

# (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)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/147532 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 35/74* (2015.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/128237

(22) 国际申请日: 2019年12月25日 (25.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201910036001.4 2019年1月15日 (15.01.2019) CN  
201911022193.X 2019年10月25日 (25.10.2019) CN

(71) 申请人: 辽宁格瑞仕特生物制药有限公司  
(LIAONING GREATEST BIO-PHARMACEUTICAL  
CO., LTD.) [CN/CN]; 中国辽宁省本溪市  
溪湖区石桥子春安街8-2栋1层1号,  
Liaoning 117004 (CN)。

(72) 发明人: 盖波(GAI, Bo); 中国辽宁省本溪市溪湖区  
石桥子春安街8-2栋1层1号, Liaoning 117004  
(CN)。 窦春艳(DOU, Chunyan); 中国辽宁省  
本溪市溪湖区石桥子春安街8-2栋1层1号,  
Liaoning 117004 (CN)。 张轶(ZHANG, Yi); 中国  
辽宁省本溪市溪湖区石桥子春安街8-2栋1  
层1号, Liaoning 117004 (CN)。 张国英(ZHANG,  
Guoying); 中国辽宁省本溪市溪湖区石桥子春安  
街8-2栋1层1号, Liaoning 117004 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司  
(GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区  
东长安街1号东方广场东三办公楼19层程伟  
(David W. Cheng), Beijing 100738 (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))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于  
生物材料保藏的说明(细则13之二. 4(d) (i) 和  
48. 2(a) (viii))。

(54) **Title:** USE OF ISOLATED RHODOCOCCLUS RUBER CELL WALL SKELETON IN PREPARATION OF MEDICAMENT FOR TREATING HUMAN CERVICAL PRECANCEROUS LESIONS

(54) 发明名称: 分离的赤红球菌细胞壁骨架在制备治疗人宫颈癌前病变的药物中的用途

(57) **Abstract:** An isolated *Rhodococcus ruber* cell wall skeleton, a composition comprising said cell wall skeleton, and use of said cell wall skeleton in preparation of a medicament for treating human cervical precancerous lesions. The *Rhodococcus ruber* is the one deposited in General Microbiological Culture Collection Center of China Committee for Culture Collection of Microorganisms, Building 3, Courtyard 1, Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing on 22 March 2019, and has a deposit number of CGMCC 17431.

(57) 摘要: 一种分离的赤红球菌细胞壁骨架、包含所述细胞壁骨架的组合物、及所述细胞壁骨架在制备治疗人宫颈癌前病变的药物中的用途; 其中该赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) 为2019年03月22日保藏在北京市朝阳区北辰西路1号院3号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC 17431的赤红球菌。



WO 2020/147532 A1

## 分离的赤红球菌细胞壁骨架在制备治疗人宫颈癌前病变的药物中的用途

本公开要求 2019 年 01 月 15 日提交的中国专利申请《赤红球菌细胞壁骨架及其用途》（申请号 201910036001.4）以及 2019 年 10 月 25 日提交的中国专利申请《一种分离的赤红球菌》（申请号 201911022193.X）的优先权，它们的全部内容通过引用并入此处。

### 技术领域

本公开涉及医学领域、微生物领域、生物制药领域。具体而言，本发明涉及分离的赤红球菌细胞壁骨架以及包含其的药物组合物在制备用于治疗宫颈癌前病变的药物中的用途。

### 背景技术

宫颈癌前病变是个临床上较为疑难的妇科疾病，该病变既具有一定的自限性，同时又有恶变的趋势。发展到宫颈癌需要长达 10 年左右的过渡期。由于宫颈癌前病变是个渐变的漫长过程，也给早期发现和早期治疗提供了充足的时间和条件。特别是宫颈癌前病变较轻的病人，更有希望治愈。

宫颈癌前病变通常称为宫颈鳞状上皮内病变(SZL)或称为宫颈上皮内瘤样病变(CIN)。也细分为非典型鳞状上皮细胞(ASCUS)和非典型腺性上皮细胞(AGUS)，以及低度宫颈鳞状上皮内病变(LSIL)和高度宫颈鳞状上皮内病变(HSIL)。通常应用较多的还有将宫颈上皮内病变分为三级，临床上常称之为 CIN-I、CIN-II、CIN-III。

现代医学已查明，宫颈癌的发生主要与人乳头瘤病毒(HPV)感染有关，以及与单纯疱疹病毒感染、真菌感染相互作用更促进宫颈上皮细胞的病理改变，并逐步导致上皮细胞组织发生病变直至完全癌变。

宫颈癌前病变是指宫颈上皮细胞和细胞组织发生了异常改变，但还没有发生完全的癌变，宫颈癌有一系列的癌前病变，它的发生、发展是由量变到质变，渐变到突变的过程。宫颈癌前病变的典型形式是宫颈上皮不典型增生，所以可以从细胞组织检测中确定细胞组织病变

程度。

全世界每年新发生宫颈癌为 50 万人，每年有 20 万人死于宫颈癌，我国每年新发生宫颈癌为 15 万人，每年约有 8 万人死于宫颈癌。世界卫生组织的统计资料还表明，宫颈癌在全球妇女癌症死亡率中位居第二，在一些发展中国家甚至居于首位。进入 21 世纪，宫颈癌正在成为影响全球妇女健康的重大疾病之一。

而世界各国对于宫颈癌前病变，通常采取对适龄妇女广泛筛查的办法，通过细胞学检测方法，并配合细胞组织学检测方法及 HPV 感染检测，可有效检查出是否患有宫颈癌前病变，对于患有宫颈癌前病变者，视病变程度采用宫颈表面破坏方法或宫颈病变切除的方法。这一措施，可减少宫颈癌前病变进一步向宫颈癌发展的可能性。

当前国内外在该领域的研发方向，一是进一步完善检测手段，使之更加准确和更加简便易行。二是对物理疗法和手术方法进一步改进和丰富，如激光、电切，锥切手术等的应用。该领域的科研人员治疗宫颈癌前病变的思路，主要集中在如何破坏宫颈表面和怎样切除宫颈病变上面。三是也有个别研发药物(化合物)进行治疗宫颈癌前病变试验的报道。涉及治疗宫颈癌前病变的药物目前还很缺乏，提供有效治疗宫颈癌前病变的药物，防止其癌症的进一步发展，有非常重要的临床意义和价值。

赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) (也称为红色红球菌) 是一种革兰氏阳性菌。通常而言，菌落呈桔黄色或呈桔红色，圆形；菌落大小约 1mm 至 2mm；细胞形态为球状或短杆状；可形成初级分枝菌丝体；无鞭毛。赤红球菌好氧，化能异养。

目前，已有研究人员对赤红球菌进行了全基因组测序。例如，樊欣等人对赤红球菌 SD3 株的全基因组进行测序，并进行生物信息学分析。SD3 株的全基因组长度大约为 5.37 Mb, GC 含量约为 70.63%, GenBank 登录号为 CP029146 (樊欣, 赤红球菌 SD3 全基因组测序及其热休克蛋白 DnaK 的表达分析, 基因组学与应用生物学, 2019 年 1 月)。

