(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 7 月 23 日 (23.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/147191 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 35/741 (2015.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/078974

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 21 日 (21.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910048993.2 2019年1月18日 (18.01.2019) CN

(71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 曾谷城 (ZENG, Gucheng); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(74) 代理人: 广州新诺专利商标事务所有限公司 (GUANGZHOU SINO PATENT & TRADEMARK AGENT CO., LTD.); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西平云路163号军工楼9楼曹爱红, Guangdong 510627 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** APPLICATION OF AKKERMANSIA MUCINIPHILA OR PREVOTELLA IN PREPARING DRUG FOR INCREASING γδ T CELL ACCUMULATION IN TUMOR MICROENVIRONMENT AND ENHANCING ANTITUMOR IMMUNITY

(54) **发明名称**: 阿克曼粘菌或普氏菌在增加肿瘤微环境γδT细胞积累并增强抗肿瘤免疫功能药物中的应用

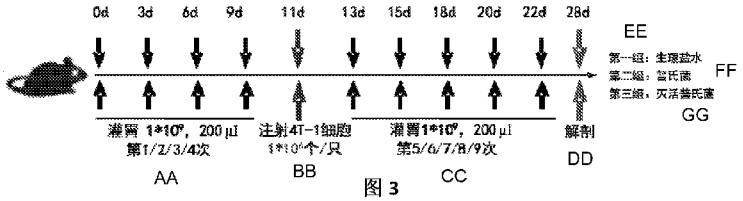


图 3

AA Intragastric administration; 1*10^9, 200 μl; 1st/2nd/3rd/4th administration
BB Injection of 4T-1 cells; 1*10^6/mouse
CC Intragastric administration; 1*10^9, 200 μl; 5th/6th/7th/8th/9th administration
DD Dissection
EE Group 1: Saline
FF Group 2: Prevotella
GG Group 3: Inactivated Prevotella

(57) **Abstract:** Provided is an application of Akkermansia muciniphila or Prevotella in preparing an antitumor drug for increasing γδ T cell infiltration in a tumor microenvironment. Also provided are a pharmaceutical composition and an edible composition comprising Akkermansia muciniphila or Prevotella.

(57) **摘要**: 提供了一种阿克曼粘菌或普氏菌用于制备抗肿瘤及其增加γδT细胞在肿瘤微环境中浸润的药物的应用。还提供了包含阿克曼粘细菌或普氏菌的药物组合物和可食用组合物。

WO 2020/147191 A1

阿克曼粘菌或普氏菌在增加肿瘤微环境γδT细胞积累并增强抗肿瘤免疫功能药物中的应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及使用阿克曼粘细菌（或简称阿克曼粘菌）或普氏菌或包含使用阿克曼粘细菌或普氏菌的组合物抗肿瘤及其增加 γδ T 细胞（TCR-γδ 阳性 T 细胞、TCRγδ 阳性 T 细胞或 TCR-γδ+T 细胞）在肿瘤微环境中的浸润的药物中的应用。

背景技术

迄今为止，恶性肿瘤仍是威胁人类健康的主要杀手。例如，肝癌是一种恶性程度极高、治愈率很低、预后很差的恶性肿瘤，在世界范围内肝癌的发病率在男性中占第 5 位，死亡率占第 2 位；在女性中发病率占第 9 位，死亡率占第 6 位。中国是肝癌高发国家，死亡例数占全球死亡例数的 50%以上。传统治疗手段包括手术切除、放射治疗和化学治疗等，但是预后不佳。乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一。最新世界卫生组织的当今肿瘤(CANCER TODAY)流行病统计数据显示，2018 年全球新发乳腺癌病例约 200 万例，死亡人数高达 60 万人。尽管目前治疗手段包括手术、化疗、放疗、靶向治疗、新辅助化疗相结合等诸多综合治疗方式，但是目前治疗效果有限，肿瘤转移和复发的问题仍难以解决，且化疗和放疗毒副反应严重，严重破坏患者机体免疫系统与生活、生存质量。因此，开发更为有效的、最大限度地杀伤肿瘤细胞而不伤害自身正常细胞的疗法迫在眉睫。

肿瘤免疫治疗是指通过主动或被动方式激发机体产生肿瘤特异性免疫应答，恢复或增强机体免疫系统活性，进而抑制和杀伤肿瘤功能的治疗方法。目前主要包括免疫检测点阻断、过继性细胞输注、肿瘤疫苗等。虽然 γδ T 细胞是机体发挥抗肿瘤功能的关键的免疫细胞亚群之一，但是目前的 T 细胞免疫治疗效果欠佳，主要原因是肿瘤微环境中 γδ T 细胞的浸润及功能受抑制，表现在肿瘤浸润 γδ T 细胞量少、活性低、靶向性不好，导致相当一部分接受抗肿瘤免疫治疗的患者不能对 T 细胞抑制性分子阻断抗体治疗等免疫治疗疗法产生有效响应，严重影响抗肿瘤的免疫治疗效果。因此，破解肿瘤微环境中 γδ T 细胞浸润不足难题是解决肿瘤免疫治疗所面临挑战的关键。

阿克曼粘细菌（*Akkermansia muciniphila*）是一种革兰阴性、椭圆形的肠道细菌，

定植在粘液层中，可特异性降解粘蛋白，占肠道微生物总量的 1~3%，人体肠道中的最丰富的单一物种之一，具有一定的厌氧能力。目前研究发现阿克曼粘细菌在人体内定植丰度与肥胖和II型糖尿病常可能呈负相关，与心脏代谢紊乱可能也有一定的关联，对机体代谢可能有着重要作用。普氏菌（*Prevotella copri*）是一种革兰阴性厌氧菌，人体肠道共生菌，目前研究发现它与类风湿性关节炎的易感性可能有关，和糖尿病患者胰岛素抵抗也可能具有相关性。

但是，目前尚未有利用包括阿克曼粘细菌和/或普氏菌等肠道细菌增加肿瘤微环境中 γδ T 细胞的浸润进而增强机体抗肿瘤功能的报道。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是针对目前肿瘤免疫治疗难题，尤其是肿瘤微环境中 γδ T 细胞的浸润不足的难题，提供一种抗肿瘤及其增加 γδ T 细胞在肿瘤微环境中的浸润的药物的方法，具体是阿克曼粘细菌或普氏菌在增加肿瘤微环境 γδT 细胞积累并增强抗肿瘤免疫功能药物中的应用。

为了实现上述目的，本发明提供了阿克曼粘细菌（*Akkermansia muciniphila*）或普氏菌（*Prevotella copri*）用于抗肿瘤的用途。该用途通过增加肿瘤微环境中 γδ T 细胞的浸润进而抗肿瘤。所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

