



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112791106 A

(43) 申请公布日 2021.05.14

(21) 申请号 202110078339.3 *A61K 45/06* (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.20 *A61P 37/04* (2006.01)

(83) 生物保藏信息 *A61P 35/00* (2006.01)

CGMCC No.5469 2011.11.18

CGMCC No.18639 2019.10.08

(71) 申请人 北京科拓恒通生物技术股份有限公司

地址 101407 北京市怀柔区雁栖经济开发区
牯牛河路31号院1号-2

(72) 发明人 刘晓军 张凌宇 其木格苏都

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

A61K 35/747 (2015.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图8页

(54) 发明名称

药物组合物及其治疗疾病的用途

(57) 摘要

本发明涉及药物组合物及其治疗疾病的用途。提供了药物组合物,其包含免疫信号通路调节剂和一定量的鼠李糖乳杆菌,所述鼠李糖乳杆菌的量足以增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。本发明属于微生物药物领域。本发明通过口服以保藏号为CGMCC No.18639保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的鼠李糖乳杆菌,能够提高肿瘤患者接受PD-1治疗的应答率,抑制肿瘤的发展,延长生存期;口服的治疗方式简单,无创,对患者身体基本不会造成额外伤害;该鼠李糖乳杆菌耐酸耐碱,能通过胃肠道环境,稳定定殖;且菌粉发酵冻干工艺成熟稳定。

1. 药物组合物,其包含免疫信号通路调节剂和有效量的鼠李糖乳杆菌,所述鼠李糖乳杆菌的有效量足以增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应;

优选地,所述药物组合物的单位剂量含有 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 CFU以上的鼠李糖乳杆菌;

优选地,所述鼠李糖乳杆菌为口服形式,优选冻干粉或片剂形式。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述鼠李糖乳杆菌是以保藏号为CGMCC No.18639保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的鼠李糖乳杆菌。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述免疫信号通路调节剂选自下组:PD-1调节剂、CTLA-4调节剂、PD-L1调节剂、TIM-3调节剂、LAG-3调节剂、4-1BB调节剂、OX40调节剂或CD27调节剂;优选地PD-1抗体、CTLA-4抗体、PD-L1抗体、TIM-3抗体、LAG-3抗体、4-1BB抗体、OX40抗体或CD27抗体。

4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其包含一种或多种另外的药物,所述药物选自化疗剂和促凋亡剂;优选地,化疗剂选自安吡啶、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氟法齐明、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、多西他赛、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、多柔比星脂质体、柔红霉素脂质体、洛莫司汀、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、帕立他塞、培美曲塞、喷司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、沙铂、链唑星、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、替尼泊苷、塞替派、硫鸟嘌呤、托泊替康、曲奥舒凡、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨或其组合;优选地,促凋亡剂选自氟达拉滨、环己酰亚胺和乳糖苷神经酰胺。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物不包含选自下组的一种或多种成分:花青素类物质和双歧杆菌。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的药物组合物,其中所述受试者患有以免疫检查点蛋白介导的疾病,优选地所述疾病选自膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸和血液学癌症。

7. 鼠李糖乳杆菌在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于通过增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应来治疗受试者中的疾病或者增强患有疾病的受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述鼠李糖乳杆菌的量足以增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应;

优选地,所述药物的单位剂量含有 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 CFU以上的鼠李糖乳杆菌;

优选地,所述鼠李糖乳杆菌为口服形式,优选冻干粉或片剂形式。

9. 根据权利要求7或8所述的用途,其中所述鼠李糖乳杆菌是以保藏号为CGMCC No.18639保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的鼠李糖乳杆菌。

10. 根据权利要求7-9中任一项所述的用途,其中所述免疫信号通路调节剂选自下组:PD-1调节剂、CTLA-4调节剂、PD-L1调节剂、TIM-3调节剂、LAG-3调节剂、4-1BB调节剂、OX40调节剂或CD27调节剂;优选地PD-1抗体、CTLA-4抗体、PD-L1抗体、TIM-3抗体、LAG-3抗体、4-1BB抗体、OX40抗体或CD27抗体。

11. 根据权利要求7-10中任一项所述的用途,其中所述药物组合物包含一种或多种另外的药物,所述药物选自化疗剂和促凋亡剂;优选地,化疗剂选自安吡啶、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯法齐明、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、多西他赛、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、多柔比星脂质体、柔红霉素脂质体、洛莫司汀、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、帕立他塞、培美曲塞、喷司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、沙铂、链唑星、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、替尼泊苷、塞替派、硫鸟嘌呤、托泊替康、曲奥舒凡、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨或其组合;优选地,促凋亡剂选自氟达拉滨、环己酰亚胺和乳糖苷神经酰胺。

12. 根据权利要求7-11中任一项所述的用途,其中所述药物组合物不包含选自下组的一种或多种成分:花青素类物质和双歧杆菌。

13. 根据权利要求7-12中任一项所述的用途,其中所述受试者患有以免疫检查点蛋白介导的疾病,优选地所述疾病选自膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸和血液学癌症。

14. 根据权利要求7-13中任一项所述的用途,其中所述鼠李糖乳杆菌在所述免疫信号通路调节剂前施用一次或多次。

15. 权利要求1-6中任一项的药物组合物在制备用于治疗受试者中的疾病的药物中的用途,其中所述疾病是以免疫检查点蛋白介导的疾病,优选地所述疾病选自膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸和血液学癌症;其中所述鼠李糖乳杆菌作用为增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。

药物组合物及其治疗疾病的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物制药领域,具体涉及包含鼠李糖乳杆菌的药物组合物及其用于治疗癌症的用途。

背景技术

[0002] 手术,化疗和放疗,是传统癌症治疗的“三驾马车”。然而这些传统方法普遍存在治愈率不高,易复发,副作用大等特点。近年来,以PD-1/PD-L1抑制剂为代表的免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors,ICB)逐渐成为癌症治疗中的新星。这类药物通过阻断PD-1/PD-L1、CTLA-4等免疫检查点分子的受体与配体的结合从而有效阻止共抑制因子对T细胞的抑制作用,促进T细胞的进一步活化、增殖和分化,最终实现对肿瘤细胞的清除作用。

[0003] PD-1(programmed death1,程序性死亡受体1)是由T细胞表达的一类免疫检查点(immune checkpoint)分子,其属于CD28超家族成员。PD-1是一类重要的免疫抑制分子,其作为“关闭的开关”发挥作用,抑制T细胞攻击体内的其它细胞。当T细胞表面的PD-1与体内正常细胞上表达的PD-1配体PD-L1(programmed death ligand-1,程序性死亡配体1)时,T细胞的细胞杀伤效果受到抑制。肿瘤细胞利用这一机制逃避T细胞的免疫攻击,其表达大量PD-L1,以与T细胞表面的PD-1结合,抑制其细胞杀伤效果。针对PD-1或PD-L1免疫检查点的抑制剂,例如单克隆抗体药物能够阻断PD-1与PD-L1结合,抑制其下游信号传导,从而增强T细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用。以PD-1为靶点的免疫调节在抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病和器官移植存活方面均有重要意义。根据目前的临床研究和临床前研究,PD-1抗体药物在多种癌症的治疗中表现出显著的效果,包括多种消化道癌症、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾癌等。一部分接受PD-1抗体治疗的患者能够获得长期持久的疗效。

[0004] 然而,以PD-1/PD-L1抑制剂为代表的免疫检查点抑制剂在癌症治疗方面也存在诸多问题,其中以响应率低最为突出。研究表明,靶向PD-1/PD-L1的药物治疗的患者响应率通常不超过40%,而采用CTLA-4单抗药物-ipilimumab治疗的患者其响应率仅约为15%,并且其中一部分患者仅为局部应答。此外,此类治疗还存在以下问题:起效慢,其中位起效时间为12周,可能会耽误患者的救治时间;部分患者治疗效果较差;在患者体内引起副作用,诸如结肠炎、腹泻、皮炎、肝炎、内分泌疾病等免疫相关不良反应(irAEs),可能导致治疗提前终止;以及价格昂贵,令普通患者难以承担。

[0005] 本领域需要改进的治疗癌症的药物和方法。

发明内容

[0006] 本发明部分基于以下发现:鼠李糖乳杆菌增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。更具体地,发明人发现鼠李糖乳杆菌增强癌症受试者对免疫信号通路调节剂,更具体地免疫检查点抑制剂的响应,其中响应通过相对肿瘤抑制率和延迟生存期的增加证明。