红球菌属 *Rhodococcus*, 因其自身具有非常强的有机物耐受性, 以及较宽的降解谱, 能够适应多种生存环境。因此, 红球菌属被广泛应用于污染修复、有机化合物降解、污水处理等领域。目前, 赤红球菌

的主要应用领域在于环境治理，参见 CN108862590A、CN107151635A、CN102250796A、CN1519312A、CN103627653A、CN101033454A、CN108130288A、CN104830738A、CN101619299A、CN103509833A、CN106434466A、CN101580808A、CN102604875A、CN103160491A、  
5 CN106591168A、CN106591172A、CN105820982A。

CN109576180A 中公开了一种从广州市番禺区附近郊野红土中筛选到的菌 RDC-01，经 16S rRNA 基因序列分析和培养特性鉴定，该菌株鉴定为赤红球菌。将该菌灭活后，作为免疫佐剂添加入动物用的灭活疫苗中，发现可以促进动物生产抗体。

10 然而，赤红球菌在人类医学领域中的应用，尚未有报道。本发明人意想不到地发现，赤红球菌细胞壁骨架以及包含其的组合物在治疗人宫颈癌前病变中具有显著的有益用途。

## 发明内容

15 根据本公开的一些实施方案，一方面，提供了一种分离的赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*)。

根据本公开的一些具体的实施方案，提供了一种赤红球菌，其于 2019 年 03 月 22 日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏 (China General Microbiological Culture Collection Center, 北京市  
20 朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所; 邮政编码: 100101), 保藏编号为 CGMCC 17431。该保藏满足《国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约 (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure)》的规定。

25 根据本公开的一些实施方案，提供了赤红球菌及其衍生产品。所述衍生产品源自赤红球菌，包含赤红球菌的组成成分 (如蛋白、核酸、脂质、细胞壁及其组成成分、碳水化合物、代谢物)。

在具体的实施方案中，提供了一种分离的赤红球菌细胞壁。

在具体的实施方案中，提供了一种分离的赤红球菌细胞壁，所述  
30 赤红球菌是指保藏号为 CGMCC 17431 的株。

在具体的实施方案中，提供了一种分离的赤红球菌细胞壁骨架。

在具体的实施方案中，提供了一种分离的赤红球菌细胞壁骨架，所述赤红球菌是指保藏号为 CGMCC 17431 的株。

根据本公开的一些实施方案，提供了药物组合物，其包含根据本公开的赤红球菌的细胞壁或赤红球菌的细胞壁骨架。

5 根据本公开的一些实施方案，提供了一种赤红球菌产品，其包含赤红球菌经粉碎后所得的产物。

根据本公开的另一些实施方案，提供了一种赤红球菌产品，其包含赤红球菌经粉碎并经过纯化（除脂、除核酸、除蛋白）所得的产物。

10 根据本公开的另一些实施方案，提供了一种赤红球菌产品，其包含赤红球菌的细胞壁。

根据本公开的另一些实施方案，提供了一种赤红球菌产品，其包含赤红球菌的细胞壁骨架。

根据本公开的一些实施方案，提供了一种药物组合物或医疗器械，其包含赤红球菌经粉碎后所得的产物。

15 根据本公开的另一些实施方案，提供了一种药物组合物或医疗器械，其包含赤红球菌经粉碎和经过纯化（除脂、和/或除核酸、和/或除蛋白质）后所得的产物。

根据本公开的另一些实施方案，提供了一种药物组合物或医疗器械，其包含赤红球菌的细胞壁。

20 根据本公开的另一些实施方案，提供了一种药物组合物或医疗器械，其包含赤红球菌的细胞壁骨架。

根据本公开的另一些实施方案，提供了一种药物组合物或医疗器械，其包含上述赤红球菌产品。

在具体的实施方案中，药物组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

25 在一些实施方案中，药物组合物中所述赤红球菌产品为 1 个重量份，药学上可接受的赋形剂为 200 至 300 个重量份（例如，200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 以及任意两个数值范围内的任意点值）。

30 在另一些实施方案中，药物组合物中赤红球菌细胞壁为 1 个重量份，所述药学上可接受的赋形剂为 200 至 300 个重量份（例如，200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 以及任意两个

数值范围内的任意点值)。

在又一些实施方案中，药物组合物中赤红球菌细胞壁骨架为 1 个重量份，所述药学上可接受的赋形剂为 200 至 300 个重量份（例如，200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 以及任意  
5 两个数值范围内的任意点值）。

在一些实施方案中，药物组合物可以制备成液态的（液体制剂）。

在另一些实施方案中，药物组合物可以制备成固体的（干粉制剂或冻干粉制剂）。

技术人员理解，对于本公开的药物组合物而言，液体制剂和干粉  
10 制剂（或冻干粉制剂），二者可以相互转化，差别仅在于含水量。除去液体制剂中的绝大部分或全部水，得到干粉制剂（或冻干粉制剂）。干粉制剂（或冻干粉制剂）溶解（或复溶）后得到液体制剂。

在一些实施方案中，药物或药物组合物被制备成选自以下的剂型：  
15 软膏剂、乳膏剂、凝胶剂、洗剂、酊剂、搽剂、油剂、糊剂、气雾剂、  
口含片、贴片、冻干粉、悬液。

在一些实施方案中，剂型是口含片。例如，采用冻干粉经过压片而制得。

在一些实施方案中，所述药学上可接受的赋形剂涉及但不限于：  
填充剂、稳定剂、矫味剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂。

20 根据本公开的一些实施方案，提供一种赤红球菌产品的制备方法，其包括以下步骤或由以下步骤组成：

- 1) 提供赤红球菌；
- 2) 培养所述赤红球菌；
- 3) 收集经培养的赤红球菌；
- 25 4) 粉碎所述经培养的赤红球菌，得到粉碎产物；
  - 5.1) 对所述的粉碎产物进行去除脂质的操作；
  - 5.2) 对所述的粉碎产物进行去除核酸的操作；
  - 5.3) 对所述的粉碎产物进行去除蛋白质的操作；
  - 5.4) 得到纯化产物；
- 30 6) 任选地，除去所述纯化产物中的水，优选通过冷冻干燥除去所述纯化产物中的水；

- 7) 任选地, 进行分装;
- 8) 收获所述的赤红球菌产品;

其中, 步骤 5.1)、5.2)、5.3) 可互换顺序或可并行; 步骤 6) 和步骤 7) 可互换顺序或可并行。

- 5 任选地, 步骤 5) 中还可以包含 (例如用非离子型表面活性剂) 去除细胞膜的步骤。

赤红球菌的培养不限于具体的培养基和培养参数, 技术人员可以采用公知的适当方式进行培养, 可以根据制备规模采用培养皿、培养瓶、发酵罐。

- 10 对于赤红球菌的粉碎, 其目的在于去除细胞内的物质, 因此可以采用超声破碎、溶菌酶等技术。技术人员理解, 任何适用于破碎革兰氏阳性菌的已知或未来方法, 均适用于本公开技术方案。

- 15 技术人员有能力根据活性成分 (细胞壁及其组成成分) 的后续应用 (例如口服、注射、外敷等), 来调整培养、破碎、分离、收集、除杂质、分装的具体参数和设备, 以免制备步骤中引入影响后续应用的因素。

