

(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
2022 年 4 月 7 日 (07.04.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/068924 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 35/741 (2015.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61K 35/742 (2015.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01) A61P 5/00 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 36/064 (2006.01) A61K 35/12 (2015.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61K 36/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 36/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/122132

(22) 国际申请日: 2021 年 9 月 30 日 (30.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202011064448.1 2020 年 9 月 30 日 (30.09.2020) CN
202011059746.1 2020 年 9 月 30 日 (30.09.2020) CN
202111147464.1 2021 年 9 月 29 日 (29.09.2021) CN

(71) 申请人: 成都夸常奥普医疗科技有限公司 (CHENGDU KUACHANGAOPU MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国四川省成都市高新区天山路 59 号附 20 号 1 层, Sichuan 610000 (CN)。夸常股份有限公司 (KUACHANG INC.) [US/US]; 美国加利福尼亚州阿纳海姆鲍尔路 2858 号, California 92804 (US)。

(72) 发明人: 邹方霖 (ZOU, Fanglin); 中国四川省成都市桐梓林中路 1 号芳草地商务中心 5 楼, Sichuan

610041 (CN)。邹礼常 (ZOU, Lichang); 中国四川省成都市桐梓林中路 1 号芳草地商务中心 5 楼, Sichuan 610041 (CN)。王建霞 (WANG, Jian Xia); 中国四川省成都市桐梓林中路 1 号芳草地商务中心 5 楼, Sichuan 610041 (CN)。王艺羲 (WANG, Yixi); 中国四川省成都市桐梓林中路 1 号芳草地商务中心 5 楼, Sichuan 610041 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中联创和知识产权代理有限公司 (BEIJING ZLC INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市海淀区上地东路 1 号盈创动力大厦 E 座 802F, Beijing 100085 (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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

(54) Title: USE OF PROBIOTIC COMPONENT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING PROBIOTIC COMPONENT

(54) 发明名称: 益生菌组分的应用以及包含益生菌组分的药物组合物

(57) Abstract: Provided in the present invention are a new use of a probiotic component and a topical pharmaceutical composition containing the probiotic component, and the use of the probiotic component as an active ingredient that can provide a therapeutic effect in the preparation of a topical pharmaceutical composition for the treatment of local lesion diseases. The local drug of the present invention provides a completely new pharmacology, so as to realize chemical ablation-like topical treatment comprising local action (or local synergy) and/or immunotherapy comprising a secondary immune effect associated with the local action (or local synergy) which cannot be performed by means of the existing probiotic composition. Moreover, the local drug has almost completely non-toxic systemic safety and a significantly higher long-term efficacy, has a large potential in terms of rapidly growing tumors, large tumors and hypovascular tumors, and has no problems in terms of drug resistance, is convenient to prepare and has low costs.

(57) 摘要: 本发明提供了益生菌组分的一种新应用以及包含益生菌组分的局部药物组合物, 所述益生菌组分作为可提供治疗作用的活性成分在制备用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物中的应用。本发明所述的局部药物提供了全新的药理, 从而实现现有益生菌组合物未能进行的包含局部作用 (或局部协同作用) 的类化学消融局部治疗或/和包含与该局部作用 (或局部协同作用) 相关的次生免疫作用在内的免疫治疗; 同时几乎无毒的全身安全性和明显较高的长期疗效, 对快速生长瘤体、大瘤体和乏血供瘤体的巨大潜力, 且不存在耐药性问题、制备方便、成本低廉。

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))。

益生菌组分的应用以及包含益生菌组分的药物组合物

技术领域

本发明涉及药物制剂技术领域，特别涉及益生菌组分的一种新应用以及包含益生菌组分的药物组合物。

背景技术

从病变组织的角度看，实体肿瘤是局部病变疾病的代表性模型；它是一种具有瘤体症状的肿瘤疾病，瘤体包含瘤体组织，该组织包含肿瘤细胞还存在更大量的其它组成（有时亦被称作肿瘤细胞的微环境），例如其它多种细胞、多种细胞间质、多种管道等。以胰腺癌瘤体为例，胰腺癌细胞在瘤体中仅占约 30% 的体积。

细胞毒药物、化学消融剂是近百年来治疗实体肿瘤的常见药物。其中细胞毒药物通过瘤内给药虽然可提高其瘤内浓度，但其药效仅仅是在癌细胞抑制动力学预期范围（通常小于 200%）内略有提高；考虑到患者的顺应性，目前细胞毒药物基本都通过口服或静注的方式进行全身给药。而化学消融剂，通常不以肿瘤细胞破坏、而以瘤体组织破坏为药理特征，其瘤内给药的药效远大于其癌细胞抑制动力学预期范围，具有明显不同于全身给药的药理，如高纯度乙醇、高浓度酸化剂或碱化剂等；但存在刺激性大，长效性不高且介入体积和介入部位均非常受限，例如酸碱用量不超过 0.2ml/kg 以及对瘤体所在器官的限制、瘤体边缘消融受限等，因此已逐渐从临床上淡出。

近年来，以肿瘤疫苗、细胞过继疗法和免疫检查点抑制剂为代表的肿瘤免疫治疗方法有一些进展。这些治疗药物千差万别，但对患者基因特异性和肿瘤特异性均要求非常高，在普通动物实验中几乎观察不到给药组与阴性对照组瘤体残重之间的明显差异，临床上的适应症范围非常小。

世界卫生组织对益生菌的定义为：一种摄入充足数量时会赋予宿主某种健康益处的活的非致病性细菌。研究表明，益生菌可能有三种作用机制来支持其有益性：（1）与肠道上皮细胞结合竞争病原体附着位点或消耗其营养物质从而抑制致病菌的生长；（2）改善肠道屏障功能；（3）提高机体免疫功能。其中，益生菌提高机体免疫功能的研究尤其令人关注。有研究将酵母作为饲料添加剂用于增强猪的免疫功能（例如专利公开号：CN106387398A）。还有研究将灭活酵母菌用于增强免疫功能、抗菌和抗病毒（例如专利公开号：CN108524925A）。

现有技术中益生菌的抗肿瘤作用被认为主要与其细菌免疫原性有关。但该免疫原性并未显示出治疗性疫苗抗原所应有的治疗效应，因而目前主要被用于增强患者机体的免疫力。免疫异质性是肿瘤异质性的特征之一，该药理使益生菌的免疫增强仅对结直肠癌存在作用，显示出强烈的肿瘤特异性。因此，相对于其他药物，益生菌在动物实验中没有显示出有意义的瘤体生长抑制（抑瘤率 $\leq 15\%$ 或相对肿瘤增值率 $\geq 85\%$ ），所提供的这些抗肿瘤免疫增强作用十分有限，仅仅起到辅助治疗作用，远远达不到提供治疗作用。

开发益生菌的新药理来突破现有技术中仅提供免疫功能增强等预期，能够为临床治疗提供新的解决方案。

发明内容

有鉴于此，本发明旨在提出一种基于益生菌组分的新药理—即提供局部作用（或局部协同作用）及

其次生作用(或次生协同作用),从而制备的局部药物组合物,实现高效低毒,尤其是中长期内,以为临床提供各种选择。

益生菌组分作为可提供治疗作用的活性成分在制备用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物中的应用,其中所述治疗作用包括涉及局部作用(或局部协同作用)的局部治疗或/和与该局部作用(或局部协同作用)相关的免疫治疗。

优选的,其中所述药物组合物还包含能够与所述益生菌组分产生协同作用的化学活性成分,以及其中所述益生菌组分与所述化学活性成分的量比(益生菌组分重量浓度/共用物重量浓度)为(1-110)/(1-100)。

一种用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物,其包含可提供治疗作用的益生菌组分、以及药理学可接受的合适载体,但不包含专用于将血液渗透压增加至正常生理水平的盐或单糖,其中所述治疗作用包括涉及局部作用(或局部协同作用)的局部治疗或/和免疫治疗。

优选的,其还任选地包含能够与所述益生菌组分产生协同作用的化学活性成分。

一种用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物,其包含可提供治疗作用的益生菌组分、能够与所述益生菌组分产生协同作用的化学活性成分、和药理学可接受的合适载体,且所述益生菌组分与所述化学活性成分的量比(益生菌组分重量浓度/共用物重量浓度)为(1-110)/(1-100),其中所述治疗作用包括涉及局部作用(或局部协同作用)的局部治疗或/和免疫治疗。

优选的,其中所述益生菌组分为选自细菌免疫原性最小化的源于天然益生菌或其工程菌的制备物或该制备物的工程类似物,其中所述制备物优选为选自包括以下组及其衍生物之一或多种: 益生菌水溶性组分、益生菌半流体类组分、益生菌组分水不溶颗粒、灭活益生菌。

优选的,其中所述益生菌水溶性组分选自包括以下组及其衍生物之一或多种: 益生菌或破碎益生菌上清组分、益生菌抽提物、益生菌细胞内水溶性组分、益生菌细胞壁组分的水溶性成分或非水溶成分的水溶性衍生物;所述益生菌半流体类组分优选为选自其含水混合物可形成半流体类组合物的益生菌组分之一或多种,例如益生菌聚多糖及其类似物之一或多种;所述益生菌组分水不溶颗粒选自包括以下组及其衍生物之一或多种: 破碎益生菌沉淀组分、益生菌细胞壁聚多糖颗粒、益生菌细胞壁聚多糖纳米颗粒;所述灭活益生菌优选为选自并不限定其皆为完整菌体的灭活益生菌;

其中所述益生菌水溶性组分选自包括以下组及其衍生物之一或多种: 益生菌水溶性 β -葡聚糖、优选为选自纯度大于90%的水溶性 β -葡聚糖, 益生菌核糖核酸。

优选的,其中所述益生菌选自包括以下组之天然菌或/和工程菌的一种或多种: 益生芽孢杆菌、益生乳酸杆菌、益生双歧杆菌、益生真菌。

优选的,其中所述芽孢杆菌包括选自包括以下组之一或多种: 地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌;所述乳酸杆菌包括选自包括以下组之一或多种: 嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、短小乳杆菌和发酵乳杆菌;所述双歧杆菌包括选自包括以下组之一或多种: 长双歧杆菌、青春双歧杆菌、短双歧杆菌、屎肠球菌、粪链球菌;所述真菌包括选自包括以下组包括选自之一或多种: 酵母菌、布魯氏酵母菌,且其中所述酵母菌包括选自包括以下之一或多种: 酿酒酵母菌、德尔布有抱圆酵母菌、威克汉姆酵母菌、毕赤酵母菌、产阮假丝酵母、乳清酵母。

优选的，其中所述益生菌包括选自酿酒酵母菌或/和布鲁氏酵母菌。

优选的，其中所述合适载体为水；所述化学活性成分可溶于水，而所述益生菌组分为水不溶性的且为选自包括以下组中的一种或多种或其衍生物：灭活益生菌、益生菌组分水不溶颗粒、益生菌半流体类组分。

优选的，其中所述益生菌组分在该药物组合物中的浓度为 $>0.1\%$ 、 $\geq 0.25\%$ 、 $0.25-25\%$ 、优选为 $0.5-15\%$ 、更优选为 $1-15\%$ 或 $5-15\%$ 。

优选的，其中当所述益生菌组分包括所述灭活益生菌，则所述灭活益生菌在该药物组合物中的浓度为 $>0.3\%$ 、 $\geq 0.75\%$ 、 $0.75-15\%$ 、优选为 $1.5-15\%$ 或 $5-15\%$ ；当所述益生菌组分包括所述益生菌水溶性组分，则所述益生菌水溶性组分在该药物组合物中的浓度为 $>0.1\%$ 、或 $0.15-25\%$ 、优选为 $0.35-15\%$ 或 $5-15\%$ ；当所述益生菌组分包括所述益生菌水不溶组分颗粒，则所述益生菌水不溶组分颗粒在该药物组合物中的浓度为 $>0.5\%$ 、或 $0.5-15\%$ 、优选为 $1.5-15\%$ 或 $5-15\%$ ；当该药物组合物为半流体类组合物，则所述益生菌半流体类组分在该药物组合物中的浓度为 $>2.5\%$ 、 $2.6-25\%$ 、优选为 $5-15\%$ 。

优选的，其中所述化学活性成分为包括选自弱局部作用化合物和/或细胞毒药物之一或多种，以及其中当所述化学活性化合物包括细胞毒药物时，所述益生菌组分和细胞毒药物的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{细胞毒药物}}$ ）为 $(1-110)/(1-100)$ ；当所述化学活性化合物包括弱局部作用化合物时，所述益生菌组分和弱局部作用化合物的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{弱局部作用化合物}}$ ）为 $(1-90)/(1-100)$ 。

优选的，其中所述弱局部作用化合物选自包括以下组之一或多种：氨基酸类营养素、活体染料、奎宁类药物、低浓度酸化剂、低浓度碱化剂、包含酸化剂或/碱化剂的 pH 缓冲系统，以及其中当所述弱局部作用化合物包括所述氨基酸营养素时，所述益生菌组分和氨基酸营养素的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{氨基酸营养素}}$ ）为 $(1-20)/(1-100)$ ；当所述弱局部作用化合物包括所述活体染料时，所述益生菌组分和活体染料的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{活体染料}}$ ）为 $(7-90)/(1-100)$ ；当所述弱局部作用化合物包括所述奎宁类药物时，所述益生菌组分和奎宁类药物的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{奎宁类药物}}$ ）为 $(2-90)/(1-100)$ ；当所述弱局部作用化合物包括所述酸化剂或/和碱化剂时，所述益生菌组分和酸化剂或/和碱化剂的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{酸化剂或/和碱化剂}}$ ）为 $(2-60)/(1-100)$ 。

优选的，其中所述化学活性成分为选自活体染料和 1 种或多种其它所述化学活性成分。优选的，其中所述化学活性成分为选自所述细胞毒药物和活体染料。

优选的，其中所述氨基酸类营养素为选自包括以下组中的氨基酸或其盐或者包含或由以下氨基酸构成的寡肽和多肽：精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸，以及所述氨基酸类营养素的浓度为 $>2.5\%$ 、或 $5-30\%$ 、优选为 $5-25\%$ 。

优选的，其中所述活体染料为选自包括孟加拉红或/和以下亚甲蓝类染料之一或多种：亚甲蓝、专利蓝、异硫蓝、新亚甲蓝，且其中所述孟加拉红的浓度为 $2.5\%-20\%$ ；所述亚甲蓝类染料的浓度为 $\geq 0.25\%$ 、或 $0.25-2.5\%$ 、优选为 $0.5-2.5\%$ 。

优选的，其中所述酸化剂选自强酸或/和弱酸之一或多种，且所述益生菌组分与所述酸化剂的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{酸化剂}}$ ）为 $(1-20)/(0.5-50)$ ，以及所述酸化剂的浓度为 $\geq 0.5\%$ 、 $0.5-2\%$ （强酸）、或 $2-15\%$ （弱酸），其中所述强酸例如为盐酸；所述弱酸例如为乙二酸、乙酸、乳酸、柠

柠檬酸、苹果酸；所述碱化剂例如选自强碱或/和弱碱之一或多种，且所述益生菌组分与所述碱化剂的量比（益生菌组分重量浓度/碱化剂重量浓度）为（1-20）/（0.5-50），以及所述碱化剂的浓度为 $\geq 0.5\%$ 、0.5-5%（强碱）、或2-15%（弱碱），其中所述强碱例如为氢氧化钠、氢氧化钾；所述弱碱例如为磷酸二氢钠、碳酸氢钠、碳酸钠。

优选的，其中所述细胞毒药物包括选自包括以下组之一或多种：破坏DNA结构和功能的药物，例如环磷酰胺、卡莫司汀、金属铂络合物、多柔比星类药物、拓扑替康、伊立替康；嵌入DNA中干扰转录RNA的药物，例如抗肿瘤抗生素药物；干扰DNA合成的药物，例如5-氟尿嘧啶（5-Fu）、呋氟尿嘧啶、双呋氟尿嘧啶、阿糖胞苷、环胞苷、5-氮杂胞苷；影响蛋白质合成的药物，例如秋水仙碱类药物、长春碱类药物、紫杉烷类药物，且所述细胞毒药物的浓度为 $\geq 0.1\%$ 、0.1-15%。

优选的，其中所述药物组合物还任选地包含生物活性成分，其中所述生物活性成分选自包括以下组之一或多种：抗原、免疫调节类抗体、细胞因子、佐剂。

一种治疗局部病变疾病的方法，其包括以下步骤：向有此需要的个体的局部病变内或/和局部病变外局部施用治疗有效量的上述药物组合物。

优选得，其包括以下步骤：向所述个体的局部病变内、或局部病变内和局部病变外施用治疗有效量的所述药物组合物。

优选的，其还包括在施用所述药物组合物之前、期间或之后还任选进行一种或多种其它治疗，例如化疗、免疫疗法、放射疗法、手术、化学消融、物理消融。

优选的，其中所述益生菌组分在该药物组合物中的含量使得它的局部给药浓度为 $> 0.1\%$ 、 $\geq 0.25\%$ 、0.25-25%、优选为0.5-15%、更优选为1-15%或5-15%。