[0007] 出乎意料地,发明人还发现了与现有技术中鼠李糖乳杆菌发挥免疫抑制作用相

反,鼠李糖乳杆菌可以通过免疫加强来促进免疫信号通路调节剂的治疗效果。此外,发明人还发现了与包含鼠李糖乳杆菌的混合益生菌相比,单独的鼠李糖乳杆菌可以在疾病治疗中发挥相当或者更好的效果。例如,与免疫信号通路调节剂联用,相当或者更好地抑制肿瘤或者延迟生存期。

[0008] 还出乎意料地,发明人还发现了与现有技术的预期(即联合多种益生菌,例如双歧杆菌有益于抗癌,例如参见CN1487798A,CN106170557A等)相反,单独的鼠李糖乳杆菌更有益于增强受试者对免疫检查点抑制剂的治疗响应。

[0009] 保藏信息:

[0010] 鼠李糖乳杆菌Probio-M9菌株分类命名鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*),保藏单位名称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,邮编:100101,保藏编号:CGMCC No.18639;保藏日:2019年10月08日。干酪乳杆菌zhang菌株分类命名干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*),保藏单位名称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,邮编:100101,保藏编号:CGMCC No.5469;保藏日:2011年11月18日。

[0011] 鼠李糖乳杆菌Probio-M9是2018年从采集自中国内蒙古、新疆、湖北、北京等地区品100份健康妇女母乳样中分离540株乳酸菌和双歧杆菌中筛选出一株具有潜在益生特性的鼠李糖乳杆菌。研究表明Probio-M9在pH2.5的人工胃液中消化3小时(存活率83.72%),之后继续在pH8.0的人工消化液中消化11小时,其存活率高达78.33%。具有良好的胃肠道消化液耐受性,能够以活的状态进入人体肠道,发挥健康功效。

[0012] 在一方面,本发明提供了药物组合物,其包含免疫信号通路调节剂和一定量的鼠李糖乳杆菌,所述鼠李糖乳杆菌的量足以增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。

[0013] 在一个实施方案中,药物组合物的单位剂量含有 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 CFU以上的鼠李糖乳杆菌。

[0014] 在一个实施方案中,鼠李糖乳杆菌为口服形式。在一个实施方案中,冻干粉或片剂形式。

[0015] 在一个实施方案中,鼠李糖乳杆菌是以保藏号为CGMCC No.18639保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的鼠李糖乳杆菌。

[0016] 在一个实施方案中,免疫信号通路调节剂选自下组:PD-1调节剂、CTLA-4调节剂、PD-L1调节剂、TIM-3调节剂、LAG-3调节剂、4-1BB调节剂、OX40调节剂或CD27调节剂。

[0017] 在一个实施方案中,免疫信号通路调节剂选自下组:PD-1抗体、CTLA-4抗体、PD-L1抗体、TIM-3抗体、LAG-3抗体、4-1BB抗体、OX40抗体或CD27抗体。

[0018] 在一个实施方案中,药物组合物包含一种或多种另外的药物。在一个实施方案中,药物选自化疗剂和促凋亡剂。在一个实施方案中,化疗剂选自安吡啶、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氟法齐明、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、多西他赛、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、多柔比星脂质体、柔红霉素脂质体、洛莫司汀、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、帕立他塞、培美曲塞、喷司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、沙铂、链唑星、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、替尼泊苷、塞替派、硫鸟嘌呤、托泊替康、曲奥舒凡、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞

滨或其组合。在一个实施方案中,促凋亡剂选自氟达拉滨、环己酰亚胺和乳糖苷神经酰胺。

[0019] 在一个实施方案中,药物组合物不包含选自下组的一种或多种成分:花青素类物质和双歧杆菌。

[0020] 在一个实施方案中,受试者患有以免疫检查点蛋白介导的疾病。在一个实施方案中,疾病选自膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸和血液学癌症。

[0021] 在另一个方面,本发明提供了鼠李糖乳杆菌在制备药物中的用途,所述药物用于通过增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应来治疗受试者中的疾病或者增强患有疾病的受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。

[0022] 在一个实施方案中,鼠李糖乳杆菌的量足以增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。

[0023] 在一个实施方案中,药物的单位剂量含有 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 CFU以上的鼠李糖乳杆菌。

[0024] 在一个实施方案中,鼠李糖乳杆菌为口服形式。在一个实施方案中,冻干粉或片剂形式。

[0025] 在一个实施方案中,鼠李糖乳杆菌是以保藏号为CGMCC No.18639保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的鼠李糖乳杆菌。

[0026] 在一个实施方案中,免疫信号通路调节剂选自下组:PD-1调节剂、CTLA-4调节剂、PD-L1调节剂、TIM-3调节剂、LAG-3调节剂、4-1BB调节剂、OX40调节剂或CD27调节剂。免疫信号通路调节剂选自下组:PD-1抗体、CTLA-4抗体、PD-L1抗体、TIM-3抗体、LAG-3抗体、4-1BB抗体、OX40抗体或CD27抗体。

[0027] 在一个实施方案中,药物包含一种或多种另外的药物。在一个实施方案中,药物选自化疗剂和促凋亡剂。在一个实施方案中,化疗剂选自安吡啶、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氟法齐明、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、多西他赛、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、多柔比星脂质体、柔红霉素脂质体、洛莫司汀、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、帕立他塞、培美曲塞、喷司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、沙铂、链唑星、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、替尼泊苷、塞替派、硫鸟嘌呤、托泊替康、曲奥舒凡、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨或其组合。在一个实施方案中,促凋亡剂选自氟达拉滨、环己酰亚胺和乳糖苷神经酰胺。

[0028] 在一个实施方案中,药物组合物不包含选自下组的一种或多种成分:花青素类物质和双歧杆菌。

[0029] 在一个实施方案中,受试者患有以免疫检查点蛋白介导的疾病,优选地所述疾病选自膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸和血液学癌症。

[0030] 在一个实施方案中,鼠李糖乳杆菌在所述免疫信号通路调节剂前施用一次或多次。

[0031] 在又一个方面,本发明提供了本发明的药物组合物在制备用于治疗受试者中的疾病的药物中的用途。疾病可以是以免疫检查点蛋白介导的疾病。优选地,疾病选自膀胱、脑、

乳房、宫颈、结肠、直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸和血液学癌症。在本发明的用途中，鼠李糖乳杆菌作用为增强受试者对免疫信号通路调节剂的治疗响应。

[0032] 在本文中，免疫信号通路调节剂可以是免疫检查点抑制剂。

[0033] 本发明的有益效果至少包括：

[0034] (1) 本发明为提高免疫信号通路调节剂，更具体地免疫检查点抑制剂，例如PD-1免疫抑制剂在癌症治疗中的响应率，通过口服鼠李糖乳杆菌Probio-M9，联合免疫信号通路调节剂(例如PD-1抑制剂)免疫治疗，增加肿瘤患者的存活率；

[0035] (2) 本发明通过口服鼠李糖乳杆菌Probio-M9，能够提高肿瘤患者接受免疫信号通路调节剂(例如PD-1抑制剂)治疗的应答率，抑制肿瘤的发展，延长生存期；口服的治疗方式简单，无创，对患者身体基本不会造成额外伤害；鼠李糖乳杆菌Probio-M9耐酸耐碱，能通过胃肠道环境，稳定定殖；且菌粉发酵冻干工艺成熟稳定。

附图说明

[0036] 图1:实验设计流程图。

[0037] 图2:对照组荷瘤鼠和肿瘤照片。

[0038] 图3:鼠李糖乳杆菌Probio-M9单独治疗组荷瘤鼠和肿瘤照片。

[0039] 图4:PD-1抗体单独治疗组荷瘤鼠和肿瘤照片。

[0040] 图5:鼠李糖乳杆菌Probio-M9和PD-1抗体联合治疗组荷瘤鼠和肿瘤照片。

[0041] 图6A-C:鼠李糖乳杆菌Probio-M9显著增强PD-1抗体疗效。

[0042] 图7:Probio-M9培养上清对THP-1的作用。

[0043] 图8:Probio-M9培养活菌对THP-1的作用。

具体实施方式

[0044] 如本文中所用，“鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)”是厌氧耐酸、不产芽孢的一种革兰氏阳性益生菌，多存在于人和动物的肠道内，细菌分类学属于乳杆菌属。在本发明中，鼠李糖乳杆菌可以是以保藏号为CGMCC No.18639保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的鼠李糖乳杆菌。该菌株是2018年从采集自中国内蒙古、新疆、湖北、北京等地区品100份健康妇女母乳样中分离540株乳酸菌和双歧杆菌中筛选出的一株具有潜在益生特性的鼠李糖乳杆菌。研究表明Probio-M9在pH2.5的人工胃液中消化3小时(存活率83.72%)，之后继续在pH8.0的人工消化液中消化11小时，其存活率高达78.33%。具有良好的胃肠道消化液耐受性，能够以活的状态进入人体肠道，发挥健康功效。在本文中表明单独的鼠李糖乳杆菌对于癌症并没有明显的治疗效果。