- 20 在一些实施方案中, 利用有机溶剂去除破碎产物中的脂质。在一些实施方案中, 利用核酸酶去除破碎产物中的 DNA 和 RNA。在一些实施方案中, 利用水解酶降解破碎产物中的蛋白质。在一些实施方案中, 利用表面活性剂去除破碎产物中的细胞膜。

- 25 在一些实施方案中, 粉碎的平均粒度为 10 nm 至 1000nm; 可以提及 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190nm $\pm$ 10nm, 以及上述任意两个数值之间的范围。粒度的测试方法有很多 (胡松青等人, 现代颗粒粒度测量技术, 现代化工, 2002 年 22: 1)。

在一些具体的实施方案中, 粉碎的平均粒度为 10nm 至 800nm。

在另一些具体的实施方案中, 粉碎的平均粒度为 10nm 至 500nm。

在一些实施方案中, 所述分装是指分装至容器中。所述容器选自: 瓶、管、包、袋、板、安瓿、注射装置、铝膜包装、敷料、胶囊。

- 30 例如, 在具体的实施方案中, 所述分装是指分装至瓶/安瓿中。临用前, 向瓶/安瓿中添加溶剂。

具体地,本发明在一方面提供了一种分离的赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) 细胞壁骨架在制备用于治疗人宫颈癌前病变的药物中的用途,其中:

5 优选地,所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌;

在优选的实施方案中,其中所述分离的赤红球菌细胞壁骨架通过以下步骤获得:

- 1) 提供赤红球菌;
- 10 2) 培养所述赤红球菌;
- 3) 收集经培养的赤红球菌;
- 4) 粉碎经培养的赤红球菌,得到粉碎产物;和
- 5) 去除所得粉碎产物中的脂质、核酸和蛋白质。

另一方面,本发明提供了一种药物组合物在制备用于治疗人宫颈癌前病变的药物中的用途,其中所述药物组合物包含:

15 分离的赤红球菌细胞壁骨架,优选地,所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌;和

20 药学上可接受的赋形剂;

优选地,其中所述分离的赤红球菌细胞壁骨架为 1 个重量份,所述药学上可接受的赋形剂为 200 至 300 个重量份;

25 优选地,200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 以及任意两个数值范围内的任意点值;优选地,所述药学上可接受的赋形剂选自右旋糖酐、海藻糖、甘氨酸、木糖醇、羧甲基纤维素钠、赤藓糖醇、明胶、硬脂酸镁和甘露醇。

另一方面,本发明提供的分离的赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) 细胞壁骨架或包含其的组合物可用于局部施用;任选地,所述局部施用可以是局部粘膜下注射、或者粘膜涂覆。

30 任选地,本发明提供的分离的赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) 细胞壁骨架或包含其的组合物可配制成软膏剂、乳膏剂、硬膏剂、凝胶剂、

洗剂、酞剂、搽剂、油剂、糊剂、冻干粉、气雾剂、栓剂、贴片或悬液。优选地，本发明提供的分离的赤红球菌（*Rhodococcus ruber*）细胞壁骨架或包含其的组合物可配制成冻干粉制剂，并且在使用前将冻干粉制剂在生理盐水中稀释，使赤红球菌细胞壁骨架的浓度为  
5 15 $\mu$ g/ml-500 $\mu$ g/ml，优选浓度为 30-240 $\mu$ g/ml。

另一方面，本发明提供了一种分离的赤红球菌细胞壁骨架在制备用于治疗人宫颈癌前病变的医疗器械中的用途，其中：

优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理  
10 委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌；

所述医疗器械包含所述分离的赤红球菌细胞壁骨架，和

任选地，药学上可接受的赋形剂；

任选地，所述医疗器械为外用医疗器械，优选地选自以下形式：敷料、贴片、绷带、膜。优选地，所述所述敷料、贴片、绷带或膜中  
15 浸润含浓度为 15 $\mu$ g/ml-500 $\mu$ g/ml，优选浓度为 30-240 $\mu$ g/ml 的赤红球菌细胞壁骨架的混悬液。

另一方面，本发明提供了一种用于治疗人宫颈癌前病变的分离的赤红球菌细胞壁骨架，其中：

优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22  
20 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌。

另一方面，本发明提供了一种用于治疗人宫颈癌前病变的药物组合物，其中所述药物组合物包含：

分离的赤红球菌细胞壁骨架，优选地，所述分离的赤红球菌细胞  
25 壁源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌；和

药学上可接受的赋形剂；

优选地，其中所述赤红球菌细胞壁骨架为 1 个重量份，所述药学  
30 上可接受的赋形剂为 200 至 300 个重量份；

优选地，其中所述赤红球菌细胞壁骨架为 1 个重量份，所述药学

上可接受的赋形剂为 200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 以及任意两个数值范围内的任意点值。

本发明中提供的用于治疗人宫颈癌前病变的分离的赤红球菌细胞壁骨架通过以下步骤获得：

- 5           1) 提供赤红球菌；
- 2) 培养所述赤红球菌；
- 3) 收集经培养的赤红球菌；
- 4) 粉碎经培养的赤红球菌，得到粉碎产物；和
- 5) 去除所得粉碎产物中的脂质、核酸和蛋白质。

10           另一方面，本发明提供了一种治疗人宫颈癌前病变的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的分离的赤红球菌细胞壁骨架，其中：

            优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理  
15           委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌；或包含所述分离的赤红球菌细胞壁骨架的药物组合物；优选地，所述施用为局部施用；优选地，所述局部施用为粘膜涂覆、或粘膜下注射；

            优选地，其中所述治疗有效量的单位剂量是 1 $\mu$ g 至 1000 $\mu$ g；优选地为 15-500 $\mu$ g，更优选为 30-240 $\mu$ g。

20           优选地，所述治疗按照每周 2-4 次，优选地，每周 2 次的频率进行；  
            优选地，所述的预防和/或治疗持续 2 天至 2 个月，更优选地，持续 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周或 8 周。

            在本申请的上下文中，药物或药物组合物中的唯一治疗性（或预防性）活性成分是源自赤红球菌的产品，尤其是包含赤红球菌组成成分  
25           （如蛋白、核酸、脂质、细胞壁及其组成成分、碳水化合物、代谢物）的产品，具体而言包含赤红球菌细胞壁（更优选赤红球菌细胞壁骨架或其组成）的产品。

## 附图说明

30           图 1：赤红球菌的菌落形态。

            图 2：16S rRNA 鉴定结果。

## 具体实施方式

“分离”是指本公开的赤红球菌脱离其原始生长环境。

技术人员知晓，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞壁结构不同。具体而言，革兰氏阳性菌的细胞壁较厚（通常 20nm 至 80nm），含有约 90%的肽聚糖和约 10%的磷壁酸（一种由醇和磷酸分子形成的聚合物，通常以糖酯或氨基酸酯的形式存在）。肽聚糖层致密，甚至多达 20 层。然而，革兰氏阴性菌的细胞壁比革兰氏阳性菌的细胞壁要薄很多，结构较复杂，分为外膜（outer membrane）和肽聚糖层（通常 2nm 至 3nm）。