优选的，其中当所述益生菌组分包括所述灭活益生菌，则所述灭活益生菌在该药物组合物中的含量必须使得它的局部给药浓度为 $> 0.3\%$ 、 $\geq 0.75\%$ 、0.75-15、优选为1.5-15%或5-15%；当所述益生菌组分包括所述益生菌水溶性组分，则所述益生菌水溶性组分在该药物组合物中的含量必须使得它的局部给药浓度为 $> 0.1\%$ 、或0.15-25%、优选为0.35-15%或5-15%；当所述益生菌组分包括所述益生菌水不溶组分，则所述益生菌水不溶组分在该药物组合物中的含量必须使得它的局部给药浓度为 $> 0.5\%$ 、或0.5-15%、优选为1.5-15%或3.5-15%。

优选的，其中所述药物组合物的含量或单位含量使得其给药体积为以下系数乘以局部病变内靶区体积： > 0.1 、0.15-1.5、优选为0.23-1.5或0.5-1.5。

优选的，其中所述药物组合物的含量或单位含量使得其给药体积为 $\geq 1\text{ml}$ 、或局部病变内给药10-150ml或/和局部病变外给药1.5-50ml。

优选的，其中所述局部病变包含肿瘤细胞或/和成纤维细胞。

优选的，其中所述局部病变疾病包括肿瘤、非瘤肿大、局部炎症、分泌腺功能异常和皮肤病，其中所述肿瘤包括恶性和非恶性实体肿瘤。

优选的，其中所述实体肿瘤包括以下肿瘤及其次生肿瘤之一或多种：乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、肠癌、口腔癌、食道癌、胃癌、喉癌、睾丸癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、脑瘤、淋巴瘤。

优选的，其中所述局部作用（或局部协同作用）包括局部化学作用（或局部化学协同作用）和任选存在的其它作用；所述局部治疗包括一处或多处局部病变的类化学消融和任选存在的其它化疗；所述免疫治疗包括所述病变内或/和病变外所述局部作用（或局部协同作用）的次生免疫作用和任选存在的其它免疫作用。

优选的，其中所述治疗的适用患者选自包括以下组之一种或多种：免疫抑制患者、可局部病变内给药的患者、局部病变组织可类化学消融的患者、局部病变内可产生次生免疫物质的患者、病变外给药区域内可产生次生免疫物质的患者。

包含益生菌组分以及药理学可接受的合适载体的药物组合物，其是用于治疗局部病变疾病，其中所述局部病变疾病包括实体肿瘤。

药物试剂盒，其包括一个或多个装有上述的药物组合物的容器。优选的。所述药物试剂盒还可包括如何向有需要的个体施用所述药物组合物的说明书或标签。优选的其中所述施用包括在所述局部病变内施用，或者在局部病变内和局部病变外施用，其中所述局部病变外施用例如包括在所述个体的腋下皮下注射。

为达到上述目的，本发明的技术方案是这样实现的：一种用于治疗局部病变的局部用药，包含益生菌组分及药学上可接受的载体，所述益生菌组分的浓度为 0.25-25%。

优选的，所述局部用药还包括弱局部作用化合物和/或细胞毒药物，其中所述弱局部作用化合物的浓度为 1-20%，所述细胞毒药物的浓度为 1-5%。

优选的，所述局部用药的组成包括 0.25%-10%益生菌组分，还包括 0.1-2.5%细胞毒药物和/或 5-20%氨基酸类营养素和/或 0.5-1%活性染料。

优选的，所述局部用药的组成包括 0.5%-10%益生菌组分，还包括 0.5-1%亚甲蓝或者 5-20%赖氨酸或者 0.1-2.5%吉西他滨或 5-氟尿嘧啶；所述局部用药的组成包括 0.25-0.5%益生菌组分和 5-10%精氨酸。

所述局部用药的组成为 2.5%益生菌组分、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水；或者组成为 2.5%益生菌组分 2.5%、10%精氨酸，余量为注射用水；或者为 2.5%益生菌组分、1%5-氟尿嘧啶、10%精氨酸，余量为注射用水；或者组成为 5%热灭活布拉氏酵母菌、1%亚甲蓝，余量为注射用水；或者组成为 5%热灭活布拉氏酵母菌、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水；或者组成为 5%热灭活布拉氏酵母菌、1%5-氟尿嘧啶、1%亚甲蓝，余量为注射用水；或者组成为半流体组合物中的 7.5%β-葡聚糖、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水；或者组成为 5%破碎布拉氏酵母菌上清组分、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水；或者组成为 5%破碎布拉氏酵母菌、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水；或者组成为 5%热灭活布拉氏酵母菌、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水；或者组成为 5%β-葡聚糖、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶的水悬液经加热后降温处理形成的半流体；或者组成为 5%水溶性酿酒酵母菌 β-葡聚糖、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水；或者组成为 20%酿酒酵母菌核糖核酸、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶，余量为注射用水。优选的，所述局部用药的组成包括 10%益生菌组分、1%亚甲蓝、1%5-氟尿嘧啶。优选的，所述局部用药的组成包括 0.5%益生菌组分/7%碳酸氢钠/3%氢氧化钠或者 10%益生菌组分/0.7%碳酸氢钠/0.3%氢氧化钠。优选的，所述益生菌组分包括灭活益生菌、益生菌水溶性组分、益生菌水不溶组分颗粒、益生菌半流体类组分中的至少一种。优选的，所述益生菌包括芽孢杆菌、

乳酸杆菌、双歧杆菌、益生真菌中的至少一种。优选的，所述益生菌为布拉氏酵母菌。优选的，所述局部用药不含有渗透压调节剂、矫味剂。

相对于现有技术，本发明所述的局部用药具有以下优势：提供了一种全新的药理（局部作用或局部协同作用以及它们的次生免疫作用），从而可以进行现有益生菌组合物未能进行的包含类化学消融在内的局部治疗或/和包含次生免疫作用在内的免疫治疗，该局部治疗可以产生远远超过现有技术方案的疗效（例如 3 倍以上的抑瘤率）以及适应症（例如突破了现有技术中的肿瘤特异性限制，以及对患者免疫功能的依赖性限制），该免疫治疗也可以产生远远超过现有技术方案的免疫疗效（例如病变区内或/和病变区外所述次生免疫作用产生或大大加强的免疫疗效大大超过了机体免疫增强的预期）以及适应症。此外，本发明的实施方案还具有大大降低了不限定给药方式的现有技术方案的安全性风险。

根据本发明的实施方案与治疗局部病变疾病的其它组合物的现有技术相比具有以下优点：与现有细胞毒药物相比，显示出几乎无毒的全身安全性和明显较高的长期疗效；与现有分子靶向药物相比，显示出不那么苛刻的适应症筛选，以及针对快速生长瘤体、大瘤体和乏血供瘤体的巨大潜力；与现有化学消融剂相比，显示出明显低得多的局部刺激性以及更好的长期效应。本发明的应用和组合物也不受现有细胞毒性药物和现有分子靶向药物遭遇的耐药性问题的困扰。此外，该应用和组合物制备方便、成本便宜，特别有助于使难以承受高额费用的广大人群也享受到安全、有效治疗。

本发明还提供了上述的局部用药在制备用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物中的应用，其中所述治疗作用包括涉及局部作用（或局部协同作用）的局部治疗或/和免疫治疗作用。优选的，所述药物组合物的含量或单位含量使给药体积 $V_1 = (0.15-1.5) \times V_2$ ，优选为 $(0.23-1.5) \times V_2$ 或 $(0.5-1.5) \times V_2$ ，其中 V_2 为局部病变内靶区的体积。优选的，所述给药体积 V_1 为 1.5-150ml，或若局部病变内给药，则给药体积 V_1 为 10-150ml，若局部病变外给药，则给药体积 V_1 为 1.5-50ml。

优选的，所述局部病变包括肿瘤、非瘤肿大、局部炎症、分泌腺功能异常和皮肤病，其中所述肿瘤包括恶性和非恶性实体肿瘤。优选的，所述实体肿瘤为乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、肠癌、口腔癌、食道癌、胃癌、喉癌、睾丸癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、脑瘤、淋巴瘤中的一种。

本发明还提供了一种药物试剂盒，包括一个或多个装有上述药物组合物的容器。优选的，所述药物试剂盒还包括如何向有需要的个体施用所述药物组合物的说明书或标签。优选的，所述施用包括在所述局部病变内施用，或者在局部病变内和局部病变外施用，其中所述局部病变外施用为腋下皮下注射。

本发明还提供了一种治疗局部病变疾病的方法，包括向患者的局部病变内或向局部病变内和局部病变外施用治疗有效量的上述的药物组合物。优选的，所述在施用所述药物组合物前和/或中和/或后还进行化疗、免疫疗法、放射疗法、手术、化学消融、物理消融中的至少一种治疗。优选的，所述药物组合物经施用后，其中的益生菌组分的局部给药浓度为 0.25-25%、优选为 0.5-15%，更优选为 1-15% 或 5-15%。

优选的，所述患者为选自包括以下组之一或多种：免疫抑制患者、可局部病变内给药的患者、局部病变组织可类化学消融的患者、局部病变内可产生次生免疫物质的患者、病变外给药区域内可产生次生免疫物质的患者中的任意一种。

具体实施方式

需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。本申请中L-氨基酸均简写为氨基酸,如L-精氨酸简写为精氨酸。

若物质在特定条件下显示出治疗活性,这说明其作为活性成分可用于局部病变疾病的治疗。同一物质在不同条件下可显示出不同的活性或药理,例如乙醇通常被用作杀菌剂,而高浓度乙醇通过瘤内给药显示出对肿瘤组织的化学消融的药理。

发明人在荷瘤裸鼠实验中意外地发现,通常用作免疫增强剂的灭活益生菌居然可以在某些特定的条件下产生有意义的局部化学作用、甚至可能是类化学消融作用。所述特定条件并非现有技术中益生菌组分的应用条件,而是如以下所限定的。

本申请的一个发明目的是提供益生菌组分在制备用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物中的应用,所述益生菌组分可作为具有治疗作用的活性成分。下面对本申请中的相关术语进行说明:

术语“益生菌”(probiotics)是指能够对宿主健康产生有益作用的非致病性活细菌。术语“益生菌组分”是指源于天然益生菌或其工程菌的制备物(例如胞壁聚多糖)或该制备物的类似物。术语“类似物”是指与制备物具有类似活性的类似物质,包括制备物的衍生物(例如能够提高水溶性或活性的胞壁聚多糖衍生物)、合成物(例如类似于胞壁聚多糖的合成聚多糖)、类似于益生菌制备物的其它来源制备物(例如类似于胞壁聚多糖的其它来源聚多糖)。

术语“药物”或“药物组合物”是指包含活性组分并给出其在患者体内实现其药理所必须的药理方法、药理组成等药学特征的物质。术语“活性成分”是指可在特定条件下进行某特定药理的物质。术语“药理方法”是指为实现某特定药理所必须的给药方法,如益生菌肠道屏障改善的药理方法是口服。术语“药理组成”是指实现某特定药理所必须的药物组合物、尤其是进入靶区的药物组合物的组分构成。不同的药理通常需要不同的优选药理组成(活性成分、活性动力学条件、剂型条件、等等)。术语“活性动力学条件”是指使得活性成分实现某特定药理所必须满足的数量条件,同一个物质用作不同活性成分于是有可能需要满足不同动力学条件。术语“剂型条件”是指为保证活性成分实现特定药理所必须满足的药理反应环境条件,同一个物质用作不同活性成分于是有可能需要满足不同剂型条件。以包含益生菌及其组分的药物组合物为例,其在现有技术中用作全身性作用活性成分时以带药血液(含很多物质)进入靶区反应器,因而可以采用开放式组成(如口服剂型的矫味剂、常规注射剂中的渗透压调节剂、等等)的常规剂型;其在本发明中作为局部活性成分则对反应环境高度敏感,某些常用的添加剂(如以下实施例中常用作渗透压调节剂的氯化钠)可能对益生菌组分的局部活性产生负面作用,因而必须采用封闭式的药理剂型组成(优选为仅包含活性成分和溶媒)使得外源性干扰最小化。

术语“治疗药物”区别于“辅助(治疗)药物”,前者是指可提供治疗作用的药物,后者指提供辅助(治疗作用)的药物。术语“治疗作用”区别于辅助(治疗)作用,前者是指使得疾病有效缓解、好转或痊愈的主要药理作用(例如局部病变的局部治疗或/和免疫治疗),而后者是指虽不能有效缓解、好转或痊愈疾病但却也对患者有利的次要药理作用(例如机体的免疫增强)。治疗作用通常包括单独使用时具有明显疗效、或在与其它药物共用或结合其他治疗方法产生的明显疗效中提供主要或相等作用;而辅助(治疗)通常在单独使用时只提供虽有利但不明显的作用、或在与其它药物共用或结合其他治疗方法所产生的明显疗效中提供虽有利但非主要或同等的作用。术语“明显疗效”是指与经典化疗药物或

经典化学消融剂相比,使局部病变的生长或发展得到有效抑制,例如临床上对局部病变的病理有效率 $(PR+CR) \geq 30\%$,亦或者动物实验中的局部病变生长抑制有不可忽略的药理学意义,例如瘤体增值率 $\leq 85\%$ 或抑瘤率 $\geq 15\%$,优选为瘤体增值率 $\leq 60\%$ 或抑瘤率 $\geq 40\%$ 。用作不同活性成分的同一个物质于是可能提供完全不同的作用。以包含益生菌及其组分的药物组合物为例,其在现有技术中用作全身性作用活性成分时主要提供辅助作用,例如免疫增强作用通常不足以观察到抑瘤效果;其在本发明中作为局部活性成分则主要提供治疗作用。

术语“局部药物”或“局部用药”区别于“常规药物”或“常规用药”后者是指基于全身性作用药理的药物,而前者是指主要基于局部作用药理的药物,两者之间有以下区别:前者通常为治疗药物,而后者可以是治疗药物或辅助(治疗)药物,它们对适应症的作用有可能完全不同;前者的药理方法为局部、尤其是局部病变给药,而后者主要是常规给药(全身性给药),它们对给药副作用的关注有可能完全不同;前者的药理活性成分必须能提供局部作用,而后的药理活性成分必须能提供全身性作用,它们的优选方向可能完全相反;前者的药理动力学组成中的要素是给药浓度,而后者则关注给药剂量,它们的药剂浓度的含义可能完全不同;前者的药理剂型为局部给药剂型,而后的药理剂型为常规给药剂型,它们的药理剂型组成可能有完全不同的要求。

术语“局部给药”区别于常规给药(全身性给药),是指以产生局部作用为目的的任何给药方式,包括病变内给药或/和可产生局部治疗作用的病变外有利局部内给药(例如在可产生局部作用且有利于局部作用次生免疫作用的皮下注射);常规给药是指以产生全身性作用为目的的任何给药方式,包括将药物经消化道(例如口服)或血管(例如静脉注射、腹腔注射)给药后经血液递送至靶区的方式。术语“病变内给药”是指让药物直接进入而非以带药血液的方式间接进入局部病变的任何给药方式,如瘤内给药、局部病变内植入、局部病变涂抹、局部病变喷射、经皮下或经血管局部病变内注射、局部病变插入、等等。

术语“局部治疗”区别于“全身治疗”,后者是指主要利用带药血液的全身性药理(常规活性)针对患者全身病变(例如瘤体、瘤体联通的区域、体内其它部分所含肿瘤细胞)的治疗,而前者是指主要利用药物本身的局部作用药理(局部活性)针对患者局部病变所在的局部区域(例如给药局部病变及与其联通的其它病变区域)的治疗。现有技术中,所用的益生菌组分在治疗局部病变疾病的主要功能基于其作为异种抗原所能提供的治疗辅助作用(例如免疫增强作用)、而非治疗作用、更不是局部治疗作用。

术语“局部活性”区别于常规活性,局部活性可提供局部作用(局部协同作用)或/和与该局部作用(局部协同作用)相关的次生作用(中长效协同作用),而常规活性通常只提供全身性作用(例如细胞毒作用、免疫增强作用),它们是两种完全不同的药理活性。术语“局部作用”区别于常规作用,是指局部给药后药物在组织间隙渗透所及的局部(例如瘤或/和瘤外局部)范围内产生的药理作用、通常包括局部化学作用,而常规作用则是指常规用药后药物经消化道或血管给药后以血药形式递送至靶区所产生的药理作用。术语“局部化学作用”是指包括化学作用的局部作用。术语“局部协同作用”是指包括协同作用的局部作用。术语“局部化学协同作用”是指包括协同作用的局部化学作用。通过其次生作用(如次生的跨距效应),局部活性有时也会产生全身性效果。

本申请所述的局部化学作用(或局部化学协同作用)在药理上包括普通局部化学作用、化学消融和

类化学消融。术语“普通局部化学作用”是指药物效应不超过同一药物的常规化学作用的动力学差异最大预期（例如 200%以内）的局部化学作用，如细胞毒药物常规给药产生的化疗作用。术语“化学消融”是指药物效应超过同一药物的常规化学作用（例如高浓度乙醇常规给药产生的化疗作用）的动力学差异最大预期（例如大于 200%、优选为大于 400%）的局部化学作用，通常指经典化学消融剂（如高浓度乙醇、高浓度酸、高浓度碱）所显示的局部化学作用。术语“类化学消融”是指药物效应类似于化学消融（超常规作用预期）的局部作用。类化学消融虽非经典化学消融剂所致，但其在药理上明显区别于普通局部化学作用。

术语“次生作用”区别于术语“直接作用”，后者是指药物进入靶区后与药靶直接反应的作用（例如局部用药进入局部病变与病变组织发生的局部作用），而前者是指与后者有关但不相同、且产生时间上稍后的作用。

