

戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂的应用

本申请要求于 2021 年 10 月 09 日提交中国专利局、申请号为 CN202111177878.9、发明名称为“戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂的应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明属于肿瘤学技术领域，涉及戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂的应用，特别涉及利用戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂解除肿瘤免疫抑制性微环境，改善肿瘤微环境增强治疗肿瘤效果的应用。

背景技术

肿瘤微环境（Tumor microenvironment, TME）是在肿瘤生长过程中，由肿瘤细胞、基质细胞和细胞外基质以及浸润在其中的生物分子等共同构成局部稳态环境。TME 为肿瘤发生、发展、侵袭等提供了必要物质基础，调控肿瘤转移、复发等多种生物学行为。同时 TME 增加肿瘤耐药性和耐辐射性，降低治疗效果。TME 内的免疫调节在肿瘤发生发展中具有重要功能，其可通过多种机制，形成肿瘤局部免疫抑制。而这对于肿瘤的增殖、侵袭及新生血管的形成具有重要影响，如何调控 TME 免疫治疗策略，重塑积极的免疫微环境是抗肿瘤治疗的重点和难点。

恶性肿瘤通过多种机制逃避宿主免疫监视，包括淋巴细胞浸润受损、通过缺氧上调免疫检查点蛋白表达、募集 Treg，以及建立免疫抑制性肿瘤微环境，该微环境损害常驻和转运免疫效应细胞的功能。浸润到肿瘤微环境的髓样细胞在肿瘤微环境中能够调控肿瘤细胞的免疫逃逸、肿瘤转移等肿瘤发展的关键环节。

实体瘤通常浸润大量免疫抑制剂，如肿瘤相关巨噬细胞（TAM）、髓源性抑制细胞（MDSC）和调节性 T 细胞（Treg）。在 TME 的免疫反应中 TGF β 发挥重要作用，具有促进抗肿瘤免疫抑制的作用，且 TGF β 被认为对抗血管生成治疗产生耐药性。

乏氧或氧含量低是实体肿瘤典型特征，实体肿瘤的缺氧可通过 HIF-1 α 激活直接上调 MDSC、树突状细胞和肿瘤细胞的免疫检查点蛋白 PD-L1 的表达，以帮助免疫抑制和逃避。同时，肿瘤缺氧还可通过诱导促迁移蛋白（如 SDF1A 和

HGF) 和促侵袭性细胞外基质分子的产生, 增加肿瘤细胞的侵袭潜能。缺氧也增强了肿瘤对放化疗的抵抗力。

戈氏梭菌为专性厌氧菌, 仅可在肿瘤乏氧或坏死区中特异性萌发和大量增殖, 有效而不加区分溶解肿瘤组织, 破坏 TME。戈氏梭菌溶瘤后, 改变 TME 免疫原性, 调节免疫抑制性 TME, 诱导抗肿瘤免疫反应。目前并没有戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂可明显改变肿瘤免疫抑制性微环境, 增强抗肿瘤效果的相关报道。

发明内容

针对现有技术的不足, 本发明提供一种更安全、强靶向性的治疗实体肿瘤的厌氧菌--戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂的应用。

戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂在制备治疗肿瘤医药制品中的应用。

一种治疗肿瘤药物, 药物中的有效成分包括戈氏梭菌和肿瘤血管生成抑制剂。

根据本发明优选的, 所述的戈氏梭菌为戈氏梭菌 MW-DCG-LCv-26 菌株或者戈氏梭菌驯化后获得的菌株; 所述戈氏梭菌 MW-DCG-LCv-26 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院, 菌株保藏号 V12/001486; 所述戈氏梭菌驯化后获得的菌株包括 MW-DCG-HNCv-18 菌株或 MW-DCG-CCv-17 菌株; 所述 MW-DCG-HNCv-18 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院, 菌株编号为 V12/001485; 所述 MW-DCG-CCv-17 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院, 菌株保藏号 V12/001487。

根据本发明优选的, 所述的戈氏梭菌为芽孢形式。

根据本发明优选的, 所述肿瘤血管生成抑制剂选自: 包括但不限于阿帕替尼(艾坦)、舒尼替尼、帕唑帕尼、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、康柏西普、阿柏西普、索拉非尼、瑞戈非尼等。

根据本发明优选的, 所述药效成分戈氏梭菌与肿瘤血管生成抑制剂的给药顺序为先后给药或同时给药。

根据本发明优选的药物组合是 1×10^7 CFU 戈氏梭菌芽孢冻干粉联合艾坦最优剂量 60mg/kg/d。

根据本发明优选的, 所述肿瘤包括但不限于结肠癌、Lewis 肺癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌、纤维肉瘤、黑色素瘤等。

