

戈氏梭菌芽孢联合帕博利珠单抗的应用

本申请要求于 2021 年 10 月 09 日提交中国专利局、申请号为 CN202111177854.3、发明名称为“戈氏梭菌芽孢联合 PD-1 抗体的应用”的中国专利申请 5 的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及戈氏梭菌联合帕博利珠单抗（Pembrolizumab）的应用。

背景技术

10 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（包括成纤维细胞、免疫、炎性细胞以及一些血管内皮细胞等）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 可以增加肿瘤耐药性和耐辐射性，降低治疗效果。TME 15 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。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。

帕博利珠单抗（Pembrolizumab）是一种 PD-1 抑制剂药物，PD-1 是一种重要的免疫抑制分子，PD-1 抗体临床表现出显著抗肿瘤效果，包括对晚期转移患 20 者的持久治疗效果。一般认为，对免疫检查点阻断剂的敏感性取决于肿瘤新生抗原负荷以及肿瘤微环境（TME）中免疫细胞浸润程度和组成。不幸的是，多数常见癌症并未表现出大量的突变和免疫细胞浸润，因此肿瘤对免疫检查点抑制剂不敏感，响应率低，仅 20% 患者使用有效。因此，开发能使这些肿瘤对免疫治疗更敏感方法也是目前重点研究方向之一。

25 戈氏梭菌（*Clostridium ghonii*）为严格厌氧菌，具有趋肿瘤低氧特性，仅能定植在肿瘤乏氧区。戈氏梭菌溶瘤可募集大量免疫细胞向 TME 浸润，包括树突状细胞、中性粒细胞、巨噬细胞在内的先天免疫细胞及 CD3⁺ T、CD4⁺ T、CD8⁺ T 等特异性免疫细胞，改变 TME 中免疫细胞浸润程度和组成。同时促进肿瘤中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 等细胞因子和趋化因子表达增强。可见，戈氏梭菌溶瘤可 30 以通过多种方式影响 TME 免疫原性，使 TME 从一个免疫抑制状态变成免疫激

活状态，打破免疫耐受，使得戈氏梭菌与免疫检查点抑制剂联用高效抗肿瘤成为可能。

发明内容

本发明根据现有技术的不足，提供戈氏梭菌芽孢联合 PD-1 抗体的应用。

5 本发明技术方案如下：

戈氏梭菌芽孢联合帕博利珠单抗（Pembrolizumab）在制备治疗结肠癌医药制品中的应用。

一种治疗结肠癌的药物，药物中的药效成分包括戈氏梭菌芽孢和帕博利珠单抗。

10 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；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。其它优选的菌株为 MW-DCG-HNCv-18 菌株，该菌株保藏于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号 V12/001485；MW-DCG-CCv-17 菌株，该菌株保藏于澳大利亚国家计量研究
15 院，菌株保藏号 V12/001487 等。

根据本发明优选的，所述的戈氏梭菌为芽孢形式。

本发明优选的，所述戈氏梭菌的芽孢形式为冻干粉剂，其辅料为 1% 蔗糖；

本发明优选的，所述帕博利珠单抗为 PD-1 抗体注射液。

进一步优选的戈氏梭菌芽孢冻干粉剂冻干工艺为：冻结阶段-40℃ 4h；-35℃
20 10min 同时抽真空、-30℃ 10min、-25℃ 10min、-20℃ 26h、-15℃ 2h、-10℃ 10min、-5℃ 10min、0℃ 10min、10℃ 2h、15℃ 10min、20℃ 3h、27℃ 3h 冻干制备。

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浓度 1mg/mL 的帕博利珠单抗注射液 0.2mg。

进一步优选的，所述帕博利珠单抗注射液的溶媒为质量百分比浓度 0.9% 的
25 氯化钠注射液；戈氏梭菌芽孢冻干粉的溶媒为灭菌注射用水和质量百分比浓度 0.9% 氯化钠注射液。