术语“免疫治疗”区别于术语“免疫增强”，前者是指其单独使用便可达到治疗作用的免疫作用（例如治疗疫苗、特异性抗体等的免疫作用），而后者是指单独使用不能达到治疗作用、但仍有辅助作用的免疫作用（例如免疫增强剂具有提高机体免疫功能的作用）。术语“次生免疫作用”区别于术语“药物抗原作用”，后者是指药物自身的抗原作用（例如任何药物作为外来物进入体内引起的抗原作用），而前者是指与给药相关的、但区别于药物抗原作用的免疫作用，例如药物局部化学作用导致的原位疫苗作用）。术语“原位次生免疫作用”区别于术语“非原位次生免疫作用”，前者是指病变（例如瘤体）内的次生免疫作用，而后者是指病变外（例如腋下皮内）的次生免疫作用。术语“次生免疫物质”是指在给药区域内由于局部给药形成的、且与所给药物本身不同的免疫物质，例如给药后因任何原因被释放、生成、激活、或/和募集的抗原、佐剂、或/和其它免疫分子。术语“原位次生免疫物质”区别于术语“非原位次生免疫物质”，前者是指是指病变（例如瘤体）内的次生免疫物质（例如原位抗原、原位佐剂、或/和病变内被释放、生成、激活、或/和募集的其它免疫分子），而后者是指病变外（例如腋下皮内）的次生免疫物质（例如给药处形成的结节性免疫物质、因该结节或/和给药处其它药物效应被释放、生成、激活、或/和募集的其它免疫分子、等等）。

术语“疫苗抗原”区别于术语“抗原”，后者是指能够诱发机体产生免疫应答的任何物质，而前者是指能够诱发机体产生针对特定疾病、且达到治疗作用的抗原，例如同一种物质可以通过大不相同的技术方案被用作疫苗抗原和免疫增强剂抗原。术语“佐剂”是指在疫苗中可以增强其抗原的免疫治疗作用的物质。术语“原位抗原”是指可作为抗原的原位次生免疫物质。术语“类疫苗药物”或“类疫苗”，是指可提供类似于疫苗作用的次生免疫作用（区别于免疫增强剂和常规疫苗）和任选存在的外源性抗原作用的治疗药物。

在本发明的范围内，所述益生菌组分与所述能够与该益生菌组分产生协同作用的化学活性成分和/或生物活性成分一起局部给药。在一个实施方案中，所述益生菌组分与所述共用活性成分包含在同一个药剂中。

术语“协同作用”是指特定的活性成分（如本申请的益生菌组分）在特定条件下（如可提供最小化细菌免疫作用的药理组分优选和最小化局部作用的药理浓度优选）与另一些活性成分（如弱局部作用化合物和/或细胞毒药物）的共用的作用效果（如短期药效和/或中长期药效）超过各自单独使用的作用效果

的加和预期。术语“局部协同作用”是指包括协同作用的局部作用。术语“局部化学协同作用”是指包括协同作用的局部化学作用。

术语“量比”是指多个活性成分（如本申请的益生菌组分及其共用物）在同一个组合物中的重量比。术语“浓度比”是指多个活性成分（如本申请的益生菌组分及其共用物）在同一个组合物中的浓度比。

所述治疗的适用患者选自包括以下组之一或多种：免疫抑制患者（如免疫能力低的患者、老年患者）、可局部病变内给药的患者、局部病变组织可类化学消融的患者、局部病变内可产生次生免疫物质的患者、病变外给药区域内可产生次生免疫物质的患者。

所述“免疫抑制患者”是指荷瘤裸小鼠模型所能代表的任何患者，例如其免疫功能因任何原因处于较低水平、且在本发明技术方案中的组合物可提供局部作用的时间内（例如以下实施例2中第一次给药7日内）利用其它方法（如免疫增强）不能达到正常水平的患者例如因免疫为低下而难以进行放疗或常规化疗的患者。

所述治疗作用包括涉及所述局部作用（或局部协同作用）的局部治疗或/和免疫治疗。所述免疫治疗包括在所述病变内和/或病变外所述局部作用（或局部协同作用）的次生免疫作用和任选存在的其它免疫作用；所述局部治疗包括一处或多处局部病变的类化学消融和任选存在的其它化疗。优选的，所述药物组合物为类化学消融-原位和非原位免疫治疗药物，所述患者选自可局部病变内给药且该局部病变组织可类化学消融或/和该局部病变内可产生次生免疫作用的患者、病变外给药区域内可产生次生免疫作用的患者中的一种或多种。所述药物组合物为类化学消融药物或者原位免疫治疗药物，所述原位免疫治疗药物可以是提供病变内靶区原位疫苗激活和任选存在的其它免疫作用的免疫治疗药物；所述药物组合物也可以是可提供病变外次生免疫作用和任选存在的其它免疫作用的免疫治疗药物，如类疫苗药物。所述病变外次生免疫作用包括所述局部作用（或局部协同作用）次生的非正常结构（例如结节）的免疫作用。

所述益生菌组分可提供局部作用、局部作用的次生作用、局部给药的免疫作用中的至少一种作用，其中所述局部作用的次生作用包括给药区域内次生的免疫物质参与的免疫作用。

所述益生菌组分选自益生菌水溶性组分、益生菌半流体类组分、益生菌组分水不溶颗粒、灭活益生菌中的一种或多种，且细菌免疫原性低。作为本发明的一个示例，所述益生菌组分选自益生菌水溶性组分和/或及其工程类似物以及所述组合物为溶液组合物。在一个实施方案中，所述益生菌组分选自益生菌组分水不溶颗粒、或/和灭活益生菌以及所述组合物为悬浊液组合物。在一个实施方案中，所述益生菌组分选自益生菌半流体类组分以及所述组合物为半流体类组合物。在一个实施方案中，所述组合物优选为半流体类组合物或水溶液组合物、更优选为半流体类组合物。

所述“细菌免疫原性”是指细菌作为一个完整的外来物体在受者体内产生免疫响应的能力，不同的细菌具有不同的细菌免疫原性。活益生菌具有最强的细菌免疫原性，但直接进入体内也有很强的安全性风险。所述“灭活益生菌”是指经如高温灭活、高温高压灭活、紫外线灭活、化学试剂灭活、辐射灭活等灭活处理后获得的制备物。所述“益生菌水不溶组分”是指来源于益生菌获得的水溶度为 $<0.1\%$ 的任意组分，所述“益生菌水溶性组分”是指来源于益生菌获得的水溶度 $\geq 0.1\%$ 的任意组分，所述“破碎益生菌”是指益生菌经破碎工程处理后获得的混合物，所述“破碎益生菌沉淀组分”是指自破碎益生菌分

离（如过滤或/和离心）出的水不溶沉淀、其进一步分离组分及其类似物。术语“破碎益生菌上清组分”是指自破碎益生菌分离（如过滤和/或离心）出的上清液、其进一步分离组分及其类似物。术语“益生菌细胞壁聚多糖”是指细胞壁所含聚多糖及其类似物，如 β -葡聚糖。术语“益生菌半流体类组分”是指为本发明的组合物提供半流体类形态的益生菌组分。

术语“半流体类”是指液体和半固体之间的这样一类物理形态，其包括半流体及其类似物。术语“半流体”是指在室温下限时内（例如 20 秒）无外压则无肉眼可见的流动、而在临床（施用）可接受的外压（例如可施加在注射器推进装置上的外压）下可以流动并导致不可逆形变的物体，其区别于液体（无外压时亦有流动性）和半固体（在临床可接受的外压下仅发生可逆形变）。术语“半流体类似物”是指液体（悬浊液）和半流体之间的、与半流体接近的一种物理形态，其在室温下静止约 1 分钟时不出现、而悬浊液出现明显分层；其在室温下无外压时约 1 分钟以内可出现、而半流体不会出现肉眼可见的流动。悬浊液有可能转变为半流体类物体，如 5% β -葡聚糖加水混合为悬浊液，5% β -葡聚糖水悬浊液可加热制备为半流体类似物，而 5% β -葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水悬浊液可加热制备为半流体。

所述益生菌水溶性组分选自破碎益生菌上清组分、益生菌抽提物、益生菌细胞内水溶性组分中的至少一种。所述益生菌半流体类组分选自其含水混合物可形成（如通过加热后冷却、碱化等形成）半流体类组合物的益生菌组分之一或多种，如多聚糖及其类似物。

所述益生菌水不溶颗粒选自：破碎益生菌沉淀组分、益生菌细胞壁聚多糖颗粒、益生菌细胞壁聚多糖纳米颗粒中的至少一种。所述灭活益生菌并不限定其皆为完整菌体的灭活益生菌，如灭活益生菌中不完整菌体的量比 $>20\%$ 或 $>30\%$ ，或完整菌体的数量 $<10^5$ 个/ml 或 $<0.5 \times 10^5$ 个/ml。

所述益生菌选自芽孢杆菌、乳酸菌、双歧杆菌、真菌中的至少一种，其可以是天然菌或工程菌。所述芽孢杆菌为蜡样芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌中的一种或多种。所述乳酸菌为乳酸杆菌和/或双歧杆菌，其中所述乳酸杆菌选自嗜酸乳杆菌、唾液乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、短小乳杆菌和发酵乳杆菌中的至少一种。所述双歧杆菌包括长双歧杆菌、青春双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、布魯氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、嗜热乳杆菌、屎肠球菌、粪链球菌中的至少一种。所述真菌包括酵母菌和/或布魯氏酵母菌，其中所述酵母菌包括酿酒酵母菌、德尔布有抱圆酵母菌、假丝酵母菌、威克汉姆酵母菌、毕赤酵母菌、白球拟酵母菌、薛瓦酵母菌、深红酵母菌、粟酒裂殖酵母菌、鲍氏酵母菌、产阮假丝酵母中的至少一种。

所述益生菌组分提供上述治疗作用所需的药理组成满足使该益生菌组分提供所述作用所需的药理浓度（局部给药浓度）为 $>0.1\%$ 、 $\geq 0.25\%$ 、 $0.25-25\%$ 、优选为 $0.5-15\%$ 、更优选为 $1-15\%$ 或 $5-15\%$ 。

术语“浓度”是特定组分在药物中的重量-体积百分比浓度(w/v)。术语“药理浓度”是指指定组分为达成其特定药理反应所必须的进入靶区浓度，例如病变内初浓度。术语“制剂浓度”是指指定组分在药物制剂形态（例如注射剂或灌注液）中的浓度。术语“给药浓度”是指指定组分在药物制剂的给药形态（例如制剂的稀释液）中的浓度。术语“病变内初浓度”是指药物进入病变时指定组分在含药介质（例如含药血液）中的浓度。即使本发明组合物的益生菌组分给药浓度与常规注射剂中的益生菌组分给药浓度相同，它们各自药理（局部化学作用 vs 免疫增强作用）所必须的瘤内初浓度也可以大不相同。而本发明

的应用、组合物及方法的技术方案特征之一，是要保障所述作用、尤其是局部化学作用所需的药理浓度（局部给药浓度）。

本申请所述组合物中益生菌组分的给药浓度即使与常规注射剂中益生菌组分的给药浓度相同，但它们的各自药理（局部化学作用 vs 免疫增强作用）所必须的病变内初浓度也可以大不相同。而本发明的应用、组合物及方法的技术方案特征之一是保障所述作用、尤其是局部化学作用所需的局部初浓度（局部给药浓度）。本申请中药物组合物中益生菌组分的局部给药浓度，通常是注射器、穿刺器、灌注导管等给药器械终点（如针孔、导管出口等）的药物中的益生菌组分的浓度。对注射用粉针剂而言，所述给药浓度即为干粉和液体载体的混合后益生菌组分的浓度。

术语“靶”是指药理的主要目标，如细胞毒药物针对肿瘤细胞，免疫调节药物针对免疫系统的调节因子，化学消融剂针对瘤组织等。术语“靶区”是指给药时针对靶所在的空间范围，如瘤体或其一部分。例如，当瘤体直径较小，所需一次给药剂量在临床上可行时，靶区是作为本次治疗目标的一个瘤体；或当瘤体直径较大，所需一次给药剂量在临床上不可行时，靶区是作为本次治疗目标的瘤体中的一部分。

当用于治疗患者时，所述组合物的组成或单位组成必须满足使得该益生菌组分提供所述作用所需的药理体积条件，其中所述药理体积（局部给药体积） $\geq 1\text{ml}$ 、或局部病变内给药 10-150ml 或/和局部病变外给药 1.5-50ml。作为本发明的应用、组合物及方法的技术方案特征之一，该超常规的体积给药尤其是所述益生菌组分的局部作用所需。

所述组合物的组成要求除协同物外的其它组分的最小化，从而满足提供所述局部作用所需的局部药理环境条件优选不含常规组合物中药剂学和/或给药安全性所需的非活性成分，如口服制剂中的固体赋形剂、调味剂及常规注射剂中的渗透压提高剂。

在一个实施方案中，所述药物组合物的载体为水，共用物可溶于水且所述益生菌组分为益生菌水溶性组分或者是灭活益生菌、益生菌组分水不溶颗粒、益生菌半流体类组分中的一种或多种或其衍生物水不溶性组分。在一个实施方案中，所述药物组合物的载体为水，所述共用物和/或难溶于水，而所述益生菌组分为益生菌半流体类组分。

优选的，本申请中所述的化学活性成分选自弱局部作用化合物和/或细胞毒药物，如所述共用物为至少两种化学活性成分。若所述化学活性成分为细胞毒药物时，所述益生菌组分和细胞毒药物的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{细胞毒药物}}$ ）为 $(1-110)/(1-100)$ ，若所述化学活性化合物为弱局部作用化合物时，所述益生菌组分和弱局部作用化合物的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{弱局部作用化合物}}$ ）为 $(1-90)/(1-100)$ 。

术语“化学活性成分”是指任何可提供化学作用的活性成分，包括细胞毒药物和局部化学成分。术语“局部化学成分”是指任何在局部给药时可提供局部化学作用的活性成分。术语“弱局部作用化合物”是指在特定条件（如用作共用物的浓度）下局部作用低于经典化学消融剂的化学活性成分。所述弱局部作用化合物包括：氨基酸类营养素、活体染料、奎宁类药物、低浓度酸化剂、低浓度碱化剂、包含酸化剂或/碱化剂的 pH 缓冲系统。所述共用物可以是活体染料和至少一种其它化学活性成分，也可以是活体染料和细胞毒药物，或者活体染料和氨基酸类营养素，亦或者细胞毒药物和至少一种其他化学活性成分。

若所述弱局部作用化合物为氨基酸营养素时，则所述益生菌组分和氨基酸营养素的量比（ $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{氨基酸营养素}}$ ）为 $(1-20)/(1-100)$ ；若所述弱局部作用化合物为活体染料时，则所述益生菌组分和活

体染料的质量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{活体染料}}$) 为 (7-90) / (1-100) ; 若所述弱局部作用化合物为奎宁类药物时, 则益生菌组分和奎宁类药物的质量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{奎宁类药物}}$) 为 (2-90) / (1-100) ; 若所述弱局部作用化合物为酸化剂和/或碱化剂时, 则所述益生菌组分和酸化剂和/或碱化剂的质量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{酸化剂和/或碱化剂}}$) 为 (2-60) / (1-100) 。

术语“氨基酸类营养素”是指具有营养保健效应的氨基酸类化合物, 优选为官方药典或指南所载的氨基酸类营养药或具有营养保健作用的氨基酸类辅料。所述氨基酸类营养素包括氨基酸、氨基酸盐、寡肽和多肽。优选的, 所述氨基酸类营养素包括以下组中的氨基酸或其盐或由以下氨基酸构成的寡肽和多肽: 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、 β -丙氨酸、牛磺酸、 γ -氨基丁酸 (GABA)、茶氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸。优选的, 所述氨基酸类营养素包括以下组中的氨基酸或其盐或者包含或由以下氨基酸构成的寡肽和多肽: 精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸。在一个实施方案中, 所述氨基酸类营养素的浓度 $> 2.5\%$ 、或 $5-30\%$ 、优选为 $5-25\%$ 。

术语“活体染料”是指进入动物活体组织后能够使组织、细胞、亚细胞单元等结构上色、但对动物整体没有不可接受的危害性的芳香化合物染料。所述活体染料包括亚甲蓝、专利蓝、异硫蓝、孟加拉红、甲苯胺蓝、台盼蓝、碱性蓝、伊红、碱性品红、结晶紫、龙胆紫、中性红、詹纳斯绿 B、番红中的至少一种。优选的, 所述活体染料为亚甲蓝类染料, 如亚甲蓝、专利蓝、异硫蓝、新亚甲蓝。在一个实施方案中, 所述活体染料的浓度 $\geq 0.25\%$ 、或 $0.25-10\%$ 、优选为 $0.25-1.5\%$ 或 $2.5-10\%$ 。优选的, 所述活体染料为亚甲蓝类染料, 其浓度 (w/v) $\geq 0.35\%$ 、优选为 $0.35-2.5\%$ 、更优选为 $0.35-1.5\%$ 或 $0.5-1\%$ 。在一个实施方案中, 所述活体染料为孟加拉红, 浓度 (w/v) 为 $1-10\%$ 。