肽聚糖层是细菌细胞壁中特有成分，是一种杂多糖的衍生物。每一个肽聚糖的单体包括 3 部分：糖单元（例如，至少两种糖分子通过糖苷键连接起来，构成肽聚糖的框架性结构）、肽尾（由若干氨基酸连接成的短肽链，其连接在 N-乙酰胞壁酸分子上）、和肽桥（将相邻“肽尾”交联形成高强度的网状结构）。不同细菌的肽桥、肽尾、交联方式是不同的。

### *分离的赤红球菌细胞壁*

在本公开中，“分离的赤红球菌细胞壁”既可以理解为完整的细胞壁，也可以理解为不完整的细胞壁（例如，破碎的、或部分降解的）。在本公开的教导下，技术人员将理解，显示出所需活性的成分来自赤红球菌的细胞壁（例如，是细胞壁本身或其组成）。因此，在临床应用中允许采用完整的细胞壁、经破碎的细胞壁、细胞壁的不完全降解产物、细胞壁的组成成分、细胞壁的提取物等各种形式，这些都包含在本公开范畴之内。

### *细胞壁骨架*

构成细胞壁主体结构的组成成分；但不能理解为仅仅表示细胞壁当中的交联网状实体，技术人员理解不排除交联网状实体上所吸附、结合、携带的其他细胞壁成分。

### *赤红球菌*

本公开实施方案中所用的赤红球菌是指红球菌属（*Rhodococcus*）的赤红球菌种（*Rhodococcus ruber*），不限于特定的细胞株。

非限制性示例包括 TOY7 株（南京农业大学农业环境微生物菌种保藏中心）、CGMCCNo.4795、DSM43338、CCTCC No.2012035、CGMCC No.16640、CGMCC 17431。

#### *赤红球菌的鉴定*

5 根据已知的或未来的微生物鉴定技术，技术人员可以对一株细菌进行分类学鉴定，例如可用的鉴定技术包括形态学、生理生化特征、16S rRNA 等。技术人员理解，随着科技的发展，鉴定技术涉及不同的手段，在较早的时期主要采用形态学和生化鉴定方式，但是这种方法的可靠程度不高。测序技术出现后，技术人员可以利用更为可信的方式鉴定菌株。例如，当 16S rRNA 的 DNA 序列被鉴定为具有 97%（含）  
10 以上相似性时，判定两个菌属于相同的种（华苟根等人，红球菌属的分类及应用研究进展，微生物学通报，2003：30（4））。就赤红球菌而言，将保藏在国际（或国家级）菌种保藏单位中的已知菌株作为模式菌株，并与其进行比对。

#### 15 *剂型*

本公开的药物或药物组合物或活性成分或产品，可以体现为但不限于以下形式：软膏剂、乳膏剂、硬膏剂、凝胶剂、洗剂、酊剂、搽剂、油剂、糊剂、冻干粉、气雾剂、栓剂、贴片、悬液、口服液、口含片、护肤品（洁面乳、化妆水、精华、乳液、面霜、面膜）。

#### 20 *赋形剂*

适用于本公开的赋形剂，例如但不限于：右旋糖酐、乳糖、微晶纤维素、海藻糖、甘氨酸、木糖醇、羧甲基纤维素钠、赤藓糖醇、明胶、硬脂酸镁、甘露醇、抛射剂、保湿剂、溶剂、增溶剂、乳化剂、抗氧化剂、pH 调节剂、防腐剂。具体而言，非限制实例还包括：白凡士林、卡波姆、羟丙甲纤维素、甲基纤维素、羟甲基纤维素钠、壳聚糖、  
25 硫糖铝壳聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、玻璃酸钠、二甲醚、四氟乙烷、氢氟烷烃、甘油、丙二醇、去离子水、生理盐水、蒸馏水、乙醇、十六醇、十八醇、对氨基苯甲酸、乙酰胺、异丙醇、吐温、聚氧乙基氢化蓖麻油、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、三聚甘油单硬脂酸酯、脂肪酸蔗糖酯、蔗糖酯、乙酸异丁酸蔗糖糖酯、山梨醇酐三硬脂酸酯、  
30 肉豆蔻酸异丙酯、胆固醇、角鲨烯、角鲨烷、正丁醇、乙二醇、乙醇、

丙二醇、聚甘油酯、亚硫酸盐、半胱氨酸、二叔丁基羟基甲苯、山梨酸钾、磷酸缓冲溶液、三乙醇胺、氢氧化钠、乙二胺、月桂胺、碳酸氢钠、盐酸、尼泊金类、硫柳汞、氯甲酚、三氯叔丁醇、苯甲酸及其钠盐。

#### 5 制剂单元

本公开的<sup>5</sup>药物或药物组合物或活性成分或产品，可以制备成单位制剂（单元制剂）的形式。

在一些实施方案中，所述药物（或制剂、或治疗剂、或医疗器械）中的单位剂量含有：

- 10 - 0.001mg 至 500 mg 所述的赤红球菌产品；或
- 0.001mg 至 500 mg 所述的赤红球菌细胞壁；或
- 0.001mg 至 500 mg 所述的赤红球菌细胞壁骨架。

单位剂量的具体示例是 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、5、10、15、20、25、30、40、  
15 50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500mg ±10%、以及上述任意两个数值之间的范围。

“施用”、“给予”、“提供给”、“处理”当应用于动物、人、细胞、组织、器官或生物样品时，是指药物（治疗剂、活性成分或组合物）与动物、人、细胞、组织、器官或生物样品接触。

20 “治疗”意指给予受试者内用或外用药物（治疗剂、活性成分或组合物）（如，根据本公开的赤红球菌细胞壁或其药物组合物），在被治疗的受试者（或群体）中缓解（减轻、延迟、改善、治愈）一种或多种疾病症状，以至于达到临床可测量的程度，其中所述的受试者已经患有、疑似患有或易感于一种或多种疾病或其症状。

25 有效缓解任何疾病症状的药物（治疗剂、活性成分或组合物）的量称为治疗有效量。可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重。应当理解，在缓解单个受试者的目标疾病或其症状时，药物（治疗剂、活性成分或组合物）可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法（如 Student T 检验、卡方检验、依据 Mann 和  
30 Whitney 的 U 检验）确定，药物（治疗剂、活性成分或组合物）在统计学意义上对目标疾病或其症状是有效的。

“任选”意味着其随后所描述的事项可以发生，但不必须发生；需要视情况而定。例如，“任选地，进行分装”意味着允许对产品进行分装，但是不是必须进行分装；分装与否不影响技术效果的实现。

“一个”、“一”、“单个”、“该”，如果没有明确说明，也  
5 包括复数形式。

以下结合实施例、制备例和测试例，进一步描述本公开。但这些实施例、制备例和测试例并非限制着本公开的范围。当未注明具体条件时，按照常规条件、按照原料供应商所建议的条件操作。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

10 技术人员尤其理解，虽然以下具体示例采用了特定的细胞株，但是技术效果的实现不限于该特定的细胞株，任何属于红球菌属赤红球菌种的 (*Rhodococcus ruber*) 物种均适用。

## 实施例

### 15 实施例 1. 菌株保藏

发明人将实验室保存的主代菌株于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431。经检测表明，所寄存的菌株存活。