本发明可随机联合使用肿瘤血管生成抑制剂。戈氏梭菌芽孢必须是纯的微生物，即除含有芽孢外，不含任何其它细菌，肿瘤血管生成抑制剂应同样符合无菌要求。戈氏梭菌芽孢按照本领域已有的方法进行制备、纯化，获得符合相关质量标准的药物。

5 有益效果

1、本发明首次发现更安全、强靶向性的戈氏梭菌与肿瘤血管生成抑制剂联用高效抗肿瘤。

2、本发明首次发现戈氏梭菌联合低剂量肿瘤血管生成抑制剂降低肿瘤中M2 样巨噬细胞、MDSC 等浸润，并减少肿瘤中 TGFβ数量，降低了TME 中抗肿瘤免疫反应的抑制作用。同时联合低剂量肿瘤血管生成抑制剂可促进 CD8⁺、
10 CD3⁺T、F4/80⁺等免疫细胞向肿瘤浸润，改善肿瘤中免疫微环境，增强抗肿瘤疗效。

3、本发明中明确了肿瘤血管生成抑制剂联合戈氏梭菌的最优剂量。

4、本发明可应用于晚期恶性实体肿瘤类型，戈氏梭菌联合低剂量艾坦通过
15 降低TME 中抗肿瘤免疫反应抑制作用，使TME 由免疫抑制转变为免疫激活状态，实现高效抗肿瘤，其独特的治疗效果应归因于抗肿瘤免疫微环境的变化，而非利用高剂量艾坦加重肿瘤缺氧创造戈氏梭菌繁殖的缺氧环境高效抗肿瘤。

5、本发明中的组合物在治疗肿瘤时更为安全、靶向性更高，仅靶向肿瘤缺氧环境萌发，而在非肿瘤缺氧环境中不能萌发为细菌。

20 **附图说明**

图1是实施例2中的净体重柱状图；

图2是实施例2中脑梗组织TTC染色图；

图3是实施例2中组织切片革兰氏染色图；

图4是实施例2中心梗组织TTC染色图；

25 图5是实施例2中组织切片革兰氏染色图；

图6是实施例3中实验小鼠净体重柱状图；

图7是实施例3中实验小鼠肿瘤体积曲线图；

图8是实施例3中实验小鼠肿瘤重量图；

图9是实施例3中实验小鼠解剖肿瘤图；

30 图10是实施例4中肿瘤组织中T细胞浸润的比例；

图 11 是肿瘤组织中 T 细胞的细胞因子表达情况；

图 12 是实施例 4 中小鼠瘤内细胞因子表达情况；

图 13, 14 是实施例 4 中小鼠肿瘤内髓系来源的抑制细胞 (MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 的比例；

5 图 15, 16 是实施例 4 中小鼠肿瘤组织免疫组织化学染色图及 CD163 细胞比例图。

具体实施方式

下面将结合具体实施例对本发明做进一步的详细说明，所描述的实施例仅仅是本发明为了使公众便于理解所列举的一部分技术方案，这些实施例仅用于
10 说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围，本发明的保护范围由权利要求限定。

实施例 1

材料和方法

戈氏梭菌芽孢冻干粉

15 注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉，菌株为 MW-DCG-LCv-26 菌株，该菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号 V12/001486，批号：202003001-1，山东新创生物科技有限公司研制。注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉以戈氏梭菌芽孢为活性成分，以 1% 蔗糖为辅料，经过 -40℃4h；-35℃10min 同时抽真空、-30℃10min、-25℃10min、-20℃26h、-15℃2h、-10℃10min、-5℃10min、0℃10min、
20 10℃2h、15℃10min、20℃3h、27℃3h 冻干程序制备，规格为 1×10^8 CFU/支；对照品冻干粉，批号：201910002F，山东新创生物科技有限公司研制，以 1mL 1% 蔗糖溶液经过上述冻干程序制备；0.9% 氯化钠注射液，批号：2005062146，辰欣药业股份有限公司有售；灭菌注射用水，批号：1902212162，辰欣药业股份有限公司有售；

25 细胞系及细胞培养

CT26.WT 结肠癌细胞，编号：3131C0001000800037，中国科学院上海生命
科学研究所细胞资源中心。RPMI Medium1640 basic 基础培养基中加入体积百分比浓度 10% 特级胎牛血清（低温融化后的血清中可能有漂浮物，2000rpm 离
心 3min 以去除漂浮物）和体积百分比浓度 1.1% 青链霉素混合液，充分混匀，
30 重悬细胞，将细胞悬液接种到 75cm² 细胞培养瓶中，每瓶加入 25mL 细胞培养

