抗肿瘤组合物

技术领域

本申请涉及一种抗肿瘤组合物，更具体涉及阿克曼氏菌组合物与免疫检查点抑制剂的联合使用。

背景技术

治愈癌症一直是医学领域的一大难题，传统的化疗、放疗等治疗方式都会对患者带来较大的副作用和痛苦。近几年，癌症的免疫疗法在血液瘤和部分实体瘤中展现了惊人的疗效，且给患者带来的副作用较小，给人类治愈癌症带来了巨大的希望。

正常情况下，肿瘤细胞的表面存在可被人体免疫 T 细胞识别的抗原，而人体的免疫系统是能够识别并杀死肿瘤细胞的，然而肿瘤细胞为了生存和生长，会采用各种方式来躲避免疫系统的识别和杀伤。肿瘤免疫疗法就是识别并破坏掉肿瘤细胞的这种伎俩，使人体恢复正常的抗肿瘤免疫反应，从而可以控制和消除多种肿瘤。肿瘤免疫疗法主要包括五种类型：（1）治疗性抗体；（2）癌症疫苗；（3）细胞治疗，即 CAR-T 疗法；（4）免疫调节剂；（5）免疫检查点抑制剂。

人体免疫系统的活性受共刺激分子的调控，共刺激分子就是免疫检查点。当发生抗原识别时，其他分子与免疫细胞和靶细胞表面分子相互作用，进而确定相互作用的平衡。如果很大程度上信号是正性的，免疫细胞会被激活并攻击靶细胞呈递的抗原。反之，如果信号是负性的，免疫细胞会失活，这种失活有时是永久性的，并且抗原被识别为正常/自身抗原。已经相对研究清楚的癌症相关免疫检查点包括 CTLA-4，PD-1 和 PD-L1。免疫检查点抑制剂就是针对相应的免疫检查点研发的一些单抗类药物，其主要作用为阻断表达免疫检查点的肿瘤细胞与免疫细胞之间的作用，从而阻断肿瘤细胞对免疫细胞的抑制作用。目前广泛应用的免疫检查点抑制剂包括靶向程序性死亡蛋白 1（PD-1）及其配体（PD-L1）的单克隆抗体。PD-1 抗体对于阻断晚期黑色素瘤、非小细胞肺癌和肾细胞癌非常有效，在治疗肿瘤上取

得了重大的突破。但由于肿瘤致病机理复杂、患者个体差异较大，再加上环境因素的影响，免疫检查点抑制剂目前只能对约 25%的患者起效。

越来越多研究表明，肠道微生物也是影响癌症免疫治疗效果的重要因素。2015 年，Marie Vétizou 等人发现给经过抗生素处理或者无菌小鼠体内接种的肿瘤，不会对 CTLA-4 抑制剂产生响应，而给小鼠饲喂脆弱拟杆菌后，CTLA-4 抑制剂抗肿瘤的效果得以恢复。2017 年，Routy B 等人的研究表明抗 PD-1 抑制剂与某些特定的肠道菌群联合使用，显著提高了肿瘤患者对其的响应，并显著提高了患者的平均无进展生存期（PFS）。综上，肠道微生物在改善免疫检查点抑制剂的疗效上具有巨大的应用潜力。因此，本领域需要开发一种新的抗肿瘤组合物，其具有更好的抗肿瘤效果，特别是对于特定的肿瘤具有更好的治疗效果。

发明内容

本申请的发明人发现，阿克曼氏菌组合物与免疫检查点抑制剂联合使用可有效抑制各种肿瘤，包括但不限于，结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌、尿路上皮癌等。

本申请一方面提供了一种抗肿瘤组合物，其包括：

（A）阿克曼氏菌；以及

（B）免疫检查点抑制剂。

在本申请的一个实例中，所述阿克曼氏菌是阿克曼氏菌菌株 *Akkermansiamuciniphila* SSYD-3，其保藏号为 CGMCC No.14764。

在本申请的一个实例中，所述阿克曼氏菌与其他菌（如双歧杆菌、乳杆菌、梭菌、屎肠球菌、粪便普雷沃氏菌、瘤胃球菌）组合在一起。

在本申请的一个实例中，所述阿克曼氏菌和免疫检查点抑制剂混合在一起制备单一制剂，或者物理上分离分别使用。

在本申请的一个实例中，所述阿克曼氏菌是口服的。

在本申请的一个实例中，所述抗肿瘤组合物还包括抗生素。

在本申请的一个实例中，所述肿瘤选自结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌或尿路上皮癌。

本申请另一方面提供了阿克曼氏菌在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

在本申请的一个实例中，所述阿克曼氏菌与免疫检查点抑制剂联合使用。

在本申请的一个实例中，所述用途是提高免疫检查点抑制剂抑制肿瘤的效果，优选地，所述肿瘤选自结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌或尿路上皮癌。