进一步优选的，所述戈氏梭菌芽孢联合帕博利珠单抗使用顺序为先戈氏梭菌芽孢后帕博利珠单抗。

有益效果

30 本发明首次发现戈氏梭菌芽孢联合帕博利珠单抗可以显著提高抗结肠癌的

疗效，同时降低帕博利珠单抗的使用剂量，高效低毒。戈氏梭菌溶瘤可通过多种方式影响 TME 免疫原性，使 TME 从一个免疫抑制状态变成免疫激活状态，同时调节免疫抑制性 TME，打破免疫耐受。在最佳组合条件下戈氏梭菌芽孢与帕博利珠单抗联合约有 20% 小鼠肿瘤组织彻底清除，将 PD-1 抗体治疗肿瘤患者 5 的受益范围扩大，甚至对 PD-1 抗体治疗失败患者也有突出疗效。

附图说明

图 1 实施例 1 中戈氏梭菌芽孢治疗 CT26.WT 结肠癌荷瘤鼠模型各组肿瘤重量 (a)、抑瘤率 (b)；数据表示为：* 与 Control 组相比 $P < 0.05$ ，** 与 Control 组相比 $P < 0.01$ ；

10 图 2 实施例 2 中戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 治疗 MC38 结肠癌荷瘤鼠模型各组肿瘤重量 (a)、肿瘤重量抑瘤率 (b)；数据表示为：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；

图 3 实施例 2 中戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 治疗 MC38 结肠癌荷瘤鼠模型各组肿瘤体积变化；数据表示为：* 与 Control 组相比 $P < 0.05$ ，** 与 Control 15 组相比 $P < 0.01$ ；# 与 C.ghonii 组相比，C.ghonii+Pembrolizumab 组 $P < 0.05$ ，## 与 C.ghonii 组相比，C.ghonii+Pembrolizumab 组 $P < 0.01$ ；

图 4 实施例 2 中戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 治疗 MC38 结肠癌荷瘤鼠模型实验终点肿瘤体积抑瘤率；数据表示为：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；

图 5 实施例 2 中戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 治疗 MC38 结肠癌荷瘤 20 鼠模型各批肿瘤体积抑瘤率；a 图实验批次 1，b 图实验批次 2，c 图实验批次 3；

图 6 实施例 2 中戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 治疗 MC38 结肠癌荷瘤鼠模型各组肿瘤瘤体形态照片；

图 7 实施例 3 中戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 不同给药顺序治疗 MC38 结肠癌荷瘤鼠模型各组肿瘤重量；

25 图 8 实施例 3 中戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 不同给药顺序治疗 MC38 结肠癌荷瘤鼠模型各组肿瘤体积变化。

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 30 说明本发明而不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 戈氏梭菌芽孢对结肠癌荷瘤鼠模型治疗效果

材料：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，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、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：201803001F，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：1803122161，辰欣药业股份有限公司有售；灭菌注射用水，批号：1704242163，辰欣药业股份有限公司有售；CT26.WT 结肠癌细胞，编号：3131C0001000800037，中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心有售；BALB/c 雌性小鼠，动物合格证号：No.11401300088557 (120 只)，No.11401300089721 (60 只)，No.11401300089721 (60 只)，北京华阜康生物科技股份有限公司有售。

方法：CT26.WT 细胞复苏传代至所需细胞数量，制备浓度为 7.5×10^6 个/mL 的接种用细胞悬液，细胞活率在 90% 以上用于建立 BALB/c 小鼠结肠癌皮下移植瘤模型，小鼠右前肢皮下接种细胞悬液 0.2mL，10 天左右选择肿瘤体积约 0.30cm^3 的实验动物用于试验；成瘤合格的小鼠以抽签法随机分为 4 组：对照组 (Control)、低剂量治疗组 (L C.ghonii)、中剂量治疗组 (M C.ghonii)、高剂量治疗组 (H C.ghonii)，每组 8 只；戈氏梭菌芽孢冻干粉先用 0.1mL 灭菌注射用水复溶后，再用质量百分比浓度 0.9% 氯化钠注射液配制浓度分别为 5×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL、 2×10^8 cfu/mL 的混悬液，瘤内注射 0.1mL，隔天给药 1 次，共给药 5 次，给药剂量分别为 5×10^6 cfu/次、 1×10^7 cfu/次、 2×10^7 cfu/次，对照组的对照品浓度与高剂量治疗组相同；开始给药后，每天观察动物行为、死亡或濒死等临床症状，所有存活动物于末次给药后第 2 天进行解剖，称量肿瘤重量，并以肿瘤重量计算抑瘤率，肿瘤重量抑瘤率 ($\text{IR}_{\text{TW}}\%$) = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。以上述实验方法，分别进行 3 批独立重复实验。