所述奎宁类化合物包括奎宁、一盐酸奎宁、二盐酸奎宁中的至少一种, 其浓度 $\geq 0.5\%$ 、或 $0.5-5\%$ 、优选为 $1.5-5\%$ 或 $1.5-3\%$ 。术语“酸化剂”是指在药物制备中主要用作辅料、更具体讲用作 pH 调节的酸, 其在使用时除提供酸性外通常并不引入特殊的生物活性; 优选为经各国官方主管行政部门批准、或经各国官方药典或指南载入的强酸和/或弱酸。所述强酸可以是盐酸、硫酸、硝酸、高氯酸、硒酸、氢溴酸、氢碘酸、氯酸等, 优选为盐酸。所述弱酸可以是碳酸、硼酸、乙酸、磷酸、亚硫酸、丙酮酸、草酸、酒石酸、亚硝酸等, 优选为乙酸。在一个实施方案中, 所述益生菌组分与所述酸化剂的质量比-即重量浓度 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{酸化剂}}$) 为 (1-20) / (0.5-50)。在一个实施方案中, 所述酸化剂的浓度 $\geq 0.5\%$ 、 $0.5-2\%$ (强酸) 或者 $2-15\%$ (弱酸)。

在一个实施方案中, 所述益生菌组分与所述碱化剂的质量比 (益生菌组分重量浓度/碱化剂重量浓度) 为 (1-20) / (0.5-50)。在一个实施方案中, 所述碱化剂的浓度为 $\geq 0.5\%$ 、 $0.5-5\%$ (强碱)、或/和 $2-15\%$ (弱碱)。术语“碱化剂”是指在药物制备中主要用作辅料、更具体讲用作 pH 调节的碱性化合物; 优选为选自经各国官方主管行政部门批准、或经各国官方药典或指南载入的碱化剂, 包括强碱和弱碱。所述强碱为碱金属氢氧化物或/和有机强碱, 其在药物组合物中的浓度 (w/v) $\geq 0.5\%$ 、优选为 $0.5-7.5\%$ 或 $0.75-7.5\%$ 。优选的, 所述强碱为氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙等碱金属氢氧化物, 更优选为氢氧化钠。所述弱碱包括多元弱酸酸式无机盐、多元弱酸碱式无机盐、含氮弱碱, 其中多元弱酸酸式无机盐包括磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸氢钙、氢硫酸钠, 优选为碳酸氢钠。在一个实

施方案中，所述多元弱酸酸式无机盐在所述药物组合物中的浓度(w/v) $\geq 1\%$ 、优选为 2-10%或 3-10%。

所述多元弱酸碱式无机盐包括磷酸钠、碳酸钠、碳酸钾、硼砂，优选为碳酸钠；所述多元弱酸碱式无机盐在所述药物组合物中的浓度(w/v) $\geq 1\%$ 、优选为 2-10%或 3-10%。所述含氮弱碱包括氨水、氯化氨、2-氨基乙醇、氨丁三醇、三乙醇胺、三羟甲基氨基甲烷、2-氨基乙醇、氨丁三醇、三乙醇胺、葡甲胺、葡乙胺；所述含氮弱碱在所述药物组合物中的浓度(w/v) $\geq 2\%$ 、优选为 2-35%或 3-35%。所述碱化剂可以是氢氧化钠和碳酸氢钠，且二者在所述药物组合物中的浓度(w/v) 分别为 2-5%、3-10%。所述碱化剂也可以是碳酸钠和碳酸氢钠，且二者在所述药物组合物中的浓度(w/v) 分别为 3-10%、3-10%。优选的，所述药物组合物包含酸化剂或/和碱化剂且具有 pH 缓冲能力。

所述化学活性成分包括至少一种细胞毒药物，所述细胞毒药物包括抗肿瘤药物活性成分；其中所述抗肿瘤药物活性成分的浓度 $\geq 0.1\%$ 、0.1-15%。

术语“细胞毒药物”指主要以病变细胞或病变细胞内结构为靶实现其药物效应的活性成分，如常规化疗药物。术语“常规化疗药物”是指在安全剂量下可以通过常规用药有效治疗局部病变疾病的药物，优选为各国官方主管行政部门（例如 FDA 或中国药监局）已批准或将批准、或经各国官方药典已载入或将载入的常规化疗药物（如抗肿瘤药物）。

所述抗肿瘤药物活性成分可以为选自 1) 破坏 DNA 结构和功能的药物，如 a) 环磷酰胺、卡莫司汀等烷化剂；b) 金属铂络合物，如顺铂、卡铂等；c) DNA 拓扑异构酶抑制剂，如多柔比星类、拓扑替康、伊立替康等；2)、嵌入 DNA 中干扰转录 RNA 的药物，如抗肿瘤抗生素，如放线菌素类、柔红霉素、多柔比星等、3) 干扰 DNA 合成的药物，包括 a) 嘧啶拮抗物，如 5-氟尿嘧啶、呋氟尿嘧啶、双呋氟尿嘧啶，胞嘧啶衍生物阿糖胞苷、环胞苷、5-氮杂胞苷等尿嘧啶衍生物、b) 溶癌呤、硫鸟嘌呤等嘌呤拮抗物、c) 甲氨蝶呤等叶酸拮抗物；4) 影响蛋白质合成的药物，如秋水仙碱类、长春碱类以及紫杉醇、多西紫杉等紫杉烷类。

所述抗肿瘤药物活性成分包括尿嘧啶衍生物类、环磷酰胺类、吉西他滨类、表柔比星类、抗肿瘤抗生素类、替尼泊苷、金属铂络合物、紫杉烷类中的至少一种；优选的，抗肿瘤药物活性成分选自 5-氟尿嘧啶、环磷酰胺、吉西他滨、表柔比星、抗肿瘤抗生素、替尼泊苷、金属铂络合物、紫杉醇中的至少一种。

抗肿瘤药物活性成分可以是环磷酰胺、卡莫司汀等烷化剂，且在所述药物组合物中的浓度(w/v) 为 0.5-6%、优选为 0.75-1.5%；也可以是顺铂、卡铂等金属铂络合物，且在所述药物组合物中的浓度(w/v) 为 0.03-0.15%、优选为 0.05-0.15%；或者是多柔比星类、拓扑替康、伊立替康等 DNA 拓扑异构酶抑制剂，且在所述药物组合物中的浓度(w/v) 为 0.05-0.20%、优选为 0.075-0.15%；或者是放线菌素类、柔红霉素等抗肿瘤抗生素，且在所述药物组合物中的浓度(w/v) 为 1-4%、优选为 1-2%；或者是尿嘧啶衍生物 5-氟尿嘧啶、呋氟尿嘧啶、双呋氟尿嘧啶，胞嘧啶衍生物阿糖胞苷、环胞苷、5-氮杂胞苷等嘧啶拮抗物，且在所述药物组合物中的浓度(w/v) 浓度为 0.5-2%、优选为 0.75-1.5%。

优选的，所述药物组合物包含生物活性成分，所述生物活性成分包括抗原、免疫调节类抗体、细胞因子、佐剂中的至少一种。所述抗原为微生物抗原或肿瘤抗原，其中所述微生物抗原包括 1) 化脓性链球菌、豁质沙雷菌、卡介苗、破伤风梭菌、丁酸梭菌、嗜酸乳杆菌等非益生菌细菌；2) 乙肝病毒、

腺病毒、单纯疱疹病毒、牛痘病毒、腮腺炎病毒、新城鸡瘟病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、西尼卡谷病毒、柯萨奇病毒、呼肠孤病毒等病毒；3) 疟原虫等寄生虫；所述肿瘤抗原选自乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、肠癌、口腔癌、胃癌、结直肠癌、支气管癌、喉癌、睾丸癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤、脑瘤、肾细胞癌、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤中的至少一种；所述免疫调节类抗体包括 1) 针对抑制性受体的抗体阻断剂，如 CTLA-4 分子和 PD-1 分子的阻断性抗体；2) 针对抑制性受体的配体的抗体阻断剂、针对免疫反应细胞表面刺激分子的激活性抗体，如抗 OX40 抗体、抗 CD137 抗体、抗 4-1BB 抗体；3) 针对局部病变疾病微环境中免疫抑制性分子的中和抗体，如抗 TGF- β 1 抗体。所述细胞细胞包括肿瘤坏死因子、干扰素、白介素。

优选的，本申请所述药物组合物的剂型为局部给药剂型，所述药物组合物可以是包含益生菌组分、且满足使得所述益生菌组分提供所需作用的必需条件的任何局部给药剂型，例如注射剂、涂抹剂或膏剂。

术语“注射剂”是指含活性成分和液体载体并供体内给药的无菌制剂，按给药方式分为局部注射剂、静脉注射剂等，局部注射剂只有在给定局部给药浓度后方可作为局部注射剂使用；按商品形式分为液体注射剂、半流体注射剂、注射用粉针剂等，其中注射用粉针剂包含无菌干粉和溶媒，无菌干粉中包含部分或全部活性成分，溶媒中包含全部液体载体。注射剂中所述活性成分的浓度均为其与全部所述液体载体的混合物中的活性成分浓度，通常是注射器、穿刺器、注入导管等局部给药器械终点（例如针孔、导管出口等）的液体药物中的活性成分浓度。对粉针剂而言，所述活性成分的浓度即为无菌干粉和溶媒的混合物（如复溶液或所述药物学可接受的液体载体）中的活性成分浓度。

优选的，本申请所述药物组合物还包含赋形剂，例如分散介质、防腐剂、稳定剂、湿润剂和/或乳化剂、增溶剂、增粘剂等，其中所述增粘剂可以为羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶，所述防腐剂可以是抗坏血酸等抗氧化剂。优选的，本申请所述药物组合物还包含碘化油等示踪剂。

本申请还提供了一种药物试剂盒，其包括一个或多个装有根据本申请公开的药物组合物的单独容器，其中所述单独容器可以是瓶、小玻璃瓶等。优选的，所述药物试剂盒还包括如何向有需要的个体施用所述药物组合物的说明书或标签。所述施用包括在所述局部病变内施用，或者在局部病变内和局部病变外施用，所述局部病变外施用例如腋下皮下注射。在施用时，所述药物组合物的施用量与所述局部病变内靶区体积之比 >0.1 、 $0.15-1.5$ ，优选为 $0.23-1.5$ 或 $0.5-1.5$ 。

本发明的药物组合物的制备包含：制备含所述益生菌组分和任选存在的其它物质的局部药物制剂或制备含所述益生菌组分、所述共用物和任选存在的其它物质的局部药物制剂。其中所述药物可以是液体药物或半流体药物，而该液体药物可以是溶液（例如为亲水溶媒的溶液、优选为水溶液）、悬浮液、乳浊液。在一个实施方案中，所述药物可以是体内给药剂或体表涂抹剂。

本申请中灭活益生菌可通过高温灭活、高温高压灭活、紫外线灭活、化学试剂灭活、辐射灭活等方式制备。本申请中的破碎益生菌组分可通过以下方法制备：1)、将活益生菌通过高压匀浆破碎法、振荡珠击破碎法、高速搅拌珠研磨破碎法、超声波破碎法、撞击破碎法、渗透压冲击破碎法、冻融破碎法、酶溶破碎法、化学破碎法、去垢剂破碎法等制备；如有必要，2)、将 1) 的制备物经过滤或/和离心等分离工程制备为破碎益生菌分离组分，例如破碎益生菌水不溶组分颗粒、破碎益生菌水溶性组分。在一个实施方案中，本发明中的益生菌水溶性组分通过上述破碎益生菌水溶性组分（例如破碎益生菌上清液

组分)的制备或现有技术中益生菌水溶性组分(例如益生菌抽提物)的制备的方法制备。在一个实施方案中,本发明中的益生菌水不溶组分颗粒通过上述破碎益生菌水不溶组分颗粒(如破碎益生菌沉淀组分)的制备或现有技术中益生菌水不溶组分颗粒(如胞壁聚多糖)的制备的方法制备。在一个实施方案中,本发明中的益生菌半流体类组分可通过益生菌聚多糖或其类似物和水的混合物的加温步骤的方法制备。在一个实施方案中,所述益生菌聚多糖/水混合物的加温温度优选为 50-110°C,其通过微波致热、电炉加温、蒸汽加温等方法加温。在一个实施方案中,本发明的包含所述益生菌半流体类组分和所述共用物的药物组合物的制备包含:将所述益生菌聚多糖或其类似物、所述共用物和水混合均匀后进行所述加温。在一个实施方案中,本发明的药物组合物的制备还包含:使得所述药物制剂中的所述益生菌组分、所述共用物和任选存在的其它物质的浓度大于或等于其在本发明技术方案所需的给药浓度。当大于在本发明之药物组合物中的给药浓度时,其可进一步被稀释使用。

优选的,本发明的药物组合物的制备还包括:使得所述药物制剂中的所述益生菌组分、所述共用物和任选存在的其它物质的含量宜于满足其在本发明技术方案所需的药物体积/靶区体积比,如根据该药物体积/靶区体积比对进行药物分装和封盖。优选的,本发明的药物组合物的制备还包括:对制备物进行高温灭菌、高温高压灭菌、紫外线灭菌、化学试剂灭菌、辐射灭菌等灭菌处理。

按上述这些方法的原则,本领域技术人员可以采用任意合适的具体方法制备多种包含本发明组合物的具体剂型。例如,本发明的药物组合物中的变化包括:含不同种类和浓度的所述药物组合物、含不同种类和浓度的其它药物、含不同种类和浓度的其他添加剂(例如止痛剂、增活剂等)。

术语“局部病变疾病”是指具有局部病变症状的疾病。术语“局部病变(亦简称病变)”是指动物(优选人类)身体原生或继生的不正常局部,其包括结构(例如病变组织)、形态或功能上的症状区块及与之相联通的不正常区域。在本申请中所述局部病变疾病包括实体肿瘤、非瘤肿大,如非瘤结节、宫颈糜烂等局部炎症、分泌腺功能异常和皮肤病。若局部病变疾病为实体肿瘤时,局部病变为肿瘤细胞所在的瘤体及其组织,而与之相联通的不正常区域为与该瘤体相联通(例如通过淋巴管或血管联通)的、且有或疑似有肿瘤细胞的相邻区域;若局部病变疾病为非瘤肿大时,局部病变为增生、囊肿、结节等异常的非瘤肿块;甲状腺、乳腺、肝、肺、肠若的息肉等非瘤结节。局部病变疾病为局部炎症时,则局部病变为发炎面或发炎体等发炎区;若局部病变疾病为分泌异常时,则局部病变为异常源或其所在的分泌腺体;例如,当疾病为胰岛素分泌异常时,异常源在胰岛,局部组织则为胰岛或胰岛所在的胰腺;当疾病为皮肤病时,局部组织为病变皮肤或病变皮肤的附属器官。

术语“肿瘤”是指由于细胞或变异的细胞异常增殖形成的肿块,其包括实体肿瘤。术语“实体肿瘤”是指具有瘤体的肿瘤,其可以是由于任何病理(恶性和非恶性)和处于任何阶段的肿瘤,若按照肿瘤细胞类型分为上皮细胞肿瘤、肉瘤、淋巴瘤、生殖细胞肿瘤、胚细胞瘤等;若按肿瘤细胞集中区所在的器官或组织来命名的肿瘤,包括按以下器官或组织来命名的肿瘤:脑、皮肤、骨、肌肉、乳腺、肾、肝、肺、胆囊、胰腺、脑、食道、膀胱、大肠、小肠、脾、胃、前列腺、睾丸、卵巢或子宫。具体的,所述肿瘤包括恶性肿瘤和非恶性肿瘤,其中所述恶性肿瘤包括乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、肠癌、口腔癌、食道癌、胃癌、喉癌、睾丸癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、恶性淋巴瘤、恶性脑瘤等;所述非恶性肿瘤包括乳腺瘤、胰腺瘤、甲状腺瘤、前列腺瘤、肝瘤、肺瘤、肠瘤、

口腔瘤、食道瘤、胃瘤、鼻咽瘤、喉瘤、睾丸瘤、阴道瘤、子宫瘤、输卵管瘤、卵巢瘤、淋巴瘤、脑瘤等。所述局部病变疾病也可以是慢性粘膜皮肤念珠菌病、各种癣等皮肤病。

当本申请所述药物组合物用于治疗疾病时，还可与其它介入疗法、全身化疗、免疫疗法、光动力疗法、声动力疗法、手术干预等进行组合施用，以进一步提高疗效。

基于在下文中更详细描述的研究，尽管具体机理尚待进一步研究，本发明的药物组合物显示出促进瘤体组织的有效破坏、同时对患者正常组织仅有最小化的损害，从而达到安全、有效治疗局部病变疾病的药学效果。

本申请所用益生菌以及部分的益生菌组分(酵母菌水不溶 β -葡聚糖微粒、酵母菌水溶性 β -葡聚糖、酵母菌羟甲基葡聚糖、酵母菌羧甲基葡聚糖、酵母菌核糖核酸、等)均可从商业途径得到，其他益生菌组分(灭活益生菌、益生菌粉碎物、益生菌粉碎物上清成分、益生菌粉碎物沉淀)利用前述方法(如(100℃、2小时的高温灭活、转速5000转/分的粉碎机粉碎、10000转/分的离心机分离上清液和沉淀)自制。

以下实施例中所用的实验动物均由专业实验动物公司购入的 SPF (Specific Pathogen Free, 无特定病原体) 级动物，除非另有说明，其中小鼠和裸小鼠均为 6-8 周龄健康雌性、体重 17.5-20.5g。