附图说明

图 1 描述了抗生素处理造成的肠道菌群破坏影响 anti-m PD-1 对 MC38 荷瘤小鼠的治疗效果。

图 2 描述了 anti-m PD-1 单独注射，以及和阿克曼氏菌 SSYD-3 联合使用对 MC38 肿瘤的治疗效果。

图 3 描述了 anti-m PD-1 单独注射，以及和阿克曼氏菌 SSYD-3 联合使用时 MC38 荷瘤小鼠体内肿瘤浸润的 CD8 T 细胞数。

图 4 描述了 anti-m PD-1 单独注射，以及和阿克曼氏菌 SSYD-3 联合使用时 MC38 荷瘤小鼠体内平均 CD3 细胞数。

图 5 描述了 anti-m PD-1 单独注射，以及和阿克曼氏菌 SSYD-3 联合使用时 MC38 荷瘤小鼠体内平均 Treg 细胞数。

图 6 描述了 anti-m PD-1 单独注射，以及和阿克曼氏菌 SSYD-3 联合使用对 4T1 肿瘤的治疗效果。

图 7 描述了 anti-m PD-1 单独注射，以及和阿克曼氏菌 SSYD-3 联合使用对 LLC1 肿瘤的治疗效果。

具体实施方式

在本发明中，如果没有特别的说明，百分数（%）或者份都指相对于组合物的重量百分数或者重量份。

在本发明中，如果没有特别的说明，所涉及的各组分或其优选组分可以相互组合形成新的技术方案。

在本发明中，如果没有特别的说明，本文所提到的所有实施方式以及优选实施方式可以相互组合形成新的技术方案。

在本发明中，如果没有特别的说明，本文所提到的所有技术特征以及优选

特征可以相互组合形成新的技术方案。

在本发明中，如果没有相反的说明，组合物中各组分的含量之和为100％。

在本发明中，如果没有相反的说明，组合物中各组分的份数之和可以为100重量份。

在本发明中，除非有其他说明，数值范围“a-b”表示a到b之间的任意实数组合的缩略表示，其中a和b都是实数。例如数值范围“0-5”表示本文中已经全部列出了“0-5”之间的全部实数，“0-5”只是这些数值组合的缩略表示。

在本发明中，除非有其他说明，整数数值范围“a-b”表示a到b之间的任意整数组合的缩略表示，其中a和b都是整数。例如整数数值范围“1-N”表示1、2……N，其中N是整数。

在本发明中，除非有其他说明，“其组合”表示所述各元件的多组分混合物，例如两种、三种、四种以及直到最大可能的多组分混合物。

如果没有特别指出，本说明书所用的术语“一种”指“至少一种”。

如果没有特别指出，本发明所述的百分数（包括重量百分数）的基准都是所述组合物的总重量。

本文所公开的“范围”以下限和上限的形式。可以分别为一个或多个下限，和一个或多个上限。给定范围是通过选定一个下限和一个上限进行限定的。选定的下限和上限限定了特别范围的边界。所有可以这种方式进行限定的范围是包含和可组合的，即任何下限可以与任何上限组合形成一个范围。例如，针对特定参数列出了60－120和80－110的范围，理解为60－110和80－120的范围也是预料到的。此外，如果列出的最小范围值1和2，和如果列出了最大范围值3，4和5，则下面的范围可全部预料到：1－3、1－4、1－5、2－3、2－4、和2－5。

在本文中，除非另有说明，各组分的比例或者重量都指干重。

在本文中，除非另有说明，“不变”表示变化在±10％以内，较好在±5％以内，更好在±2％以内，最后在±1％。

在本文中，阿克曼氏菌菌株包括衍生自阿克曼氏菌菌株的活性成分，或者测序鉴定结果与阿克曼氏菌的序列相似性至少97%的菌株。

阿克曼氏菌菌株

本申请所述的阿克曼氏菌菌株可通过市售渠道获得，也可通过现有技术获得。例如，申请号为CN201380070847.0、公开号为CN 104918626 A的中国发明专利申请公开了“阿克曼氏菌属用于治疗代谢病症的用途”，该专利申请公开了阿克曼氏菌菌株ATCC BAA835。