本发明所述肿瘤可以为各种实体瘤，例如但不限于肝癌、乳腺癌、肺癌、黑色素肿瘤、前列腺癌、纤维肉瘤、胃癌、食管癌、结直肠癌、膀胱肉瘤及神经胶质瘤等实体瘤，特别是肝部和/或乳腺的肿瘤。

在某些实施方案中，将抗肿瘤及增加 γδ T 细胞在肿瘤微环境中的浸润的方法与其他治疗技术进行组合。在某些实施方案中，所述其他治疗方法包括但不限于是免疫治疗技术、外科手术、化学疗法、放射疗法、基因疗法或它们的组合。

为了更好地实现上述目的，本发明还提供了阿克曼粘细菌或普氏菌在制备用于抗肿瘤及其增加 γδ T 细胞在肿瘤微环境中的浸润的药物中的用途。所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或

阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。所述肿瘤是肝和/或乳腺、或关于肺、皮肤、癌、肾、前列腺、神经系统或膀胱的肿瘤，特别是肝部和/或乳腺的肿瘤。

所述肿瘤微环境中γδ T 细胞浸润增加特征包括：γδ T 细胞数量相对肿瘤微环境中所有细胞数量的增加。

本发明还提供了一种治疗性和预防性的药物组合物，其包含阿克曼粘细菌或普氏菌作为药物活性成分。在某些实施方案中，所述药物组合物可能还含有其它微生物菌株。在一个方面，所述阿克曼粘细菌或普氏菌可以抑制肿瘤的生长。在一个方面，所述肿瘤是实体瘤，包括但不限于肝癌、乳腺癌、肺癌、黑色素肿瘤、前列腺癌、纤维肉瘤、胃癌、食管癌、结直肠癌、膀胱肉瘤及神经胶质瘤等实体瘤。在某些施方案中，所述肿瘤包括但不限于：肝癌和/或乳腺癌。

根据本发明的一个方面，上述的药物组合物中，所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

根据本发明的一个方面，本发明的药物组合增加肿瘤微环境中γδ T 细胞的浸润从而实现抗肿瘤。

根据本发明的一个方面，本发明的药物组合物包括药学有效剂量的阿克曼粘细菌或普氏菌及其在药学上可接受的载体。其中，所述阿克曼粘细菌或普氏菌为活性成分。

优选地，上述的药物组合物中，所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

优选地，上述的药物组合物中，所述药物组合物可以是药学上可行的任一种或多种剂型，包括但不限于为片剂、胶囊剂、口服液或冻干粉剂。

优选地，上述的药物组合物中，所述药学上可接受的载体为脱脂奶、乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、海藻糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明

胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁或矿物油中的一种或多种的混合物。

为了更好地实现上述目的，本发明还提供了抗肿瘤及其增加肿瘤微环境中γδ T细胞的浸润的可食用组合物，其中，所述可食用组合物包括阿克曼粘细菌或普氏菌。该可食用组合物包括但不限于食品、保健品、食品添加剂等。

优选地，上述可食用组合物中，所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

根据本发明的一个方面，本发明的可食用组合物通过增加肿瘤微环境中γδ T细胞的浸润从而实现抗肿瘤功能。

本发明以移植性肿瘤研究法建立小鼠肝癌模型和/或乳腺癌模型，通过在小鼠肝癌模型和/或乳腺癌模型中对阿克曼粘细菌或普氏菌的功能进行分析、检测和鉴定。本发明通过实验证明，阿克曼粘细菌或普氏菌能够显著抑制肝肿瘤和/或乳腺肿瘤的生长，并能有效抑制小鼠体内移植肿瘤的生长，说明阿克曼粘细菌或普氏菌在肿瘤临床治疗中具有重要的开发和应用价值。

附图说明

图1为在小鼠肝癌模型中检测阿克曼粘细菌或灭活阿克曼粘细菌抗肿瘤及增加肿瘤微环境中γδ T细胞的浸润的实验流程示意图。施用细菌或移植肿瘤细胞时间用天（Day，d）表示。

图2为在小鼠肝癌模型中检测普氏菌或灭活普氏菌抗肿瘤及增加肿瘤微环境中γδ T细胞的浸润的实验流程示意图。施用细菌或移植肿瘤细胞时间用天（Day，d）表示。

图3为在小鼠乳腺癌模型中检测普氏菌或灭活普氏菌抑制肿瘤生长和治疗肿瘤作用的实验流程示意图。施用细菌或移植肿瘤细胞时间用天（Day，d）表示。

图4为阿克曼粘细菌或灭活阿克曼粘细菌治疗后每组4只典型的小鼠肝癌肿瘤大小对比图。

图 5 为阿克曼粘细菌或灭活阿克曼粘细菌治疗后小鼠肝癌肿瘤大小对比图的统计分析图。

图 6 为普氏菌或灭活普氏菌治疗后每组 4 只典型的小鼠肝癌肿瘤大小对比图。

图 7 为普氏菌或灭活普氏菌治疗后小鼠肝癌肿瘤大小对比图的统计分析图。

图 8 为普氏菌或灭活普氏菌治疗后每组 4 只典型的小鼠乳腺癌肿瘤大小对比图。

图 9 为普氏菌或灭活普氏菌治疗后小鼠乳腺癌肿瘤大小对比图的统计分析图。

图 10 为肝癌细胞移植的小鼠施用阿克曼粘细菌或灭活阿克曼粘细菌后，每组一只小鼠的典型的 γδ T 细胞的流式细胞分析图，右象限为 γδ T 细胞，右侧象限的数字显示的为 γδ T 细胞占肝肿瘤微环境内总体细胞的百分比。

图 11 为肝癌细胞移植的小鼠中施用阿克曼粘细菌或灭活阿克曼粘细菌后，γδT 细胞占肿瘤微环境内总体细胞的百分比的统计分析图。

图 12 为肝癌细胞移植的小鼠施用普氏菌或灭活普氏菌后，每组一只小鼠的典型的 γδT 细胞的流式细胞分析图，右象限为 γδ T 细胞，右侧象限的数字显示的为 γδ T 细胞占肝肿瘤微环境内总体细胞的百分比。

图 13 为肝癌细胞移植的小鼠中施用普氏菌或灭活普氏菌后，γδT 细胞占肿瘤微环境内总体细胞的百分比的统计分析图。

具体实施方式

下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。需要指出的是，由本发明中的用于抗肿瘤的阿克曼粘细菌或普氏菌或含有本发明的阿克曼粘细菌或普氏菌的药物组合物、食品、保健品和食品添加剂在施用于受试者后，都可以应用于上文所述的适应症并展现出上文所述的功能，在本发明范围内的所有剂型均已测试，下文中，仅仅是为说明，只在实施例中描述了其中一小部分，然而不应将其理解为对本发明的限制。

