reestimulación).

Dicha molécula portadora del Nuclear-1 en el sentido de las pruebas de respuesta inmune celular descritas significa cantidades suficientes de una célula o célula tumoral portadora del Nuclear-1, una proteína portadora del Nuclear-1, o un polipéptido portador del Nuclear-1. Dicha célula o célula tumoral portadora del Nuclear-1 puede estar viva o muerta, o un lisado de esas células o una fracción de las mismas, más preferido es un lisado. Una proteína portadora del Nuclear-1 puede ser cualquier proteína portadora del Nuclear-1, como las proteínas transportadoras, en las que el Nuclear-1 se une a los tumores. Un polipéptido que lleva Nuclear-1 puede ser cualquier polipéptido que lleve Nuclear-1, preferiblemente aquellos que pueden presentarse con Nuclear-1 en la mDC.

Dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 en el sentido de los ensayos de respuesta inmune celular descritos significa cantidades suficientes del microorganismo positivo en particular Nuclear-1 que puede estar vivo o muerto, o un lisado de esas células o una fracción del mismo, más preferido es un lisado o una fracción del mismo.

Deben usarse controles para confirmar aun más la positividad de la respuesta inmune. Los expertos en la técnica pueden usar controles apropiados como los que se describen con más detalle a continuación y en el ejemplo 12. Los ejemplos son el uso de controles que se cargan en el CD como se describe para las moléculas portadoras del Nuclear-1 y se usan para la reestimulación y puede comprender (i) células que son negativas para el Nuclear-1,

preferiblemente aquellas que se parecen lo más posible a las células positivas del Nuclear-1 como moléculas portadoras del Nuclear-1, en el formato correspondiente como vivo o muerto, o un lisado de esas células o una fracción de las mismas; (ii) una proteína que no porta Nuclear-1, preferiblemente la misma proteína que se usa como Nuclear-1 pero sin Nuclear-1, preferiblemente sin glicosilación o con una estructura Nuclear-1 sialilada, (iii) un polipéptido que no porta Nuclear-1, preferiblemente el mismo polipéptido que se usa como molécula portadora del Nuclear-1 pero sin Nuclear-1, preferiblemente sin glicosilación o con una estructura Nuclear-1 sialilada o la estructura Tn (GalNAcalf α 1-O-Ser/Thr). Los controles adicionales pueden ser (iv) mDC no cargados tratados de la misma manera que el mDC cargado con moléculas portadoras Nuclear-1, incluidas las moléculas necesarias y las condiciones para la maduración, pero sin ninguna molécula adicional correspondiente a la molécula portadora de Nuclear-1 o mencionada anteriormente controles (i-iii). Los ejemplos y las realizaciones preferidas describen en detalle los controles más adecuados, mientras que los expertos en la técnica podrían seleccionar otros adecuados.

En una realización preferida de la invención, las células dendríticas son células dendríticas funcionales obtenidas de la línea celular de leucemia MUTZ-3 (DSMZ ACC295) o células derivadas de MUTZ-3 tales como NEMOD-DC [como se describe en DE10139428 A1, WO2003/023023 A1, EP01419240, US20040265998, CA2457287, 10139428.4 (DE), PCT/EP02/09260, 02758474.7 (EP), US10/486,966, CA2,457,287)] y obtenible de Glycotope GmbH Berlin, Alemania [www.Glycotope.com]. Esas células dendríticas son células dendríticas activas que son completamente capaces de activar células T y procesar y/o presentar antígenos en su superficie, incluso en moléculas de clase MHC. En una realización preferida adicional de la invención, las células dendríticas son células dendríticas funcionales obtenidas de MUTZ-3 o células derivadas de MUTZ-3, tales como NMD-200, y las células inmunes se emparejan en una molécula de clase I de MHC tal como HLA-A2 o HLA-B44, preferiblemente HLA-A2 y HLA-B44. En una realización preferida adicional, se utiliza un lisado de NM-D4 o NM-F9 como molécula portadora del Nuclear-1 y NM-wt [que es la célula parental de NM-D4 o NM-F9 como se describe en los documentos WO2005/017130 A2 y EP1654353] o NM-H9 [NM-H9D8, DSM ACC2806], que difiere en el potencial de sialilato y, por lo tanto, en contraste con NM-D4 y NM-F9 no lleva Nuclear-1 en su superficie, como control en el formato correspondiente como vivo o muerto, o un lisado de esas células o una fracción de las mismas, más preferido es un lisado, ambos cargados en el CD y utilizados para la reestimulación. En otra realización preferida, la glicoforina o la asialoglicoforina tratada con peryodato como control de la asialoglicoforina se cargan en la CD y se usan para la reestimulación. En una realización más preferida, un lisado de NM-D4 o NM-F9 y asialoglicoforina se usa como molécula portadora de Nuclear-1 para la reestimulación y NM-wt [NM-H9] y glicoforina o asialoglicoforina tratado con peryodato y/o DC descargados se utilizan como controles negativos.

Debido a las variaciones de experimento a experimento que son en particular típicas para los métodos inmunológicos celulares conocidos por los expertos en la técnica, los controles deben establecerse en paralelo a la prueba, tal como lo saben los expertos en la materia.

De acuerdo con una realización, una prueba de respuesta inmune celular in vitro contra el Nuclear-1 comprende

- a.) cargar al menos una célula dendrítica con un primer compuesto positivo al Nuclear-1, en donde dicho compuesto positivo al Nuclear-1 porta Nuclear-1;
- b.) poner en contacto una cantidad adecuada de dicha al menos una célula dendrítica cargada con dicho compuesto positivo al Nuclear-1 con una cantidad adecuada de células inmunes que pueden ser activadas o inhibidas por una célula dendrítica;
- c.) cultivar para permitir la interacción de dichas células inmunes con dichas células dendríticas cargadas;
- d.) agregar una cantidad adecuada de células presentadoras de antígeno (APC) cargadas con una cantidad adecuada de al menos un segundo compuesto que contenga Nuclear-1, en donde dicho segundo compuesto es diferente de dicho primer compuesto positivo al Nuclear-1;
- e.) cultivar para la reestimulación de dichas células inmunes
- f.) determinar la cantidad de células inmunes reestimuladas.

Se describe un método para determinar si un microorganismo o compuesto positivo al Nuclear-1 en general es capaz de desencadenar una respuesta inmune celular. Hasta ahora, el estado de la técnica supuso que los carbohidratos son incapaces de desencadenar una respuesta inmune celular. Sin embargo, ahora se ha encontrado que ciertos epítomos de carbohidratos son capaces de provocar una respuesta inmune celular. Por lo tanto, es importante proporcionar sistemas de prueba para determinar si un cierto epítomo de carbohidrato, aquí Nuclear-1, está en la forma presentada (por ejemplo, por un microorganismo positivo al Nuclear-1 de acuerdo con la presente invención o un conjugado Nuclear-1) de hecho capaz de desencadenar una respuesta respectiva, determinando de este modo si dicho compuesto positivo al Nuclear-1 es un producto terapéutico/nutracéutico adecuado. Por lo tanto, la invención utiliza células dendríticas, ya que las células dendríticas son capaces de cebar y, por lo tanto, estimular células inmunes tales como las células T. Las células dendríticas procesan los compuestos con los que se encuentran y presentan los compuestos/antígenos procesados en su superficie. Sin embargo, las células MHC, como las células dendríticas, solo pueden presentar ciertos tipos de antígenos y es importante determinar si las células dendríticas pueden presentar el epítomo Nuclear-1 en su entorno sobre el microorganismo o el portador, las

células dendríticas pueden presentarlas de la forma correcta, solo desde entonces estos compuestos/microorganismos son capaces de provocar una respuesta inmune celular. Los principios de esta prueba de respuesta inmunitaria celular también se ilustran en la Figura 23.

5 Por lo tanto, las células dendríticas se cargan con el compuesto positivo al Nuclear-1 de interés. Dicho compuesto puede por ejemplo sea un microorganismo portador del Nuclear-1 como se describe aquí, una célula tumoral o cualquier otro compuesto portador del Nuclear-1. Las condiciones adecuadas para la carga y los compuestos adecuados que llevan estructuras de hidratos de carbono se describen en el presente documento.

10 Dichas células dendríticas cargadas se ponen en contacto con células inmunes, en particular linfocitos tales como células T. Las células inmunes se pueden obtener, por ejemplo, de donantes humanos. Las células dendríticas que presentan antígenos que coinciden con los receptores de las células inmunitarias se activan y, por lo tanto, estimulan a los linfocitos, lo que les permite proliferar y sobrevivir. Los linfocitos que no coinciden con los antígenos presentados por las células dendríticas no se activan y mueren.

15 Esta primera ronda de estimulación proporciona linfocitos activados que son específicos para cualquier antígeno correspondiente presentado por dichas células dendríticas cargadas, incluido el Nuclear-1 si se presenta. Sin embargo, el objetivo del presente método es identificar si el compuesto que comprende un epítipo/antígeno de carbohidrato de interés, en este caso Nuclear-1, puede estimular una respuesta celular específica contra el Nuclear-1.

20 Por lo tanto, se realiza una etapa de selección en la que los linfocitos se reestiman para determinar si Nuclear-1 estimula a los linfocitos y, por lo tanto, desencadena una respuesta celular. En dicha etapa de selección, el antígeno presenta células tales como, por ejemplo, las células dendríticas están cargadas con un segundo compuesto que también lleva Nuclear-1. Sin embargo, dicho segundo compuesto es diferente del primer compuesto. Por ejemplo, el primer compuesto es un microorganismo que porta Nuclear-1 y el segundo compuesto es una célula tumoral que porta Nuclear-1. Este segundo compuesto también es procesado por los APC y los antígenos son presentados por dichos APC. Como el segundo compuesto es diferente del primer compuesto de antígenos más presentados, 25 preferiblemente todos los antígenos son, además del Nuclear-1, diferentes de los antígenos presentados en la primera ronda. Esto tiene el efecto de que solo esos linfocitos sobreviven a la segunda ronda de reestimulación que encuentra un antígeno compatible presentado por dichas APC, a saber, Nuclear-1. En el caso de que tanto las células dendríticas de la primera ronda como las APC de la segunda ronda presenten un antígeno que comprende o que consiste en Nuclear-1 (o una estructura que imita inmunológicamente al Nuclear-1), los linfocitos que reconocen dicho antígeno son estimulados y, por lo tanto, sobreviven como también son reestimulados. Aquellos linfocitos que 30 no encuentran una pareja adecuada cuando entran en contacto con dichas APC cargadas con dicho segundo compuesto positivo al Nuclear-1 mueren debido a la falta de reestimulación. Este paso de selección asegura que se detecte una respuesta celular contra el Nuclear-1.

35 En el último paso se determina si los linfocitos fueron reestimulados. Esto se puede hacer, por ejemplo, determinando

- productos de secreción de los linfocitos que se secretan si dichos linfocitos son (re)estimulados, como interferón alfa, interferón gamma o GM-CSF.
- la proliferación de las células T.

Las pruebas adecuadas para determinar si se produce la reestimulación se describen aquí.

40 La especificidad de dicho ensayo puede mejorarse utilizando una estructura de unión a carbohidratos que reconoce específicamente el Nuclear-1 cuando se presenta por las células dendríticas/APC. De acuerdo con dicha realización, al menos una porción de dichos linfocitos estimulados de acuerdo con la etapa c) se ponen en contacto con una cantidad adecuada de células presentadoras de antígeno (APC) cargadas con una cantidad adecuada de al menos un segundo compuesto positivo al Nuclear-1, en donde dicha segunda el compuesto es diferente de dicho primer 45 compuesto positivo en carbohidratos, en presencia de una molécula de unión a Nuclear-1 que reconoce a Nuclear-1. Dicha molécula de unión Nuclear-1 bloquea la interacción de las APC con dichos linfocitos, lo que evita la reestimulación y, por lo tanto, la supervivencia de las células. Este paso adicional asegura además que el carbohidrato de interés estimule específicamente los linfocitos y, por lo tanto, desencadene una respuesta inmune celular específica. Esta etapa de mejora/confirmación de la especificidad se puede realizar en paralelo, dividiendo 50 los linfocitos estimulados de acuerdo con la etapa c, o realizando dicha etapa de confirmación/mejora adicionalmente y, por lo tanto, posteriormente. Las moléculas de unión a Nuclear-1 adecuadas, preferiblemente anticuerpos, se describen en el presente documento.

Según una realización, se proporciona una prueba de respuesta inmunitaria celular (prueba de respuesta inmunitaria celular 1) contra el Nuclear-1 que comprende

55 a.) poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1, un lisado o una fracción de la misma,

formulaciones que comprenden aquellas, el nutraceutico o la composicion farmaceutica de la invencion junto con una cantidad adecuada de células inmunes que comprenden al menos una célula inmune, células T CD4+, células T CD8+, una mezcla de células que comprende al menos una célula T, o células mononucleares de sangre periférica, que pueden ser activadas o inhibidas por una célula dendrítica

5 b.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada

c.) agregar una cantidad adecuada de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas, o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora de Nuclear-1

d.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada para la reestimulación

10 e) medir la cantidad de GM-CSF secretado, por ejemplo, por ELISA o ELISPOT, mediante el cual una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor secreción de GM-CSF de dichas células inmunes reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con una molécula portadora del Nuclear-1 que la secreción de GM-CSF de las correspondientes células inmunes reestimuladas con las correspondientes células dendríticas
15 descargadas y/o una mayor secreción de GM-CSF de dichas células inmunes reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con una molécula portadora del Nuclear-1 que la secreción de GM-CSF de las correspondientes células inmunes reestimuladas con las células dendríticas correspondientes cargadas con una molécula que no porta Nuclear-1 y/o una mayor secreción de GM-CSF de dichas células inmunes reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con asialoglicoforina que la secreción de GM-CSF de las correspondientes
20 células inmunes reestimuladas con las correspondientes células dendríticas cargadas con glicoforina o peryodato tratado como asialoglicofenina o una mayor secreción de GM-CSF de dichas células inmunes reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con un lisado o fracciones de NM-D4 o NM-F9 que la secreción de GM-CSF de las células inmunitarias correspondientes reestimuladas con las células dendríticas correspondientes cargadas con un lisado de NM-wt o NM-H9.

25 Células inmunes correspondientes significa que las mismas células inmunes, que son o comprenden al menos una célula inmune, células T CD4+, células T CD8+, una mezcla de células que comprenden al menos una célula T o células mononucleares de sangre periférica u otras células descritas en otros lugares y mezclas de células, que pueden ser activadas o inhibidas por una célula dendrítica, se utilizan para el control o prueba comparativa con una molécula de control o prueba, mezcla de moléculas, células, lisados o fracciones celulares, microorganismos o fracciones de las mismas que aquellas que son utilizado para dichas células inmunes con el fin de permitir una
30 comparación.

Células dendríticas correspondientes significa que las mismas células dendríticas, que son o comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas, o una mezcla de células que comprende al menos una célula dendrítica u otra célula descrita en otro lugar y mezclas de células capaces de activar las células T, cargadas con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora del Nuclear-1, se utilizan para el control o prueba comparativa con
35 una molécula de control o prueba, mezcla de moléculas, células, lisados o fracciones celulares, microorganismos o fracciones de los mismos o sin ninguno, que los que se utilizan para dichas células dendríticas con el fin de permitir una comparación.

Esto es conocido por los expertos en la técnica y pueden seleccionarse por los expertos en la técnica. Esto se muestra con más detalle en los ejemplos. Para aclarar: por ejemplo, la misma cantidad de células inmunes de la
40 misma preparación se ponen en contacto con la misma cantidad de células dendríticas de la misma preparación cargada con la misma cantidad de asialoglicoforina y en paralelo con la misma cantidad de glicoforina o asialoglicoforina tratado con peryodato y utilizado en la prueba con el fin de permitir una comparabilidad óptima.

Las variaciones son conocidas por los expertos en la técnica y pueden ser determinadas por ellos o se describen con más detalle en los ejemplos.

45 Dicha prueba de respuesta inmunitaria celular 1 prueba la activación de células T CD4+ y/o CD8+ a células T activadas CD4+ y/o CD8+ específicas del Nuclear-1 por un microorganismo positivo al Nuclear-1 mediante la medición de la secreción inducida específica de GM-CSF que comprende poner en contacto células dendríticas cargadas con un microorganismo Nuclear-1, lisado o fracción de las mismas y células inmunes y cultivarlas en tiempos y condiciones apropiados y posteriormente agregar células dendríticas cargadas con la molécula portadora
50 del Nuclear-1 para la reestimulación y el cultivo durante tiempos y condiciones apropiados y posteriormente midiendo la cantidad de GM-CSF secretado en respuesta a esta reestimulación. Dicha medición de la cantidad de GM-CSF secretada se realiza preferiblemente mediante ELISA o ELISPOT, más preferiblemente ELISA, y es conocida por los expertos en la técnica. En la realización más preferida de la invención, el ensayo de respuesta inmunitaria celular 1 comprende poner en contacto células dendríticas funcionales obtenidas de células derivadas de
55 MUTZ-3 cargadas con microorganismo positivo al Nuclear-1 junto con PBMC (células mononucleares de sangre periférica) apareadas al menos en MHC clase I (HLA-A2) y (HLA-B44) y el cultivo de estas células durante los tiempos y condiciones apropiados, generalmente de 7 a 10 días, y posteriormente se agregan para la reestimulación las células dendríticas funcionales obtenidas de células derivadas de MUTZ-3 cargadas con lisado de NM-D4 o NM-

F9, o con asialoglicoforina y el cultivo durante tiempos y condiciones apropiados, generalmente de 7 a 9 días, y posteriormente se mide la cantidad de GM-CSF secretado en un análisis ELISA o ELISPOT. El análisis ELISA y ELISPOT de la liberación de GM-CSF es conocido por los expertos en la técnica y se describe en detalle en ejemplos. Una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor secreción de GM-CSF de las células inmunitarias reestimuladas con DC cargadas con un lisado de NM-D4 o NM-F9 que la secreción de las células inmunes reestimuladas con DC cargadas con un lisado de NM-wt o NM-H9 y/o muestra una mayor secreción de GM-CSF de las células inmunes reestimuladas con DC cargadas con asialoglicoforina que las células inmunes reestimuladas con DC cargadas con glicoforina. En una realización preferida, la secreción de GM-CSF inducida con NM-D4 o NM-F9 es 2 veces mayor que la inducida con NM-wt, más preferiblemente 3 veces mayor. En una realización preferida, la secreción de GM-CSF inducida con asialoglicoforina es 2 veces más alta que la inducida con glicoforina, más preferiblemente 3 veces más alta. Una realización preferida de la prueba de respuesta inmune celular 1 se describe en detalle en el ejemplo 12.

En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmune celular (prueba de respuesta inmune celular 2) contra el Nuclear-1 comprende

a.) poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1, a un lisado o una fracción del mismo, formulaciones que comprenden aquellas, el nutracéutico o la composición farmacéutica de la invención junto con una cantidad adecuada de células inmunitarias que comprenden al menos una célula inmunitaria, células T CD4+, células T CD8+, una mezcla de células que comprende al menos una célula T, o células mononucleares de sangre periférica, que pueden ser activadas o inhibidas por una célula dendrítica

b.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada

c.) agregar una cantidad adecuada de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora del Nuclear-1

d.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada para la reestimulación

e.) medir la cantidad de IFNgamma secretada y/o TNFalfa secretada por ELISA o ELISPOT, por lo que una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor IFNgamma y/o TNFalfa secreción de dichas células inmunes restringidas con dichas células dendríticas cargadas con una molécula portadora del Nuclear-1 que el IFNgamma y/o la secreción de TNFalfa de las correspondientes células inmunitarias reestimuladas con las correspondientes células dendríticas descargadas y/o una mayor IFNgamma y/o la secreción de TNFalfa de dichas células inmunes reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con un Nuclear-1 molécula portadora que la secreción de IFNgamma y/o TNFalfa de las correspondientes células inmunitarias reestimuladas con las correspondientes células dendríticas cargadas con una molécula que no lleva Nuclear-1 y/o una mayor IFNgamma y/o TNFalfa secreción de dichas células inmunes reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con asialoglicoforina que el IFNgamma y/o secreción de TNFalfa de las células inmunitarias correspondientes reestimuladas con las correspondientes células c dendríticas cargadas con glicoforina o asialoglicoforina tratada con peryodato y/o una secreción de IFNgamma y/o TNFalfa mayor de dichas células inmunitarias reestimulan dichas células dendríticas cargadas con un lisado o fracciones de NM-D4 o NM-F9 que el IFNgamma y/o la secreción de TNFalfa de las células inmunitarias correspondientes reestimuladas con células dendríticas correspondientes cargadas con un lisado de NM-wt o NM-H9.

Dicha prueba de respuesta inmunitaria celular 2 prueba la activación de las células T citotóxicas como CTL (linfocitos T citotóxicos) y Th1 (células auxiliares T citotóxicas) a células T citotóxicas activadas específicas del Nuclear-1 por un microorganismo positivo al Nuclear-1 mediante la medición la secreción inducida específica de IFNgamma y/o TNFalfa que comprende poner en contacto células dendríticas cargadas con un microorganismo Nuclear-1 y células inmunes y el cultivo durante tiempos y condiciones apropiados y posteriormente agregar células dendríticas cargadas con la molécula portadora de Nuclear-1 para la reestimulación y el cultivo para tiempos y condiciones apropiados y posteriormente medir la cantidad de IFNgamma secretada y/o TNFalfa secretada en respuesta a esta reestimulación. Dicha medición de la cantidad de IFNgamma secretada y/o TNFalfa se realiza preferiblemente mediante ELISA o ELISPOT, más preferiblemente ELISPOT y es conocida por los expertos en la técnica. En la realización más preferida de la invención, el ensayo de respuesta inmune celular 2 comprende poner en contacto células dendríticas funcionales obtenidas de células derivadas de MUTZ-3 cargadas con microorganismo positivo al Nuclear-1 junto con PBMC (células mononucleares de sangre periférica) apareadas al menos en MHC clase I (HLA-A2 y HLA-B44) y el cultivo de estas células para tiempos y condiciones apropiados, típicamente de 7 a 10 días, y posteriormente se agregan para la reestimulación las células dendríticas funcionales obtenidas de células derivadas de MUTZ-3 cargadas con lisado de NM-D4 o NM-F9, o con asialoglicoforina y el cultivo para tiempos y condiciones apropiados, típicamente de 7 a 9 días, y posteriormente se mide la cantidad de IFNgamma secretada por análisis ELISPOT y/o TNFalfa secretada por análisis ELISA. El análisis ELISA y ELISPOT de TNFalfa e IFNgamma es conocido por los expertos en la técnica y se describe en detalle en ejemplos. Una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor secreción de IFNgamma y/o TNFalfa por las células inmunes reestimuladas

con DC cargadas con un lisado de NM-D4 o NM-F9 que la secreción de las células inmunes reestimuladas con DC cargadas con un lisado de NM-wt o NM-H9 y/o muestra una mayor secreción de IFNgamma y/o TNFalfa de las células inmunitarias reestimuladas con DC cargadas con asialoglicoforina que las células inmunes reestimuladas con glicoforina cargada DC. En una realización preferida, la secreción de IFNgamma y/o TNFalfa inducida con NM-D4 o NM-F9 es 2 veces mayor que la inducida con NM-wt, más preferiblemente 3 veces mayor. En una realización preferida, la secreción de GM-CSF inducida con asialoglicoforina es 2 veces mayor que la inducida con glicoforina, más preferiblemente 3 veces mayor. Una realización preferida de la prueba de respuesta inmune celular 2 se describe en detalle en el ejemplo 12.

En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmune celular (prueba de respuesta inmune celular 3) contra el Nuclear-1 comprende

a.) poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1, a lisado o una fracción del mismo, formulaciones que comprenden aquellas, el nutracéutico o la composición farmacéutica de la invención junto con una cantidad adecuada de células inmunitarias que comprenden al menos una célula inmunitaria, células T CD4+, células T CD8+, una mezcla de células que comprende al menos una célula T, o células mononucleares de sangre periférica, que pueden ser activadas o inhibidas por una célula dendrítica

b.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada

c.) agregar una cantidad adecuada de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora del Nuclear-1

d.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada para la reestimulación y

e.) medir la proliferación y/o la inducción de la proliferación, preferiblemente utilizando la reacción WST en combinación con una medición colorimétrica, por lo que una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor proliferación o número de células T después de un cierto tiempo del cultivo cuando se reestiman con dichas células dendríticas cargadas con una molécula portadora de Nuclear-1 que cuando se reestiman con las células dendríticas descargadas correspondientes y/o una mayor proliferación o número de células T después de un cierto tiempo de cultivo cuando se reestiman con dichas células dendríticas cargadas con molécula portadora del Nuclear-1 que cuando se reestima con las células dendríticas correspondientes cargadas con una molécula que no porta Nuclear-1 y/o una mayor proliferación o número de células T después de un cierto tiempo de cultivo cuando se reestima con dichas células dendríticas cargadas con asialoglicoforina que cuando se reestima con las células dendríticas correspondientes cargadas con glicoforina o asialoglicoforina tratada con peryodato y/o una mayor proliferación o número de células T después de un cierto tiempo de cultivo cuando se reestiman con dichas células dendríticas cargadas con un lisado o fracciones de NM-D4 o NM-F9 que cuando se reestiman con las células dendríticas correspondientes cargadas con un lisado de NM -wt o NM-H9.

Dicha prueba de respuesta inmunitaria celular 3 prueba la activación de células T CD4+ y CD8+ a células T activadas específicas del Nuclear-1 por un microorganismo positivo al Nuclear-1 mediante la medición de la inducción de la proliferación de células T que comprende poner en contacto células dendríticas cargadas con un microorganismo positivo al Nuclear-1 y células inmunes y cultivo para tiempos y condiciones apropiados y posteriormente agregar células dendríticas cargadas con la molécula portadora de Nuclear-1 para la reestimulación y el cultivo para tiempos y condiciones apropiados y posteriormente medir la proliferación. Dicha medición de la inducción de la proliferación se realiza preferiblemente utilizando la reacción de WST en combinación con una medición colorimétrica y la deducción de la DC sola y las células inmunes no reestimuladas solas, que conocen los expertos en la materia y se describen en el ejemplo 12. En la realización más preferida de la invención, el ensayo de respuesta inmune celular 3 comprende poner en contacto células dendríticas funcionales obtenidas de células derivadas de MUTZ-3 cargadas con microorganismo positivo al Nuclear-1 junto con PBMC (células mononucleares de sangre periférica) emparejadas al menos en la clase MHC I (HLA-A2 y HLA-44) y el cultivo de estas células para tiempos y condiciones apropiados, típicamente de 7 a 10 días, y posteriormente se agregan para la reestimulación funcional de células dendríticas obtenidas de células derivadas de MUTZ-3 cargadas con lisado de NM-D4 o NM-F9, o con asialoglicoforina y el cultivo para tiempos y condiciones apropiados, típicamente 7 a 9 días, y posteriormente medir la tasa de proliferación como se describió anteriormente y con más detalle en el ejemplo 12. Una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una mayor proliferación de células T reestimuladas con DC cargadas con la molécula portadora del Nuclear-1 que la tasa de proliferación de las DC solas y la células T puestas en contacto con mDC descargadas o con DC cargadas con el control correspondiente. En una realización preferida, la proliferación de las células T inducidas con DC cargadas con NM-D4 o NM-F9 es 2 veces mayor que la inducida con NM-wt o NM-H9, más preferiblemente 3 veces mayor. Una realización preferida de la prueba de respuesta inmune celular 3 se describe en detalle en el ejemplo 12.

En otra realización preferida, una prueba de respuesta inmunitaria celular (prueba de respuesta inmunitaria celular 4) contra el Nuclear-1 comprende poner en contacto una cantidad adecuada de una célula dendrítica, células

dendríticas o una mezcla de células que comprende al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1, un lisado o una fracción del mismo, formulaciones que los comprenden, el nutracéutico o la composición farmacéutica de la invención o una molécula portadora del Nuclear-1, una mezcla que comprende una molécula portadora del Nuclear-1, una células positivas al Nuclear-1, un lisado o fracción del mismo, junto con una cantidad adecuada de al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1, preferiblemente Nemod-TF1, Nemod-TF2 o A78-G/A7, por lo que una presentación positiva al Nuclear-1 en dicha célula o células dendríticas está presente cuando la unión del anticuerpo específico del Nuclear-1 es mayor a dicha célula o células dendríticas cargadas con una molécula portadora del Nuclear-1 que su unión a una célula dendrítica descargada correspondiente o células o a una célula o células dendríticas correspondientes cargadas con una molécula que no porta el Nuclear-1 o una molécula portadora del Nuclear-1 tratada con peryodato y/o cuando la unión del anticuerpo específico del Nuclear-1 es mayor a dicha célula o células cargadas dendríticas con el microorganismo, lisado o fracción del mismo Nuclear-1, el nutracéutico, la composición farmacéutica o las formulaciones del mismo, que a una célula o células dendríticas correspondientes descargadas o que a la célula o células dendríticas correspondientes cargadas con un microorganismo que no se une por un anticuerpo específico para el Nuclear-1 o hacia una célula o células dendríticas correspondientes cargadas con el microorganismo positivo al Nuclear-1 después del tratamiento con peryodato.

Dicha prueba de respuesta inmune celular 4 prueba la capacidad de las células dendríticas para presentar Nuclear-1 en su superficie después de cargar con un microorganismo positivo al Nuclear-1 que muestra el potencial de las células dendríticas cargadas para procesar y presentar el Nuclear-1 derivado de microorganismos para inmune células tales como células T que comprenden reunir cantidades adecuadas de microorganismo positivo al Nuclear-1 y células dendríticas en un estado adecuado de diferenciación y maduración, preferiblemente DC inmaduras que luego se maduran a mDC usando un cóctel apropiado de moléculas conocidas por los expertos en la técnica y mida la presentación del Nuclear-1 por la DC cargada probando la unión de un anticuerpo específico del Nuclear-1 de la invención a dicha DC cargada. Dicha prueba de la unión se realiza mediante métodos apropiados, preferiblemente inmunocitoquímica, inmunofluorescencia o citometría de flujo, y más preferiblemente mediante inmunocitoquímica que son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en los ejemplos. La prueba muestra una presentación positiva de las DC cargadas cuando la unión del anticuerpo específico del Nuclear-1 es mayor a las DC cargadas con el microorganismo positivo Nuclear-1 que a las DC descargadas, o más preferiblemente a las DC cargadas con un microorganismo que no se une por un anticuerpo específico Nuclear-1 o en DC cargado con el microorganismo positivo Nuclear-1 después del tratamiento con peryodato. En la realización más preferida de la invención, el ensayo de respuesta inmune celular 4 comprende poner en contacto cantidades adecuadas de células dendríticas inmaduras funcionales obtenidas de células derivadas de MUTZ-3 con lisados de un microorganismo positivo al Nuclear-1 y subsiguiente cultivo y maduración durante 24 h - 48 horas utilizando un cóctel de moléculas adecuado, tal como se describe en el ejemplo 12 y probando la presentación del Nuclear-1 a través de microscopía de inmunofluorescencia (inmunocitoquímica) utilizando los anticuerpos específicos del Nuclear-1 Nemod-TF1 o Nemod-TF2 o A78-G/A7. En una realización preferida, la unión de Nemod-TF1, Nemod-TF2 o A78-G/A7 es al menos 2 veces más alta que la DC cargada con un microorganismo Negativo al Nuclear-1, más preferiblemente una fuerte unión de Nemod-TF1, Nemod TF2 o A78-G/A7 a DC cargados con el microorganismo positivo al Nuclear-1 pueden detectarse y no se obtiene la unión de los anticuerpos sobre el fondo con DC descargados o con DC cargados con un microorganismo negativo para el Nuclear-1.

Una realización preferida de la prueba de respuesta inmune celular 4 se describe en detalle en el ejemplo 12.

En otra realización, una prueba de respuesta inmune celular (prueba de respuesta inmune celular 5) contra el Nuclear-1 comprende

a) incubar una cantidad adecuada de células diana de las líneas celulares ZR-75-1, NM-D4, NM-F9, NM-H9 y/o NM-wt marcadas con una cantidad adecuada de europio o cromo-51 con al menos una célula inmunitaria dirigida contra el Nuclear-1 o una mezcla de células que comprende al menos una célula inmunitaria dirigida contra el Nuclear-1 durante un tiempo adecuado (típicamente entre 3-6 horas o durante la noche) y en condiciones adecuadas y

b) medir la lisis de las células diana mediante la determinación de la liberación de europio o cromo-51, por lo que una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una lisis significativamente mayor de células NM-D4 o NM-F9 que de NM-wt o NM-H9 o muestra una lisis significativamente mayor de NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1 incubada con células inmunes dirigidas a Nuclear-1, que una lisis de NM-D4, NM-F9 o ZR 75-1 incubados con las correspondientes células inmunitarias de control.

Dichas 5 CIRT (prueba de respuesta inmune celular) prueban la citotoxicidad específica del Nuclear-1 de las células inmunes dirigidas contra el Nuclear-1 como, por ejemplo, células T, células T, clon de células T, línea de células T, células T positivas para CD4, CD8 células T positivas, células NK y/o PBMC.

La generación de células inmunes dirigidas a Nuclear-1 se describe en otra parte en este documento.

En una realización preferida de la invención, las células inmunes dirigidas a Nuclear-1 se obtienen mediante la administración de la formulación de la invención, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción o lisado de los mismos a un ser humano o animal, más preferido por la administración de la formulación de la invención, el

microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción o lisado del mismo a un humano o animal y el posterior aislamiento de las células inmunitarias del humano o animal mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica y descritas en el presente documento tales como, pero sin limitación, la separación en gradiente de Ficoll de células inmunes de sangre total o de células sanguíneas de leucaferasas y/o separación de subpoblaciones de células inmunes mediante técnicas de separación de perlas inmunomagnéticas.

En otra realización preferida de la invención, las células inmunitarias dirigidas a Nuclear-1 se reestiman al menos una vez con células dendríticas cargadas con la formulación de la invención, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción o lisado de las mismas o una molécula portadora de Nuclear-1 o célula tumoral, como se describe en otra parte del presente documento, antes de su uso en CIRT 5.

En una realización más preferida de la invención, las células inmunes dirigidas a Nuclear-1 se reestiman más de una vez con células dendríticas cargadas con la formulación de la invención, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción o lisado de las mismas o una molécula portadora o célula tumoral antes de su uso en CIRT 5, por lo que Nuclear-1 en diferentes portadores (como pero no limitándose a Nuclear-1 en o de microorganismo, Nuclear-1 molécula portadora, Nuclear-1 proteína portadora o célula tumoral) se utiliza para diferentes rondas de reestimulación.

En una realización aun más preferida, las células T activadas con Nuclear-1 se reestiman al menos una vez con células dendríticas cargadas con otra molécula o célula o fracción de dicha célula que comprende el Nuclear-1 y que no se presenta en el microorganismo Nuclear-1, preferiblemente un lisado de una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 que no se usa para medir la cantidad de lisis.

En una realización aun más preferida de la invención, la activación o generación de células inmunes dirigidas a Nuclear-1, o la reestimulación de las células inmunes específicas del Nuclear-1, o la lisis de las células tumorales positivas al Nuclear-1 se inhibe en una cantidad adecuada de al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1.

La prueba comprende incubar cantidades adecuadas de células diana positivas marcadas con Nuclear-1 tales como ZR75-1, preferiblemente NM-D4 o NM-F9, con cantidades adecuadas de células inmunes dirigidas contra el Nuclear-1 durante un tiempo adecuado, típicamente entre 3 y 6 horas o durante la noche. Las células tumorales positivas al Nuclear-1 están marcadas con europio o cromo-51, lo que permite la medición de las células que están lisadas. La cantidad de células lisadas se determina, preferiblemente midiendo la liberación de europio o cromo-51 después de la incubación. Los expertos en la técnica pueden determinar un control adecuado, como las células negativas al Nuclear-1 (preferiblemente NM-wt o NM-H9) o las células inmunitarias de control correspondientes no dirigidas contra el Nuclear-1. Los expertos en la técnica pueden optimizar la prueba con respecto a números adecuados de células tumorales marcadas, números de células efectoras inmunes y tiempo de incubación para su uso en la invención.

En una realización preferida, la CIRT 5 se realiza utilizando un ensayo de liberación de europio. Las células diana NM-D4 se incuban durante 10 minutos a 4°C en 800 µl de regulador de europio (HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 93 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, ácido dietilentriaminopentaacético 10 mM, acetato de europio (III) 2 mM), sometido a electroporación (710 V, 1 pulso, 30 µs) en un Multiporator (Eppendorf) y posteriormente se incuba en hielo durante otros 10 minutos. Posteriormente, las células se lavan 5 veces en RPMI/5% de FCS y se siembran en una placa de fondo redondo de 96 pozos (Nunc; 5x10³/pozo). A partir de entonces, se agregan células inmunes dirigidas a Nuclear-1 o células inmunes correspondientes como células efectoras (100 µl/pozo), usando diferentes relaciones de células efectoras/células diana de 100:1 a 5:1, preferiblemente relaciones de células efectoras/células diana de 50:1 a 20:1. Para determinar la liberación espontánea, se agregan 100 µl de RPMI/5% de FCS sin células efectoras. La liberación máxima se determina después de la lisis completa del objetivo con etanol.

Después de la incubación a 37°C durante 4 horas, la placa se centrifuga a 500 x g durante 5 minutos, y se pipetea 20 µl de sobrenadante sin células de cada pozo en 200 µl por pozo de solución de mejora (Perkin-Elmer Wallac) en la placa de fondo plano preparada anteriormente (Nunc-Immunoplate Maxisorp). Después de la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se determina la fluorescencia (fluorómetro Victor², Perkin-Elmer Wallac). La citotoxicidad específica se obtiene de la ecuación (lisis experimental - lisis espontánea)/(lisis máxima - lisis espontánea) x100%.

En una realización preferida, una prueba de respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 comprende

a.) cargar una cantidad adecuada de células dendríticas inmaduras que comprenden al menos una célula dendrítica, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, con una cantidad adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1, un lisado o una fracción del mismo, o la formulación como se describe en otra parte del presente documento

b.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada para la maduración

c.) poner en contacto una cantidad adecuada de dichas células dendríticas cargadas con una cantidad adecuada de células inmunes que comprenden al menos una célula inmune, una célula T, una célula T CD4+, una célula T CD8+,

una mezcla de células que comprende al menos una célula T, o células mononucleares de sangre periférica, que pueden ser activadas o inhibidas por una célula dendrítica.

d.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada para la activación o inhibición

5 e.) agregar una cantidad adecuada de células dendríticas para la reestimulación que comprende al menos una célula dendrítica, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden al menos una célula dendrítica, cargada con una cantidad adecuada de al menos un antígeno portador Nuclear-1 o antígenos de control adecuados

f.) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada para la reestimulación

10 g.) medir la cantidad de GM-CSF, IFNgamma y/o TNFalfa secretados por ELISA o ELISPOT, por lo que una respuesta inmune celular positiva contra el Nuclear-1 muestra una secreción de GM-CSF, IFNgamma y/o TNFalfa significativamente mayor de dicha las células inmunitarias reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con un antígeno portador Nuclear-1 que el GM-CSF, IFNgamma y/o la secreción de TNF alfa de las células inmunitarias correspondientes reestimuladas con las células dendríticas descargadas correspondientes y/o un GM-CSF significativamente mayor, IFNgamma y/o la secreción de TNFalfa de dichas células inmunitarias reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con un antígeno portador Nuclear-1 que el GM-CSF, IFNgamma y/o la
15 secreción de TNFalfa de las células inmunitarias correspondientes reestimuladas con las células dendríticas correspondientes cargadas con un antígeno que no lleva Nuclear-1 y/o una secreción significativamente mayor de GM-CSF, IFNgamma y/o TNFalfa de dichas células inmunes reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con asialoglicoforina que la GM-CSF, IFNgamma y/o secreción de TNFalfa de las células inmunitarias correspondientes reestimuladas con células dendríticas correspondientes cargadas con glucoforina o
20 asialoglicoforina tratada con peryodato y/o un GM-CSF, IFNgamma y/o TNF alfa significativamente mayor de dichas células inmunitarias reestimuladas con dichas células dendríticas cargadas con un lisado o fracciones de NM-D4 o NM-F9 que la secreción de GM-CSF, IFNgamma y/o TNFalfa de las células inmunitarias correspondientes reestimuladas con las células dendríticas correspondientes cargadas con un lisado de NM-wt o NM-H9.

25 En una realización preferida adicional de la invención, la composición nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo o lisado positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo induce una respuesta inmunitaria celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmunitaria celular de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5.

30 En una realización aun más preferida de la invención, la formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo o lisado positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo induce una respuesta inmune humoral y celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos una prueba de respuesta inmune humoral y al menos una prueba de respuesta inmune celular.

35 En una realización aun más preferida de la invención, la formulación nutracéutica o farmacéutica que comprende al menos un microorganismo o lisado positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo induce una respuesta inmune humoral y celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos prueba de respuesta inmune humoral y dos pruebas de respuesta inmune celular, preferiblemente positiva para las pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3 y prueba de respuesta inmune celular 1 y 3, y más preferiblemente para pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3 y prueba inmune celular 1, 2 y 3, e incluso más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4 y prueba de respuesta inmune celular 1, 2, 3 y 4, e incluso más preferiblemente para la prueba de respuesta
40 inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 6, y todas las 5 pruebas de respuesta inmune celular, e incluso más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 5, y todas las 5 pruebas de respuesta inmune celular, y lo más preferiblemente positivo para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral y las 5 pruebas de respuesta inmune celular.

45 En otra realización preferida, en las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5, las células dendríticas, células dendríticas o una mezcla de células que comprenden células dendríticas comprenden al menos una célula dendrítica que es una célula dendrítica madura cuando se pone en contacto con dichas células inmunitarias.

En otra realización preferida, en las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5, las células dendríticas, células dendríticas o una mezcla de células comprenden células dendríticas funcionales obtenidas de células derivadas de MUTZ-3.

50 En otra realización preferida, en las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5, dichas células inmunes se combinan con dichas células dendríticas al menos en una molécula de clase I de MHC.

En otra realización preferida, en las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5, la molécula portadora del Nuclear-1 es un lisado o fracción de NM-D4 o NM-F9 o asialoglicoforina.

55 En otra realización preferida, la invención se refiere al uso de cualquiera de las pruebas de respuesta inmune como se describió anteriormente para determinar la respuesta inmune contra el Nuclear-1 inducida o mejorada por el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo, o formulaciones que comprenden aquellas de acuerdo con esta invención en al menos un ser humano o animal.

En otra realización preferida, la invención se refiere al uso de cualquiera de las pruebas de respuesta inmune como se describió anteriormente para probar la respuesta inmune natural en un ser humano o animal sin o antes de la administración del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo o formulaciones que los comprenden en al menos un humano o animal que comprende.

5 En otra realización preferida, la invención se refiere al uso de cualquiera de las pruebas de respuesta inmune como se describió anteriormente para determinar y optimizar la cantidad efectiva, la cantidad máxima efectiva, la dosis, el régimen de dosis, la vía de administración, la composición, la formulación, los portadores y otras moléculas se usa junto con el nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción, o formulaciones que comprenden aquellas de acuerdo con la invención.

10 Dicho nutraceutico de la invención puede consistir en al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo sola, tal como, entre otros, un microorganismo vivo o muerto, liofilizado o pasteurizado, o lisados, o componentes, o fracciones de los mismos, o en una forma al menos parcialmente solubilizada en un líquido, o puede consistir en componentes adicionales tales como, entre otros, nutrientes, aditivos nutricionales o aditivos para alimentos o bebidas, soluciones o emulsiones conocidas por los expertos en la materia. Dicho nutraceutico puede aplicarse por vía oral en diferentes formas, como cápsulas, tabletas, emulsiones, polvo, líquidos. El nutraceutico puede administrarse solo o mezclado con alimentos o bebidas. Dicho nutraceutico también puede ser cualquier alimento, bebida, componente de una bebida o alimento, un aditivo alimentario, o un nutraceutico independiente.

En una realización preferida, el nutraceutico se usa como una cápsula o una tableta. En otra realización preferida, el nutraceutico se mezcla en alimentos o bebidas tales como, pero sin limitarse a, aquellos enumerados en otra parte en esa invención.

B) Métodos para probar el potencial del microorganismo positivo al Nuclear-1 para inducir respuestas inmunes, métodos para aislar microorganismos positivos al Nuclear-1, métodos para identificar microorganismos positivos al Nuclear-1 adecuados para nutraceuticos y composiciones farmacéuticas

25 Un método para probar el potencial de un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo para inducir una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 comprende

a.) la administración de una cantidad adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo a al menos un humano o animal

b.) probar la respuesta inmune en al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1-6 contra el Nuclear-1.

30 Un método para probar el potencial de un microorganismo positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo para inducir una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 comprende

a.) administración de una cantidad adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo a al menos un ser humano o animal y

b.) probar la respuesta inmune en al menos una prueba de respuesta inmune celular contra el Nuclear-1.