在本申请的一个优选实例中，所述阿克曼氏菌（*Akkermansiamuciniphila*）菌株命名为*Akkermansiamuciniphila* SSYD-3，其保藏号为CGMCC No.14764。

本发明的*Akkermansiamuciniphila* SSYD-3（简称W03菌株），已于2017年09月29日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC），保藏地址：北京市朝阳区北辰西路1号院3号，邮编：100101，保藏编号分别为：CGMCC No.14764，培养物名称是*Akkermansiamuciniphila* SSYD-3，分类命名是*Akkermansiamuciniphila*。

所述阿克曼氏菌菌株可制成各种合适的剂型，例如口服液、片剂、胶囊、口崩片、冻干粉等等。在本申请的一个优选实例中，所述剂型为胶囊。在本申请的另一个优选实例中，所述剂型为片剂。所述剂型优选为冻干菌剂，其中的活菌数优选10^{10}CFU/g。其中，所述有效剂量是指阿克曼氏菌作为主要药物活性成分制成的固体活菌制剂包含的总活菌数为10^{6}-10^{14}CFU/g。其中，所述有效剂量是指阿克曼氏菌作为主要药物活性成分制成的液体活菌制剂包含的总活菌数为10^{6}-10^{14}CFU/mL。

在本申请的一个优选实例中，所述阿克曼氏菌菌株还可与其他菌株（包括但不限于双歧杆菌、乳杆菌、梭菌、屎肠球菌、粪便普雷沃氏菌、瘤胃球菌等）一起使用。

免疫检查点抑制剂

本申请使用的免疫检查点抑制剂可以是任意市售产品，如PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、CTLA-4抑制剂等。在一个优选的实例中，所述免疫检查点抑制剂包括可瑞达(Keytruda)、特善奇（Tecentriq）、纳武利尤单抗注射液(Nivolumab Injection)、Bavencio（Avelumab）、拓益（特瑞普利单抗注射液）。

抗肿瘤组合物

在本申请中，所述阿克曼氏菌菌株和免疫检查点抑制剂可混合在一起制备单一制剂一起使用，也可以物理上分离分别使用。在本申请的一个实例中，所述阿克曼氏菌菌株和免疫检查点抑制剂物理上分离分别使用。在本申请的另一个实例中，所述阿克曼氏菌菌株可以在施用免疫检查点抑制剂之前施用给患者。通常，所述阿克曼氏菌菌株可以任何合适的方式（包括但不限于口服、注射等等）施用给患者。所述免疫检查点抑制剂可以任何合适的方式（包括但不限于口服、注射等）施用给患者。所述阿克曼氏菌菌株或免疫检查点抑制剂的使用方法是本领域常规的，本领域普通技术人员根据说明书的描述再结合现有技术可直接确定。

在本申请中，所述抗肿瘤组合物还可包括抗生素。所述抗生素可以是任何合适的抗生素，例如但不限于喹诺酮类抗生素、β-内酰胺类抗生素、大环内酯类、氨基糖苷类抗生素等。在本申请的一个优选实例中，所述抗生素包括但不限于 β-内酰胺类抗生素（如青霉素、氨苄西林、羧苄西林、甲氧西林、苯唑西林、双氯西林、氟氯西林、头孢拉定、头孢噻肟、头孢氨苄、头孢曲松、头孢匹罗、头孢克肟、头孢托仑酯、头孢地尼、头孢丁烯、头孢帕胯酯、亚胺培南、氨曲南、头孢米诺钠、比安培南、亚胺培南、美罗培南等）；大环内酯类抗生素（如红霉素、白霉素、罗红霉素、琥乙红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、乙酰螺旋霉素、麦白霉素、麦迪霉素、交沙霉素、泰利霉素等）；氨基糖苷类抗生素（链霉素、庆大霉素、阿贝卡星、丁胺卡那霉素等）；喹诺酮类抗菌素（如环丙沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星等）；其他抗生素及抗菌药物（如四环素类、氯霉素类、林可霉素、利福霉素类如利福喷丁、多肽类如万古霉素、磺胺类如新诺明、甲硝唑类等）；抗真菌药物（如二性霉素、灰黄霉素、达克宁等）；抗肿瘤抗生素（如丝裂霉素、放线菌素 D、博莱霉素、阿霉素等）等。