本发明所指的阿克曼粘细菌或普氏菌包括但不限于以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

所述肿瘤是实体瘤，例如但不限于肝癌、乳腺癌、黑色素肿瘤、肺癌、前列腺

癌、纤维肉瘤、胃癌、食管癌、膀胱肉瘤及神经胶质瘤等实体瘤。在某些实施方案中，所述肿瘤包括但不限于：肝癌和/或乳腺癌。

本发明还提供的用于抗肿瘤的药物组合物包括药学有效剂量的阿克曼粘细菌或普氏菌。其中，所称的“药学有效剂量”的范围值为 10^6~10^{10} CFU，优选为 10^9 CFU。

所述药物组合物包括但不限于为片剂、胶囊剂、口服液或冻干粉剂。所述药学上可接受的载体包括但不限于为脱脂奶、乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、阿拉伯胶、甘露糖、淀粉、海藻糖、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁或矿物油中的一种或多种。

本发明的阿克曼粘细菌或普氏菌还可以被制成食品、保健品或食品添加剂等。所述食品、保健品或食品添加剂均含有阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体、基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌、阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物，和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液中的任意一种。这些食品、保健品或食品添加剂均可用于抗肿瘤。

实施例 1　阿克曼粘细菌培养

培养方法

步骤 1：取冻干保存阿克曼粘细菌（*Akkermansia muciniphila*）菌种（购自 ATCC）一支，加 200μL TSB 培养基使其溶解，取 200μl 血平板划线，厌氧条件下培养箱中 37℃培养 48 小时；

步骤 2：挑取单克隆菌落溶解于 10 毫升 TSB 培养基，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 3： 取 500 毫升 TSB 培养基， 按 1%(v/v) 接入菌种，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 4：收集菌液，转速 6000rpm 离心 10 分钟。用生理盐水洗 2 次后复溶菌泥备用并进行活菌计数。

实施例 2　普氏菌培养

培养方法

步骤 1：取冻干保存普氏菌（*Prevotella copri*）菌种（购自 ATCC）一支，加 200μL

PYG 培养基使其溶解，取 200μl 血平板划线，厌氧条件下培养箱中 37℃培养 48 小时；

步骤 2：挑取单克隆菌落溶解于 10 毫升 TSB 培养基，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 3：取 500 毫升 PYG 培养基， 按 1%(v/v) 接入菌种，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 4：收集菌液，转速 6000rpm 离心 10 分钟。用生理盐水洗 2 次后复溶菌泥备用并进行活菌计数。

实施例 3 阿克曼粘细菌增强 γδ T 细胞在肿瘤微环境中浸润并治疗肿瘤（肝癌）实验

图 1 为检测阿克曼粘细菌或灭活阿克曼粘细菌增加 γδ T 细胞在肿瘤微环境中的浸润和治疗的实验流程示意图。

1、培养方法

阿克曼粘细菌培养方法同上述实施例 1。

2、样品准备

1）阿克曼粘细菌活菌体的制备

步骤 1：取冻干保存阿克曼粘细菌（*Akkermansia muciniphila*）菌种（购自 ATCC）一支，加 200μL TSB 培养基使其溶解，取 200μl 血平板划线，厌氧条件下培养箱中 37℃培养 48 小时；

步骤 2：挑取单克隆菌落溶解于 10 毫升 TSB 培养基，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 3： 取 500 毫升 TSB 培养基， 按 1%(v/v) 接入菌种，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 4：收集菌液，转速 6000rpm 离心 10 分钟。用生理盐水洗 2 次后复溶菌泥备用并进行活菌计数。

2）阿克曼粘细菌灭活菌体

活菌计数后的阿克曼粘细菌菌液 70℃水浴加热 30 分钟，获得灭活菌液。

3）阿克曼粘细菌裂解液

阿克曼粘细菌培养菌液，采用超声破碎法处理，超声 2 秒，停 5 秒，合计持续 20 分钟，获得阿克曼粘细菌裂解液。

4）阿克曼粘细菌培养上清液

阿克曼粘细菌培养菌液， 按 6000rpm 离心 10 分钟，离心后上清为阿克曼粘细菌培养上清液。

3、阿克曼粘细菌对肿瘤防治作用的小鼠实验

实验动物：购自中山大学实验动物中心的 3~4 周 C57BL/6 小鼠 27 只，精神状态佳。将小鼠随机分成 3 组，每组 9 只，组间性别与周龄匹配，分别是对照组、活菌灌胃组、灭活菌灌胃组，3 组小鼠分别给生理盐水、阿克曼粘细菌及灭活阿克曼粘细菌灌胃，连续治疗 4 次。待小鼠肿瘤（肝癌）细胞 HEPA1-6 生长到对数期，用胰酶消化细胞，加培养基中和，离心后收集细胞，用 DPBS 洗两次，去除残留血清，最后用 DPBS 重悬细胞。肿瘤细胞计数，将 10^6 个细胞接种到每只小鼠右腋皮下。小鼠继续分别进行灌胃治疗 5 次，2 周后处死荷瘤小鼠，解剖后测量皮下移植瘤大小，收集肿瘤原位细胞，利用流式细胞术检测分析肿瘤微环境中 γδ T 细胞的含量。

实施例 4 普氏菌促进肿瘤微环境中 γδ T 细胞浸润并治疗肿瘤（肝癌）实验

图 2 为检测普氏菌或灭活普氏菌增加 γδ T 细胞在肿瘤微环境中的浸润和治疗肿瘤实验的实验流程示意图。

1、培养方法

普氏菌培养方法同实施例 2。

2、样品准备

1）普氏菌活菌体的制备

步骤 1：取冻干保存普氏菌（*Prevotella copri*）菌种（购自 ATCC）一支，溶解于 200μL PYG 培养基，取 200μl 血平板划线，厌氧条件下培养箱中 37℃培养 48 小时；挑取单克隆菌落溶解于 10 毫升 TSB 培养基，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 3：取 500 毫升 PYG 培养基， 按 1%(v/v) 接入菌种，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 4：收集菌液，6000rpm 离心 10 分钟。用生理盐水洗 2 次后复溶菌泥备用并进行活菌计数。