结果：实验期间，3 批实验所有动物均未见濒死/死亡情况。实验结束，3

批实验各组荷瘤鼠平均肿瘤重量及治疗组抑瘤率如表 1、表 2 所示。

表 1 各组荷瘤鼠平均肿瘤重量 (g)

实验批次	Control 组	L C.ghonii 组	M C.ghonii 组	H C.ghonii 组
1	2.85±0.59	1.98±0.76	1.84±0.67	2.45±0.34
2	4.15±0.51	2.00±0.61	2.23±0.78	2.50±0.71
3	2.69±0.52	1.73±0.56	1.72±0.42	1.93±0.39

表 2 治疗组肿瘤重量抑瘤率 (%)

实验批次	L C.ghonii 组	M C.ghonii 组	H C.ghonii 组
1	30.40	35.58	14.12
2	51.90	46.17	39.79
3	35.46	35.97	28.06

与 Control 组相比，每批治疗组肿瘤重量均小于 Control 组，以 M C.ghonii 组抗肿瘤效果最好 (图 1 中 a)。各剂量治疗组均表现出对肿瘤生长的抑制作用，且实验批次 1 和 3 中 MC.ghonii 组肿瘤重量抑瘤率效果最好，实验批次 2 中 L C.ghonii 组肿瘤重量抑瘤率效果最好。根据 3 批次实验结果进行统计学分析发现，H C.ghonii 组肿瘤重量抑瘤率与 Control 组相比具有显著性差异 ($p<0.05$)，L C.ghonii 组和 M C.ghonii 组肿瘤重量抑瘤率与 Control 组相比具有极显著差异 ($p<0.01$)，图 1 中 b 所示。

综上所述，戈氏梭菌芽孢冻干粉对结肠癌生长具有抑制作用，且研究表明 MC.ghonii 组 (1×10^7 cfu/次) 优于其它治疗组效果。因此，在接下来与 Pembrolizumab 组合用药中 C.ghonii 优选剂量 1×10^7 cfu/次。

实施例 2 戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 对 PD-1 人源化转基因结肠癌荷瘤鼠模型治疗效果

材料：注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉，山东新创生物科技有限公司研制。制备方法同实施例 1 中材料；Pembrolizumab 注射液，批号：S001188，规格：100mg/4mL，美国默沙东公司有售；对照品冻干粉，批号 201910002F，201803001F，山东新创生物科技有限公司研制，制备方法同实施例 1 中材料；0.9%氯化钠注射液，批号：1809282161，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；MC38 结肠癌细胞，货号 T1917，Abm 生物科技有限公司有售；C57BL/6PD-1 人源化基因工程小鼠，动物合格证号：No.20170010002500 (90 只)，No.312024300008757 (35 只)，No.20170010001319 (50 只)，上海南方模式生物科技股份有限公司有售。

方法：MC38 细胞复苏传代至所需细胞数量，制备浓度为 7.5×10^6 个/mL 的接种用细胞悬液，细胞活率在 90% 以上建立 C57BL/6PD-1 人源化基因工程小鼠结肠癌皮下移植瘤模型，小鼠右前肢皮下接种 0.2mL 细胞悬液，10 天左右选择肿瘤体积大于 0.15cm^3 的实验动物用于试验；采用随机原则将筛选出符合要求的动物以抽签法分为 4 组：对照组 (Control)、戈氏梭菌芽孢治疗组 (C.ghonii)、Pembrolizumab 组和戈氏梭菌芽孢联合 Pembrolizumab 组 (C.ghonii+Pembrolizumab)，每组不少于 5 只；戈氏梭菌芽孢冻干粉先用 0.1mL 灭菌注射用水复溶后，再用质量百分比 0.9% 氯化钠注射液配制浓度 1×10^8 cfu/mL 的混悬液，瘤内注射 0.1mL，C.ghonii 组和 C.ghonii+Pembrolizumab 组注射芽孢 1×10^7 cfu/次，Control 组和 Pembrolizumab 组剂量为 0 cfu/次，隔 1 天给药 1 次，共给药 6 次；以 0.9% 氯化钠注射液将 Pembrolizumab 注射液稀释成终浓度为 1mg/mL 工作液，腹腔注射 0.2mL，Pembrolizumab 组和 C.ghonii+Pembrolizumab 组注射 Pembrolizumab 为 0.2mg/次，Control 组和 C.ghonii 组注射 0.2mL 0.9% 氯化钠注射液，每周给药 2 次，共 4 次。