基，置 5%CO₂ 细胞培养箱 37℃静置培养。

试剂

RPMI Medium1640 basic 基础培养基购自 Gibco，特级胎牛血清和青链霉素
购自 BI，艾坦（阿帕替尼）购自江苏恒瑞医药股份有限公司，戈氏梭菌芽孢按
5 照已有的方法进行制备、纯化，获得符合相关质量标准的药物。

模型建立

采用 BALB/c 小鼠皮下接种 CT26 肿瘤细胞，建立结肠癌皮下移植瘤模型。
以 1mL 一次性无菌注射器抽取 0.2mL 浓度为 7.5×10^6 个/mL（可接受范围：
6.75×10⁶ 个/mL~8.25×10⁶ 个/mL）的细胞悬液，缓慢皮下注射接种于小鼠右前
10 肢腋窝皮下（75%酒精预先消毒处理）。注射完毕后以干棉球轻轻按压针眼部
位。

观察和检查

临床观察：给药期每天上午和下午肉眼观察，动物行为、死亡或濒死情况
等 1 次。

15 肿瘤测量：以游标卡尺测量肿瘤最大长径（L）和最大横径（W）（包括小

鼠皮肤厚度在内），并根据 $V = \frac{L \times W^2}{2}$ 计算肿瘤体积。

体重：给药期，自治疗之日起于肿瘤测量日称量体重。

肿瘤重量：解剖出肿瘤组织称量并记录肿瘤重量。

抑瘤率（IR_{Tw}%）=（对照组平均瘤重-实验组平均瘤重）/对照组平均瘤重
20 ×100%。

流式细胞术分析

在相应的时间采集结肠癌模型中肿瘤和脾脏，在含有 IV 型胶原酶
（1mg/mL，Sigma）、透明质酸酶（1mg/mL，Sigma）和 DNaseI（20U/mL，
Sigma）的 DMEM 培养基中进行 37℃酶消化 1 小时，收集单个肿瘤细胞和脾脏
25 细胞。分别以含 2%FCS 的 PBS 冲洗分离的单个细胞，然后用相关抗体进行表
面染色。细胞经大量洗涤后，在 BD FACS Calibur（Becton Dickinson）上获得。
流式细胞术数据由 Novo Express TM（ACEA Biosciences, Inc.）分析。

Multi-ELISA 检测细胞因子

收集实验小鼠的外周血和肿瘤组织，评估 IL-10、TNF- α 、GM-CSF 和 TGF β 等细胞因子。Multi-ELISA 试剂盒购自 Qiagen (Australia)，按照试剂盒内提供的说明书进行实验。

ELISA 结果由 ELISA 程序板在 450nm 处读取 (Polarstar Omega
5 96-wellmicroplatereader BMG Labtech GmbH, Germany)。

TTC 染色

取出肿瘤组织，液氮速冻后，用切片刀同样厚度均切为 5 片。将肿瘤组织切片置于玻片上，滴加 2% 的 TTC 溶液覆盖组织切片，避光反应 30min，数码相机拍照。

10 免疫组织化学

肿瘤组织取材后快速置于 10% 中性福尔马林溶液中固定，石蜡包埋，切片。石蜡切片常规脱蜡至水。3% H₂O₂ 去离子水室温避光孵育 10min，以消除内源性过氧化氢酶活性，PBS 冲洗，5min $\times$ 3 次。将切片浸入到 EDTA 修复液 (1 $\times$) 中，微波炉加热到沸腾后断电，间隔 5-10min 再修复 1-2 次，冷却。滴加 5% BSA
15 封闭液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，甩干。滴加适当稀释的抗 CD163 和 HIF-1 α 的小鼠单克隆抗体一抗，37 $^{\circ}$ C 孵育 1-2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 冲洗，5min $\times$ 3 次。滴加生物素标记山羊抗兔 IgG (二抗)，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。PBS 冲洗，5min $\times$ 3 次。滴加 SABC，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。PBS 冲洗，5min $\times$ 3 次。按 1mL 蒸馏水加显色剂 A，B，C 各 1 滴，混匀，加至标本上，显色 1-10min，蒸馏水充分洗涤以终止反应。苏木素
20 复染。脱水，透明。中性树胶封片，显微镜观察。

肿瘤组织切片 Gram stain

肿瘤组织取材后快速置于 10% 中性福尔马林溶液中固定，石蜡包埋，切片。烤片 30min，二甲苯 I 5min，二甲苯 II 5min，100% 乙醇 I 2min，95% 乙醇 I 2min，80% 乙醇 I 2min，流水冲洗干净，晾稍干；革兰氏试剂一 1min，流水冲洗，革
25 兰氏试剂二 1min，流水冲洗，革兰氏试剂三 20s 左右，流水冲洗，伊红 20s 左右，流水冲洗；95% 乙醇 II 30s，95% 乙醇 III 1min，100% 乙醇 II 2min，二甲苯 III 3min，二甲苯 IV 3min，中性树胶封片，观察。