20

### 实施例 2. 菌株鉴定

#### 1. 菌落形态特征的裸眼观测

在甘油琼脂培养基上，30-37℃（具体为 32-35℃）培养 12 至 72（具体为 36 至 60，例如 40-50）小时，可见（图 1）：

25

- 菌落隆起；
- 呈桔红色（受光线、培养基颜色等影响，则略有差别）；
- 表面干燥皱起、稍显光泽（随培养条件差别，则略有差别）；
- 轻触易碎；
- 菌落大小约 1mm 至 2mm（随培养条件差别，则略有差别）。

30

#### 2. 显微镜观察

- 菌体呈分枝状，有横隔膜，形成菌丝体（随培养条件差别，则略

有差别)；

- 菌丝分裂形成规则的短粗细胞(随培养条件差别,则略有差别)；
- 培养4至5天时,菌体成短杆状或球形(随培养条件差别,则略有差别)。

### 5 3. 染色性

革兰氏染色阳性。

### 4. 生化反应

取甘油琼脂斜面培养基上,30-37℃(具体为32-35℃)培养12至72(具体为36至60,例如40-50)小时培养。然后,对培养物进行以下各项测试。

#### 4.1 碳水化合物产酸:

呈阳性: 甘油、甘露醇、山梨醇、D-阿拉伯糖醇、D-果糖、D-葡萄糖;

呈阴性: 肌醇、菊糖、乳糖、蔗糖、淀粉、麦芽糖、糖原、木糖醇、葡萄糖酸盐、海藻糖、赤藓醇、松三糖、蜜二糖、棉子糖、纤维二糖、苦杏仁甙、龙胆二糖、阿东醇、熊果甙、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、 $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖甙、 $\alpha$ -甲基-D-甘露糖甙、D-核糖、D-木糖、L-木糖、N-乙酰-葡萄糖胺、D-松二糖、D-来苏糖、 $\beta$ -甲基-D-木糖甙、D-半乳糖、D-塔格糖、D-岩藻糖、L-岩藻糖、D-甘露糖、L-山梨糖、L-阿拉伯糖醇、L-鼠李糖、2-酮基-葡萄糖酸盐。

#### 4.2 酶活性测定(API ZYM):

呈阳性: 碱性磷酸酶、类脂酯酶(C8)、类脂酶(C14)、白氨酸芳胺酶、缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、萘酚-AS-B1-磷酸水解酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶;

呈阴性: N-乙酰-葡萄糖胺酶、酯酶(C4)、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -糖醛酸苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶、 $\beta$ -岩藻糖苷酶。

#### 4.3 硝酸盐还原反应阳性、接触酶阳性、酪氨酸酶阳性、淀粉酶

阴性、氧化酶阴性、明胶液化阴性。

#### 4.4 唯一碳源：

Biolog Gen II 葡糖醛酰胺、 $\beta$ -羟基-DL 丁酸、D-果糖-6-磷酸、 $\alpha$ -D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露醇、D-阿糖醇、  
生长实验： D-山梨醇、奎宁酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、柠檬酸、L-苹果酸、溴代丁二酸、吐温 40、丙酸、乙酸呈阳性；  
Biolog Gen III 对二甲胺四环素、十四烷硫酸钠、利福霉素 SV、pH5.0、8%氯化钠、林可霉素、夫西地酸、D-丝氨酸、万古霉素、四唑紫、四唑蓝敏感；  
化学敏感实验 对溴酸钠、1%乳酸钠、pH6.0、1%-4%氯化钠、茶啉酸、氯化锂、亚碲酸钾、氨基曲南、丁酸钠不敏感。

#### 4.5. 16S rRNA 鉴定

对工作种子管中分离的 15 株菌和原始种子管中分离的 10 株不同  
5 菌株，进行基因组提取、16Sr RNA 扩增、并测序。总计 25 个菌株的 16Sr RNA 基因同一性为 100%。这表示 25 个菌株为相同种属（图 2）。

同时，基于 Kimura2-参数算法构建的 neighbor-joining 菌株进化树，结果显示菌株归属为 *Rhodococcus ruber*。

10

## 制备例

### 制备例 1. 培养方法

1. 可以通过常规的微生物生产方法，培养保藏编号为 CGMCC 17431 赤红球菌。

2. 培养方式既可为固体培养，也可为液体培养。

15

3. 对培养基中的营养源并无特殊的规定，可使培养基中含有通常用于微生物培养的碳源、氮源及其它营养源。

- 碳源可以是赤红球菌可以利用的任何碳源。例如，果糖、葡萄糖等。

- 氮源可为：肉膏、蛋白胨、铵盐、硝酸盐以及其它有机或无机含  
20 氮化合物。

- 其它营养源则可适当添加一些无机盐类。例如 NaCl、磷酸盐类。

4. 对培养条件（温度、时间等）并无严格的限制，技术人员可以根据初步的小规模的中试数据，自行选择使其产量最高的条件。

5. 作为一个示例，采用以下培养条件发酵赤红球菌：

(1) 培养基组成包含：

5 蛋白胨、牛肉膏、氯化钠、磷酸盐、甘油（以及，任选琼脂，当固体培养时）。

(2) 培养的方法参数：

工作菌种复苏后，转移至固体培养介质上维持 3-5 天，再转移至液体培养（30-37℃，维持 3-5 天），可以采用补料分批的半连续模式，  
10 也可以采用分批模式。培养期间监控 pH、细菌密度、溶解氧、碳源消耗。

### 制备例 2. 菌体破碎

收集制备例 1 所得到的菌，对细胞进行粉碎（例如但不限于通过  
15 超声波破碎）。也允许采用本领域任何适当的公知方法对菌体进行破碎，例如 CN101250490A 或 CN101323865A。

显微镜下检查粉碎的情况，每个视野有形菌不得超过 5 个，检查若干（10 至 30 个）视野均达到此标准为合格。

### 20 制备例 3. 除去核酸、除去脂质、除去杂蛋白、除去细胞膜

1. 除核酸：

将破碎上清液进行离心，获得的沉淀物中加入 DNA 酶和 RNA 酶，按照酶的供应商建议的操作去除核酸。

2. 除蛋白质：

25 沉淀物加入常见的蛋白酶（例如胰蛋白酶），按照酶的供应商建议的操作去除蛋白质。

3. 除脂质：

沉淀物中加入有机试剂（如但不限于丙酮、乙醚、乙醇中的一种或组合），按照本领域常规操作去除脂质。

30 4. 除细胞膜：

沉淀物中加入 TritonX-100，按照本领域常规操作，离心收集沉淀

物，用 PBS 漂洗。

应当理解，上述除去杂质的步骤之间，技术人员可以调整先后顺序，使得步骤之间兼容。去除非细胞壁成分后，将沉淀物复溶于生理盐水，待用。任选地，可以在 115℃ 下灭菌 20-30 分钟，作为细胞壁骨架的原液（主要包含细胞壁骨架及其组成成分）。