在以下实施例中，除非另有说明，皮下移植细胞生成局部病变(如瘤体)的动物试验均依据药管当局颁发的试验指南、按常规的细胞皮下接种方法进行。除非另有说明，当局部病变(如瘤体)长至所需体积(如小鼠荷瘤为 50-500mm³) 为建模成功，建模后将动物分成若干组，每组 6 只，定期观察测定一般状态、体重、摄食量、动物移植抗宿主病、瘤体体积、瘤重、生存时间等。的模型分别含肿瘤细胞的瘤体(代表瘤体)、含成纤维细胞的结节(代表含成纤维细胞的瘤体和其它局部病变)、正常活组织(代表含普通组织的局部病变)。

局部病变(例如瘤体)体积(V)、相对局部病变(例如瘤体)增殖率(R)、局部病变(例如瘤体)抑制率(r')、抑瘤率(r)分别按照下述公式计算：

局部病变(例如瘤体)体积 $V=0.5 \times a \times b^2$ ，其中 a、b 分别代表局部病变的长、宽；

局部病变(例如瘤体)增值率(R)=TV/CV×100，其中 TV 和 CV 分别为研究组和阴性对照组的局部病变体积；

局部病变(例如瘤体)抑制率 (r') =100%-R，其中 R 为局部病变增值率。

抑瘤率 $r=(CW-TW)/CW \times 100\%$ ，其中 TW、CW 分别为研究组、阴性对照组的平均瘤重。

在下述实施例中，药物 i 的药效记为 E_i ，可以用 r_i' 或 r_i 表示。药物的作用类型即药理可通过药效，尤其是同意药物在不同方案中的药效来研究。如当药物 i 在方案 X、Y 之间的药效差异不大时(如 $E_{ix}/E_{iy} < 200\%$)，其说明药物的药理是相同的；当药物 i 在方案 X、Y 之间的药效差大时(如 $E_{ix}/E_{iy} > 200\%$)，说明药物 i 在方案 X 中的药理大大超过了其在方案 Y 中药理的动力学预期范围，很可能涉及与方案 Y 不同的新药理。若两个药物显示出显然不同的 E_{ix}/E_{iy} 关系，则很可能涉及不同的药理；若两个药物显示出相似的 E_{ix}/E_{iy} 关系，则它们很可能涉及相同的药理，至少涉及相似的药理，如类化学消融药理和化学消融药理。

在以下实施例中，实验结果(例如瘤重、瘤体积、病变组织体积)采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两个实验动物组与组均数之间的差别采用统计学软件 SPSS13.0 或 SPSS19.0 进行显著性检验，检验选用

统计量 t 来进行, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P > 0.05$ 则无统计学意义。

化疗的阳性对照包括经典的细胞毒药物 (如 0.5-1%5-氟尿嘧啶, 其在下述实施例条件下的抑瘤率为 $\geq 30\%$) 和经典化学消融剂 (如 75-99%乙醇, 其在下述实施例条件下的抑瘤率为 $\geq 15\%$)。免疫增强阳性对照包括细胞因子 (如白细胞介素-12,)、细菌组分 (如减毒细菌疫苗等)、疫苗佐剂等免疫增强剂。

在本发明的范围内, A 药和 B 药的组合物记为 B/A, 其共用作用通过 $q = \text{实际共用作用} / \text{理论单纯相加预期作用}$ 判断进行, 其中 A、B 的单用药效分别记为 E_A 和 E_B , 如抑瘤率, A/B 的实际共用药效记为 E_{A+B} 。当 $q=1$ 时说明实际共用作用符合理论预期, 显示为相加作用; 当 $q < 1$ 时说明实际共用作用弱于理论预期, 显示为拮抗作用; 当 $q > 1$ 时说明实际共用作用超理论预期, 显示为协同作用。

判断动物实验中合并用药效应的方法有 Burgi 法 (Burgi Y. Pharmacology; Drug actions and reactions. Cancerres. 1978, 38 (2), 284-285)。金正均对 Burgi 法进行了改进 (金正均, 等概率和曲线和“Q50”, 上海第二医学院学报; 1981, 1, 75-86), 其 q 计算式为: $q = E_{A+B} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$ 。在本发明以下实施例中, 根据金正均法的实际药效/预期药效比 q 进行的药物 A 和药物 B 联合给药的共用药效作用判断如下:

当药物 A 和药物 B 的组合物组并不显示有意义的药效 (例如 r 或 $r' \leq 15\%$) 时, 该联合给药也就未显示有意义的共用作用, 在本发明中视作可忽略不计的共同作用。当组合物组显示有意义的药效 (例如抑瘤率 $\geq 15\%$) 时, 如果实际药效/预期药效比 $q=1.00$ 则该组合物的共用药效作用为药效相加作用 (实际作用符合理论单纯相加预期); 如果实际药效/预期药效比 $q > 1.00$ 则该组合物的共用药效作用为明显药效协同作用 (实际作用超理论单纯相加预期); 如果实际药效/预期药效比 $q < 1.00$ 则该组合物的共用药效作用为明显药效拮抗作用 (实际作用不及理论单纯相加预期)。

实施例 1 组合物的制备

按照上述本发明的组合物的制备方法, 可以配制出本发明众多不同的组合物。本实施例制备的部分本发明的组合物的组成列于表 2 (益生菌组分作为活性成分) 和表 3 (益生菌组分作为协同活性成分)。

表 2 包含益生菌组分的组合物水剂的组分、药理浓度 ($>0.1\%$ 、 $\geq 0.25\%$ 、 $0.25-25\%$ 、优选为 $0.5-15\%$ 、更优选为 $1-15\%$ 或 $5-15\%$)

益生菌组分类型	组合物具体例	
	序号	具体例
1.1 灭活益生菌, 药理浓度 $\geq 0.75\%$ 、 $0.75-15\%$ 、优选为 $1.5-15\%$ 或 $2.0-10\%$	A1	2.5%灭活酿酒酵母菌
	A2	2.5%灭活布拉氏酵母菌
	A3	2.5%灭活地衣芽孢杆菌
	A4	2.5%灭活枯草杆菌
	A5	2.5%灭活屎肠球菌株
	A6	2.5%灭活长双歧杆菌

	A7	2. 5%灭活乳酸菌
	A8	1. 5%灭活酿酒酵母菌/1%灭活布拉氏酵母菌
1. 2 益生菌组分水不溶颗粒/水溶性组分, 药理浓度 $\geq 0.75\%$ 、0.75-15%、优选为1.5-15%或2.0-10%	A9	2. 5%破碎酿酒酵母菌
	A10	2. 5%破碎布拉氏酵母菌
	A11	2. 5%破碎地衣芽孢杆菌
	A12	2. 5%破碎枯草杆菌
	A13	2. 5%破碎屎肠球菌株
	A14	2. 5%破碎长双歧杆菌
	A15	2. 5%破碎乳酸菌
	A16	1. 5%破碎酿酒酵母菌/1%破碎布拉氏酵母菌
1. 3 益生菌组分水不溶颗粒, 药理浓度0.5-15%、优选为1.5-15%或2.0-10%	A17	1. 4%破碎酿酒酵母菌沉淀组分
	A18	1. 4%破碎地衣芽孢杆菌沉淀组分
	A19	5%水不溶性 β -葡聚糖微粒
1. 4 益生菌半流体类组分, 药理浓度2.6-15%、优选为5-15%	A20	10%水不溶性 β -葡聚糖微粒加热致半流体
	A21	10%破碎酿酒酵母菌沉淀加热致半流体
1. 5 益生菌水溶性组分1(上清组分及抽提物), 药理浓度0.15-25%、优选为0.35-15%或5-15%	A22	1. 1%破碎布拉氏酵母菌上清组分
	A23	1. 1%破碎布拉氏酵母菌上清组分
	A24	1. 1%破碎地衣芽孢杆菌上清组分
	A25	10%酿酒酵母菌抽提物
1. 6 益生菌水溶性组分2(葡聚糖及其衍生物), 药理浓度 >0.1 、或0.15-25%、优选为0.35-15%或5-15%	A26	5%水溶性酵母 β -葡聚糖
	A27	10%羟甲基酵母 β -葡聚糖
	A28	10%酵母 β -葡聚糖硫酸脂
	A29	10%降解酵母 β -葡聚糖
1. 7 益生菌水溶性组分3(核酸及其衍生物), 药理浓度1-30%、优选为1-25%或15-25%	A30	20%酵母 RNA
	A31	20%毕赤酵母 DNA

以下列表2中几个制备物的制备试验例子。

A1-A8 的制备方法: 按所需(例如局部化学作用所需)浓度量取益生菌(例如2.5g 酿酒酵母菌干粉)、任选存在的其他组分、以及定容至总体积(例如100ml)的液体载体(例如注射用水), 将它们缓慢混合均匀获得益生菌混合液。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为30cm³)对该液体混合物进行分装(例如10ml/瓶)和封盖, 即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合剂型和规格。将该制备物(例如2.5%酿酒酵母菌)放入巴斯德灭活柜式机中进行巴斯德灭活(60° C, 48

小时)，即可获得 A1。使用与 A1 制备相同的方法，可分别从不同益生菌进行不同灭活益生菌(例如上表中制备物 A1-A8)的制备。

A9-A16 的制备方法：按所需(例如局部化学作用所需)浓度量取益生菌(例如 2.5g 酿酒酵母菌干粉)、任选存在的其他组分、以及定容至总体积(例如 100ml)的液体载体(例如注射用水)，将它们缓慢混合均匀并使用匀浆机对其进行破碎。通过调整匀浆工艺参数(例如转速 10000-25000 转/分钟，转时 0.5-1 分钟，匀浆次数 2-10 次)可以获得不同破碎程度(优选为 100%破碎)的破碎益生菌。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm³)对该液体混合物进行分装(例如 10ml/瓶)和封盖，即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 A9。使用与 A9 制备相同的方法，可分别从不同益生菌进行不同组合物(例如上表中制备物 A9-A16)的制备。

此外，使用上述制备中制备破碎益生菌的方法，可从益生菌(例如 10g 酿酒酵母菌干粉以及定容至 100ml 的注射用水制备高浓度破碎益生菌悬浊液(例如 10%破碎酿酒酵母菌悬浊液)。将该悬浊液加入离心瓶在离心机上进行离心。通过调整离心机转速(例如 1000-25000 转/分钟)、离心时间(例如 0.5-30 分钟)和离心分离次数(例如 2-4 次)可以获得不同离心程度的破碎益生菌上清成分和破碎益生菌沉淀组分成分。离心后倾出上清液另用，所剩沉淀组分经干燥处理(例如 125° C，90 分钟)后制备为破碎益生菌沉淀组分干粉。原料益生菌(例如 10g 酿酒酵母菌)和以此制备的破碎益生菌沉淀组分干粉(例如 4g)之差被计作破碎益生菌上清成分干重(例如 6g)。

A17-A19 的制备方法：按所需(例如局部化学作用所需)浓度量取益生菌水不溶组分颗粒(例如按实施例 1a 方法制备的破碎酿酒酵母菌干粉 1.4g)、任选存在的其他组分、以及定容至总体积(例如 100ml)的液体载体(例如注射用水)，将它们缓慢混合均匀。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm³)对该液体混合物进行分装(例如 10ml/瓶)和封盖，即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 A17。使用与 A17 制备相同的方法，可分别从不同益生菌进行不同破碎益生菌沉淀组分(例如上表中制备物 A17 和 A18)和从商业途径得到的水不溶β-葡聚糖微粒(例如上表中制备物 A19)的制备。

A20-A21 的制备方法：按所需(例如局部化学作用所需)浓度量取益生菌可生成半流体类组分(例如 10g 水不溶β-葡聚糖微粒)、任选存在的其他组分、以及定容至总体积(例如 100ml)的液体载体(例如注射用水)，将它们缓慢混合均匀为悬浊液，然后将该悬浊液加热(例如温度 50-110° C 和时间 0.5-24h)，冷却后可形成半流体。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm³)对该半流体进行分装(例如 10ml/瓶)和封盖，即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 A16。使用与 A16 制备相同的方法，可分别从不同益生菌可半流体化组分进行不同半流体组合物的制备。实验显示，只有当益生菌可半流体化组分的浓度大于某个阈值(例如β-葡聚糖≥ 2.5%)，方可使得包含它的液体在加温后转化为半流体类。

A22-A24 的制备方法：按所需(例如局部化学作用所需)浓度量取益生菌水溶性组分(例如按 A17-A18 方法制备的破碎酿酒酵母菌上清成分 1.1g 或等量上清液 20ml)、任选存在的其他组分、以及定容至总体积(例如 100ml)的液体载体(例如注射用水)，将它们缓慢混合均匀。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm³)对该液体混合物进行分装(例如 10ml/瓶)和封盖，

即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 A22。使用与 A12 制备相同的方法，可分别从不同益生菌进行不同组合物(例如上表中制备物 A22-A24)的制备。

A25-A31 的制备方法：按所需(例如局部化学作用所需)浓度量取益生菌水溶性组分(例如从商业途径得到的水溶性酵母β-葡聚糖 5g)、任选存在的其他组分、以及定容至总体积(例如 100ml)的液体载体(例如注射用水)，将它们缓慢混合均匀。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为 30cm³)对该液体混合物进行分装(例如 10ml/瓶)和封盖，即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 A26。使用与 A26 制备相同的方法，可分别从商业途径得到的不同益生菌组分制备不同组合物(例如上表中制备物 A25-A32)。

使用上述制备方法获得的组合物水剂，可按现有技术的方法加入化学活性成分，制备出包含益生菌组分*和化学活性成分的组合物水剂。

表 3 包含益生菌组分*和化学活性成分的组合物水剂的组分、配比

益生菌组分*/各共用物类型， 益生菌组分与共用物的量比	组合物具体例	
	编号	具体例
A. 包含益生菌组分和弱局部作用化合物的组合物		
2.1 益生菌组分/氨基酸营养素， $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{氨基酸营养素}}: (1-20)/(1-100)$	B1	10%水溶性酵母β-葡聚糖/20%精氨酸
	B2	1.5%破碎布拉氏酵母菌/20%耐氨酸
	B3	1.5%破碎布拉氏酵母菌/10%精氨酸/10%耐氨酸
	B4	2%破碎酿酒酵母菌沉淀组分/10%还原型谷胱甘肽
2.2 益生菌组分/活体染料， $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{活体染料}}: (7-90)/(1-100)$	B5	10%酿酒酵母菌抽提物/1%亚甲蓝/10%孟加拉红
	B6	20%酵母核糖核酸/1%亚甲蓝
	B7	5%羟甲基酵母β-葡聚糖/1%亚甲蓝
2.3 益生菌组分/奎宁类药物， $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{奎宁类药物}}: (2-90)/(1-100)$	B8	1.5%破碎酿酒酵母菌/5%二盐酸奎宁
	B9	5%羟甲基酵母β-葡聚糖//5%二盐酸奎宁
2.4 益生菌组分/酸化剂或/和碱化剂， $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{酸化剂或/和碱化剂}}: (2-60)/(1-100)$	B10	10%水溶性酵母β-葡聚糖/3%氢氧化钠/7%碳酸氢钠
	B11	20%酵母核糖核酸/3%氢氧化钠/7%碳酸氢钠
	B12	5%羟甲基酵母β-葡聚糖/3%氢氧化钠/7%碳酸氢钠
2.5 益生菌组分/氨基酸营养素/活体染料， $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{氨基酸营养素}}/W_{\text{活体染料}}: (5-100)/(5-500)/(1-100)$	B13	10%水溶性酵母β-葡聚糖/20%精氨酸/1%亚甲蓝
	B14	20%酵母核糖核酸/20%耐氨酸/1%亚甲蓝
	B15	5%羟甲基酵母β-葡聚糖/10%精氨酸/10%甘氨酸/1%亚甲蓝
2.6 益生菌组分/氨基酸营养素/酸化剂或/和碱化剂， $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{氨基酸营养素}}/W_{\text{酸化剂或/和碱化剂}}: (5-100)/$	B16	10%水溶性酵母β-葡聚糖/20%精氨酸/3%碳酸氢钠
	B17	20%酵母核糖核酸/20%精氨酸/3%碳酸氢钠

(5-500) / (1-100)	B18	5%羟甲基酵母β-葡聚糖/20%甘氨酸/5%乙酸
B. 包含益生菌组分和细胞毒药物的组合物		
2.7 益生菌组分/细胞毒药物, W _{益生菌组分} /W _{细胞毒药物} : (1-300)/(0.1-15)	B19	7.5%β-葡聚糖半流体/1%5-氟尿嘧啶
	B20	10%β-葡聚糖半流体/1%5-氟尿嘧啶/0.1 顺铂
	B21	7.5%β-葡聚糖半流体/2.5%吉西它滨
C. 包含益生菌组分、弱局部作用化合物和细胞毒药物的组合物		
2.8 包含益生菌组分、活体染料和细胞毒药物的组合物, W _{益生菌组分} /W _{共用物} : (1-110) / (1-100)	B22	7.5%β-葡聚糖半流体/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶
	B23	5%水不溶性β-葡聚糖微粒/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶
	B24	2.5%灭活酿酒酵母菌/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶
	B25	20%酵母核糖核酸/1%亚甲蓝/0.1%顺铂/1%5-氟尿嘧啶
	B26	5%羟甲基酵母β-葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶
2.9 包含益生菌组分、氨基酸营养素和细胞毒药物的组合物, W _{益生菌组分} /W _{共用物} : (1-110) / (1-100)	B27	2.5%灭活布拉氏酵母菌 20%精氨酸//1%5-氟尿嘧啶
	B28	2.5%灭活地衣芽孢杆菌/20%精氨酸/1%5-氟尿嘧啶
	B29	10%水溶性酵母β-葡聚糖/20%精氨酸/1%5-氟尿嘧啶
2.10 包含益生菌组分、氨基酸营养素、细胞毒药物和酸化剂或/和碱化剂的组合物, W _{益生菌组分} /W _{共用物} : (1-110) / (1-100)	B30	10%水溶性酵母β-葡聚糖/20%精氨酸/1%5-氟尿嘧啶/2%碳酸氢钠
	B31	25%酵母 RNA/20%精氨酸/1%5-氟尿嘧啶/2%碳酸氢钠
	B32	10%水不溶酵母β-葡聚糖微粒/10%还原型谷胱甘肽/1%5-氟尿嘧啶/1%氢氧化钠