戈氏梭菌定量分析

采取 Trizol 法提取组织 RNA，利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA
30 Eraser (Perfect real time) 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板，

采取戈氏梭菌硫氧还蛋白特异性引物进行检测戈氏梭菌细菌，引物序列如下：

Trx Forward primer (SEQ ID NO:1) :5'--AATACAGGGAATTTTAGAGGT
GCAG-3'

Trx Reverse primer (SEQ ID NO:2) :5'--GCTAACATCTTACAAGGCCCA
5 CA-3'

统计分析

采用双尾 T 检验或 Prism 6.0 Mann-Whitney 检验 (Graphpad Software, SanDiego) 进行统计分析。p<0.05 差异有统计学意义。

实施例 2

10 戈氏梭菌在实体肿瘤模型中应用的高安全性和强靶向性
模型建立

建立结肠癌皮下移植瘤模型。SD 大鼠大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型建立。
C57BL/6 小鼠急性心肌梗死 (MI) 模型建立。

动物分组

15 在筛选荷瘤动物当日，选择肿瘤体积 $0.35\sim 0.60\text{cm}^3$ 的实验动物用于试验。
采用随机原则将筛选出的符合要求的动物以抽签法分为 4 组：静脉给药对照组、
瘤内给药对照组、静脉给予戈氏梭菌芽孢组、瘤内给予戈氏梭菌芽孢组，每组
8 只小鼠。

SD 大鼠大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型，随机分为 4 组，健康大鼠对照组，
20 脑梗模型对照组，脑梗模型静脉给药组，脑梗模型颅内给药组，每组 5 只。

C57BL/6 小鼠急性心肌梗死 (MI) 模型，随机分 3 组，心梗模型 TTC 染色
组，心梗模型对照组，心梗模型尾静脉给药组，每组 5 只。

给药

25 结肠癌模型：芽孢剂量为 $1\times 10^7\text{cfu/瘤/次}$ ，瘤内给药，对照组给予相同体积
的质量体积百分比浓度 0.9%氯化钠注射液；芽孢剂量为 $1\times 10^8\text{cfu/瘤/次}$ ，尾静
脉给药，对照组给予相同体积的质量体积百分比浓度 0.9%氯化钠注射液；

SD 大鼠大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型：尾静脉给药剂量 $5\times 10^7\text{CFU}$ ，颅
内给药剂量 $1\times 10^6\text{CFU}$ 。

C57BL/6 小鼠急性心肌梗死 (MI) 模型：尾静脉给药剂量 $2\times 10^7\text{CFU}$ 。

30 观察与检查

结肠癌模型在实验期间观察小鼠死亡或濒死情况，行为、小鼠体重情况。

MCAO 模型和 MI 模型，分别取脑组织和心脏组织，进行 TTC 染色、戈氏梭菌细菌 qPCR 和芽孢细菌培养法检测，以及组织切片戈氏梭菌 Gram stain 检测。

5 结果

结肠癌模型在实验期间，无论瘤内给药或静脉给药，均未出现动物死亡。且小鼠净体重与对照组相比，均无显著性差异（图 1）。

MCAO 模型试验中，分别对健康大鼠对照组，脑梗模型对照组，脑梗模型静脉给药组，脑梗模型颅内给药组的脑组织进行 TTC 染色，正常大鼠大脑组织切片 TTC 染色为红色，MCAO 模型大鼠大脑组织切片 TTC 染色显示，发生脑梗死的大鼠脑组织部分区域呈苍白色（图 2）。

对 MCAO 模型试验中的脑组织进行戈氏梭菌细菌和芽孢检测，尾静脉单次给药注射用戈氏梭菌芽孢和颅内单次给药注射用戈氏梭菌芽孢后，在发生脑梗死的脑组织中检测到戈氏梭菌芽孢，但均未检测到戈氏梭菌细菌。

15 脑组织进行切片制作和 Gram stain，并采用数字病理扫描系统扫描各组大鼠脑组织切片检测戈氏梭菌细菌分布情况，阳性对照组肿瘤组织切片革兰氏染色后切片中可见呈短杆状、蓝紫色的戈氏梭菌（图 3a）；阴性对照组肿瘤组织切片革兰氏染色后切片中未见细菌（图 3b），大鼠大脑中动脉栓塞后尾静脉单次给药注射用戈氏梭菌芽孢和颅内单次给药注射用戈氏梭菌芽孢，在发生脑梗死
20 的脑组织切片中均未检测到戈氏梭菌细菌（图 3c，3d）。