#### 5. 产量

从 159 个克氏瓶中共收集菌液 653 ml(破碎后);湿重产量为 138g;细胞壁骨架产量为约 0.87g/克氏瓶。

### 10 制备例 4. 药物组合物的制备方法

1. 向制备例 3 所得产物中加入赋形剂（如右旋糖酐 40、甘露醇或海藻糖）。灌装后，即为药物组合物。

表 1. 药物组合物可以配制成多种形式

组合物	每瓶容量	配比
组合物 1	2 ml	活性成分 60μg 右旋糖酐 40 15mg
组合物 2	2 ml	活性成分 240μg 右旋糖酐 40 48 mg
组合物 3	2 ml	活性成分 120μg 右旋糖酐 40 36 mg
组合物 4	2 ml	活性成分 60μg 海藻糖 12mg
组合物 5	2 ml	活性成分 120μg 海藻糖 36mg
组合物 6	2 ml	活性成分 120μg 甘露醇 36mg
组合物 7	2 ml	活性成分 60μg 甘露醇 12mg

15 2. 将制备例 3 所得产物(活性成分 30μg 至 240μg)涂覆在敷料上，制备成外用医疗器械。

3. 将表 1 中的药物组合物冻干，制得冻干粉（分别编号为组合物 1 至 7）。

4. 质量检验（以组合物 1 为例）

20

表 2. 质量检验项目



未见到延迟毒性（组合物 1 至组合物 7）。

### 测试例 3. 稳定性试验

5 在常温（18-25°C）放置 0、1、2、3、8、14、21 个月，该药物组合物的丙氨酸含量、胞壁酸含量、吞噬率、吞噬指数与试验起始时相比，无统计学显著差异（测试三个批次）。

综上，冻干粉制剂的药物组合物可以稳定保存 24 个月（组合物 1 至组合物 7）。

### 10 测试例 4. 吞噬试验

巨噬细胞是单核吞噬细胞系统的主要细胞，吞噬细胞受抗原刺激后活化，可使吞噬功能明显增强。在小鼠体内诱导腹腔巨噬细胞产生后，给小鼠腹腔注射鸡血红细胞，30min 后处死小鼠取出腹腔液，染色，显微镜下计数吞噬红细胞的百分数，以判断吞噬细胞的杀伤能力，间接地测定机体的非特异性免疫水平。

15 利用本申请的组合物 1 进行测试，其吞噬率为 75%，吞噬指数 1.05。而阴性对照（赋形剂）和空白对照（生理盐水）的吞噬率和吞噬指数都较低。说明本申请的细胞壁骨架的促免疫吞噬能力强。

### 20 效果例：本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂在治疗宫颈癌癌前病变中的用途

#### 1. 本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂对体外宫颈癌细胞生长的抑制作用

25 将本发明制备例 3 中获得的赤红球菌细胞壁骨架配制成一定浓度的混悬液，在 0.07MPa 下灭菌 15min，并置于 4°C 保存。

常规培养宫颈癌细胞系的 HeLa 细胞，以胰蛋白酶消化，收集对数生长期 HeLa 细胞，用 DMEM 培养液配制细胞悬液，调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$ /ml，接种于 96 孔细胞培养板内，0.1ml/孔，对照组和实验组各 5 孔，其中实验组加入如上制备的赤红球菌细胞壁骨架混悬液，终浓度值至 30 $\mu$ g/ml，对照组仅加入 DMEM 培养基。置于含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内

(37℃)培养 24-120 h, 每隔 2 日更换培养液, 于培养的 24h、48h、72h、96h、120h 用 MTT 法检测两组细胞生长差异。

根据现有技术公知的方法以及制造商的说明书, 进行 MTT 测定法。简言之, 分别于每个待检测点(24h、48h、72h、96h、120h)加入 MTT(四甲基偶氮唑蓝)溶液(5mg/ml 贮存液)20 $\mu$ l/孔, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 4h, 然后去上清, 每孔加入 DMSO 150 $\mu$ l/孔, 培养箱内孵育 20min, 待 MTT 完全溶解后, 用 ELISA 测定仪 590nm 波长测定每孔的光吸收值。

取各时间点光吸收值相近数据平均值和标准差, 以时间为横坐标, 光吸收值为纵坐标, 绘制 HeLa 细胞生长曲线。

采用 SPSS12.0 统计软件对各组数据进行配对 t 检验。

结果: 对照组和实验组在不同时间点的 OD<sub>490</sub> 光吸收值如下表 3 所示

表 3. 不同时间点 HeLa 细胞 OD<sub>490</sub> 光吸收值

	24h	48h	72h	96h	120h
对照组	0.47 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.02	1.46 $\pm$ 0.04	2.47 $\pm$ 0.04
实验组	0.37 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.04	0.64 $\pm$ 0.06	1.04 $\pm$ 0.07	2.01 $\pm$ 0.02

采用 SPSS10.0 统计软件对各组数据进行配对 t 检验分析结果表明, 两组数据具有显著的统计学差异,  $p < 0.05$ 。

在上述 HeLa 细胞活力的 MTT 检测中, 可以看出, 在添加赤红球菌细胞壁骨架和仅含对照培养基的两组中, 在不同时间点 OD<sub>490</sub> 光吸收值有显著性差异, 与对照组相比, 实验组 HeLa 细胞生长明显受阻, 说明赤红球菌细胞壁骨架具有阻滞 HeLa 细胞生长的作用。

## 2. 本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂对体外宫颈癌细胞生长的抑制作用

将人宫颈癌细胞系的 HeLa 细胞(请确认)以密度为  $10^6$  /只接种到小鼠右侧腹, 一周以后(8-9 天)呈现肉眼可见肿块。将本发明制备例 3 中获得的赤红球菌细胞壁骨架, 用生理盐水配制成浓度为 30 $\mu$ g/ml、60 $\mu$ g/ml 的悬浮液制剂, 向肿瘤部位局部注射, 2 次/周, 四周后处死小

鼠，量取瘤组织长、宽及瘤体重量；对照组仅注射生理盐水。结果见下表 4。

表 4. 本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂小鼠体内肿瘤细胞生长的抑制

	肿瘤 长 X 宽 (cm)	肿瘤重量 (g)
对照组	2.46×1.51	2.38
赤红球菌细胞壁骨架 (30 μg/ml)	1.56×1.1	0.63
赤红球菌细胞壁骨架 (60 μg/ml)	1.37×0.65	0.51

该实验结果表明，局部注射本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂的小鼠中肿瘤生长明显变缓，与对照组有统计学上的显著差异 ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ )。

### 3. 本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂对人宫颈癌前病变的治疗效果

临床诊断为宫颈癌前病变的 25 例 28-45 岁的女性患者，在与患者签署“知情同意书”之后，通过病变部位外敷本发明的组合物或局部注射本发明的组合物，对患者进行治疗。

将本发明制备例 3 中获得的赤红球菌细胞壁骨架用生理盐水配制成 30μg/ml、60μg/ml、120μg/ml 和 240μg/ml，局部涂覆或局部粘膜下注射到患者病变部位，每周两次，持续一个月，结果如以下表 5 所示