35 Se describe un método para probar el potencial de cualquiera de los nutraceuticos, las composiciones farmacéuticas, los microorganismos positivos al Nuclear-1 o las fracciones de los mismos, o la formulación que los comprende, para inducir una respuesta inmunitaria y para determinar qué respuesta inmunitaria se induce.

Un método para determinar la dosis, el régimen de dosificación, la vía de administración, la formulación, los vehículos u otros componentes utilizados en o con los nutraceuticos, las composiciones farmacéuticas, los microorganismos positivos al Nuclear-1 o las fracciones de los mismos, o se describe una formulación que comprende aquellos.

40 Un método para probar el potencial de un microorganismo positivo al Nuclear-1 para inducir una respuesta inmune humoral comprende al menos uno de los ensayos de respuesta inmune humoral 1 a 6, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente tres, más preferiblemente 4, más preferiblemente 5, y lo más preferiblemente las 6 pruebas de respuesta inmune humoral, por lo que a un animal o humano se le administraron cantidades adecuadas del microorganismo a analizar por vía oral o sistémica (con o sin adyuvantes adicionales) y los anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos del suero, el plasma o las heces se analizan preferiblemente en comparación con los anticuerpos en suero o anticuerpos obtenidos de la sangre, plasma o heces antes de que se administraran los microorganismos. Los expertos en la técnica pueden determinar cantidades adecuadas del microorganismo y formas de obtener los anticuerpos de la sangre y los controles adecuados. Las pruebas se describen en detalle aquí y/o en el ejemplo 11.

Un método para probar el potencial de un microorganismo positivo al Nuclear-1 para inducir una respuesta inmune celular comprende al menos uno de los ensayos de respuesta inmune celular 1 a 5, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente tres, y lo más preferiblemente todas las 5 pruebas de respuesta inmune celular.

Un método para probar el potencial de un microorganismo positivo al Nuclear-1 para inducir una respuesta inmune celular citotóxica comprende al menos la prueba 2 de respuesta inmune celular, preferiblemente 2 y 1, más preferiblemente 2, 3 y, y lo más preferiblemente las 5 pruebas de respuesta inmune celular.

Las pruebas se realizan como se describió anteriormente in vitro o las pruebas de inmunidad celular 1 a 3 o 5 se realizaron al dar al menos un animal o una cantidad humana adecuada del microorganismo que se probará por vía oral o sistémica (con o sin adyuvantes adicionales) y las células inmunitarias se obtuvieron de la sangre y (i) se probaron de acuerdo con las pruebas celulares 1 a 3 o 5 como se describió anteriormente o (ii) se analizaron de acuerdo con las pruebas celulares 1 a 3 o 5 como se describió anteriormente con la diferencia de que la inmunidad las células no se ponen en contacto con células dendríticas cargadas con un microorganismo Nuclear-1 y solo se agregaron células dendríticas cargadas con la molécula portadora del Nuclear-1 para la reestimulación. El (i) se usa preferiblemente para mejorar el efecto in vivo y para mejorar la lectura con respuestas más débiles y (ii) se usa preferiblemente para respuestas fuertes. Los expertos en la técnica pueden determinar cantidades adecuadas del microorganismo y controles adecuados. Las pruebas se describen en detalle en el ejemplo 12.

Un método para probar el potencial de un microorganismo positivo al Nuclear-1 para inducir una respuesta inmune humoral y celular que corresponde a una combinación de los métodos descritos anteriormente, comprende al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 y al menos una de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 4, preferiblemente al menos dos de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 y al menos una, más preferiblemente al menos dos de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5, más preferiblemente al menos tres de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6, más preferiblemente al menos 4 de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 y todas las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5, más preferiblemente al menos 5 de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 y todas las pruebas de respuesta inmunitaria celular 1 a 5, y más preferiblemente las 6 pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 y las 5 pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5.

También se describen métodos para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 en el sentido de la invención y métodos para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismos positivos y negativos al Nuclear-1.

Un método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismo comprende

- (a) poner en contacto un anticuerpo específico del Nuclear-1 con una mezcla de microorganismos, y
- (b) aislar un microorganismo unido a dicho anticuerpo específico del Nuclear-1.

En una realización preferida del método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismos en la etapa (b), se usan partículas magnéticas para la separación de microorganismos unidos a dicho anticuerpo específico para el Nuclear-1. En una realización preferida del método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismos, dicha mezcla de microorganismos es una mezcla que comprende microorganismos de un humano o paciente sano, un animal, suelo, alimento o plantas.

En una realización preferida del método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismos, dicha mezcla de microorganismos es una mezcla que comprende microorganismos del tracto gastrointestinal humano, heces humanas, sangre humana, tejido humano o cuerpo humano, fluidos de individuos o pacientes sanos.

En una realización preferida, el método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismos se realiza en condiciones anaerobias que permiten el aislamiento del microorganismo anaerobio positivo para Nuclear-1.

Dicha mezcla de microorganismos puede ser cualquier mezcla de al menos dos microorganismos diferentes, tales como, entre otros, los que se producen en la naturaleza, tales como, entre otros, suelos, alimentos, plantas, animales, tracto gastrointestinal humano, sangre humana, tejido humano, fluidos del cuerpo humano de individuos o pacientes sanos, el más preferido es una mezcla de microorganismos de un individuo sano. Los microorganismos se llevan preferiblemente a una solución adecuada antes de poner la mezcla en contacto con un anticuerpo específico del Nuclear-1. El anticuerpo específico del Nuclear-1 se acopla preferiblemente a un portador, tal como perlas magnéticas, que permite la separación del microorganismo unido a dicho portador. Y después de unir la molécula específica Nuclear-1 con la mezcla de microorganismos, los microorganismos unidos al anticuerpo específico Nuclear-1 se separan de los no unidos al anticuerpo. En una realización alternativa, el anticuerpo específico Nuclear-1 no está acoplado a un portador y el microorganismo positivo Nuclear-1 se aísla junto con el anticuerpo específico Nuclear-1 utilizando métodos que aíslan específicamente el anticuerpo, como la proteína A, la proteína G, la proteína anticuerpos L o anti-IgM o anticuerpos anti-IgG que se acoplan a un portador como un material de lecho cromatográfico de perlas magnéticas. En una realización preferida de la invención, los microorganismos positivos al Nuclear-1 unidos al anticuerpo específico para el Nuclear-1 se lavan a fondo con un regulador adecuado (como PBS-a) y se colocan en placas en medios selectivos y no selectivos como, entre otros, MRS, BSM, KF, N, S, WC, BHI, CBA y ST (para más detalles, véase tabla 3). Las colonias resultantes se raspan de las placas y se aplican a rondas adicionales de enriquecimiento por afinidad con anticuerpos específicos para el Nuclear-1. Las colonias se seleccionan, se vuelven a raspar y se analizan para determinar la expresión del Nuclear-1 en ELISA e

inmunofluorescencia (más detalles en los ejemplos 1-9). A partir de esta descripción y de los ejemplos, alguien experto en la técnica puede ajustar u optimizar los métodos para diversas bacterias de diversas fuentes.

En una realización especial preferida, el método se realiza bajo condiciones anaerobias que permiten el aislamiento de microorganismos positivos a anaerobia Nuclear-1, que es, por ejemplo, importante para la mayoría de los microorganismos del intestino humano. El método se describe en detalle en los ejemplos 1 a 9.

Según una realización, los microorganismos se aíslan de los alimentos. En una realización aun más preferida, el microorganismo se aísla de un sistema gastrointestinal, y aun más preferido de heces humanas. El método se describe en detalle en los ejemplos 1 a 9. El uso de bacterias que habitualmente habitan en el tracto gastrointestinal de los humanos da como resultado un agente profiláctico y terapéutico que no causa efectos secundarios no deseados. La naturaleza de los carbohidratos es responsable de la falta de tolerancia relevante y no muestra reacciones alérgicas relevantes.

Un método para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado para uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención comprende

a.) probar un microorganismo para determinar su unión a al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 y

b.) identificar este microorganismo positivo al Nuclear-1 que se une por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 como se describe aquí.

Lo más preferiblemente son aquellos microorganismos positivos al Nuclear-1 que están unidos por los anticuerpos específicos para el Nuclear-1 NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2, y por lo que la unión es sensible al peryodato que muestra una unión reducida de NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 después del tratamiento con ácido peryódico.

En una realización preferida, la prueba de un microorganismo para determinar su unión a al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 se realiza mediante ELISA, por lo que un microorganismo positivo al Nuclear-1 muestra una señal de ELISA con al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 de al menos 3 veces, más preferido 5 veces e incluso más preferido de al menos 10 veces de la señal de fondo.

En otra realización preferida, el microorganismo positivo al Nuclear-1 muestra una señal ELISA positiva con el anticuerpo Nemod-TF1 específico para el Nuclear-1 cuando se reviste a una concentración de microorganismos de $1 \times 10^7/\text{ml}$ más preferido de $5 \times 10^6/\text{ml}$, aun más preferido de $1 \times 10^6/\text{ml}$, el más preferido de $1 \times 10^5/\text{ml}$.

En otra realización preferida, el microorganismo positivo al Nuclear-1 muestra una señal ELISA positiva con el anticuerpo Nemod-TF2 específico para el Nuclear-1 cuando se reviste a una concentración de microorganismo de $1 \times 10^7/\text{ml}$ más preferido de $5 \times 10^6/\text{ml}$, aun más preferido de $1 \times 10^6/\text{ml}$, el más preferido de $1 \times 10^5/\text{ml}$.

En otra realización preferida, el microorganismo positivo al Nuclear-1 muestra una reducción de la señal ELISA con el anticuerpo específico Nuclear-1 después del tratamiento con ácido peryódico, preferiblemente la señal ELISA muestra una reducción de al menos el 30%, más preferido de menos el 50% y el más preferido de al menos el 80%.

En una realización preferida, un método para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado para su uso como componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención comprende

a) probar un microorganismo positivo al Nuclear-1 para su unión a al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 y

b) probar su capacidad para inducir una respuesta inmune en humanos o animales que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva al Nuclear-1 y

c) identificar este microorganismo que se une por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 como se describe aquí y es capaz de inducir una respuesta inmune en humanos o animales que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva al Nuclear-1 siendo positivo para al menos una prueba de respuesta inmune humoral 1-6 o prueba de respuesta inmune celular 1-4 descrita en este documento. Se prefieren aquellos microorganismos positivos al Nuclear-1 que son positivos para NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 y son sensibles al peryodato que muestran una unión reducida de NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 como se describe aquí (ejemplo 9) y que inducen una respuesta inmune en al menos un ser humano o animal que sea positivo para al menos una prueba de respuesta inmune humoral y celular, más preferiblemente aquellos que sean al menos positivos para la prueba de respuesta inmune celular 2. Aun más preferidos son aquellos microorganismos positivo al Nuclear-1s que son positivos para TF 1 y TF 2 son sensibles a la periodización y muestran una unión reducida de NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 como se describe en este documento y que son positivos para las pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4 y para las pruebas de respuesta inmune celular 1, 2, 3 y 4, como se describe en el presente documento. Los más preferidos son aquellos microorganismos positivos al Nuclear-1 que son positivos para NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 y son sensibles al peryodato que muestran una unión reducida de NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 como se describe en este documento y que son positivos para al menos 5 pruebas de respuesta inmune humoral y para las 5 pruebas de respuesta inmunitaria celular como se describe en este documento.

En una realización preferida del método para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado para uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención, el microorganismo identificado se une por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA pero no a ninguna de las sustancias de #list 2# (ver definiciones).

- 5 En una realización preferida del método para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado para uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención, el microorganismo identificado se une por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se unen a asialoglicoforina y no a glicoforina y que se unen a al menos una línea de células tumorales humanas de NM-D4 (DSM ACC2605), NM-F9 (DSM ACC2606), ZR-75-1 (ATCC CRL-1500), CAMA-1 (ATCC HTB-21), KG-1 (DSM ACC 14) o A-204 (DSM ACC 250), y por lo que el enlace es sensible al peryodato. Las líneas celulares NM-9 y NM-D4 han sido depositadas en el DSMZ por Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG, Robert-Rossle-Strasse 10, 13125 Berlín, Alemania (es decir, el depositante) que autoriza al solicitante de la presente solicitud a referirse al material biológico depositado descrito en este documento y dé su consentimiento sin reservas e irrevocable al solicitante de la presente solicitud para que el material biológico depositado que se describe aquí se ponga a disposición del público de acuerdo con la Regla 28 (1) (d) de la Convención de Patente Europea. El DSMZ se encuentra en el Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. Los depósitos DSMZ mencionados anteriormente se realizaron de conformidad con los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patentes.
- 10
- 15
- 20 En una realización preferida del método para identificar un microorganismo positivo Nuclear-1 adecuado para su uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención, el microorganismo identificado se une por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se unen a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se unen a al menos una línea de células tumorales humanas de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1 o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, y que está unida por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 con cualquiera de las características de unión anteriores pero que no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA.
- 25

- 30 En una realización preferida del método para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado para su uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención, el microorganismo identificado se une por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 o NEMOD-TF1.

En una realización preferida del método para identificar un microorganismo positivo Nuclear-1 adecuado para su uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención, el microorganismo identificado se une bajo (b) por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1.

- 35 En una realización preferida del método para identificar un microorganismo positivo Nuclear-1 adecuado para su uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención, el microorganismo identificado se une bajo (b) por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1 pero no por A68-B/A11.

- 40 En una realización preferida del método para identificar un microorganismo positivo Nuclear-1 adecuado para su uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención, la respuesta inmune inducida después de la administración de una formulación de acuerdo con la presente invención en un ser humano o un animal es una respuesta inmune positiva para al menos una prueba de respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 y al menos una prueba de respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 como se describe en otra parte en este documento.

- 45 Los métodos para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado para su uso como un componente para nutracéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para identificar un microorganismo adecuado de cepas existentes como las que se encuentran en DSMZ u otras colecciones de microorganismos o de el microorganismo positivo al Nuclear-1 aislado por un método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismo de acuerdo con la invención.

Un método para aislar e identificar bacterias positivas al Nuclear-1 comprende

- a) aislar bacterias enteras de muestras de heces,
- 50 b) realizar enriquecimientos de afinidad de bacterias positivas al Nuclear-1 utilizando uno o más de los siguientes anticuerpos monoclonales Nuclear-1 Nemod-TF1, Nemod-TF2 y A78-G/A7 en condiciones aeróbicas o anaeróbicas,
- c) sembrar las bacterias enriquecidas en diferentes medios selectivos y seleccionar las bacterias para unirse a los anticuerpos o lectinas específicos del Nuclear-1.

En otra realización preferida, un método para aislar e identificar una bacteria positiva para el Nuclear-1 comprende

- 55 a.) aislar una mezcla de microorganismos que comprenden bacterias enteras de muestras de heces

- b.) poner en contacto un anticuerpo específico del Nuclear-1 con una mezcla de microorganismos
- c.) aislar el microorganismo que se une a Nemod-TF1, Nemod-TF2 o A78-G/A7 en condiciones aeróbicas o anaeróbicas utilizando separación magnética de partículas,
- d.) sembrar las bacterias enriquecidas en al menos un medio selectivo
- 5 e.) identificar el microorganismo que se une por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1
- La generación también significa que se genera un microorganismo positivo Nuclear-1, por ejemplo, por tratamiento químico de un microorganismo que comprende la estructura Nuclear-1 en tratamiento químico cubierto tal como, por ejemplo, el tratamiento con peryodato puede descubrir la estructura Nuclear-1 generando así un microorganismo positivo al Nuclear-1. En otra realización preferida, un método para aislar e identificar una bacteria positiva para el Nuclear-1 comprende
- 10 a.) generación de una cepa bacteriana pura que está unida por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1; y/o
- b.) probar la capacidad de dicha cepa bacteriana pura para inducir o mejorar una respuesta inmunitaria contra el Nuclear-1 en al menos un humano o animal.
- En otra realización preferida, un método para probar el potencial de un microorganismo positivo al Nuclear-1 para inducir una respuesta inmune específica para el Nuclear-1 comprende los siguientes pasos:
- 15 1) identificación de microorganismos positivos al Nuclear-1 y producción en cultivos puros;
- 2) identificación de cepas bacterianas inmune efectivas del intestino;
- 3) generación de una preparación Nuclear-1 positiva efectiva, inmunológicamente y toxicológicamente probada como aditivo nutricional listo para pruebas en humanos;
- 20 4) inducción o mejora de las respuestas inmunitarias específicas del Nuclear-1 en humanos; y si es necesario
- 5) aislamiento, identificación y prueba de una fracción o componente positivo al Nuclear-1 definido como inmune efectivo de dicho microorganismo.
- El método también se describe en detalle en los ejemplos 1-10.
- En una realización preferida, un método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 de una mezcla de microorganismo, comprende
- 25 a.) poner en contacto un anticuerpo específico del Nuclear-1 con una mezcla de microorganismos seleccionados del grupo que comprende microorganismos de un ser humano y/o paciente, un animal, suelo, alimentos y/o plantas, y/o microorganismos del tracto gastrointestinal humano, heces humanas, sangre humana, tejido humano y/o fluidos corporales humanos de individuos y/o pacientes sanos y
- 30 b.) aislar el microorganismo unido a dicho anticuerpo específico del Nuclear-1.
- En otra realización preferida, un método para aislar e identificar una bacteria positiva para el Nuclear-1 comprende
- (a) aislar una mezcla de microorganismos que comprenden bacterias enteras de muestras de heces,
- (b) poner en contacto un anticuerpo específico del Nuclear-1 con una mezcla de microorganismos,
- 35 (c) aislar el microorganismo que se une al anticuerpo específico Nuclear-1 en condiciones aeróbicas o anaeróbicas utilizando separación magnética de partículas,
- (d) identificar el microorganismo que se une por Nemod-TF2 o A78-G/A7, y por Nemod-TF1, por lo que la unión es sensible al peryodato y muestra una unión significativamente reducida después del tratamiento con peryodato y
- (e) probar la capacidad para inducir o mejorar una respuesta inmunitaria contra el Nuclear-1 en al menos un humano o animal.
- 40 En otra realización preferida, un método para identificar un microorganismo positivo Nuclear-1 adecuado para uso como un componente de la formulación comprende
- a. probar un microorganismo para determinar su unión a al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 y
- b. probar la inducción de una respuesta inmune en humanos o animales que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 y
- 45 c. identificar dicho microorganismo que se une por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1

por lo cual dicho microorganismo induce o mejora una respuesta inmune contra el Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal como se caracteriza por ser positivo para al menos una prueba de respuesta inmune humoral o una prueba de respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 como se describe en otra parte en este documento.

Un método para generar microorganismos positivos al Nuclear-1 comprende

- 5 a.) poner en contacto un microorganismo con un agente para la inducción de mutaciones por mutágenos químicos y/o físicos, tales como, entre otros, EMS, UV, metotrexato, microondas, sustancias cancerígenas, carcinógeno, mutágeno o radiación en condiciones que matan a la mayoría de microorganismos y
- b.) cultivar microorganismos supervivientes en condiciones adecuadas
- 10 c.) enriquecer, aislar y/o identificar microorganismos positivos al Nuclear-1 como se describe en otra parte del presente documento
- d.) probar la capacidad de dicho microorganismo para inducir o mejorar una respuesta inmune contra el Nuclear-1 en al menos un humano o animal.

Un método para generar microorganismos positivos al Nuclear-1 mediante ingeniería genética comprende

- 15 a) introducción, desactivación y/o silenciamiento de genes, parte de genes, ADN, ARN, ARN antisentido, oligonucleótidos, oligopéptidos o proteínas en un microorganismo que afecte la biosíntesis del Nuclear-1, la degradación del Nuclear-1 o la biosíntesis o degradación de carbohidratos flanqueantes y
- b) enriquecer, aislar, identificar y/o probar los microorganismos positivos al Nuclear-1 como se describe en otra parte del presente documento.

20 De acuerdo con una realización, dicho microorganismo es un microorganismo negativo a Nuclear-1. En una realización adicional, dicho microorganismo es un microorganismo beneficioso para el tracto intestinal tal como, entre otros, Lactobacillus o Bifidobacterium. En una realización adicional, dicho microorganismo es un microorganismo utilizado para la producción de alimentos convencionales tales como, entre otros, Lactobacillus o Bifidobacterium. En otra realización, dicho microorganismo ya es positivo al Nuclear-1 y el método se utiliza para aumentar la cantidad del Nuclear-1 expresada en la superficie celular.

25 C) Provisión de microorganismo positivo al Nuclear-1.

Además, se describe un microorganismo positivo al Nuclear-1, en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1.

30 Un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado puede usarse como un componente para un nutraceutico o una composición farmacéutica de la invención en la que el microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1. El microorganismo positivo al Nuclear-1 induce una respuesta inmune específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1, las células tumorales positivas al Nuclear-1 o la enfermedad positiva para el Nuclear-1 en humanos o animales.

35 Los microorganismos positivos al Nuclear-1 adecuados se pueden usar como un componente para un nutraceutico o una composición farmacéutica de la invención en donde el microorganismo positivo Nuclear-1 induce una respuesta inmune específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales.

Un microorganismo positivo al Nuclear-1 representa el ingrediente activo de la composición nutraceutica o farmacéutica de la invención que induce la especificidad de la respuesta inmunitaria contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o los animales.

40 Un microorganismo positivo al Nuclear-1 induce o mejora una respuesta inmunitaria específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales cuando se usa en una composición nutraceutica o farmacéutica de la invención.

45 En una realización preferida de la invención, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido y, por lo tanto, se une cuando se pone en contacto con al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 de los siguientes anticuerpos

• HB-T1, HH8, A78-G/A7, Nemod-TF1 o Nemod-TF2, más preferiblemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA pero no a ninguna de las sustancias de #list 2#; - aun más preferido por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las sustancias enumeradas en #list 2# y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y esta unión es perodato sensible;

50 • aun más preferido por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las sustancias enumeradas en #list 2# y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y que se une a al menos

- una línea de células tumorales humanas de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1 o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato (como NEMOD-TF2 o A78-G/A7), aun más preferiblemente por al menos un anticuerpo con cualquiera de las características de unión anteriores pero que no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA, aun más preferiblemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa PAA y menos o no a TFb-PAA y no se unen al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se unen a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une a menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato (tal como NEMOD-TF1);
- aun más preferido por al menos dos de los anticuerpos descritos anteriormente, incluso más preferido por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une a al menos una línea de células tumorales humanas fuera de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1 o A-204 y, por lo que la unión es sensible al peryodato, tal como NEMOD-TF2 o A78-G/A7, y por al menos un anticuerpo con cualquiera de las características de unión anteriores pero que no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA;
 - aun más preferido por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato tal como NEMOD-TF1;
 - aun más preferido por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1;
 - aun más preferido por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1 pero no por A68-B/A11;
 - aun más preferido por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y esto la unión es sensible al peryodato;
 - aun más preferido por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y que se une a al menos una línea de células tumorales humanas de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1 o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, como NEMOD -TF2 o A78-G/A7, incluso más preferiblemente por al menos un anticuerpo con cualquiera de las características de unión anteriores pero que no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA, aun más preferiblemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no se unen al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se unen a asialoglicoforina y no a glicoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato tal como NEMOD-TF1;
 - aun más preferido por al menos dos de los anticuerpos descritos anteriormente, incluso más preferiblemente por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une a al menos una línea de células tumorales humanas de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1 o A-204, y por lo que la unión es sensible al peryodato, tal como NEMOD-TF2 o A78-G/A7, y por al menos un anticuerpo con cualquiera de las características de unión anteriores pero que no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA;
 - aun más preferido por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA y no a ninguna de las sustancias enumeradas en #list 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato (como NEMOD-TF1);
 - aun más preferido por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1;
 - y aun más preferiblemente por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 y NEMOD-TF1 pero no por A68-B/A11.
- En una realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por al menos dos anticuerpos específicos del Nuclear-1.
- En una realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por al menos un anticuerpo que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las sustancias enumeradas en #list 2# y que se une a asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une a al menos una línea de células tumorales humanas de NM-D4, NM-F9, ZR-75-1, CAMA-1, KG-1 o A-204, y por lo tanto la unión es sensible al peryodato, y que se une por al menos un anticuerpo con cualquiera de las características de unión anteriores pero que no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA.
- En una realización más preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por NEMOD-TF2 o A78-G/A7 o NEMOD-TF1.

- En una realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por el anticuerpo específico para el Nuclear-1 Nemod-TF1, por lo que la unión se prueba en ELISA y la señal de ELISA con el anticuerpo específico para el Nuclear-1 Nemod-TF1 es al menos 3 veces la del fondo cuando se reviste a una concentración de microorganismo de 1×10^7 /ml más preferida de 5×10^6 /ml, aun más preferida de 1×10^6 /ml, más preferida de 1×10^5 /ml. En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por el anticuerpo Nemod-TF2 específico del Nuclear-1, por lo que la unión se prueba en ELISA y la señal de ELISA con el anticuerpo Nemod-TF2 específico del Nuclear-1 es al menos 3 veces mayor que el fondo cuando se reviste a una concentración de microorganismo de 1×10^7 /ml más preferido de 5×10^6 /ml, aun más preferido de 1×10^6 /ml, más preferido de 1×10^5 /ml.
- En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por el anticuerpo Nemod-TF2 específico del Nuclear-1, por lo que la unión se prueba en ELISA y la señal ELISA con el anticuerpo Nemod-TF2 específico del Nuclear-1 es al menos 3 veces mayor que la del fondo cuando se reviste a una concentración de microorganismo de 1×10^7 /ml, más preferida de 5×10^6 /ml, aun más preferida de 1×10^6 /ml, más preferida de 1×10^5 /ml y por lo que la unión es sensible a la peryodación que muestra una señal de ELISA reducida después del tratamiento con ácido peryódico, preferiblemente la señal de ELISA muestra una reducción de al menos 30%, más preferida de al menos 50% y más preferida de al menos 80%.
- En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por el anticuerpo Nemod-TF1 específico del Nuclear-1, por lo que la unión se prueba en ELISA y la señal de ELISA con el anticuerpo Nemod-TF1 específico del Nuclear-1 es al menos 3 veces mayor que la del fondo cuando se reviste a una concentración de microorganismo de 1×10^7 /ml, más preferida de 5×10^6 /ml, aun más preferida de 1×10^6 /ml, más preferida de 1×10^5 /ml y por lo que la unión es sensible a la peryodación que muestra una señal de ELISA reducida después del tratamiento con ácido peryódico, preferiblemente la señal de ELISA muestra una reducción de al menos 30%, más preferida de al menos 50% y más preferida de al menos 80%.
- En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por los anticuerpos específicos del Nuclear-1 Nemod-TF1 y Nemod-TF2, por lo que la unión se prueba en ELISA y la señal de ELISA es al menos 3 veces mayor que la del fondo cuando recubierto a una concentración de microorganismos de 1×10^7 /ml más preferido de 5×10^6 /ml, aun más preferido de 1×10^6 /ml, más preferido de 1×10^5 /ml y por lo que la unión es sensible a la peryodación que muestra una señal de ELISA reducida después del tratamiento con ácido peryódico, preferiblemente la señal ELISA muestra una reducción de al menos el 30%, más preferida de al menos el 50% y más preferida de al menos el 80%.
- En una realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 induce o potencia una respuesta inmune humoral y/o celular específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales.
- En una realización preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 o una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1.
- En una realización preferida adicional, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 y una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1.
- Dicho anticuerpo específico del Nuclear-1, anticuerpos específicos del Nuclear-1 preferidos, combinaciones de anticuerpos específicos del Nuclear-1 o combinaciones preferidas de anticuerpos específicos del Nuclear-1 se describen en detalle en las Definiciones y en otras partes del presente documento.
- Dichos nutraceuticos o composiciones farmacéuticas y sus realizaciones preferidas se describen en detalle en otra parte de este documento.
- Dicha respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 y dicha respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 se describen en detalle en otra parte de la presente invención, así como las pruebas de respuesta inmune humoral y celular que pueden detectar el anticuerpo correspondiente o la respuesta de células T contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1.
- En una realización preferida, el microorganismo positivo al Nuclear-1 induce o mejora una respuesta inmune humoral y celular específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales que pueden detectarse por al menos una prueba de respuesta inmune humoral y al menos una prueba de respuesta inmune celular.
- En una realización preferida, el microorganismo positivo al Nuclear-1 se une por NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2, por lo que la unión es sensible al peryodato y que induce o mejora una respuesta inmune en al menos un humano o animal que es positivo en al menos dos de las pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3 y en al menos una de las pruebas de respuesta inmune celular 1, 2 y 3.

- En una realización preferida adicional, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmune humoral fuera de la prueba de respuesta inmune humoral 1 a 6, preferiblemente positiva para pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4, y 6, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 5, y lo más preferiblemente positivo para las 5 pruebas de respuesta inmune humoral.
- En una realización preferida adicional, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmune celular fuera de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5.
- En una realización aun más preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral y celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos una prueba de respuesta inmune humoral y al menos una prueba de respuesta inmune celular.
- En una realización aun más preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral y celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmune humoral y dos pruebas de respuesta inmune celular, preferiblemente positiva para pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3 y prueba de respuesta inmune celular 1 y 3, y más preferiblemente para pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3 y prueba inmune celular 1, 2 y 3, y aun más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4 y prueba de inmunidad celular 1, 2, 3 y 4, y más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 6 y todas las 5 pruebas de inmunidad celular, y aun más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 5, y las 5 pruebas de respuesta inmune celular, y lo más preferiblemente positivo para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral y las 5 pruebas de respuesta inmune celular.
- En una realización preferida adicional, se puede usar un microorganismo positivo al Nuclear-1 para construir una respuesta inmunitaria específica para el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1 al tener el potencial de destruir esas células como se muestra aquí para Ejemplo por la inducción de los anticuerpos específicos del Nuclear-1, por la citotoxicidad dependiente del complemento específico del Nuclear-1 de los anticuerpos del Nuclear-1 contra las células tumorales positivas al Nuclear-1, que destruyen a aquellos de manera efectiva y/o por la secreción de TNFalfa y/o INFgamma por Nuclear-1 respuestas de células T específicas que son marcadores sustitutos reconocidos científicamente por los expertos en la técnica para una destrucción de células tumorales mediada por células T citotóxicas específicas para aquellas células tumorales que llevan el Nuclear-1, cuando se utilizan como nutraceuticos o una composición farmacéutica de la invención.
- En una realización preferida adicional, se puede usar un microorganismo positivo al Nuclear-1 para construir dicha respuesta inmune específica para el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1 que tiene el potencial de destruir esas células como se describe en otra parte en este documento administrando oralmente el nutraceutico en (al menos uno) individuos sanos.
- En una realización preferida adicional, se puede usar un microorganismo positivo al Nuclear-1 para reducir o incluso preferir aun más para prevenir la aparición de una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 administrándolo oralmente como un componente del nutraceutico de la invención para (al menos uno) individuos sanos.
- En una realización preferida adicional, se puede usar un microorganismo positivo al Nuclear-1 para reducir o incluso más preferido para prevenir la aparición de una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 cuando se administra como un componente de una formulación farmacéutica de la invención en (al menos uno) individual.
- En otra realización preferida, se usa un microorganismo positivo al Nuclear-1 como ingrediente activo de un nutraceutico para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 mediante la administración oral del nutraceutico en pacientes que padecen esta enfermedad.
- En una realización preferida, se usa un microorganismo positivo al Nuclear-1 como ingrediente activo de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 en pacientes que padecen esta enfermedad administrando la composición farmacéutica como se describe en otra parte en este documento.
- En una realización más preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 es un componente adecuado de una formulación nutraceutica que muestra preferentemente la inducción de una respuesta inmune en humanos que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 por ser positivo después de la administración oral del microorganismo positivo al Nuclear-1 para al menos una prueba inmune humoral o celular descrita en el presente documento y las realizaciones preferidas como se describió anteriormente.
- En la realización más preferida, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 es positivo para la unión a los anticuerpos específicos para el Nuclear-1 NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2, por lo que la unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato y muestra una unión reducida de NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 después del tratamiento con ácido peryódico como se describe en este documento y que induce una respuesta inmune en al menos un ser humano o animal que es positivo para las pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3 y para las pruebas de

respuesta inmune celular 1, 2, y 3, y aun más preferido para al menos 5 pruebas de respuesta inmune humoral y para las 5 pruebas de respuesta inmune celular, y aun más preferido para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral y para las 5 pruebas de respuesta inmune celular como se describe aquí.

En una realización preferida, la invención usa el

5 (i) microorganismo positivo al Nuclear-1 de la invención, o

(ii) el nutraceutico o la formulación farmacéutica o aditivo alimentario que comprende un microorganismo positivo al Nuclear-1

que se selecciona del grupo que consiste en enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Rhuminococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Johnsonella*, *Atopobium*,
10 *Staphylococcus*, *Eubacterium*, *Fingoldia*, *Clostridium*, *Eggerthella*, *Butyribacterium*, *Citrobacter*, *Helicobacter*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides acidophilus*, *Bacteroides caccae*, AG6 (DSM 18726) y/o MU1 (DSM 18728) en donde dicho microorganismo seleccionado de dicho grupo es positivo al Nuclear-1 y es reconocido específicamente por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1.

15 Dado que estos microorganismos no son per se positivos al Nuclear-1, es importante seleccionar un microorganismo/cepa que sea capaz de desencadenar una respuesta inmune específica del Nuclear-1. Por lo tanto, es importante que dicho microorganismo sea reconocido específicamente por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 y, por lo tanto, esté unido por dicho anticuerpo si se pone en contacto con él. La capacidad de desencadenar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 también puede determinarse por los sistemas de
20 prueba humoral y celulares descritos en este documento. Que esta selección de especificidad es importante también se hace evidente cuando se comparan los microorganismos de acuerdo con la presente invención con la técnica anterior.

Por ejemplo, G. F. Springer et al. describe la inducción de antígeno T después de la alimentación de *E. coli* a partir de una cepa del serotipo 086. En estos experimentos, para la evaluación de anticuerpos anti-T se utilizó una prueba
25 de aglutinación con eritrocitos tratados con sialidasa. El tratamiento con sialidasa de los eritrocitos da como resultado la separación de los epítomos del Nuclear-1, pero también hay muchos otros epítomos. Por lo tanto, este ensayo no es específico del Nuclear-1. No se usaron anticuerpos anti-Nuclear-1 específicos. Con el fin de averiguar si estas cepas son positivas al Nuclear-1 de acuerdo con la invención, incluimos varias cepas de *E. coli* en nuestro procedimiento de selección, entre ellas 7 cepas establecidas de *E. coli* de colecciones de cultivos y especialmente la
30 cepa DSMZ 8697 de *E. coli* (cepa 32), que es del serotipo 086 y, por lo tanto, está fuertemente relacionado con la cepa de *E. coli* utilizada por Springer; la cepa original era imposible de obtener. Además, se probaron 12 cepas de *E. coli* obtenidas de muestras fecales de 3 sujetos humanos sanos después del enriquecimiento por afinidad con anticuerpos específicos de TF. Sin embargo, ninguna de estas cepas mostró la reducción deseada de la unión de los anticuerpos específicos de TF Nemod-TF-1 y Nemod-TF2 después del tratamiento con peryodato. Para la cepa de
35 *E. coli* de serotipo 086 (cepa 32), la unión con Nemod-TF1, Nemod-TF2 y B/A11 se mostró solo después del tratamiento con peryodato (destruyendo las estructuras de azúcar). Esto indica una expresión críptica del Nuclear-1, lo que significa que el epítipo Nuclear-1 no es accesible y, por lo tanto, no está disponible para desencadenar una respuesta inmune específica del Nuclear-1. Para confirmar eso, la cepa de *E. coli* del serotipo 086 (=32) también se probó en las pruebas de respuesta inmune humoral después de la inmunización de ratones. Sorprendentemente,
40 aunque encontramos anticuerpos anti-AGP en el suero de estos ratones en HIRT 1 (que es menos específico), no hubo resultados positivos en las pruebas específicas HIRT 2 y HIRT 3. Estos resultados demuestran que no hay Nuclear-1 respuesta inmune específica inducida por dicha cepa de *E. coli* que reconoce el Nuclear-1 en PAA o células tumorales humanas (para más detalles, véase ejemplos). Por lo tanto, la cepa de *E. coli* del serotipo 086 que supuestamente fue TF positivo es de hecho inadecuada para resolver el problema, ya que, a diferencia de los
45 microorganismos positivo al Nuclear-1s de la presente invención, no es capaz de desencadenar un Nuclear-1 específico respuesta inmune. Por lo tanto, es importante seleccionar una cepa de *E. coli* que sea positiva para el Nuclear-1 y sea reconocida específicamente por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 y, por lo tanto, unida a dicho anticuerpo si se pone en contacto con él. Como se describió anteriormente, los microorganismos respectivos que comprenden Nuclear-1 en una forma oculta se pueden convertir en microorganismos positivos a
50 Nuclear-1 mediante tratamiento químico, como el tratamiento con peryodato. Los métodos de prueba adecuados para determinar que el microorganismo es después de dicho tratamiento descrito anteriormente un microorganismo positivo al Nuclear-1.

Un resultado similar también se encontró con *Helicobacter*. Klaamas et al. (Immunological Investigations vol. 31, Nos. 3 y 4, páginas 191-204, 2002) describen la cepa NCTC 11637 de *Helicobacter pylori* como positiva para la unión con
55 anticuerpos específicos para el antígeno T. Se usó la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 en paralelo en nuestros experimentos ELISA con aproximadamente $5-10 \times 10^6$ bacterias por pozo, lo que resulta en una fuerte unión de los anticuerpos Nemod-TF1 y Nemod-TF2 para las cepas positivas al Nuclear-1 AG6 y MU1. Sin embargo, no pudimos detectar la unión de los anticuerpos Nemod-TF1 y Nemod-TF2 a la cepa NCTC 11637 de *Helicobacter pylori*. Solo después del tratamiento con ácido peryódico, la cepa NCTC 11637 de *Helicobacter pylori* se unió al
60 anticuerpo Nemod-TF1, pero no al anticuerpo Nemod-TF2. Esto también indica una expresión críptica del Nuclear-1

- en *Helicobacter pylori* que solo se detecta después del tratamiento con peryodato. En los experimentos de Klaamas et al. Nuclear-1: los resultados pueden deberse a una menor especificidad de los anticuerpos usados o al uso de una cantidad muy alta de bacterias (10^8 /tubo) que pueden contener en cierta medida productos de degradación que contienen Nuclear-1. Además, el uso de *Helicobacter* en un producto nutracéutico o farmacéutico es difícil. La colonización por *Helicobacter pylori* del estómago humano induce infecciones crónicas y desempeña un papel importante en la patogenia de la enfermedad de úlcera gastroduodenal y se asocia con el desarrollo de linfomas de células B de la mucosa gástrica. Por lo tanto, la aplicación de *H. pylori* en la profilaxis o tratamiento de humanos es difícil. Por lo tanto, *H. pylori* preferiblemente no se usa de acuerdo con la presente invención.
- Más preferiblemente, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 se selecciona del grupo que comprende *Escherichia coli*, *Bacteroides*, como *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides acidophilus* y *Bacteroides caccae* e incluso se prefiere más del grupo que comprende la nueva cepa *Bacteroides* AG6 (DSM 18726), la nueva cepa *Bacteroides* MU1 (DSM 18728) depositada en la "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" en Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) al 20 de octubre de 2006.
- En otra realización preferida de la formulación de la invención, el microorganismo positivo al Nuclear-1 se selecciona del grupo que comprende *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Rhuminococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Johnsonella*, *Atopobium*, *Staphylococcus*, *Eubacterium*, *Finegoldia*, *Clostridium*, *Eggerthella*, *Butyribacterium*, *Citrobacter*, *Helicobacter*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides acidophilus*, *Bacteroides caccae*, AG6 (DSM 18726),
- En una realización preferida, la cepa bacteriana se selecciona del grupo que comprende AG6 (DSM 18726), MU1 (DSM 18728).
- En otra realización preferida de la invención, el microorganismo positivo al Nuclear-1 (componente activo) del nutracéutico o la formulación farmacéutica es una combinación de microorganismos positivos al Nuclear-1 de diferentes cepas.
- En una realización preferida adicional, dicho componente activo es una combinación de microorganismos positivos al Nuclear-1 de diferentes cepas seleccionadas de las cepas AG6 y MU1.
- En una realización preferida adicional, la composición nutracéutica o farmacéutica (formulación) de la invención comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 combinado con al menos otro microorganismo beneficioso, tal como, entre otros, un *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*, aun más preferido es una combinación de microorganismos positivos al Nuclear-1 de diferentes cepas combinados con otros microorganismos beneficiosos.
- En una realización preferida de la invención, el microorganismo Nuclear-1 es un microorganismo no patógeno. En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo Nuclear-1 se aísla de un donante sano. En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo Nuclear-1 puede aislarse de un donante sano.
- En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o una fracción del mismo se usa para la fabricación de un medicamento y/o nutracéutico para terapia o profilaxis de un tumor, mediante técnicas conocidas por los expertos en el arte.
- En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o una fracción del mismo se usa in vivo o in vitro para inducir o potenciar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 y/o para generar células dendríticas funcionales o células T activadas, líneas de células T o clones de células T o anticuerpos contra el Nuclear-1.
- En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo Nuclear-1 se usa en la composición nutracéutica o farmacéutica como un organismo vivo.
- En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo Nuclear-1 se usa como un organismo vivo y se administra por vía oral.
- En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo Nuclear-1 usado en la composición nutracéutica o farmacéutica es sensible a al menos un antibiótico.
- En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo Nuclear-1 usado en el nutracéutico puede colonizar el intestino.
- En otra realización preferida de la invención, el microorganismo Nuclear-1 usado en la composición nutracéutica o farmacéutica está muerto.
- En una realización aun más preferida de la invención, el microorganismo Nuclear-1 usado en la composición nutracéutica o farmacéutica se pasteuriza.

En una realización aun más preferida de la invención, el microorganismo Nuclear-1 se usa en la composición nutracéutica o farmacéutica como un organismo vivo y se aisló de un donante humano sano y puede colonizar el intestino humano y es sensible a los antibióticos.

5 En una realización aun más preferida de la invención, el microorganismo Nuclear-1 se usa en el nutracéutico en forma pasteurizada y se aisló del intestino de un donante humano sano y que es sensible a los antibióticos.

En otra realización preferida de la invención, el microorganismo Nuclear-1 usado en la composición farmacéutica está muerto o lisado.

En una realización preferida adicional de la invención, el microorganismo Nuclear-1 usado en la composición nutracéutica o farmacéutica está liofilizado.

10 Las cepas seleccionadas positivas al Nuclear-1, así como las cepas que no fueron positivas al Nuclear-1, se caracterizaron por su sensibilidad frente a diferentes antibióticos (ver tabla 1 - Figura 22) y por su unión a los anticuerpos específicos del Nuclear-1 (ver tabla 2).

Tabla 2

Código/Cepa	Especies	Enlace a NEMOD-TF1	Sensibilidad al peryodato de la unión a NEMOD-TF1	Enlace a NEMOD-TF2	Sensibilidad al peryodato de la unión a NEMOD-TF2	Enlace a A68-B/A11	Sensibilidad al peryodato de la unión a A68-B/A11
AG6	Bacteroides ovatus	positivo	Señal de reducción	positivo	Señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción
MU1	Bacteroides ovatus	positivo	Señal de reducción	positivo	Señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción
LH2 (DSM 18727),	E.coli	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción	positivo	Señal de reducción
32	E.coli	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción
52	Bacteroides thetaiotaomicron	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción
53	Bacteroides ovatus	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción	positivo	Señal de reducción
AG3	E.coli	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción	negativo	Sin señal de reducción

15 D) Provisión de fracciones del microorganismo positivo Nuclear-1.

Se describe una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1, en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1.

20 Se puede usar una fracción adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1 como un componente para un nutracéutico o una composición farmacéutica de la invención en la que el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1.

Una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 puede inducir una respuesta inmune específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales.

Se puede usar una fracción adecuada del microorganismo positivo al Nuclear-1 como un componente para un nutracéutico o una composición farmacéutica de la invención en la que la fracción del microorganismo positivo al

Nuclear-1 induce una respuesta inmune específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales.

5 Una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 puede representar el ingrediente activo de la composición nutracéutica o farmacéutica de la invención y que induce la especificidad de la respuesta inmune contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales.

Una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 puede inducir o mejorar una respuesta inmune específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 en humanos o animales cuando se usa en una composición nutracéutica o farmacéutica de la invención.

10 Dicho anticuerpo específico del Nuclear-1, anticuerpos específicos del Nuclear-1 preferidos, combinaciones de anticuerpos específicos del Nuclear-1 o combinaciones preferidas de anticuerpos específicos del Nuclear-1 se describen en detalle en las Definiciones y en otras partes del presente documento.

Dichos nutracéuticos o composiciones farmacéuticas y realizaciones preferidas de los mismos se describen con detalle en otra parte en este documento.