[0045] 如本文中所用，术语“免疫信号通路调节剂”指调节免疫信号通路调节的药剂。在本文中，免疫信号通路调节是免疫检查点调节剂。术语“免疫检查点调节剂”是指整体或部分减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白质的分子。检查点蛋白质调控T细胞活化或功能。已知多种检查点蛋白质，如CTLA-4及其配体CD80和CD86；以及PD-1及其配体PD-L1和PD-L2 (Pardoll, *Nature Reviews Cancer*12:252-264, 2012)。这些蛋白质负责T细胞反应的共刺激或抑制相互作用。免疫检查点蛋白调控并维持自身耐受性以及生理免疫反应的

持续时间和幅度。免疫检查点调节剂包括抗体或源自于抗体。在本发明中,免疫信号通路调节剂是PD-1调节剂、CTLA-4调节剂、PD-L1调节剂、TIM-3调节剂、LAG-3调节剂、4-1BB调节剂、OX40调节剂或CD27调节剂,并且可以是抗体。

[0046] 如本文中所示,术语“花青素类物质”指花青素及其类似物或衍生物。例如,花青素类物质可以是花青素提取物干粉。有文献(CN108853478A)表明花青素类物质结合益生元,益生菌等能够提高PD-1治疗癌症的效果。在本申请中,本发明的组合物可以不包含花青素类物质。

[0047] 如本文中所示,术语“双歧杆菌(Bifidobacterium)”是一种革兰氏阳性、不运动、细胞呈杆状、一端有时呈分叉状、严格厌氧的细菌属,广泛存在于人和动物的消化道、阴道和口腔等生境中。双歧杆菌属的细菌是人和动物肠道菌群的重要组成成员之一。据报道,双歧杆菌具有抗结肠癌作用,可能是通过影响肠道菌群代谢、提高宿主免疫应答;黏附及降解潜在致癌物,预防肠道癌症;改变肠道菌群;产生抗癌抗诱变物质;提高宿主的免疫应答;影响宿主的生理活动来实现(梁冰,吴力克,姜峰,付海波等;双歧杆菌QJ405、乳杆菌QJ405在试管内对肠道致病菌抑杀效果的初步报告.《中国微生态学杂志》,2000)。双歧杆菌包括长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、梭形双歧杆菌、链状双歧杆菌、假链状双歧杆菌和齿状双歧杆菌。本发明可以不包括双歧杆菌中的一种或多种或全部。

[0048] 如本文所使用,术语“患者”或“受试者”可互换使用,并且意思指哺乳动物,包括但不限于人类或非人类哺乳动物,如牛、马、犬、绵羊或猫。优选地,患者或受试者是人类。

[0049] 有报道称鼠李糖乳杆菌能够与短双歧杆菌结合治疗结肠炎,例如由CTLA-4和PD-1阻断诱导的结肠炎。在这些情况下,各种菌的施用剂量为 1×10^9 CFU,并且一般是在形成结肠炎后进行施用。在本发明中,鼠李糖乳杆菌起到增强受试者对免疫信号通路调节剂的响应,其施用剂量和时机明显不同于现有技术的量和时间。举例而言,在本发明的组合物中,鼠李糖乳杆菌的量是至少 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 CFU,优选 5×10^9 CFU以上,并且可以在免疫信号通路调节剂施用前施用。

[0050] 如本文所使用,术语“有效量”指活性成分有效治疗疾病的量。在本文中,“有效量”是指鼠李糖乳杆菌有效加强免疫以促进免疫信号通路调节剂治疗,例如增强受试者对免疫信号通路调节剂的响应的量。

[0051] 在本文中,以免疫检查点蛋白介导的疾病可以是癌症,包括但不限于膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸和血液学癌症。术语“癌症”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌,淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括但不限于鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、肢端黑素瘤、结节性黑素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小无核裂细胞性NHL、贮积病NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特

伦氏 (Waldenstrom) 巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、毛细胞性白血病、慢性骨髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性病症 (PTLD)、以及与癩痣病 (phakomatoses)、水肿 (诸如与脑瘤有关的) 和梅格斯氏 (Meigs) 综合征有关的异常血管增殖、脑瘤和脑癌、以及头颈癌、及相关转移。

[0052] 在本文中,本发明的组合物中还可以包含一种或多种另外的药物。例如,药物选自化疗剂和促凋亡剂。在一个实施方案中,“化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类,诸如塞替派和环磷酰胺 (CYTOXAN®);磺酸烷基酯类,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,诸如苯佐替派、卡波醌、美妥替派和乌瑞替派;乙撑亚胺类和甲基蜜胺类,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺;氮芥类,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝脲类,诸如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素类,诸如阿克拉霉素、放线菌素、氨基糖苷类、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素类、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物类,诸如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸、甲氨喋呤、蝶酰三谷氨酸、三甲曲沙;嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄激素类,诸如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、表硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺类,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋酐内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;地美可辛;地吡醌;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌 (莫派达醇);二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK®;雷佐生;西索菲兰;螺旋锗 (细交链孢菌酮酸);三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;阿糖胞苷 (“Ara-C”);环磷酰胺;塞替派 (thiotepa);类紫杉醇类,例如紫杉醇 (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和多西他塞 (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨喋呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷 (VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;能灭瘤;替尼泊苷;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊本膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶调节剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);视黄酸;卡培他滨;及任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物。

[0053] 如本文中使用时,促进对免疫信号通路调节剂的响应是指与免疫信号通路调节剂联合给药后增加受试者的无进展存活或者增加相对肿瘤抑制率或者减少相对肿瘤增殖率。

[0054] 药物或活性成分,例如鼠李糖乳杆菌可以制备成口服形式给药。对于口服给药,化合物可方便地通过将活性化合物和本领域熟知的药学可接受载体结合而配制。所述载体可使得本发明的化合物配制为片剂、丸剂、糖锭、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆液、悬浮液等

等,用于被所治疗的受治疗者口服摄入。用于口服使用的药物制剂可通过添加固体赋形剂,选择性地研磨得到的混合物和加工该颗粒混合物,如果需要,在添加合适的辅剂后获得片剂或糖衣药丸芯而获得。合适的赋形剂尤其为,填充剂如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制品如,例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可添加崩解剂,如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐如藻酸钠。

[0055] 可口服使用的药物包括由明胶制成的推入配合式胶囊以及由明胶和增塑剂,如甘油或山梨糖醇制成的软的密封胶囊。推入配合式胶囊可以包含与填充剂如乳糖,粘合剂如淀粉、和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁以及可选择的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮在合适的液体中,例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。

[0056] 术语“单位剂量”是指适合作为单位剂量用于人类或其它哺乳动物的物理上分离的单位,每个单位含有经计算能产生预期的治疗效果的预测量的活性成份,以及结合有所需要的药物载体。在本文中,药物的单位剂量含有 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 CFU以上的鼠李糖乳杆菌。

[0057] 下文提供了一些示例性的实施例以帮助本领域技术人员理解本发明,但是应当理解,这些实施例仅仅为了说明本发明提供,而不应用于限制本发明。本发明仅由所附权利要求书限定。在不背景本发明的范围或精神的情况下,本领域技术人员可以对这些实施方案进行修改。

[0058] 实施例

[0059] 实施例1:利用口服鼠李糖乳杆菌Probio-M9联合PD-1免疫调节剂,用于治疗消化道肿瘤。

[0060] 材料和方法

[0061] 购买SPF级6-8周龄雌性Balb/c小鼠。适应性饲养一周。实验期间将饲养在不同笼子里的属于同一组别的小鼠进行随机交换。

[0062] 同种型抗体:Rat IgG2a,中美冠科生物技术有限公司,货号:CVP039;

[0063] PD-1抗体(或简称aPD-1):RMP1-14,中美冠科生物技术有限公司,货号:CVP033;