*: 益生菌组分的类型及其浓度为表 2 中的类型及其浓度

以下列表 3 中几个制备物的制备试验例子。

包含益生菌组分(水溶性组分 1-3)和化学活性成分的组合物水剂(B1、B5-B7、B9-B18、B25、B26、B29-B32)的制备方法: 按所需(例如局部协同作用或/和中长期协同作用所需)协同量比和协同浓度量取益生菌水溶性组分(例如水溶性酵母β-葡聚糖 10g)、共用药(例如 20g 精氨酸)、任选存在的其它成分、以及定容至总体积 100ml 的注射用水, 并将它们缓慢混合均匀。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm³)对该液体混合物进行分装(例如 10ml/瓶)和封盖, 即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 B1。使用与 B1 制备相同的方法, 可分别从不同益生菌水溶性组分及其共用药进行不同组合物(例如上表中制备物 B1、B5-B7、B9-B18、B25、B26、B29-B32)的制备。

包含益生菌组分(水不溶颗粒/水溶性组分)和化学活性成分的组合物水剂(B2-B4、B8)的制备方法: 按所需(例如局部协同作用或/和中长期协同作用所需)协同量比和协同浓度量取益生菌(例如 1.5g 酿酒酵母菌)、共用药(例如 20g 耐氨酸)、任选存在的其它成分、以及定容至总体积 100ml 的注射用水, 并使用与 A10 制备相同的方法将它们缓慢混合均匀并使用匀浆机对其进行破碎并获得破碎益生菌/共用药

悬浊液。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm^3)对该悬浊液进行分装(例如 $10\text{ml}/\text{瓶}$)和封盖,即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 B2。使用与 B2 制备相同的方法,可分别从不同益生菌或/和不同共用药进行不同组合物(例如上表中制备物 B2-B4、B8)的制备。

包含益生菌组分(可半流体化组分)和化学活性成分的组合物水剂(B19-B22)的制备方法:按所需(例如局部协同作用或/和中长期协同作用所需)协同量比和协同浓度量取益生菌可半流体化组分(例如 7.5g 水不溶 β -葡聚糖)、共用药(例如 1g 5-氟尿嘧啶)、任选存在的其他组分、以及定容至总体积(例如 100ml)的液体载体(例如注射用水),将它们缓慢混合均匀为悬浊液,然后将该悬浊液加热(例如温度 $50\text{--}110^\circ\text{C}$ 和时间 $0.5\text{--}24$ 小时),冷却后可形成半流体。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm^3)对该半流体进行分装(例如 $10\text{ml}/\text{瓶}$)和封盖,即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 B19。使用与 B17 制备相同的方法,可进行不同半流体组合物(例如上表中 B20-B22)的制备。

包含益生菌组分(水不溶组分颗粒)和化学活性成分的组合物水剂(B23)的制备方法:按所需(例如局部协同作用或/和中长期协同作用所需)协同量比和协同浓度量取益生菌水不溶组分颗粒(例如 A19 中的水不溶性 β -葡聚糖微粒 10g)、共用药(例如 10g 还原型谷胱甘肽、 1g 5-氟尿嘧啶、 1g 氢氧化钠)、任选存在的其它成分、以及定容至总体积 100ml 的注射用水,并将它们缓慢混合均匀。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm^3)对该液体混合物进行分装(例如 $10\text{ml}/\text{瓶}$)和封盖,即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。所获制备物为 B23。使用与 B6 制备相同的方法,可分别从不同益生菌组分(益生菌沉淀组分等水不溶颗粒)和不同共用药进行不同组合物的制备。

包含益生菌组分(灭活益生菌)和化学活性成分的组合物水剂(B24、B27、B28)的制备方法:按所需(例如局部协同作用或/和中长期协同作用所需)协同量比和协同浓度量取益生菌(例如 2.5g 酿酒酵母菌干粉)、其它成分(例如 1g 亚甲蓝、 1g 5-氟尿嘧啶)、以及定容至总体积 100ml 的注射用水,并将它们缓慢混合均匀获得益生菌/共用药混合液。如果按所需药物体积/靶区体积比(例如临床上常见的实体肿瘤的平均体积为的 30cm^3)对该液体混合物进行分装(例如 $10\text{ml}/\text{瓶}$)和封盖,即可获得可提供瘤内局部作用的药物组合物剂型和规格。将该制备物(例如 2.5% 酿酒酵母菌)放入巴斯德灭活罐式机中进行巴斯德灭活(60°C , 48 小时),即可获得 B24。使用与 B24 制备相同的方法,可分别从不同益生菌进行不同灭活益生菌(例如上表中制备物 B27、B28)的制备。

如果将上述未灭活制备物(例如 A1-B31、B1-B32)放入巴斯德灭活罐式机中进行巴斯德灭菌(60°C , 48 小时),即可获得灭菌液体注射剂。

需要说明的是, A1-16、B1-B19 的制备中,所述灭菌采用 60°C , 48 小时进行巴斯德灭菌,得到灭菌液体注射剂。

若制备冻干粉制剂时,则分别将上述液体制剂进行冷冻干燥,所述冷冻干燥的工艺条件为: -45°C 保持 4h 进行预冻,以 $0.1^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的升温速率升至 -15°C 时至少保持 10h 进行升华;升温至 30°C , 6h 保持进行解吸附干燥,即得。按需对注射用水进行分装如 $7.5\text{ml}/\text{瓶}$ 、封盖,即得注射用溶媒瓶。使用时,

将瓶中的无菌溶媒抽入上述注射用冻干粉瓶中混合均匀形成液体药物，即注射药物，如 1.5%酿酒酵母菌破碎组分/20%氨基酸。

实施例 2 免疫抑制动物模型中的药理研究

荷瘤裸小鼠被广泛用于实体瘤患者化疗而非免疫治疗的药物研究，以裸小鼠为实验对象，采用人肝癌 HepG2 细胞为建模细胞，将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模，建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 161.3 mm^3 ，将模型动物随机分为 17 组，按表 4 的药物、用药方式给药，每组均用药 1 次，每次注射量 $150 \mu\text{l}$ /只。用药后第 7 日，对动物进行安乐死，解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重，并根据阴性对照组计算抑瘤率 (r)。

表 4 不同组别的抑瘤率数据

组别	药物 i	备注	用药方式	瘤重 ($\bar{x} \pm s_{\text{g}}$)	抑瘤率 r
01	阴性对照物	生理盐水	静脉注射	0.241 ± 0.113	—
1	细胞毒阳性对照物	1%5-氟尿嘧啶	静脉注射	0.139 ± 0.094	42.3%
2	局部作用阳性对照物	无水乙醇	静脉注射	0.226 ± 0.113	6.1%
3	免疫增强对照物	$4 \times 10^4 \text{ U/ml}$ 白细胞介素-12	静脉注射	0.230 ± 0.102	4.7%
4	5%灭活益生菌	5%热灭活酿酒酵母菌	静脉注射	0.233 ± 0.107	3.5%
5	5%益生菌水不溶组分颗粒	5% β -葡聚糖微粒	静脉注射	0.228 ± 0.114	5.2%
6	5%益生菌水溶性组分	5%破碎酿酒酵母菌上清组分	静脉注射	0.238 ± 0.093	1.3%
02	阴性对照物	生理盐水	瘤内注射	0.263 ± 0.129	—
7	细胞毒阳性对照物	1%5-氟尿嘧啶	瘤内注射	0.133 ± 0.094	49.5%
8	局部作用阳性对照物	无水乙醇	瘤内注射	0.122 ± 0.085	53.6%
9	免疫增强对照物	$4 \times 10^4 \text{ U/ml}$ 白细胞介素-12	瘤内注射	0.241 ± 0.111	8.1%
10	5%灭活益生菌	5%热灭活酿酒酵母菌	瘤内注射	0.165 ± 0.063	37.2%
11	5%益生菌水不溶组分颗粒	5% β -葡聚糖微粒	瘤内注射	0.183 ± 0.097	30.4%
12	5%益生菌水溶性组分	5%破碎酿酒酵母菌上清组分	瘤内注射	0.180 ± 0.079	31.7%
13	5%益生菌半流体类组分	5% β -葡聚糖微粒经加热后降温处理形成的半流体	瘤内注射	0.157 ± 0.081	40.2%

14	5%益生菌组分混合物	5%破碎酿酒酵母菌	瘤内注射	0.168 ± 0.081	36.2%
15	5%活益生菌	5%酿酒酵母菌	瘤内注射	0.201 ± 0.101	23.6%

通常认为,5-氟尿嘧啶静脉注射可提供常规化学作用,而通过瘤内注射可提供普通的局部化学作用,两种给药方式引起的药效差异与细胞毒动力学相关。组7与组1相比,其抑瘤率之比 $E_7/E_1 < 200\%$,说明5-氟尿嘧啶在不同给药条件(全身性用药 vs 局部用药)下均作为细胞毒药物发挥作用。高浓度(75-99%)乙醇通过静脉注射可提供醉酒样反应;而通过瘤内注射可提供化学消融作用。组8与组2相比,其抑瘤率提高远远超过基于后者的动力学提高预期极限 ($E_8/E_2 > 200\%$),说明乙醇在不同给药条件(全身性用药 vs 局部用药)下可作为不同的活性成分(醉酒剂 vs 化学消融剂)应用。

白细胞介素-12 通常在临床上作为免疫增强剂使用,其通过瘤内注射(组9)合乎预期地未显示短期抑瘤效果。而现有技术中益生菌及其组分也可作为辅助药物,其抗肿瘤作用也是基于其免疫增强作用,组别4-6的结果与组别3一致。值得注意的是,组别4、5在注射后均有1只动物死亡,说明5%益生菌组分的悬浊液通过静注存在安全性风险。

根据现有技术的免疫增强预期,组别10的结果应当与免疫增强对照组9一致。出人意料的是,它们之间的药理行为明显不同:相同药物相同剂量的组9与组3几无药效差异;而相同药物相同剂量的组10与组4的药效差异超过其动力学提高预期极限 ($F_{10}/F_9 > 200\%$),这也体现为它们之间的药效明显不同 ($F_{10}/F_9 = 459\% > 200\%$)。相反,组10与药理预期之外的组7、组8的抑瘤率差异却不大(例如 $F_7/F_{10} = 133\% < 200\%$),而且组10与组8的药理行为也明显一致:相同药物相同剂量的组8与组2的抑瘤率差异巨大 ($E_{10}/E_9 > 200\%$)。而组别11、12存在与组10相同的药效和药理行为。

实际上,只有通过肠道内给药才能使益生菌组分起到调节肠道内细菌群作用;而肠道内、外给药均可使益生菌组分起到免疫增强的作用。因此,当排除口服、静注等常规给药方式,而通过局部,尤其是病变内给药,才能使益生菌组分提供区别于现有技术的新功能 ($E_{10}/E_4 > > 200\%$)。

益生菌及其组分的免疫增强作用基于其细菌免疫原性。通常认为的细菌免疫原性由强减弱的次序为:活菌、基本保持活菌形状的灭活菌、多少有一些类似活菌形状的水不溶颗粒、失去活菌形状的半流体、水溶性成分。然而,局部给药益生菌及其组分的各组的药效由强减弱的次序却为:半流体类组分(组13)、并不要求基本保持活菌形状的灭活益生菌(不完整菌体的量比 $>20\%$ 的灭活益生菌,组10)、水不溶组分/水溶性组分混合物(组14)、水溶性组分(组12)、水不溶组分(尽管其与半流体类组分的化学组成相同)(组11)、活菌(组15)。这进一步说明益生菌组分新功能并不依赖于其在现有技术中的功能(如细菌免疫原性)。因此,益生菌组分在药物组合物中的浓度可用重量浓度而非单位体积内的完整菌体数目来表示。

药理功能是药物的根本特征,老药物发现的新药理通常可创造性地产生与新药物一样的新应用。药物的有效应用通常取决于在临床治疗限定的实验条件下,如最小化给药频次和剂量下的有效性和安全性,提供的具有相对优势的药理功能,也就是优选的药理作用。同一个物质于是在不同条件下有可能被用作不同活性成分,而同一类物质更是可能有适于用作不同活性成分的不同优选方案。在上述实验中,各阳性对照物(5-氟尿嘧啶、乙醇、白细胞介素-12)均显示合乎其在不同药理方法中的优选药理(分别为细胞

毒药理、免疫增强药理、局部作用药理)预期的药效和药理行为,并给出了一个药理比较研究系统。益生菌组分在静注时显示的药效或许还合乎其在现有技术中的药理(例如免疫增强)预期,但其在病变内给药产生的药效则显然远远超过了该预期。其药理行为甚至也超过细胞毒药理(假如有的话)预期。其在不同给药方式中显示的药理差异导致巨大的药效差异,这种药理行非常类似于局部作用阳性对照物乙醇,也说明其在病变内给药时的优选药理为局部作用。总之,益生菌组分作为提供局部作用的活性成分(局部活性成分)在药理、疗效上大大超出了其作为提供任何非局部作用(如细胞毒作用或免疫增强作用)的活性组分(非局部活性成分)的预期。

为深入研究上述新功能,申请人进行以动物正常组织为局部病变模型(该模型为化学消融剂的经典研究模型)的下述对比实验——以裸小鼠为实验动物,随机分成A、B两组,每组6只,分别以75%乙醇水溶液、5%灭活益生菌为实验药物,注射至右腿外侧肌肉块内,注射量100u1/只;用药后第7日对动物进行安乐死,解剖取出裸小鼠右腿外侧肌肉块标本,切片洗涤后测量区别于正常肌肉的异常区域面积,如坏死、结节等。结果显示:A组、B组的异常区域面积分别为 $35.14 \pm 15.92\text{mm}^2$ 和 $34.12 \pm 15.81\text{mm}^2$,且两者之间无统计学差异($P > 0.05$)。这些结果进一步证实了益生菌组分类似于乙醇的局部作用药理。如同乙醇,益生菌组分所提供的该局部作用使得它可以被用于包含病变组织的任何局部病变。

实施例3 局部作用的药理研究及其药理浓度优化

以裸小鼠为实验对象,采用乳腺癌细胞(MDA-MB231)为建模细胞,将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模,建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 158.2mm^3 ,将模型动物随机分为16组,按表5的药物组份、剂量进行瘤内注射给药,每组均用药1次。用药后第7日,对动物进行安乐死,解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重,并根据阴性对照组计算抑瘤率(r)。

表5 不同药物组分、剂量对抑瘤率的影响

组别	备注	具体组分	注射量	瘤重 ($\bar{x} \pm s$ g)	抑瘤率 r
0	阴性对照组	生理盐水	150u1	0.216 ± 0.127	-
01	局部作用对照组	50%乙醇	150u1	0.201 ± 0.115	7.1%
02		75%乙醇	107u1	0.163 ± 0.091	24.4%
03		无水乙醇	75u1	0.131 ± 0.074	39.3%
1	破碎布拉氏酵母菌上清组分	0.1%上清组分*	500u1	0.204 ± 0.090	5.6%
2		0.25%上清组分	200u1	0.175 ± 0.065	19.1%
3		0.5%上清组分	100u1	0.165 ± 0.085	23.4%
4	热灭活布拉氏酵母菌	0.3%灭活菌**	500u1	0.198 ± 0.077	8.3%
5		0.75%灭活菌	200u1	0.171 ± 0.081	20.7%
6		1.5%灭活菌	100u1	0.161 ± 0.093	25.6%
7	益生菌水不溶	0.5%β-葡聚糖颗粒***	500u1	0.202 ± 0.100	6.7%

8	组分颗粒	1. 25%β-葡聚糖颗粒	200u1	0. 170±0. 069	21. 1%
9		2. 5%β-葡聚糖颗粒	100u1	0. 157±0. 092	27. 5%
10	益生菌水不溶 / 水溶组分混 合物	0. 25%破碎布拉氏酵母菌***	500u1	0. 195±0. 097	9. 6%
11		0. 50%破碎布拉氏酵母菌	200u1	0. 168±0. 082	22. 3%
12		1. 25%破碎布拉氏酵母菌混 合物	100u1	0. 159±0. 071	26. 4%

*: 上清组分为破碎布拉氏酵母菌上清组分; **: 灭活菌为热灭活布拉氏酵母菌; ***: 微粒为酿酒酵母β-葡聚糖微粒; ****: 破碎菌为破碎布拉氏酵母菌

由表 5 可知, 组别 01 的技术方案中乙醇未提供化学消融活性, 仅类似于静注乙醇; 组别 02、03 的抑瘤率接近 ($E_{03}/E_{02} < 200\%$), 但远高于组别 01 ($E_{02}/E_{01} > 200\%$), 显示出预料中的化学消融; 说明只有乙醇浓度高于某一阈值 (如 70%) 才能作为化学消融剂使用。