15 Dicha fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1 significa preparaciones o purificaciones de partes más pequeñas de dichos microorganismos, como la preparación de la pared celular, la preparación de la envoltura, los lisados, la preparación de lipopolisacáridos, la preparación de cápsulas o la preparación de cápsulas de polisacárido, que se describen en los ejemplos (Ejemplo 10) o alguien experto en la técnica puede optimizar y seleccionar un método adecuado o una combinación de métodos adecuados. Preferiblemente, comprenden al menos un componente positivo Nuclear-1 de dicho microorganismo positivo Nuclear-1. Se pueden obtener mediante
20 preparaciones o purificaciones de al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1. Dichas preparaciones y purificaciones pueden obtenerse por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos anteriormente, o por fraccionamiento de células individuales o secuenciales, extracciones con fenol en agua, extracciones con éter, digestiones con lisozima o métodos cromatográficos. El componente positivo al Nuclear-1 o la fracción que contiene el componente positivo al Nuclear-1 se detecta mediante la unión de la fracción a al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 en los sistemas de prueba, tales como, entre otros, el ELISA o las transferencias
25 de puntos que son conocidos por aquellos expertos en la materia. En una realización preferida de la invención, la fracción que comprende un componente positivo al Nuclear-1 se obtiene por cromatografía de afinidad utilizando al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1.

30 En una realización preferida, se usa una única etapa de preparación o purificación. En otra realización preferida, se usa una combinación de al menos etapas de preparación y purificación.

En una realización preferida adicional, el componente positivo al Nuclear-1 está enriquecido en dicha fracción cuando se compara con el microorganismo completo, como puede determinarse mediante una unión aumentada de al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 a la fracción en comparación con el microorganismo, por ejemplo, por ELISA, y preferiblemente cuando el peso del material biológico contenido en el mismo volumen es igual.

35 Dicho componente positivo al Nuclear-1 significa cualquier componente de un microorganismo positivo al Nuclear-1 que se une por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1. Dicho componente positivo al Nuclear-1 comprende al menos una estructura de carbohidratos del Nuclear-1 o una estructura de imitación del Nuclear-1 que puede estar disponible en forma de su molécula natural de la que forma parte en el microorganismo, como un péptido, oligopéptido, polipéptido, lípido, ceramida, hidratos de carbono, lipoproteínas, polisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, proteoglicanos, lipopolisacáridos o glicoproteínas, o como parte de dicha molécula natural, o solo.
40 Dicho componente positivo al Nuclear-1 también se puede obtener a partir de componentes que portan el Nuclear-1 disfrazado de, por ejemplo, por un tratamiento químico tal como un tratamiento con peryodato que libera Nuclear-1. El componente positivo al Nuclear-1 puede usarse en el sentido de la invención como una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 como tal o acoplado a otras estructuras portadoras no naturales tales como
45 proteínas, lípidos, moléculas químicas tales como poliacrilamida. Preferiblemente se utiliza en su forma natural. El componente positivo al Nuclear-1 puede comprender una única estructura de carbohidratos del Nuclear-1 o una estructura de imitación del Nuclear-1 o unidades de repetición de dichas estructuras y puede contener estructuras o unidades de carbohidratos adicionales u otras estructuras de biomoléculas. Dicha estructura de imitación del Nuclear-1 es una estructura que está unida por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 y/o induce una
50 respuesta inmune contra el Nuclear-1, preferentemente una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 o una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1, y más preferiblemente una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 y una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1.

55 En una realización preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 o una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1.

En una realización adicional preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 y una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1.

Dicha respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 y dicha respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 se describen en detalle en otra parte de la presente invención, así como las pruebas de respuesta inmune humoral y celular que pueden detectar el anticuerpo correspondiente o la respuesta de células T contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1.

- 5 En una realización preferida adicional, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmune humoral fuera de la prueba de respuesta inmune humoral 1 a 6, preferiblemente positiva para pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4, y más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 6, y más
10 preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 5, y lo más preferiblemente positivo para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral.

En una realización preferida adicional, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmune celular fuera de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5.

- 15 En una realización aun más preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral y celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos una prueba de respuesta inmune humoral y al menos una prueba de respuesta inmune celular.

- En una realización aun más preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune humoral y celular contra el Nuclear-1 que es positiva para al menos dos pruebas de respuesta inmune humoral y dos pruebas de respuesta
20 inmune celular, preferiblemente positiva para pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3 y prueba de respuesta inmune celular 1 y 3, y más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3 y prueba inmune celular 1, 2 y 3, y aun más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4 y prueba de inmunidad celular 1, 2, 3 y 4, e incluso más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 6 y todas las 5 pruebas de inmunidad celular, y aun más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1,
25 2, 3, 4 y 5 y las 5 pruebas inmunes celulares, y lo más preferiblemente positivo para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral y las 5 pruebas de respuesta inmune celular.

- En una realización preferida adicional, se puede usar una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 para construir una respuesta inmunitaria específica para el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células
30 cancerosas positivas al Nuclear-1 al tener el potencial de destruir esas células como mostrados en este documento, por ejemplo, por la inducción de los anticuerpos específicos del Nuclear-1, por la citotoxicidad dependiente del complemento específico del Nuclear-1 de los anticuerpos del Nuclear-1 contra las células tumorales positivas al Nuclear-1, matándolos de manera efectiva y/o por secreción de TNFalfa y/o INFgamma por respuestas de células T específicas del Nuclear-1 que son marcadores sustitutos reconocidos científicamente por los expertos en la técnica para una muerte de células tumorales mediada por células T citotóxicas específicas para aquellas células tumorales
35 que llevan el Nuclear-1, cuando se utilizan como nutraceuticos o una composición farmacéutica de la invención.

En una realización preferida adicional, se puede usar una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 para construir dicha respuesta inmune específica para el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1 que tiene el potencial de destruir esas células como se describe anteriormente por administración oral del nutraceutico en (al menos uno) individuos sanos.

- 40 En una realización preferida adicional, se puede usar una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 para reducir o incluso se prefiere aun más para prevenir la aparición de una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 administrándolo oralmente como un componente del nutraceutico de la invención a (al menos una) personas sanas.

- En una realización preferida adicional, se puede usar una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 para reducir o incluso más preferible para prevenir la aparición de una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 cuando
45 se administra como un componente de una formulación farmacéutica de la invención a (al menos uno) individuo.

En otra realización preferida, una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 se usa como ingrediente activo de un nutraceutico para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 mediante la administración oral del nutraceutico en pacientes que padecen esta enfermedad.

- 50 En una realización preferida, una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 se usa como ingrediente activo de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 en pacientes que padecen esta enfermedad administrando la composición farmacéutica como se describe aquí en otro lugar.

- En una realización más preferida, una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 es un componente adecuado de una formulación nutraceutica que muestra preferentemente la inducción de una respuesta inmunitaria en humanos que reconocen el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva al Nuclear-1 siendo positiva
55 después de la administración oral de la fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 para al menos una prueba inmune humoral o celular descrita en el presente documento y realizaciones preferidas como se describió anteriormente.

En la realización más preferida, dicha fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 es positiva para la unión a los anticuerpos específicos para el Nuclear-1 NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2, por lo que la unión de dichos anticuerpos es sensible al peryodato y muestra una unión reducida de NEMOD TF1 y NEMOD-TF2 después del tratamiento con ácido peryódico como se describe en este documento y que induce una respuesta inmune que es positiva para las pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3 y para las pruebas de respuesta inmune celular 1, 2 y 3, y aun más preferido para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral y para las 5 pruebas de respuesta inmune celular como se describe aquí.

En otra realización preferida, el componente positivo al Nuclear-1 no es parte del lipopolisacárido bacteriano.

En una realización preferida, la invención usa la

- fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 de la invención, o
- el nutraceutico o la formulación farmacéutica o aditivo alimentario que comprende al menos una fracción de al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1,

por lo cual el microorganismo positivo Nuclear-1 se selecciona del grupo que consiste en enterobacteriaceae, Escherichia coli, Streptococcus, Bacteroides, Rhuminococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Johnsonella, Atopobium, Staphylococcus, Eubacterium, Finegoldia, Clostridium, Eggerthella, Butyribacterium, Citrobacter, Helicobacter, Propionibacterium y Corynebacterium, Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides acidophilus, Bacteroides caccae, AG6 (DSM 18726) y/o MU1 (DSM 18728) en donde dicho microorganismo es seleccionado de dicho grupo al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1. Dado que Helicobacter es un patógeno, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 preferiblemente no es Helicobacter, ya que Helicobacter no puede ser usado con vida debido a su naturaleza patógena.

Más preferiblemente, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 se selecciona del grupo que comprende Escherichia coli, Bacteroides como Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides acidophilus y Bacteroides caccae e incluso más preferido seleccionado del grupo que comprende la nueva cepa AG6(DSM 18726), MU1(DSM 18728) depositada en la "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" in Braunschweig (Alemania), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (Alemania) al 20 de octubre de 2006.

En una realización preferida adicional, la fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 (componente activo) del nutraceutico o la formulación farmacéutica comprende una combinación de fracciones de un microorganismo positivo al Nuclear-1 o preferentemente de diferentes microorganismos positivos al Nuclear-1 de diferentes cepas. Las fracciones pueden ser del mismo o diferente tipo de preparación o purificación, preferiblemente es una combinación de componentes positivos al Nuclear-1 que tienen diferentes estructuras de soporte o mimetismo molecular, tales como, entre otros, un péptido, oligopéptido, polipéptido, lípido, ceramida, carbohidratos, lipoproteínas, polisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, proteoglicanos o glicoproteínas, o como parte de otra molécula natural o sintética.

En una realización preferida adicional, dicha fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 (componente activo) comprende una combinación de componentes positivos al Nuclear-1 de microorganismos positivos al Nuclear-1 de al menos dos cepas diferentes, preferiblemente las nuevas cepas AG6(DSM 18726) y MU1(DSM 18728).

En una realización preferida adicional, dicha fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 (componente activo) comprende los componentes positivos al Nuclear-1 de los microorganismos positivos al Nuclear-1 de la cepa AG6.

En otra realización preferida, dicha fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 comprende estructuras de carbohidratos seleccionadas del grupo que comprende #1, #2, #3, #4 y/o #5 de la figura 19.

En otra realización preferida, dicha fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 comprende unidades repetidas de las estructuras de carbohidratos seleccionadas del grupo que comprende #1, #2, #3, #4 y/o #5 de la figura 19.

En otra realización preferida, dicha fracción comprende al menos una de las estructuras de carbohidratos seleccionadas del grupo que comprende #1, #2, #3, #4 y/o #5 de la figura 19 y/o sus unidades repetidas.

En otra realización preferida, dicha estructura de carbohidrato o dichas unidades repetitivas de la misma se obtienen por enriquecimiento y/o purificación y/o aislamiento de un microorganismo positivo al Nuclear-1.

En una realización preferida adicional, dicha estructura de carbohidrato o dichas unidades repetitivas de la misma se obtienen mediante enriquecimiento y/o purificación y/o aislamiento de la cepa AG6.

Los detalles se muestran en el ejemplo 10.

En una realización preferida adicional, dicha estructura de carbohidrato o dichas unidades repetitivas de la misma se obtienen por síntesis química.

Los expertos en la técnica son capaces de determinar las condiciones y los métodos adecuados para sintetizar químicamente la estructura de carbohidratos de acuerdo con la figura 8 o unidades repetidas de los mismos.

En una realización preferida adicional, dicha fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 (componente activo) comprende los componentes positivos al Nuclear-1 de los microorganismos positivos al Nuclear-1 de la cepa MU1.

- 5 En otra realización preferida, la composición nutracéutica o farmacéutica de la invención comprende al menos una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 y al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1.

En una realización preferida adicional, la composición nutracéutica o farmacéutica de la invención comprende al menos una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 combinado con al menos otro microorganismo beneficioso, tal como, entre otros, un lactobacilo y/o bifidobacteria, aun más preferido una combinación de fracciones de microorganismos positivos al Nuclear-1 de diferentes cepas combinadas con otros microorganismos benéficos.

10 En otra realización preferida, la composición nutracéutica o farmacéutica de la invención comprende al menos una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 y al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 combinado con al menos otro microorganismo beneficioso, tal como, pero no limitándose a, un lactobacilo y/o bifidobacterium.

15 En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo induce o mejora una respuesta inmune humoral y/o celular contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 en al menos un humano o animal cuando se administra en una composición o formulación adecuada.

En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo induce o mejora una respuesta inmunitaria específica para el Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1 al tener el potencial de destruir las células cancerosas positivas al Nuclear-1 cuando se administran en una composición o formulación adecuada.

20 En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo reduce o previene la aparición de una enfermedad, tumor o metástasis positiva al Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal cuando se administra en una composición o formulación adecuada.

25 En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo reduce o previene la diseminación o metástasis de una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal cuando se administra en una composición o formulación adecuada.

En otra realización preferida, se usa un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo para tratar una enfermedad o tumor positivo al Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal cuando se administra en una composición adecuada.

30 En otra realización preferida, se utiliza un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo como ingrediente activo de un nutracéutico para prevenir, reducir el riesgo de desarrollo o reducir la aparición de un tumor positivo al Nuclear-1 mediante la administración oral del nutracéutico en un individuo saludable.

35 En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa como ingrediente activo de un nutracéutico para prevenir o reducir la propagación del tumor o metástasis o la propagación de metástasis o el tiempo para la recaída de un Nuclear-1 tumor positivo o células tumorales, para mejorar la calidad de vida o la supervivencia media o la tasa de tiempo de recaída, o para tratar a un paciente tumoral que tiene o tiene células tumorales positivas al Nuclear-1 mediante la administración oral del nutracéutico en pacientes que padecen esta enfermedad.

40 En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa como ingrediente activo de una composición farmacéutica para prevenir, reducir el riesgo de desarrollo de, o reducir la aparición de un tumor positivo al Nuclear-1 mediante la administración de composición farmacéutica en un individuo sano.

45 En otra realización preferida, un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se usa como ingrediente activo de una composición farmacéutica para prevenir o reducir la propagación del tumor o metástasis o la propagación de metástasis o el tiempo para la recaída de un tumor o tumor positivo al Nuclear-1 células, para mejorar la calidad de vida o la supervivencia media o la tasa de tiempo de recaída, o para tratar a un paciente con tumor que tiene o tiene células tumorales positivas al Nuclear-1 mediante la administración de la composición farmacéutica en pacientes que padecen esta enfermedad.

50 E) Métodos para inducir un escudo inmunitario contra células cancerosas positivas al Nuclear-1, para prevenir y/o tratar tumores positivos al Nuclear-1 y para tratar o prevenir una enfermedad positiva al Nuclear-1

Un método para inducir o mejorar una respuesta inmune humoral y/o celular específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad efectiva del nutracéutico, o la composición farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden.

En otra realización preferida, un método para inducir o potenciar una respuesta inmune humoral y/o celular específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1 comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad efectiva de formulación, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción o lisado del mismo como se describe en otra parte en este documento.

- 5 En una realización preferida, el método mencionado anteriormente en donde dicho nutraceutico, o dicha formulación farmacéutica, o dicho microorganismo positivo al Nuclear-1, o dicha fracción del mismo, o dichas formulaciones que los comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-reconocido/unido por Nemod-TF1 o A78-G/A7 y Nemod-TF2.

- 10 Se describe un método para inducir o potenciar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1 al tener el potencial de destruir al menos una célula cancerosa positiva al Nuclear-1.

- 15 En una realización preferida, un método para inducir una respuesta inmune específica del Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas del Nuclear-1 al tener el potencial de destruir esas células como se muestra aquí, por ejemplo, por la inducción del Nuclear-1 anticuerpos específicos, por la citotoxicidad dependiente del complemento específico del Nuclear-1 de los anticuerpos Nuclear-1 contra las células tumorales positivas al Nuclear-1, matándolos de manera efectiva y/o mediante la secreción de TNFalfa y/o INFgamma por las respuestas de células T específicas del Nuclear-1 que son marcadores sustitutos reconocidos científicamente por los expertos en la técnica para una destrucción de células tumorales mediada por células T citotóxicas específicas para aquellas células tumorales que llevan el Nuclear-1, como se muestra en los ejemplos y se describen en este documento, comprende la administración en un ser humano o en un animal de una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción de los mismos que se describen en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden.

- 20 Un método para reducir o incluso más preferido para prevenir la aparición de un tumor, preferiblemente un tumor con positivo al Nuclear-1, comprende administrar a un ser humano o animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden, preferiblemente en un individuo sano.

- 25 Un método para reducir o incluso preferir aun más para prevenir la diseminación o metástasis de un tumor, preferiblemente de un tumor positivo al Nuclear-1, comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o las formulaciones que los comprenden.

- 30 Un método para tratar un tumor, preferiblemente un tumor positivo al Nuclear-1, comprende administrar en un ser humano o animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden.

- 35 Un método para reducir o incluso más preferido para prevenir la aparición de una enfermedad positiva para el Nuclear-1 comprende administrar en un ser humano o animal una cantidad efectiva del nutraceutico, la formulación farmacéutica o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción de los mismos que se describe en otra parte de este documento, o formulaciones que los comprenden, preferiblemente en un individuo sano.

- 40 En otra realización preferida, un método para la vacunación o inmunización de un ser humano o un animal contra el Nuclear-1 comprende

- i) la administración a un ser humano o un animal de una cantidad efectiva de células dendríticas funcionales o una mezcla de células que comprende al menos una célula dendrítica funcional dirigida contra el Nuclear-1 al menos una vez e inducción de una respuesta inmune por dichas células dendríticas funcionales en el humano o animal y

- 45 ii) refuerzo de la respuesta inmunitaria mediante la administración de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o una fracción y/o un lisado del mismo al menos una vez.

En otra realización preferida, un método para la vacunación de un humano o un animal contra un epítipo de carbohidrato presente en una molécula de una célula humana o animal comprende

- 50 i) la administración a un ser humano o animal de una cantidad efectiva de células T activadas, clon de células T, línea de células T o una mezcla de células que comprende al menos una célula T activada dirigida contra el Nuclear-1 al menos una vez e inducción de una respuesta inmune por dichas células T activadas en el humano o animal y

ii) refuerzo de la respuesta inmunitaria mediante la administración de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o una fracción y/o un lisado del mismo al menos una vez.

La generación de células dendríticas funcionales, células T activadas, líneas de células T y clones de células T se describe en otra parte en este documento.

En una realización preferida, la administración de acuerdo con los métodos anteriores bajo (i) se realiza una vez. En otra realización preferida, la administración según los métodos anteriores en (i) se realiza dos veces. En otra realización preferida, la administración según los métodos anteriores en (i) se realiza al menos de tres a cinco veces.

En una realización preferida, el refuerzo de la respuesta inmune mediante la administración de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica según (ii) de los métodos anteriores se realiza una vez, en otra realización preferida el refuerzo se realiza de 2 a 10 veces, más preferiblemente más de 10 veces, más preferiblemente hasta 20 veces, lo más preferiblemente, el refuerzo se realiza continuamente a intervalos de tiempo regulares durante un período de varios meses a varios años.

En una realización preferida, el refuerzo de la respuesta inmune se realiza de 1 a 5 veces cerca del cebado y, posteriormente, a intervalos de 3 meses a 1 año o de 1 año a 10 años.

La generación de células dendríticas funcionales, células T activadas, líneas de células T y clones de células T se describe en otra parte en este documento.

Un método para reducir o incluso se prefiere aun más para prevenir la propagación de una enfermedad positiva para el Nuclear-1 comprende administrar en un ser humano o animal una cantidad efectiva del nutraceutico, la formulación farmacéutica o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción de los mismos que se describen en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden.

Un método para tratar una enfermedad positiva para el Nuclear-1 comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden.

Un método para fortalecer el sistema inmunitario o para mejorar una respuesta inmunitaria comprende administrar en un ser humano o animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que sea descrito en otra parte en este documento, o formulaciones. Esto puede ser, por ejemplo, pero no se limita a una mejora general de la condición del sistema inmunológico, por ejemplo, contra enfermedades infecciosas o tumores, una mejora de la actividad de otros agentes inmunoestimulantes o probióticos o prebióticos, o una acción como adyuvantes.

En una realización preferida, el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte en este documento, o las formulaciones que comprenden los métodos descritos anteriormente comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1 reconocido/unido por Nemod-TF1 y/o A78-G/A7 y Nemod-TF2.

En una realización preferida, el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte en este documento, o las formulaciones que comprenden los métodos descritos anteriormente comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de la cepa AG6(DSM 18726) y/o MU1(DSM 18728).

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

El término prevenir la aparición se refiere al uso del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que comprenden aquellas para un sujeto con el propósito de reducir el riesgo o la tasa o la probabilidad de desarrollar un cáncer positivo al Nuclear-1 o enfermedad positiva para el Nuclear-1.

El término para reducir o prevenir la propagación de un tumor o enfermedad positiva al Nuclear-1 o metástasis de un tumor se refiere al uso de nutraceuticos, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden para un sujeto con propósito de reducir el riesgo o la tasa o la probabilidad de metástasis o propagación de la enfermedad a otros órganos u otros sitios en el cuerpo u otros individuos.

El término tratamiento se refiere al uso del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que comprenden aquellas para un individuo o sujeto con el propósito de curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, mejorar, restablecer o afectar el cáncer, los síntomas del cáncer, la predisposición al cáncer, el tiempo de supervivencia o el tiempo de progresión.

Dicha enfermedad positiva para el Nuclear-1 es cualquier enfermedad que esté asociada con un virus, microorganismo u otro material biológico que pueda estar unido por al menos uno de los anticuerpos específicos del Nuclear-1 o que esté asociado con un componente del cuerpo o que ocurre en el cuerpo de un ser humano o animal, tal como, entre otros, una célula, microorganismo, virus o partícula que se une por al menos uno de los anticuerpos específicos del Nuclear-1.

La "cantidad efectiva" de cualquiera de los nutraceuticos, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o las formulaciones que los comprenden microorganismos vivos o muertos, o lisados o fracciones de estos microorganismos que corresponden o se derivan de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{14} cfu por persona por día (cfu/persona/día), en donde cfu es una unidad formadora de colonias como medida para un microorganismo como tal conocido y puede ser determinado por los expertos en la técnica.

En otra realización, la cantidad efectiva es la cantidad del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o formulaciones que comprenden aquellas que inducen una respuesta inmune humoral o celular contra el Nuclear-1 en al menos una respuesta inmune individual, preferiblemente humoral y celular contra el Nuclear-1, detectable por al menos una de las pruebas de respuesta inmune contra el Nuclear-1 descritas en otra parte en este documento.

En otra realización, la cantidad efectiva es la cantidad del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o formulaciones que comprenden aquellas que se requieren para conferir un escudo inmunitario contra las células tumorales positivas al Nuclear-1, para tener un efecto profiláctico contra el cáncer o para tener un efecto terapéutico contra el cáncer, o para tener un efecto profiláctico o terapéutico contra otra enfermedad positiva al Nuclear-1, cada una en al menos un individuo.

La cantidad efectiva para un individuo o un grupo de individuos puede ser determinada y/u optimizada por los expertos en la técnica, preferiblemente usando al menos una prueba de respuesta inmune contra el Nuclear-1 descrita en otra parte en este documento y preferiblemente aquellas combinaciones de pruebas de respuesta inmune contra el Nuclear-1 que se describen en otro lugar del presente documento como realizaciones preferidas y/o pruebas de respuesta clínica conocidas por los expertos en la técnica o descritas en otro lugar del presente documento.

Estas cantidades efectivas pueden variar respecto de las cantidades o dosis descritas anteriormente o las cantidades o dosis preferidas descritas en otra parte del presente documento para una persona que depende, por ejemplo, del sujeto, del número y el calendario de las dosis, del formato o formulación del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo, en el esquema de administración de vía y tiempo, en el propósito para el que se utiliza, como la profilaxis o el tratamiento, en el estado de una enfermedad o cáncer positivo al Nuclear-1, y pueden variar según las especies, razas y entre un animal individual o un humano individual que reciba el nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los contengan. Los expertos en la materia pueden determinar la dosificación, la vía de administración y el esquema de tiempo adecuados y/o óptimos para un individuo o para un grupo de individuos preferiblemente usando la descripción y una realización de la invención descrita en el presente documento.

Se prefieren aquellas cantidades y dosis eficaces del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o formulaciones que comprenden aquellas que inducen o mejoran dicha respuesta inmune contra el Nuclear-1 en más de un individuo, más preferiblemente en un número significativo de individuos, más preferiblemente en al menos el 10%, más preferiblemente en al menos el 20%, más preferiblemente en al menos el 30%, más preferiblemente en al menos el 40%, más preferiblemente en al menos el 50%, y lo más preferiblemente en el mayoría de individuos.

En una realización preferida, la cantidad efectiva es la cantidad de dicho nutraceutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden aquellas que inducen una respuesta inmune contra el Nuclear-1 en al menos un individuo.

En una realización preferida, dicha respuesta inmune inducida o mejorada es una respuesta inmune humoral y celular contra el Nuclear-1, detectable por al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 y una de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5. En una realización preferida, la cantidad efectiva es la cantidad del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o formulaciones que comprenden aquellas que inducen una respuesta inmune que es positiva en al menos dos de las pruebas de respuesta inmune descritas en el presente documento contra el Nuclear-1, más preferiblemente positivo para pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3, más preferiblemente para pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3, más preferiblemente para pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4, más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 6, aun más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 5, y más preferiblemente positiva para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral, aun más preferiblemente positivo para al menos dos pruebas de respuesta inmune celular fuera de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5, aun más preferiblemente para al menos una prueba de respuesta inmune humoral y al menos

- una prueba de respuesta inmune celular, aun más preferiblemente positivo para al menos dos pruebas de respuesta inmune humoral y dos pruebas de respuesta inmune celular, preferiblemente positivas para las pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3 y pruebas de respuesta inmune celular 1 y 3, y más preferiblemente para pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3 y prueba inmune celular 1, 2 y 3, incluso más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4 y prueba inmune celular 1, 2, 3 y 4, aun más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 6, y todas las 5 pruebas de respuesta inmunitaria celular, aun más preferiblemente para la prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3, 4 y 5, y todas las 5 pruebas de respuesta inmune celular, y lo más preferiblemente positiva para las 6 pruebas de respuesta inmune humoral y las 5 pruebas de respuesta inmune celular.
- 10 En una realización preferida, la cantidad efectiva es la cantidad de dicho nutraceutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden aquellas que se requieren para conferir un escudo inmunitario contra células tumorales positivas al Nuclear-1, para tener un efecto profiláctico contra el cáncer o para tener un efecto terapéutico contra el cáncer, o para tener un efecto profiláctico o terapéutico contra otra enfermedad positiva al Nuclear-1, cada una en al menos un individuo.
- 15 En otra realización preferida, la cantidad efectiva es la cantidad de dicho nutraceutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden aquellas que inducen la respuesta inmune máxima o cercana a la máxima contra el Nuclear-1 en al menos un individuo.
- 20 En una realización aun más preferida, la cantidad efectiva preferida es la cantidad del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o formulaciones que comprenden aquellas que inducen las respuestas inmunes máximas o cercanas a las máximas contra el Nuclear-1 según lo detectado en las pruebas de respuesta inmune contra el Nuclear-1 por los expertos en la técnica, por lo que esta respuesta inmune máxima no tiene que ser tal que sea positiva en todas las pruebas de respuesta inmune, pero preferiblemente la que dé las respuestas más altas de anticuerpos o títulos de anticuerpos contra el Nuclear-1 y/o la mayor respuesta de células T contra el Nuclear-1 y más preferiblemente contra células tumorales positivas al Nuclear-1, más preferiblemente ambas, y más preferiblemente aquellas que muestran al menos en las pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3 contra el Nuclear-1 los títulos de anticuerpos más altos y/o al menos en la prueba de respuesta inmune celular 1 o 2 o 3 contra el Nuclear-1 las respuestas de células T más altas contra el Nuclear-1.
- 25 En una realización preferida, la cantidad efectiva de dicho nutraceutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden microorganismos vivos o muertos, o lisados o fracciones de estos microorganismos que corresponden o se derivan de desde aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^{14} cfu por individuo por dosis.
- 30 En una realización más preferida, la cantidad efectiva del nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden microorganismos vivos o muertos, lisados o fracciones de estos microorganismos que corresponden a o se derivan de 1×10^7 a 1×10^{13} cfu/persona/día, más preferiblemente a 2×10^8 a 1×10^{12} , y más preferiblemente 1×10^9 - 1×10^{11} cfu/persona/ día.
- 35 Las cantidades efectivas o las dosis efectivas también pueden variar, como reconocen los expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de uso conjunto con otros agentes, como los de la mejora inmunológica, para inducir una respuesta inmune, o construir un escudo inmunitario, o prevenir o tratar el cáncer.
- 40 Las cantidades efectivas o las dosis efectivas también pueden variar, según reconocen los expertos en la materia, dependiendo del formato de uso, tal como el uso como nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o como las formulaciones que los comprenden, así como si comprenden lisados vivos o muertos o fracciones de los mismos, así como en las cantidades de dosis, así como en los intervalos de tiempo entre dosis. Aquellas pueden ser determinadas y optimizadas por los expertos en la técnica preferiblemente usando la invención proporcionada, pruebas y métodos de la invención.
- 45 En una realización preferida, el nutraceutico se administra por vía oral desde más de una dosis diaria, a una dosis diaria, semanal o mensual desde un intervalo a corto plazo hasta un uso de un año, preferiblemente uso diario o semanal durante 4 semanas a 2 años.
- 50 En otra realización preferida, se administra una dosis única a un individuo. En otra realización preferida, se administran dosis múltiples a un individuo. En otra realización preferida, la cantidad efectiva corresponde a una dosis única. En otra realización preferida, la cantidad efectiva corresponde a dosis múltiples.
- 55 En una realización preferida, la composición farmacéutica puede administrarse sistémicamente por tan solo una dosis a muchas dosis, preferiblemente de semanal a mensual a 3 mensual o 6 mensual o una combinación escalonada de los mismos, y puede combinarse con un refresco de la vacuna de 6 meses a anual, de 5 a diez años de la inmunización.

En otra realización preferida de la invención, la dosificación efectiva de la formulación nutracéutica que comprende al menos un microorganismo o lisado positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo en humanos es de 0.1 mg/m² - 10 g/m², más preferiblemente 10 mg/m² - 10 g/m², aun más preferido 0.1 g/m² - 10 g/m².

5 En otra realización preferida, la formulación se administra primero de manera sistémica con refrescos orales posteriores de la inmunización.

10 El término administración significa poner en contacto a un ser humano o un animal con una cantidad efectiva del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o formulaciones que comprenden aquellas para las cuales se pueden usar vehículos adicionales. Las vías de administración incluyen cualquier forma de poner al ser humano o animal en contacto con el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden. Se prefieren aquellas vías de administración, tales como, entre otras, administración oral, administración sistémica, administración por inhalación o contacto con la piel u otra epidermis, que conduce a una respuesta inmune contra el Nuclear-1, un escudo inmunitario contra el Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1, efecto profiláctico contra el cáncer o un efecto terapéutico contra el cáncer, que puede determinarse en sus formas preferidas como se describe anteriormente o en cualquier otro lugar del presente documento. Los expertos en la técnica pueden seleccionar la vía de administración más adecuada.

A continuación se describen ejemplos y las rutas de administración y formulaciones preferidas:

20 Los nutracéuticos se administran preferiblemente por vía oral, por ejemplo, como cápsulas, tabletas, emulsiones, polvo, líquidos, en forma de cualquier alimento o bebida, o como un componente de un alimento o una bebida como un aditivo alimentario. El nutracéutico puede administrarse solo o mezclado con al menos otro ingrediente. El nutracéutico solo o su mezcla con al menos otro ingrediente puede administrarse solo o mezclado en un alimento o una bebida.

25 Una formulación para la administración oral del nutracéutico, pero también la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden pueden ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral o cantidad efectiva del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o formulaciones que comprenden, entre otras, tabletas, cápsulas, nanopartículas, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. Los portadores comúnmente usados para tabletas incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, como el estearato de magnesio, también suelen agregarse a las tabletas. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo se puede suspender o disolver en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

35 Una formulación para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral o una cantidad efectiva del nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o su fracción o formulaciones que comprenden aquellas que incluyen, entre otras, tabletas, cápsulas, nanopartículas, emulsiones y suspensiones acuosas, dispersiones y soluciones. Los portadores comúnmente usados para tabletas incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, como el estearato de magnesio, también suelen agregarse a las tabletas. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo se puede suspender o disolver en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

45 La formulación de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyecciones como infusión en gotas, inyecciones hipodérmicas, intravenosas o intramusculares, aplicación transdérmica con pomada o fármaco transdérmico y aplicación rectal con supositorio. Cuando la composición se administra por vía oral, puede prepararse en forma de cápsula dura, cápsula blanda, gránulo, polvo, gránulo fino, píldora, comprimido de pastillas, sistema de administración gradual de ingrediente activo, líquido y suspensión. La preparación puede llevarse a cabo fácilmente por métodos convencionales en el campo farmacéutico.

50 El modo de administración y las formas de dosificación afectarán, por supuesto, las cantidades terapéuticas de los compuestos o composiciones que son deseables y eficaces para la aplicación de tratamiento dada. Cuando la formulación de la presente invención se prepara en forma de administración oral, la composición puede prepararse usando ingredientes farmacéuticos convencionales en un medicamento normal tal como relleno, diluyente, aglutinante, desintegrador, tensioactivo, diluyentes tales como lubricante y excipiente. Los ejemplos particulares de los ingredientes convencionales incluyen recipientes tales como azúcar de leche, azúcar blanco, cloruro de sodio, glucosa, urea, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa cristalina y ácido silícico; aglomerantes tales como agua, etanol, jarabe simple, líquido de glucosa, líquido de almidón, solución de gelatina, carboximetilcelulosa, laca, metilcelulosa, fosfato de potasio y polivinilpirrolidona; desintegradores tales como almidón seco, alginato de sodio, polvo de agar, polvo de laminar, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán, laurilsulfato de sodio, monoglicérido del ácido esteárico, almidón y azúcar de la leche;

inhibidores de la descomposición, tales como azúcar blanco, ácido esteárico, manteca de cacao y aceite hidrogenado; absorbentes como la sal de amonio cuaternario y el laurilsulfato de sodio; agentes humectantes tales como glicerina y almidón; absorbentes tales como almidón, azúcar de leche, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal; y lubricantes tales como talco purificado y estearato. Si es necesario, la preparación incluye además colorante, conservante, perfume, agente saborizante y agente edulcorante.

Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen sales básicas de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido fenilacético y ácido mandélico. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención también pueden formarse con un catión farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, si un grupo sustituyente comprende una unidad estructural carboxi. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen cationes de amonio alcalinotérreo alcalino y de amonio cuaternario.

En una realización preferida, la vía de administración de la composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección intracraneal, inyección intratumoral, inyección intraepitelial, administración transcutánea, administración por vía esofágica, administración intraabdominal, administración intraapendicular, administración intraarterial, administración intraarticular, administración intrabronquial, administración intrabucal, administración intracapsular, administración intracardial, administración intracartilaginosa, administración intracavitaria, administración intracefálica, administración intracólica, administración intracutánea, administración intraciquística, administración intradérmica, administración intraductal, administración intraduodenal, administración intrafascicular, administración intrafilar, administración intrafisural, administración intragástrica, administración intraglandular, administración intrahepática, administración intrainestinal, administración intralamelar, administración intralesiones, administración intraligamentosa, administración intralingual, administración intramamaria, administración intramedular, administración intrameningeal, administración intramiocárdica, administración intranasal, administración intraocular, administración intraoperatoria, administración intraoral, administración intraósea, administración intraovariana, administración intrapancreática, administración intraparietal, administración intrapélvica, administración intrapericárdica, administración intraperineal, administración intraperitoneal, administración intraplacentar, administración intrapleural, administración intrapontina, administración intraprostática, administración intrapulmonar, administración intrarraquidiana, administración intrarrectal, administración intrarrenal, administración intraescleral, administración intraescrotal, administración intrasegmentaria, administración intrasellar, administración intraespinal, administración intraesplénica, administración intraesternal, administración intraestromal, administración intrasinovial, administración intratarsal, administración intratesticular, administración intratorácica, administración intratonsilar, administración intratraqueal, administración intratubal, administración intratimpánica, administración intraureteral, administración intrauretral, administración intrauterina, administración intravaginal, administración intravascular, administración intraventricular, administración intravertebral, administración intravesical y administración intravítrea.

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

Una formulación de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamino, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares. Los portadores fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de portadores líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y el agua, o que contienen un regulador tal como fosfato de sodio a pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, como solución salina regulada con fosfato. Además, los portadores acuosos pueden contener más de una sal regulador, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, propilenglicol, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de la exclusión de agua. Ejemplos de tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, ésteres orgánicos tales como oleato de etilo y emulsiones de agua y aceite. Una formulación contiene un microorganismo, lisado o fracción del mismo positivo al Nuclear-1 de la presente invención, típicamente una cantidad de al menos 0.1 por ciento en peso de un microorganismo, lisado o fracción del positivo al Nuclear-1 por peso de la composición total. Un porcentaje en peso es una relación en peso de un microorganismo, lisado o fracción del mismo positivo al Nuclear-1 a la composición total. Así, por ejemplo, 0.1 por ciento en peso es 0.1 gramos de un microorganismo positivo al microorganismo positivo al Nuclear-1, lisado o fracción del mismo por 100 gramos de composición total.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales de compuestos que conservan la efectividad biológica y las propiedades de las bases libres y que se obtienen por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico,

ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de metales alcalinos, tales como sodio y potasio, sales alcalinotérreas y sales de amonio.

La formulación que comprende como ingrediente activo el microorganismo positivo al Nuclear-1, el lisado o la fracción del mismo) puede estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, tabletas, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y paladeables. Las tabletas contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de tabletas. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden recubrirse mediante las técnicas descritas en las Patentes de los Estados Unidos No. 4,256,108; 4,166,452; y 4,265,874, para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para el control de liberación. Una formulación de acuerdo con la presente invención también puede, o alternativamente, contener uno o más fármacos, que pueden estar unidos a un agente modulador o pueden estar libres dentro de la composición. Prácticamente cualquier fármaco puede administrarse en combinación con un agente modulador como se describe en este documento, para una variedad de propósitos como se describe a continuación. Los ejemplos de tipos de fármacos que pueden administrarse con un agente modulador incluyen analgésicos, anestésicos, antianginales, antifúngicos, antibióticos, medicamentos contra el cáncer (por ejemplo, taxol o mitomicina C), antiinflamatorios (por ejemplo, ibuprofeno e indometacina), antihelmínticos, antidepresivos, antidotos, antieméticos, antihistamínicos, antihipertensivos, antipalúdicos, antimicrotúbulos (por ejemplo, colchicina o alcaloides de la vinca), antimigraña, antimicrobianos, antipsicóticos, antipiréticos, antisépticos, agentes anti-señalización (por ejemplo, inhibidores de la proteína quinasa C o inhibidores de la movilización de calcio intracelular), antiartríticos, agentes antitrombina, antituberculóticos, antitusivos, antivirales, supresores del apetito, medicamentos cardioactivos, medicamentos de dependencia química, catárticos, agentes quimioterapéuticos, vasodilatadores coronarios, cerebrales o periféricos, agentes anticonceptivos, depresivos, diuréticos, expectorantes, factores de crecimiento, agentes hormonales, agentes hipnóticos, agentes de inmunosupresión, antagonistas narcóticos, parasimpaticomiméticos, sedantes, estimulantes, simpaticomiméticos, toxinas (por ejemplo, toxina del cólera), tranquilizantes y antiinfecciosos urinarios.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura cuando en el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o con un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona de alginato de sodio, goma de tragacanto y goma de acacia; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileño con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como un polioxietileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como la parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Agentes edulcorantes tales como los expuestos anteriormente, y agentes aromatizantes pueden agregarse para proporcionar una preparación oral paladeable. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Se ejemplifican agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión, por ejemplo, también pueden estar presentes agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo, goma de acacia o goma de tragacanto, fosfátidos naturales, por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulgente, un conservante y un agente saborizante y colorante. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede estar en una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. Los niveles de dosificación del orden de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente (aproximadamente 2.5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día). Por ejemplo, un tumor positivo al Nuclear-1 puede tratarse eficazmente mediante la administración de aproximadamente 0.01 a 50 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal por día (aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 3.5 g por paciente por día). La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación destinada a la administración oral de seres humanos puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95% de la composición total. Las formas unitarias de dosificación generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 g de ingrediente activo. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, el tiempo de administración de la dieta, la ruta de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se encuentra en tratamiento. La cantidad efectiva de dosificación de los compuestos de acuerdo con la invención variará dependiendo de los factores que incluyen el compuesto particular, la toxicidad y la actividad inhibidora, la condición tratada y si el compuesto se administra solo o con otras terapias. Normalmente, una cantidad de dosis efectiva oscilará entre aproximadamente 0.0001 mg/kg y 1500 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 1000 mg/kg, más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 150 mg/kg de peso corporal, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 50 y 100 mg/kg de peso corporal. La invención se refiere también a un procedimiento o un método para el tratamiento de las afecciones patológicas mencionadas anteriormente. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar de forma profiláctica o terapéutica, preferiblemente en una cantidad que sea eficaz contra los trastornos mencionados, a un animal de sangre caliente, por ejemplo, un ser humano, que requiera tal tratamiento, los compuestos se usan preferiblemente en la forma de composiciones farmacéuticas o nutracéuticas.

La formulación de excipientes y soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, como lo es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de regímenes de tratamiento, incluidos, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

A. Administración oral

En ciertas aplicaciones, las formulaciones descritas en el presente documento pueden administrarse mediante administración oral a un ser humano o un animal. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en tabletas, o pueden incorporarse directamente a los alimentos de la dieta.

Los compuestos activos pueden incluso incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Las tabletas, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y se puede agregar un agente edulcorante, como sacarosa, lactosa o sacarina, o un agente saborizante, como menta, aceite de gaulteria o sabor a cereza. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o las cápsulas pueden estar recubiertos con laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un tinte y saborizante, como sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no

tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Por lo general, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente el 0.1% del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del ingrediente(s) activo(s) puede, por supuesto, variar y convenientemente puede estar entre aproximadamente el 1 o el 2% y aproximadamente el 60%, 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtenga una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. El experto en la materia de preparación de tales formulaciones farmacéuticas contemplará factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, la vida media biológica, la vía de administración, la vida útil del producto y otras consideraciones farmacológicas, y como tal, una variedad de dosis y los regímenes de tratamiento pueden ser deseables.

Para la administración oral, las composiciones de la presente invención pueden incorporarse alternativamente con uno o más excipientes en forma de enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, aerosol oral o formulación administrada por vía oral sublingual. Por ejemplo, se puede preparar un enjuague bucal incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, como una solución de borato de sodio (solución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo puede incorporarse en una solución oral como una que contenga borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o dispersarse en un dentífrico, o agregarse en una cantidad/dosis efectiva terapéuticamente efectiva a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes. Alternativamente, las composiciones pueden transformarse en una forma de tableta o solución que puede colocarse debajo de la lengua o disolverse en la boca.

B. Administración inyectable

En ciertas circunstancias, será deseable administrar las formulaciones descritas en este documento por vía parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil disposición en jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede facilitarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser adecuadamente regulada si es necesario y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán un medio acuoso estéril que puede emplearse a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregarse a 1000 ml de líquido de hipodermoclisis o inyectar en el sitio de infusión propuesto. alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con la esterilidad, pirogenicidad y los estándares generales de seguridad y pureza que exigen las oficinas nacionales o regionales de estándares biológicos.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo filtrada previamente estéril.

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

- 5 Como se usa en el presente documento, "portador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción, reguladores, soluciones de portadores, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

15 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo se entiende bien en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también puede ser emulsionada.

En una realización preferida de la invención, el nutraceutico o las formulaciones del mismo que comprenden al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se aplican a seres humanos como un aditivo alimentario.

- 25 En una realización preferida de la invención, el nutraceutico o las formulaciones del mismo que comprenden al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo se aplican a los seres humanos como alimento médico.

La invención también se refiere al nutraceutico o una formulación del mismo que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo como aditivo alimentario o como alimento o como componente del mismo. El alimento en el contexto de la invención es cualquier sustancia consumida por organismos vivos, incluidas las bebidas líquidas. Los alimentos son la principal fuente de energía y nutrición para animales/humanos, y generalmente son de origen animal o vegetal. El alimento es alimento vegano preferido, que generalmente es todo tipo de alimentos que no contienen productos de origen animal, como carne, leche o huevos. El alimento en el contexto de la invención también es un alimento no vegano preferido que contiene productos animales. El alimento en el contexto de la invención es:

(i) cualquier sustancia o producto, ya sea procesado, parcialmente procesado o sin procesar, destinado a ser ingerido o razonablemente esperado por los seres humanos, ya sea de valor nutricional o no;

(ii) agua y otras bebidas;

(iii) goma de mascar o productos de caramelo; y/o

- 40 (iv) artículos y sustancias utilizadas como ingredientes o componentes en la preparación de alimentos. Los alimentos en el contexto de la invención se obtienen tradicionalmente a través de la agricultura, la ganadería y la pesca, con la caza, el forrajeo y otros métodos de subsistencia localmente importantes para algunas poblaciones, pero menores para otras. En la era moderna, en las naciones desarrolladas, el suministro de alimentos depende cada vez más de la agricultura, la agricultura industrial, la acuicultura y las técnicas de piscicultura que apuntan a maximizar la cantidad de alimentos producidos, al tiempo que minimizan el coste. Estos incluyen una dependencia de las herramientas mecanizadas que se han desarrollado, desde la trilladora, la sembradora, hasta el tractor y la cosechadora, etc. Se han combinado con el uso de pesticidas para promover altos rendimientos de cultivos y combatir a los insectos o mamíferos que reducir el rendimiento. Más recientemente, ha habido una tendencia creciente hacia prácticas agrícolas más sostenibles. Este enfoque, que en parte está impulsado por la demanda de los consumidores, fomenta la biodiversidad, la autosuficiencia local y los métodos de agricultura orgánica.