[0064] Probio-M9:发酵冻干粉末;深圳未知君生物科技有限公司。

[0065] 抗生素处理:氨苄青霉素(Ampicillin 1mg/ml),新霉素(Neomycin 10mg/ml),甲硝哒唑(Metronidazole 10mg/ml),万古霉素(Vancomycin 5mg/ml)和两性霉素B(Amphotericin B 0.1mg/ml)。

[0066] CT26细胞:结肠癌细胞,购自上海生命科学研究院,货号:TCM37;CT26细胞培养在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中。收集指数生长期的CT26细胞,PBS重悬至适合浓度用于小鼠皮下肿瘤接种。

[0067] 本实验过程中动物实验的实验方案均通过CrownBio IACUC委员会审核并批准通过。实验过程中,动物实验操作均根据AAALAC的要求。肿瘤接种后,常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响,具体内容有实验动物的活动性,摄食和饮水情况,体重增加或降低(体重每周测量2次)情况,眼睛、被毛及其它异常情况。实验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。肿瘤体积计算公式:肿瘤体积(mm^3)= $1/2 \times (a \times b^2)$ (其中a表示长径,b表示短径)。实验中使用StudyDirector™(版本号3.1.399.19,供应商

StudylogSystem, Inc., S. San Francisco, CA, USA) 软件收集数据, 包括肿瘤的长短径的测量和动物体重的称量。原始数据由天平和游标卡尺测量后直接导入软件。

[0068] 将小鼠分为4组: 对照组(无菌生理盐水+同种型抗体)、Probio-M9单独治疗组(Probio-M9+同种型抗体对照)、PD-1抗体单独治疗组(无菌生理盐水+PD-1抗体)和Probio-M9联合治疗组(Probio-M9+PD-1抗体), 每组10只小鼠。

[0069] 适应性饲养结束后, 采用灌胃的方式对小鼠进行抗生素处理以清除小鼠肠道中原有微生物, 处理时间为16天(从第-8天到第7天), 每天灌胃2次。在抗生素处理过程中, 选择在第0天将培养好的CT26细胞注射到小鼠体内, 具体地, 右侧皮下接种CT26细胞, 接种体积为: 200 μ l, 数目为 5×10^5 个。进行造模(接种8天后根据肿瘤体积进行随机分组, 各组肿瘤平均体积为87 mm^3)。

[0070] 第7天灌胃结束后中断抗生素处理, 将小鼠转移到新的笼子中, 以防小鼠食用含抗生素的粪便。第9天在第一次微生物治疗前再一次将小鼠转移到新的笼子中。

[0071] 准备鼠李糖乳杆菌Probio-M9冻干粉, 用无菌生理盐水重悬至 2.5×10^{10} CFU/ml。在第8天, 第11天, 第14天及第17天分别给Probio-M9单独治疗组和Probio-M9联合治疗组小鼠以灌胃的形式进行益生菌治疗, 每只小鼠每天灌胃1次, 灌胃体积为200 μ l, 即剂量为 5×10^9 CFU/只/次; 对照组和PD-1抗体单独治疗组灌入等体积生理盐水。

[0072] 对于PD-1抗体和同种型抗体对照抗体, 在每次灌胃后第二天, 即第9天, 第12天, 第15天及第18天分别进行抗体注射, 用量为200 μ g/只/次。其中PD-1抗体单独治疗组和Probio-M9联合治疗组注射PD-1抗体, 而对照组和Probio-M9单独治疗组注射同种型抗体对照。

[0073] 第24天处死小鼠, 收集肿瘤, 进行称重并测量肿瘤面积后将肿瘤组织磨碎, 同时收集脾脏, 用于流式细胞分析。

[0074] 在实验过程中, 定期监控肿瘤细胞接种后小鼠肿瘤的生长状况: 用游标卡尺直接测量肿瘤面积, 监测时间点为: 第5, 8, 11, 14, 17, 21及24天; 接种肿瘤后小鼠体重的监测。给药后第16天(细胞接种后第24天), 每组取5个肿瘤做FACS。收获的肿瘤样品经消化处理成单细胞悬液后, 加入BFA(小牛血清)进行阻断, 培养4小时后收获进行染色。流式上机后获得的数据通过Kaluza软件进行分析(表2), 所有检验均为双尾检验, p 值小于0.05时被认为具有统计显著性。主要检测指标有: Viability dye, CD45, CD4, CD8, PD-1, Tim3, CD25, CD44+, CD11c+, CD11b+, Gr1+, CD86, CD80, IFN- γ , TNF- α 。

[0075] 表1受试物在鼠结肠癌CT26模型中的抗肿瘤作用实验设计

组别	动物数	给药组	剂量	给药方式	给药周期
[0076]	1	无菌生理盐水	--	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		Rat IgG2a	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19
	2	Probio-M9	5x10 ⁹ CFU/小鼠	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		Rat IgG2a	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19
	3	无菌生理盐水	--	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
			aPD-1	200 ug/小鼠	i.p.
[0077]	4	Probio-M9	5x10 ⁹ CFU/小鼠	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		aPD-1	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19

[0078] 相对肿瘤抑制率, TGI (%), 计算公式如下: $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积 (RTV) 或瘤重 (TW))。所有治疗组在实验过程中除有一只动物因为腹水死亡外, 其他动物均未死亡, 没有表现明显的药物毒性, 治疗期间耐受良好。

[0079] 结果:

[0080] CT26模型所有组小鼠在给药后第13天 (细胞接种后第21天) 测定平均瘤体积。在图6A和6B中显示了结果。可以看到, 对照组 (无菌生理盐水+同种型抗体, 即Ctrl+Ctrl) 与Probio-M9单独治疗组 (Probio-M9+同种型抗体对照, 即Ctrl+Probio-M9) 的肿瘤大小的平均值和中值相当, 表明Probio-M9单独没能抑制肿瘤生长。与PD-1抗体单独治疗组 (无菌生理盐水+PD-1抗体, 即aPD-1+Ctrl) 相比, Probio-M9联合治疗组 (Probio-M9+PD-1抗体, 即aPD-1+Probio-M9) 明显抑制肿瘤生长。这表明Probio-M9能够加强PD-1抗体的治疗效果。

[0081] 生存曲线也显示了类似的趋势, 如图6C显示。图6C表明Probio-M9+aPD-1治疗组能够显著促进小鼠的生存期, 相较对照组统计学上均有显著性差异, p值为0.011, 如图6C所示。对于无进展存活, Probio-M9+aPD-1治疗组相对于单独的Probio-M9和单独的aPD-1治疗组具备明显的协同效果。

[0082] 由表2可知, Probio-M9+PD-1治疗组在以下指标相较于对照组有显著差异: CD4+CD25+, CD4+CD62L+CD44+, CD4+IFN-gamma+, CD8+IFN-gamma+, CD4+PD-1+, CD4+Tim3+, CD4+TNF-alpha+, Gr-1+CD80+, Gr-1+CD86+和CD11c+CD86+。并且Probio-M9+PD-1治疗组在以下指标相较于单独的PD-1治疗组有显著差异: CD4+CD25+, CD4+CD62L+CD44+, CD4+IFN-gamma+, CD8+IFN-gamma+, CD4+PD-1+, CD8+PD-1+, CD4+Tim3+, CD8+Tim3+, CD4+TNF-alpha+, Gr-1+CD80+, Gr-1+CD86+和CD11c+CD86+。说明Probio-M9能够刺激免疫系统, 促进多种免疫细胞的富集, 可能通过刺激免疫系统来提高PD-1的响应, 抑制肿瘤生长, 提高生存率, 延长生存