2）普氏菌灭活菌体

活菌计数后的阿克曼粘细菌菌液 70℃水浴加热 30 分钟，获得灭活菌液。

3）普氏菌裂解液

普氏菌培养菌液，采用超声破碎法处理，超声 2 秒，停 5 秒，合计持续 20 分钟，获得普氏菌裂解液。

4）普氏菌培养上清液

普氏菌培养菌液，以 6000rpm 的转速离心 10min，获得普氏菌培养上清液。

3、普氏菌对肿瘤防治作用的小鼠实验

实验动物：购自中山大学实验动物中心的 3~4 周 C57BL/6 小鼠 27 只，精神状态佳。将小鼠随机分成 3 组，每组 9 只（组间小鼠性别与周龄匹配），分别是对照组、活菌灌胃组、灭活菌灌胃组，3 组小鼠分别给生理盐水、10^9CFU 的普氏菌及同样 CFU 的灭活普氏菌灌胃，连续治疗 4 次。待小鼠肿瘤（肝癌）细胞 HEPA1-6 生长到对数期，用胰酶消化细胞，加培养基中和，离心后收集细胞，用 DPBS 洗两次，去除残留血清，最后用 DPBS 重悬细胞。肿瘤细胞计数，将 10^6 个细胞接种到每只小鼠右腋皮下。小鼠继续分别进行灌胃治疗 5 次，2 周后处死荷瘤小鼠，解剖后测量皮下移植瘤大小，收集肿瘤原位细胞，利用流式细胞术检测分析肿瘤微环境中 γδ T 细胞的含量。

实施例 5　普氏菌抑制肿瘤（乳腺癌）生长实验

图 3 为检测普氏菌或灭活普氏菌肿瘤生长并治疗肿瘤（乳腺癌）实验的实验流程示意图。

1、培养方法

普氏菌培养方法同实施例 2。

2、样品准备

1）普氏菌活菌体的制备

步骤 1：取冻干保存普氏菌（*Prevotella copri*）菌种（购自 ATCC）一支，溶解于 200μL PYG 培养基，取 200μl 血平板划线，厌氧条件下培养箱中 37℃培养 48 小时；挑取单克隆菌落溶解于 10 毫升 TSB 培养基，37℃厌氧条件下培养 48 小时；

步骤 3： 取 500 毫升 PYG 培养基， 按 1%(v/v) 接入菌种，37℃厌氧条件下培

养 48 小时；

步骤 4：收集菌液，转速 6000rpm 离心 10 分钟。用生理盐水洗 2 次后复溶菌泥备用并进行活菌计数。

2）普氏菌灭活菌体

活菌计数后的阿克曼粘细菌菌液 70℃水浴加热 30 分钟，获得灭活菌液。

3）普氏菌裂解液

普氏菌培养菌液，采用超声破碎法处理，超声 2 秒，停 5 秒，合计持续 20 分钟，获得普氏菌裂解液。

4）普氏菌培养上清液

普氏菌培养菌液，以 6000rpm 的转速离心 10min，获得普氏菌培养上清液。

3、普氏菌对肿瘤抑制作用的小鼠实验

实验动物：购自中山大学实验动物中心的 3~4 周 BALB/c 小鼠 27 只，精神状态佳。将小鼠随机分成 3 组，每组 9 只（组间小鼠性别与周龄匹配），分别为对照组、活菌灌胃组、灭活菌灌胃组，分别给与生理盐水、10^9CFU 的普氏菌或同样 CFU 的灭活普氏菌灌胃，连续灌胃 4 次。随后待小鼠肿瘤（乳腺癌）细胞 4T1 生长到对数期，用胰酶消化细胞，然后利用培养基中和，离心后收集细胞，用 DPBS 洗两次，去除残留血清，最后用 DPBS 重悬细胞。细胞计数后，将 10^6 个细胞接种到每只小鼠右腋皮下。继续对小鼠分别进行灌胃治疗 5 次，2 周后处死荷瘤小鼠，解剖后测量记录皮下移植瘤大小。

结果分析：

给皮下移植肝癌细胞（HEPA1-6）后的小鼠中施用阿克曼粘细菌和灭活的阿克曼粘细菌的实验流程如图 1 所示，施用普氏菌和灭活的普氏菌的实验流程图如图 2 所示。图 3 为给皮下移植乳腺癌细胞（4T1）后的小鼠中施用普氏菌和灭活的普氏菌的实验流程图。图 4、图 6 为施用阿克曼粘细菌、灭活的阿克曼粘细菌、普氏菌及灭活的普氏菌后的小鼠皮下肝癌细胞移植的典型的肝肿瘤照片。图 5、图 7 为施用阿克曼粘细菌、灭活的阿克曼粘细菌、普氏菌及灭活的普氏菌后肝肿瘤的大小体积统计分析结果。图 8 为施用普氏菌及灭活的普氏菌后的小鼠皮下乳腺癌细胞移植的典型的乳腺肿瘤照片。图 9 为施用普氏菌及灭活的普氏菌后乳腺肿瘤的大小体积

统计分析结果。图 4、图 5、图 6、图 7 的实验结果可以明确地观察到，施用阿克曼粘细菌、灭活的阿克曼粘细菌、普氏菌及灭活的普氏菌后，肝肿瘤体积大幅度减小约 2~4 倍，图 8、图 9 的实验结果可见施用普氏菌及灭活的普氏菌后，乳腺肿瘤体积显著减小 20%以上，而且减小具有统计学显著性意义。这些实验结果说明，通过施用阿克曼粘细菌、灭活的阿克曼粘细菌、普氏菌或灭活的普氏菌可以显著抑制肿瘤的生长。

图 10 是每组一只小鼠的典型的肝肿瘤微环境中 γδ T 细胞数量的流式细胞分析图, 右象限的数字显示的为 γδ T 细胞占肿瘤微环境中细胞的百分比情况图。从流式细胞分析图可以看出，相较生理盐水对照组，阿克曼粘细菌或灭活的阿克曼粘细菌的施用增加了肝肿瘤微环境中 γδ T 细胞相对量达 5~8 倍。图 11 是肝癌细胞移植的小鼠中施用阿克曼粘细菌或灭活的阿克曼粘细菌后 γδ T 细胞占肿瘤微环境细胞的百分比的统计分析图。从统计图可以看出，相对比生理盐水对照组，阿克曼粘细菌或灭活的阿克曼粘细菌显著增加了肿瘤微环境中 γδ T 细胞的数量，而且这些增加具有统计学显著意义。图 12 是每组一只小鼠的典型的肝肿瘤微环境中 γδ T 细胞数量的流式细胞分析图, 右象限的数字显示的为 γδ T 细胞占肿瘤微环境中细胞的百分比情况图。同样，从流式细胞分析图可以看出，相较生理盐水对照组，普氏菌和灭活普氏菌增加了肝肿瘤微环境中 γδ T 细胞相对量约 5~8 倍。图 13 是肝癌细胞移植的小鼠中施用普氏菌和灭活普氏菌后 γδ T 细胞占肿瘤微环境所有细胞的百分比的统计分析图。从统计图可以看出，相对比生理盐水对照组，普氏菌和灭活普氏菌显著增加了肿瘤微环境中 γδ T 细胞的数量，而且这些增加具有统计学显著意义。