Los tipos de alimentos manufacturados (alimentos que contienen al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción de los mismos) en el contexto de la invención son:

- bebidas: cerveza, zumo, refresco, calabaza, vino, bebidas que contengan leche, productos lácteos u otras bebidas alcohólicas o no alcohólicas, por ejemplo agua, incluyendo solo agua carbonatada, jugos de frutas y jugos de verduras, refrescos, aguas frescas, limonada, cola, *ginger ale*, *irn bru*, cerveza de raíz, zarzaparrilla, crema de soda, diente de león y bardana, calabaza, un jarabe con sabor a fruta diluido con agua, bebidas deportivas, infusiones, café, té, bebidas lácteas, por ejemplo, leche, bebida de yogur, leche con chocolate, batido, ponche de huevo, leche

de almendras, horchata, bebidas alcohólicas, cócteles, bebidas mixtas, bebidas calientes, por ejemplo chocolate caliente, sidra caliente, capuchino o té de leche perla.

- 5 • El pan es un alimento básico para muchas poblaciones, ya que está hecho de una masa de trigo u otro tipo de cereal, por ejemplo, centeno-trigo, pan tostado (pan blanco), de grano entero, trigo-centeno, pan blanco, de grano múltiple, centeno, semillas de girasol, pizzas, chapatis, tortillas, baguettes, pitas, lavash, galletas, pretzels, naan, roscas, puris, tartas, pan de centeno, pan integral, pan de germen de trigo, cereales integrales, pan de granero y muchas otras variaciones.
- 10 • tartas y galletas, por ejemplo, tarta Angelfood, tarta de manzana, Babka, Buccellato, tarta Bundt, tarta de mantequilla, tarta de mariposa, tarta de zanahoria, tarta de queso, tarta de chocolate, tarta de Navidad, tarta de gasa, Croquembouche, magdalenas, tarta del diablo, tarta de Eccles, tarta de hadas, tarta de frutas, tarta de chocolate alemana, tarta genoise, pan de jengibre, tarta, pastel de mantequilla pegajosa, tarta de leche caliente, tarta de helado, tartas de jaffa, tarta de levadura, tarta de pan de piña, tarta de piña, tarta de libra, tarta de la reina Elizabeth, tarta de haba roja, tarta de terciopelo tarta Sacher, tarta Simnel, tarta de especias, tarta esponjosa, del sol, tarta de té, tarta tatin, rebanada de vainilla o tarta de boda
- 15 • el queso es un producto lácteo cuajado, de los cuales existen muchas variedades, por ejemplo, queso sardo, queso testouri, queso bokmakiri, queso kwaito, queso wookie, queso ackawi, queso de cesta, labneh, queso jibneh arabieh, queso nenaushi, queso naboulsi, paneer, affineur, Queso de montaña, Brimsen, Dachsteiner, tirolés, queso gris, Luneberg, queso Beaubé, queso de Bruselas, queso Herve, queso Limburger, queso Maredsous, queso Passendale, queso Plateau de Herve, queso Postel, queso Remedou, queso azul danés, queso danés o tilsit havarti, queso
- 20 allmentu emmental, queso cambozola, queso de Schozzer, Queso Limburger, queso spundekas, queso feta, queso halloumi o queso mozzarella
- un postre es un plato, generalmente dulce, y generalmente se sirve después del plato principal, por ejemplo, helado, por ejemplo, bizcochos o galletas, pasteles, migajas, natillas, frutas, postres de gelatina, helados, merengues, pastas, pasteles o tartas, pudines, sorbetes, esponjados o bizcochos de crema.
- 25 • patatas fritas, hojuelas, por ejemplo, patatas fritas o "patatas crujientes", hojuelas de tortilla u hojuelas de maíz
- alimentos funcionales (los alimentos funcionales se denominan nutraceuticos, una combinación de productos de nutrición y farmacéuticos, y pueden incluir alimentos genéticamente modificados; la categoría general incluye alimentos procesados elaborados a partir de ingredientes alimenticios funcionales o fortificados con aditivos que promueven la salud, como productos " enriquecidos con vitaminas", y también alimentos frescos (por ejemplo, verduras) que tienen especificaciones específicas adjuntas)
- 30 • mermelada y jalea, por ejemplo, mermeladas de grosellas, grosellas rojas, grosellas negras, frutas cítricas, manzanas, frambuesas, fresas y moras maduras, o jalea real
- 35 • pasta, por ejemplo, pasta conformada, *campanilla*, *casarecci*, *cavatelli*, *conchiglie*, *conchiglioni*, *farfalle*, *fiori*, *fusilli*, *fusilli bucati*, *gelli*, *gramigna*, *lumache*, *lumaconi*, *maltagliati*, *orecchiette*, *pipe*, *quadrefiore*, *radiator*, *riccini*, *strozzapreti*, *torchio* o *trofie*
- pastel, por ejemplo pastel de tocino y huevo, pastel de pollo y champiñones, pastel de carne en conserva, pastel de Cornualles, pastel de pescado, kalakukko, kulebjaka, pastel de pizza, pastel de carne de cerdo, pastel escocés, pastel de pastor, pastel de Stargazy, pastel de carne, pastel de carne y riñón, tarta de manzana, tarta de crema de plátano, tarta de moras, tarta de arándanos, tarta de crema de Boston, tarta de arándanos, tarta de cereza, tarta de crema de chocolate, tarta de crema de coco, pastel de natillas, tarta de manzana holandesa, tarta de uva, tarta de lima, tarta de merengue de limón, tarta de limón, tarta mixta de bayas, tarta de naranja, tarta de melocotón, tarta de ruibarbo, tarta de ruibarbo de fresa, tarta de fresa o tarta de vinagre
- 40 • pizza, por ejemplo los tipos clásicos y sus respectivas coberturas incluyen: marinera o napolitana: tomate, aceite de oliva, orégano y ajo; margarita: tomate, aceite de oliva, hojas frescas de albahaca y fior-di-latte (mozzarella hecha con leche de vaca) o mozzarella de búfala; formaggio e pomodoro: tomate, aceite de oliva y queso parmesano rallado, las hojas de albahaca son opcionales; ripieno o calzone: fior-di-latte o mozzarella de búfala, a veces también queso ricotta, aceite de oliva y salami, otras carnes, verduras, etc, o stromboli: mozzarella, carne, verduras, etc.
- 45 • carnes procesadas, por ejemplo, carne de anfibios, sapos, carne artificial, carne de imitación, carne in vitro, carne de res (bovinos), búfalos, bovinos, filetes, ternera, yak, aves de corral (aves), pollo, pato, aves de caza, pavos,
- 50 cánidos, mariscos, pescados, tiburones, crustáceos, cangrejos, conejos, carneros (ovinos), corderos, puercos (cerdo), jamón (haunch), tocino (tiras de carne curadas) o insectos
- sándwiches por ejemplo sándwich de aram, baguette rellena, *butty* de tocino, panecillo, hamburguesa, burrito, *chip butty*, sándwich club, queso asado, kebab döner, *georgia* *hots*, sándwich de fusión: derretido de atún, etc., panini, sándwich de carne, taco, sándwich de té, tostado sándwich, tarta o envoltura.

• ensalada por ejemplo Ensalada César, ensalada del chef, ensalada Cobb, ensalada griega, ensalada italiana, ensalada mesclum, ensalada niçoise, ensaladas de judías como la ensalada de judías verdes, ensalada de siete judías, ensalada de pollo, ensalada de huevo, ensalada de frutas (rebanadas, frutas peladas servidas en sus propios zumos) o con un aderezo), *larb*, ensalada de pasta, ensalada de patata, ensalada somen, som tam, tabouli, ensalada waldorf o ensalada watgate

• salsa por ejemplo salsas blancas, salsa de champiñones, salsa allemande, salsa de américa, salsa suprema, salsas pardas elouté, salsa bordelesa, salsa bourguignonne, salsa chateaubriand, salsa de África, salsa robert, salsa bechamel, salsa mornay, salsas emulsionadas, salsa de oso, salsa holandesa, mayonesa, salsa tártara, crema de ensalada, salsas de mantequilla, beurre blanc, café de paris, salsas dulces, salsa de pescado, sambal, salsa de barbacoa, mole, salsa de tomate o tzatziki

• butifarra, chorizo, salchicha por ejemplo andouille, pudín negro, salchicha de sangre, boerewors, salchicha, salchicha de desayuno, butifarra, chorizo, salchicha de la península, falukorv, fuet, haggis, kieska, kielbasa, kishka, kishke, knackwurst, kovbasa, landjäger, linguça, salchicha de hígado, lukanka, mettwurst, carne picada, mortadela, salami, soujouk, thüringer, weißwurst o pudín blanco

• bocadillos: confitería, patatas fritas, chocolate, hardtack, barras de dulce, comida chatarra, por ejemplo, cacahuete hervido, barras de chocolate, cheetos, mezcla de chex, bizcochos, galletas, combos, rondas de dulce de leche, aros, helados, pasteles de luna, botín de pirata, palomitas de maíz, chicharrones, patatas fritas, pretzels, bocadillos listos, refrescos, bolas de nieve, comida para estudiantes, panecillos suizos, tings, twinkies, botín vegetal o tartas cebrá

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

• azúcar o productos de azúcar, por ejemplo, jarabe de oro, caramelos o chocolates.

• yogur, cuajada, crema agria, crema batida, por ejemplo, Lassi, kéfir, ayran, doogh o tarator.

• beber polvos o tabletas, por ejemplo, bebidas vitamínicas o bebidas minerales

• alimentos terapéuticos en cápsulas o tabletas (los alimentos terapéuticos son alimentos diseñados para propósitos específicos, generalmente nutricionales, terapéuticos), alimentos funcionales, alimentos médicos, alimentos enterales, alimentos parenterales, alimentos de uso sanitario específico. Ejemplos son: una bebida fortificada de batido de leche diseñada principalmente para los ancianos, y Plumpy'nut, un alimento a base de cacahuete diseñado para la alimentación de emergencia de niños con desnutrición severa.

En otra realización preferida, la formulación de la invención se fabrica como un fármaco de venta libre.

En otra realización preferida, se describe un método para inducir o mejorar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva al Nuclear-1, en donde dicho nutracéutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicha fracción del mismo o dichas formulaciones que comprenden aquellas se administran a un individuo sano.

En otra realización preferida, se describe un método para inducir o mejorar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva al Nuclear-1, en donde dicho nutracéutico, dicha composición farmacéutica, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o dicha fracción del mismo o las formulaciones que comprenden aquellas se administran a un individuo con un cáncer, un tumor, al menos un tumor o una célula cancerosa, o al menos una metástasis.

En particular, el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden se pueden usar para inducir una respuesta inmune contra un cáncer, un tumor, una célula cancerosa o la metástasis derivada del mismo, para inducir una respuesta inmunitaria que funciona como un escudo inmunitario contra las células tumorales, un cáncer, un tumor, una célula cancerosa o las células cancerosas o la metástasis derivadas del mismo, para tratar un tumor o cáncer, metástasis y/o metástasis, y/o para reducir o para prevenir la aparición, diseminación o metástasis de un cáncer, tumor, célula cancerosa o la metástasis derivada de ellos en individuos o pacientes sanos, respectivamente, cada uno de los cuales preferiblemente comprende al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, seleccionada de cánceres, tumores o enfermedades cancerosas o tumorales como se describe a continuación o en cualquier otro lugar del presente documento. Por ejemplo, el tratamiento está dirigido contra tumores primarios o cánceres, tumores residuales mínimos o enfermedades de cáncer, recaídas y/o metástasis o partes de los mismos. El tratamiento de los tumores o cánceres también puede efectuarse como un tratamiento adyuvante. El nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden también se pueden usar en la profilaxis de enfermedades tumorales, tumores o células tumorales positivas para Nuclear-1. Por ejemplo, el uso profiláctico está dirigido a la profilaxis de tumores y metástasis. Estos agentes antitumorales se administran en una forma adecuada de acuerdo con métodos bien conocidos o como se

describe en otra parte del presente documento. Una variante preferida es la inyección o administración de estos agentes antitumorales o fármacos por vía oral, intravenosa, localmente en cavidades corporales, por ejemplo, rutas intraperitoneales, intrarrectales, intragastrointestinales, localmente, por ejemplo, directamente en un tumor, en órganos o vasos linfáticos (intranodales), pero también por vía subcutánea, intradérmica o en la piel, e intramuscular.

De una manera preferida, los tipos de administración también pueden combinarse, en cuyo caso la administración puede efectuarse en diferentes días de tratamiento o en un día de tratamiento como se describe con detalle en otra parte en este documento. De acuerdo con la invención, también es posible combinar dos o más de los nutracéuticos de la invención, composiciones farmacéuticas, microorganismos positivos al Nuclear-1 o sus fracciones o formulaciones que los contengan, así como combinar uno o una combinación de aquellos con uno o más medicamentos. o tratamientos de tumores, como terapias con anticuerpos, quimioterapias o radioterapias, administrados o aplicados de manera adecuada al mismo tiempo o por separado en el tiempo.

El cáncer, el tumor, las células tumorales, las células cancerosas o la metástasis derivadas del mismo se seleccionan del grupo de enfermedades cancerosas o tumorales de la región del oído, nariz, garganta, pulmones, mediastino, tracto gastrointestinal, sistema urogenital, sistema ginecológico, sarcomas de mama, sistema endocrino, piel, huesos y tejidos blandos, mesoteliomas, melanomas, neoplasias del sistema nervioso central, enfermedades cancerosas o tumorales durante la infancia, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásicos, metástasis con tumor primario desconocido (síndrome de CUP), carcinomatosis peritoneales, neoplasias malignas relacionadas con la inmunosupresión y/o metástasis tumorales.

Más específicamente, el cáncer, el tumor, las células tumorales, las células cancerosas o la metástasis derivadas de los mismos pueden comprender los siguientes tipos de cáncer: adenocarcinoma de mama, próstata y colon; todas las formas de cáncer de pulmón que comienzan en el tubo bronquial; cáncer de médula ósea, melanoma, hepatoma, neuroblastoma; papiloma; apudoma, coristoma, branquioma; síndrome carcinoide maligno; cardiopatía carcinoide, carcinoma (por ejemplo, carcinoma de Walker, carcinoma de células basales, carcinoma escamobasal, carcinoma de Brown-Pearce, carcinoma ductal, tumor de Ehrlich, carcinoma in situ, carcinoma de cáncer de Merkel, carcinoma de células de Merkel, cáncer de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; leucosarcoma; mesotelioma; mixoma; carcinoma papilar, carcinoma scirrhous, carcinoma bronquialveolar, carcinoma bronquial, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células de transición); trastorno funcional histiocítico; leucemia (por ejemplo, en relación con leucemia de células B, leucemia de células mixtas, leucemia de células nulas, leucemia de células T, leucemia de células T crónica, leucemia asociada a HTLV-II, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia de mastocitos y leucemia mieloide); histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, tumor de células plasmáticas solitarias; reticuloendoteliosis, condroblastoma; condroma, condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; leucosarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; sarcoma de Ewing; sinovioma; adenofibroma; adenolinfoma; carcinosarcoma, cordoma, craneofaringioma, disgerminoma, hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma; odontoma; teratoma; timoma, corioblastoma; adenocarcinoma, adenoma; colangioma; colesteatoma; cilindroma; cistoadenocarcinoma, cistoadenoma; tumor de células granulosas; ginadroblastoma; hidradenoma; tumor de células de los islotes; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli, tumor de células de la teca, leiomioma; leiomiosarcoma; mioblastoma; mioma miosarcoma; rhabdomyoma; rhabdomyosarcoma; ependimoma; ganglioneuroma, glioma; meduloblastoma, meningioma; neurilemoma neuroblastoma; neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma no cromafínico, angioqueratoma, hiperplasia angiointerficial con eosinofilia; angioma esclerotizante; angiomatosis; glomangioma; hemangioendotelio; hemangioma; hemangiopericitoma, hemangiosarcoma; linfangioma, linfangiomoma, linfangiosarcoma; pinealoma; cistosarcoma phyllodes; hemangiosarcoma; linfangiosarcoma; myxosarcoma, carcinoma ovárico; sarcoma (por ejemplo, sarcoma de Ewing, experimentalmente, sarcoma de Kaposi y sarcoma de mastocitos); neoplasias (por ejemplo, neoplasias óseas, neoplasias mamarias, neoplasias del aparato digestivo, neoplasias colorrectales, neoplasias hepáticas, neoplasias del páncreas, neoplasias de hipofisis, neoplasias del testículo, neoplasias orbitales, neoplasias de la cabeza y el cuello, neoplasias del sistema nervioso central, neoplasias del sistema nervioso central el órgano auditivo, la pelvis, el tracto respiratorio y el tracto urogenital); neurofibromatosis y displasia de células escamosas cervicales, y/o metástasis derivadas de cualquiera de estos.

En una realización preferida, el cáncer, el tumor, las células tumorales, las células cancerosas o la metástasis derivadas del mismo se seleccionan del grupo de enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales que comprenden al menos una célula o preferiblemente un número significativo de células o más preferiblemente la mayoría de las células tumorales que son positivas al Nuclear-1 en la definición de acuerdo con la invención, seleccionados del grupo de: tumores de la región oreja-nariz-garganta, que comprenden tumores de la nariz interna, seno nasal, nasofaringe, labios, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, orejas, glándulas salivales y paragangliomas, tumores de los pulmones, que comprenden carcinomas bronquiales no parvicelulares, carcinomas bronquiales parvicelulares, tumores del mediastino, tumores del tracto gastrointestinal, tumores del esófago, estómago, páncreas, hígado vesícula biliar y tracto biliar, intestino delgado, carcinomas de colon y recto y carcinomas anales, tumores urogenitales que comprenden tumores de los riñones, uréter, vejiga, glándula prostática, uretra, pene y testículos, tumores ginecológicos que comprenden tumores del cuello uterino, vagina, vulva, cáncer uterino, enfermedad maligna del trofoblasto, carcinoma de ovario, tumores del tubo uterino (Tuba Faloppii), tumores de la cavidad abdominal, carcinomas mamarios, tumores de los órganos endocrinos, que comprenden tumores de tiroides, paratiroides, corteza suprarrenal, tumores del páncreas endocrinos, tumores

- carcinoides y síndrome carcinoide, neoplasias endocrinas múltiples, sarcomas óseos y de tejidos blandos, mesoteliomas, tumores cutáneos, melanomas que comprenden melanomas cutáneos e intraoculares, tumores del sistema nervioso central, tumores durante la infancia, que comprenden retinoblastoma, tumor de Wilms, neurofibromatosis, neuroblastoma, familia de tumores de sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, linfomas que comprenden linfomas no Hodgkin, linfomas cutáneos de células T, linfomas primarios del sistema nervioso central, enfermedad de Hodgkin, leucemias que comprenden leucemias agudas, leucemias mieloides y linfáticas crónicas, neoplasias de células plasmáticas, síndromes de mielodisplasia, síndromes paraneoplásicos, metástasis con tumor primario desconocido (síndrome de CUP), carcinomatosis peritoneal, neoplasia relacionada con la inmunosupresión que comprende neoplasias relacionadas con el SIDA como el sarcoma de Kaposi, linfomas asociados con el SIDA, linfomas asociados con el SIDA del sistema nervioso central, enfermedad de Hodgkin asociada al SIDA y tumores anogenitales asociados al SIDA, tumores malignos relacionados con el trasplante, tumores metastásicos que comprenden metástasis cerebrales, metástasis pulmonares, cáncer de hígado, metástasis hepáticas, metástasis óseas, metástasis pleurales y pericárdicas y ascitis maligna y/o metástasis derivadas de cualquiera de estos.
- En otra realización preferida, el cáncer, el tumor, las células tumorales, las células cancerosas o la metástasis derivadas del mismo se seleccionan del grupo que comprende enfermedades cancerosas o tumorales tales como carcinomas mamarios, tumores gastrointestinales, incluidos carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer gástrico temprano, cáncer del intestino delgado, carcinomas de ovario, carcinomas cervicales, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinomas de células renales, melanoma maligno y/o cáncer de hígado y/o metástasis derivadas de cualquiera de estos.
- En una realización preferida adicional, el cáncer, el tumor, las células tumorales, las células cancerosas o la metástasis derivadas del mismo se seleccionan del grupo de enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales que comprenden al menos una célula, preferiblemente un número significativo de células, o más preferiblemente una mayoría de células tumorales, que son positivas al Nuclear-1 en la definición según la invención, seleccionadas del grupo de carcinomas mamarios, tumores gastrointestinales, incluidos carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer gástrico temprano, cáncer pequeño, cáncer de intestino, carcinomas de ovario, carcinomas cervicales, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinomas de células renales, melanoma maligno y/o cáncer de hígado, y/o metástasis derivadas de cualquiera de estos.
- En otra realización preferida, se describe un método para inducir o mejorar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva al Nuclear-1, el cáncer, un tumor, al menos un tumor o una célula cancerosa, o al menos una metástasis comprende al menos una célula que es positiva al Nuclear-1.
- En una realización preferida adicional, se describe un método para inducir o mejorar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 y/o para prevenir o tratar una enfermedad positiva al Nuclear-1, en la que el individuo tiene un cáncer, un tumor, al menos un tumor o célula cancerosa, o al menos una metástasis seleccionada del grupo de enfermedades cancerosas o tumorales que comprenden carcinomas mamarios, tumores gastrointestinales, incluidos carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer gástrico temprano, cáncer de intestino delgado, carcinoma de ovario, carcinomas de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinomas de células renales, melanoma maligno y/o cáncer de hígado, y/o metástasis derivadas de cualquiera de estos.
- En un estudio con voluntarios humanos sanos, los títulos de anticuerpos séricos contra el Nuclear-1 se determinan utilizando al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 que determinan la respuesta de anticuerpos existente contra el Nuclear-1 antes de la primera aplicación del nutraceutico y preferiblemente voluntarios sin o se seleccionan niveles de anticuerpos anti-Nuclear-1 más bajos para el ensayo en humanos. En aquellos voluntarios, el nutraceutico que comprende AG6 o MU1 o un placebo se administra por vía oral durante un período de 3 a 30 semanas. Se realiza la aplicación oral de al menos dos dosis diferentes. Las respuestas inmunitarias son seguidas por la determinación del anticuerpo y/o la respuesta de las células T contra el Nuclear-1 utilizando al menos una de las pruebas de respuesta humoral 1 a 6 y/o las pruebas de respuesta inmunitaria celular 1 a 5 antes a y en intervalos adecuados después del inicio de administración oral del nutraceutico. Hay una elevación significativa de la respuesta de anticuerpos contra el Nuclear-1 y/o la respuesta de las células T contra el Nuclear-1 observada en un número significativo de voluntarios en el grupo de voluntarios que recibe el nutraceutico en comparación con el título antes del estudio, según lo probado positivamente por ser positivo en al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 o en al menos una de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5. En el grupo de placebo, la elevación de anticuerpos o respuesta de células T contra el Nuclear-1 se observa con menos frecuencia o en menor medida.
- Esto muestra la efectividad del nutraceutico en humanos para desarrollar una respuesta inmunitaria contra el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas Nuclear-1 para la prevención, reducción o diseminación de los tumores o metástasis positivos al Nuclear-1s o su tratamiento.
- En un estudio con pacientes humanos con cáncer inmunocompetentes con tumores positivos al Nuclear-1, los títulos de anticuerpos séricos contra el Nuclear-1 se determinan mediante el uso de al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 que determinan la respuesta de anticuerpos existente contra el Nuclear-1. Antes de la primera aplicación de la composición farmacéutica. La composición farmacéutica que comprende AG6 o MU1 o un

- placebo se administra varias veces por vía oral, intraperitoneal o intravenosa durante un período de 3 a 70 semanas. Se realiza la administración de al menos dos dosis adecuadas diferentes. Las respuestas inmunitarias son seguidas por la determinación del anticuerpo y/o la respuesta de las células T contra el Nuclear-1 mediante el uso de al menos una de las pruebas de respuesta humoral 1 a 6 y/o las pruebas de respuesta inmunitaria celular 1 a 5 y/o la respuesta clínica. por determinación del tiempo hasta la progresión, supervivencia libre de tumor y/o volúmenes y/o sitios de tumor, cada uno antes y en intervalos adecuados después del inicio de la administración de la composición farmacéutica. Existe una elevación significativa de la respuesta de anticuerpos contra el Nuclear-1 o de la respuesta de células T contra el Nuclear-1 observada en un número significativo de voluntarios en el grupo que recibe la formulación de la invención en comparación con el título antes del estudio como positivo probado por ser positivo en al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 o en al menos una de las pruebas de respuesta inmune celular 1 a 5 y/o una respuesta clínica parcial o completa o un tiempo prolongado hasta la progresión o tiempo de supervivencia en un número significativo de los pacientes que recibieron la formulación. En el grupo de placebo, la elevación del anticuerpo o la respuesta de las células T contra el Nuclear-1 se observa con menos frecuencia o en menor medida y/o se observa una respuesta clínica significativamente menor.
- 15 Esto muestra la efectividad de la composición farmacéutica en humanos para desarrollar una respuesta inmunitaria contra el Nuclear-1 que funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas al Nuclear-1 para la prevención, reducción o diseminación de la aparición de tumores positivos al Nuclear-1s o metástasis o su tratamiento.
- 20 La puesta en contacto del microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo dentro del cuerpo del organismo vivo (humano/animal) inicia la producción de anticuerpos que se unen al Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1. Sorprendentemente, los anticuerpos contra el Nuclear-1 funcionan como un mecanismo de inmunovigilancia contra las células cancerosas que surgen recientemente.
- F) Métodos para tratar o prevenir un trastorno gastrointestinal.
- 25 En otra realización preferida, un método para reducir o prevenir la aparición o propagación de un trastorno o enfermedad gastrointestinal comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad efectiva del nutraceutico, la formulación farmacéutica o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o su fracción, o formulaciones que los comprenden.
- Las cantidades efectivas del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o su fracción, o las formulaciones que comprenden aquellas se describen en otra parte en este documento.
- 30 En otra realización preferida del método para reducir o prevenir la aparición o propagación de un trastorno o enfermedad gastrointestinal, dicho nutraceutico, o dicha formulación farmacéutica, o dicho microorganismo positivo al Nuclear-1, o dicha fracción del mismo que se describen en otra parte en este documento, o dichas formulaciones son o comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1 reconocido/unido por Nemod-TF1 o A78-G/A7 y Nemod-TF2.
- 35 En otra realización preferida del método para reducir o prevenir la aparición o propagación de un trastorno o enfermedad gastrointestinal, dicho nutraceutico, o dicha formulación farmacéutica, o dicho microorganismo positivo al Nuclear-1, o dicha fracción del mismo que se describen en otra parte en este documento, o dichas formulaciones son o comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de la cepa AG6(DSM 18726), MU1(DSM 18728) y LH2(DSM 18727), más preferiblemente de las cepas AG6 o MU1, más preferiblemente de la cepa AG6.
- 40 En otra realización preferida, un método para tratar un trastorno o enfermedad gastrointestinal comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o su fracción, o formulaciones que los comprenden.
- En otra realización preferida del método para tratar un trastorno o enfermedad gastrointestinal, la enfermedad gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria del intestino o un trastorno funcional del intestino.
- 45 Un método para reducir o preferiblemente para prevenir la aparición de un trastorno o enfermedad gastrointestinal, preferiblemente una enfermedad inflamatoria del intestino o un trastorno funcional del intestino, comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden, preferiblemente en un individuo sano.
- 50 Un método para reducir o incluso más preferido para prevenir la propagación de un trastorno o enfermedad gastrointestinal, preferiblemente una enfermedad inflamatoria del intestino o un trastorno funcional del intestino, comprende administrar en un humano o un animal una cantidad efectiva del nutraceutico, o formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden.
- 55 Un método para tratar un trastorno o enfermedad gastrointestinal, preferiblemente una enfermedad inflamatoria del intestino o un trastorno funcional del intestino, comprende administrar en un ser humano o un animal una cantidad

efectiva del nutraceutico, la formulación farmacéutica o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden.

En una realización preferida, el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte en el presente documento, o las formulaciones que comprenden los métodos descritos anteriormente comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1 reconocido/unido por Nemod-TF1 o A78-G/A7 y Nemod-TF2.

En una realización preferida, el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo que se describe en otra parte del presente documento, o las formulaciones que comprenden los métodos descritos anteriormente comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de la cepa AG6 (DSM 18726), la cepa MU1 (DSM 18728), y más preferiblemente de la cepa AG6.

Las rutas de administración, las dosis eficaces, las formulaciones son tales como las descritas en otra parte en el presente documento, preferiblemente aquellas como se describen dentro de los métodos para tratar o prevenir enfermedades o tumores positivos al Nuclear-1. En una realización preferida, se administran dos dosis por día que comprenden de 10^9 a 10^{12} microorganismos positivos al Nuclear-1 durante al menos dos semanas.

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

En un estudio con pacientes humanos con síndrome de colon irritable, enfermedad de Crohn (EC), ileítis o colitis ulcerosa, la composición nutraceutica o farmacéutica que comprende AG6 o MU1 se administra por vía oral o un placebo durante un período de 3 a 30 semanas. Se realiza la administración de al menos dos dosis adecuadas diferentes. Respuestas clínicas como la reducción de la hinchazón o la flatulencia, el mantenimiento de la remisión en la EC, la mejora de la calidad de vida, la reducción del tiempo hasta la gravedad de la erupción, la disminución de la diarrea, el mantenimiento de la remisión de la reservoritis, la inducción o el mantenimiento de la remisión se realiza un seguimiento de la colitis ulcerativa activa, respectivamente, antes y en intervalos adecuados después del inicio de la administración del nutraceutico o la composición farmacéutica. Hay una mejora significativa de al menos uno de los síntomas anteriores o respuestas clínicas observadas en un número significativo de pacientes que reciben el nutraceutico o la composición farmacéutica que aquellos en el grupo de placebo.

Esto muestra la efectividad de la composición nutraceutica o farmacéutica en humanos para la prevención, reducción, diseminación o tratamiento de trastornos gastrointestinales.

G) Métodos para la generación de anticuerpos

Un método para la generación de un anticuerpo anti-Nuclear-1 o composición de anticuerpos o suero policlonal comprende

(a) poner en contacto el nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo con un humano o un animal

(b) inducir o mejorar una respuesta inmune humoral que reconoce el antígeno Nuclear-1 y/o la célula tumoral positiva al Nuclear-1

(c) aislar dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 o composición de anticuerpo.

En otra realización preferida, un método para generar una célula que produce un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composición de anticuerpo comprende

(a) poner en contacto la formulación, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores con un ser humano o animal

(b) inducir o mejorar una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1

(b) generar al menos una célula que produce dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 o composición de anticuerpo.

En otra realización, un método para generar una célula que produce un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composición de anticuerpo comprende

(a) poner en contacto el nutraceutico, la composicion farmaceutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fraccion del mismo segun la invencion con un humano o animal

(b) inducir o mejorar una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1

(c) generar al menos una célula que produce dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 o composicion de anticuerpo.

5 Dicha etapa final (c) se puede realizar mediante diversos métodos, tales como

(i) mediante immortalización de al menos una célula que produce el anticuerpo anti-Nuclear-1, preferiblemente por fusion con una linea celular inmortal como se realiza en la tecnologia de hibridoma, o preferiblemente por infeccion con un virus adecuado como el Virus de Epstein Barr (EBV) o por transfeccion recombinante con al menos un gen que causa la immortalización de la célula tal como E1 de EBV; o

10 (ii) mediante el analisis de la secuencia peptidica de al menos las regiones variables del anticuerpo anti-Nuclear-1 o al menos la region de union del anticuerpo anti-Nuclear-1 responsable de la especificidad del anticuerpo y la transformacion de células con ADN que codifica el anticuerpo anti-Nuclear-1 como un anticuerpo completo de cualquier isotipo o un fragmento del mismo o una proteina de fusion de un fragmento del anticuerpo anti-Nuclear-1 o el anticuerpo completo con al menos otra secuencia de aminoácidos o polipéptidos.

15 Se prefieren las células que son capaces de producir de manera estable los anticuerpos, lo que significa que las células se pueden pasar a través de una cantidad adecuada de ciclos para la produccion de los anticuerpos, tales como, entre otros, células de hibridoma y células immortalizadas de otra manera o mediante células transformadas de forma estable, tales como pero no limitándose a CHO, NS0, SP2, Y0, PerC.6, Hec293. Sin embargo, también una expresion transitoria, como la expresion en células COS o Hec293 o células B, es una realizacion de la invencion.

20 En otra realizacion, un método para la generacion de un anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 comprende, además

(a) hacer crecer al menos una célula de dicha célula que produce el anticuerpo anti-Nuclear-1 o la composicion del anticuerpo en condiciones adecuadas

(b) aislar dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 o composicion de anticuerpo.

En una realizacion preferida, dicho anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 se aísla del sobrenadante de cultivo.

25 En una realizacion preferida, dicha célula que produce un anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 se obtiene mediante clonacion de una sola célula.

En otra realizacion, un método para la generacion de una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo monoclonal anti-anticuerpo Nuclear-1 o un fragmento del mismo comprende

30 (a) poner en contacto el nutraceutico, la composicion farmaceutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fraccion del mismo con un humano o animal

(b) inducir o mejorar una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1

(c) aislamiento de una célula o clon de célula que produce el anticuerpo anti-Nuclear-1

(d) analizar el material genetico que codifica el anticuerpo anti-Nuclear-1 o su fragmento o analizar las secuencias peptidicas del anticuerpo anti-Nuclear-1 o sus fragmentos.

35 Se describe el ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal de anticuerpo anti-Nuclear-1 o un fragmento del mismo.

Se describe la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o su fragmento.

Se describe un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composicion de anticuerpos o suero policlonal, el anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o al menos un fragmento del mismo.

40 Se describe un anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o fragmentos del mismo.

Se describe una célula que produce un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composicion de anticuerpos o al menos un fragmento del mismo.

Se describe un anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o el fragmento del mismo que es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano de un raton transgénico.

45 Se describe la célula que produce un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composicion de anticuerpos, el anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o al menos un fragmento del mismo como se describió anteriormente.

Dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 en el sentido de la invención puede ser cualquier anticuerpo inducible en un ser humano o un animal que reconozca el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, preferiblemente aquellos anticuerpos que son anticuerpos Nuclear-1 específicos con los criterios de unión o especificidad descritos en las definiciones o en otra parte en este documento, siendo más preferidos en este documento aquellos anticuerpos que se unen a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y se unen al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA y no a cualquiera de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2 # y que se unen a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une a al menos una célula tumoral como NM-D4, NM-F9 o ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato, e incluso más preferido es un anticuerpo tal que se une a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no se une al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA y no a ninguna de las construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se unen al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato.

Dicha composición de anticuerpo anti-Nuclear-1 en el sentido de la invención puede ser cualquier mezcla inducible de anticuerpos en un ser humano o un animal que reconozca el antígeno Nuclear-1 y/o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1. Dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 o composición de anticuerpos en el sentido de la invención puede ser un anticuerpo único o una mezcla de anticuerpos, tal como, entre otros, un anticuerpo monoclonal, una mezcla de anticuerpos monoclonales, una mezcla de anticuerpos policlonales, como un suero de anticuerpos o una fracción del mismo, o una mezcla de al menos un anticuerpo monoclonal con una mezcla de anticuerpos policlonales. Dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 o composición de anticuerpo puede ser o comprender cualquier formato de anticuerpo inducible tal como IgG, IgM, IgA, IgE, IgD o cualquier fragmento derivado del mismo por tecnologías conocidas por los expertos en la técnica, tales como, entre otros, Fab, F(ab)₂, anticuerpos de cadena única, anticuerpos de dominio único, multicuerpos, proteínas de fusión de anticuerpos, anticuerpos o anticuerpos biespecíficos y anticuerpos humanizados o quimerizados.

Los anticuerpos anti-Nuclear-1 o composiciones de anticuerpos generados por los métodos descritos tienen ventajas sobre los anticuerpos específicos del Nuclear-1 disponibles actualmente o anticuerpos específicos del Nuclear-1 en composiciones de anticuerpos que son al menos una de las siguientes características:

Se pueden obtener anticuerpos anti-Nuclear-1 que

(i) tienen un formato de anticuerpo diferente de IgM

(ii) se pueden generar o aislar más rápidamente

(iii) se pueden generar en mayores cantidades

(iv) reconocen más casos de tumores

(v) tienen una afinidad mayor

(vi) muestran señales de unión más altas en pruebas inmunes, como ELISA, inmunotransferencia Western, citometría de flujo, histoquímica inmune o inmunocitoquímica

(vii) tienen una actividad ADCC contra al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1

(viii) inhiben el crecimiento o la proliferación celular en al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 cuando se incubaba con cantidades adecuadas del anticuerpo

(ix) inducen la muerte celular, como la apoptosis en al menos una de las células tumorales positivas al Nuclear-1 incubadas con cantidades adecuadas del anticuerpo

(x) son IgG.

Se pueden obtener composiciones de anticuerpos anti-Nuclear-1 que

(i) comprenden anticuerpos contra el Nuclear-1 con un formato de anticuerpo diferente de IgM

(ii) comprenden anticuerpos IgG contra el Nuclear-1

(iii) comprenden anticuerpos IgG como una importante fracción anti-Nuclear-1 de los anticuerpos

(iv) comprenden mayores cantidades de anticuerpos que reconocen el antígeno Nuclear-1 o una célula tumoral positiva al Nuclear-1

(v) comprenden títulos más altos de anticuerpos anti-Nuclear-1

(vi) muestran señales de unión más altas en pruebas inmunes, como ELISA, inmunotransferencia Western, citometría de flujo, histoquímica inmune, inmunocitoquímica o inmunofluorescencia

(vii) tienen una afinidad mayor

(viii) tiene una actividad ADCC contra al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1

(ix) inhibe el crecimiento o la proliferación celular en al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 cuando se incuba con cantidades adecuadas del anticuerpo

5 (x) induce la muerte celular como la apoptosis en al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 incubada con cantidades adecuadas de anticuerpo

Son preferidos aquellos anticuerpos anti-Nuclear-1 o composiciones de anticuerpos que muestran al menos dos, más preferidos aquellos que muestran al menos tres, más preferidos que muestran al menos cuatro, más preferidos que muestran al menos cinco, más preferidos aquellos que muestran en al menos seis, más preferidos aquellos que muestran al menos siete, más preferidos aquellos que muestran al menos ocho, más preferidos aquellos que muestran al menos nueve, más preferidos aquellos que muestran todas las características anteriores.

10

En una realización preferida, el anticuerpo anti-Nuclear-1 es un anticuerpo monoclonal.

En una realización preferida, la mezcla de anticuerpos anti-Nuclear-1 es un antisuero policlonal.

15

Cualquier animal o humano puede ponerse en contacto con el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o una fracción del mismo, se prefieren seres humanos y ratones, ratas, conejos, cabras, camellos, pollos, hámsteres, cobayas o monos, incluso más preferidos son animales que son conocidos por los expertos en la técnica que son particularmente adecuados para generar una respuesta de anticuerpos tal como, entre otros, conejos, cabras, ratas, seres humanos, chimpancés y ratones para sueros de anticuerpos policlonales y aquellos conocidos porque los expertos en la técnica por ser particularmente adecuados para generar anticuerpos monoclonales tales como, entre otros, ratones, ratas, seres humanos, se prefieren adicionalmente ratones transgénicos que portan al menos partes de los genes de anticuerpos humanos y seres humanos.

20

25

Ponerse en contacto significa cualquier método o vía de administración descrita en otra parte del presente documento para administrar el nutracéutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o su fracción, que sea capaz de inducir una respuesta humoral contra el Nuclear-1. Se pueden usar adyuvantes adicionales para aumentar la inmunogenicidad que son conocidos por los expertos en la técnica. Se prefiere la administración oral y sistémica y, dentro de esta última, la administración intravascular, la intradérmica o subcutánea e incluso más la intraperitoneal.

30

La inducción de la respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 puede probarse en las pruebas de respuesta inmune humoral de la invención y al menos una de las pruebas de respuesta inmune humoral 1 a 6 tiene que ser positiva como se describe en otra parte del presente documento, por lo que en una realización preferida dichos anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces también incluyen aquellos que se obtienen de las células productoras de anticuerpos contra el Nuclear-1, como las células B, o las células B inmortalizadas, o las células que expresan de forma recombinante los anticuerpos Nuclear-1. Estos anticuerpos pueden obtenerse en una variedad de formas conocidas por los expertos en la técnica, en una realización preferida sueros de sangre, o fracciones de un suero, o un suero o una fracción de un suero que se preabsorbió contra antígenos adecuados, como microbios antígenos negativos al Nuclear-1, preferiblemente microorganismos negativos al Nuclear-1, o anticuerpos de una célula productora de anticuerpos como los descritos anteriormente en forma de sobrenadantes de células enteras o fraccionadas o anticuerpos purificados se usan como dichos anticuerpos obtenidos del suero, plasma o heces en al menos una de las pruebas inmunes humorales 1 a 6.

35

40

En una realización preferida, el anticuerpo anti-Nuclear-1 o la composición de anticuerpos o el suero policlonal, el anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o al menos un fragmento del mismo es positivo en al menos cinco pruebas de respuesta inmune humoral fuera de la prueba de respuesta inmune humoral 1 a 6.

45

En una realización preferida adicional, el anticuerpo anti-Nuclear-1 o la composición de anticuerpos o el suero policlonal, el anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o al menos uno de sus fragmentos es preferiblemente positivo para las pruebas de respuesta inmune humoral 1 y 3, y más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3, y más preferiblemente para prueba de respuesta inmune humoral 1, 2, 3 y 4, y más preferiblemente positiva para prueba inmune humoral 5 y más preferiblemente positiva para prueba inmune humoral 6.

50

En una realización preferida adicional, el anticuerpo anti-Nuclear-1 o la composición de anticuerpos o suero policlonal, el anticuerpo monoclonal anti-Nuclear-1 o al menos uno de sus fragmentos se une a TFA-PAA y menos o no a TFB-PAA y no a cualquiera de las sustancias enumeradas en #list 2# y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato, y que es o que se origina a partir de una IgG.

55

En una realización preferida, el anticuerpo anti-Nuclear-1 es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que es Nuclear-1 específicamente unido a TFA-PAA y menor o no a TFB-PAA y no a ninguna de las sustancias enumeradas en la #lista 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato, y que es o se origina a partir de

una IgG, más preferiblemente el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano de un ratón transgénico o un humano, lo más preferiblemente el anticuerpo muestra una actividad ADCC contra células tumorales positivas al Nuclear-1.

Los expertos en la técnica pueden usar los métodos descritos para su propósito y pueden seleccionar y adoptar condiciones adecuadas para lograr los propósitos descritos. Los expertos en la materia pueden, por ejemplo, seleccionar animales o seres humanos adecuados y las condiciones de inmunización, seleccionar células adecuadas e inmortalizar células, analizar la secuencia peptídica o el ADN que codifica la secuencia peptídica de un anticuerpo o fragmento o parte de ella, para seleccionar formatos de anticuerpos adecuados o fragmentos y para generar vectores adecuados para la transfección recombinante de células, para seleccionar y transformar de forma estable o transitoria células adecuadas para la producción de anticuerpos, para seleccionar y hacer crecer las células o el clon celular y aislar y purificar anticuerpos o fragmentos de los mismos.

En otra realización, pueden generarse anticuerpos anti-Nuclear-1 utilizando al menos uno de los microorganismos positivos al Nuclear-1 o fragmentos de los mismos para aislar un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una mezcla de anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos usando tecnologías como la presentación de fagos o la presentación de ribosomas.

En otra realización, un método para la generación de un anticuerpo anti-Nuclear-1 o composición de anticuerpo comprende,

a.) poner en contacto el nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo con una biblioteca de fagos de anticuerpos (por ejemplo, bibliotecas basadas en fagémidos o vectores de fagos) o una biblioteca de presentación ribosomal de anticuerpos derivada de humanos o animales o anticuerpo quimérico

b.) aislar dicho anticuerpo anti-Nuclear-1 o composición de anticuerpo por su unión a dicho nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo.

En una realización preferida, se utilizan las bibliotecas de anticuerpos sintéticos de genes de anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o animales. En una realización más preferida, las bibliotecas se construyen a partir del repertorio de al menos un animal y/o un ser humano que se inmunizó mediante el nutraceutico, la composición farmacéutica, el microorganismo y/o fracción positivos al Nuclear-1. Los expertos en la materia saben cómo construir estas bibliotecas y usar esas bibliotecas para generar o seleccionar anticuerpos específicos.