期。

[0083] 表2流式细胞术分析结果

Marker	Bartlett	ANOVA/Kruskal	对照组 VS PD-1	对照组 VS Probio-M9+PD-1	PD-1 VS Probio-M9+PD-1
CD4+CD25+	0.83008499	0.003710242	0.239921455	0.009476334	0.005833736
CD8+CD25+	1.16E-07	0.547802403	0.547619048	0.30952381	0.222222222
CD4+CD62L-CD44+	0.81129339	0.188515713	0.329933696	0.20172591	0.13905845
CD4+CD62L+CD44+	0.00449271	0.007351505	0.69047619	0.007936508	0.015873016
CD4+CD62L+CD44-	0.09159804	0.131796808	0.281186443	0.084819181	0.085085621
CD8+CD62L-CD44+	0.18425662	0.419650034	0.400927811	0.485152892	0.608420476
CD8+CD62L+CD44+	0.00012441	0.163391236	0.095238095	0.074912899	0.095238095
CD8+CD62L+CD44-	0.00361111	0.2517618	0.420634921	0.074912899	0.150793651
CD4+IFN-gamma+	0.33459965	0.008045033	0.102388877	0.003638249	0.025185992
CD8+IFN-gamma+	0.06964491	0.002884079	0.265747016	0.048142021	0.041053033
CD4+PD-1+	0.30695137	0.001745215	0.109693353	0.032441295	0.011098435
CD8+PD-1+	0.01994163	0.003796311	0.015873016	0.222222222	0.015873016
CD4+Tim3+	0.58703882	0.003133036	0.142512835	0.001067141	0.006675679
CD8+Tim3+	0.27292808	0.091118213	0.106434052	0.062973459	0.047694407
CD4+TNF-alpha+	0.00010641	0.003309415	0.059327061	0.007936508	0.007936508
CD8+TNF-alpha+	0.64066183	0.645180171	0.118300057	0.237163464	0.506044582
Gr-1+CD80+	0.54530775	0.009189762	0.820132375	0.019521759	0.030438463
Gr-1+CD86+	0.01592266	0.000571872	0.841269841	0.007936508	0.015873016
CD11c+CD80+	0.37936103	0.003868626	0.121725186	0.341691451	0.167000068
CD11c+CD86+	0.00170274	0.015820541	0.69047619	0.031746032	0.031746032

[0085] 注:P值小于-0.05用粗体阴影背景标出。

[0086] 本发明通过口服鼠李糖乳杆菌Probio-M9,能够提高肿瘤患者接受PD-1治疗的响应性,抑制肿瘤的发展,延长患者生存期。荷瘤小鼠实验中,通过灌胃的方式结合PD-1免疫治疗,仅通过4次给药,即可抑制肿瘤的发展:Probio-M9+aPD-1组的平均肿瘤体积为1237.75mm³,相对肿瘤抑制率TGI (%)为32%;生存曲线分析表明Probio-M9+aPD-1治疗组能够显著促进小鼠的生存期,相较对照组统计学上均有显著性差异。

[0087] 实施例2:鼠李糖乳杆菌Probio-M9与包含鼠李糖乳杆菌Probio-M9的混合菌株在PD-1抗体治疗中的比较

[0088] 材料和方法

[0089] 益生菌2:鼠李糖乳杆菌Probio-M9;益生菌4:干酪乳杆菌zhang;益生菌6:混合菌株:鼠李糖乳杆菌Probio-M9+干酪乳杆菌Zhang的组合。

[0090] 其他材料和方法同实施例1。

[0091] 表2.受试物在鼠结肠癌CT26模型中的抗肿瘤作用实验设计

组别	动物数	给药组	剂量	给药方式	给药周期
1	10	无菌生理盐水	--	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		Rat IgG2a	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19
2	10	无菌生理盐水	--	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		aPD-1	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19
3	10	益生菌2	5e9 CFU/小鼠	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		aPD-1	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19
4	10	益生菌4	5e9 CFU/小鼠	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		aPD-1	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19
5	10	益生菌6	5e9 CFU/小鼠	p.o.	Day 9, 12, 15, 18
		aPD-1	200 ug/小鼠	i.p.	Day 10, 13, 16, 19

[0093] 表3. 在鼠结肠癌CT26模型中各组药效分析表

实验组	给药后第13天			
	肿瘤体积mm ³ ($\bar{x} \pm S$)	相对肿瘤体积 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)
第1组 无菌生理盐水+Rat IgG2a	1916.88±192.97	22.14±2.08	--	--
第2组 无菌生理盐水+aPD-1	1402.64±293.17	16.29±3.39	26	74
第3组 益生菌2+ aPD-1	1237.75±286.13	14.99±3.92	32	68
第4组 益生菌4+ aPD-1	1494.08±311.43	16.96±3.27	23	77
第5组 益生菌6+ aPD-1	1689.06±287.33	19.61±3.38	11	89

[0095] 相对肿瘤增殖率, T/C%, 即在某一时间点, 治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。计算公式如下:

[0096] $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ (T_{RTV} : 治疗组平均RTV; C_{RTV} : 溶媒对照组平均RTV; $RTV = V_t/V_0$, V_0 为分组时该动物的瘤体积, V_t 为治疗后该动物的瘤体积);

[0097] 或 $T/C\% = T_{TW}/C_{TW} \times 100\%$ (T_{TW} : 治疗组实验结束时平均瘤重; C_{TW} : 溶媒对照组实验结束时平均瘤重)。

[0098] 相对肿瘤抑制率, TGI (%), 计算公式如下: $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。(T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积 (RTV) 或瘤重 (TW))。

[0099] 结果:

[0100] 如表3中所示, 在CT26模型中与第2组无菌生理盐水+aPD-1相比第4和5组益生菌+aPD-1都未能进一步抑制肿瘤生长, 这些益生菌未能与aPD-1产生协同抗肿瘤效果。当Probio-M9与aPD-1联用时加强aPD-1抑制肿瘤的效果。这证明了足量的Probio-M9能够促进小鼠对aPD-1的响应。

[0101] 实施例3: 鼠李糖乳杆菌Probio-M9促进THP-1细胞表达IL-6。

[0102] 实验方法:

[0103] 细胞的传代与培养:THP-1 (THP-1人急性单核细胞白血病细胞,购自北京北纳创联生物技术研究院,货号100122)为悬浮细胞,使用RPMI-1640+10%FBS培养细胞(RPMI Medium1640,供应商:Solarbio,货号:201991031;Fetal Bovine Serum,供应商:Gibco,货号:2045512CP)(实验过程均未使用抗生素), 5×10^5 个细胞/ml接种密度,48~72h传代培养。

[0104] 极化诱导:300g,10min离心收集状态良好的THP-1细胞,PBS洗涤2次,台盼蓝染色计数后,使用完全培养基调整细胞密度至 1×10^6 (或 5×10^6)细胞/ml,添加50ng/ml的PMA(供应商:Sigma-Aldrich,货号:MKCL1142),混匀后,接种至96孔板,200 μ l/孔,5%CO₂+95%空气,37°C培养48h,细胞基本贴壁,吸去培养基,并用完全培养基洗涤一次,按照实验要求添加新培养基和作用上清或菌液。

[0105] Probio-M9培养上清对THP-1的作用:

[0106] 菌株培养:MRS培养基(供应商:Meilunbio,货号:M0226A)接种,好氧培养18~24h.nanodrop(Thermo,型号为:NanoDrop ONE)测量菌株浓度,传代接种一次,调整至 1×10^8 CFU/ml,培养18~24h,10000rpm,离心10min,上清用0.22 μ m的滤膜过滤,收集滤液,4°C保存待用。

[0107] 上清对THP-1的影响实验:极化好THP-1细胞,加入新培养基200 μ l。空白对照组添加4 μ l PBS;阴性对照组添加4 μ l MRS培养基(供应商:Meilunbio,货号:M0226A);实验组添加4 μ l菌株上清。CO₂培养箱培养。8000rpm,离心10min收集上清,检测IL-6(Human IL-6Valukine ELISA kit,供应商:Novus,货号:968607)。

[0108] Probio-M9活菌对THP-1的作用:

[0109] 菌株培养:接种菌株至MRS培养基,好氧培养18~24h。1:100传代接种,培养18~24h。PBS洗涤菌体3次,4000rpm,10min离心。洗涤完毕,用1640完全培养基稀释菌株至 1×10^7 CFU/ml,待用。

[0110] Probio-M9和THP-1共培养:极化好THP-1细胞,空白组添加2 μ l PBS+200 μ l新培养基;实验组添加200 μ l菌液。5%CO₂+95%空气,37°C培养2、6、24h。8000rpm,离心10min收集细胞培养上清,使用ELISA(Human IL-6/IL-6ELISA kit,供应商:Sino Biological,货号:CW13AP2403)检测IL-6。

[0111] 结果

[0112] Probio-M9培养上清对THP-1的作用:实验结果显示Probio-M9培养上清可以促进THP-1细胞产生IL-6,具有明显的促炎作用(图7),揭示Probio-M9可能可以通过刺激免疫系统来提高PD-1的响应,抑制肿瘤生长,提高生存率,延长生存期。

[0113] Probio-M9活菌对THP-1的作用:实验结果显示 1×10^7 CFU/ml的Probio-M9可以促进THP-1细胞产生IL-6,具有明显的促炎作用(图8),揭示Probio-M9可能可以通过刺激免疫系统来提高PD-1的响应,抑制肿瘤生长,提高生存率,延长生存期。