上述结果的统计分析图中，*表示 student *t*-test $p<0.05$，***表示 student *t*-test $p<0.001$。$p<0.05$ 具有统计学差异意义。每种处理组有 9 只小鼠。

综上所述，阿克曼粘细菌、灭活的阿克曼粘细菌、普氏菌和/或灭活的普氏菌均能对小鼠肿瘤（肝癌、乳腺癌）的形成以及生长有明显的抑制作用（图 4、图 5、图 6、图 7、图 8、图 9）。此外，图 10、图 11、图 12、图 13 实验结果表明，对照组中小鼠肿瘤（肝癌），灌胃阿克曼粘细菌、灭活的阿克曼粘细菌、普氏菌和灭活的普氏菌在体内促进肿瘤微环境中 γδ T 细胞的浸润从而增强了抗肿瘤功能，抑制肿瘤生长，对于防治肝癌等肿瘤具有很好的效果。

以上内容是结合本发明创造的优选实施方式对所提供技术方案所作的进一步

详细说明，不能认定本发明创造具体实施只局限于上述这些说明，对于本发明创造所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明创造构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明创造的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 阿克曼粘细菌（*Akkermansia muciniphila*）或普氏菌（*Prevotella copri*）在制备用于抗肿瘤及其增加 γδ T 细胞（TCR-γδ 阳性 T 细胞、TCRγδ 阳性 T 细胞或 TCR-γδ+T 细胞）在肿瘤微环境中的浸润的药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

3. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述肿瘤包括但不限于实体瘤。

4. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述肿瘤包括但不限于肝部和/或乳腺实体瘤。

5. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述肿瘤微环境中 γδ T 细胞浸润增加特征包括但不限于：肿瘤微环境中 γδ T 细胞绝对数量和/或 γδ T 细胞数量相对肿瘤微环境中所有细胞数量的增加。

6. 一种用于抗肿瘤及其增加 γδ T 细胞在肿瘤微环境中的浸润的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包括药学有效剂量的阿克曼粘细菌或普氏菌及其在药学上可接受的载体。

7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其特征在于，所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌的裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

8. 一种用于抗肿瘤及其增加 γδ T 细胞在肿瘤微环境中的浸润的可食用组合物，其特征在于，所述可食用组合物包括阿克曼粘细菌或普氏菌。

9. 根据权利要求 8 所述的可食用组合物，其特征在于，所述阿克曼粘细菌或普氏菌为以下中的任意一种：阿克曼粘细菌或普氏菌活菌体；经过基因重组、改造或修饰、减毒、灭活、物理处理或化学处理的阿克曼粘细菌或普氏菌；阿克曼粘细菌或普氏菌裂解物、蛋白提取物、菌体成分、菌体提取物和/或代谢物；和/或阿克曼粘细菌或普氏菌培养上清液。

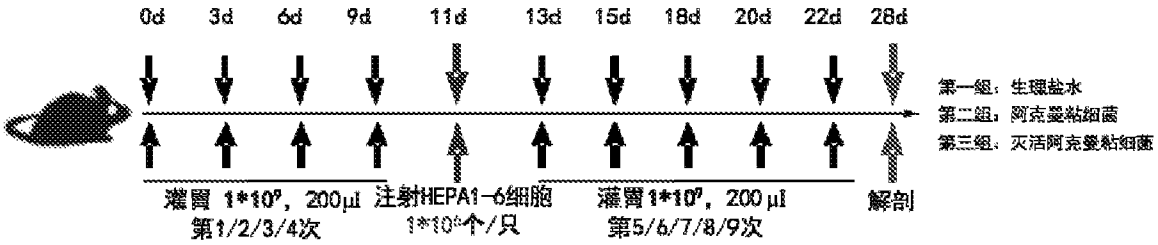

0d 3d 6d 9d 11d 13d 15d 18d 20d 22d 28d
第一组：生理盐水
第二组：阿克曼粘细菌
第三组：灭活阿克曼粘细菌
灌胃 1*10⁹，200μl
第1/2/3/4次
注射HEPA1-6细胞
1*10⁶个/只
灌胃1*10⁹，200 μl
第5/6/7/8/9次
解剖

图 1

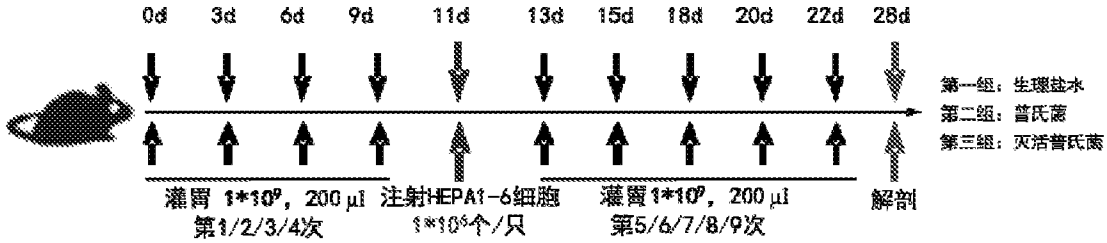

0d 3d 6d 9d 11d 13d 15d 18d 20d 22d 28d
第一组：生理盐水
第二组：普氏菌
第三组：灭活普氏菌
灌胃 1*10⁹，200 μl
第1/2/3/4次
注射HEPA1-6细胞
1*10⁶个/只
灌胃1*10⁹，200 μl
第5/6/7/8/9次
解剖