MI 模型 TTC 染色组小鼠心脏组织 TTC 染色显示，小鼠心肌组织呈白色，MI 模型小鼠心脏组织出现明显梗死（图 4）。MI 模型小鼠尾静脉单次给药注射用戈氏梭菌芽孢，发生心肌梗死的心肌组织中检测到戈氏梭菌芽孢，但未检测到戈氏梭菌细菌。

25 心脏组织进行切片制作和 Gram stain，并采用数字病理扫描系统扫描各组小鼠心脏组织切片检测戈氏梭菌细菌分布情况。阳性对照组肿瘤组织切片革兰氏染色后切片中可见呈短杆状、蓝紫色的戈氏梭菌（图 3a）；阴性对照组肿瘤组织切片革兰氏染色后切片中未见细菌（图 3b），MI 模型小鼠尾静脉单次给药注射用戈氏梭菌芽孢后在发生心脏梗死的心肌组织切片中未检测到戈氏梭菌
30 细菌（图 5）。

实施例 3

戈氏梭菌芽孢联合不同剂量艾坦在 CT26 小鼠模型中的抗肿瘤作用

采用随机原则将符合要求小鼠（肿瘤体积 0.31~0.41cm³）以抽签法分为 8 组：对照组、戈氏梭菌芽孢组、艾坦高剂量组、艾坦中剂量组、艾坦低剂量组、芽孢联合艾坦低剂量组、芽孢联合艾坦中剂量组、芽孢联合艾坦高剂量组。

对照组：瘤内给予相同体积的 0.9%氯化钠注射液；

戈氏梭菌芽孢组：剂量为 1×10⁷cfu/瘤/次，瘤内给药，给药 2 次；

艾坦高剂量组：剂量为 180mg/kg/d，灌胃给药，每天给药 1 次，共 7 次；

艾坦中剂量组：剂量为 120mg/kg/d，灌胃给药，每天给药 1 次，共 7 次；

艾坦低剂量组：剂量为 60mg/kg/d，灌胃给药，每天给药 1 次，共 7 次；

戈氏梭菌联合艾坦组：戈氏梭菌芽孢剂量为 1×10⁷cfu/瘤/次，瘤内给药，先给予艾坦 3 天，每天 1 次，再进行芽孢给药，隔 1 天给药 1 次，共给药 2 次。联合高、中、低剂量同单独艾坦高、中、低剂量组；

结果

治疗期间，各组均未出现死亡或濒死情况。治疗前，各组小鼠体重无显著差异（p>0.05）。与对照组相比，各组小鼠净体重无显著差异（p>0.05）。荷瘤鼠净体重见表 1 和图 6。

表 1.实验小鼠净体重

组别	对照组（n=7）	单独芽孢组（n=7）	戈氏梭菌联合低剂量艾坦组（n=7）	低剂量艾坦（n=7）
净体重（g）	17.66±1.22	16.06±1.01	16.16±1.74	18.32±1.12
组别	戈氏梭菌联合中剂量艾坦组（n=7）	中剂量艾坦（n=7）	戈氏梭菌联合高剂量艾坦组（n=7）	高剂量艾坦（n=7）
净体重（g）	17.18±0.78	18.02±1.61	16.12±0.72	18.44±1.42

注：n 为各组试验用动物数，小鼠净体重为荷瘤鼠剖出肿瘤后的小鼠体重，数据以均数±标准差表示。

治疗前，各组荷瘤鼠肿瘤体积无显著差异（p>0.05）。给药末期，与对照组相比，单独芽孢组、戈氏梭菌联合低剂量艾坦组和戈氏梭菌联合中剂量艾坦组肿瘤体积均显著小于对照组（p=0.045，p=0.000，p=0.026）。荷瘤鼠肿瘤体积见表 2 和图 7。

表 2.荷瘤鼠肿瘤体积

天数	对照组 (mm ³)	单独芽孢组 (mm ³)	戈氏梭菌联合低剂量艾坦组 (mm ³) (n=7)		低剂量艾坦 (mm ³)
	(n=7)	(n=7)			(n=7)
D-1	996.37±130.93	1023.59±200.27	1026.03±97.91		931.50±97.91
D-4	1606.25±291.83	1584.84±401.26	1669.35±504.54		1489.82±232.84**
D-8	2813.11±416.55	1982.64±533.59*	1.25.99±676.02		2275.35±348.84
天数	对照组 (mm ³)	单独芽孢组 (mm ³)	戈氏梭菌联合低剂量艾坦组 (mm ³) (n=7)		低剂量艾坦 (mm ³)
	(n=7)	(n=7)			(n=7)
D-1	968.47±198.03	892.74±156.30	865.43±198.95		1049.42±166.37
D-4	1573.97±357.26	1698.84±177.49	1566.05±359.30		1499.45±303.10
D-8	1880.47±279.87*	2615.77±351.13	2160.22±704.11		2442.80±882.95