15 优先给予戈氏梭菌芽孢再给予 PD-1 抗体，给药顺序如下：戈氏梭菌芽孢于第 1 天起，隔一天注射一次；Pembrolizumab 于第 3、6、9 和 13 天分别进行注射。

观测及评价指标：开始给药后，每天观察动物行为、死亡或濒死情况；每隔 1-2 天观测肿瘤体积，并以实验末次测量的肿瘤体积计算抑瘤率；所有存活动物于末次给药第 2 天后进行解剖，称量肿瘤重量，并以肿瘤重量计算抑瘤率。

20 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 $\times 100\%$ ；

肿瘤体积抑瘤率 ($IR_{TV}\%$) = $1 - (\text{实验组开始平均肿瘤体积} - \text{实验组结束平均肿瘤体积}) / (\text{对照组开始平均肿瘤体积} - \text{对照组结束平均肿瘤体积}) \times 100\%$ ；

25 治愈率 (%) = 每组治愈的动物数 / 每组总实验动物数 $\times 100\%$ (时间节点为试验结束)。

以上述实验方法，分别进行 3 批独立重复实验。

结果：实验期间，实验批次 1 中对照组 1 只小鼠死亡，其他各批各组未出现死亡或濒死情况。

30 1、各组荷瘤鼠平均肿瘤重量与抑瘤率

3 批实验各组荷瘤鼠平均肿瘤重量如表 3 所示。各治疗组平均肿瘤重量均小于 Control 组, 且 C.ghonii+Pembrolizumab 组肿瘤重量均小于任何一种药物单独治疗组, 与 Control 组相比, 极显著降低 ($P<0.01$)。C.ghonii+Pembrolizumab 组平均肿瘤重量也显著小于单独 C.ghonii 组和单独 Pembrolizumab 组 ($P<0.05$, $P<0.05$) (图 2 中 a)。

表 3 各组荷瘤鼠平均肿瘤重量 (g)

实验批次	Control 组	C.ghonii 组	Pembrolizumab 组	C.ghonii + Pembrolizumab 组
1	3.46±1.33	2.24±0.74	0.83±0.74	0.18±0.19
2	7.97±2.46	5.42±1.70	1.92±1.42	0.56±0.45
3	6.41±1.46	3.60±1.09	2.48±1.40	0.86±0.79

根据 3 批次实验结果进行统计学分析发现各治疗组表现出对肿瘤生长的抑制作用, 抑瘤率均在 30% 以上, 抑瘤率表现为 C.ghonii+Pembrolizumab 组 > Pembrolizumab 组 > C.ghonii 组 (图 2 中 b)。Pembrolizumab 给药相同剂量后, C.ghonii+Pembrolizumab 组比单独 Pembrolizumab 组抑瘤率分别提高了约 20%, 20%, 25% (表 4)。

表 4 治疗组肿瘤重量抑瘤率 (%)

实验批次	C.ghonii 组	Pembrolizumab 组	C.ghonii + Pembrolizumab 组
1	35.33	76.04	94.76
2	32.03	75.95	92.95
3	43.82	61.27	86.61