[0114] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范畴。

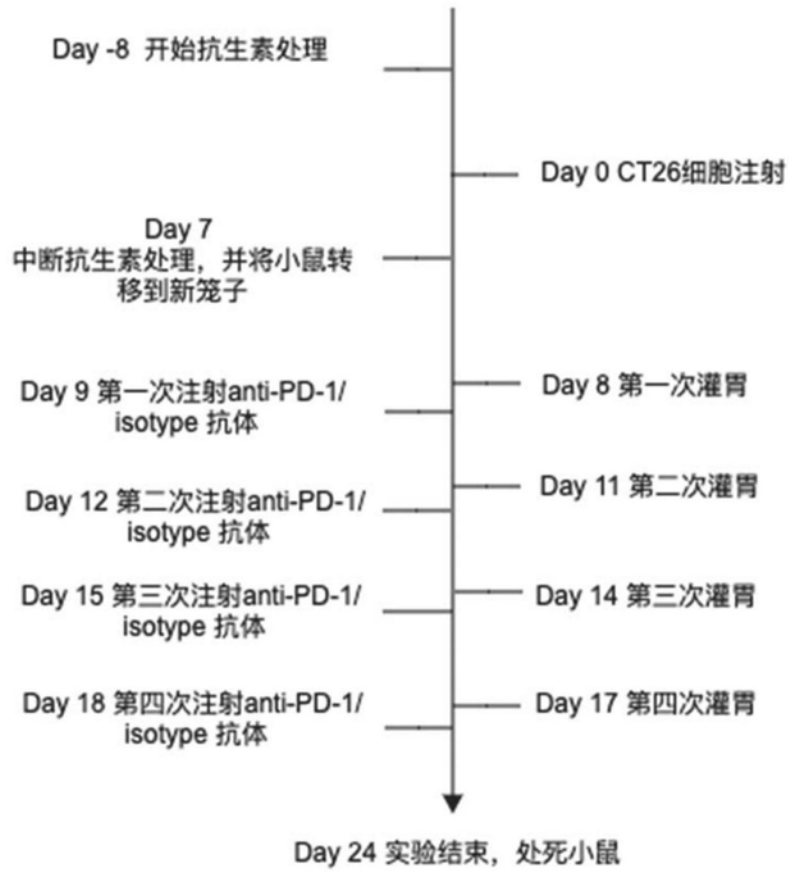


图1

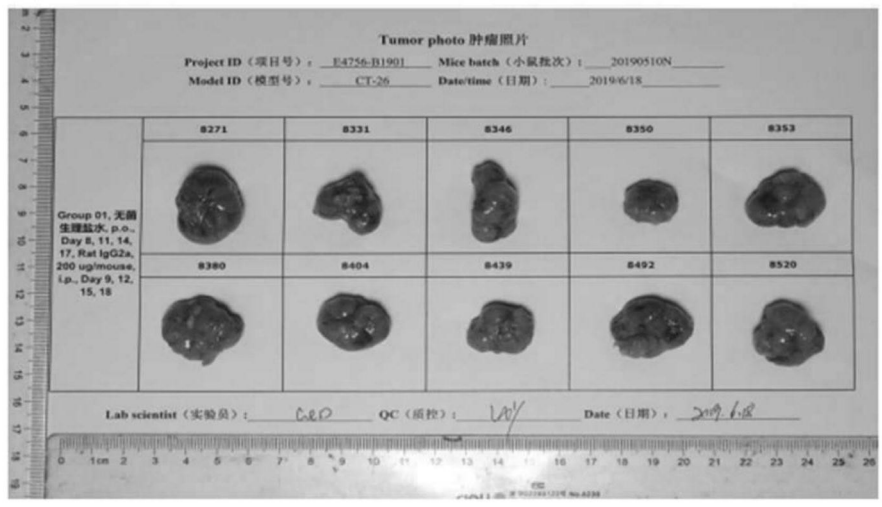


图2

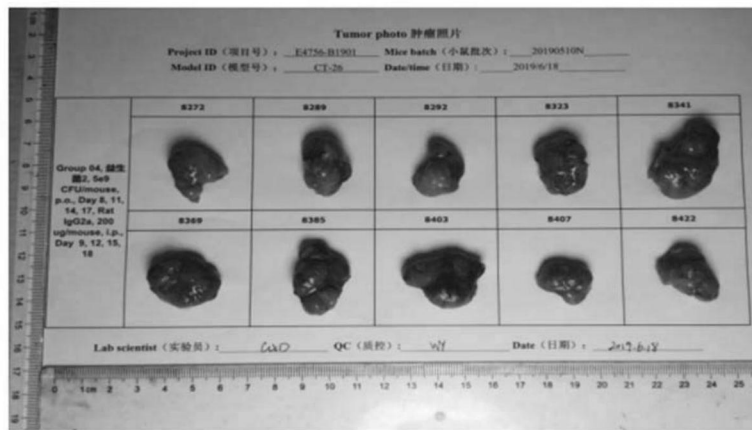
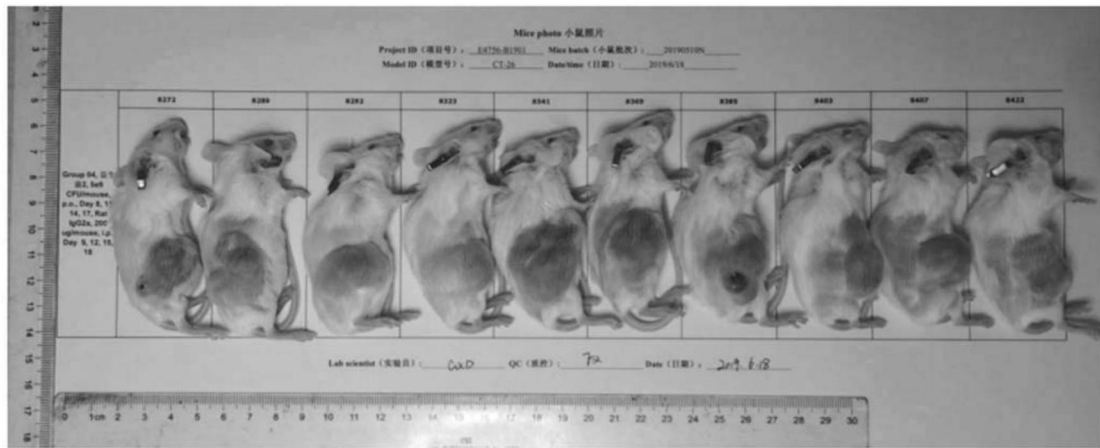


图3

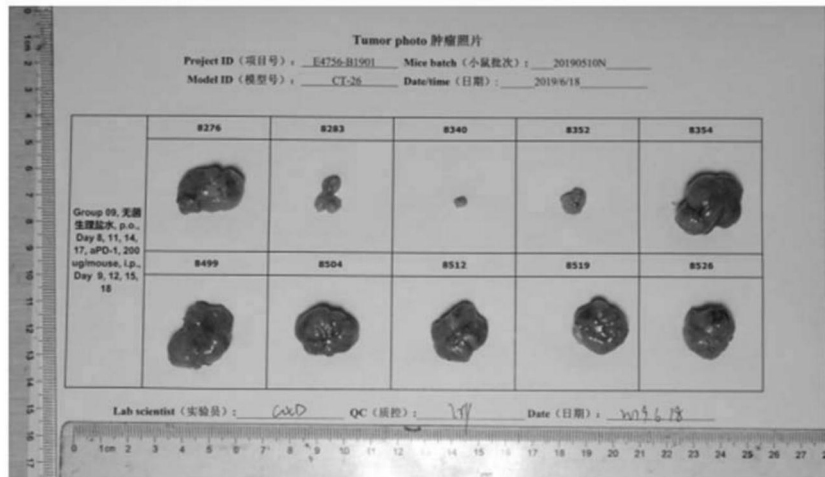
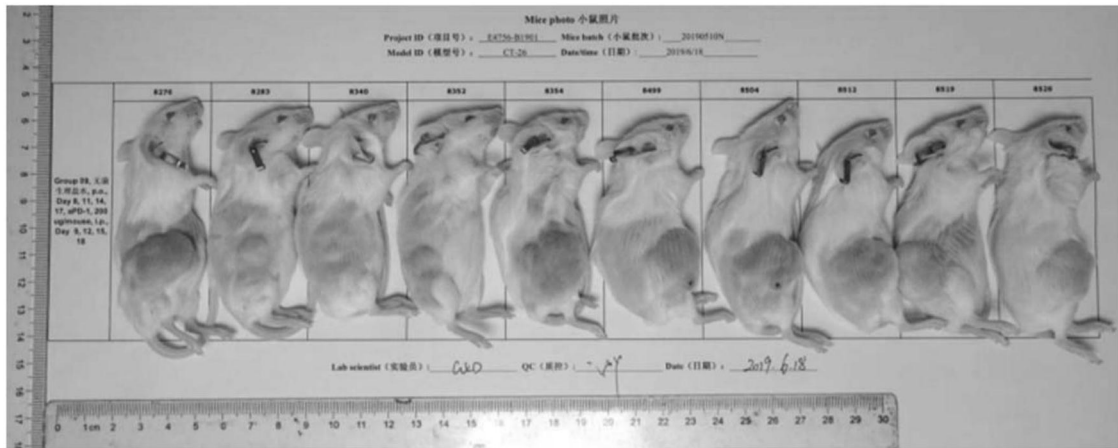