组别 1-3 是将相同剂量不同浓度的益生菌组分注射入相同体积瘤体, 其中组 3 的抑瘤率与组 02 相差不大 ($E_3/E_{02}=79\%$), 说明其显示出类似局部作用。组别 5、8、11 存在与组 02 相似的局部作用, 而组 3、6、9、12 的抑瘤率数据说明该局部作用存在给药浓度依赖性。

组别 1、2 虽然为相同剂量的瘤内给药, 不同给药浓度的益生菌组分的药效差异超过了动力学差异预期 ($E_2/E_1 > 200\%$); 因此本申请的药物组合中益生菌组分的给药浓度是局部作用所需的药理浓度, 而非免疫增强所需。

益生菌组分提供局部作用的一个必要条件是: 益生菌组分在药物组合物中的含量须使其药理浓度 (局部给药浓度) $> 0.1\%$ 、 $\geq 0.25\%$ 、 $0.25-25\%$, 优选为 $0.5-15\%$, 更优选为 $1-15\%$ 或 $5-15\%$ 。其中当所述益生菌组分为灭活益生菌, 则其药理浓度 $> 0.3\%$ 、 $\geq 0.75\%$ 、 $0.75-15\%$, 优选为 $1.5-15\%$ 或 $5-15\%$; 当所述益生菌组分为益生菌水溶性组分, 则其药理浓度 $> 0.1\%$, 如 $0.15-25\%$ 、优选为 $0.35-25\%$ 或 $5-25\%$ (其中, 水溶性组分为益生菌上清组分则 $0.35-3.5\%$ 、为水溶性益生菌源聚多糖则 $2-5\%$ 或 $5-15\%$ 、为益生菌源核糖核酸则 $15-25\%$); 当所述益生菌组分为益生菌水不溶组分颗粒, 则其药理浓度为 $> 0.5\%$ 或 $0.5-15\%$ 、优选为 $1.5-15\%$ 或 $5-15\%$; 当所述益生菌组分为益生菌半流体类组分, 则其药理浓度为 $> 2.5\%$ 、 $2.6-25\%$ 、优选为 $5-15\%$ 。

同一个物质用作不同活性成分有可能需要满足不同药理动力学特征。上述药效的给药浓度依赖性比较研究结果进一步证实本发明所述益生菌组分的局部活性类似于化学消融, 而与常规活性 (癌细胞抑制、肿瘤血管抑制、或免疫增强等) 相去甚远。本申请所述作为局部活性成分的益生菌组分的药理浓度, 完全不能简单地与现有技术中作为非局部活性成分的益生菌组分的制剂浓度或给药浓度进行比较。非局部活性药物的制剂浓度往往仅受制剂学限制, 如高浓度制剂可节约运输、储存成本, 适当高浓度的注射可减小注射体积以缩短给药时间。众所周知, 制剂浓度可较大范围, 但其本质上不同于药理作用所需的给药浓度。例如静注时通过稀释使给药浓度远低于制剂浓度, 以避免药物快速进入血液产生安全性风险。本发明组合物中的药理浓度不仅作为一个特征限制了其组成和制备, 且还必须作为药理条件出现

在新药报批中，也必须作为应用条件出现在药物的使用说明书之中。

实施例 4：局部作用药理研究及其药理体积优化

不同药理的药物组合物的组分含量通常需要用不同的特征来限定，通常常规的药物组合物在给药剂量外并无病变靶区体积依赖性的药理体积，以下实验却对此研究。

以裸小鼠为实验对象，采用人胰腺癌细胞（PANC-1）为建模细胞，将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模，建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 213.1 mm^3 ，将模型动物随机分为 16 组，按表 6 的药物组份、给药体积进行瘤内注射给药，每组均用药 1 次。其中组别 1-12 的药物均采用实施例 1 的方法制备，其中的灭活益生菌为热灭活布拉氏酵母菌、益生菌水不溶组分颗粒为 β -葡聚糖颗粒、益生菌水溶性组分为破碎布拉氏酵母菌上清组分、益生菌水不溶组分颗粒和水溶性组分混合物（简记为益生菌组分混合物）为破碎布拉氏酵母菌，制备方法同实施例 3；用药后第 7 日，对动物进行安乐死，解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重，并根据阴性对照组计算抑瘤率（r）。

表 6 不同注射浓度、体积的抑瘤率数据

由表 6 可知，组别 01-03 将不同给药体积/靶区体积比的乙醇注射入相同体积瘤体，其中组 01 中的

组别	注射浓度	注射体积	给药体积/瘤体体积比	瘤重 ($\bar{x} \pm s$ g)	抑瘤率 r
0	(生理盐水)	100 μ l	0.50	0.274 ± 0.124	—
01	75%乙醇	20 μ l	0.09	0.257 ± 0.110	6.2%
02	75%乙醇	50 μ l	0.23	0.218 ± 0.115	20.3%
03	75%乙醇	100 μ l	0.47	0.187 ± 0.064	31.7%
1	10%益生菌组分混合物	20 μ l	0.09	0.259 ± 0.091	5.6%
2	4%益生菌组分混合物	50 μ l	0.23	0.215 ± 0.104	21.4%
3	2%益生菌组分混合物	100 μ l	0.47	0.193 ± 0.083	29.7%
4	10%灭活益生菌	20 μ l	0.09	0.254 ± 0.109	7.3%
5	4%灭活益生菌	50 μ l	0.23	0.220 ± 0.081	19.8%
6	2%灭活益生菌	100 μ l	0.47	0.198 ± 0.099	27.6%
7	10%益生菌水不溶组分颗粒	20 μ l	0.09	0.252 ± 0.093	8.1%
8	4%益生菌水不溶组分颗粒	50 μ l	0.23	0.212 ± 0.114	22.4%
9	2%益生菌水不溶组分颗粒	100 μ l	0.47	0.204 ± 0.105	25.6%
10	10%益生菌水溶性组分	20 μ l	0.09	0.264 ± 0.087	3.7%
11	4%益生菌水溶性组分	50 μ l	0.23	0.210 ± 0.098	23.4%
12	2%益生菌水溶性组分	100 μ l	0.47	0.195 ± 0.077	28.7%

乙醇未能提供化学消融作用，类似于静注乙醇；而组 02 的抑瘤率与组 01 差异极大 ($F_{02}/F_{01} > 200\%$)、

而组 02 的抑瘤率与组 03 的相差不大 ($E_{03}/E_{02} < 200\%$)，显示出预料中的化学消融。由此表明，只有乙醇超过某一给药体积/瘤体体积比阈值，如 0.15，才能作为化学消融剂应用。

组别 1-3 将相同剂量不同给药体积/靶区体积比的的益生菌组分注射入相同体积瘤体，其中组别 2 的抑瘤率与组别 02 的抑瘤率相近 ($E_3/E_{02} = 105\%$)，显示出与之类似的局部作用；而组别 5、8、11 也存在类似于组别 02 的局部作用，而组别 3、6、9、12 则进一步说明该局部作用对靶区体积的相关性和对给药体积的依赖性。综上，即使是瘤内给药的浓度较高的药物组合物，相同剂量但不同给药体积/靶区体积比的益生菌组分的药效差异可远超动力学差异预期 (如 $E_2/E_1 > 200\%$)，此时益生菌组分的给药体积 (给药体积/靶区体积比) 已经不是药效动力学问题，而是药理问题。

优选的，益生菌组分在药物组合物中的含量使给药体积/靶区体积比 > 0.09 、 $0.1-1.5$ ，优选为 $0.23-1.5$ 或 $0.5-1.5$ 。临床上尽管很多瘤体体积 $\geq 30\text{cm}^3$ ，但基于免疫增强药理的药物在瘤区内的给药体积普遍很低 (如细胞因子，体积 $\leq 2\text{ml}$)；这类药物制剂的规格体积通常不大，如注射液瓶、或粉针剂瓶。然而本申请所述的药物组合物只能在满足上述给药体积/靶区体积比的条件下给药，如肿瘤靶区体积为 $\geq 30\text{cm}^3$ 、给药体积/靶区体积比为 0.2，则所需给药体积 $\geq 6.0\text{cm}^3$ ，此时药物制剂的规格体积为 6ml 或整数倍数。众所周知，实质上药物规格也可以是活性成分实现所需药理作用的常用所需含量的形式之一，如每片包含不同含量阿司匹林的“拜阿司匹灵”有不同的适应症范围。

本申请所述作为局部活性成分的益生菌组分的上述根据病变体积的给药体积的优选方案超过益生菌组分现有技术的预期。具体的，现有技术中用作非局部活性成分 (如免疫增强活性成分) 的益生菌组分也许可以辅助治疗、却不能作为主药治疗局部病变疾病，尤其是可降低局部病变体积的局部病变治疗，因而其给药体积并不依据局部病变体积。此外，根据以上实施例 2 中的实验及其它类似实验的结果，相同浓度药物在病变内给药与静注给药比较，其安全性体积 (例如出现死亡的给药体积) 可以高出 2 倍以上。因而，本申请所述作为局部活性成分的益生菌组分特别适用于较大 (例如平均直径大于 3cm) 病变。

上述药效的给药体积依赖性比较研究结果进一步证实本发明所述益生菌组分的局部活性类似于化学消融，而与常规活性 (癌细胞抑制、肿瘤血管抑制、或免疫增强等) 相去甚远。现有技术中作为非局部活性成分的益生菌组分的药理动力学特征为血药浓度 (通常非常低，如 $0.25 \times 10^{-5}\%$)，给药体积仅与血药浓度所需剂量有关，而与病变靶区体积无关。由于该剂量与全身性安全性相关，给药体积于是广泛地从药理动力学特征中淡化，而由医生根据病人体重等状态决定。本申请所述作为局部活性成分的益生菌组分的药理体积是一个重要的药理动力学特征 (涉及有效渗透区与无药区之间的药理关系及后果)，其不仅限制了其组成 (例如单位制剂体积) 和制备，且其还必须作为药理条件出现在新药报批中，也必须作为应用条件出现在药物的使用说明书之中。本申请所述作为局部活性成分的益生菌组分的药理体积，完全不能简单地与现有技术中作为非局部活性成分的益生菌组分的单位制剂体积或给药体积进行比较。

根据上述实施例 2-4 以及更多的类似研究的结果，包含益生菌组分的本发明局部药物组合物 (本发明组合物) 在以下方面超过包含益生菌组分的现有技术中的非局部药物组合物 (现有技术组合物，例如可用于口服或静注的益生菌组分) 的预期：

1)、其基础药理超预期：本发明组合物中的益生菌组分作为局部活性组分是基于其新药理-药物渗透区组织破坏作用-即局部作用的发现，该局部作用主要包括局部化学作用 (例如类化学消融)，超过了现

有技术益生菌组分的任何非局部活性(例如免疫作用、抗病毒作用、肿瘤细胞毒作用、或瘤体血管破坏作用等)的药理预期;

2)、其药理方法超预期:本发明组合物中的益生菌组分必须严格限定于局部给药才能进入靶区反应器实现其新功能,而现有技术组合物中的益生菌组分的药理方法则不限于局部给药、优选为全身性给药去实现其目标功能;

3)、其活性成分选择方案超预期:现有技术免疫增强组合物中的益生菌组分优选为细菌免疫作用较强组分(如活菌和在形貌上接近度尽可能高的组分,如基本保留活菌形态的灭活益生菌),而本发明组合物优选细菌免疫作用最小化组分(与活菌形貌上接近度尽可能低的组分,如益生菌水溶性组分、益生菌半流体组分)。

4)、其药理动力学方案超预期:现有技术组合物中的益生菌组分实现其全身性作用(药理浓度为血药浓度)的动力学条件依赖于给药剂量而非给药浓度、更谈不上制剂浓度(为制备和储运方便通常制备为浓缩剂),为避免出现例如注射部位的局部作用损伤还将药剂稀释给药。然而本发明组合物中的益生菌组分实现其局部作用的动力学条件则相反地依赖于给药浓度而非给药剂量(血药浓度),局部给药浓度即其药理浓度,而且往往也是其制剂浓度。此外,现有技术组合物给药体积仅与其全身性药理所需血药浓度的剂量有关,而与病变靶区体积无关,而本发明组合物给药体积则与其局部活性所需渗透的靶区体积有关;

5)、其药理反应所需的时间超预期:现有技术组合物的全身性活性必须在靶区进行长时间高频次(例如3个月内数十次)的药理反应来实现,相应地必须高频次和长时间供药,而本发明组合物的局部活性类似于化学消融,其在给药区域内仅需少数次(例如3个月内 ≤ 3 次)药理反应即可实现。这也为剂型(例如数十针剂 vs 数针剂)和制备方案带来很大的不同;

6)、其药理反应所需的反应环境要求超预期:本发明组合物严格限定于局部给药剂型的相应组成限定(不得包含某些用于全身型给药剂型的辅料、给药时组合物需为充分混合物从而要求统一的溶媒、等等)、等等;

7)、其技术效果超预期:首先,对局部病变的治疗效果超预期。例如至少在给药区域内获得可与公认的有效药物相比、大大超过超过现有技术组合物短期预期(例如多次给药时第一次给药后21天、或最后一次给药后7天)的药物效应($r_{\text{本发明组合物}}/r_{\text{现有技术组合物}} > 200\%$, 优选 $r_{\text{本发明组合物}}/r_{\text{现有技术组合物}} > 400\%$)。该药效特点也导致其适应症范围超预期,例如,上述动物模型所能代表的免疫缺陷患者、老龄患者、经多种治疗后免疫能力下降的患者。这些也进一步显示两种组合物之间的差异并非动力学差异而是药理差异(例如局部作用 vs 常规作用)。

实施例 5: 免疫抑制动物模型中的共用药理研究及技术方案优选

以裸小鼠为实验对象, 采用肺肿瘤细胞 (A549) 为建模细胞, 将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模, 建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 153.7 mm^3 , 将模型动物随机分为 18 组, 按表 7 的药物组份、给药方式进行给药, 每组均用药 1 次, 注射量为 $150 \mu\text{l}$ /只。其中益生菌组分为热灭活布拉氏酵母菌, 组别 16 的用药方式为瘤内注射益生菌组分约 2h 后再瘤内注射 10%精氨酸; 用药后第 7 日, 对动物进行安乐死, 解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重, 并根据阴性对照组计算抑瘤率 (r), 还可根据疗效 (抑瘤率) 计算药效实际/预期比 q。

表 7 不同组分、给药方式对抑瘤率的影响

组别	药物	给药方式	瘤重 ($\bar{x} \pm s_{\text{g}}$)	抑瘤率 r
01	生理盐水	静脉注射	0.209 ± 0.125	—
1	75%乙醇		0.203 ± 0.095	<u>2.7%</u>
2	1%5-氟尿嘧啶		0.122 ± 0.065	<u>41.3%</u>
3	10%精氨酸		0.196 ± 0.077	<u>6.4%</u>
4	2.5%益生菌组分		0.200 ± 0.114	4.7%
5	2.5%益生菌组分/75%乙醇		0.201 ± 0.107	3.8%
6	2.5%益生菌组分/1%5-氟尿嘧啶		0.117 ± 0.091	44.1%
7	2.5%益生菌组分/10%精氨酸		0.204 ± 0.103	2.6%
02	生理盐水	瘤内注射	$0.218 \pm 0.115\text{g}$	—
8	75%乙醇		0.145 ± 0.084	33.7%
9	1%5-氟尿嘧啶		0.116 ± 0.076	46.6%
10	10%精氨酸		0.164 ± 0.061	24.7%
11	2.5%益生菌组分		0.170 ± 0.099	21.8%
12	2.5%益生菌组分/75%乙醇		0.118 ± 0.062	45.7%
13	2.5%益生菌组分/1%5-氟尿嘧啶		0.070 ± 0.045	68.1%
14	2.5%益生菌组分/10%精氨酸		0.092 ± 0.027	57.9%
15	2.5%益生菌组分/1%5-氟尿嘧啶/10%精氨酸		0.018 ± 0.039	91.6%
16	2.5%益生菌组分+10%精氨酸		0.167 ± 0.083	23.3%

由上表可知, 组别 5、6、7 的实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 q 均不大于 1.00, 说明此时益生菌组分与化学活性物质在静注条件下共用未能产生任何协同作用。

相同益生菌组分/化学活性物质 (乙醇) 混合物不同给药方式的组别 12 显示出远远高于组别 5 的药效, 但它们的实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 q 均不大于 1.00, 该高药效主要是因为乙醇的局部作用 (组别 8)。按此预期, 相同益生菌组分与其它化学活性物质的共用也应有类似药理行为。然而, 组别 13 和 14 却分别显示出明显高于组别 6 和 7 (分别使用相同益生菌组分/化学活性物质混合物) 的药效, 说明

它们的较高药效直接与它们的局部作用相关。而且组别 13 和 14 的实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 q 均大于 1.00, 说明该局部作用为益生菌组分和这些化学活性物质的局部协同作用。

进一步的, 组别 15 的药效最高, 且其实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 $q > 1.00$, 说明三组分组合(益生菌组分/弱局部作用化合物/细胞毒药物)居然还可以在其二组分(益生菌组分/弱局部作用化合物和益生菌组分//细胞毒药物)协同作用的基础上进一步产生协同作用。最后, 组别 16 的药物组合物尽管与组别 14 的成分相同但却不在同一个药剂之中, 其实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 $q < 1.00$, 未显示出协同作用。