表 5. 本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂制对人宫颈癌前病变的治疗作用

患者	年龄	赤红球菌细胞壁骨架浓度	治疗前宫颈病变	给药方式	治疗 1 个月后检测
1	35	30 $\mu$ g/ml	ASCUS	宫颈外敷	细胞学阴性
2	37	30 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
3	29	30 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
4	36	30 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
5	30	30 $\mu$ g/ml	CIN II	宫颈外敷	细胞学降级
6	32	60 $\mu$ g/ml	CIN II	宫颈注射	细胞学降级
7	31	60 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
8	33	60 $\mu$ g/ml	ASCUS	宫颈外敷	细胞学阴性
9	44	60 $\mu$ g/ml	ASCUS	宫颈外敷	细胞学阴性
10	45	60 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
11	35	120 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
12	53	120 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
13	30	120 $\mu$ g/ml	CIN II	宫颈外敷	降级
14	46	120 $\mu$ g/ml	CIN II	宫颈注射	细胞学阴性
15	34	120 $\mu$ g/ml	LSIL	宫颈外敷	细胞学阴性
16	43	120 $\mu$ g/ml	LSIL	宫颈外敷	细胞学阴性
17	41	240 $\mu$ g/ml	LSIL	宫颈外敷	细胞学阴性
18	35	240 $\mu$ g/ml	CIN I	宫颈外敷	细胞学阴性
19	37	240 $\mu$ g/ml	CIN II	宫颈外敷	细胞学阴性
20	49	240 $\mu$ g/ml	CIN II	宫颈注射	降级
21	50	240 $\mu$ g/ml	CIN II	宫颈注射	细胞学阴性

其中 ASCUS 指非典型鳞状上皮细胞；LSIL 指低度鳞状细胞上皮内病变；CIN I 属于低度鳞状细胞上皮内病变，病变常局限在宫颈阴道部；CIN II 属于高度鳞状细胞上皮内病变，病变可扩展至宫颈管内。

其中选取 4 名患者作为对照患者，仅局部施用生理盐水。在该对照组中，患者的宫颈病变没有显著的改善（结果未显示）。

结果表明，与对照组相比，本发明的赤红球菌细胞壁骨架制剂可

显著改善患者宫颈癌的癌前病变。其中用 30 $\mu$ g/ml、60 $\mu$ g/ml、120 $\mu$ g/ml 和 240 $\mu$ g/ml 四个剂量在治疗后，均可以使不典型鳞状细胞和轻度鳞状细胞上皮内病变患者的细胞学转阴，而使属于高度鳞状细胞上皮内病变的 CIN II 患者的病变分类降级；其中，在 120 $\mu$ g/ml 剂量组，一例  
5 CIN II 患者的病变细胞学转阴，在 240 $\mu$ g/ml 剂量组，有两例 CIN II 患者的病变细胞学转阴。

## 权利要求书

1. 一种分离的赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) 细胞壁骨架在制备用于治疗人宫颈癌前病变的药物中的用途，其中：

5 优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述分离的赤红球菌细胞壁骨架通过以下步骤获得：

- 1) 提供赤红球菌；
- 2) 培养所述赤红球菌；
- 3) 收集经培养的赤红球菌；
- 4) 粉碎经培养的赤红球菌，得到粉碎产物；和
- 15 5) 去除所得粉碎产物中的脂质、核酸和蛋白质。

3. 一种药物组合物在制备用于治疗人宫颈癌前病变的药物中的用途，其中所述药物组合物包含：

20 分离的赤红球菌细胞壁骨架，优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌；和

药学上可接受的赋形剂；

25 优选地，其中所述分离的赤红球菌细胞壁骨架为 1 个重量份，所述药学上可接受的赋形剂为 200 至 300 个重量份；

优选地，所述药学上可接受的赋形剂为 200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 以及任意两个数值范围内的任意点值。

4. 根据权利要求 3 所述的用途，其中所述药学上可接受的赋形剂选自右旋糖酐、海藻糖、甘氨酸、木糖醇、羧甲基纤维素钠、赤藓糖醇、明胶、硬脂酸镁和甘露醇。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述药物用于局部施用，优选地，所述局部施用为粘膜涂覆、或粘膜下注射。

5       6. 根据权利要求 5 所述的用途，其中所述药物配制成软膏剂、乳膏剂、硬膏剂、凝胶剂、洗剂、酊剂、搽剂、油剂、糊剂、冻干粉、气雾剂、栓剂、贴片或悬液，优选地，其中所述药物配制成冻干粉制剂，并且在使用前将冻干粉制剂在生理盐水中稀释，使赤红球菌细胞壁骨架的浓度为 15 $\mu$ g/ml-500 $\mu$ g/ml，优选浓度为 30-240 $\mu$ g/ml。

10

7. 一种分离的赤红球菌细胞壁骨架在制备用于治疗人宫颈癌前病变的医疗器械中的用途，其中：

      优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌；

15

      所述医疗器械包含所述分离的赤红球菌细胞壁骨架，和  
      任选地，药学上可接受的赋形剂。

8. 根据权利要求 7 所述的用途，其中所述医疗器械为外用医疗器械，优选地选自以下形式：敷料、贴片、绷带或膜。

20

9. 根据权利要求 8 所述的用途，其中所述敷料、贴片、绷带或膜中浸润含浓度为 15 $\mu$ g/ml-500 $\mu$ g/ml，优选浓度为 30-240 $\mu$ g/ml 的赤红球菌细胞壁骨架的混悬液。

25

10. 一种用于治疗人宫颈癌前病变的分离的赤红球菌细胞壁骨架，其中：

      优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌。

30

11. 一种用于治疗人宫颈癌前病变的药物组合物，其中所述药物组

合物包含：

分离的赤红球菌细胞壁骨架，优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为

5 CGMCC 17431 的赤红球菌；和

药学上可接受的赋形剂；

优选地，其中所述分离的赤红球菌细胞壁骨架为 1 个重量份，所述药学上可接受的赋形剂为 200 至 300 个重量份；

10 优选地，其中所述分离的赤红球菌细胞壁骨架为 1 个重量份，所述药学上可接受的赋形剂为 200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 以及任意两个数值范围内的任意点值。

12. 根据权利要求 10 所述的用于治疗人宫颈癌前病变的分离的赤红球菌细胞壁骨架、或根据权利要求 11 所述的用于治疗人宫颈癌前病变的药物组合物，其中所述分离的赤红球菌细胞壁骨架通过以下步骤获得：

- 1) 提供赤红球菌；
- 2) 培养所述赤红球菌；
- 3) 收集经培养的赤红球菌；
- 20 4) 粉碎经培养的赤红球菌，得到粉碎产物；和
- 5) 去除所得粉碎产物中的脂质、核酸和蛋白质。

13. 一种治疗人宫颈癌前病变的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的分离的赤红球菌细胞壁骨架或包含所述分离的赤红球菌细胞壁骨架的药物组合物，其中：

25 优选地，所述分离的赤红球菌细胞壁骨架源自于 2019 年 03 月 22 日保藏在北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC 17431 的赤红球菌；优选地，所述施用为局部施用；优选地，所述局部施用为粘膜涂覆、或  
30 粘膜下注射。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述治疗有效量的单位剂量是  $1\mu\text{g}$  至  $1000\mu\text{g}$ ；优选地为  $15\text{-}500\mu\text{g}$ ，更优选为  $30\text{-}240\mu\text{g}$ ；