En los ejemplos se describen realizaciones preferidas de la invención.

H) Generación de células dendríticas, células T, clones de células T y líneas de células T específicas del Nuclear-1

Sorprendentemente, los microorganismos positivos provistos del Nuclear-1 también fueron capaces de activar células T humanas de una manera específica del Nuclear-1 cuando fueron presentadas por células dendríticas humanas (in vitro). No hay reportes que documenten una respuesta inmunitaria celular y, especialmente, una respuesta inmunitaria celular citotóxica contra un antígeno tumoral de carbohidratos y, especialmente, un pequeño carbohidrato no cargado como Nuclear-1. Tampoco hay reportes de presentación de antígenos de carbohidratos de tumores humanos en células dendríticas humanas, los reguladores clave del sistema inmunológico, y especialmente no de estructuras de carbohidratos humanos que se originan a partir de microorganismos. En contraste, la opinión científica general es que los humanos no desarrollan una respuesta inmune celular específica de carbohidratos y, especialmente, no contra antígenos tumorales de carbohidratos. Los microorganismos positivos al Nuclear-1 fueron procesados y presentados por células dendríticas humanas y esas células dendríticas cargadas respectivamente podrían usarse para activar células T primarias humanas específicamente contra el Nuclear-1. Las células T generadas por la sensibilización con lisados de bacterias positivas al Nuclear-1 mostraron fuertes respuestas inmunes después de la reestimulación con lisados de células tumorales humanas positivas en Nuclear-1 como se documenta en la secreción de citoquinas que documentan la respuesta específica de las células T y especialmente la respuesta de las células T citotóxicas.

Es sorprendente que sea posible cargar células dendríticas humanas con un microorganismo positivo al Nuclear-1 o con moléculas portadoras del Nuclear-1 en general y lograr una activación específica del Nuclear-1 de células T humanas. Es aun más sorprendente que las células inmunitarias activadas por células dendríticas humanas cargadas con dichos microorganismos positivos al Nuclear-1 puedan activarse o reestimularse aun más utilizando células dendríticas humanas cargadas con las moléculas portadoras del Nuclear-1 como los lisados de NM-D4 o NM-F9 o asialoglicoforina que muestra que (i) las células T específicas para el Nuclear-1 pueden ser activadas por el microorganismo positivo al Nuclear-1, y que (ii) esta respuesta inmune comprende células T específicas para el Nuclear-1 que pueden activarse o reestimularse aun más mediante DC cargadas con Nuclear-1 moléculas portadoras. Además, es sorprendente que la estructura del Nuclear-1 pueda detectarse mediante anticuerpos específicos del Núcleo en DC cargados con microorganismos positivos al Nuclear-1, así como en DC cargados con asialoglicoforina. Es sorprendente además que no solo la secreción de GM-CSF y la proliferación de células T se pueden inducir potentemente utilizando el microorganismo positivo al Nuclear-1, sino también la secreción de INFgamma (interferón gamma) y aun más sorprendente TNFalfa (factor de necrosis tumoral alfa) que muestra la

activación de las células T citotóxicas específicas del Nuclear-1. Es sorprendente además que las células T específicas del Nuclear-1 puedan reestimularse, preferiblemente durante al menos 4 veces in vitro, lo que indica una respuesta inmune celular fuerte y específica contra el antígeno tumoral y el tumor mediado por las células T. Estas respuestas inmunitarias son una prueba para los expertos en la técnica de que el microorganismo positivo al Nuclear-1 es capaz de inducir una potente respuesta inmunitaria celular anti-Nuclear-1 en humanos.

Un método para la generación de una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 comprende poner en contacto una cantidad adecuada de una célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de células que comprende al menos una célula dendrítica con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1, lisado o fracción del mismo, como se describe en otra parte en el presente documento, o una molécula portadora del Nuclear-1 o célula tumoral positiva al Nuclear-1, lisado o fracción, durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para generar al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1.

La invención proporciona un método para la generación de una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 que comprende poner en contacto una cantidad adecuada de una célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de células que comprende al menos una célula dendrítica con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo, lisado o fracción del positivo al Nuclear-1, como se describe en otra parte del presente documento durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para generar al menos una célula dendrítica funcional cargada con Nuclear-1; en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es del género Bacteroides y es reconocido y, por lo tanto, reconocido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 en contacto, en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 es sensible al peryodato que muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato

Un método para la generación de una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 comprende poner en contacto una cantidad adecuada de una célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas o una mezcla de células que comprende al menos una célula dendrítica con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora del Nuclear-1 o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, lisado o fracción de la misma, como se describe en otra parte en este documento, durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para generar al menos una célula dendrítica funcional cargada con Nuclear-1.

Dicha célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 es una célula dendrítica o una mezcla de células dendríticas que activa al menos una célula T contra el Nuclear-1 que puede probarse preferentemente mediante una prueba de respuesta inmune celular de la invención y es positiva contra el Nuclear-1 en al menos una de las pruebas de respuesta inmune celular descritas en otra parte del presente documento. En una realización preferida, la célula dendrítica funcional presenta el Nuclear-1 en su superficie y puede ser detectada por un anticuerpo específico del Nuclear-1 como se describe, por ejemplo, en la prueba de respuesta inmune celular 4. En una realización preferida de la invención, la función dendrítica funcional la célula contra el Nuclear-1 se obtuvo al poner en contacto una célula dendrítica inmadura o una mezcla de células dendríticas inmaduras o una mezcla de células dendríticas que comprenden al menos una célula dendrítica inmadura con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1, lisado, o una fracción de la misma, como se describe en otra parte en el presente documento por un tiempo adecuado y bajo condiciones adecuadas para madurar dicha célula dendrítica usando condiciones adecuadas como se describe en otra parte en este documento y como es conocido por los expertos en la técnica, que comprende, por ejemplo, las moléculas TNFalfa (factor de necrosis tumoral alfa) LPS (Lipopolisacárido) o BCG (Bacille Calmette Guerin), INFgamma (interferón gamma), dexametasona y/o TGFbeta (factor de crecimiento transformante beta), a una célula dendrítica funcional cargada con Nuclear-1. En una realización preferida de la invención, la célula dendrítica se deriva de MUTZ-3 o NemoDC (que se puede obtener de Glycotope GmbH Berlin, Alemania; www.glycotope.com), y otras células dendríticas inmaduras preferidas se generaron a partir de células MUTZ-3 o NemoDC bajo las condiciones adecuadas que comprenden el uso de IL-4 y GM-CSF por lo general durante aproximadamente una semana, las células dendríticas inmaduras resultantes o iNMDc se ponen en contacto con dicha cantidad adecuada de al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1, lisado o fracción del mismo. se maduran utilizando condiciones adecuadas que comprenden, por ejemplo, TNFalfa, LPS, BCG, INFgamma, dexametasona o TGFbeta, preferiblemente TNFalfa, típicamente durante aproximadamente uno a dos días, lo que da como resultado células dendríticas maduras cargadas con Nuclear-1 que corresponden a dicha célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1.

En los ejemplos se describen realizaciones preferidas de la invención.

La invención proporciona un método para la generación de una célula T activada o células T contra el Nuclear-1 que comprende

(a) poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas funcionales o una mezcla de células que contengan al menos una célula dendrítica funcional, cargadas con cantidades adecuadas del microorganismo, lisado o fracción positiva al Nuclear-1 con al menos una célula T o células T

(b) el cultivo de dicha célula T o células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra el Nuclear-1.

Un método para la generación de una célula T activada o células T contra el Nuclear-1 comprende

(a) poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas funcionales o una mezcla de células que contengan al menos una célula dendrítica funcional cargada con cantidades adecuadas de una molécula portadora del Nuclear-1 o célula tumoral positiva para el Nuclear-1, lisado o fracción de la misma con una célula T o células T o una mezcla de células que contienen al menos una célula T

(b) cultivo de dicha célula T o células T o mezcla de células que contengan al menos una célula T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra Nuclear- 1.

En una realización preferida, un método para la generación de una célula T activada o células T contra el Nuclear-1 comprende

(a) poner en contacto cantidades adecuadas de células dendríticas funcionales cargadas con cantidades adecuadas del microorganismo, lisado o fracción positiva al Nuclear-1 con una célula T o células T

(b) cultivo de dichas células T o células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra el Nuclear-1

(c) agregar células dendríticas funcionales cargadas con una molécula portadora del Nuclear-1 o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación

(d) cultivo para tiempos y condiciones apropiados.

En una realización preferida, un método para la generación de una célula T activada o células T contra el Nuclear-1 comprende

a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo, lisado o fracción del mismo positivo al Nuclear-1 con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprenden al menos una célula T

b) cultivar dicha célula T o mezcla de células T o mezcla de células que comprende al menos una célula T con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra el Nuclear-1.

En una realización preferida, un método para la generación de una célula T activada o células T contra el Nuclear-1 comprende

a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora del Nuclear-1 o una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, un lisado o una fracción de la misma con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprende al menos una célula T

b) cultivar dicha célula T o mezcla de células T o mezcla de células que comprende al menos una célula T con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en condiciones adecuadas para activar o cebar una célula T o células T contra el Nuclear-1.

En otra realización preferida, un método para la generación de una célula T activada o células T contra el Nuclear-1 comprende los pasos (a) y (b) de los métodos anteriores y, posteriormente, comprende:

(c) agregar una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora de Nuclear-1 o célula tumoral positiva al Nuclear-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación;

o agregar una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo, lisado o fracción del mismo positivo al Nuclear-1 para la reestimulación; y

(d) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada

En otra realización preferida, un método para la generación de una línea de células T contra el Nuclear-1 comprende los pasos (a), (b), (c) y (d) del método anterior

y posteriormente comprende al menos una ronda adicional de reestimulación, por lo que una ronda de reestimulación comprende las etapas (e) y (f) o las etapas (g) y (h), con

(e) agregar una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos una molécula portadora del Nuclear-1 o célula tumoral positiva para el Nuclear-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación;

(f) el cultivo por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada y

(g) agregar una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con una cantidad adecuada de al menos un microorganismo, lisado o fracción del mismo positivo al Nuclear-1 para la reestimulación

(h) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada

5 En una realización preferida adicional, un método para la generación de una línea de células T contra el Nuclear-1 comprende además dos rondas adicionales de dicha ronda de reestimulación. En una realización más preferida, un método para la generación de una línea de células T contra el Nuclear-1 comprende tres rondas adicionales de dicha ronda de reestimulación. En una realización aun más preferida, un método para la generación de una línea de células T contra el Nuclear-1 comprende cinco rondas adicionales de dicha ronda de reestimulación.

10 En una realización preferida adicional del método para la generación de un clon de células T contra el Nuclear-1, se realiza una etapa adicional de clonación de las células al menos antes de una ronda de dichas rondas de reestimulación.

15 En una realización preferida, las células T activadas o las células T son una línea de células T contra el Nuclear-1, por lo que preferiblemente (c) y (d) que corresponden a una ronda de reestimulación se realiza dos veces, más preferiblemente tres veces, más preferiblemente 4 veces, y lo más preferiblemente una línea de células T para las que se realizan más de 4 rondas de reestimulación.

20 En una realización preferida, las células T activadas o células T son un clon de células T contra el Nuclear-1, por lo que preferiblemente (c) y (d) que corresponden a una ronda de reestimulación se realiza dos veces, más preferiblemente tres veces, más preferiblemente 4 veces, y lo más preferiblemente una línea de células T para las que se realizan más de 4 rondas de reestimulación, y las células se clonan al menos una vez, por ejemplo mediante dilución de una sola célula, antes de la reestimulación.

En una realización preferida adicional del método para la generación de un clon de células T contra el Nuclear-1, dicha célula dendrítica funcional es una célula dendrítica madura.

25 En una realización preferida adicional del método para la generación de un clon de células T contra el Nuclear-1, dichas células dendríticas funcionales y las células T o células T son células humanas.

30 En una realización preferida adicional del método para la generación de una célula T activada, una línea de células T o un clon de células T contra el Nuclear-1, dicha célula dendrítica funcional deriva de MUTZ-3 [Solicitudes de Patente 10139428.4 (DE), PCT/EP02/09260, 02758474.7 (EP), US10/486,966, CA2,457,287, DE10139428A1, WO2003/023023A1, EP01419240, US20040265998, CA2457287] tal como Nemod-DC (que se puede obtener de Glycotope en Berlín, Alemania, www.glycotope.com).

En una realización preferida adicional del método para la generación de una célula T activada, una línea de células T o un clon de células T contra el Nuclear-1, dicha célula dendrítica funcional y las células T o células T se combinan en al menos una molécula de clase MHC.

35 En una realización preferida, un método para la generación de una célula T activada, células T, clon de células T o línea de células T contra el Nuclear-1 comprende

a. poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 como se describe en otra parte de este documento con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprende al menos una célula T; y

40 b. cultivo de dicha célula T o mezcla de células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en una condición adecuada para activar o cebar una célula T o células T contra el Nuclear-1.

En una realización preferida, un método para la generación de una célula T activada, células T, clon de células T o línea de células T contra el Nuclear-1, comprende cualquiera

45 a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 cargada con dicho microorganismo, lisado o fracción del mismo positivo al Nuclear-1, con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprenden al menos una célula T; y

b) cultivo de dicha célula T o mezcla de células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en una condición adecuada para activar o cebar una célula T o células T contra el Nuclear-1; y

50 c) agregar una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con dicha molécula portadora del Nuclear-1 o célula tumoral positiva para el Nuclear-1, lisado o fracción de la misma para la reestimulación; y

d) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada;

o

- a) poner en contacto una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 cargada con dicha molécula portadora del Nuclear-1 o célula tumoral positiva al Nuclear-1, lisado o fracción del mismo con una cantidad adecuada de al menos una célula T o una mezcla de células T o una mezcla de células que comprende al menos una célula T; y
- b) cultivo de dicha célula T o mezcla de células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas durante un tiempo adecuado en una condición adecuada para activar o cebar una célula T o células T contra el Nuclear-1; y
- c) agregar una cantidad adecuada de al menos una célula dendrítica funcional cargada con dicho microorganismo, lisado o fracción positiva al Nuclear-1 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la reestimulación; y
- d) cultivar por un tiempo apropiado y bajo una condición apropiada.

En los ejemplos se describen realizaciones preferidas de la invención.

Se describen las células T activadas o las células T contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular las células T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1 o el clon de células T contra el Nuclear-1 como se describió anteriormente.

- Las células T activadas o las células T contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular células T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1 o el clon de células T contra el Nuclear-1 como se describe anteriormente que comprende al menos una célula auxiliar CD4+ contra el Nuclear-1.

- Las células T activadas o las células T contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular células T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1, o el clon de células T contra el Nuclear-1 como se describe anteriormente que comprende al menos una célula T citotóxica contra el Nuclear-1.

Las células T activadas o las células T contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular al menos una célula T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1 o el clon de células T contra el Nuclear-1 como se describe anteriormente que mata al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 o que secreta moléculas que median la destrucción de al menos una célula tumoral.

- Las células T activadas o las células T contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular las células T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1 o el clon de células T contra el Nuclear-1 que destruyen al menos un positivo al Nuclear-1 las células tumorales o las moléculas secretoras que median la destrucción de al menos una célula tumoral significa que dichas células T o células citotóxicas contra el Nuclear-1 destruyen una célula tumoral positiva para el Nuclear-1 que puede determinarse mediante el uso de la prueba de respuesta inmune celular según se describe en otra parte aquí, la medición de la secreción de INFgamma o TNFalfa o mediante una prueba de citotoxicidad (como la prueba de respuesta inmunitaria celular 5) en la que al menos una célula tumoral positiva marcada con Nuclear-1 es lisada por dichas células T, principalmente conocidas por los expertos en la técnica mediante el uso de las células T de la invención, por ejemplo, la respuesta CTL o Th1 o mediante la inducción de una respuesta auxiliar CD4 T específica que media la activación de respuestas inmunitarias humores y celulares acordes que dan como resultado la muerte de al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1.

Un método para tratar a un paciente con cáncer comprende la administración de cualquiera de las células T o células T activadas contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular al menos una célula T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1, o el clon de células T contra el Nuclear-1 como se describió anteriormente o una composición que los comprende.

- Un método para tratar a un paciente con cáncer comprende la administración de una cantidad adecuada de al menos una de las células dendríticas funcionales contra el Nuclear-1 como se describe anteriormente o una composición que las comprende.

En una realización preferida del método para tratar a un paciente con cáncer, el paciente tiene o tuvo una célula cancerosa positiva para el Nuclear-1.

- En una realización más preferida del método para tratar a un paciente con cáncer, la célula dendrítica funcional es autóloga. En otra realización preferida del método para tratar a un paciente con cáncer, la célula dendrítica funcional es el originador alogénico de un donante.

En una realización preferida del método para tratar a un paciente con cáncer, la célula dendrítica funcional se deriva de MUTZ-3.

- En una realización preferida del método para tratar a un paciente con cáncer, las células dendríticas funcionales comparten al menos una molécula de clase MHC con dicho paciente.

Un método para tratar a un paciente con cáncer comprende la administración de cualquiera de las células T activadas o células T contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular al menos una célula T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1, o el clon de células T contra el Nuclear-1 descrito en otra parte en este documento o una composición que comprende al menos uno de esos.

- 5 Un método para tratar a un paciente con cáncer comprende la administración de una cantidad adecuada de al menos una de las células dendríticas funcionales contra el Nuclear-1 descrito en otra parte en el presente documento o una composición que las comprende.

En una realización preferida, al menos uno de dichos métodos se usa para un paciente que tiene o tuvo una célula cancerosa positiva para el Nuclear-1 que es detectable por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 y en su realización preferida descrita en otra parte en este documento. Más preferidos son dichos métodos en los que la célula dendrítica funcional es autóloga, Más preferiblemente, en la que la célula dendrítica funcional es alogénica, se prefiere aun más cuando la célula dendrítica funcional se origina en un donante, incluso más preferida cuando la célula dendrítica funcional deriva de MUTZ-3, aun más preferido cuando cualquiera de las células dendríticas funcionales descritas comparte al menos una molécula de clase MHC con el individuo al que se administra.

- 10 Los expertos en la técnica pueden realizar la tarea descrita utilizando los métodos y el material descritos en este documento. Pueden determinar las mejores condiciones para obtener esas células dendríticas funcionales o células T, la mejor vía de administración y/o las composiciones adecuadas que las comprenden y/o se describen con más detalle en realizaciones preferidas para la generación y uso en las Solicitudes de Patente DE10139428A1, WO2003/023023A1, EP01419240, US20040265998, CA2457287.

- 15 Dichas células T activadas o células T contra el Nuclear-1 significa que las células T, células T o células generadas que comprenden células T son positivas para al menos una de las pruebas de inmunidad celular de la invención, preferiblemente para dos, más preferiblemente para tres y más preferiblemente para todos los 4. Preferiblemente, comprenden al menos una célula auxiliar CD4+, e incluso más preferiblemente al menos una célula T citotóxica capaz de destruir al menos una célula tumoral positiva para el Nuclear-1.

- 20 Dichas células T o células T utilizadas para poner en contacto son al menos una célula T CD4+ y/o CD8+ que se aisló o enriqueció antes por métodos estándar o es una composición celular que comprende al menos una CD4+ y/o Células T CD8+.

Dicho lisado puede ser cualquier lisado de un microorganismo positivo Nuclear-1 o de una célula tumoral positiva para el Nuclear-1, respectivamente, como, por ejemplo, pero no limitándose a un lisado generado por congelación-descongelación repetitiva, por sonicación, por fuerza mecánica o por inducción de la temperatura.

- 30

Para detalles sobre la generación de células T específicas para el Nuclear-1, véase el ejemplo 12.

Una célula dendrítica funcional es una célula que puede activar una célula T. La activación de una célula T significa la estimulación de la proliferación y/o la conversión de una célula T a una célula T activa. Una célula T activa secreta moléculas que inducen o ayudan a una respuesta inmunitaria contra el Nuclear-1 diana o células tumorales que portan Nuclear-1, preferiblemente aquellas células T citotóxicas que median la destrucción de una célula tumoral positiva para el Nuclear-1.

- 35

En una realización preferida, dicha célula dendrítica funcional es una célula dendrítica madura. Más preferiblemente, el precursor de células dendríticas a partir del cual se deriva la célula madura se obtiene de un humano, más preferiblemente de un humano del que también se obtuvieron las células T o las células T o que están emparejadas en al menos una molécula de clase MHC. En una realización más preferida, la célula dendrítica funcional se deriva de MUTZ-3, e incluso se prefiere que las células MUTZ-3 o las células derivadas de la misma se diferenciaran utilizando IL-4 y GM-CSF, cargadas con cantidades apropiadas del microorganismo positivo Nuclear-1, lisado o fracción del mismo o la molécula portadora de Nuclear-1 o célula tumoral positiva para el Nuclear-1, lisado o fracción del mismo, y maduró adicionalmente utilizando, por ejemplo, cantidades adecuadas de TNF-alfa para madurar células dendríticas que corresponden a las células dendríticas funcionales de la invención. En una realización aun más preferida, se usan células dendríticas funcionales cargadas junto con PBMC (células mononucleares de sangre periférica) emparejadas al menos en MHC de clase I (HLA-A2) y (HLA-B44).

- 40

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

- 50

- 55

En otra realización preferida, se usan células dendríticas diferentes o células dendríticas funcionales de diferentes fuentes, tales como células dendríticas derivadas de MUTZ-3 y derivadas de donantes de un ser humano, para los diferentes pasos de cebado y reestimulación. Los expertos en la técnica pueden seleccionar la mejor combinación.

5 La generación exitosa de una célula T, células T o composiciones celulares que comprenden una célula T, células T, células CD4+ y/o CD8+ T contra el Nuclear-1 se puede probar utilizando al menos una prueba de respuesta inmune celular como se describe aquí. Otros detalles se describen en este documento. Preferiblemente, al menos dos pruebas de respuesta inmune celular son positivas, más preferiblemente tres, más preferiblemente cuatro y más preferiblemente las cinco.

10 La descripción usada aquí para las células dendríticas, su uso y las condiciones adecuadas y las moléculas para su uso también es válida para las pruebas de respuesta inmune celular descritas en otra parte en este documento y viceversa y será válida para todas las demás partes de la invención.

Se describe una célula T activada contra el Nuclear-1.

Se describen las células T que comprenden al menos una célula T activada contra el Nuclear-1.

Se describe una línea de células T contra el Nuclear-1 y un clon de células T contra el Nuclear-1.

15 En una realización preferida, la línea de células T o el clon de células T se generó usando células dendríticas funcionales derivadas de MUTZ-3 cargadas con el microorganismo positivo al Nuclear-1, lisado o fracción del mismo en combinación con al menos una ronda de reestimulación con MUTZ-3 células dendríticas funcionales derivadas cargadas con al menos una molécula portadora del Nuclear-1 o célula tumoral positiva para el Nuclear-1, lisado o fracción del mismo de un donante, y aun más preferido de un paciente con tumor, y aun más preferido de un
20 paciente con tumor cuyo tumor es positivo para la unión con un anticuerpo específico Nuclear-1.

Un método para generar al menos una célula T activada para uso como terapia tumoral comprende administrar las células T activadas contra células tumorales positivas al Nuclear-1 en un paciente.

25 En una realización preferida, las células dendríticas funcionales contra el Nuclear-1, las células T activadas o las células T contra el Nuclear-1, comprendiendo la composición celular las células T contra el Nuclear-1, la línea de células T contra el Nuclear-1 o el clon de células T contra el Nuclear-1 producido por un método como se describe anteriormente, induce una respuesta inmune humoral y/o celular contra células y/o enfermedades positivas al Nuclear-1.

30 En otra realización preferida, la formulación y/o de la célula dendrítica funcional y/o de la célula T activada, las células T, el clon de la célula T o la línea de la célula T como se describe anteriormente se usa para fabricar un medicamento y/o un nutraceutico para la profilaxis o la terapia de un tumor mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia.

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

I) Kits

35 Un kit para inducir una respuesta inmune humoral y/o celular específica en un ser humano o animal contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o las células tumorales positivas al Nuclear-1, como se describe en este documento, comprende el nutraceutico o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción de los mismos o formulaciones que los comprenden, que se describen en otra parte del presente documento, y una información sobre el uso del kit.

40 En una realización más preferida, dicha respuesta inmune específica del Nuclear-1 funciona como un escudo contra las células cancerosas positivas del Nuclear-1.

Un kit para reducir o prevenir la aparición de una enfermedad positiva para el Nuclear-1 o un tumor, preferiblemente un tumor positivo al Nuclear-1, comprende el nutraceutico, la formulación farmacéutica, el microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción de los mismos o las formulaciones de los mismos que se describen en otra parte del presente documento, o las formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

45 Un kit para reducir o prevenir la propagación de una enfermedad o metástasis positiva al Nuclear-1 de un tumor, preferiblemente de un tumor positivo al Nuclear-1, comprende la formulación nutraceutica o farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción de los mismos o las formulaciones de los mismos que se describen en otra parte del presente documento, o las formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

50 Un kit para tratar una enfermedad positiva al Nuclear-1 o un tumor, preferiblemente un tumor positivo al Nuclear-1, comprende el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo o las formulaciones del mismo que se describen en otro lugar aquí, o las formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

Un kit para la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales comprende el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo o las formulaciones del mismo que se describen en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

- 5 Un kit para fortalecer el sistema inmunológico o para mejorar una respuesta inmunitaria como se describe en otra parte del presente documento comprende el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo o las formulaciones del mismo que se describen en otra parte del presente documento, o formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

- 10 En una realización preferida, la formulación nutraceutica, o farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción de los mismos o las formulaciones comprendidas en los kits descritos anteriormente, comprenden al menos un microorganismo, lisado o fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1 unidos por Nemod-TF1 y/o A78-G/A7 y Nemod-TF2, preferiblemente de la cepa AG6 (DSM 18726), la cepa MU1 (DSM 18728), y/o la cepa LH2 (DSM 18727), y más preferiblemente de las cepas AG6 y/o MU1, más preferiblemente de la cepa AG6.

- 15 El kit puede incluir información (folleto de instrucciones, dirección de Internet) que explica cómo combinar los componentes del kit. Dicha información también puede estar relacionada con un esquema terapéutico.

- 20 Un kit para la determinación de la respuesta inmune contra el Nuclear-1 comprende al menos una de las pruebas de respuesta inmune descritas aquí contra el Nuclear-1, preferiblemente al menos dos, y más preferiblemente al menos una prueba de respuesta inmune humoral y celular, que comprende a al menos uno de los materiales descritos en la prueba de respuesta inmune correspondiente y una información sobre el uso del kit. En una realización preferida, el kit comprende adicionalmente controles de acuerdo, y más preferiblemente al menos uno de los nutraceuticos, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo o las formulaciones del mismo que se describen en otra parte del presente documento, o las formulaciones que los comprenden.

- 25 Un kit para generar un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composición de anticuerpos como se describe en otra parte del presente documento, comprende el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo o las formulaciones de los mismos que se describen en otra parte en el presente documento, o formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

Un kit para generar al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1, comprende el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo o las formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

- 30 En una realización preferida, el kit para generar al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1 comprende además células dendríticas inmaduras derivadas de una línea celular dendrítica tal como, entre otros, MUTZ-3 o Nemod-DC.

- 35 Un kit para generar al menos una célula T activada, células T, clon de células T o línea de células T contra el Nuclear-1, comprende el nutraceutico, o la formulación farmacéutica, o el microorganismo positivo al Nuclear-1, o la fracción del mismo o las formulaciones del mismo, o formulaciones que los comprenden, y una información sobre el uso del kit.

Un kit para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción de un microorganismo comprende al menos una molécula o estructura Nuclear-1, que comprende al menos un anticuerpo específico Nuclear-1 o un anticuerpo o una composición de anticuerpos y una información sobre el uso del kit.

- 40 Un kit para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción de un microorganismo comprende a menos una molécula o estructura Nuclear-1, que comprende al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 o un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composición de anticuerpos y una información sobre el uso del kit.

- 45 Un kit para identificar o aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción de un microorganismo comprende al menos una molécula o estructura Nuclear-1 o para identificar un microorganismo positivo al Nuclear-1 adecuado para su uso como componente para nutraceuticos y composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 o un anticuerpo anti-Nuclear-1 o una composición de anticuerpos y una información sobre el uso del kit.

En realizaciones preferidas, se usan los anticuerpos específicos preferidos del Nuclear-1 como se describen en otra parte en este documento, lo más preferiblemente Nemod-TF1, Nemod-TF2 y/o A78-G/A7.

- 50 En una realización preferida, el kit comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1, lisado o fracción del mismo como control positivo.

En los ejemplos se describen realizaciones preferidas.

Definiciones:

De acuerdo con la presente invención, el término "nutracéutico" significa cualquier nutriente, composición de nutrientes o formulación que puede ser ingerida por vía oral por un ser humano o animal tal como, entre otros, nutrientes, aditivos nutricionales, aditivos alimentarios, suplementos dietéticos, alimentos médicos, alimentos clínicos, alimentos parenterales, alimentos enterales, alimentos para dietas especiales, alimentos de uso específico para la salud o alimentos funcionales que pueden aplicarse por vía oral en diferentes formas, como cápsulas, tabletas, emulsiones, polvos, líquidos, entre otros, como en forma de cualquier alimento o bebida o como parte de ella. En casos especiales, el nutracéutico puede administrarse por vía parenteral (alimento parenteral). El nutracéutico puede administrarse solo o mezclado con al menos otro ingrediente. El nutracéutico solo o su mezcla con al menos otro ingrediente puede administrarse solo o mezclado en un alimento o una bebida. El término nutracéutico también significa cualquier alimento, bebida, cápsula, tableta, emulsión, polvo o líquido.

De acuerdo con la presente invención, el término "composición farmacéutica" significa cualquier composición que se puede usar como un fármaco, o un producto farmacéutico, o biológico, o es un componente de un fármaco o un producto farmacéutico o biológico.

De acuerdo con la presente invención, el término "Nuclear-1" significa la estructura de carbohidrato galactosa beta 1-3 unida a N-Acetil-galactosamina alfa - enlazada (Gal beta1-3GalNAc alfa1; TF alfa, TFa). En la proteína o polipéptido, el Nuclear-1 se une covalentemente a través de un enlace O-glicosídico a los aminoácidos de serina o treonina (Gal beta1-3GalNAc alfa1-O-Ser/Thr). El Nuclear-1 también se puede enlazar mediante varios enlazadores y varias densidades a portadores naturales o sintéticos, como la poliacrilamida (en este documento también se llama PAA), u otras moléculas como los materiales de lecho cromatográfico (por ejemplo, sefarosa), biotina o proteínas, como la albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (Ova), albúmina sérica humana (HSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH), toxinas, toxoides, perlas o nanopartículas. En el sentido de esta invención, el término Nuclear-1 significa también estructuras de mimetismo del Nuclear-1 tales como polipéptidos, péptidos, lípidos o carbohidratos o combinaciones de los mismos que tienen una estructura química diferente del Nuclear-1 pero que tienen una estructura conformacional que puede ser reconocida por los anticuerpos específicos del Nuclear-1 de la invención y, por lo tanto, son inmunológicamente idénticos a Nuclear-1. Por lo tanto, el término Nuclear-1 también comprende el Nuclear-1 en una configuración anomérica beta (ver también la Figura 19).

De acuerdo con la presente invención, el término "anticuerpo específico del Nuclear-1" significa particularmente cualquier anticuerpo que se une específicamente a Gal beta1-3GalNAc alfa1-PAA (TFa-PAA, TFalfa-PAA, Nuclear-1-PAA) pero no a ninguno de las sustancias de #list 1#.

#list 1#

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

Fucalfa1-2Gal β 1-3GalNAcalfa-PAA (H tipo 3)

GalNAcalfa1-3Gal β -PAA (A_{di})

Galalfa1-3-GalNAc β -PAA (T_{alfa β})

que se obtuvieron de Lectinity Holdings, Inc.

Alternativamente, todas las estructuras pueden ser generadas por un experto en la técnica, que también puede seleccionar 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 intermedios.

Un anticuerpo específico del Nuclear-1 es, por ejemplo

anticuerpo que se une a la asialoglicoforina (que lleva Nuclear-1) pero no a la glucoforina (que no lleva Nuclear-1), y esta unión es sensible al peryodato,

• más preferiblemente, cualquier anticuerpo que se una a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA (Gal beta1-3GalNAc beta1-PAA) pero no a ninguna de las sustancias de #list 2#:

Proteínas:

Glicoforina

BSA (albúmina de suero bovino)

PAA-conjugados:

Aminoglucitol

Ácido β -N-acetilneuramínico (ácido beta-N-acetilneuramínico)

- alfa-D-glucosa (alfa-D-glucosa)
- β -D-glucosa (beta-D-glucosa)
- alfa-D-galactosa (alfa-D-galactosa)
- β -D-galactosa (beta-D-galactosa)
- 5 alfa-D-manosa (alfa-D-manosa)
- alfa-D-manosa-6-fosfato (alfa-D-manosa-6-fosfato)
- alfa-L-fucosa (alfa-L-fucosa)
- β -N-acetil-D-glucosamina (beta-N-acetil-D-glucosamina)
- alfa-N-acetil-D-galactosamina (alfa-N-acetil-D-galactosamina, Tn, Tn)
- 10 β -D-galactosa-3-sulfato (beta-D-galactosa-3-sulfato)
- ácido alfa-N-acetilneuramínico (ácido alfa-N-acetilneuramínico)
- β -N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato (beta-N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato)
- Lac-di-NAc (GalNAc β 1-4GlcNAc β -, GalNAcbeta1-4GlcNAcbeta-)
- GlcNAc β 3Gal (GlcNAc β 1-3Gal β -, GlcNAcbeta1-3Galbeta-)
- 15 Gala4GlcNAc (Gala α 1-4GlcNAc β -, Galalfa1-4GlcNAcbeta)
- Maltosa
- Gal β 3Gal (Gal β 1-3Gal β -, Galbeta1-3Galbeta)
- Le^c (Gal β 1-3GlcNAc β -, Galbeta1-3GlcNAcbeta-)
- Lac (Gal β 1-4Glc β -, Galbeta1-4Glcbeta)
- 20 LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc β -, Galbeta1-4GlcNAcbeta-)
- Fuca3GlcNAc (Fuca α 1-3GlcNAc β -, Fucalfa1-3GlcNAcbeta-)
- Fuca4GlcNAc, (Fuca α 1-4GlcNAc β -, Fucalfa1-4GlcNAcbeta-)
- Fs-2 (GalNAc α 1-3GalNAc β -, GalNAcalfa1-3GalNAcbeta)
- Núcleo 5 (GalNAc α 1-3GalNAc α -, GalNAcalfa1-3GalNAcalfa-)
- 25 Talfaalfa Gal α 1-3GalNAc α -, Galalfa1-3GalNAcalfa-, Talfa alfa)
- Galalfa2Gal (Gal α 1-2Gal β -, Galalfa1-2Galbeta-, Gala2Gal)
- SiaTn (Neu5Ac α 2-6GalNAc α -, Neu5Acalfa2-6GalNAcalfa sTn)
- 3'-su-LacNAc (3'-O-su-LacNAc β -, 3'-O-su-LacNAcbeta-)
- 3'-su-Le^c (3'-O-su-Gal β 1-3GlcNAc β -, 3'-O-su-Galbeta1-3GlcNAcbeta)
- 30 melibiosa (Gala α 1-6Glc β -, Galalfa1-6Glcbeta-)
- (Sia)₂ (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α -, Neu5Acalfa2-8Neu5Acalfa)
- Gal2 β Gal (Gal β 1-2Gal β -, Galbeta1-2Galbeta-, Galbeta2Gal-)
- 6-O-su-LacNAc (Gal β 1-4(6-O-su)GlcNAc β -, Galbeta1-4(6-O-su)GlcNAcbeta-)
- A_{di} (GalNAc α 1-3Gal β -, GalNAcalfa1-3Galbeta-)
- 35 B_{di} (Gala α 1-3Gal β -, Galalfa1-3Galbeta)
- 6'-O-su-LacNAc (6'-su-LacNAc β -, 6'-su-LacNAcbeta-)
- H_{di} (Fuca α 1-2Gal β -, Fucalfa1-2Galbeta)

- 3'-O-su-TF (3'-O-su-Gal β 1-3GalNAc α -, 3'-O-su-Galbeta1-3GalNAcalfa-)
 di-GalNAc β (GalNAc β 1-3GalNAc β -, GalNAcbeta1-3GalNAcbeta)
 Núcleo 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α -, GlcNAcbeta1-3GalNAcalfa)
 Núcleo 6 (GlcNAc β 1-6GalNAc α -, GlcNAcbeta1-6GalNAcalfa)
- 5 GA1, GgOse3 (GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -, GalNAcbeta1-4Galbeta1-4Glcbeta)
 Gala1-3'Lac (Gala1-3Gal β 1-4Glc β -, Galalfa1-3Galbeta1-4Glcbeta)
 GlcNAc β 1-2'TF (GlcNAcbeta1-2Galbeta1-3GalNAcalfa-)
 Man₃ (Man α 1-6 Man α -Man α 1-3)
 3'SLN (Neu5Acalfa2-3Galbeta1-4GlcNAcbeta-)
- 10 Pk (Gb3, GbOse3, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -)
 Le^a (Fuc α 1-4 GlcNAc β Gal β 1-3)
 Le^d (H tipo 1, Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -)
 Le^x (Fuc α 1-3 GlcNAc β - Gal β 1-4)
 3'-SiaLe^c (Neu5Aca2-3Gal β 1-3GlcNAc β -)
- 15 H tipo 3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -)
 3'-SL (Neu5Aca2-3Gal β 1-4Glc β -)
 6'-SL (Neu5Aca2-6Gal β 1-4Glc β -)
 3'-O-su-Le^a (Fuc α 1-4 GlcNAc β -O-su-3Gal β 1-3)
 3'-O-su-Lex (Fucal-3 GlcNAc β - O-su-3Gal β 1-4)
- 20 Gala1-3'LacNAc (Gala1-3Gal β 1-4GlcNAc β -)
 (Sia)₃ (Neu5Aca2-8Neu5Aca2-8Neu5Aca2-)
 GlcNAc β 1-3'TF (GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -)
 A_{tri} (Fuc α 1-2 Gal β -GalNAc α 1-3)
 que se obtuvieron de Lectinity Holdings, Inc.
- 25 Alternativamente, todas las estructuras pueden ser generadas por un experto en la materia, que también puede seleccionar 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 intermedios
- 30 aun más preferiblemente un anticuerpo seleccionado de entre los siguientes anticuerpos: HB-T1 (IgM) [que se puede obtener de DakoCytomation GmbH, Hamburgo; Giuffré G, Vitarelli E, Tuccari G, Ponz de Leon M, Barresi G: detección de antígenos Tn, sialosil-Tn y T en el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis. Virchows Arch 429: 345-352 (1996)], HH8 (IgM) [Clausen H, Stroud M, Parker J, Springer G, Hakomori S: anticuerpos monoclonales dirigidos a la estructura asociada al grupo sanguíneo A, galactosil-A: especificidad y relación al antígeno de Thomsen-Friedenreich. Mol Immunol 25: 199-204 (1988)], A78-G/A7 [Glycotope GmbH, Berlin; Karsten U, Butschak G, Cao Y, Goletz S, Hanisch FG. Un nuevo anticuerpo monoclonal (A78-G/A7) para el antígeno pan-tumor de Thomsen-Friedenreich. Hybridoma 1995 Feb; 14(1): 37-44], Nemod-TF1 [Glycotope GmbH, Berlin; Goletz S, Cao Y, Danielczyk A, Ravn P, Schoeber U, Karsten U. El antígeno de Thomsen-Friedenreich: el antígeno tumoral "oculto". Adv Exp Med Biol. 2003; 535: 147-62], o Nemod-TF2 [Glycotope GmbH, Berlin; Goletz S, Cao Y, Danielczyk A, Ravn P, Schoeber U, Karsten U. El antígeno de Thomsen-Friedenreich: el antígeno tumoral "oculto". Adv Exp Med Biol. 2003; 535: 147-62],
- 35 40 • aun más preferiblemente un anticuerpo que se une a TFA-PAA y menos o no a TFB-PAA y no a ninguna de las proteínas y construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a asialoglicoforina y no a glicoforina y esta unión es peryodato sensible,

• aun más preferiblemente cualquier anticuerpo que se una a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no a ninguna de las proteínas y construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une hasta al menos una línea de células tumorales humanas fuera de NM-D4 [DSM ACC2605], NM-F9 [DSM ACC2606], ZR-75-1, CAMA-1, KG-1 o A-204, y por lo que la unión es peryodato sensible, como NEMOD-TF2 o A78-G/A7,

• más preferiblemente es cualquier anticuerpo con cualquiera de las características de unión anteriores pero que no se una al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA, como por ejemplo NEMOD-TF1,

• lo más preferiblemente cualquier anticuerpo que se una a TFa-PAA y menos o no a TFb-PAA y no se una al trisacárido Nuclear-2 acoplado a PAA y no a ninguna de las proteínas y construcciones de X-PAA enumeradas en #list 2# y que se une a la asialoglicoforina y no a la glicoforina y que se une al menos a las células NM-D4, NM-F9 [DSM ACC2606] y ZR-75-1, y por lo que la unión es sensible al peryodato, como NEMOD-TF1.

Dicho anticuerpo específico para el Nuclear-1 puede ser un anticuerpo completo de cualquier animal o humano, como el anticuerpo murino, de rata, humano, camello, quimérico o quimérico de diferentes clases de anticuerpos, tales como, entre otros, IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD o cualquier fragmento de un anticuerpo, siempre que comprenda la especificidad de unión contra el Nuclear-1, como Fab, F(ab)2, Fv de cadena única o anticuerpos de dominio único. Esos anticuerpos también pueden contener al menos un aminoácido adicional o mutaciones o secuencias polipeptídicas, como etiquetas, enlazadores o dominios de multimerización, y también pueden originarse de otras fuentes distintas de los animales, tales plantas y tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos sintéticos utilizando, por ejemplo, fagos. pantalla o visualización ribosoma o por construcción recombinante.

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

De acuerdo con la presente invención, el término "sensibilidad peryodizada" significa que la unión de un anticuerpo a un antígeno o célula es menor cuando este antígeno o célula se trató con peryodato que su unión al mismo antígeno o célula que se trató sin peryodato como se describe por ejemplo en detalle en el tratamiento con peryodato en el ejemplo 9. Para determinar la sensibilidad del peryodato de un anticuerpo por su especificidad Nuclear-1, la sensibilidad del peryodato de su unión se prueba preferiblemente con TFa-PAA, TFb-PAA, asialoglicoforina, NM-D4 [03018576.3 (EP), PCT/EP2004/009281, WO2005/017130 A2, EP1654353] y/u otras células tumorales. Preferiblemente, la unión reducida después del tratamiento con peryodato del antígeno o célula es menos del 50% de la contraparte tratada sin peryodato, e incluso más preferido es menos del 20% de la unión al mismo antígeno o célula que se trató sin peryodato.

Los anticuerpos específicos preferidos del Nuclear-1 de acuerdo con la invención son NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A78-G/A7, HB-T1, HH8. Los anticuerpos preferidos son NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A78-G/A7 y HH8, los más preferidos son NEMOD-TF1, NEMOD-TF2 y A78-G/A7, incluso más preferidos NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2, y los más preferidos NEMOD-TF1. NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 también se describen en el documento DE 10256900.2, PCT/DE2003/003994, EP 03788853.4, US 10/536,834. NEMOD-TF1, NEMOD-TF2, A78-G/A7 y también A68 B/A11 también pueden adquirirse por compra y son, por ejemplo, obtenible de Glycotope GmbH Berlin, Alemania.

La unión de un anticuerpo a Gal beta 1-3 GalNAc alfa1-PAA, Gal beta 1-3 GalNAc beta 1-PAA, GlcNAc beta1-2 Gal beta 1-3 GalNAc alfa 1-PAA, asialoglicoforina y glicoforina se determina preferiblemente en ELISA, y la unión a las células tumorales se determina preferiblemente en análisis por citometría de flujo o análisis de inmunofluorescencia que se describen en detalle en los ejemplos. Los expertos en la técnica pueden usar y adoptar métodos alternativos para probar la unión de tales anticuerpos, tales como, entre otros, los análisis Scatchard para la unión celular, el análisis BIACORE, el análisis de inmunotransferencia Western o el análisis de inmunotransferencia de puntos para la unión al antígeno. Los expertos en la materia también pueden usar otras moléculas portadoras del Nuclear-1 para probar una unión del Nuclear-1 tal como (Gal beta1-3 GalNAc alfa1-) acoplada con o sin un enlazador adecuado a KLH, biotina o BSA, sin embargo, las realizaciones preferidas descritas anteriormente se prefieren en el sentido de la invención.