2、各组荷瘤鼠平均肿瘤体积与抑瘤率

实验开始前分组时各批次各组平均肿瘤体积均无显著性差异 ($P>0.05$)。批次 3 实验中荷瘤鼠给药末期, 与 Control 组相比, C.ghonii 组、Pembrolizumab 组和 C.ghonii+Pembrolizumab 肿瘤体积显著小于 Control 组 ($p=0.001$, $p=0.000053$, $p=0.000$)。C.ghonii+Pembrolizumab 组肿瘤体积明显小于 C.ghonii 组和 Pembrolizumab 组, 且在第 10 天联合组与 Control 组平均肿瘤体积出现显著性差异, 而此时 C.ghonii+Pembrolizumab 组肿瘤体积比 Pembrolizumab 组小近 1 倍 (图 3)。

以肿瘤体积计算抑瘤率, 3 批试验期间 C.ghonii+Pembrolizumab 组抑瘤率均大于其它各组抑瘤率 (图 4)。

3 批次实验中给药后第 7 天, Pembrolizumab 完成给药 2 次, Pembrolizumab 给药剂量 0.4mg 后, C.ghonii+Pembrolizumab 组抑瘤率分别为 51.29% (大于

50%)，49.78%（约 50%），59.33%（大于 50%），而此时单独 Pembrolizumab 组抑瘤率分别为 25.67%，7.68%，35.10%。单独 Pembrolizumab 组给药 3 次，Pembrolizumab 给药剂量 0.6mg 后，其抑瘤率才达到 C.ghonii+Pembrolizumab 组给药 2 次 Pembrolizumab(给药剂量 0.4mg)时的抑瘤率，分别为 69.31%，52.83%，53.08%（图 5）。可见，C.ghonii+Pembrolizumab 组显著提高了 Pembrolizumab 抗肿瘤效果，在获得同样治疗效果 C.ghonii+Pembrolizumab 组所需 Pembrolizumab 使用剂量降低 50%，高效低毒。

3、治愈率

3 批实验 C.ghonii+Pembrolizumab 组分别有约 20%（1/6、1/5、1/6）的小鼠肿瘤完全消除（表 5），至实验终点也未见肿瘤生长，而 Pembrolizumab 组和 C.ghonii 组均未出现肿瘤彻底消失情况，治愈率 0%。这可能与戈氏梭菌芽孢在肿瘤乏氧区萌发，通过多种方式影响 TME 免疫原性，使 TME 从一个免疫抑制状态变成免疫激活状态，同时调节免疫抑制性 TME，打破免疫耐受。联合 Pembrolizumab 后可将 PD-1 抗体治疗效果进一步放大，约 20%小鼠被治愈。戈氏梭菌有望成为肿瘤病人免疫治疗优秀的“增敏剂”。各组肿瘤瘤体形态见图 6。

表 5 治愈率（%）

实验批次	Control 组	C.ghonii 组	Pembrolizumab 组	C.ghonii + Pembrolizumab 组
1	0	0	0	16.7
2	0	0	0	20.0
3	0	0	0	16.7

实施例 3 戈氏梭菌芽孢和 Pembrolizumab 给药顺序对 PD-1 人源化转基因结肠癌荷瘤鼠模型治疗效果的影响

材料：注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉，山东新创生物科技有限公司研制，制备方法同实施例 1 中材料；Pembrolizumab 注射液，批号：S006648，规格：100mg/4mL，美国默沙东公司有售；对照品冻干粉，批号 201910002F，山东新创生物科技有限公司研制，制备方法同实施例 1 中材料；0.9%氯化钠注射液，批号：J18070104，山东华鲁制药有限公司有售；灭菌注射用水，批号：1902212162，辰欣药业股份有限公司有售；MC38 结肠癌细胞，货号 T1917，Abm 生物科技有限公司有售；C57BL/6PD-1 人源化基因工程小鼠，动物合格证号：No.20170010002500（90 只），上海南方模式生物科技股份有限公司有售。