优选地，所述治疗按照每周 2-4 次，优选地，每周 2 次的频率进行；

优选地，所述的治疗持续 2 天至 2 个月，更优选地，持续 1 周、2

5 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周或 8 周。

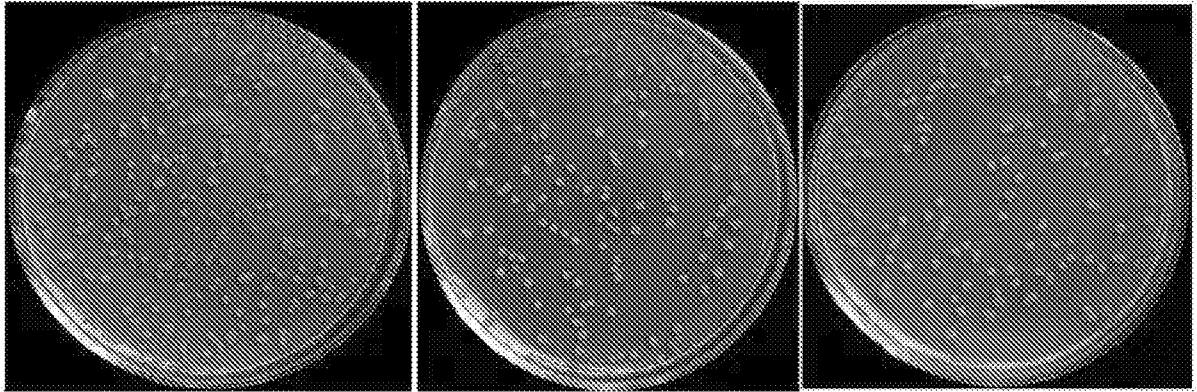


图 1

GGTTAGGCCACCGGCTTCGGGTGTACCGACTTTCATGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCA  
GCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCACGGGTCGAGTTGCAGACCCCGATCCGAAC TGAGACCGGCTTTAA  
GGGATTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGCCCTCTGTACCGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGA  
TGACTTGACGTCGTCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTGCGAGTCCCCACCATTACGTGCTGGCAACACAG  
GACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGA  
CCACAAGGGAAACCCCATCTCTGGGGCGGTCCGGTGTATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCA  
CATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGGGCGCTTAAT  
GCGTTAGCTACGGCACGGATCCCGTGGAAGGAAACCCACACCTAGCGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA  
TCCTGTTGCTACCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAGACCCGCCCTTCGCCACCGGTGTTCTCTGATA  
TCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCTGCAGTACTCAAGTCTGCCCGTATCGCTGCAAGCCCGCAGT  
TGAGCTGCGGGTTTTACAGACGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAGTAATTCGGGACAACGCTCGCACCT  
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGTCTTCTGTACTACCGTCACTTGGCTTCGTGGTACTGAAAG  
AGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCTGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCTCCACTGCT  
GCCTCCCGTAGGAGTCTGGCCGTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTGCGCCCTCTCAAGCCGGCTACCCGTCGTGGCTTGGT  
GGGCCGTTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGCCCATCTGCACCGGAAAACCTTTCCACCCCGGAACATGCATCCCG  
AGGTCCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCCGAAGTGCAGGGCAGATCACCCACGTGTTACTCACCCGTTCC  
CCTAATCCACCCAGCAAGCTGGCTTCATCGTTTCGAC

图 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/128237

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 35/74(2015.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; C12N; A61P; C12R		
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, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 赤红球菌, 红球菌, 骨架, 宫颈, 癌, 肿瘤, Rhodococcus, ruber, cell wall skeleton, cws, cervical, hpv, cancer, tumor		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	CN 110184215 A (FUJIAN INSTITUTE OF MICROBIOLOGY) 30 August 2019 (2019-08-30) see claims 1-4	1-12
Y	CN 1735431 A (UNIV LONDON) 15 February 2006 (2006-02-15) see claims 1-16, description, page 12, paragraphs 1 and 5, and page 13, paragraphs 3, 7, and 8	1-12
Y	US 2015245997 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP. et al.) 03 September 2015 (2015-09-03) see description, paragraph 67	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>17 February 2020</b>		Date of mailing of the international search report <b>26 March 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. <b>(86-10)62019451</b>		Telephone No.

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **13和14**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] Claims 13 and 14 relate to a method of treatment of the living human or animal body by therapy and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/128237**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110184215	A	30 August 2019	None			
CN	1735431	A	15 February 2006	CN	1735431	B	12 May 2010
				GB	0220809	D0	16 October 2002
US	2015245997	A1	03 September 2015	EP	2891495	A1	08 July 2015
				JP	6238366	B2	29 November 2017
				WO	2014034669	A1	06 March 2014
				EP	2891495	A4	04 May 2016
				US	9717687	B2	01 August 2017
				EP	2891495	B1	30 May 2018
				JP	WO2014034669	A1	08 August 2016

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 35/74(2015.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n</p> <p>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</p>														
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; C12N; A61P; C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 赤红球菌, 红球菌, 骨架, 宫颈, 癌, 肿瘤, Rhodococcus, ruber, cell wall skeleton, cws, cervical, hpv, cancer, tumor</p>														
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PY</td> <td>CN 110184215 A (福建省微生物研究所) 2019年 8月 30日 (2019 - 08 - 30) 参见权利要求1-4</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1735431 A (伦敦大学) 2006年 2月 15日 (2006 - 02 - 15) 参见权利要求1-16, 说明书第12页第1和5段, 第13页第3、7和8段</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2015245997 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP等) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 参见说明书第67段</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PY	CN 110184215 A (福建省微生物研究所) 2019年 8月 30日 (2019 - 08 - 30) 参见权利要求1-4	1-12	Y	CN 1735431 A (伦敦大学) 2006年 2月 15日 (2006 - 02 - 15) 参见权利要求1-16, 说明书第12页第1和5段, 第13页第3、7和8段	1-12	Y	US 2015245997 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP等) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 参见说明书第67段	1-12
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
PY	CN 110184215 A (福建省微生物研究所) 2019年 8月 30日 (2019 - 08 - 30) 参见权利要求1-4	1-12												
Y	CN 1735431 A (伦敦大学) 2006年 2月 15日 (2006 - 02 - 15) 参见权利要求1-16, 说明书第12页第1和5段, 第13页第3、7和8段	1-12												
Y	US 2015245997 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP等) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 参见说明书第67段	1-12												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 2月 17日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 3月 26日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>潘俊宇</p> <p>电话号码 62411108</p>												

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 13和14  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求13和14涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2019/128237

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)
CN	110184215	A	2019年 8月 30日	无			
CN	1735431	A	2006年 2月 15日	CN	1735431	B	2010年 5月 12日
				GB	0220809	D0	2002年 10月 16日
US	2015245997	A1	2015年 9月 3日	EP	2891495	A1	2015年 7月 8日
				JP	6238366	B2	2017年 11月 29日
				WO	2014034669	A1	2014年 3月 6日
				EP	2891495	A4	2016年 5月 4日
				US	9717687	B2	2017年 8月 1日
				EP	2891495	B1	2018年 5月 30日
				JP	W02014034669	A1	2016年 8月 8日