注：n 为各组试验用动物数，数据以均数±标准差表示。与对照组相比，*p<0.05，**p<0.01。

与对照组相比，单独芽孢组、戈氏梭菌联合低剂量艾坦组、戈氏梭菌联合中剂量艾坦组和戈氏梭菌联合高剂量艾坦组肿瘤重量显著小于对照组（p=0.000，p=0.000，p=0.000，p=0.000）。各组肿瘤重量见表 3，图 8。

表 3.肿瘤重量

组别	对照组 (n=7)	单独芽孢组 (n=7)	戈氏梭菌联合低剂量艾坦组 (n=7)	低剂量艾坦 (n=7)
肿瘤重量 (g)	4.45±0.92	2.72±0.48**	1.33±0.84**	3.55±0.61
组别	戈氏梭菌联合中剂量艾坦组 (n=7)	中剂量艾坦 (n=7)	戈氏梭菌联合高剂量艾坦组 (n=7)	高剂量艾坦 (n=7)
肿瘤重量 (g)	2.46±0.41**	3.84±0.69	2.58±0.76**	3.49±0.86

根据肿瘤重量计算抑瘤率，抑瘤率表现为：戈氏梭菌联合低剂量艾坦组>芽孢联合中剂量艾坦组>戈氏梭菌联合高剂量组>单独芽孢组>高剂量艾坦组>低剂量艾坦组>中剂量艾坦组，如表 4 所示。抑瘤率肿瘤解剖形态如图 9 所示。

表 4.抑瘤率

组别	对照组 (n=7)	单独芽孢组 (n=7)	戈氏梭菌联合低剂量艾坦组 (n=7)	低剂量艾坦 (n=7)
----	-----------	-------------	--------------------	-------------

抑菌率 (%)	/	38.97	70.07	20.21
组别	戈氏梭菌联合中剂 量艾坦组 (n=7)	中剂量艾坦 (n=7)	戈氏梭菌联合高剂 量艾坦组 (n=7)	高剂量艾坦 (n=7)
抑菌率 (%)	44.70	13.89	42.12	21.68

戈氏梭菌联合低剂量艾坦组有 28.6%小鼠肿瘤完全消除，至实验终点也未见肿瘤生长，治愈率明显高于戈氏梭菌联合高剂量艾坦组（14.3%）和戈氏梭菌联合中剂量艾坦组（14.3%），而高、中和低剂量单独艾坦组和单独芽孢组均未出现肿瘤消失情况，治愈率为 0%。可见，戈氏梭菌联合低剂量艾坦表现出显著的抗肿瘤效果，并明显优于其他组别，如表 5。

表 5.治愈率

组别	对照组 (n=7)	单独芽孢组 (n=7)	戈氏梭菌联合低剂 量艾坦组 (n=7)	低剂量艾坦 (n=7)
治愈率 (%)	0	0	28.6	0
组别	戈氏梭菌联合中剂 量艾坦组 (n=7)	中剂量艾坦 (n=7)	戈氏梭菌联合高剂 量艾坦组 (n=7)	高剂量艾坦 (n=7)
治愈率 (%)	14.3	0	14.3	0

由上述结果可见，各剂量治疗组均表现出对肿瘤生长的抑制作用，并以芽孢联合低剂量艾坦组抗肿瘤作用最明显。戈氏梭菌芽孢与抗血管生成抑制剂如艾坦联合治疗显示出超叠加作用，其中戈氏梭菌芽孢联合低剂量艾坦治疗的抗肿瘤效果最佳。

实施例 4

戈氏梭菌联合高剂量艾坦和低剂量艾坦抗肿瘤作用机制研究

戈氏梭菌联合低剂量艾坦抗肿瘤作用明显优于高于戈氏梭菌联合高剂量艾坦，对戈氏梭菌联合低剂量艾坦和高剂量艾坦抗肿瘤的作用机制进行研究。

分别取对照组、单独芽孢组、戈氏梭菌联合低剂量艾坦组和戈氏梭菌联合高剂量艾坦组处理的小鼠肿瘤组织，采用流式细胞仪对上述肿瘤组织样品进行流式细胞术分析。与对照组相比，单独芽孢组、戈氏梭菌联合低剂量艾坦组和戈氏梭菌联合高剂量艾坦组肿瘤组织中的 CD45⁺CD3⁺T、CD45⁺CD3⁺CD8⁺T 和 F4/80⁺细胞浸润肿瘤的比例均显著升高；与单独芽孢组相比，戈氏梭菌联合低剂量艾坦组小鼠肿瘤组织中 CD45⁺CD3⁺T、CD45⁺CD3⁺CD8⁺T 和 F4/80⁺细胞浸