图 2

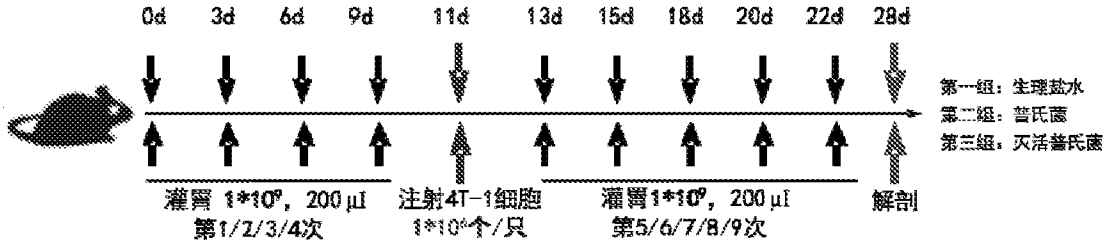

0d 3d 6d 9d 11d 13d 15d 18d 20d 22d 28d
第一组：生理盐水
第二组：普氏菌
第三组：灭活普氏菌
灌胃 1*10⁹，200 μl
第1/2/3/4次
注射4T-1细胞
1*10⁶个/只
灌胃1*10⁹，200 μl
第5/6/7/8/9次
解剖