De acuerdo con la presente invención, el término "microorganismo positivo al Nuclear-1" significa cualquier microorganismo que se une por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1, si dicho microorganismo se pone en contacto con dicho anticuerpo. Para determinar que un microorganismo es positivo al Nuclear-1, es por lo tanto decisivo que dicho microorganismo sea reconocido por un anticuerpo específico para el Nuclear-1. De este modo, se garantiza que el microorganismo transporta un epítipo que es Nuclear-1 o cuya estructura se asemeja específicamente a Nuclear-1 (estructuras de mimetismo del Nuclear-1) y, por lo tanto, es capaz de provocar una respuesta inmune específica del Nuclear-1. Esto también comprende microorganismos en los que Nuclear-1 está acoplado en la forma beta (ver también la Figura 19). Un microorganismo puede ser naturalmente positivo al Nuclear-1 o puede ser positivo al Nuclear-1 al tratar el microorganismo con un Nuclear-1 de exposición química tal

como, por ejemplo, un tratamiento peryodizado en algunas realizaciones. En caso de que un tratamiento respectivo resulte en un microorganismo positivo al Nuclear-1 que esté específicamente unido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1, si dicho microorganismo entra en contacto con dicho anticuerpo es un microorganismo positivo al Nuclear-1 de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se prefiere la alternativa en la que el microorganismo ya es positivo al Nuclear-1.

También hay otras estructuras, además de los anticuerpos, que reconocen y, por lo tanto, se unen al Nuclear-1 al contacto. Una lectina es, por ejemplo, una molécula de unión a carbohidratos que no es una molécula de anticuerpo, que es capaz de unirse a Nuclear-1. Por ejemplo, la aglutinina de cacahuete (ANP) ha sido durante años el reactivo clásico de Thomsen-Friedenreich. Sin embargo, no es específico de Thomsen-Friedenreich, ya que también se une a otros glicanos con estructuras terminales de Galbeta y también muestra una reactividad bastante amplia con el tejido normal (Cao et al, 1996). De acuerdo con una realización, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 se caracteriza porque está reconocido/unido por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 y al menos una proteína de unión a Nuclear-1 sin anticuerpo (lectina) como (pero no limitándose a) aglutinina de *Arachis hypogaea* (cacahuete) (PNA), aglutinina de *Amaranthus caudatus* (ACA), lectina de *Artocarpus integrifolia* (Jacalin), lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL), o aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA) [Las lectinas están disponibles en Vector Labs., Burlingame, CA, Estados Unidos, Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, Estados Unidos., u otras fuentes]. En una realización preferida, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 se caracteriza porque está reconocido/unido por al menos dos anticuerpos específicos del Nuclear-1. En una realización más preferida, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 se caracteriza porque está reconocido/unido por al menos dos anticuerpos específicos del Nuclear-1 y la unión es sensible al peryodato. En una realización preferida adicional, el microorganismo positivo al Nuclear-1 se caracteriza porque se une/reconocido por los anticuerpos específicos para el Nuclear-1 NEMOD-TF1, NEMOD-TF2 o A78-G/A7 en los que la unión es sensible al peryodato. En la realización más preferida, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido/unido por NEMOD-TF1 y NEMOD-TF2 o NEMOD-TF1 y A78-G/A7 y la unión es sensible al peryodato. Estos anticuerpos también son muy adecuados para generar microorganismos positivos al Nuclear-1 con una especificidad del Nuclear-1 suficiente en uno de los procesos de selección/identificación descritos en este documento.

Los métodos adecuados para probar si un anticuerpo específico del Nuclear-1 se une a un microorganismo en esta invención son ELISA e inmunofluorescencia (ver ejemplos), pero los expertos en la técnica pueden usar otros sistemas de prueba como citometría de flujo o varias técnicas de adsorción para identificar microorganismos positivos al Nuclear-1.

El tratamiento con peryodato para probar la sensibilidad del peryodato de la unión de un anticuerpo específico del Nuclear-1 hacia un microorganismo se describe en detalle en el ejemplo 9.

De acuerdo con la presente invención, el término "sensibilidad al peryodato del Nuclear-1 de un microorganismo" significa que la unión de un anticuerpo específico del Nuclear-1 a dicho microorganismo se altera (por ejemplo, menos o más alto) cuando dicho microorganismo se trató con peryodato con respecto a su unión al mismo microorganismo que se trató sin peryodato como se describe en detalle, por ejemplo, en los ejemplos. En una realización preferida, dicha unión de un anticuerpo específico del Nuclear-1 a dicho microorganismo es menor y, por lo tanto, se reduce cuando dicho microorganismo se trató con peryodato con respecto a su unión al mismo microorganismo que no se trató con peryodato. Como se describió anteriormente, el peryodato destruye la estructura específica del antígeno Nuclear-1. En una realización más preferida, dicha unión reducida del anticuerpo específico del Nuclear-1 a dicho microorganismo después del tratamiento con peryodato del microorganismo es menos del 80% de la contraparte tratada sin peryodato, e incluso más preferida es menos del 50% y la más preferida menos que 30%.

Un microorganismo positivo al Nuclear-1 puede ser cualquier microorganismo como, por ejemplo, bacterias, cianobacterias, eubacterias, algas, hongos (hongos, levaduras, hongos, mohos, etc.), virus y protozoos. Se prefieren microorganismos bacterianos tales como, entre otros, microorganismos aislados del suelo, de plantas, animales, seres humanos u otros organismos vivos superiores tales como gatos, perros, cerdos, vacas, cabras, conejos, ratones, chimpancés. En una realización preferida, el microorganismo positivo al Nuclear-1 es un microorganismo que se origina en el sistema gastrointestinal humano.

De acuerdo con la presente invención, el término "fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1" significa preparaciones o purificaciones de partes más pequeñas de dichos microorganismos, como, por ejemplo, una preparación de pared celular, preparación de envoltura, lisados, preparación de lipopolisacáridos, preparación de cápsulas, o preparación de polisacáridos en cápsulas o componentes positivos al Nuclear-1 de dicho microorganismo positivo al Nuclear-1. Deben comprender o consistir en al menos un componente positivo al Nuclear-1 de dicho microorganismo positivo Nuclear-1 para poder provocar la respuesta inmune deseada. Se pueden obtener mediante preparaciones o purificaciones de al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1. Dichas preparaciones y purificaciones pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos anteriormente o el(los) fraccionamiento(es) celular(es) secuencial, fenol, extracciones con éter, digestiones con lisozima o métodos cromatográficos. Además, el término fracción de un microorganismo positivo al Nuclear-1 también comprende componentes positivos al Nuclear-1 producidos artificialmente que también se encuentran en los microorganismos positivos al Nuclear-1 de la presente invención.

La Figura 19, por ejemplo, muestra algunos componentes positivos del Nuclear-1 y, por lo tanto, fracciones de un microorganismo positivo al Nuclear-1 (aquí: AG6). Estos componentes/fracciones del positivo al Nuclear-1 del microorganismo positivo al Nuclear-1 AG6 también podrían producirse químicamente. El componente positivo al Nuclear-1 o la fracción que contiene el componente positivo al Nuclear-1 puede detectarse mediante la unión de la fracción a al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 en sistemas de prueba como, entre otros, el ELISA o las transferencias de puntos que conocen los expertos en la materia. En una realización preferida de la invención, la fracción que comprende un componente positivo al Nuclear-1 se obtiene por cromatografía de afinidad utilizando al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1. En una realización preferida, se usa una única etapa de preparación o purificación. En otra realización preferida, se usa una combinación de al menos dos etapas de preparación o purificación.

De acuerdo con la presente invención, el término "componente positivo al Nuclear-1" significa cualquier componente de un microorganismo positivo al Nuclear-1 que se une por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1. Dicho componente positivo al Nuclear-1 comprende al menos una estructura de carbohidratos del Nuclear-1 o una estructura de imitación del Nuclear-1 que puede estar disponible en forma de su molécula natural de la que forma parte en el microorganismo, como un péptido, oligopéptido, polipéptido, lípido, ceramida, carbohidrato, lipoproteína, polisacárido, oligosacárido, polisacárido, proteoglicano o glicoproteína, o como parte de dicha molécula natural, o solo. El componente positivo al Nuclear-1 puede usarse en el sentido de la invención como una fracción del microorganismo positivo al Nuclear-1 como tal o acoplado a otras estructuras portadoras no naturales tales como proteínas, lípidos, moléculas químicas tales como poliacrilamida. Preferiblemente se utiliza en su forma natural. El componente positivo al Nuclear-1 puede comprender una única estructura de carbohidratos del Nuclear-1 o una estructura de imitación del Nuclear-1 o unidades de repetición de dichas estructuras y puede contener estructuras o unidades de carbohidratos adicionales u otras estructuras de biomoléculas. Dicha estructura de imitación del Nuclear-1 es una estructura que puede estar unida por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 y/o puede inducir una respuesta inmune contra el Nuclear-1, preferentemente una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 o una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1, y más preferiblemente una respuesta inmune humoral contra el Nuclear-1 y una respuesta inmune celular contra el Nuclear-1.

De acuerdo con la presente invención, el término coreotic™ significa un nutracéutico o una formulación nutracéutica que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo.

De acuerdo con la presente invención, el término "enfermedad positiva al Nuclear-1" significa cualquier enfermedad que esté asociada con un virus, microorganismo, célula eucariota, célula tumoral u otro material biológico que se caracteriza por la aparición del antígeno Nuclear-1 que es reconocidos y, por lo tanto, pueden unirse a al menos uno de los anticuerpos específicos del Nuclear-1 o que está asociado con un componente del cuerpo o que se produce en el cuerpo de un ser humano o animal como, por ejemplo, una célula, una célula tumoral, un microorganismo, virus o partícula que se caracteriza por la aparición del antígeno Nuclear-1 que es reconocido y, por lo tanto, puede unirse por al menos uno de los anticuerpos específicos del Nuclear-1.

El término "agente terapéutico", como se usa en este documento, comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 o una fracción del mismo y puede comprender además otros componentes o elementos o un portador preferido de una composición farmacéutica, fármaco y medicamento conocido para los expertos en la materia.

Un portador es una sustancia que puede estar asociada con un compuesto activo antes de la administración a un ser humano o un paciente, generalmente con el propósito de controlar la estabilidad o biodisponibilidad del compuesto. Los portadores para uso dentro de tales formulaciones son generalmente biocompatibles, y también pueden ser biodegradables. Los portadores incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como albúmina de suero (por ejemplo, humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los portadores también incluyen materiales de soporte sólidos tales como perlas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, polilactato poliglicolato, poli(lactida-coglicolida), poliacrilato, látex, almidón, celulosa o dextrano. Un portador puede soportar los compuestos en una variedad de formas, incluida la unión covalente ya sea directamente o a través de un grupo enlazador, interacción no covalente o mezcla.

La inducción de una respuesta inmune contra el Nuclear-1 como se describe en otra parte del presente documento también significa, en el sentido de la invención, la mejora de una respuesta inmune ya existente contra el Nuclear-1.

Sin pretender ser limitativo, la invención se explicará con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Textos de las figuras

Figura 1

Árbol no arraigado basado en las secuencias alineadas de forma no ambigua (1248 pares de bases) de los aislados AG6, MU1, sus parientes más cercanos y la cepa de tipo E. coli obtenida con el método de Neighbour-Joining (7).

Figura 2

2a: productos de PCR de la cepa LH de *E. coli* obtenidos después de la amplificación con el cebador OPL07 –carril 1- escalera de 1 kb; carriles 2-11 - LH cepas 2-5, 8, 13-16, 18; carril 12 - cepa 32 *E. coli* DSMZ 8697

2b: cepas MU y AG6 obtenidas después de la amplificación con el cebador OPA18 - carril 1 - escalera de 1 kb; carriles 2-5 - cepas MU 1, 3-5; carril 6 - AB12; carril 7 - *B. thetaiotaomicron* DSMZ 2079; carril 8 - *B. ovatus* DSMZ 1896; carril 9 - *B. vulgatus* DSMZ 1447; carril 10 - *B. acidifaciens* DSMZ 15896; carriles 11-13 - AG6

Figura 3

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

Figura 3A

ELISA con cepas bacterianas recubiertas *Helicobacter pylori* NCTC 11637, *E. coli* cepa DSMZ 8697 (cepa 32) y *Bacteroides ovatus* cepa MU1 (cada una con una densidad correspondiente a $10 \times OD_{650nm}$ 0,1) y los anticuerpos monoclonales Nemod-TF1 Nemod-TF2 y A68 -BA11 ($OD_{450/630nm}$ menos $OD_{450/630nm}$ del anticuerpo de control A63-B/C2).

Figura 4

SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia Western de la preparación en cápsula de la cepa AG6

A) tinte azul Alcian de SDS- gel de poliacrilamida

B) tinción DIG-glicano de inmunotransferencia Western

C) tinción de inmunotransferencia Western con Nemod-TF2

Figura 5

Enriquecimiento de polisacáridos positivos al Nuclear-1 por cromatografía de fase reversa

Figura 6

Secuencia de unidades repetitivas de polisacárido capsular positivo al Nuclear-1 de la cepa AG6 de *B. ovatus*

Figura 7

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

Figura 8

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

Figura 9

Análisis de sueros de ratón mediante prueba de respuesta inmune humoral 1

Los anticuerpos IgM contra AGP y AGP tratados con ácido peryódico se determinaron mediante ELISA en sueros de ratones inmunizados con PBS (grupo L), bacterias negativas a Nuclear-1 (grupo I) y bacterias positivas al Nuclear-1 (grupo K)

Dilución de suero 1:200, día 21.

Figura 10

Las señales ELISA de sueros inmunitarios en los conjugados carbohidrato-PAA significan el valor de las señales ELISA de 4 ratones C3H contra el conjugado PAA Gal beta1-3GalNAc alfa1-PAA en relación con la señal ELISA contra GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcalfa-PAA (dilución de sueros 1:100)

Figura 11 a e

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

A) intensidad de fluorescencia media del análisis FACS

B) superposición de histogramas (negro: grupo L, azul: grupo I, rojo: grupo K)

La Figura 11c muestra los resultados de la prueba de respuesta inmune humoral 1 con sueros de ratones inmunizados con cepas bacterianas *Bacteroides ovatus* MU-1, *E. coli* LH2, *E. coli* AG3, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32 (se muestran los valores medios de 4 ratones por grupo).

- 5 La Figura 11 d muestra los resultados de la prueba de respuesta inmune humoral 2 con sueros de ratones inmunizados con cepas bacterianas *Bacteroides ovatus* MU-1, *E. coli* LH2, *E. coli* AG3, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32 (se muestran los valores medios de 4 ratones por grupo).

- 10 La Figura 11 e muestra los resultados de la prueba de respuesta inmune humoral 3 con sueros de ratones inmunizados con cepas bacterianas *Bacteroides ovatus* MU-1, *E. coli* LH2, *E. coli* AG3, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32 (se muestran los valores medios de 4 ratones por grupo).

Figura 12

Prueba de respuesta inmune humoral 1 de sueros de ratones libres de gérmenes (ratón de control y 3 ratones diferentes inmunizados con la cepa de bacterias AG6)

Figura 13

- 15 Prueba de respuesta inmune humoral 1 de sueros de ratones C3H inmunizados por vía oral con A) 2×10^{11} (grupo A) o B) 2×10^{10} (grupo B) bacterias pasteurizadas de la cepa AG6 diariamente en los días 0 a 28. Señales de ELISA en el día 21 contra la glicoforina (GP), se muestran asialoglicoforina (AGP) y AGP tratada con peryodato (AGP + PJ) de ratones individuales

Figura 14

- 20 Prueba de respuesta inmune humoral 3 de sueros de ratones C3H inmunizados por vía oral con bacterias pasteurizadas positivas al Nuclear-1 (cepa AG6). Los sueros del día 0 y el día 28 se diluyeron 1:300 y se analizaron en citometría de flujo para determinar su unión en las líneas celulares NM-wt y NM-D4.

Figura 15

- 25 Producción de citoquinas por células T generadas en lisados de bacterias positivas para Nuclear-1 (AG6 y MU1) después de la reestimulación con DC cargadas con lisados celulares positivos para Nuclear-1 MN-D4 (DC/D4) o negativos NMwt (DC/wt) de líneas de células tumorales humanas. Inhibición de la producción de citoquinas a través de la preincubación de las NM-DC cargadas con lisado con anticuerpo específico Nuclear-1 (DC/D4+Ak).

A) Producción de GM-CSF por células T (CIRT 1)

B) Producción de TNF alfa por células T (CIRT 2)

- 30 Figura 16

Prueba de respuesta inmune celular 2: Resultados del ensayo ELISpot para la producción de IFN-gamma por células T respondedoras después de la reestimulación con DC cargadas con lisados celulares positivos para Nuclear-1 (DC/D4) o negativos (DC/wt) de líneas celulares de tumores humanos y inhibición de la producción de citoquinas mediante preincubación de NM-DC cargada con lisado con anticuerpo específico Nuclear-1 (DC/D4+Ak).

- 35 Figura 17

Prueba de respuesta inmune celular 3: ensayo de proliferación de células T (WST) en células respondedoras (R) después de la reestimulación con DC cargadas con lisados celulares positivos para Nuclear-1 (DC/D4) o negativos (DC/wt) de líneas celulares de tumores humanos y inhibición de la proliferación a través de la preincubación de las NM-DC cargadas con lisado con anticuerpo específico Nuclear-1 (DC/D4+Ak).

- 40 Figura 18

Prueba de respuesta inmune celular 4: análisis de inmunofluorescencia de mNM-DC cargadas con bacterias negativas al Nuclear-1 (AG3) o positivas al Nuclear-1 (AG6) o negativas al Nuclear-1 (NM-wt) o línea celular humana positiva al Nuclear-1 (NM-D4).

Figura 19

- 45 Estructuras de carbohidratos de componentes positivos del Nuclear-1

L-Fuc: L-fucosa, D-GalNAc: N-acetilgalactosamina, D-Gal: D-galactosamina, Hex: hexosa, HexNAc: N-acetilhexosamina, OMe: O-metilación Tales estructuras son, por ejemplo, encontrado en AG6.

Figura 20

El antígeno Nuclear-1 oculto y expuesto.

Figura 21

- 5 La Figura 21 muestra las señales ELISA contra el conjugado de PAA Gal β 1-3 GalNAc a -PAA y el conjugado de PAA Gal β 1-3 GlcNAc a-PAA en el día 21. Los sueros se consideraron positivos si la señal en PAA 48 era al menos un 30% más alta luego las señales en PAA 43. Teniendo en cuenta este criterio, 5 (A1, A2, A3, B1 y B5) de los 6 ratones desarrollaron una respuesta inmune humoral específica del Nuclear-1.

Figura 22

- 10 Muestra la tabla 1, en la que las cepas seleccionadas del positivo al Nuclear-1, así como las cepas que no eran positivas al Nuclear-1, se caracterizaron por su sensibilidad frente a diferentes antibióticos.

Figura 23

Visión general sobre una prueba de respuesta celular.

Ejemplos

Ejemplo 1. Técnicas y medios de cultivo anaeróbico

- 15 Las técnicas anaeróbicas empleadas en el cultivo de bacterias se basaron en métodos descritos previamente que fueron resumidos por Breznak y Costilow. Los medios preparados con cisteína-HCl como agente reductor se dispensaron en tubos de cultivo anaeróbico (Ochs, Bovenden, Alemania) o botellas de suero de vidrio, dejando aproximadamente la mitad a un tercio del volumen total del recipiente como espacio de cabeza de gas, y se sellaron con tapones de caucho de butilo. Las soluciones preparadas sin agentes reductores (por ejemplo, PBS-a) se hirvieron antes de dispensar. Antes del autoclave, la fase gaseosa se reemplazó con N₂/CO₂ (80/20, v/v). Para lograr esto, las agujas fueron empujadas a través de las botellas tapadas con caucho de butilo y las botellas fueron evacuadas por medio de una bomba de vacío (Vacuubrand, Wertheim, Alemania). Tras la evacuación, las botellas, que se agitaron repetidamente durante todo el proceso, se gasearon con N₂/CO₂ (80/20, v/v). Este procedimiento de evacuación y gasificación se llevó a cabo tres veces en total. Antes de entrar en los recipientes, la mezcla gaseosa se pasó sobre un catalizador de paladio caliente para eliminar las trazas residuales de oxígeno presentes en la mezcla gaseosa. Se usó resazurina (1 mg l⁻¹) como indicador rédox.
- 20
- 25

- Los medios para la siembra se vertieron bajo una campana de flujo laminar y se almacenaron en condiciones anóxicas durante al menos 24 h antes de su uso. Esto se logró en frascos anaeróbicos presurizados (1.5 × 10⁵ Pa) con un AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) de 3.5 l o con una cámara de aire anaeróbica purgada repetidamente con N₂/CO₂/H₂ (80/10/10, v/v/v) (Don Whitley Scientific, Shipley, Inglaterra). La manipulación de las muestras se realizó en una cámara anaeróbica (estación de trabajo de atmósfera variable MACS, Don Whitley Scientific, Shipley, Inglaterra o Coy Laboratory Products, Grass Lake, Estados Unidos).
- 30

- Las soluciones y los materiales no estériles se esterilizaron mediante autoclave (121°C, 1.2 × 10⁵ Pa, 15 min). Los compuestos termolábiles se hicieron como soluciones madre concentradas en agua milli-Q, se filtraron de forma estéril (0.22 µm, éster de celulosa mixta, Roth, Karlsruhe, Alemania) y se agregaron a los medios a las concentraciones requeridas.
- 35

Ejemplo 2. Enriquecimiento por afinidad de microorganismos positivos al Nuclear-1

2.1 Preparación de TF1 y TF2 recubiertos con Dynabeads®

- Se colocó un volumen de 100 µl de Dynabeads® (M-450 Rat Anti-Mouse IgM, Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega) en 2 ml de tubos Eppendorf Safe-Lock (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se lavaron dos veces con 2 ml de solución salina regulada con fosfato a (PBS-a: 8.1 g l⁻¹ NaCl, 0.16 g l⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 0.98 g l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 1 g l⁻¹ BSA, pH 7.4) usando el magnético Dynal Magnetic Particle Concentrator®-S (MPC®-S, Dynal Biotech, Oslo, Noruega) y se suspendieron en 25 µl de PBS-a. Los sobrenadantes de cultivo celular TF1 o TF2 liofilizados se disolvieron en 1 ml de agua de grado de síntesis milli-Q (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos). Se agregaron sobrenadantes de cultivos celulares TF1 o TF2 disueltos (1 ml) a los tubos con Dynabeads® y se incubaron durante 30 minutos a 4°C en un rotador de tubos de ensayo (modelo 34528, Snijders Scientific, Países Bajos). Los tubos se colocaron en el MPC®-S y se dejaron reposar durante 3 minutos antes de retirar el líquido con una pipeta. Las Dynabeads® se resuspendieron en 2 ml de PBS-a, se colocaron en el MPC®-S y el líquido se eliminó mediante pipeteo. Esta etapa de lavado se realizó tres veces. Las Dynabeads® lavadas se suspendieron en su volumen original de 100 µl de PBS-a. Las Dynabeads® preparadas de esta manera se usaron inmediatamente o dentro de las dos semanas de preparación después de una repetida etapa de lavado de tres veces con 2 ml de PBS-a.
- 40
- 45
- 50

2.2 Recolección y procesamiento de muestras fecales para enriquecimiento de Dynabeads®

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

5 Tabla 3: Parámetros individuales al momento de la recolección de muestras fecales.

Número del sujeto	Años	Género
1 - GH	24	hembra
2 - RM	26	hembra
3 - TC	25	macho
4 - AG	27	hembra
5 - AB	37	hembra
6 - MU	36	hembra
7 - LH	24	hembra
8 - CA	50	macho

10 Se preparó una dilución diez veces (p/v) de las muestras fecales en PBS-b (PBS-b: 8,5 g l⁻¹ NaCl, 0,3 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0,6 g l⁻¹ Na₂HPO₄, pH 7,0 que contenía 0,1 g l⁻¹ peptona y 0,25 g l⁻¹ cisteína·HCl). Se añadieron seis perlas de vidrio de 3 mm de diámetro estériles y las muestras diluidas se homogeneizaron mediante vórtex a baja velocidad. La muestra homogeneizada se centrifugó (300 x g, 1 min, 21 °C) para sedimentar los residuos. Se añadió una porción de 200 µl del sobrenadante resultante a 1,8 ml de PBS-b, dando como resultado una dilución de aproximadamente 100 veces la muestra fecal original. Estas diluciones se lavaron una vez con 2 ml de PBS-b (8000 x g, 5 min, 21 °C) y las pastillas se suspendieron en 2 ml de PBS-b.

2.3 Procedimiento de enriquecimiento con Dynabeads®

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

20 2.4 Siembra sobre medios selectivos y no selectivos.

Las muestras lavadas se suspendieron en 1 ml de PBS-b y 100 µl de partes alícuotas se sembraron por extensión en placas sobre varios medios selectivos y no selectivos (Tabla 4) y se incubaron durante 48 horas a 37°C en una cámara anaeróbica.

Tabla 4: Medios empleados para la siembra por extensión

Medio de cultivo	Fabricante	Selectivo para	Abreviatura
de Man, Rogosa y Sharpe	Merck, Darmstadt, Alemania	lactobacilos, bacterias del ácido láctico	MRS
Medio Selectivo para Bifidus	Fluka, St. Gallen, Suiza	bifidobacterias	BSM
Agar K-F para estreptococos	Oxoid	estreptococos	KF

Medio de cultivo	Fabricante	Selectivo para	Abreviatura
Agar nutritivo	Oxoid	No selectivo	N
Agar anaerobio Schaedler	Oxoid	No selectivo	S
Agar anaerobio Wilkins Chalgren	Oxoid	No selectivo	WC
Agar de infusión cerebro corazón	Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia	No selectivo	BHI
Agar Columbia Agar con 5 % de sangre de oveja	Biomérieux	No selectivo	CBA
Agar Stamm		No selectivo	ST

Los medios sólidos se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La composición del agar ST fue la siguiente: 1 g l⁻¹ peptona proteosa, 9 g l⁻¹ peptona de carne, 3 g l⁻¹ NaCl, 2 g l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 3 g l⁻¹ extracto de carne, 4 g l⁻¹ extracto de levadura, 6 g l⁻¹ D (+)-glucosa, 0.5 ml l⁻¹ Tween 80, 0.25 g l⁻¹ cisteína-HCl, 1 mg l⁻¹ resazurina, 0.1 g l⁻¹ MgSO₄·7 H₂O, 5 mg l⁻¹ FeSO₄·7 H₂O, 0.5 g l⁻¹, 3.4 mg l⁻¹ MnSO₄·2H₂O, 1.5 g l⁻¹ agar bacteriológico, pH 7.0.

Para los sujetos 1 a 4, se seleccionaron colonias de un procedimiento de enriquecimiento para la selección basada en ELISA. Para los sujetos 5 a 8, el procedimiento de enriquecimiento Dynabeads® se repitió dos veces de la siguiente manera: Después de 48 h de incubación, las colonias se rasparon de las placas, se suspendieron en PBS-b dentro del rango de los estándares de turbidez de McFarland 3 a 5 (preparado como en (13)). Como antes, se añadió una parte alícuota de 20 µl de esta suspensión a 180 µl de PBS-a. El procedimiento de enriquecimiento y siembra se realizó tres veces en total, como se describió anteriormente.

Las muestras fecales de otros cuatro sujetos (5 AB, 6 MU, 7 LH y 8 CA) se enriquecieron con bacterias positivas para Nuclear-1. El procedimiento de enriquecimiento se modificó ligeramente porque el enriquecimiento se llevó a cabo tres veces en total. Es decir, las colonias obtenidas después del aislamiento inicial se rasparon de las placas y se sometieron a un enriquecimiento adicional. Se obtuvieron sesenta nuevos aislados de esta manera.

Ejemplo 3. Identificación de aislados.

3.1 Bioquímica

Las bacterias se identificaron con el sistema VITEK (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las bacterias se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las tarjetas de identificación utilizadas fueron las siguientes: tarjetas ANI para aislados anaeróbicos y bastoncillos Gram-positivos anaeróbicos facultativamente capaces de crecer en caldo MRS (presuntos lactobacilos), tarjetas GPI para aislados Gram-positivos y tarjetas GNI+ para aislados aerobios Gram-negativos.

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

Tabla 5: Identificación de las cepas aisladas basadas en características bioquímicas (VITEK)

Cepa	Identificación	Probabilidad
AG6 MU (1, 3 - 5) AB12	<i>Bacteroides ovatus</i>	82 - 95 %
AG3 LH (2 - 5, 8, 13 - 16, 18)	<i>Escherichia coli</i>	89 - 99 %

3.2 Molecular (Secuenciación)

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

- 5 Cada PCR se realizó por triplicado y la mezcla de reacción (50 µl) contenía: KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, 0.25 mM dNTP, 1 µM de cada cebador, 2.5 unidades de ADN polimerasa Taq (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y 1 µl de la plantilla de ADN. El programa de PCR fue: 94°C durante 5 min, 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, y finalmente 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación de productos de PCR de alta pureza (Roche, Indianapolis, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) en regulador Tris-Acetato-EDTA (4.84 g l⁻¹ Tris, 1.142 ml l⁻¹ ácido acético glacial 0.372 g l⁻¹ EDTA, pH 8.0). La concentración de ADN se estimó utilizando la escala de masa de ADN baja (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos).

- 15 Para la secuenciación, se utilizó el cebador 27f, 338f (5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT) (2), 338r (5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC), 968f (5' AAC GCG AAG AAC CTT AC) (14), o 1492r. Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit de secuenciación de ciclo de terminador de tinte DYEnamic™ ET (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Inglaterra) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron con el sistema MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Estados Unidos). Las secuencias se ensamblaron y ajustaron manualmente utilizando la función ContigExpress de Vector NTI Suite 9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos). Posteriormente, se alinearon con secuencias altamente similares (92% de similitud o más) obtenidas con la función BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (1). Los porcentajes de similitud se calcularon a partir de secuencias alineadas de forma no ambigua utilizando la función de Matriz de Identidad de Secuencia de la versión 5.0.9 del software Bioedit o la Similarity Matrix version 1.1 of the Ribosomal Database Project. Los resultados de la secuenciación se confirmaron por comparación con las secuencias obtenidas de un proveedor de servicios de secuenciación del gen 16S rRNA (AMODIA, Braunschweig, Alemania).

- 25 La identidad de los aislados se representa en la Tabla 6 y en la Figura 1 se muestra un árbol filogenético sin raíz en función de las secuencias de los aislados AG6, MU1, sus parientes más cercanos y la cepa de tipo E. coli ATCC 11755.

Tabla 6: Identificación de las cepas aisladas con base en las secuencias alineadas de manera no ambigua de los genes 16S rRNA utilizando la función de matriz de similitud versión 1.1 del Ribosomal Database Project (5)

Cepa	Identidad	Similitud(%)	a cepa	Número de acceso
AG6	<i>Bacteroides ovatus</i>	98.2	ATCC 8483T	X83952
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	97.1	ATCC 29148T	L16489
MU1	<i>Bacteroides ovatus</i>	98.0	ATCC 8483T	X83952
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	97.1	ATCC 29148T	L16489
AG3	<i>Escherichia coli</i>	99.5	k12 MG1655	AE000460
GH1	<i>Lactobacillus paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	99.4	JCM 8130T	D79212
	<i>L. paracasei</i> sp. <i>tolerans</i>	99.4	JCM 1171T	D16550
96	<i>Staphylococcus warneri</i>	99.2	ATCC 27836T	L37603
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99.0	ATCC 51129T	AF041361
TC7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99.6	JCM 1136T	D16552
	<i>Lactobacillus zeae</i>	98.7	ATCC 15820	D86516

3.3 ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Algunos aislados positivos de Nuclear-1 obtenidos con el procedimiento de enriquecimiento de Dynabead® repetido parecían ser muy similares en su morfología celular y de colonias, a pesar de haber sido aislados de diferentes medios. Las cepas también fueron muy similares con respecto a sus perfiles bioquímicos obtenidos con el sistema VITEK. Surgió la pregunta de si las bacterias aisladas son cepas idénticas. RAPD es un método que no requiere información de secuencia, que se puede aplicar para distinguir cepas. En resumen, el ADN genómico total se amplifica por PCR con un cebador de 10 pares de bases con baja restricción, de modo que las secuencias aleatorias de ADN se amplifican en base a secuencias homólogas al cebador que está presente en el ADN objetivo. Los productos de PCR resultantes se pueden separar por electroforesis en gel de agarosa y el patrón resultante se puede comparar entre cepas. Los patrones de banda resultantes para todas las cepas de LH fueron análogos para los cinco cebadores RAPD (OPL07, M13, OPX14, OPA16, OPA18) empleados. El patrón difiere claramente del de la cepa DSMZ 8697 de *E. coli* (Figura 2a), una cepa de la que se ha informado que tiene actividad en el grupo sanguíneo B. Las cepas de MU también parecen ser muy similares (Figura 2b); sin embargo, su patrón de banda difiere claramente del de otras cepas de *Bacteroides*, incluido el AG6. Parece que una cepa positiva al Nuclear-1 se enriqueció repetidamente de cada donante positivo durante el proceso de aislamiento. Las cepas aisladas diferían entre individuos.

Ejemplo 4. Crecimiento y fijación de bacterias para el cribado basado en ELISA

Se seleccionaron al azar colonias bien separadas a partir de placas de agar selectivas y no selectivas y se volvieron a sembrar tres veces en medios no selectivos. Se seleccionaron colonias individuales y se inocularon en ST (como anteriormente, omitiendo el agar), WC o caldo MRS, dependiendo de cuál de ellos dio el mejor crecimiento, y se cultivaron durante la noche a 37°C. Estos cultivos se inocularon (1%) en 300 ml de caldo ST, WC o MRS fresco y se cultivaron durante la noche a 37°C. Las células se sedimentaron (8000 x g, 15 min, 4 C) y se resuspendieron en 10 ml de PBS-c (8 g l⁻¹ NaCl, 0,2 g l⁻¹ KCl, 1,44 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 0,24 g l⁻¹ KH₂PO₄) (12). Esta suspensión se fijó 3 durante 4 h a 4°C mediante la adición de 30 ml de solución de paraformaldehído (PFA) al 4% (preparada de acuerdo con (8)) en PBS-c. A continuación, las muestras se lavaron con 40 ml de PBS-c (8000 x g, 15 min, 4 C) y los sedimentos se suspendieron en 15 ml de PBS-c, seguido de la adición de un volumen igual de etanol al 96% helado. Las muestras se almacenaron a -20° C hasta su análisis.

La pureza de los cultivos se comprobó comparando la morfología celular, así como el comportamiento de tinción de Gram. Los cultivos se colocaron en forma aeróbica en CBA para determinar su capacidad para crecer en presencia de oxígeno y para verificar la ausencia de contaminantes aeróbicos.

Ejemplo 5. Mantenimiento de aislados.

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

Ejemplo 6. Crecimiento, fijación y liofilización de bacterias para experimentos con animales.

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

6.1 Fijación

La porción para la fijación se lavó (8000 x g, 15 min, 4 C) y se resuspendió en 30 ml de PBS-c. Esta suspensión se añadió a 90 ml de la solución de PFA al 4% en PBS-c y se fijó durante 3 a 4 horas a 4°C. Para mejorar la eliminación de PFA, las muestras se lavaron tres veces con 120 ml de PBS-c (8000 x g, 15 min, 4 C). Los sedimentos celulares se suspendieron en 45 ml de PBS-c, seguidas de la adición de un volumen igual de etanol helado al 96%. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

Antes de la administración a los animales, las bacterias fijadas se liofilizaron en condiciones estériles en tubos Lid_{Bac} (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para evaporar el etanol. Para garantizar la no viabilidad de las bacterias fijas, se inocularon (1%) en caldo de WC y se colocaron en placas en CBA y se controlaron para detectar la ausencia de crecimiento durante el período de una semana.

6.2 Pasteurización

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

6.3 Liofilización

- 5 La porción para liofilización se añadió a un volumen igual de sacarosa filtrada estéril al 24% y se dividió en alícuotas en porciones de 300 µl en tubos de Lid_{Bac} de 2 ml. Estas alícuotas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido durante 1 hora y se liofilizaron (Alfa 2-4, Christ, Osterode, Alemania) después de colocarlas en bandejas previamente enfriadas a -80°C. Después de la liofilización, las tapas de los tubos se cerraron y se almacenaron a 4°C utilizando el sistema minigenerador de gas Anaerocult® C (Merck, Darmstadt, Alemania) con la adición de gel de sílice naranja (Roth, Karlsruhe, Alemania) como desecante.

6.4. Enumeración de preparaciones de bacterias.

- 15 Se determinaron los números de células totales de preparaciones de bacterias fijas y liofilizadas con una cámara Thoma de 0.01 mm de profundidad (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, Alemania). Para bacterias liofilizadas, las unidades formadoras de colonias (CFU) se determinaron colocando en placa diluciones en serie de 10 veces en agar WC de los cultivos durante la noche e inmediatamente antes y después de la liofilización. Para este propósito, el liofilizado se disolvió en 300 µl de caldo de WC, se dejó reposar durante 15 minutos, se resuspendió con vórtex a baja velocidad y se diluyó en serie. Las UFC de las preparaciones liofilizadas se enumeraron antes y después del uso en experimentos con animales para garantizar la viabilidad. La pureza de las preparaciones se verificó como se describe en la sección 4.

20 Ejemplo 7. Muestras de suero

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

Ejemplo 8. Extracción de IgA fecal

- 25 Se recolectaron muestras fecales, almacenadas a -80 °C. Las heces se liofilizaron y se registraron los pesos secos netos. Todas las manipulaciones se realizaron sobre hielo. La IgA fecal se extrajo según Grewal (6) con algunas modificaciones. Las muestras liofilizadas (~30 mg) se suspendieron en una proporción de 15 µl/mg de peso seco en regulador de extracción de IgA (PBS-Dulbecco (Biochrom, Berlín, Alemania) con 1 g l⁻¹ BSA) con inhibidores de proteasa (5 µg ml⁻¹ leupeptina (Calbiochem, Merck), 48 µg ml⁻¹ 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilfluoruro (Merck), 1 µg ml⁻¹ de aprotinina, 2 µg ml⁻¹ de bestatina (Sigma, Steinheim, Alemania) y se homogeneizaron. Se mezclaron con vórtex cada 10 minutos. Después de un período de incubación de 1 hora, las muestras se centrifugaron (16000 x g, 10 minutos, 4°C) y el sobrenadante se recogió en un nuevo tubo. El sedimento restante se suspendió en una proporción de 10 µl/mg de peso seco en regulador de extracción de IgA y se homogeneizó. El procedimiento de extracción se repitió y el sobrenadante resultante se combinó con el sobrenadante de la primera etapa de extracción. Estos sobrenadantes se centrifugaron (16000 x g, 10 min, 4°C) y se dispuso el sobrenadante resultante, en tubos nuevos, congelados a presión en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el análisis

Ejemplo 9. Selección de cepas bacterianas mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Las bacterias fijas se diluyeron en PBS, los números de células se ajustaron a 1x10⁵, 1x10⁶, 5x10⁶, 1x10⁷, 1x10⁸ o 5x10⁸ células/ml.

- 40 Se recubrieron 50 µl de solución bacteriana por pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos durante la noche a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/Tween 20 al 0.02% (se realizaron etapas de lavado idénticas después de cada etapa de incubación). Después del bloqueo de las placas con PBS/BSA al 2%, las placas ELISA se incubaron con sobrenadantes de cultivos de hibridomas que contenían diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen el Nuclear-1 (Nemod-TF1, Nemod-TF2 o menos específicos de A68/BA11) o un anticuerpo de control (A63-B/C2) en diferentes diluciones. Como anticuerpo secundario se administró una inmunoglobulina policlonal anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa (Dako P0260). El ensayo se desarrolló con TMB como sustrato, la reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 2.5 N y la extinción se midió a 450/630 nm. Para la determinación de la sensibilidad del peryodato de la unión del anticuerpo, el ELISA recubierto sembrado se incubó con peryodato de sodio antes de la incubación con anticuerpos. Por lo tanto, las placas se lavaron con regulador de acetato de sodio (50 mM, pH 4.5) durante 5 min y luego se incubaron con ácido peryódico 10 mM en regulador de acetato de sodio durante 1 h en la oscuridad. Las placas se lavaron con regulador de acetato de sodio (5 min) y la reacción se detuvo mediante la adición de borohidruro de sodio 50 mM en PBS (30 min).

Un ejemplo de tales resultados de ELISA se muestra en las figuras 3 y 3a.

Ejemplo 10: Preparación de componentes de bacterias que contienen Nuclear-1

10.1. Análisis de preparaciones de cápsulas crudas mediante SDS-PAGE y análisis por inmunotransferencia Western.

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

- 5 La preparación de la cápsula se analizó mediante SDS-PAGE y el polisacárido en la preparación se detectó mediante tinción con azul de alcía después de Karlyshev et al. (2001, J. Clin. Microbiol. 39, 279-284) que muestra una variedad de bandas que contienen carbohidratos y un alto porcentaje de carbohidratos de alto peso molecular dentro de la preparación (Figura 4A). Después de la inmunotransferencia Western, los polisacáridos fueron detectados por el kit de detección DIG-Glycan (LaRoche Diagnostics). Mostró bandas fuertes a 37 y 26 kDa. (Figura 10 4B). La detección del polisacárido que contiene el Nuclear-1 en la inmunotransferencia Western se realizó utilizando el anticuerpo específico del Nuclear-1 NEMOD-TF2 (sobrenadante del cultivo) que muestra una banda positiva al Nuclear-1 a 37 kDa (Figura 4C).

10.2. Enriquecimiento cromatográfico de polisacáridos positivos al Nuclear-1

- 15 Dentro de la preparación de la cápsula de la cepa AG6 todavía había contaminantes de lipopolisacáridos como se muestra en la medición o el contenido de KDO de 11.2 pmol/μg después de Haraet al. 1989, anal. Biochem. 179, 162-166) y por SDS-PAGE.

- 20 Por lo tanto, los polisacáridos y los lipopolisacáridos en cápsulas se separaron por cromatografía de fase reversa en una columna C18 usando un gradiente de propanol/metanol (ver Figura 5) de acuerdo con Hashimoto et al. (2001, Eur. J. Biochem. 268, 3139-3144). Los polisacáridos se eluyeron mediante un gradiente de eluyente B (72% de propanol/8% de metanol en acetato de amonio 0.1 M, pH 4.5). La detección de polisacáridos dentro de las fracciones se realizó mediante inmunoprecipitación de puntos y DIG-Glycan-Kit. La detección del Nuclear-1 se realizó utilizando los anticuerpos específicos del Nuclear-1 Nemod-TF1 y Nemod-TF2. Los polisacáridos se eluyeron a concentraciones de propanol de 14-19% y 25-43%. Los carbohidratos específicos del Nuclear-1 solo se detectaron al 29-29.4% de propanol (RP1) y al 39-42% de propanol (RP2), véase Figura 5 que muestra un fuerte 25 enriquecimiento del polisacárido positivo al Nuclear-1 mediante este método.

- Las fracciones positivas del Nuclear-1 se usaron para separaciones cromatográficas adicionales mediante hidrólisis ácida suave seguida de cromatografía en DEAE usando un gradiente de NaCl 0-0.5 M según Tzianabos et al. (1992, J. Biol. Chem. 267, 18230-18235). Mediante este método, los polisacáridos positivos al Nuclear-1 se separaron en tres fracciones eluidas en NaCl 0 M (D1), NaCl 0.04 M (D2) y NaCl 0.9-0.17 M (D3), lo que dio como resultado 30 enriquecimiento de polisacáridos positivos al Nuclear-1.

- En el proceso de acuerdo con la presente invención, los polisacáridos capsulares de *B. ovatus* AG6 se purifican y la estructura se analiza por espectrometría de masas. Preferiblemente, el polisacárido capsular de *B. ovatus* AG6 se acumula mediante la extracción con fenol en agua seguida de la extracción con éter como ya se describió por Pantosti et al. 1991. Posteriormente, el polisacárido positivo para el Nuclear-1 se acumula a partir de la preparación 35 capsular rugosa (CPS) por cromatografía de fase reversa (C18 Synergi 4μ Fusion-RP 80i, 250 mm x 10 mm, Phenomenex). Los contenidos de monosacáridos del extracto de polisacárido capsular rugoso y del polisacárido positivo al Nuclear-1 purificado se determinan mediante análisis HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alto pH, detección amperométrica pulsada). Finalmente, la estructura del polisacárido capsular positivo del Nuclear-1 se analiza mediante espectrometría de masas.

- 40 10.3 Análisis de monosacáridos del extracto de preparación capsular rugosa y extracto capsular purificado de *B. ovatus* AG6

- En el primer paso, el polisacárido positivo para el Nuclear-1 de la preparación capsular rugosa de *B. ovatus* AG6 se acumuló por cromatografía de fase reversa como ya se describió anteriormente. Posteriormente, el rendimiento de la purificación, así como el contenido de monosacáridos del polisacárido positivo acumulado en el Nuclear-1, se 45 determinó mediante análisis HPAEC-PAD.

- Antes de que se realizaran los análisis de monosacáridos, los extractos de polisacáridos se hidrolizaron completamente con ácido trifluoroacético 2 N (TFA) a 100°C durante 4 h. Durante la hidrólisis de TFA se perdieron los grupos acetilo. Por lo tanto, los monosacáridos glucosamina y galactosamina (GlcNH₂ y GalNH₂) no pudieron distinguirse de la N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina (GlcNAc y GalNAc). Los monosacáridos se 50 separaron mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto pH y se detectaron mediante amperometría pulsada como ya se describió anteriormente. Para identificar los monosacáridos y determinar sus concentraciones, se utilizaron estándares de monosacáridos externos e internos.