润的比例均显著升高，而戈氏梭菌联合高剂量艾坦组未见显著差异（图 10）。

采用细胞内染色法研究肿瘤内 T 细胞的细胞因子表达，与单独芽孢组相比，戈氏梭菌联合低剂量艾坦组肿瘤内 CD3⁺IL-10⁺T、CD3⁺IFN- γ ⁺T 细胞显著升高（ $p<0.05$ ），而戈氏梭菌联合高剂量艾坦组 CD3⁺IL-10⁺T、CD3⁺IFN- γ ⁺T 细胞未
5 见明显变化（图 11）。

Multi-ELISA 检测瘤内 IL-10、TNF- α 、GM-CSF 和 TGF β 等细胞因子，与对照组相比，单独芽孢组、戈氏梭菌联合高剂量艾坦组和戈氏梭菌联合低剂量艾坦组 IL-10、TNF- α 、GM-CSF 均有增高。与其它组相比，戈氏梭菌联合低剂量艾坦组肿瘤内 TGF β 表达明显降低（图 12）。可见，戈氏梭菌溶瘤可诱导 TME
10 中细胞因子、趋化因子表达。同时戈氏梭菌联合低剂量艾坦可显著降低 TGF β 的表达，改善免疫抑制性肿瘤微环境，而联合高剂量艾坦对 TGF β 表达无明显抑制作用。

通过流式细胞术分析了肿瘤内髓系来源的抑制细胞（MDSC）、肿瘤相关巨噬细胞（TAM）等细胞的数量。与对照组相比，戈氏梭菌联合低剂量艾坦治疗后，瘤内 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{high} 单核 MDSCs 和 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} 多形核
15 -MDSCs 的数量未见明显差异。与戈氏梭菌联合高剂量艾坦相比，戈氏梭菌联合低剂量艾坦治疗后 Mo-MDSCs 和 PMN-MDSCs 比例均降低（图 13）。此外，与其他治疗组相比，戈氏梭菌联合低剂量艾坦组的 CD11b⁺F4/80⁺-TAMs 在总活细胞中的比例显著降低（图 14）。IHC 染色检测肿瘤中 CD163⁺（M2 样巨噬细胞标记物），研究结果显示，戈氏梭菌联合低剂量艾坦组肿瘤中 CD163⁺ 细胞数量下降，表明戈氏梭菌联合低剂量艾坦治疗可有效减少肿瘤中 TAM 的数量（图
20 15）。

肿瘤组织 HIF-1 α 免疫组织化学染色显示，与对照组相比，戈氏梭菌联合低剂量艾坦肿瘤组织缺氧明显减轻，而戈氏梭菌联合高剂量艾坦组肿瘤组织缺氧程度升高（图 16）。表明高剂量艾坦加重了肿瘤组织缺氧，虽然创造了一个利于戈氏梭菌繁殖的缺氧环境，但其抗肿瘤效果低于戈氏梭菌联合低剂量艾坦组。而戈氏梭菌联合低剂量艾坦组的肿瘤缺氧虽明显降低，理论上可能加速肿瘤生长，但肿瘤体积显示肿瘤生长受到明显抑制。

综上所述，戈氏梭菌联合低剂量艾坦可促进 CD45⁺CD3⁺T、
30 CD45⁺CD3⁺CD8⁺T、F4/80⁺ 等免疫细胞的浸润，诱导 IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF

等细胞因子和趋化因子表达增强，同时有效降低肿瘤组织中 TGFβ 的表达，降低免疫抑制剂肿瘤相关巨噬细胞（TAM）、髓源性抑制细胞（MDSC）等的数量，减少免疫抑制。可见，戈氏梭菌联合低剂量艾坦高效抗肿瘤是通过诱导肿瘤血管正常化，使 TME 由免疫抑制转变为免疫激活状态，实现高效抗肿瘤，其独特的治疗效果应归因于抗肿瘤免疫微环境的变化，而非利用高剂量艾坦加重肿瘤缺氧创造戈氏梭菌繁殖的缺氧环境高效抗肿瘤。

尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述，但它仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部实施例，人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例，这些实施例都属于本发明保护范围。

权利要求

1. 戈氏梭菌联合肿瘤血管生成抑制剂在制备治疗肿瘤的医药制品中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述医药制品包括促进
5 CD45⁺CD3⁺T、CD45⁺CD3⁺CD8⁺T 和 F4/80⁺浸润，诱导 IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF 表达增强，降低 TGF β 的表达，降低巨噬细胞 TAM、髓源性抑制细胞 MDSC 的数量，减少免疫抑制的医药制品。

3. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述医药制品包括诱导肿瘤血管正常化，使 TME 由免疫抑制转变为免疫激活状态的医药制品。

10 4. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述戈氏梭菌为戈氏梭菌 MW-DCG-LCv-26 菌株或者戈氏梭菌驯化后获得的菌株；