在本申请中，所述抗生素可与其他组分分开包装，并单独施用。

在本申请的一个优选实例中，所述抗肿瘤组合物还包括说明书，所述说明书描述施用阿克曼氏菌菌株一段时间（例如 1-10 天），然后再施用 PD-1 抑制剂一段时间（例如 10-100 天）。优选的，阿克曼氏菌菌株剂量范围：10^4-10^{13}CFU/人/天，免疫检查点抑制剂剂量范围：0.5-10 mg/kg。

所述说明书还描述在施用阿克曼氏菌菌株和免疫检查点抑制剂之前，先施

用抗生素一段时间（例如 1-3 天）。优选地，抗生素的剂量范围：1-500 mg/kg。

本申请的抗肿瘤组合物可有效治疗各种肿瘤，特别是（但不限于）结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌、尿路上皮癌等等。

本申请另一方面提供了阿克曼氏菌菌株在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

在本申请中，所述阿克曼氏菌菌株可联合免疫检查点抑制剂抑制肿瘤（例如结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌、尿路上皮癌等）的生长。发明人发现，当患者使用抗生素时，免疫检查点抑制剂抑制肿瘤生长的效果受到限制，但是在给予免疫检查点抑制剂之前或同时施用阿克曼氏菌菌株可有效提高免疫检查点抑制剂抑制肿瘤的效果。

本申请另一方面提供了阿克曼氏菌菌株在治疗肿瘤中的用途。在本申请的一个实例中，所述用途包括抑制肿瘤生长。优选地，所述阿克曼氏菌菌株可与免疫检查点抑制剂联合使用。通常，所述肿瘤包括但不限于结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌、尿路上皮癌等。

以下结合实施例详细描述本申请，但本申请的范围并不局限于此。

实施例所用原料如下：

6-8 周 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠（20-26g），来自于江苏集萃药康生物科技有限公司，质量合格证号为 201805120。饲养条件为温度控制在（23±3）℃，湿度为 40-70%，小鼠自由饮食饮水。

抗 PD-1 抑制剂购自亦康（北京）医药科技有限公司，浓度为 7.09mg/mL，2-8℃避光储存。加入适量磷酸缓冲盐溶液（PBS）混匀至指定浓度的溶液。

氨苄青霉素（Ampicillin）购自安徽安丰堂动物药业有限公司，链霉素（Streptomycin）购自 Solarbio 公司，硫酸粘菌素可溶性粉（Colistin）购自山东鲁西兽药股份有限公司。

MC38 肿瘤细胞购自如汀生物技术（北京）有限公司，用灭火的 10%胎牛血清，100U/mL 的青霉素和 100μg/mL 的链霉素以及 2mM 谷氨酰胺的 DMEM

培养基在37℃、5%CO_2的培养箱中培养肿瘤细胞，每隔3天左右待细胞长满后分瓶传代，将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

小鼠乳腺癌4T1细胞（ATCC，货号：CRL-2539），LLC1肺癌细胞（购自上海生命科学研究院）。

肿瘤体积的测量：

肿瘤体积：每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行3次的测量，测量肿瘤的长径和短径，其体积计算公式为：体积=0.5×长径×短径^2。

实施例1：阿克曼氏菌CGMCC No.14764的冻干菌剂

培养基

分离培养基：0.4g KH_2PO_4；0.53g Na_2HPO_4；0.3g NH_4Cl；0.3g NaCl；0.1g $MgCl_2·6H_2O$；0.11g $CaCl_2$；0.5mg 刃天青；4g $NaHCO_3$；0.25g $Na_2S·7\text{-}9H_2O$; 0.25%粘蛋白。

发酵培养基1：Brain Heart Infusion Broth（脑心浸粉，BHI）

发酵培养基2：5g 胰蛋白胨，5g 大豆胨，5g 牛肉粉，5g 酵母粉，4g 葡萄糖，3gNaCl，1.5g $MgSO_4$，Na_2HPO_4，KH_2PO_4，水1L，pH=7.2。