- El contenido proporcional de monosacáridos del extracto bruto de CPS, que se determinó para la comparación de LPS y CPS (mencionado anteriormente), obviamente varía con respecto al contenido proporcional de monosacáridos del extracto bruto de CPS determinado para esta comparación. Los dos extractos de CPS en bruto se prepararon a partir de diferentes cultivos de *B. ovatus* AG6, lo que podría ser una explicación de la variedad 55 mencionada de contenidos de monosacáridos.

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

- 10 Tabla 7: Análisis de monosacáridos del extracto de polisacárido capsular rugoso (CPS) y extracto de polisacárido positivo para el Nuclear-1 purificados por cromatografía de fase reversa. El contenido proporcional de monosacáridos está relacionado con la cantidad total de monosacáridos.

Monosacáridos	Extracto CPS en bruto (%)	Extracto CPS purificado (%)
Fucosa	9.5	11.4
Ramnosa	17.7	3.1
GalNH ₂ /GalNAc	5.2	14.9
GlcNH ₂ /GlcNAc	14	3.5
Galactosa	4.6	6.9
Glucosa	44.2	50
Manosa	18.2	6.9
Ácido galacturónico	10	0
Ácido glucurónico	0.5	0
n. d.	3	2

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

10.4 Análisis de la estructura del polisacárido positivo al Nuclear-1 por espectrometría de masas

- 20 La estructura del polisacárido positivo al Nuclear-1 se analizó mediante espectrometría de masas asistida por láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) como ya se describió anteriormente y mediante espectrometría de masas con electroaspersión-trampa de iones (ESI-Ion-Trap-MS).

- 25 Para la espectrometría de masas ESI-Ion-Trap, el polisacárido acumulado positivo al Nuclear-1 se fragmentó mediante hidrólisis con digestión con ácido al 1% (1.5 h, a 100°C) o enzimática con condroitinasa ABC (escisión de los límites beta 1-4GalNAc/GlcNAc) o con beta1-3 galactosidasa. Además, se produjo una fragmentación por doble digestión con condroitinasa ABC/alfa1-3,4 fucosidasa o 1% de ácido ácido/beta1-3 galactosidasa (todas las enzimas se recibieron de Glyko GmbH). Todas las digestiones enzimáticas se incubaron a 37°C durante la noche. Los análisis espectrométricos de masas (MS y MS/MS) se llevaron a cabo en el modo positivo y negativo. Antes de que se realizaran los análisis, todas las muestras se desalaron con Carbograph SPE (Aalltech Associates Inc.) como se describe en el manual del fabricante y se diluyeron en NH₃ 2.5 mM/40% de acetonitrilo.

- 30 La estructura de los fragmentos de glucano positivo al Nuclear-1, que ya se identificó mediante análisis MALDI-MS, se pudo verificar mediante la determinación de ESI-Ion-Trap. También se podrían identificar fragmentos adicionales mediante espectrometría de masas ESI-Ion-Trap (tabla 8).

Tabla 8: Análisis de la estructura por espectrometría de masas ESI-Ion-Trap (modo positivo). El polisacárido positivo de Nuclear-1 purificado se fragmentó por hidrólisis con ácido al 1% durante 1.5 horas a 100°C.

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

5 La secuencia de unidades repetitivas de polisacárido capsular positivo para el Nuclear-1 se determinó mediante la superposición de fragmentos (Figura 6).

Los análisis espectrométricos de masas de polisacáridos positivos al Nuclear-1 digeridos enzimáticamente dieron indicaciones de límites glucosídicos entre los monosacáridos. Además, se pudo identificar la galactosa (división exitosa por beta1-3 galactosidasa) y fucosa (división exitosa por alfa1-3,4 fucosidasa) (figura 7).

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

10.5 Verificación de la estructura del Nuclear-1 como disacárido de ramificación de la unidad repetitiva de polisacárido capsular

15 La ramificación de la estructura del Nuclear-1, Galbeta1-3GalNAc, en la unidad de repetición debe identificarse mediante doble digestión con las exoglicosidasas beta1-3 galactosidasa y HexNAcase (beta1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc escisión) seguido por análisis de monosacáridos como se describe anteriormente.

20 Se filtraron dos muestras que contenían cantidades iguales de polisacárido positivo al Nuclear-1 para purificarlas a partir de monosacáridos libres. Posteriormente, una de las dos muestras se digirió con beta1-3 galactosidasa a 37°C durante la noche. Ambas muestras se filtraron una vez más para separar la galactosa libre de la muestra digerida, mientras que la muestra no digerida se usó como control negativo. Posteriormente, los retenidos se recogieron y se digirieron con HexNAcase. Finalmente, ambas muestras fueron filtradas nuevamente. Todos los eluidos fueron analizados por HPAEC-PAD.

25 Para controlar, si la estructura del Nuclear-1 se eliminó mediante digestión doble pero no se tocó con la digestión con HexNAcase (control negativo), los retenidos se analizaron mediante transferencia de puntos utilizando el kit de detección DIG-Glykan (Roche Diagnostics) para detectar polisacáridos y el anticuerpo Nemod-TF1 específico del Nuclear-1 para identificar la estructura del Nuclear-1.

En ambos eluatos de la muestra de doble digestión, la galactosa (primer eluato) y GalNAc (segundo eluato) pudieron identificarse mediante análisis de monosacáridos. Mientras que, en el eluido de control negativo, que solo se digirió con la exoglucosidasa HexNAcase, no se pudo identificar ni galactosa ni GalNAc. Esta es una fuerte indicación de la estructura del Nuclear-1 ramificada, Galbeta1-3GalNAc.

- 5 Los análisis por inmunotransferencia de puntos del retenido de doble digestión y la muestra digerida con HexNAcase utilizando el kit de detección DIG-Glykan revelaron concentraciones similares de polisacáridos, que se aplicaron en la membrana de nitrocelulosa. La estructura Nuclear-1 ya no se pudo detectar en la muestra doblemente digerida, mientras que en la muestra digerida con HexNAcase, la estructura Nuclear-1 todavía se identificó mediante inmunotransferencia utilizando el anticuerpo Nemod-TF1.

- 10 10.6 Verificación de la estructura del polisacárido positivo para el Nuclear-1 mediante análisis de sus fragmentos separados.

- 15 Para una verificación adicional de la estructura del polisacárido positivo para el Nuclear-1, el glicano se fragmentó por hidrólisis con ácido al 1% (1.5 h, 100°C). Los fragmentos de glicano se marcaron con el fluoróforo 2-amino benzamida (2-AB) como ya se describió por J.C. Bigge et al. (1995). Para este procedimiento, las muestras se volvieron sin partículas y sin sal mediante purificación en la columna Carbograph SPE (Alltech Associates Inc.) y se liofilizaron. El sedimento se disolvió en 5 µl de 2-AB en DMSO/ácido acético glacial/cianoborohidruro de sodio y se incubó a 60°C durante 2 h. Los fragmentos marcados con 2-AB se separaron del 2-AB libre mediante cromatografía en papel. Finalmente, los fragmentos conjugados con 2-AB se eluyeron con agua. Después de la liofilización, el sedimento se disolvió en acetonitrilo al 50%. En función de su tamaño, los fragmentos se separaron mediante HPLC de fase normal (columna: Luna 3NH2 A100, Phenomenex, eluyente A: NH4-acetato 15 mM, eluyente B: acetonitrilo) con detección de fluorescencia. La secuencia de fragmentos se analizó mediante espectrometría de masas ESI. Finalmente, para la verificación de los enlaces glicosídicos y una mejor identificación de los monosacáridos que son componentes de los fragmentos, los oligosacáridos se digirieron con la exoglucosidasa beta1-3 galactosidasa, alfa1-3,4 fucosidasa y HexNAcase como ya se describió anteriormente. El éxito de la digestión se controló mediante espectrometría de masas ESI y la eliminación de los monosacáridos terminales se identificó mediante HPAEC-PAD como ya se describió anteriormente.

La estructura ya identificada de unidades repetitivas de polisacárido positivo para el Nuclear-1 se confirmó mediante ambos análisis que obtuvieron los fragmentos de oligosacáridos esperados y los monosacáridos escindidos (tabla 9).

30

Tabla 9:

Fragmentos de oligosacáridos	Exoglucosidasa	Análisis ESI-MS	Análisis de monosacárido
HexNAc-Hex	beta1-3 galactosidasa	HexNAc	galactosa GalNAc/GalNH2
		Hex	
		HexNAc-Hex	
DesHex-desHex-desHexM	alfa1-3,4 fucosidasa	desHexM	fucosa
		DesHex-desHexM	
		DesHex-desHex	
DesHex-desHex	alfa1-3,4 fucosidasa	desHex	fucosa
DesHex-desHexM-HexNAcM-HexNAc	HexNAcase (alfa1-2,3,4,6 GalNAc/GlcNAc)	HexNAc	n.d
		DesHex-desHexM-HexNAc	

En conclusión, la estructura de las unidades de repetición del polisacárido capsular positivo para el Nuclear-1 (Figura 8) se confirmó mediante una variedad de análisis.

Además, los resultados revelaron (véase también la Figura 19, en particular el #5), que el enlace glicosídico entre la Gal-GalNAc y la molécula de GalNAc de la red troncal es alfa-anomérico. Este hallazgo fue apoyado por análisis de transferencia de puntos con mAbs TF1, TF2 y HH8, que son específicos para el anómero alfa de TF. También se usaron los mAbs A68-E/A2 y A68-E/E3 que son específicos para TFbeta. De este modo, el Ag TFalfa específico del tumor se identificó dentro de la estructura de ramificación del polisacárido capsular de *B. ovatus* AG6.

Ejemplo 11. Modelo animal

11.1 Inmunización intraperitoneal de ratones con bacterias muertas

11.1.1 Análisis de sueros de ratón mediante prueba de respuesta inmune humoral 1

Se trataron ratones hembra Balb/c (Charles River, 4 por grupo) con ciclofosfamida a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal en el día -1. En los días 0, 7 y 14, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 5×10^8 bacterias (cepas AG3 negativas para el Nuclear-1 (grupo I), 32 o 53 o la cepa AG6 positiva para el Nuclear-1 (grupo K)) en PBS o solo con PBS (grupo L). Se tomaron muestras de suero en los días -4, 21, 27 y 30.

Los sueros de ratón se analizaron para determinar su unión al Nuclear-1 en ELISA. Como antígeno portador Nuclear-1 sirvió asialoglicoforina. Como control negativo, se utilizó asialoglicoforina tratada periódicamente con ácido. El tratamiento con peryodato destruye el anillo externo de carbohidratos del Nuclear-1, destruyendo así el epítipo Nuclear-1.

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

La mitad de la placa se trató con peryodato de la siguiente manera:

Los pozos se incubaron durante 5 minutos con un regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5, seguido de una incubación de 1 h con ácido peryódico 10 mM en un regulador de acetato en oscuridad. Los pozos se incubaron durante 5 minutos con un regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5. La reacción se detuvo por incubación con borohidruro de sodio (50 mM en PBS, 30 min). A continuación, las placas se lavaron 5 veces con PBS/Tween.

Las placas se bloquearon luego mediante la adición de BSA al 2% durante 30 minutos.

La incubación con diferentes diluciones de sueros de ratón se realizó durante 1.5 h. La inmunoglobulina de ratón unida se detectó con un anticuerpo IgM anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (1:5000 en PBS/1% BSA). El ensayo se desarrolló con TMB como sustrato y la reacción se detuvo mediante la adición de H_2SO_4 2.5 N.

La Figura 9 muestra la unión de anticuerpos IgM en suero a AGP positivo para el Nuclear-1 y AGP negativo al Nuclear-1 (AGP+PJ). Solo los sueros de tres de 4 ratones inmunizados con bacterias positivas al Nuclear-1 (grupo K) mostraron una fuerte unión a AGP, mientras que la señal se reduce después de la escisión del Nuclear-1 con PJ.

Por lo tanto, las bacterias positivas al Nuclear-1 son capaces de inducir inmunidad humoral dirigida al Nuclear-1 en ratones.

11.1.2 Análisis de sueros de ratón mediante prueba de respuesta inmune humoral 2

Ratones C3H macho (Charles River, 4 por grupo) se inmunizaron intraperitonealmente con 5×10^8 bacterias pasteurizadas de cepas positivas al Nuclear-1 y negativas al Nuclear-1 en 200 µl de PBS en los días 0, 7 y 14. Se recogieron sueros antes de inmunización y en los días 13, 21 y 28 y analizados en la prueba de respuesta inmune humoral 2.

Las placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos se recubrieron con diferentes conjugados de carbohidrato-PAA (GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcalfa-PAA, Fucalfa1-2Galβ1-3GalNAcalfa-PAA, GalNAcalfa1-3Galβ-PAA, Galalfa1-3Gal beta1-3GalNAc alfa1-PAA) a 5 µg/ml en regulador de recubrimiento (8.4 g/l de NaHCO_3 , 3.56 g/l de Na_2CO_3 , pH = 9.49) y se incubaron durante la noche a 4°C.

La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween.

Las placas se bloquearon luego mediante la adición de BSA al 2% durante 30 minutos.

Las incubaciones con diferentes diluciones de sueros de ratón se realizaron durante 1.5 h. La inmunoglobulina de ratón unida se detectó con un anticuerpo IgM anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (1:5000 en PBS/1% BSA). El ensayo se desarrolló con TMB como sustrato y la reacción se detuvo mediante la adición de H_2SO_4 2.5 N.

La Figura 10 muestra el valor medio de las señales ELISA contra el conjugado de PAA Gal beta1-3GalNAc alfa1-PAA en relación con la señal ELISA contra GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcalfa-PAA, para sueros de 4 ratones por grupo en el día 0 (presuero inmune) y el día 21 [la señal de ELISA relativa se calcula después de la ecuación: (señales de ELISA contra Gal beta1-3GalNAc alfa1-PAA) * 100/(señal de ELISA contra GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcalfa-PAA)].

Los sueros se calcularon como positivos si el suero inmune mostró un aumento de al menos el 50% en comparación con el suero preinmune. Se pudo demostrar que solo las cepas AG6 y MU1 positivas al Nuclear-1 indujeron una respuesta inmune humoral específica del Nuclear-1 en ratones.

11.1.3 Análisis de sueros de ratón mediante prueba de respuesta inmune humoral 3

- 5 Se trataron ratones hembra Balb/c (Charles River, 4 por grupo) con ciclofosfamida a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal en el día -1. En los días 0, 7 y 14, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 5×10^8 bacterias (cepas AG3 negativas para el Nuclear-1 (grupo I), 32 o 53 o la cepa AG6 positiva para el Nuclear-1 (grupo K)) en PBS o solo con PBS (grupo L). Se tomaron muestras de suero en los días -4, 21, 27 y 30.

- 10 Se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo para analizar la unión de sueros de ratón a líneas celulares de tumores humanos positivos al Nuclear-1 y negativos al Nuclear-1 (NM-wt y NM-D4, respectivamente; NM-wt es la célula parental de NM-D4 como se describe en los documentos WO2005/017130 A2 y EP1654353, NM-D4 se deposita en el DSMZ bajo DSM ACC2605). Se sedimentaron 3×10^5 células por tubo y el sedimento se resuspendió en 50 μ l de suero murino (diluido 1:50 en PBS/10% FCS), anticuerpo de control o PBS/10% FCS solo. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4°C, se lavaron con PBS y se centrifugaron. A continuación, las células se incubaron con anticuerpo anti-ratón-IgM de cabra conjugado con Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:200 en PBS/10% FCS) durante 20 minutos a 4°C, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS para análisis citométrico de flujo.

- 20 Las figuras 11a y b muestran la unión de anticuerpos IgM de sueros de ratón a las líneas celulares humanas NM-wt (Negativo al Nuclear-1) y NM-D4 (positivo al Nuclear-1). Mientras que la unión a la línea NM-wt negativa al Nuclear-1 es comparable entre los ratones inmunizados con las bacterias negativas del Nuclear-1 (grupo I) y las bacterias positivas al Nuclear-1 (grupo K), existe una unión significativamente más fuerte de 3 de 4 ratones desde el grupo K hasta la línea NM-D4 positiva al Nuclear-1. Esto es indicativo de la especificidad del Nuclear-1 de la respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con bacterias positivas al Nuclear-1.

11.1.4 Análisis de sueros de ratón mediante pruebas de respuesta inmune humoral 1, 2 y 3

- 25 Se inmunizaron ratones C3H (Charles River, 4 ratones por grupo) intraperitonealmente con 1×10^9 bacterias pasteurizadas de *Bacteroides ovatus* de la cepa *Bacteroides ovatus* MU-1 positiva al Nuclear-1, cepa LH2 de *E. coli* positiva a A68-BA11 y cepas de *E. coli* negativas al Nuclear-1 (AG3, *E. coli* O86 DSMZ 8697 = 32) en 200 μ l de PBS en los días 0, 7 y 14. Se recogieron sueros antes de la inmunización y en los días 13, 21 y 28 y se analizaron en pruebas de respuesta inmune humoral. 1, 2 y 3 como se describe anteriormente.
- 30 Mientras que la cepa AG3 fue negativa para todas las pruebas de respuesta inmune humoral, el suero recolectado de ratones después de la inmunización con las cepas *E. coli* O86 y LH2 mostró anticuerpos reactivos a AGP en HIRT 1. Sin embargo, solo la cepa MU-1 positiva para el Nuclear-1 mostró una fuerte respuesta inmune humoral específica anti-Nuclear-1 contra el Nuclear-1 en conjugados de PAA (HIRT 2) y en células tumorales humanas (HIRT 3) además de la inducción de anticuerpos específicos de AGP en HIRT.
- 35 Por lo tanto, podríamos inducir una fuerte respuesta inmune humoral específica del Nuclear-1 solo con un microorganismo positivo al Nuclear-1 del *Bacteroides ovatus* (MU-1).

Las figuras 11 c a e muestran los resultados.

11.2. Inmunización oral de ratones libres de gérmenes con bacterias positivas al Nuclear-1 vivas

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

- 45 Los ratones inmunizados mostraron un aumento de los títulos anti-Nuclear-1 en comparación con los ratones de control como se muestra mediante la unión de sueros de ratón a placas de microtitulación recubiertas con AGP. La detección de IgM de ratón unida se realizó con anticuerpos anti-IgM de ratón acoplados a peroxidasa. La especificidad de la señal para el Nuclear-1 se demostró por la disminución de la señal ELISA después del tratamiento con ácido peryódico (destruyendo la estructura de carbohidrato). Después de 14 o 21 días, 3 de 3 ratones tenían niveles elevados de anticuerpos IgM para el Nuclear-1 mientras que los ratones de control no mostraron un aumento de las señales de ELISA a AGP en comparación con AGP +PJ como se muestra en la Figura 12.

- 50 11.3 Inmunización oral de ratones convencionales con bacterias pasteurizadas y vivas positivas al Nuclear-1

Se inmunizaron ratones C3H por vía oral con 1×10^{11} (grupo A) o 1×10^{10} (grupo B) bacterias pasteurizadas de la cepa AG6 diariamente en los días 0 a 28. Se tomaron muestras de suero en el día -1 (sueros preinmunes) y en los días 13, 21, 28 y 35 y se analizaron los anticuerpos IgM específicos de AGP en la prueba de respuesta inmune humoral 1.

El suero recolectado de ratones después de la inmunización mostró un aumento de los títulos como se muestra mediante la unión de sueros de ratón a placas de microtitulación recubiertas con GP o AGP (con y sin tratamiento con ácido peryódico). La detección de IgM de ratón unida se realizó con anticuerpos anti-IgM de ratón acoplados a peroxidasa. La especificidad de la señal para el Nuclear-1 se demostró por la disminución de la señal ELISA después del tratamiento con ácido peryódico (destruyendo la disminución de la estructura de carbohidratos de al menos un 30%) y por la señal más baja contra GP (aumento de la señal de AGP de al menos 50%).

Se demostró que 5 de 6 ratones del grupo A y 5 de 8 ratones del grupo B habían desarrollado anticuerpos específicos para el Nuclear-1 el día 21 (Figura 13).

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

Los resultados se calcularon siguiendo la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\% \text{ células positivas a NM-D4}_{\text{suero inmune}} - \% \text{ células positivas a NM-D4}_{\text{suero preinmune}}}{\% \text{ células positivas a NM-wt}_{\text{suero inmune}} - \% \text{ células positivas a NM-wt}_{\text{suero preinmune}}} \right) = X$$

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

En el día 28, 11 de 13 ratones habían desarrollado una respuesta inmune humoral contra la línea celular de tumor humano Nuclear-1 NM-D4 como se muestra en la Figura 14.

En el ensayo de respuesta inmune humoral, se analizaron 2 sueros del día 28 para determinar su unión a Gal β 1-3 GalNAc a -PAA (PAA 48) o Gal β 1-3 GlcNAc a -PAA (PAA 43).

Se recubrieron placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos con Gal β 1-3 GalNAc a -PAA (PAA 48) o Gal β 1-3 GlcNAc a -PAA (PAA 43) a 5 μ g/ml en regulador de recubrimiento (8.4 g/l NaHCO₃, 3.56 g/l de Na₂CO₃, pH=9.49) y se incubaron durante la noche a 4°C. Después del bloqueo, se realizaron incubaciones con los sueros durante 1.5 horas. La inmunoglobulina de ratón unida se detectó con un anticuerpo IgM anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (1:5000 en PBS 1% BSA). El ensayo se desarrolló con TMB como sustrato y la reacción se detuvo mediante la adición de H₂SOP₄ 2.5N.

Los resultados se muestran en la Figura 21. Se mostró que 5 de 13 ratones habían desarrollado anticuerpos específicos para el Nuclear-1 el día 28.

Ejemplo 12. Potencial de bacterias positivas al Nuclear-1 para la inducción de una respuesta inmune celular (in vitro)

12.1 Generación de células dendríticas funcionales.

La línea celular dendrítica NemodDC (pNM-DC) se ha usado como fuente para células presentadoras de antígeno (APC). Las pNM-DC se diferenciaron en iNM-DC, seguídas de la carga con lisados bacterianos (BaLy) de las siguientes cepas de bacterias: AG6, MU1, 52 y 53. Se añadieron 50 μ g/ml de cada BaLy junto con citoquinas de maduración al medio de cultivo y iNM-DC se diferenciaron a su estado de madurez (mNM-DC).

Más detalladamente, en la primera etapa, se diferenciaron pNM-DC (1×10^5 /ml) en iNM-DC mediante incubación de 7 días en medio NemodDC (70% MEM-alfa, 20% FCS, 10% CM5637) con adición de 1000 U/ml de GM-CSF, 100 U/ml de IL-4 y 2.5 ng/ml de TNF-alfa. A continuación, se cargaron 1×10^6 /ml de NM-DC inmaduro (iNM-DC) con lisados de bacterias (50 μ g/ml), lisados de células tumorales (1×10^6 células tumorales lisadas para cargar en 1×10^6 NM-DC) o proteínas AGP y GP (20 μ g/ml) y se maduró durante 2 días mediante la adición de 75 ng/ml de TNF-alfa.

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

12.2 Generación de células T activadas contra el Nuclear-1 y detección de GM-CSF (prueba de respuesta inmunitaria celular 1) y TNF-alfa (prueba de respuesta inmunitaria celular 2) mediante ELISA

Después de 7-10 días de cebado de linfocitos T con NM-DC cargados con lisados bacterianos positivos al Nuclear-1, las células T resultantes (0.7×10^6 /ml) se reestimularon con mNM-DC (1×10^5 /ml) cargados con lisados de células

tumorales positivas al Nuclear-1 (50 µg/ml). Después de 48 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron utilizando la evaluación de la producción de citoquinas en respuesta a la línea de células tumorales positivas al Nuclear-1 humanas NM-D4, los kits GM-CSF y TNF-alfa-BD OptEIA™.

5 Las placas de 96 pozos se recubrieron previamente con 50 µl de anticuerpos anti-humanos de captura apropiados (GM-CSF o TNF-alfa) diluidos 1:250 en regulador de recubrimiento. Después de lavar y bloquear los pasos, se agregaron 100 µl de sobrenadantes o estándares a los micropozos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la curva estándar, el GM-CSF humano recombinante en concentraciones 0; 7.8; 15.6; 31.2; 62.5; 125; 250 pg/ml y el TNF-alfa humano recombinante en concentraciones 0; 4.7; 9.4; 18.8; 37.5; 75; 150; se utilizaron 300 pg/ml. Después del lavado, se agregaron 100 µl de solución de Working Detector preparada por pozo y la placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente. En la siguiente etapa, se agregaron 100 µl de reactivo de sustrato de un se utilizaron solo paso TMB por pozo. Después de la incubación final durante 30 minutos y la adición de 50 µl de Stop Solution, se leyeron las extensiones a 450 nm.

15 Los resultados demostrados en las figuras 15A y B muestran una clara evidencia de que las células T generadas en lisados de bacterias positivas al Nuclear-1 son capaces de reconocer las DC cargadas con células lisadas celulares positivas al Nuclear-1 de la línea celular humana NM-D4 por la producción citoquinas inhibitorias de tumores tales como TNF-alfa y GM-CSF. En contraste, se liberó un nivel muy bajo de citoquinas en respuesta a lisados celulares negativos al Nuclear-1. Además, este reconocimiento se inhibió específicamente a través de la preincubación de NM-DC cargada con lisado con un anticuerpo específico Nuclear-1.

20 12.3 Ensayo ELISPOT para la evaluación de la secreción de IFN-gamma por linfocitos T activados dirigidos contra el Nuclear-1 (prueba de respuesta inmune celular 2)

Se utilizó el ensayo ELISpot para evaluar la secreción de IFN-gamma en respuesta a la estimulación específica de antígeno. Este ensayo permite la cuantificación de la capacidad funcional de las células T presensibilizadas para reconocer los antígenos Nuclear-1 de una manera específica para el antígeno.

25 Los linfocitos T se activaron primero in vitro al ser cocultivados con DC cargadas con lisados bacterianos. Después de 7 a 10 días de cebado, las células T activadas se recolectaron y se volvieron a estimular con DC (en una proporción de células T a DC 10:1) cargadas con lisados de células tumorales humanas positivas al Nuclear-1 (NM-D4) y negativas al Nuclear-1 (NM-wt).

30 Los pozos de la placa ELISpot se recubrieron previamente con anticuerpo de ratón anti-humano-IFN-gamma (Mabtech-Kit) que se une a la base de nitrocelulosa de la placa ELISpot. Las células T redesafiadas fueron transferidas a los pozos, y las citoquinas se liberan durante el período de incubación. El IFN-gamma que se libera localmente alrededor de cada célula T se une a, y por lo tanto es "capturado" por el anticuerpo específico. Después de 24 horas de incubación se retiraron las células. Un segundo anticuerpo anti-humano-IFN-gamma en concentración 1 µg/ml se agrega a los pozos; este anticuerpo biotinilado se acopla a una enzima que es capaz de convertir un sustrato en un producto coloreado insoluble. Las placas se lavan una vez más y se agrega estreptavidina conjugada con enzima-AP en una concentración de 1 µg/ml. Finalmente, se agrega un sustrato precipitante BCIP+NBT y la placa se incuba hasta que surgen puntos al lado de las células T que responden. Las manchas de color se cuentan y analizan mediante un sistema de imágenes digitales.

40 Los resultados mostraron que las células T generadas en lisados bacterianos positivos para Nuclear-1 (AG6 y MU1) son capaces de reconocer DC cargadas con lisado de células positivas al Nuclear-1 de la línea celular humana de tumores NM-D4 mediante la producción de citoquina inhibidora de tumores IFN-gamma (Figura 16). Se liberó un nivel muy bajo de citoquinas en respuesta a lisados celulares negativos a Nuclear-1 (R+DC/wt). Además, la especificidad del reconocimiento de lisado celular positivo al Nuclear-1 (R+DC/D4) se demostró mediante el bloqueo de la liberación de citoquinas con el anticuerpo específico para el Nuclear-1 Nemod-TF1 (R+DC/D4+Ak).

12.4 Prueba de respuesta inmune celular 3: Ensayo de proliferación de células T

45 Las células T sensibilizadas y reestimuladas como se describió anteriormente para el análisis ELISpot, se transfirieron después de la incubación de la placa ELISpot a una placa de 96 pozos y se analizaron utilizando el Reactivo de Proliferación Celular colorimétrico WST-1 (Roche Molecular Biochemicals), cuya sal de tetrazolio es escindida por enzimas mitocondriales de modo que la cantidad de colorante desarrollado (leída a 450 nm) se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. La absorbancia del medio de cultivo más wst-1 en ausencia de células fue la posición del blanco para el lector de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. El procedimiento consiste en la adición en un solo paso de 10 µl por pozo de reactivo de proliferación WST (Roche) y la incubación durante 3 horas a 37°C después de la medición a 450 nm.

55 Los resultados demostrados en la Figura 17, muestran una clara evidencia de que las células T generadas en lisados de bacterias positivas al Nuclear-1, reconocen las DC cargadas con lisado de células positivas al Nuclear-1 de la línea celular de tumores humanos NM-D4 como lo muestra la proliferación específica. Además, este reconocimiento se inhibió específicamente a través de la preincubación de NM-DC cargada con lisado con anticuerpo específico del Nuclear-1.

12.5 Prueba de respuesta inmune celular 4: Prueba de inmunofluorescencia para la presentación del Nuclear-1 en DC cargadas con lisados bacterianos.

Con el fin de analizar el procesamiento y la presentación del Nuclear-1 por NM-DC cargado con lisado bacteriano, se realizaron análisis de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales específicos del Nuclear-1 (Nemod-TF1, NEMOD-TF2). La presentación del antígeno Nuclear-1 procesado en la superficie de las DC maduras se demostró con la ayuda de la inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia (IF) es una técnica que permite la visualización de un antígeno específico (Nuclear-1) en las células al unir un anticuerpo Nuclear-1 específico luego de la adición de un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo, que se utiliza para reconocer un anticuerpo primario.

- 5
- 10 En la primera etapa, se diferenciaron pNM-DC (1×10^5 /ml) en iNM-DC mediante incubación de 7 días en medio NemodDC (70% MEM-alfa, 20% FCS, 10% CM5637) con adición de 1000 U/ml de GM-CSF, 100 U/ml de IL-4 y 2.5 ng/ml de TNF-alfa a continuación, se cargaron 1×10^6 /ml de NM-DC inmaduro (iNM-DC) con lisados de bacterias (50 µg/ml), lisados de células tumorales (1×10^6 células tumorales lisadas para cargar en 1×10^6 NM-DC) o proteínas AGP y GP (20 µg/ml) y maduras durante 2 días mediante la adición de 75 ng/ml de TNF-alfa.
- 15 Las DC maduras y cargadas con antígeno se lavaron y se colocaron 1×10^6 células por 50 µl en la placa de microtitulación para la tinción por inmunofluorescencia. Se incubaron 3 µg/ml de anticuerpo específico del Nuclear-1 (Nemod-TF1) diluido en medio de cultivo (FCS al 10%) con suspensión celular durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar los pasos 50 µl de IgM anti-ratón secundario de cabra diluida 1:200, se agregaron Ab (Jackson/Dianova) marcados con Cy3 y se incubaron durante 30 minutos. Después de los pasos de lavado, se
- 20 colocaron 20 µl de suspensión celular en cada pozo de un portaobjetos Multitest (10 pozos, Roth).

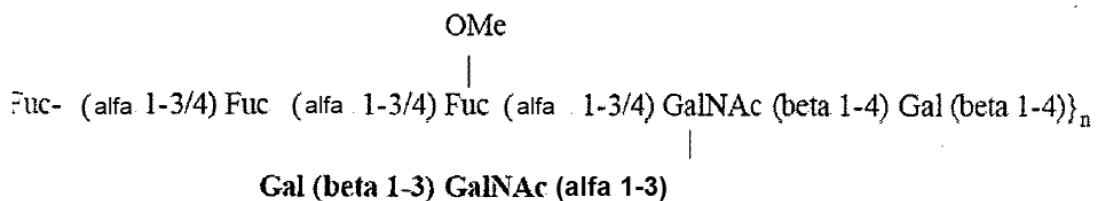
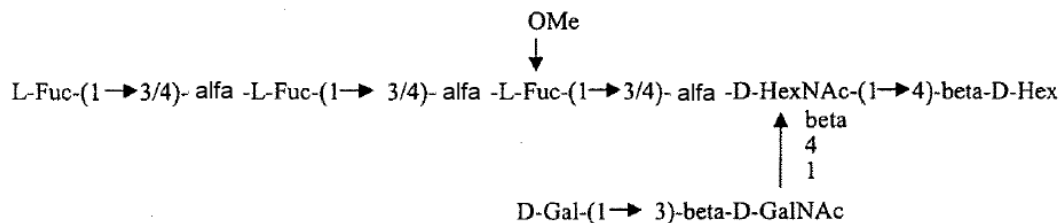
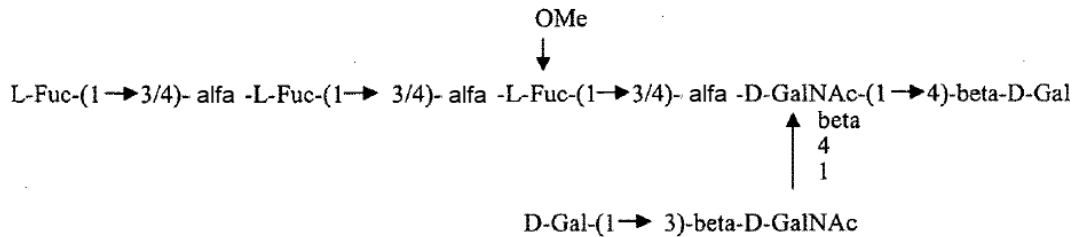
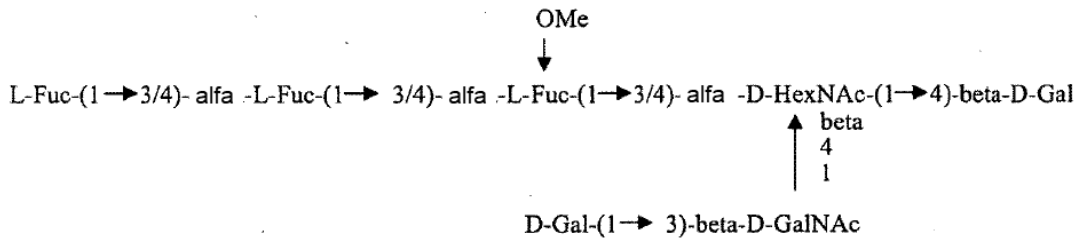
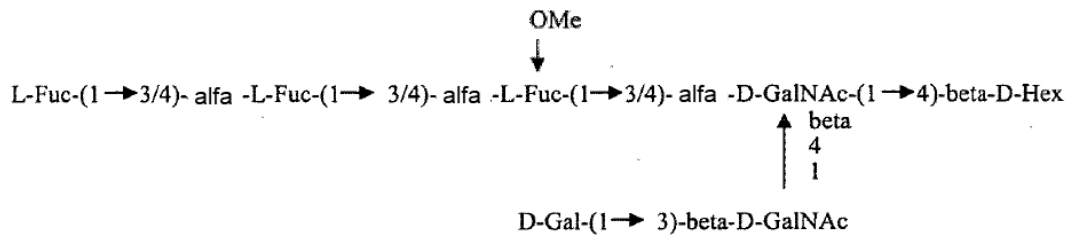
Las muestras teñidas con inmunofluorescencia se examinaron con un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 equipado con la cámara digital AxioCam (Zeiss).

La Fig. 18 muestra una tinción específica positiva para el Nuclear-1 de la mNM-DC madura, que han procesado lisados positivos para AG6 y NM-D4-Nuclear-1; e inmunofluorescencia negativa en mNM-DC cargada con lisados negativos al Nuclear-1 (AG3 y NM-wt)

25

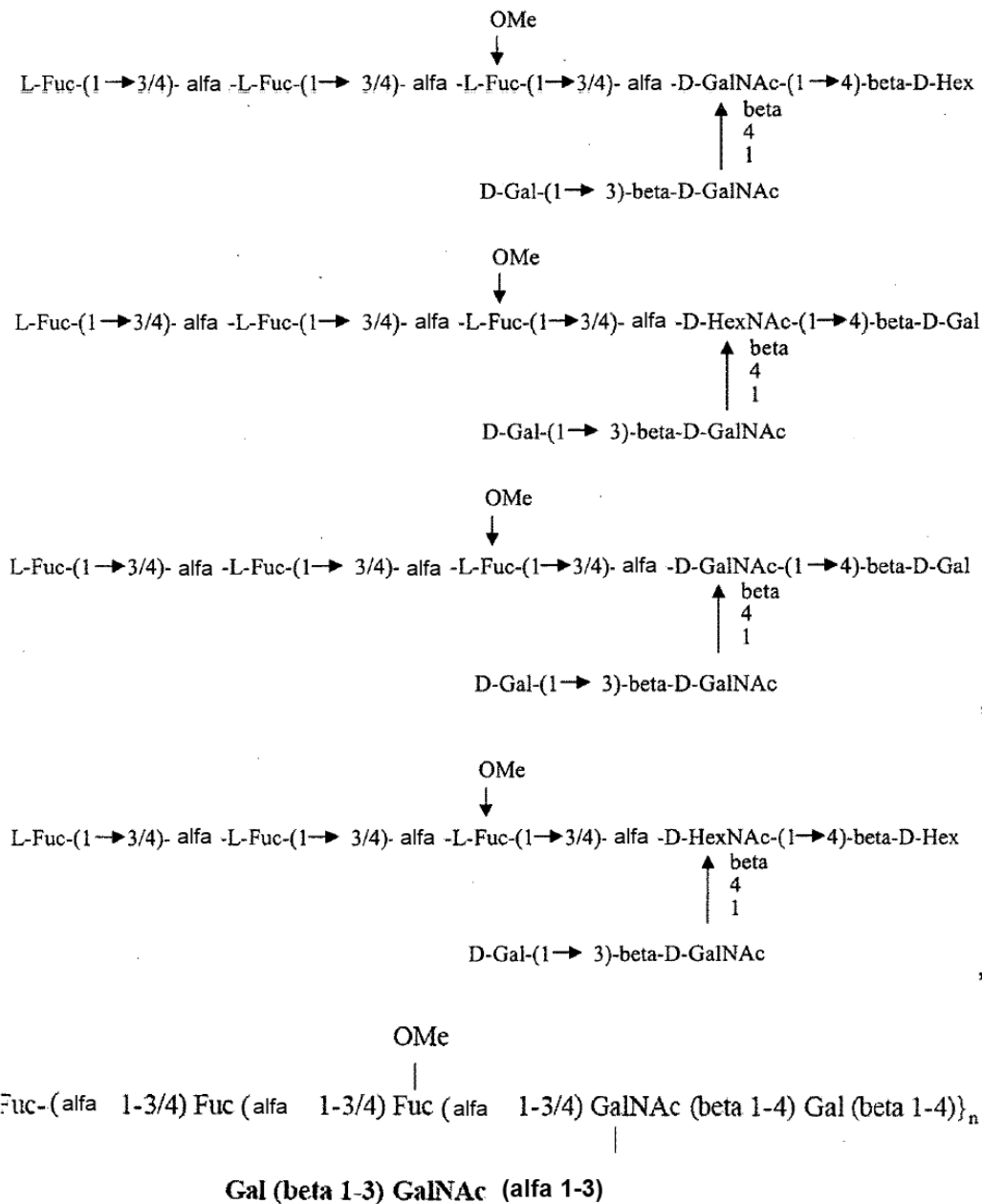
REIVINDICACIONES

1. Una formulación seleccionada del grupo que consiste en una composición nutracéutica y/o farmacéutica, que comprende al menos un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides y/o al menos una fracción positiva al Nuclear-1 o un lisado del mismo, en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su lisado son reconocidos por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1; en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o la fracción positiva al Nuclear-1 o su lisado por al menos un anticuerpo específico del Nuclear-1 es sensible a la peryodación y muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato.
2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 o la fracción de dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 comprende al menos una de las estructuras de carbohidrato seleccionadas del grupo que consiste en las estructuras



y unidades repetidas de los mismos.

3. Un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides y/o una fracción positiva al Nuclear-1 o un lisado del mismo para usar en un método para tratar o prevenir un tumor; en donde el microorganismo positivo al Nuclear-1 es reconocido y, por lo tanto, se une por al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 al contacto, y en donde el reconocimiento del microorganismo positivo al Nuclear-1 por el al menos un anticuerpo específico para el Nuclear-1 es sensible al peryodato y muestra una unión reducida después del tratamiento con peryodato.
- 5 4. El microorganismo positivo al Nuclear-1 para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho microorganismo comprende al menos una de las estructuras de carbohidratos seleccionadas del grupo que consiste en las estructuras



10

y unidades repetidas de los mismos.

5. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para uso en un método para inducir o mejorar una respuesta inmune humoral y/o celular específica contra el Nuclear-1, el antígeno Nuclear-1 o células tumorales positivas al Nuclear-1, que comprende administrar a un humano o animal, una cantidad efectiva de dicha formulación, dicho microorganismo positivo al Nuclear-1 y/o dicha fracción positiva al Nuclear-1 o un lisado de los mismos.
- 5 6. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para uso en un método para inducir o mejorar una respuesta inmune específica del Nuclear-1 en al menos un ser humano o animal cuando se administra, y/o para uso en un método para reducir o prevenir la aparición de un tumor o metástasis positivo al Nuclear-1, y/o para usar en un método para reducir o prevenir la diseminación o metástasis de un tumor positivo al Nuclear-1, y/o para usar en un método para fortalecer el sistema inmunológico y/o mejorar una respuesta inmune.
- 10 7. Un método para aislar un microorganismo positivo al Nuclear-1 del género Bacteroides de una mezcla de microorganismos, que comprende
- (a) poner en contacto un anticuerpo específico del Nuclear-1 con una mezcla de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en microorganismos de un humano y/o paciente saludable, un animal, suelo, alimentos y/o plantas, y/o microorganismos del tracto gastrointestinal humano, heces humanas, sangre humana, tejido humano y/o fluidos corporales humanos de individuos y/o pacientes sanos; y
- 15 (b) aislar un microorganismo del género Bacteroides unido por dicho anticuerpo específico del Nuclear-1; y
- (c) seleccionar el microorganismo que muestra una unión reducida del anticuerpo específico del Nuclear-1 después del tratamiento con peryodato.
- 20 8. Un método para generar una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1, que comprende poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas con una cantidad adecuada de microorganismos positivos al Nuclear-1 como se define en las reivindicaciones 3 o 4 y/o un lisado positivo al Nuclear-1 o fracción del mismo para generar al menos una célula dendrítica funcional contra el Nuclear-1.
9. Un método para generar una célula T activada, células T, clon de células T o línea de células T contra el Nuclear-1, que comprende
- 25 - poner en contacto una cantidad adecuada de células dendríticas funcionales contra el Nuclear-1 obtenida por el método de acuerdo con la reivindicación 8 con una cantidad adecuada de al menos una célula T; y
- cultivar dichas células T junto con dichas células dendríticas funcionales cargadas para activar o cebar dichas células T contra el Nuclear-1.