图 3

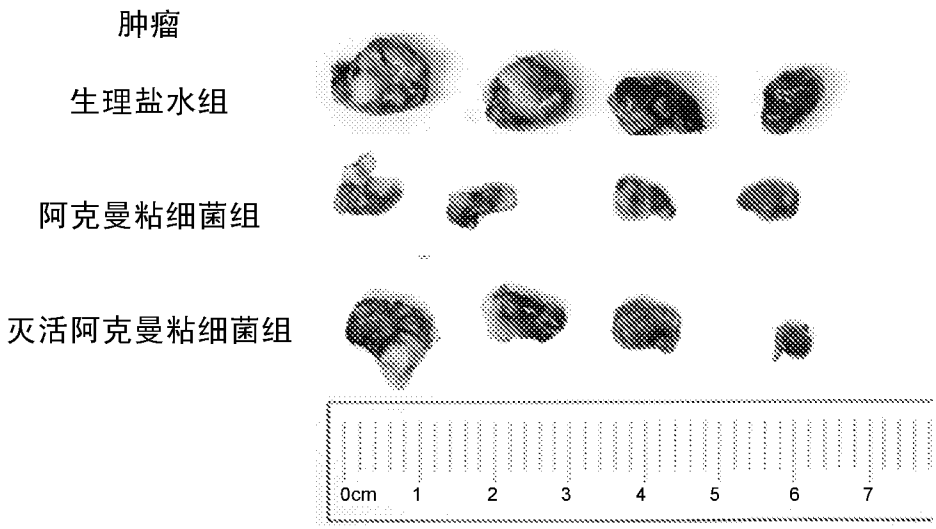

肿瘤
生理盐水组
阿克曼粘细菌组
灭活阿克曼粘细菌组
0cm 1 2 3 4 5 6 7

图 4

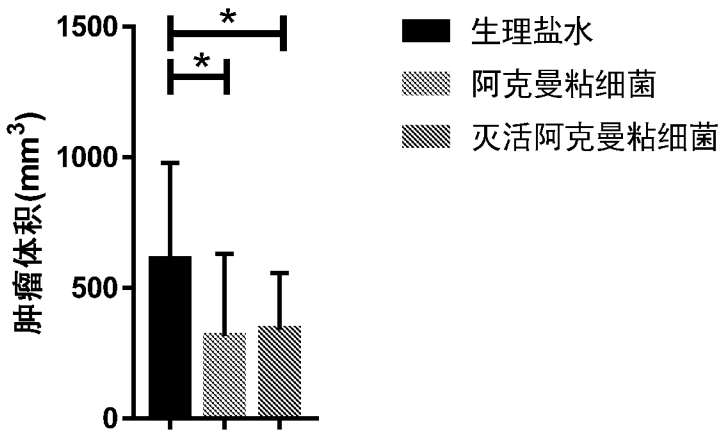

1500
1000
500
0
肿瘤体积(mm3)
*
*
生理盐水
阿克曼粘细菌
灭活阿克曼粘细菌

图 5

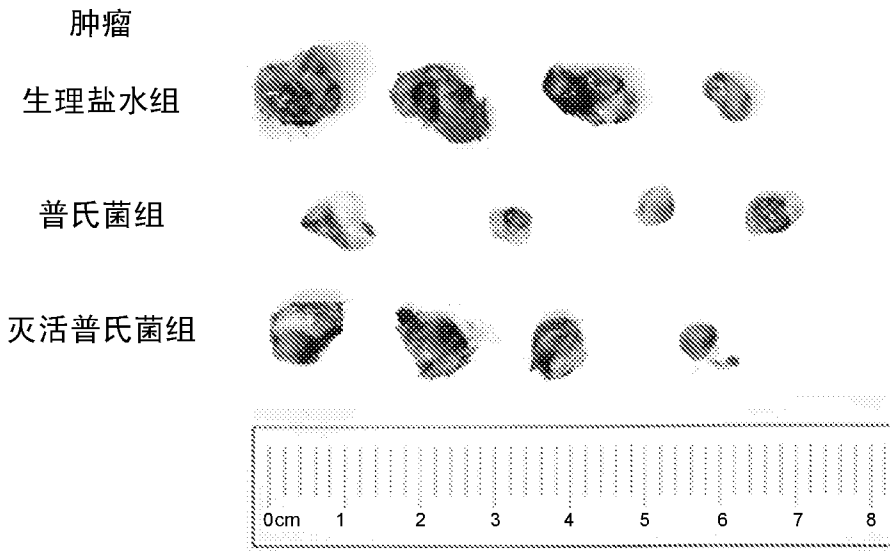

肿瘤
生理盐水组
普氏菌组
灭活普氏菌组
0cm
1
2
3
4
5
6
7
8

图 6

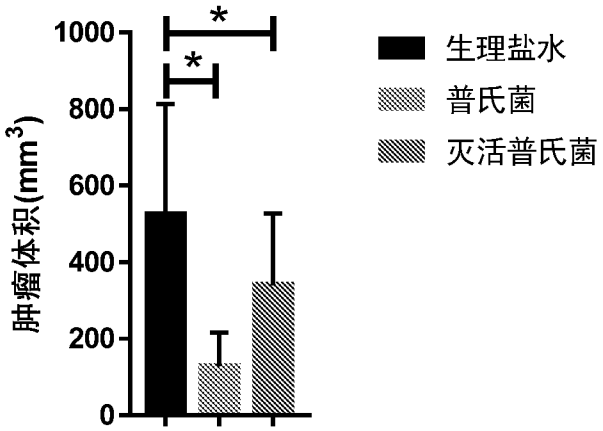

1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积(mm3)
*
*
生理盐水
普氏菌
灭活普氏菌

图 7

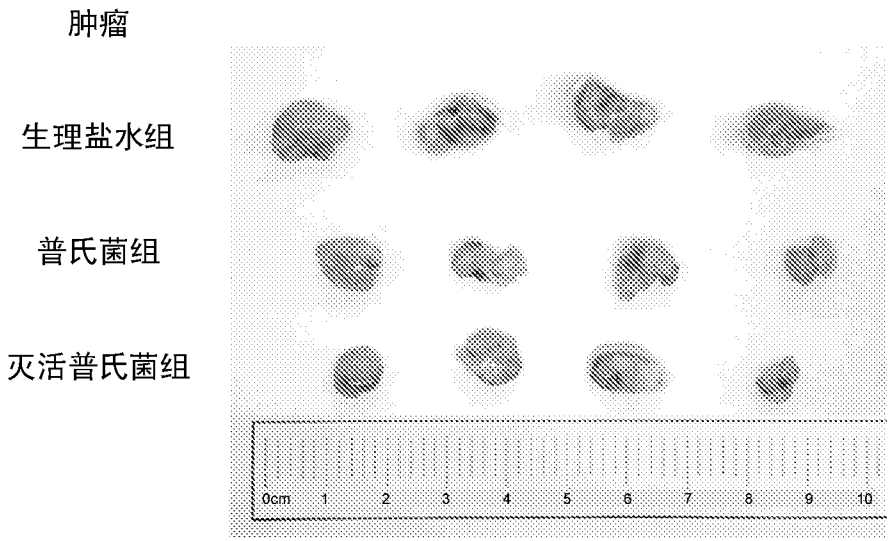

肿瘤
生理盐水组
普氏菌组
灭活普氏菌组
0cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 8

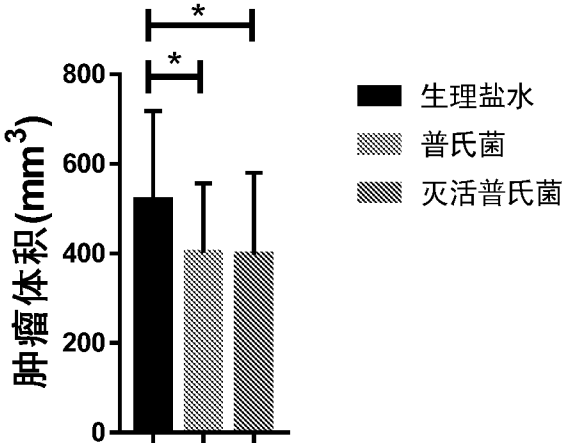

*
*
800
600
400
200
0
肿瘤体积(mm3)
生理盐水
普氏菌
灭活普氏菌

图 9

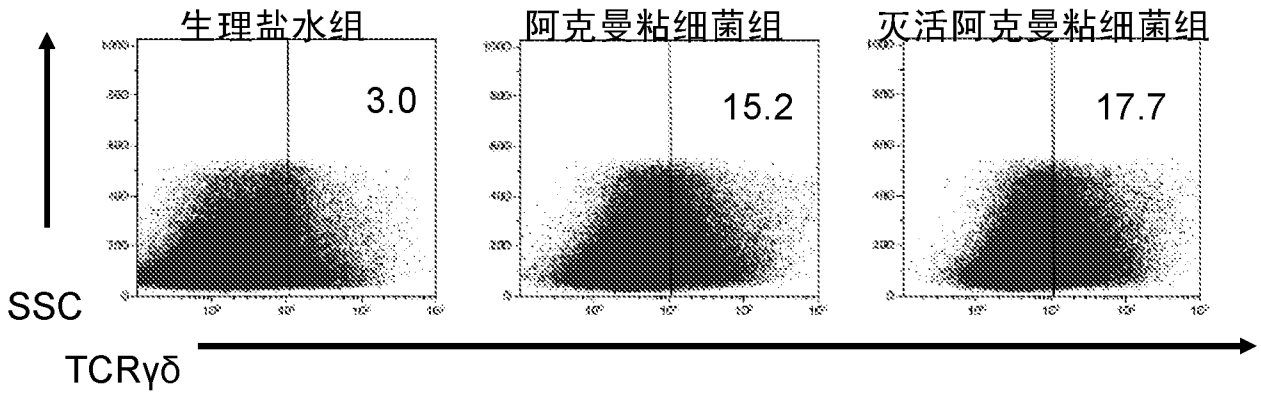

生理盐水组
阿克曼粘细菌组
灭活阿克曼粘细菌组
3.0
15.2
17.7
SSC
TCRγδ

图 10

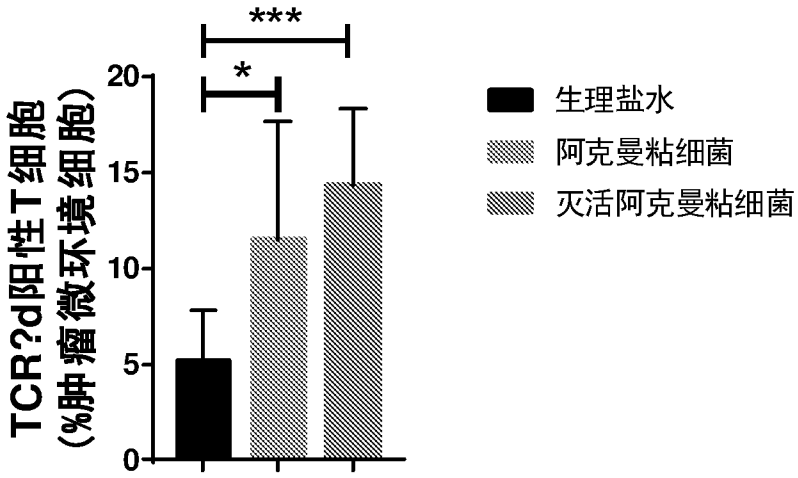

***
*
20
15
10
5
0
TCR?d阳性T细胞
(%肿瘤微环境细胞)
生理盐水
阿克曼粘细菌
灭活阿克曼粘细菌

图 11

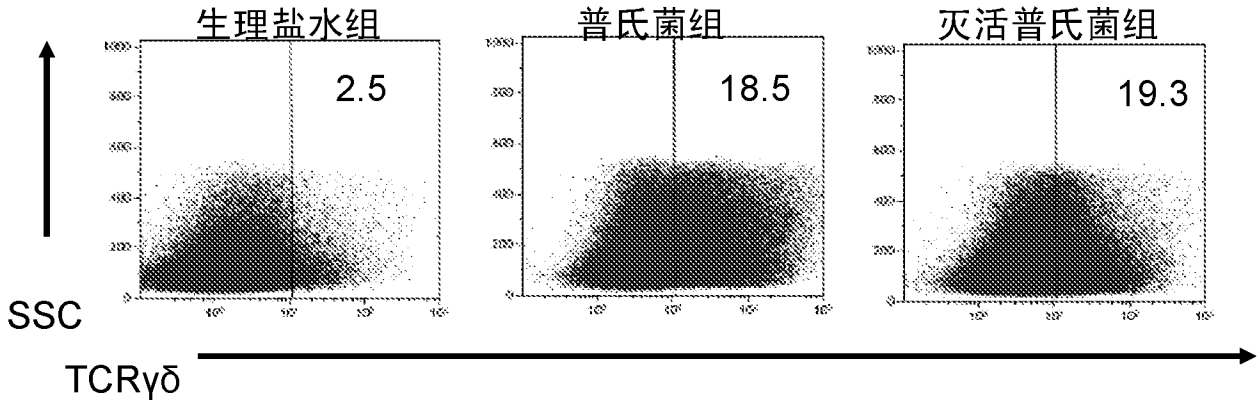

生理盐水组
普氏菌组
灭活普氏菌组
2.5
18.5
19.3
SSC
TCRγδ

图 12

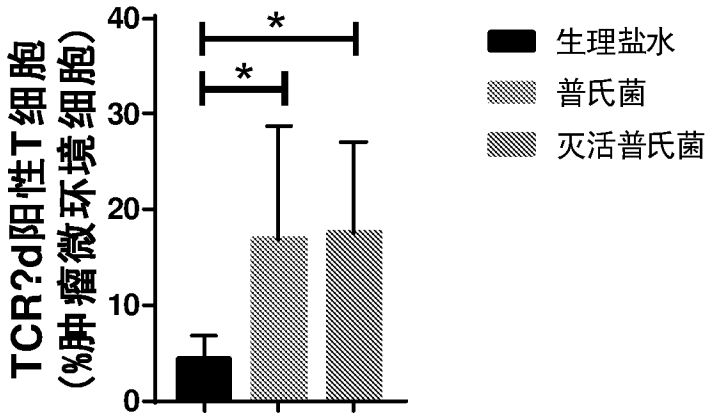

TCR?d阳性T细胞
(%肿瘤微环境细胞)
40
30
20
10
0
*
*
生理盐水
普氏菌
灭活普氏菌

图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/078974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/741(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE: 阿克曼粘细菌, 普氏菌, T细胞, 肿瘤, 免疫, AKKERMANSIA MUCINIPHILA, PREVOTELLA COPRI, T CELL, TUMOR, IMMUNE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018136617 A2 (EVELO BIOSCIENCES INC.) 26 July 2018 (2018-07-26) see claims 1, 39-41 and 73, and description, paragraphs 5-7, and table 2	1-9
X	BERTRAND, R. et al. "Gut Microbiome Influences Efficacy of PD-1-based Immunotherapy against Epithelial Tumors" *Science*, Vol. 359, No. (6371), 05 January 2018 (2018-01-05), ISSN: 0036-8075, see abstract, pages 91-96 and page 96, middle column	1-9
A	CN 102533932 A (LIU, Mingxia) 04 July 2012 (2012-07-04) see entire document	1-9
A	CN 107384828 A (INSTITUTE OF AGRO-PRODUCTS PROCESSING SCIENCE AND TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 24 November 2017 (2017-11-24) see entire document	1-9
A	WO 2018115519 A1 (INSTITUT GUSTAVE ROUSSY et al.) 28 June 2018 (2018-06-28) see entire document	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 October 2019	**24 October 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/078974

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] Group 1: claims 1-9 relate to technical solutions of akkermansia muciniphila; and

[2] group 2: claims 1-9 relate to technical solutions of prevotella.