分离和发酵培养基121℃高压灭菌15min备用。

菌株的分离鉴定

①配置好的粘蛋白分离培养基置于血清瓶（装液量10/30 mL）

②取0.5g健康成人粪便置于无菌PBS磷酸缓冲盐溶液分散均匀，粪便依次在PBS溶液中10倍梯度稀释，取1mL稀释液接种于粘蛋白分离培养基血清瓶

③粘蛋白血清瓶置于37℃，厌氧环境中培养48h

④取肉眼可见浑浊的最高稀释梯度下的粘蛋白发酵液，用PBS缓冲液稀释至10^{-6}-10^{-9}

⑤稀释液涂布于脑心粉琼脂培养基，培养24-48h，挑取菌落大小为1mm菌落纯化培养后进行细菌16S rDNA菌种鉴定

结果：结合菌落形态特征、生理和生化特征，并扩增细菌 16SrDNA，W03 细菌 16S rDNA 序列如序列表 1 所示，将测序序列与 GenBank 中已上传的 16S rDNA 基因序列进行同源性比较，经鉴定分离的细菌为阿克曼氏菌（*Akkermansiamuciniphila*），命名为 *Akkermansiamuciniphila* SSYD-3，保藏号为 CGMCC No.14764。与已有的序列比对相似度最高为 99%。

阿克曼氏菌发酵

①阿克曼氏菌三区划线接种于脑心粉琼脂，厌氧 37℃培养 48h。

②从琼脂平板中挑取阿克曼氏菌单菌落接种于 15mL 脑心浸粉液体培养基，厌氧 37℃培养 24h。

③从 15mL 厌氧管中转接 10mL 发酵液至 200mL 脑心浸粉液体培养基，厌氧 37℃培养 24h。

④ 200mL 阿克曼氏菌发酵液接种于脑心浸粉液体培养基，5L 发酵罐装量体积为 4L，厌氧气体为氮气和二氧化碳混合二元气（N2:CO2=9:1），搅拌转速为 100r/min，温度 37℃，厌氧培养 24h。

阿克曼氏菌 CGMCC No.14764 的冻干菌剂

①冷冻干燥保护剂：海藻糖，蔗糖，奶粉。

②上述所得发酵液 8000R，离心 20min，收集菌体。

③阿克曼氏菌离心所得菌体与冷冻干燥保护剂、水混合，使冻干之前的溶液中海藻糖、蔗糖、奶粉的质量百分含量分别为 5%、5%和 10%，冷冻干燥，获得冷冻干燥菌粉，菌粉中保藏号为 CGMCC No.14764 的阿克曼氏菌菌株的活菌数为 10^{10}CFU/g。

实施例 2

6-8 周雄性 C57BL/6J 小鼠（20-26g，SPF 级）48 只，适应环境一周后，按照体重随机分为 4 组，每组 12 只，分别为：第 1 组（无抗生素处理，空白，*i.p.*）、第 2 组（无抗生素处理，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）、第 3 组（抗生素处理，空白，*i.p.*）、第 4 组（抗生素处理，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）。抗生素处

理是使用广谱抗生素 Ampicillin（1mg/mL）+colistin（1mg/mL）+streptomycin（5mg/mL）饮水给药 5 天。所有组别的小鼠接种磷酸缓冲盐溶液（PBS）重悬的 MC38 肿瘤细胞，浓度为 1×10^7 个/mL，接种于实验动物的右侧胁肋部皮下，100μL/只。第 2 组和第 4 组小鼠，肿瘤细胞接种后第 4 天注射 anti-mPD-1，每 4 天注射一次，共注射 4 次。小鼠于肿瘤接种后第 19 天安乐处死，剥取各组小鼠的肿瘤。

MC38 肿瘤细胞购自如汀生物技术有限公司，用含有灭活的 10%胎牛血清，100U/mL 的青霉素和 100μg/mL 的链霉素以及 2mM 谷氨酰胺的 DMEM 培养基在 37℃、5%CO_2 的培养箱培养肿瘤细胞，每隔 3 天左右待细胞长满后分瓶传代，将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

实验结果如图 1 所示。结果表明：抗生素处理破坏了小鼠肠道菌群后，小鼠的肿瘤生长加快，肿瘤体积增加，并减弱了 anti-m PD-1 抗肿瘤效果，表明肠道菌群影响小鼠肿瘤的生长速度以及 anti-m PD-1 的抗肿瘤效果。