图4

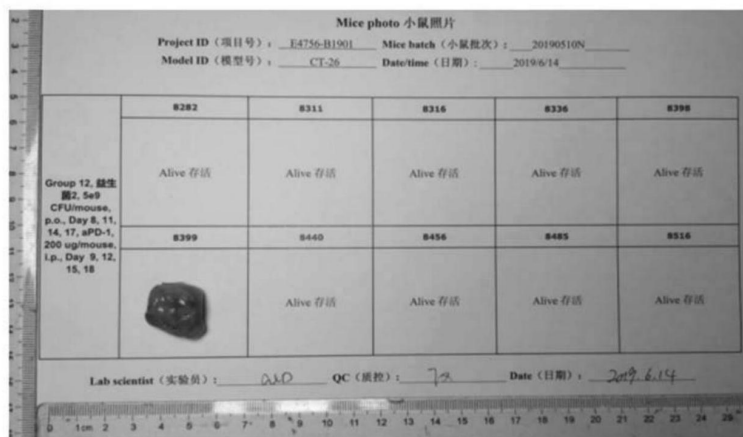
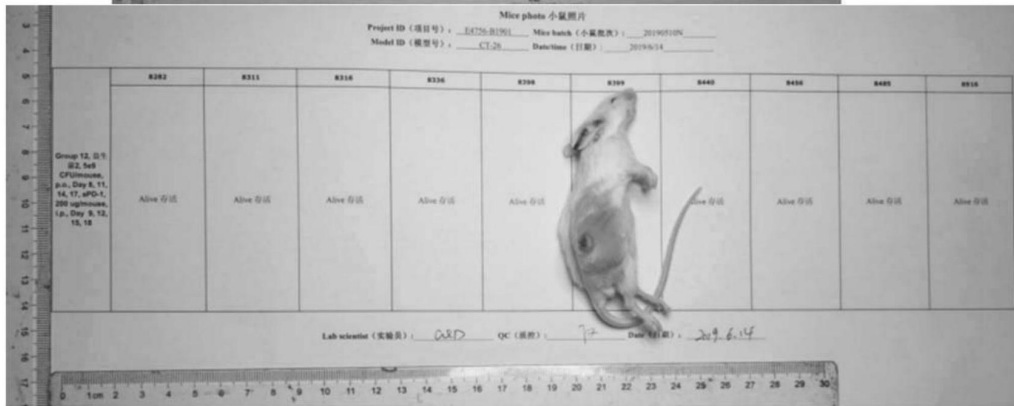
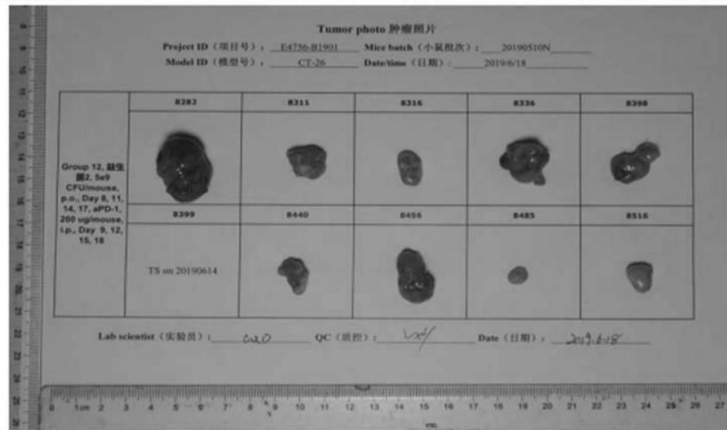
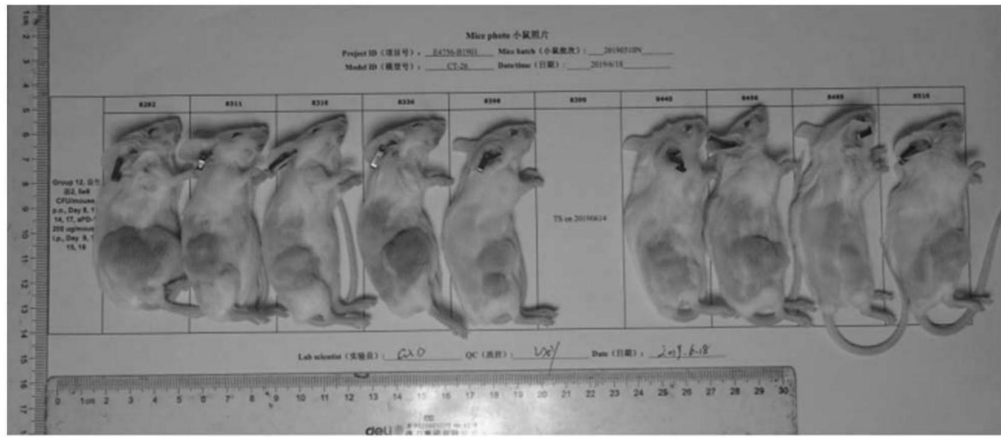