[3] Akkermansia muciniphila and prevotella do not fall within the same species of bacteria. The common technical feature of the two is intestinal bacteria. However, intestinal bacteria, as the prior art, can not be a specific technical feature. It can be seen that the above-mentioned group 1 and group 2 do not share the same or corresponding special technical feature therebetween. Therefore, these two groups of inventions do not fall within a single general inventive concept, lack unity and do not comply with PCT Rule 13.1.

1. ☑ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/078974

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018136617 A2	26 July 2018	WO 2018136617 A3	23 August 2018
CN 102533932 A	04 July 2012	CN 102533932 B	24 April 2013
CN 107384828 A	24 November 2017	None	
WO 2018115519 A1	28 June 2018	AU 2017380257 A1	04 July 2019
		CA 3047029 A1	28 June 2018

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2019/078974

A. 主题的分类

A61K 35/741(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI,WEB OF SCIENCE: 阿克曼粘细菌，普氏菌，T细胞，肿瘤，免疫，AKKERMANSIA MUCINIPHILA, PREVOTELLA COPRI,T CELL,TUMOR,IMMUNE

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2018136617 A2 (EVELO BIOSCIENCES INC) 2018年 7月 26日 (2018-07-26) 参见权利要求1、39-41、73，说明书第5-7段、表2	1-9
X	BERTRAND ROUTY 等. "Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors" SCIENCE, 第359卷，第6371期，2018年 1月 5日 (2018-01-05), ISSN：0036-8075, 第91-96页，参见摘要、第96页中栏	1-9
A	CN 102533932 A (刘名霞) 2012年 7月 4日 (2012-07-04) 参见全文	1-9
A	CN 107384828 A (中国农业科学院农产品加工研究所) 2017年 11月 24日 (2017-11-24) 参见全文	1-9
A	WO 2018115519 A1 (ROUSSY INST GUSTAVE 等) 2018年 6月 28日 (2018-06-28) 参见全文	1-9

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 10月 12日	2019年 10月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 吴汀晨 电话号码 86-(010)-62089319

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/078974

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 组1：权利要求1-9，涉及阿克曼粘细菌的技术方案；

[2] 组2：权利要求1-9，涉及普氏菌的技术方案。

[3] 阿克曼粘细菌和普氏菌不属于同一种属的细菌，二者的共同技术特征为肠道细菌，而肠道细菌作为现有技术不能作为特定技术特征，可见上述组1和组2之间不具备相同或相应的特定技术特征，因此，这两组发明不属于一个总的发明构思，不具有单一性，不符合PCT实施细则13.1的规定。

1. ☑ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/078974

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2018136617	A2	2018年 7月 26日	WO	2018136617	A3	2018年 8月 23日
CN	102533932	A	2012年 7月 4日	CN	102533932	B	2013年 4月 24日
CN	107384828	A	2017年 11月 24日		无		
WO	2018115519	A1	2018年 6月 28日	AU	2017380257	A1	2019年 7月 4日
				CA	3047029	A1	2018年 6月 28日