实施例 3

6-8 周雄性 C57BL/6J 小鼠（20-26g，SPF 级）48 只，适应环境一周后，按照体重随机分为 4 组，第 1 组（无抗生素处理，空白，*i.p.*）、第 2 组（抗生素处理，空白，*i.p.*）、第 3 组（抗生素处理，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）、第 4 组（抗生素处理，阿克曼氏菌 SSYD-3，*p.o.*，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）。使用广谱抗生素 Ampicillin（1mg/mL）+colistin（1mg/mL）+streptomycin（5mg/mL）饮水给药 5 天。第 4 组小鼠开始给予阿克曼氏菌 SSYD-3 冻干样品，灌胃浓度为 1.0×10^8CFU/只/天。持续灌胃 2 周后，所有组别接种 PBS 重悬的 MC38 肿瘤细胞，浓度为 1×10^7 个/mL，接种于实验动物的右侧胁肋部皮下，100μL/只。第 3 组和第 4 组小鼠，肿瘤细胞接种后第 4 天注射 anti-mPD-1，每 4 天注射一次，共注射 4 次。小鼠于肿瘤接种后第 19 天称体重，随后安乐处死，称量小鼠肿瘤体重并记录。

MC38 肿瘤细胞购自如汀生物技术有限公司，用含有灭活的 10%胎牛血清，100U/mL 的青霉素和 100μg/mL 的链霉素以及 2mM 谷氨酰胺的 DMEM 培养基在 37℃、5%CO2 的培养箱培养肿瘤细胞，每隔 3 天左右待细胞长满后分瓶传

代，将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

试验结果如图 2 所示。菌株与 anti-mPD-1 联合治疗效果，较单独 anti-mPD-1 治疗组，显著抑制了肿瘤生长，明显减小肿瘤体积。结果表明，阿克曼氏菌 SSYD-3 能够有效提高 anti-mPD-1 的治疗效果。$P<0.05$ 表明存在显著性差异。

实施例 4

实施例 3 中的小鼠于肿瘤接种后第 19 天安乐处死，流氏细胞术（艾森生物有限公司,NovoCyte 3130）检测肿瘤细胞内的 CD3、CD4、CD8、FOXP3、CD25、CXCR3、Gata3、Granzyme B、CD69、PD-1、CTLA-4，和 CD11b、MHCⅡ、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1。免疫因子分析包括 TNF-α、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP-10、MIP1b 和 MAC-1。对抗生素处理后的小鼠 anti-m PD-1 单独治疗，以及给予阿克曼氏菌 SSYD-3 与 anti-m PD-1 联合治疗结果如图 3 所示，结果表明阿克曼氏菌 SSYD-3 与注射 anti-m PD-1 联合治疗后，肿瘤浸润的 CD8 T 细胞数显著增加，说明阿克曼氏菌 SSYD-3 增强了 anti-mPD-1 的抗肿瘤效果。

实施例 5：

实施例 3 中的小鼠经 anti-m PD-1 单独治疗，以及给与阿克曼氏菌 SSYD-3 与 anti-m PD-1 联合治疗后第 19 天安乐处死，流氏细胞术（艾森生物有限公司,NovoCyte 3130）检测肿瘤细胞内的 CD3、CD4、CD8、FOXP3、CD25、CXCR3、Gata3、Granzyme B、CD69、PD-1、CTLA-4，和 CD11b、MHCⅡ、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1。免疫因子分析包括 TNF-α、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP-10、MIP1b 和 MAC-1。小鼠体内免疫细胞变化的结果如图 4 所示，结果表明相较于 anti-m PD-1 单独注射，anti-m PD-1 与阿克曼氏菌 SSYD-3 联合治疗使肿瘤组织内 CD3 细胞的水平显著增加，增强了机体的免疫力。图中均与抗生素处理组相比，$P<0.05$ 表明存在显著性差异，*$P<0.05$，**$P<0.01$。