方法：C57BL/6PD-1 人源化基因工程小鼠 MC38 结肠癌皮下移植瘤模型建

立方法同实施例 2；以抽签法将建模成功的小鼠随机分为 A 对照组（Control）、B 戈氏梭菌芽孢组（C.ghonii）、C Pembrolizumab 组、D 先 Pembrolizumab 后 C.ghonii 组、E 先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组、F C.ghonii+Pembrolizumab 同时组，每组 8 只；C.ghonii 给药剂量分别为 0 cfu/次、 1×10^7 cfu/次、0 cfu/次、 1×10^7 cfu/次、 1×10^7 cfu/次和 1×10^7 cfu/次，给药容量为 0.1mL/次，隔 1 天给药 1 次；1mg/mL Pembrolizumab 注射液腹腔给药 0.2mL，剂量为 0.2mg/次，隔 1 天给药 1 次。第一阶段给药过程如表 6 所示。

表 6 第一阶段给药过程

分 组	第一次给药		第二次给药		第三次给药		末次给药	
	C.ghonii	Pembrolizumab	C.ghonii	Pembrolizumab	C.ghonii	Pembrolizumab	C.ghonii	Pembrolizumab
A								
B	√		√		√		√	
C		√		√		√		√
D		√	√	√	√	√		√
E	√		√	√	√	√	√	
F	√	√	√	√	√	√	√	√

第一阶段给药结束，观察 6 天后，第二阶段重复第一阶段的给药过程。

观测及评价指标：开始给药后，每天观察动物行为、死亡或濒死情况，每隔 1-2 天观测肿瘤体积，并以实验末次测量的肿瘤体积计算抑瘤率。所有存活动物于第二阶段末次给药后第 8 天进行解剖。称量肿瘤重量，并以肿瘤重量计算抑瘤率。

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 $\times 100\%$ ；

治愈率（%）=每组治愈的动物数/每组总实验动物数 $\times 100\%$ （时间节点为试验结束）。

结果：实验期间，Control 组因肿瘤过大或破溃出现 4 只动物死亡，其它各组未出现动物死亡或濒死情况。

1、肿瘤重量与抑瘤率

与 Control 组相比，C.ghonii 组、Pembrolizumab 组、先 Pembrolizumab 后 C.ghonii 组、先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组、C.ghonii+Pembrolizumab 组肿瘤重量均显著小于 Control 组（ $p=0.005$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$ ）。各组肿瘤重量检测结果见表 7，图 7。

表 7 肿瘤重量

分组	Control 组	C.ghonii 组	Pembrolizumab 组	先 Pembrolizumab 后 C.ghonii 组	先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组	C.ghonii+ Pembrolizumab 组
肿瘤重量 (g)	7.43±2.66	4.65±1.72	1.77±2.08**	0.95±1.29**	0.54±0.69**	0.58±0.56**

备注：与 Control 组相比，**p<0.01。

根据肿瘤重量计算抑瘤率，结果显示 C.ghonii 组、Pembrolizumab 组、先
Pembrolizumab 后 C.ghonii 组、先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组、
5 C.ghonii+Pembrolizumab 组抑瘤率分别为 37.39%、76.20%、87.26%、92.71%
和 92.19%，各治疗组均表现出对肿瘤生长的明显抑制作用，见表 8。

表 8 抑瘤率

分组	C.ghonii 组	Pembrolizumab 组	先 Pembrolizumab 后 C.ghonii 组	先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组	C.ghonii +Pembrolizumab 组
抑瘤率 (%)	37.39	76.20	87.26	92.71	92.19

2、肿瘤体积与抑瘤率

治疗前，各组荷瘤鼠肿瘤体积均无显著差异 (p>0.05)。给药末期，与 Control
10 组相比，C.ghonii 组、Pembrolizumab 组、先 Pembrolizumab 后 C.ghonii 组、先
C.ghonii 后 Pembrolizumab 组、C.ghonii+Pembrolizumab 同时组肿瘤体积均显著
小于 Control 组 (p=0.002, p=0.000, p=0.000, p=0.000, p=0.000, 图 8)。
抑瘤率表现为先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组>C.ghonii+Pembrolizumab 同时组>
先 Pembrolizumab 后 C.ghonii 组>Pembrolizumab 组>Control 组，见表 9。

15

表 9 抑瘤率

分组	Control 组	C.ghonii 组	Pembrolizumab 组	先 Pembrolizumab 后 C.ghonii 组	先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组	C.ghonii+ Pembrolizumab 组
抑瘤率 (%)	---	40.99	79.07	87.36	93.62	93.42