Figura 1

```

+MU1
!
! +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 17.4 AY319392
!
! +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 0633 AY895186
!
! +7
!
! +11 +8 +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 8713 AY895202
!
! !!
!
! +9 +Bacteroides thetaiotaomicron BNRRR16SB M58763
!
! !!!
!
! +10 +Bacteroides thetaiotaomicron cepa 3751 AY895192
!
! !
!
+20 ! +Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29148 BNRRR16SAF L16489
!!
!!
!! +Bacteroides acidifaciens AB021156
!!
!! +18 +2
!!!! +Bacteroides acidifaciens cepa A1 AB021158
!!!!
!!!! +5
!!!! +Bacteroides acidifaciens cepa A32 AB021162
!!!!
!!!! +4
!!!! +12 +Bacteroides acidifaciens cepa A29 AB021160
!!!!
!!!! +3
!!!! +Bacteroides acidifaciens cepa A40 AB021164
!!!!
!!!!
!!!! +13 +Bacteroides caccae ATCC 43185T BC16S X83951
!!
!! +19
!
! ! +Bacteroides fragilis BNRRGDAM11656
+22 ! +6
!!
!! +Bacteroides distasonis BNRRR16S M86695
!!
!! +-1
!!
!! +-----Escherichia coli ATCC 11755T ECAT1177T X80725
!!
!!
!! +Bacteroides ovatus AB050108
!!
!! +14
!!
!! +15 +Bacteroides ovatus ATCC 8438T B016S X83952
!!
!!
!! +17 +Bacteroides ovatus NCTC 11153 L16484 BNRRR16SAA
!!
!!
!! +Bacteroides ovatus cepa 3941 AY895193
!!
!! +16
!!
!! +Bacteroides ovatus cepa 4140 AY895197
!!
!!
!! +Bacteroidaceae bacterium Smarlab AY538687
!!
!! +Bacteroides sp. WH302 AY895184
23-21
!! +Bacteroides sp. WH305 AY895185
!!
!!
+AG6

```

Figura 2

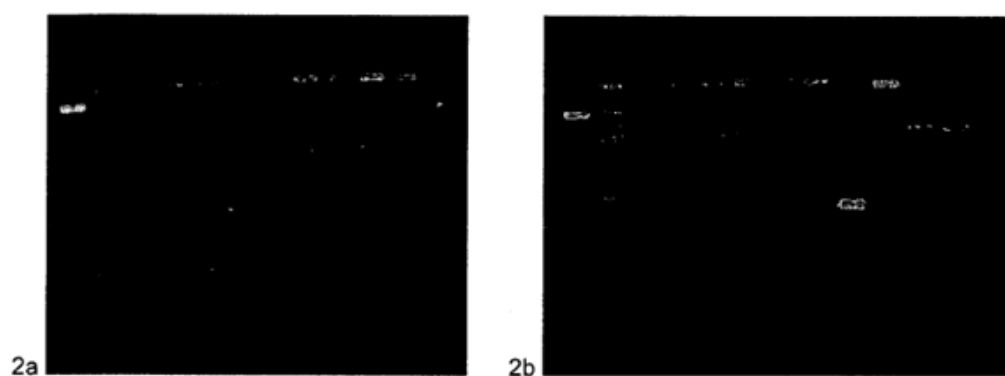


Figura 3

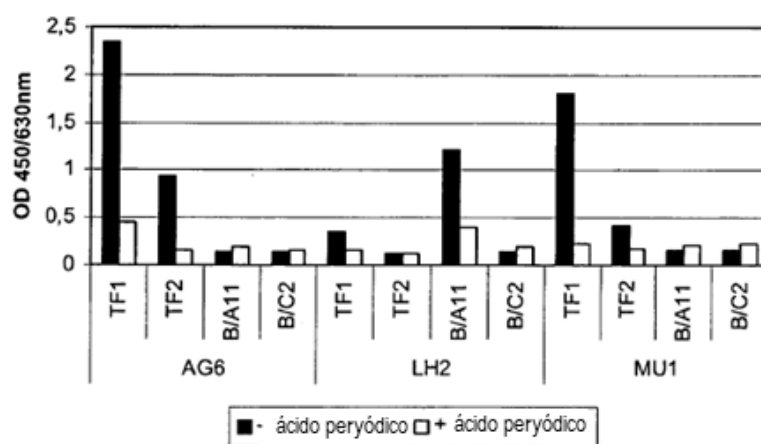


Figura 3a

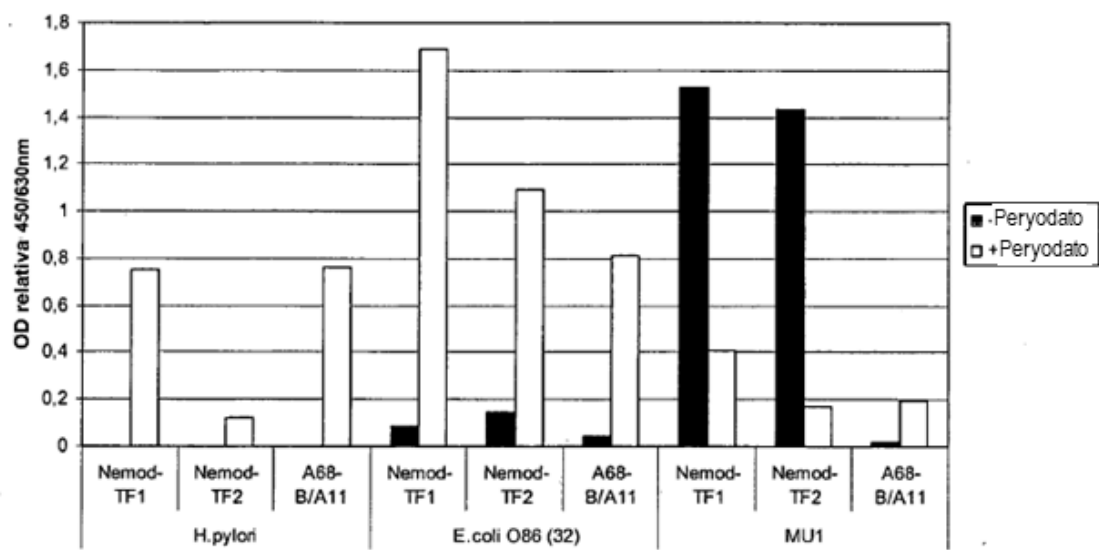


Figura 4

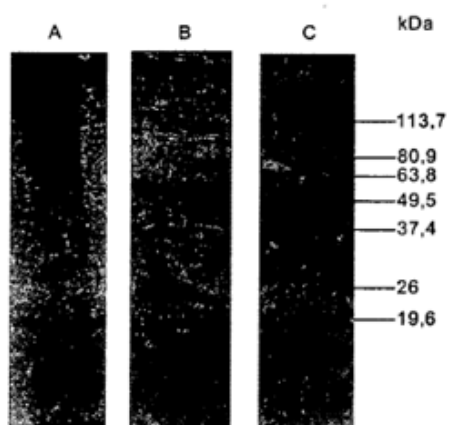


Figura 5

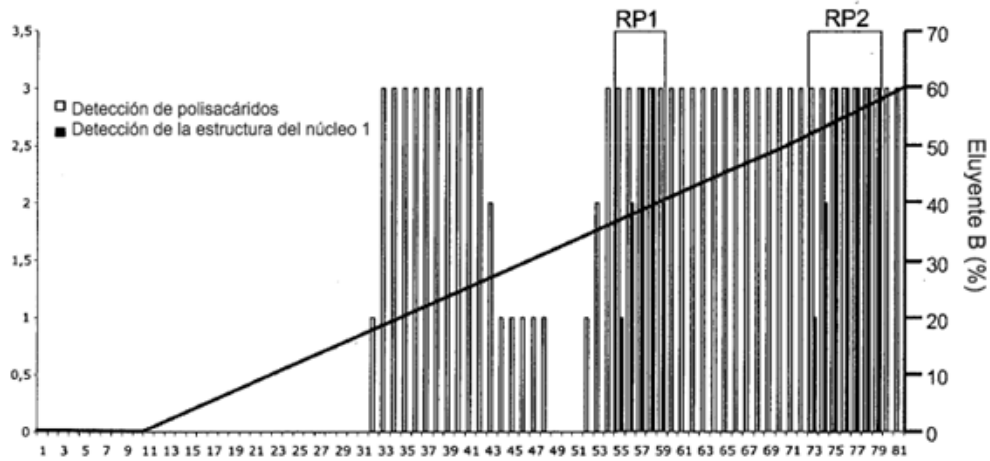


Figura 6

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

Figura 7

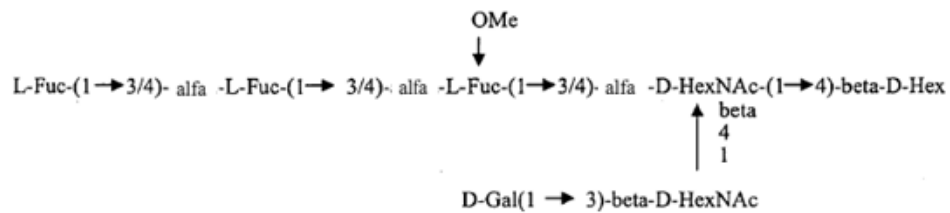


Figura 8

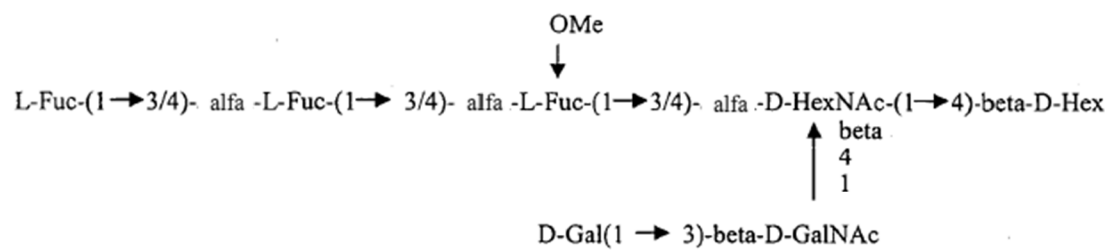


Figura 9

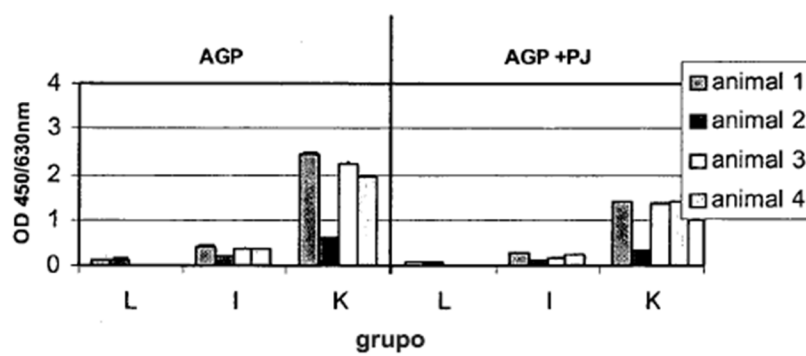
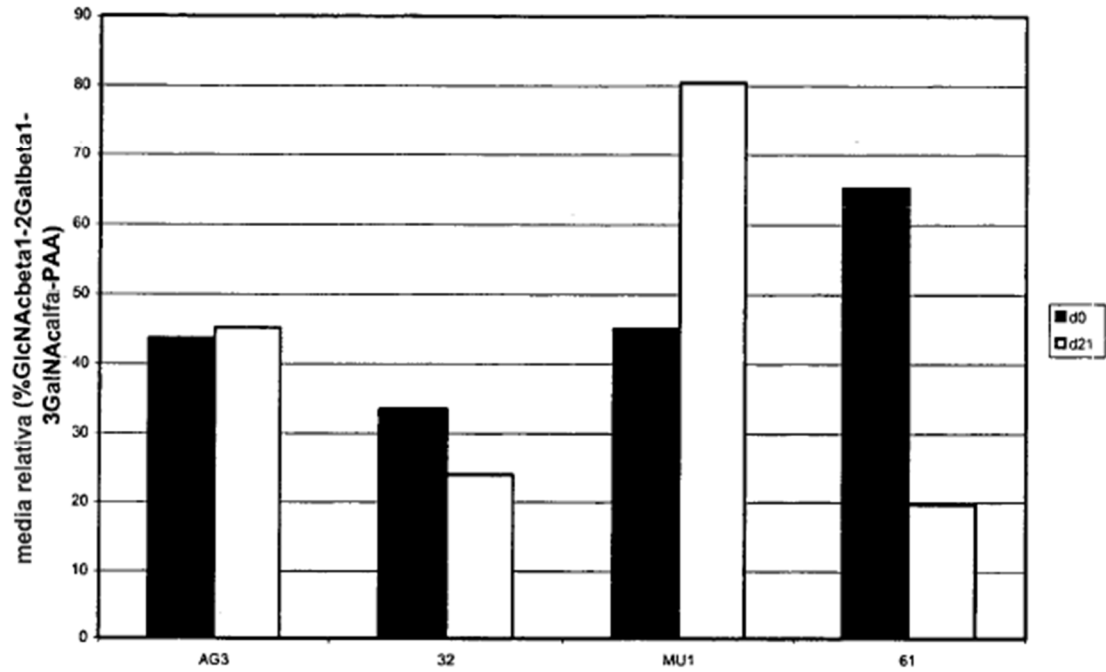


Figura 10

A)



B)

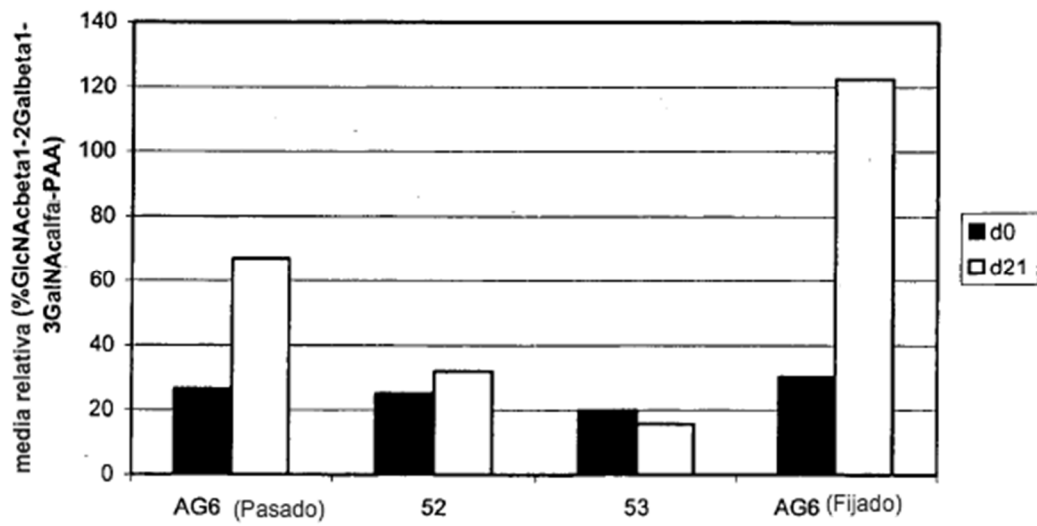
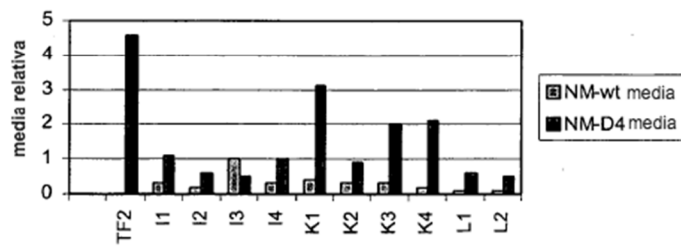
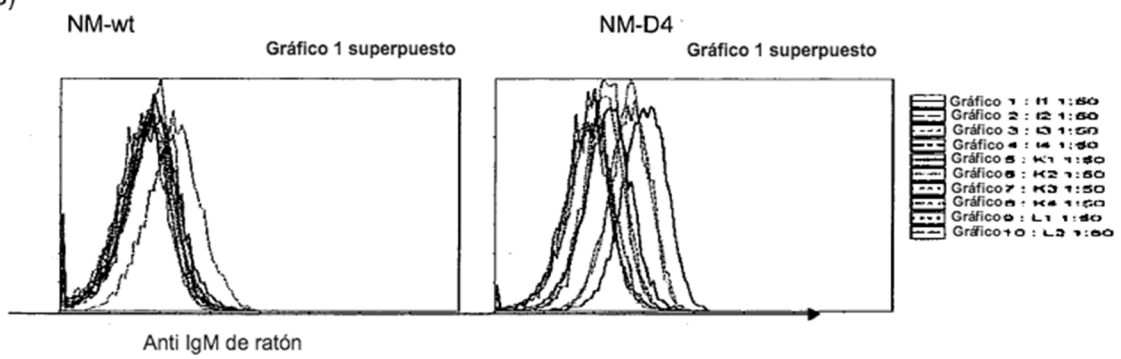


Figura 11

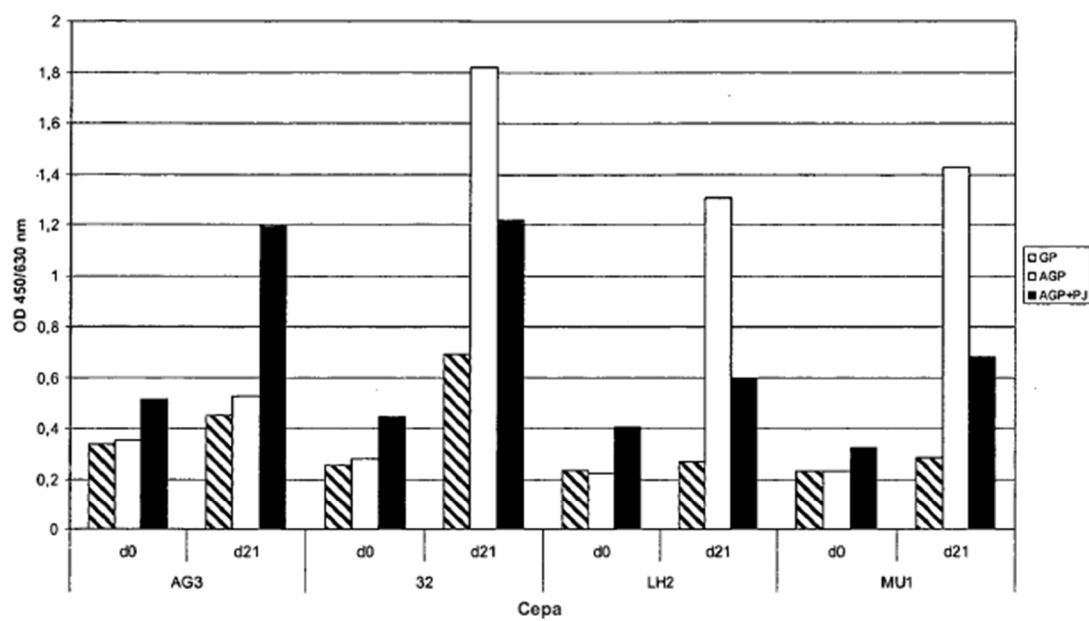
A)



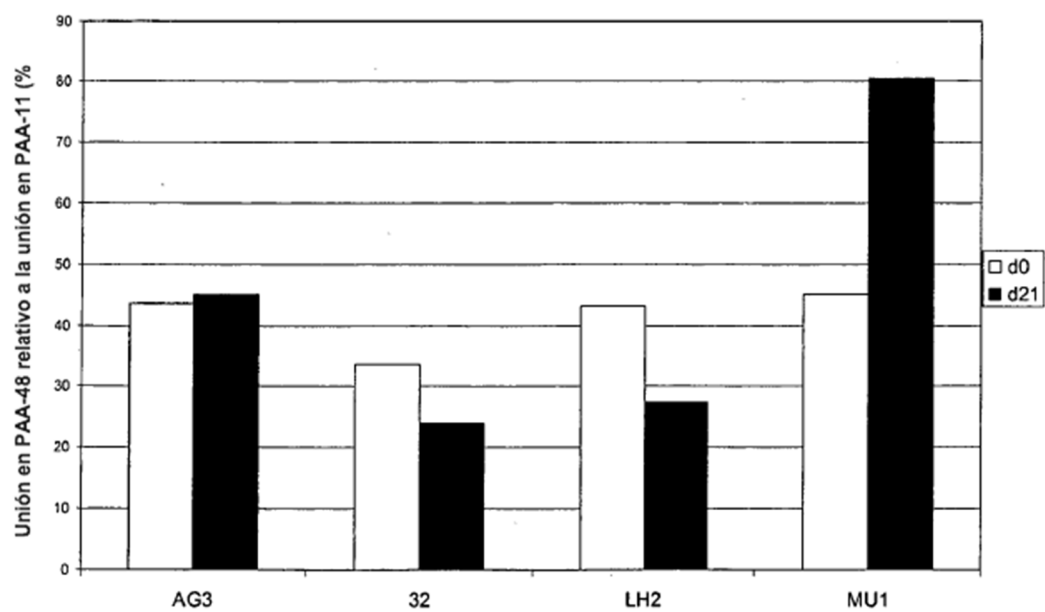
B)



C.)



D.)



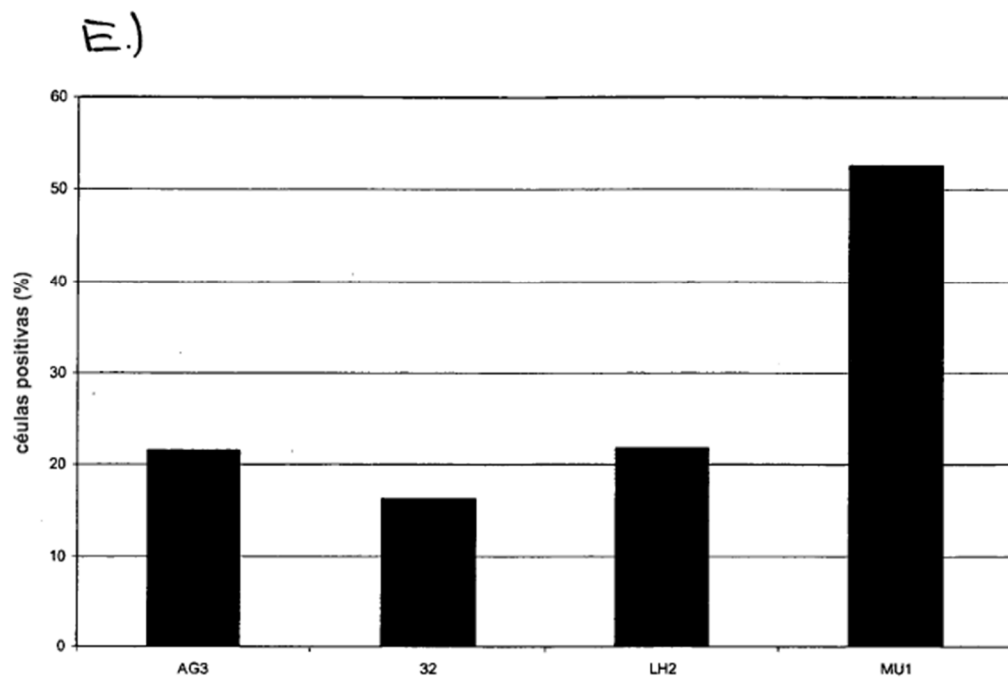


Figura 12

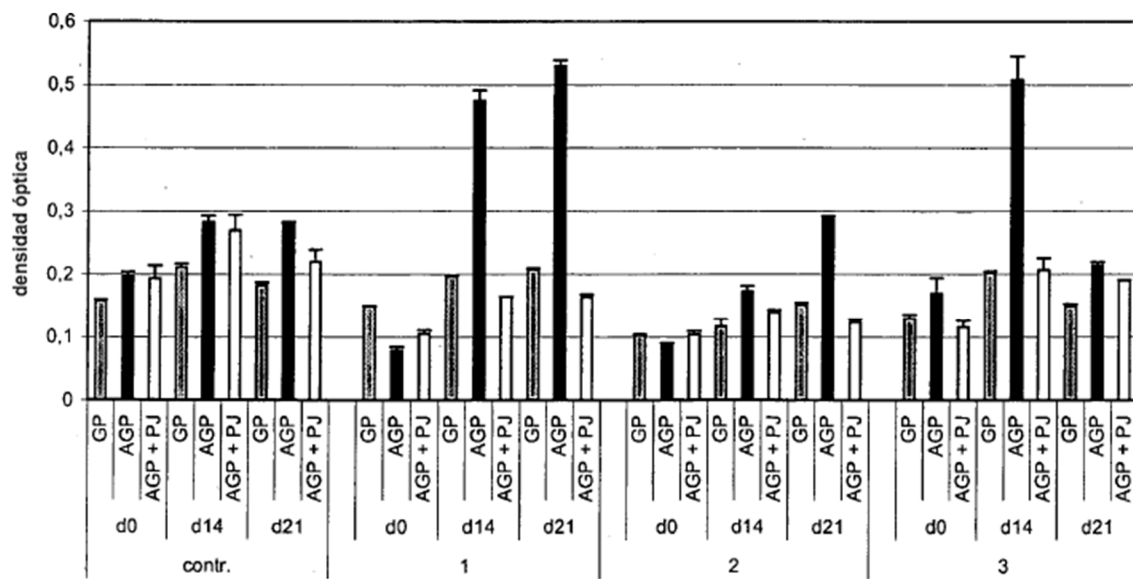
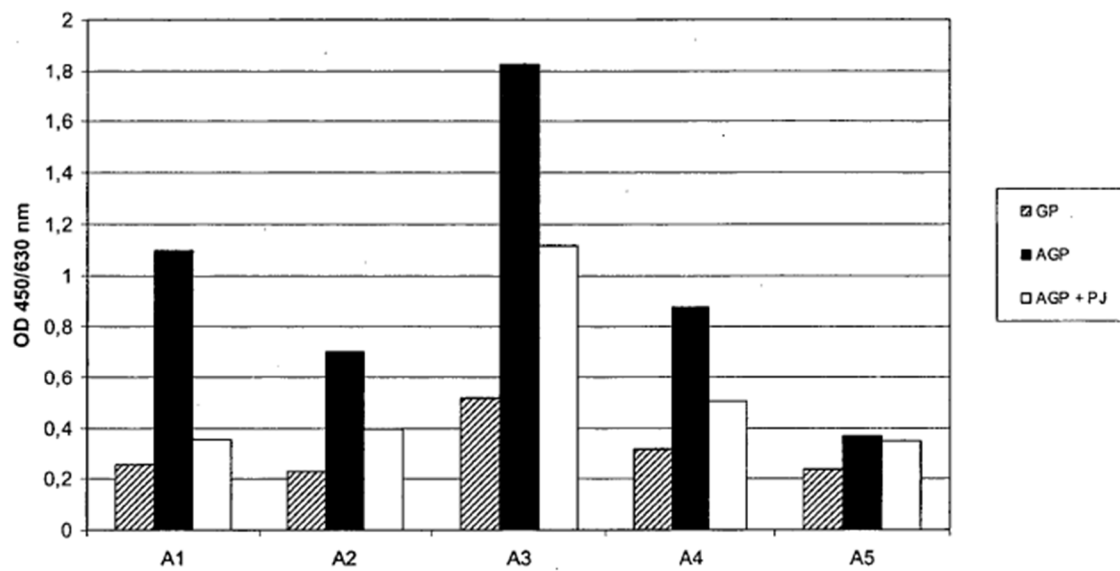


Figura 13

A)



B)

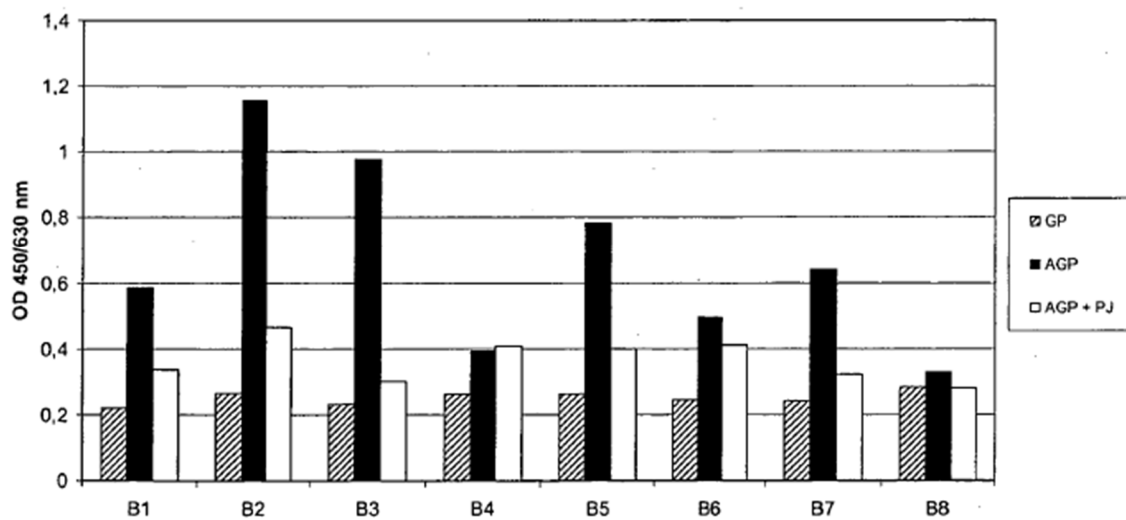


Figura 14

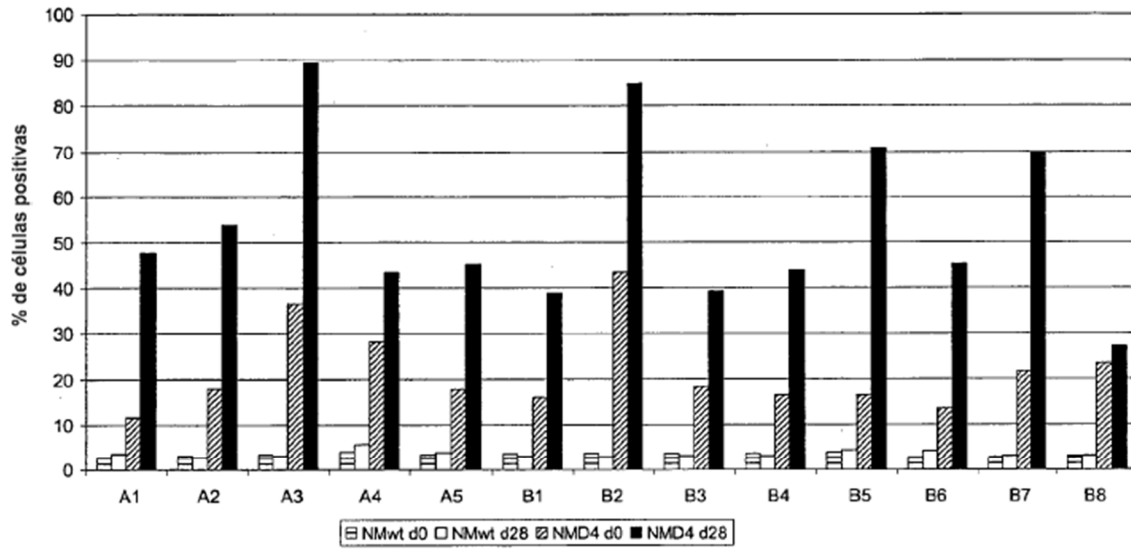


Figura 15

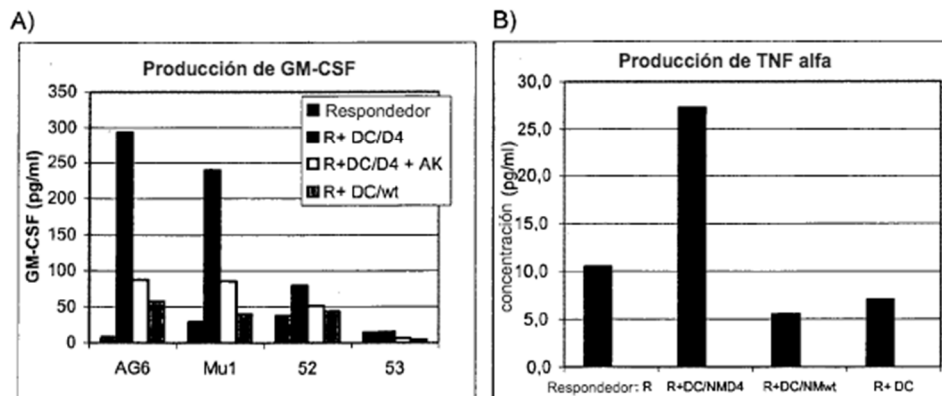


Figura 16

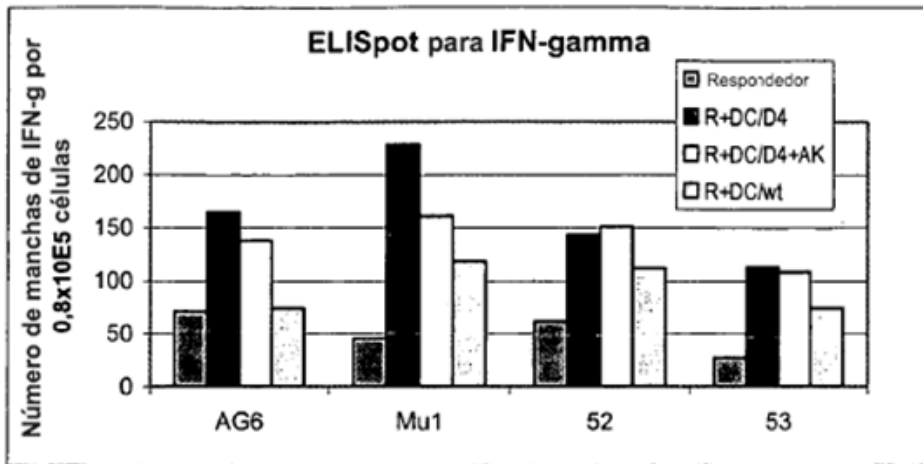


Figura 17

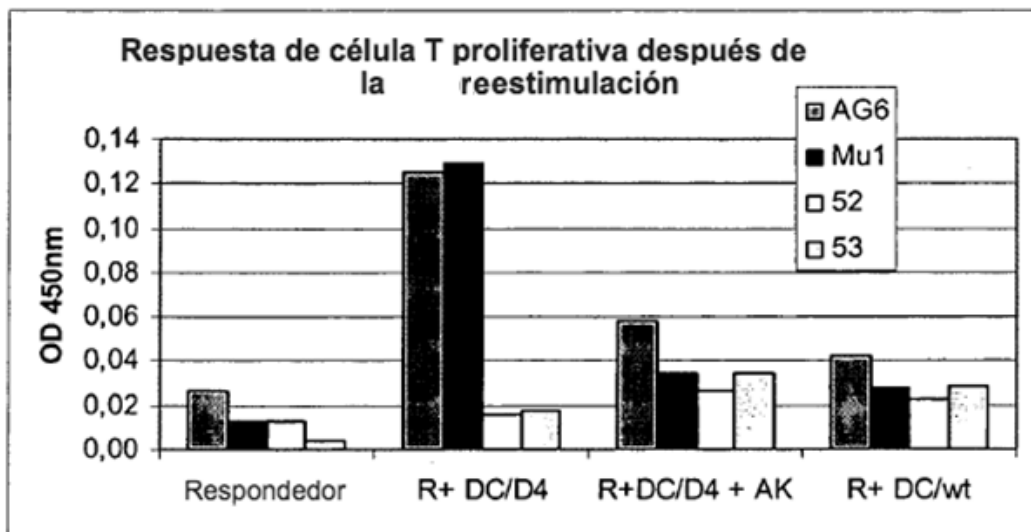


Figura 18

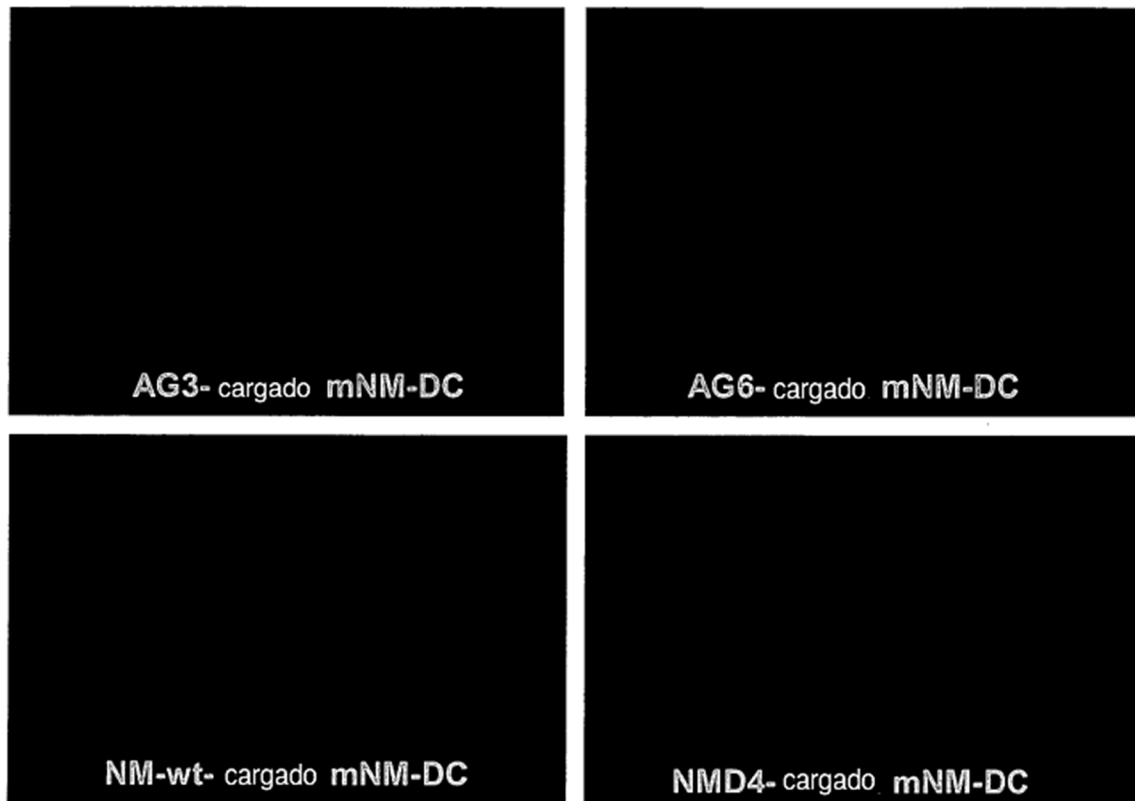
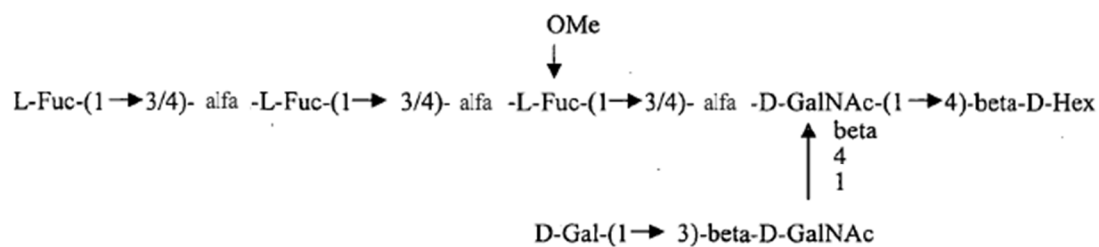
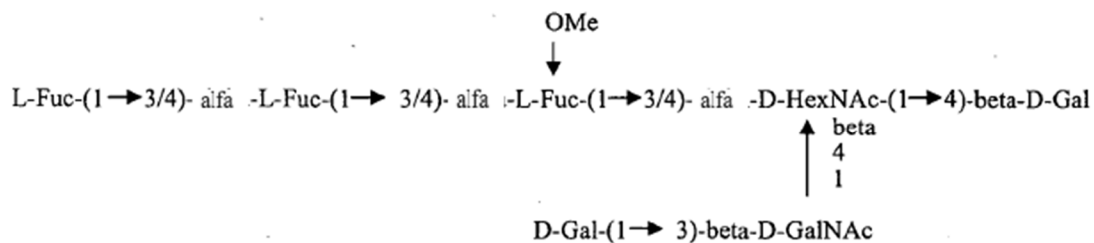


Figura 19

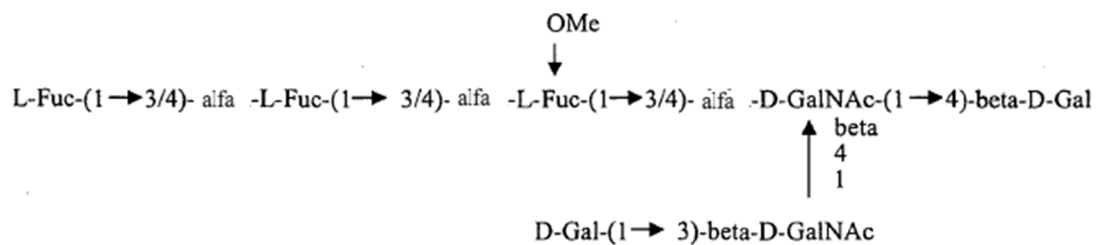
#1



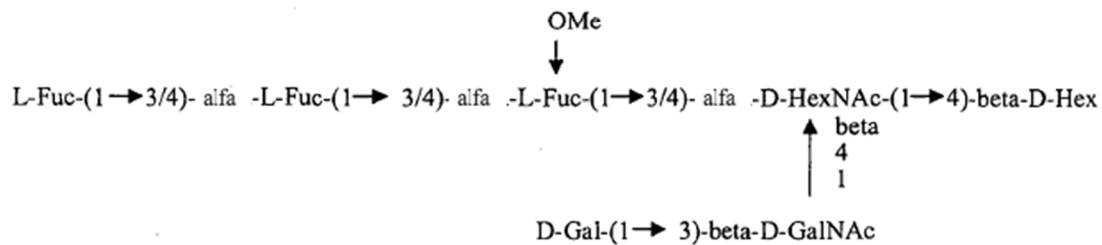
#2



#3



#4



#5

Fig. 19 - continuación

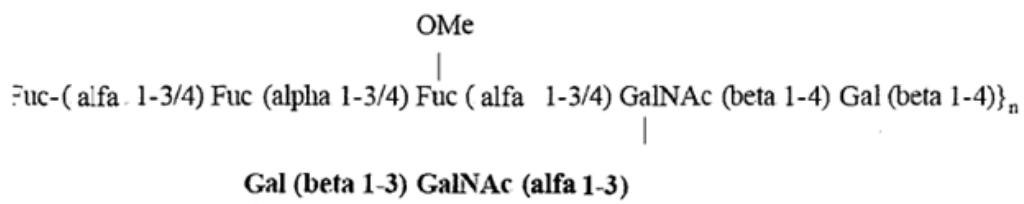


Fig. 20

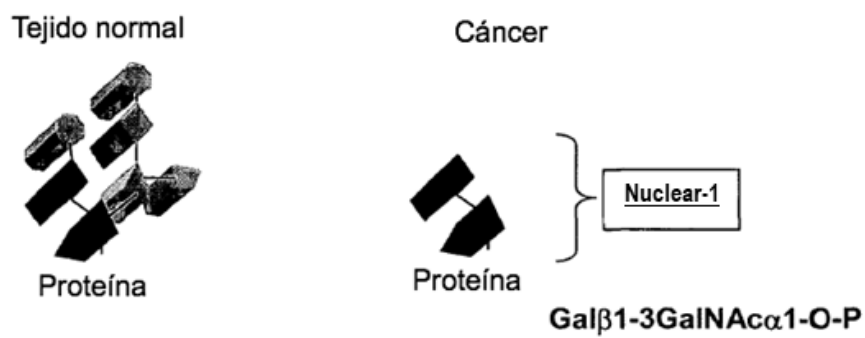


Fig. 21

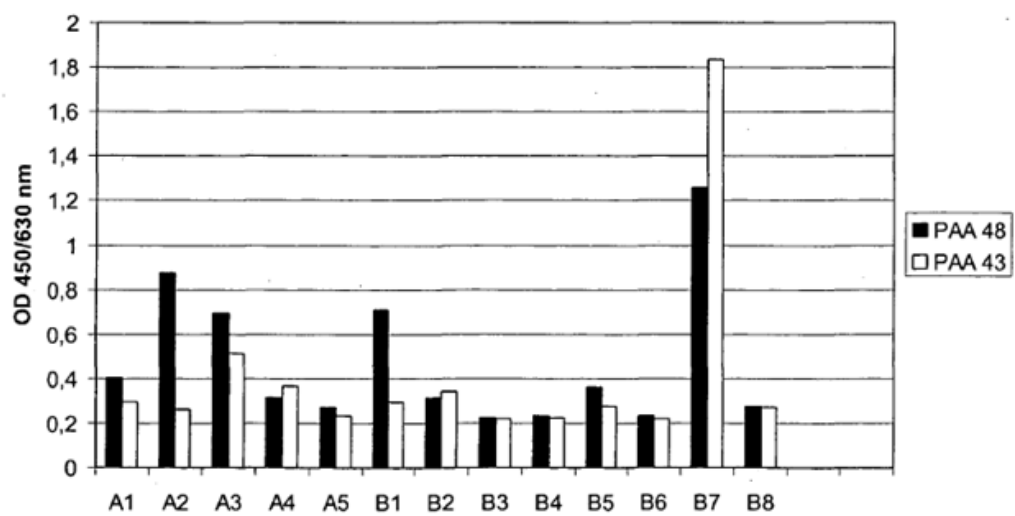


Figura 22

Tabla 1

Antibiótico/Cepa	53	52	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32
Especies	<i>B. ovatus</i> DSMZ 1896	<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> DSMZ 8697
Cepa	DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697
Penicilina	MS	MS	MS	MS	MS	S	MS	MS	S
Mezlocilina	MS	MS	MS	MS	S	S	S	S	S
Ampicilina	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Ampicilina + Sulbactam	S	MS	S	S	MS	MS	MS	MS	MS
Piperacilina + Tazobactam	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Meropenem	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Clindamicina	MS	MS	S	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Metronidazol	S	S	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS

Antibiótico/Cepa	lac Ø	lac +	AG3	LH2	32	53	52	AG6	MU1
Especies	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> DSMZ 8697	<i>B. ovatus</i> DSMZ 1896	<i>B. thetaiotaomicron</i> DSMZ 2079	<i>B. ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>
Cepa	lac Ø	lac +	AG3	LH2	DSMZ 8697	DSMZ 1896	DSMZ 2079	AG6	MU1
Ampicilina	S	S	S	S	S	MS	MS	MS	MS
sulfametoxazol + trimetoprim	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Gentamicina	MS	S	S	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Tobramicina	S	S	S	S	MS	MS	MS	MS	MS
Mezlocilina	MS	S	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Cefotiam	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Cefotaxima	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Meropenem	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Ceftriaxona	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Cefuroxima	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS

[illegible]

Fig. 23