实施例 6

实施例 3 中的小鼠经 anti-m PD-1 单独治疗，以及给予阿克曼氏菌 SSYD-3 与 anti-m PD-1 联合治疗后第 19 天安乐处死，流氏细胞术（艾森生物有限公司,NovoCyte 3130）检测肿瘤细胞内的 CD3、CD4、CD8、FOXP3、CD25、CXCR3、Gata3、Granzyme B、CD69、PD-1、CTLA-4，和 CD11b、MHCⅡ、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1。免疫因子分析包括 TNF-α、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP-10、MIP1b 和 MAC-1，实验结果如图 5 所示。抗生素处理后小鼠肿瘤组织内的 Treg 细胞数略有增加，但无显著性差异，经 anti-mPD-1 治疗的抗生素处理组 Treg 细胞数显著降低（$P<0.01$），阿克曼氏菌 SSYD-3 与 anti-mPD-1 联合治疗也显著降低了小鼠体内的 Treg 细胞数（$P<0.001$）。上述结果表明：单独注射 anti-mPD-1 部分解除了小鼠体内的免疫抑制系统，与阿克曼氏菌 SSYD-3 联合使用进一步解除了小鼠体内的免疫抑制作用，恢复了机体的免疫活性和抗肿瘤效果。与抗生素处理组相比，$P<0.05$ 表明存在显著性差异，**$P<0.01$，***$P<0.001$。

实施例 7

6-8 周雄性 C57BL/6J 小鼠（20-26g，SPF 级）36 只，适应环境一周后，按照体重随机分为 3 组，第 1 组（抗生素处理，空白，*i.p.*）、第 2 组（抗生素处理，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）、第 3 组（抗生素处理，阿克曼氏菌 SSYD-3，*p.o.*，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）。各组小鼠使用广谱抗生素 Ampicillin（1mg/mL）+colistin（1mg/mL）+streptomycin（5mg/mL）饮水给药 5 天。然后第 3 组开始给予阿克曼氏菌 SSYD-3 冻干样品，灌胃浓度为 1.0×10^{8}CFU/只/天。持续灌胃 2 周后，所有组别小鼠接种 PBS 重悬的 4T1 肿瘤细胞，浓度为 1×10^{7} 个/mL，接种于实验动物的右侧胁肋部皮下，100μL/只。第 2 组和第 3 组小鼠，肿瘤细胞接种后第 4 天注射 anti-mPD-1，每 4 天注射一次，共注射 4 次。小鼠于肿瘤接种后第 19 天测量肿瘤体积，随后安乐处死各组小鼠并剥取肿瘤组织。

结果如图 6 所示。在对 anti-mPD-1 治疗不敏感的 4T1 乳腺癌模型中，阿克曼氏菌 SSYD-3 与 anti-mPD-1 的联合治疗显著增强了 anti-mPD-1 对 4T1 乳腺癌的治疗效果（$P<0.0001$），表明阿克曼氏菌 SSYD-3 能够增强机体对 anti-mPD-1

的响应，扩大 anti-mPD-1 治疗肿瘤的应用范围。

实施例 8：

6-8 周雄性 C57BL/6J 小鼠（20-26g，SPF 级）36 只，适应环境一周后，按照体重随机分为 3 组，第 1 组（抗生素处理，空白，*i.p.*）、第 2 组（抗生素处理，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）、第 3 组（抗生素处理，阿克曼氏菌 SSYD-3，*p.o.*，anti-mPD-1，10mg/kg，*i.p.*）。各组小鼠使用广谱抗生素 Ampicillin（1mg/mL）+colistin（1mg/mL）+streptomycin（5mg/mL）饮水给药 5 天。第 3 组小鼠开始给与阿克曼氏菌 SSYD-3 冻干样品，灌胃浓度为 1.0×10^{8}CFU/只/天。持续灌胃 2 周后，所有组别接种 PBS 重悬的 LLC1 肺癌细胞，浓度为 1×10^{5} 个/mL，接种于实验动物的右侧胁肋部皮下，100μL/只。第 2 组和第 3 组小鼠，肿瘤细胞接种后第 4 天注射 anti-mPD-1，每 4 天注射一次，共注射 4 次。小鼠于肿瘤接种后第 19 天测量肿瘤体积，随后安乐处死各组小鼠并剥取肿瘤组织。

如图 7 所示，在对 anti-mPD-1 较不响应的 LLC1 肺癌模型中，抗生素处理小鼠经 anti-mPD-1 与阿克曼氏菌 SSYD-3 的联合治疗，与 anti-mPD-1 的单独治疗相比，肿瘤体积显著减小（$P<0.0001$），说明阿克曼氏菌 SSYD-3 显著提高了 LLC1 肺癌对 anti-mPD-1 的响应，扩大了 anti-mPD-1 治疗肿瘤的应用范围。