3、治愈率

试验期间，各组的治愈率见表 10。

表 10 治愈率

分组	Control	C.ghonii	Pembrolizumab	先	先 C.ghonii 后	C.ghonii+
----	---------	----------	---------------	---	--------------	-----------

	组	组	组	Pembrolizumab 后 C.ghonii 组	Pembrolizumab 组	Pembrolizumab 组
治愈 率 (%)	0	0	0	12.5	25	12.5

先 C.ghonii 后 Pembrolizumab 组小鼠肿瘤治愈率明显高于其他组，为先
Pembrolizumab 后 C.ghonii 组和 C.ghonii+Pembrolizumab 同时组治愈率的 2 倍。
这可能是由于先瘤内给予戈氏梭菌芽孢有效而不加区分溶解肿瘤组织，破坏
TME，同时细菌溶瘤后也会募集免疫细胞向 TME 的浸润，改变了 TME 中免疫
5 细胞浸润程度和组成，包括细胞裂解产物会吸引大量的 CD8⁺T 细胞聚集，在溶
瘤细菌之后应用 PD-1 抗体治疗，避免免疫治疗中的免疫抑制，发动 T 细胞对
肿瘤细胞的大规模攻击，从而发挥“双重”抗癌功效。因此溶瘤细菌与免疫抑制
剂联合使用时给药顺序对于肿瘤的治疗效果也十分关键。

10 综上，优先使用戈氏梭菌芽孢治疗再与免疫疗法联用可以增强抗肿瘤功效，
降低免疫药物的使用剂量，高效低毒。

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. 戈氏梭菌芽孢联合帕博利珠单抗在制备治疗结肠癌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，所述戈氏梭菌芽孢和帕博利珠单抗的使用顺序为先戈氏梭菌芽孢后帕博利珠单抗。
3. 根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述戈氏梭菌芽孢为注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉。
4. 一种治疗结肠癌的药物，所述药物中的药效成分包括戈氏梭菌芽孢和帕博利珠单抗。
5. 如权利要求 4 所述的药物，其特征在于，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，菌株编号为 V12/001486。
6. 如权利要求 4 所述的药物，其特征在于，所述戈氏梭菌驯化后获得的菌株为 MW-DCG-HNCv-18 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。
7. 如权利要求 4 所述的药物，其特征在于，所述戈氏梭菌驯化后获得的菌株为 MW-DCG-CCv-17 菌株，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。
8. 如权利要求 4 所述的药物，其特征在于，所述药物中的戈氏梭菌芽孢为注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉，所述注射用芽孢冻干粉中的辅料为 1% 蔗糖。
9. 如权利要求 8 所述的药物，其特征在于，所述注射用戈氏梭菌冻干粉的冻干工艺为：冻结阶段 -40℃ 4h；-35℃ 10min 同时抽真空、-30℃ 10min、-25℃ 10min、-20℃ 26h、-15℃ 2h、-10℃ 10min、-5℃ 10min、0℃ 10min、10℃ 2h、15℃ 10min、20℃ 3h、27℃ 3h 冻干制备。
10. 如权利要求 3 所述的药物，其特征在于，所述帕博利珠单抗为 PD-1 抗体注射液。
11. 如权利要求 3 所述的药物，其特征在于，所述每 1×10^7 CFU 戈氏梭菌芽孢联合浓度 1mg/mL 的帕博利珠单抗溶液 0.2mg。
12. 如权利要求 11 所述的药物，其特征在于，所述帕博利珠单抗溶液的溶

媒为质量百分比浓度 0.9% 的氯化钠注射液。

13. 如权利要求 11 所述的药物，其特征在于，所述戈氏梭菌芽孢为注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉，所述注射用戈氏梭菌芽孢冻干粉的溶媒为灭菌注射用水和质量百分浓度 0.9% 氯化钠注射液。

5 14. 权利要求 3~13 任一项所述的药物在治疗结肠癌中的应用。

15. 如权利要求 14 所述的应用，其特征在于，所述药物中戈氏梭菌芽孢和帕博利珠单抗的使用顺序为先戈氏梭菌芽孢后帕博利珠单抗。