所述戈氏梭菌 MW-DCG-LCv-26 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株编号为 V12/001486。

5. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述戈氏梭菌驯化后获得的
15 菌株包括 MW-DCG-HNCv-18 菌株或 MW-DCG-CCv-17 菌株；

所述 MW-DCG-HNCv-18 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号 V12/001485；

所述 MW-DCG-CCv-17 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号 V12/001487。

20 6. 根据权利要求 1~5 任一项所述的应用，其特征在于，所述的戈氏梭菌为芽孢形式。

7. 根据权利要求 1~5 任一项所述的应用，其特征在于，所述肿瘤血管生成抑制剂包括艾坦、舒尼替尼、帕唑帕尼、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、康柏西普、阿柏西普、索拉非尼和瑞戈非尼中的一种或两者以上的组合。

25 8. 根据权利要求 1~5 任一项所述的应用，其特征在于，所述肿瘤为结肠癌、Lewis 肺癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌、纤维肉瘤或黑色素瘤。

9. 一种治疗肿瘤的药物，其特征在于，所述药物中的有效成分包括戈氏梭菌和肿瘤血管生成抑制剂。

10. 根据权利要求 9 所述的药物，其特征在于，所述的戈氏梭菌为戈氏梭菌
30 MW-DCG-LCv-26 菌株或者戈氏梭菌驯化后获得的菌株；

所述戈氏梭菌 MW-DCG-LCv-26 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株编号为 V12/001486。

11.根据权利要求 10 所述的药物，其特征在于，所述戈氏梭菌驯化后获得的菌株包括 MW-DCG-HNCv-18 菌株或 MW-DCG-CCv-17 菌株；

5 所述 MW-DCG-HNCv-18 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号 V12/001485；

所述 MW-DCG-CCv-17 菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号 V12/001487。

10 12.根据权利要求 10 所述的药物，其特征在于，所述的戈氏梭菌为芽孢形式。

13.根据权利要求 10 所述的药物，其特征在于，所述肿瘤血管生成抑制剂包括艾坦、舒尼替尼、帕唑帕尼、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、康柏西普、阿柏西普、索拉非尼和瑞戈非尼中的一种或两者以上的组合。

15 14.根据权利要求 10~13 任一项所述的药物，其特征在于，所述药效成分戈氏梭菌与肿瘤血管生成抑制剂的给药顺序为先后给药或同时给药。

15.根据权利要求 12 所述的药物，其特征在于，每 1×10^7 CFU 所述芽孢形式的戈氏梭菌联合艾坦的剂量是 60mg/kg/d。

16.根据权利要求 10~13 任一项所述的药物，其特征在于，所述肿瘤为结肠癌、Lewis 肺癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌、纤维肉瘤或黑色素瘤。

20 17.根据权利要求 10 所述的药物，其特征在于，所述的戈氏梭菌为戈氏梭菌芽孢冻干粉。

18.根据权利要求 17 所述的药物，其特征在于，所述戈氏梭菌芽孢冻干粉以戈氏梭菌芽孢为活性成分，以 1% 蔗糖为辅料，经过 $-40^\circ\text{C} 4\text{h}$ ； $-35^\circ\text{C} 10\text{min}$ 同时抽真空、 $-30^\circ\text{C} 10\text{min}$ 、 $-25^\circ\text{C} 10\text{min}$ 、 $-20^\circ\text{C} 26\text{h}$ 、 $-15^\circ\text{C} 2\text{h}$ 、 $-10^\circ\text{C} 10\text{min}$ 、 $-5^\circ\text{C} 10\text{min}$ 、 $0^\circ\text{C} 10\text{min}$ 、 $10^\circ\text{C} 2\text{h}$ 、 $15^\circ\text{C} 10\text{min}$ 、 $20^\circ\text{C} 3\text{h}$ 、 $27^\circ\text{C} 3\text{h}$ 冻干程序制备而成。

19.根据权利要求 18 所述的药物，其特征在于，每支所述戈氏梭菌芽孢冻干粉中戈氏梭菌芽孢的个数为 1×10^8 CFU。

20.一种治疗肿瘤的方法，其特征在于，戈氏梭菌联合艾坦给药；

30 所述的戈氏梭菌为芽孢形式，戈氏梭菌芽孢剂量为 1×10^7 cfu/瘤/次，瘤内给药，先给予艾坦 3 天，每天 1 次，再进行戈氏梭菌芽孢给药，隔 1 天给药 1 次，

共给药 2 次；

所述艾坦灌胃给药，给药剂量为 60mg/kg/d 或 120mg/kg/d 或 180mg/kg/d。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述肿瘤为结肠癌、Lewis 肺癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌、纤维肉瘤或黑色素瘤。