图5

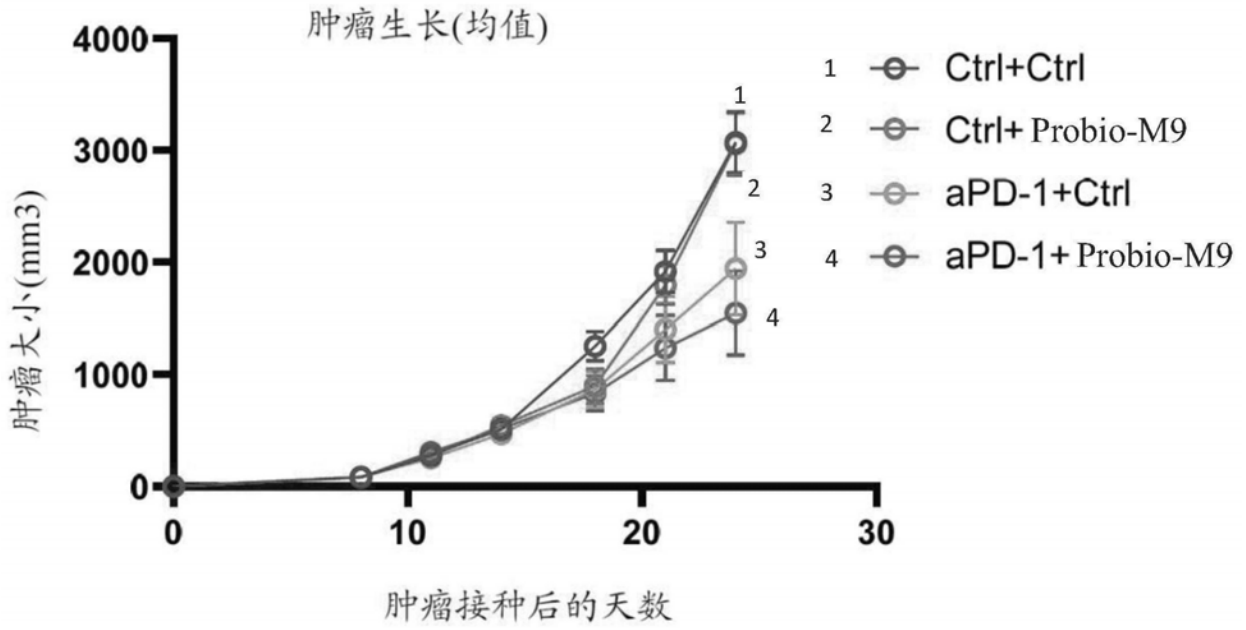


图6A

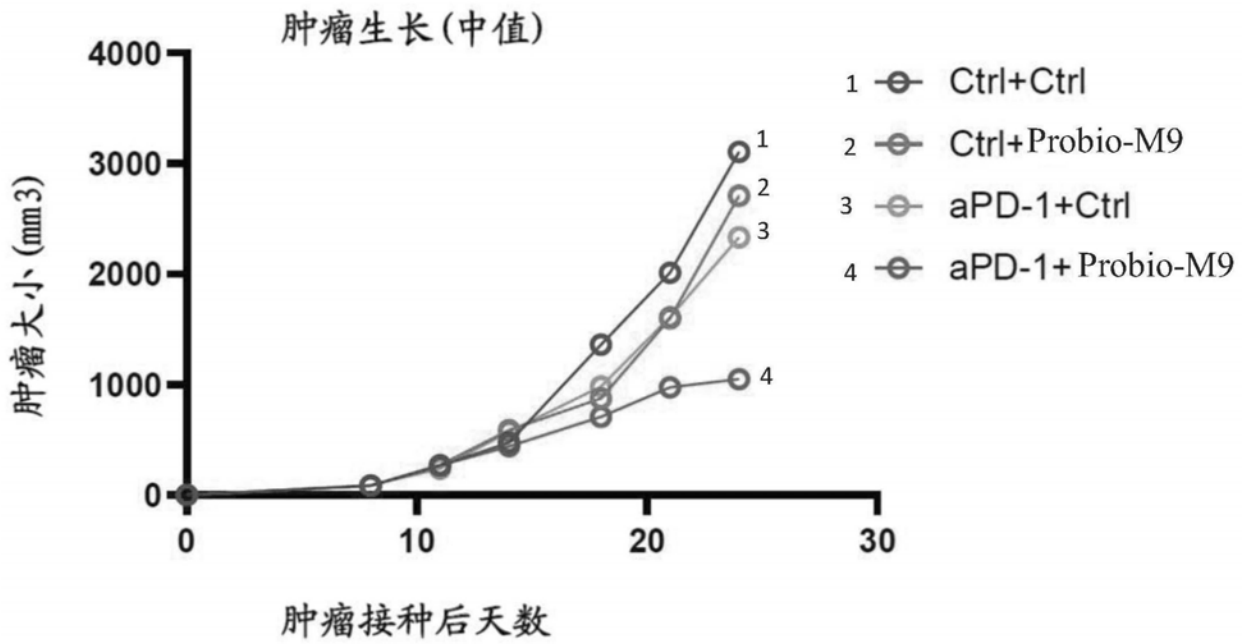


图6B

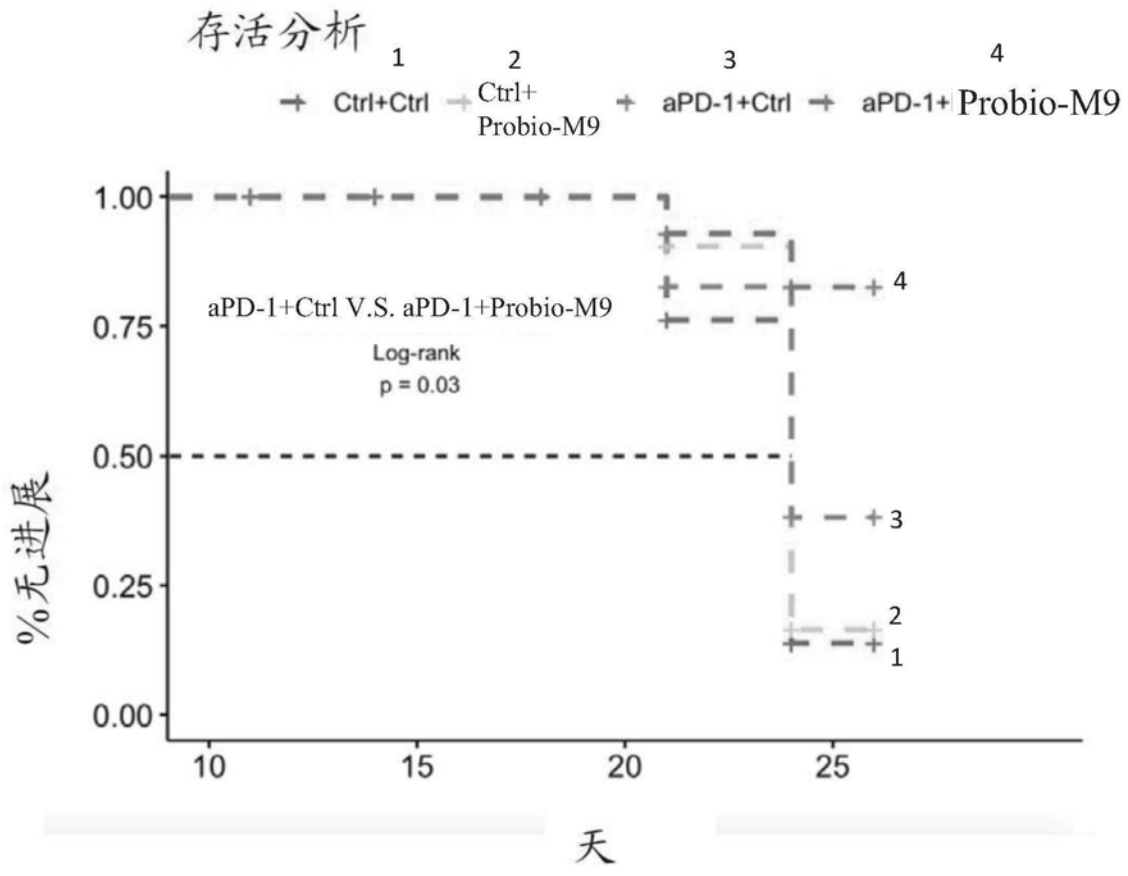


图6C

Probio-M9 上清对THP-1表达IL-6的影响

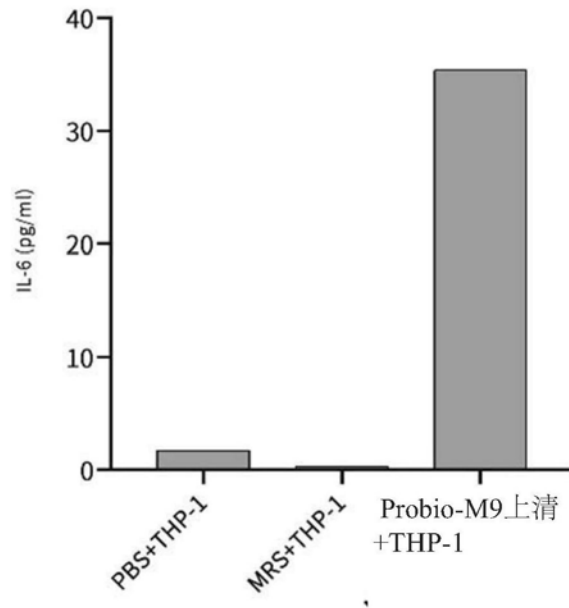


图7

Probio-M9 活菌对THP-1作用不同时间对其表达IL-6的影响

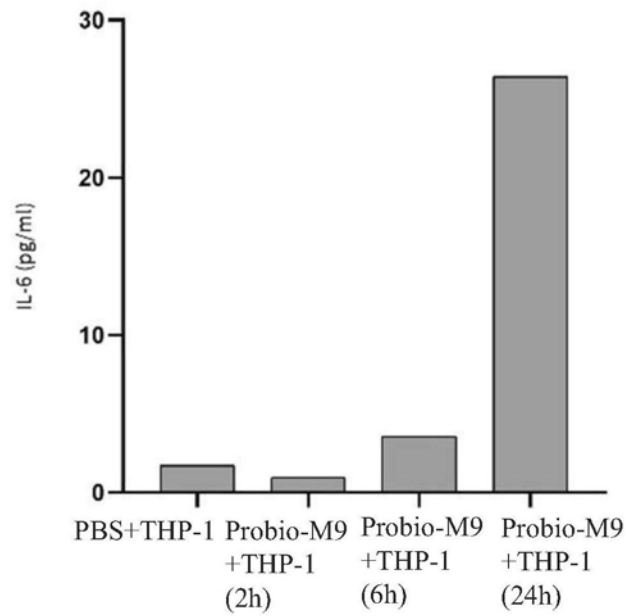


图8