实验中观察发现, 组别 11、12 中大部分实验动物在注射后产生较强烈反应, 说明益生菌组分单药或非协同药物组合物应在止痛条件下使用以避免安全性风险; 然而组别 13-15 则未观察到上述强刺激反应, 说明, 益生菌组分与弱局部作用化合物和/或细胞毒药物的协同药物组合物具有超单药效应预期的安全性。其它益生菌组分, 如益生菌半流体类组分、益生菌水溶性组分、益生菌水不溶组分颗粒等与化学药物的共用也存在相同的结果, 限于篇幅在此不进行详述。

申请人对益生菌组分的组合物, 尤其是三组分形成的组合物进行深入研究。

以裸小鼠为实验对象, 采用胃肿瘤细胞 (BGC823) 为建模细胞, 将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模, 建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 164.4 mm^3 , 将模型动物随机分为 14 组, 按表 8 的药物组份进行瘤内注射给药, 每组均用药 1 次, 注射量为 $150 \mu\text{l}$ /只; 其中组别 5、11 的药物组合物为半流体, 其余组别均为液体。用药后第 7 日, 对动物进行安乐死, 解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重, 并根据阴性对照组计算抑瘤率 (r), 还可根据疗效(抑瘤率)计算药效实际/预期比 q 。

表 8 不同药物组合的抑瘤结果

组别	药物类型	具体组分	瘤重 ($\bar{x} \pm s_{\text{g}}$)	抑瘤率 r
01	阴性对照	生理盐水	0.225 ± 0.127	—
1	弱局部作用化合物	1%亚甲蓝	0.197 ± 0.062	<u>12.5%</u>
2	细胞毒药物	1%5-氟尿嘧啶	0.132 ± 0.069	<u>41.4%</u>
3	弱局部作用化合物和细胞毒药物	1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶	0.072 ± 0.034	<u>68.1%</u>
4	灭活益生菌	5%热灭活布拉氏酵母菌	0.145 ± 0.088	35.7%
5	益生菌半流体类组分	7.5%β-葡聚糖半流体	0.150 ± 0.095	33.2%
6	益生菌水溶性组分	5%破碎布拉氏酵母菌上清组分	0.140 ± 0.076	37.7%
7	益生菌组分混合物	5%破碎布拉氏酵母菌	0.147 ± 0.061	34.6%
8	灭活益生菌/弱局部作用化合物	5%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝	0.087 ± 0.029	61.4%
9	灭活益生菌/细胞毒药物	5%热灭活布拉氏酵母菌/1%5-氟尿嘧啶	0.059 ± 0.051	73.2%
10	灭活益生菌/弱局部作用化合物和细胞毒药物	5%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶	0.005 ± 0.038	97.7%

11	益生菌半流体类组分/弱局部作用化合物和细胞毒药物	7.5%β-葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶	0.010±0.019	95.6%
12	益生菌水溶性组分/弱局部作用化合物和细胞毒药物	5%破碎布拉氏酵母菌上清组分/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶	0.013±0.042	94.3%
13	益生菌组分混合物/弱局部作用化合物和细胞毒药物	5%破碎布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶	0.003±0.065	98.7%

经瘤内注射时，组别 8-13 的实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 q 均大于 1.00，都显示出明显的协同作用。申请人对该新功能的药物效应进行进一步研究，以裸小鼠为实验对象，随机分为 3 组，每组 6 只小鼠，分别以 75%乙醇水溶液、5%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝、半流体组合物中的 7.5%β-葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶作为研究药物，各组均用药 1 次，给药至右腿外侧肌肉块内，注射量 100 μ l/只。用药后第 7 日对动物进行安乐死，解剖取出裸小鼠右腿外侧肌肉块标本，并进行大体病理分析，切片测量区别于正常肌肉的异常区域面积，如坏死、结节等。结果表明：组别 1、2、3 的异常区域面积分别为 $32.24 \pm 13.71\text{mm}^2$ 、 $46.78 \pm 13.64\text{mm}^2$ 和 $72.35 \pm 23.71\text{mm}^2$ ，说明益生菌组分所提供的局部协同作用类似但强于乙醇，其主要是局部化学协同作用。

实施例 6：非瘤局部病变模型中的药理研究及优化

以裸小鼠为实验对象，采用小鼠胚胎成纤维细胞 3T3 为建模细胞，将 2×10^4 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植结节建模，建模成功裸小鼠的类瘤结节体平均体积为 171.5mm^3 ，将模型动物随机分为 16 组，按表 9 的药物进行给药，除组别 21-24 外各组别分别进行腹腔注射、结节内注射给药，在组别 21-24 中所用药物为非局部给药剂型(益生菌组分和共用物可分别给药的剂型)的组合物，系列 A 的给药方式为：腹腔注射益生菌组分+结节内注射共用物，系列 B 的给药方式为：腹腔注射共用物+结节内注射益生菌组分。各组均用药 2 次，每次间隔 2 天，注射量为 $150 \mu\text{l}$ /只/次，末次给药后第 7 天测量包含成纤维细胞的局部病变体积 (V)，并根据阴性对照组分别计算系列 A 和系列 B 的相对局部病变抑制率 (r'_A 、 r'_B)，还可根据疗效(局部病变抑制率)计算药效实际/预期比 q 。

表 9 不同药物、给药方式的相对局部病变抑制率数据

组别	药物类别	具体组分	r'_A		r'_B	
			$V(x \pm s_{\text{cm}^3})$	r'	$V(x \pm s_{\text{cm}^3})$	r'
01	阴性对照物	生理盐水	1.357 ± 0.208	0	1.431 ± 0.194	0
02	细胞毒阳性对照物	1%5-氟尿嘧啶水溶液	1.225 ± 0.211	9.7%	1.226 ± 0.217	14.3%
03	-免疫增强阳性对照物	药用香菇多糖注射液(金陵药业股份有限公司)	1.288 ± 0.193	5.1%	1.332 ± 0.211	6.9%
04	非特异性细胞毒阳性/局部作用阳性对照物	无水乙醇	1.300 ± 0.197	4.2%	1.078 ± 0.221	24.7%
1	灭活益生菌	5%热灭活布拉氏酵母菌水悬液	1.278 ± 0.201	5.8%	1.123 ± 0.216	21.5%
2	益生菌组分半流体	5%β-葡聚糖经加热后降温处理形成的半流体	1.295 ± 0.207	4.6%	0.990 ± 0.193	30.8%

3	益生菌水溶性组分 1	5%水溶性酿酒酵母菌 β -葡聚糖水溶液	1.310 ± 0.213	3.5%	0.985 ± 0.207	31.2%
4	益生菌水溶性组分 2	20%酿酒酵母菌核糖核酸水溶液	1.320 ± 0.179	2.7%	0.943 ± 0.195	34.1%
11	染色剂	1%亚甲蓝水溶液	1.288 ± 0.205	5.1%	1.020 ± 0.210	28.7%
12	染色剂/细胞毒药物	1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	1.229 ± 0.191	9.4%	0.839 ± 0.189	41.4%
21	灭活益生菌+染色剂/细胞毒药物	5%热灭活布拉氏酵母菌水悬液+1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	0.810 ± 0.137	40.3%	1.056 ± 0.147	26.2%
22	益生菌组分半流体+染色剂/细胞毒药物	5% β -葡聚糖经加热后降温处理形成的半流体+1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	0.790 ± 0.142	41.8%	1.013 ± 0.151	29.2%
23	益生菌水溶性组分1+染色剂/细胞毒药物	5%酵母菌 β -葡聚糖水溶液+1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	0.818 ± 0.151	39.7%	1.078 ± 0.161	24.7%
24	益生菌水溶性组分2+染色剂/细胞毒药物	20%酿酒酵母菌核糖核酸水溶液+1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	0.824 ± 0.149	39.3%	0.920 ± 0.157	35.7%
31	灭活益生菌/染色剂/细胞毒药物	5%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水悬液	1.247 ± 0.186	8.1%	0.448 ± 0.193	68.7%
32	益生菌组分半流体/染色剂/细胞毒药物	5% β -葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水悬液经加热后降温处理形成的半流体	1.219 ± 0.179	10.2%	0.341 ± 0.173	76.2%
33	益生菌水溶性组分1/染色剂/细胞毒药物	5%水溶性酿酒酵母菌 β -葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	1.224 ± 0.203	9.8%	0.202 ± 0.217	85.9%
34	益生菌水溶性组分2/染色剂/细胞毒药物	20%酿酒酵母菌核糖核酸/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	1.250 ± 0.197	7.9%	0.283 ± 0.219	80.2%

本实施例中组别 02 中 5-氟尿嘧啶以针对肿瘤瘤体有效的剂量给药作为细胞毒阳性对照物；组别 02 中香菇多糖注射液以 10 倍的临床最大剂量给药作为免疫增强对照物，组别 04 中无水乙醇作为非特异性细胞毒阳性/局部作用阳性对照物，所述无水乙醇在非临床条件下显示非特异性细胞毒阳性，而在临床条件下只显示局部作用阳性，所述临床条件是指临床安全性和顺应性上可接受的常规条件，如一个疗程（40 天）中注射次数小于 10 次，而非临床条件是指远离临床安全性和顺应性的常规条件，如细胞试验条件或一个疗程（40 天）中注射次数大于 10 次。

由上表可知，组别 03 中的药物在系列 A、B 中的抑瘤率均小于 15%，符合其仅用作辅助治疗药物

起到免疫增强的药理预期。组别 04 的药物经腹腔注射后的抑瘤率 $r < 15\%$ ，而经瘤内注射的抑瘤率 $r > 15\%$ ，存在一定的治疗作用，也合乎其虽可能在极端条件下显示非特异性细胞毒作用药理、但在通常条件下只显示局部作用药理 ($E_{B04}/E_{A04} > 200\%$) 的预期。组别 02 的药物经腹腔注射后的抑瘤率 $r < 15\%$ ，明显小于其在实施例 2 中的药效，符合细胞毒作用的药理预期，但经瘤内注射后的药效却明显更高 ($E_{B02}/E_{A02} > 200\%$)，显示出类似于乙醇的局部作用且超出细胞毒作用的药理预期。

组别 1-4 中的药物经腹腔注射的药效与组别 01-04 一致，益生菌组分可能存在的免疫增强作用、细胞毒作用或其它经全身给药提供的任何作用均未超出对照药物 01-04 的药理预期。然而组别 1-4 中的药物经瘤内注射的药效远高于腹腔注射的药效 ($E_B/E_A > 200\%$)，呈现出明显不同的新药理。实际上组别 1-4 中药物的药效与对照药物 01-04 相类似，在常规条件下仅显示局部作用。同样的，组别 11、12 的药物也显示出与对照药物 04 相类似的药效和药理。

在组别 21-24 的组合物经不同给药方式后显示的瘤内注射、腹腔注射的 q 都不大于 1.0，说明非局部给药剂型中的益生菌组分 (X) 与共用物 (Y) 以不同方式给药形成的组合物 (X+Y) 的共用药效并未超过其单用药效的加和预期，二者共用时不存在协同作用；而在组别 31-34 中，当使用相同组成物 (X、Y) 的局部给药剂型 (混合共用药物) 经腹腔注射后 q 均都不大于 1.0，而经病变内注射后 q 均大于 1.00，显示出局部协同作用。

实施例 7：局部协同作用药理研究及量比优化

以裸小鼠为实验对象，采用人肝癌细胞 (HepG2) 为建模细胞，将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模，建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 155.7 mm^3 ，将模型动物随机分为 13 组，按表 10 的药物进行给药，相关药物均为含水液体，按实施例 1 的方法配置而成；各组均用药 1 次，注射量为 $150 \mu\text{l}$ /只/次，给药后第 7 天对动物进行安乐死，解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重，并根据阴性对照组计算抑瘤率，还可根据疗效 (抑瘤率) 计算药效实际/预期比 q 。

表 10 不同组别的瘤重、抑瘤率数据

组号	研究药物	瘤重 ($\bar{x} \pm s_{\text{g}}$)	抑瘤率
01	(生理盐水)	0.261 ± 0.098	-
1	0.2% 益生菌组分	0.231 ± 0.113	11.5%
2	0.5% 益生菌组分	0.208 ± 0.109	20.3%
3	10% 益生菌组分	0.149 ± 0.091	43.1%
4	20% 益生菌组分	0.127 ± 0.085	51.4%
5	10% 碳酸氢钠/4.3% 氢氧化钠	0.032 ± 0.021	87.6%
6	7% 碳酸氢钠/3% 氢氧化钠	0.064 ± 0.036	75.4%
7	0.7% 碳酸氢钠/0.3% 氢氧化钠	0.175 ± 0.088	33.1%
8	0.2% 碳酸氢钠/0.09% 氢氧化钠	0.228 ± 0.104	12.5%

9	0.2%益生菌组分/10%碳酸氢钠/4.3%氢氧化钠	0.038±0.044	85.6%
10	0.5%益生菌组分/7%碳酸氢钠/3%氢氧化钠	0.013±0.012	95.1%
11	10%益生菌组分/0.7%碳酸氢钠/0.3%氢氧化钠	0.048±0.018	81.7%
12	20%益生菌组分/0.2%碳酸氢钠/0.09%氢氧化钠	0.096±0.079	63.4%

碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲系统使单独氢氧化钠的溶液由 pH>12.5 降至 11 左右,通常认为 pH 降低不利于局部化学作用。由上表可知,组别 9 的实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 $q < 1.00$, 其中的药物组合物未显示出协同作用,而组别 10、11、12 中的药物组合物的 pH 分别为 pH10±1.0 或 pH4±1.0, 它们的实际共用作用/理论单纯相加预期作用比 q 均大于 1.00, 均显示出协同作用,其协同量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{共用物}}$) 为 (0.2-20)/(0.29-14.3)。

以裸小鼠为实验对象,采用人肝癌细胞 (HepG2) 为建模细胞,将 1×10^6 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模,建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 163.2 mm^3 ,将模型动物随机分为 13 组,按表 11 的药物进行给药,相关药物均为含水液体,按实施例 1 的方法配置而成,其中益生菌组分为灭活酿酒酵母菌,弱局部作用化合物为亚甲蓝;各组均用药 2 次,用药间隔为 7 天,注射量为 $150 \mu\text{l}$ /只/次,末次给药后第 7 天对动物进行安乐死,解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重,并根据阴性对照组计算抑瘤率。

表 11 不同组别的瘤重、抑瘤率数据

组号	研究药物	瘤重 ($\bar{x} \pm s_{\text{g}}$)	抑瘤率
01	(生理盐水)	0.253±0.117	—
1	0.2%益生菌组分	0.240±0.109	5.3%
2	0.5%益生菌组分	0.207 ±0.105	18.1%
3	10%益生菌组分	0.155±0.070	38.6%
4	20%益生菌组分	0.144±0.081	43.1%
5	3%亚甲蓝	0.073±0.033	71.1%
6	1%亚甲蓝	0.186 ±0.096	26.4%
7	0.50%亚甲蓝	0.208±0.115	17.7%
8	0.15%亚甲蓝	0.227±0.107	10.1%
9	0.2%益生菌组分/3%亚甲蓝	0.063±0.026	75.2%
10	0.5%益生菌组分/1%亚甲蓝	0.112±0.094	55.9%
11	10%益生菌组分/0.50%亚甲蓝	0.071±0.031	71.8%
12	20%益生菌组分/0.15%亚甲蓝	0.111±0.062	56.1%

由上表可知,组别 9 中的组合物均未显示出协同作用 ($q < 1.00$),而组 10、11、12 中的组合物却显示出协同作用 (q 分别为 >1.00),且其协同量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{共用物}}$) 为 (0.2-20)/(0.15-1.0),说明益

生菌组分提供局部化学协同作用与弱局部作用化合物提供的局部化学作用强弱无关。

以裸小鼠为实验对象，采用人肝癌细胞（HepG2）为建模细胞，将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模，建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 168.7 mm^3 ，将模型动物随机分为 13 组，按表 12 的药物进行给药，相关药物均为含水液体，按实施例 1 的方法配置而成，其中益生菌组分为破碎酿酒酵母菌上清组分，弱局部作用化合物为赖氨酸；各组均用药 2 次，用药间隔为 7 天，注射量为 $150 \mu\text{l}$ /只/次，末次给药后第 7 天对动物进行安乐死，解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重，并根据阴性对照组计算抑瘤率。

表 12 不同组别的瘤重、抑瘤率数据

组号	研究药物	瘤重 ($\bar{x} \pm s_{\text{g}}$)	抑瘤率
01	(生理盐水)	0.238 ± 0.191	—
1	0.2%益生菌组分	0.230 ± 0.106	3.2%
2	0.5%益生菌组分	0.199 ± 0.099	16.4%
3	10%益生菌组分	0.126 ± 0.061	47.1%
4	20%益生菌组分	0.111 ± 0.065	53.4%
5	25%赖氨酸	0.109 ± 0.074	54.1%
6	20%赖氨酸	0.134 ± 0.073	43.6%
7	5%赖氨酸	0.211 ± 0.091	11.3%
8	1%赖氨酸	0.226 ± 0.112	5.2%
9	0.2%益生菌组分/25%赖氨酸	0.093 ± 0.020	61.1%
10	0.5%益生菌组分/20%赖氨酸	0.076 ± 0.038	67.9%
11	10%益生菌组分/5%赖氨酸	0.065 ± 0.026	72.6%
12	20%益生菌组分/1%赖氨酸	0.094 ± 0.055	60.3%

由上表可知，组别 9 中的组合物均未显示出协同作用 ($q > 1.00$)，而组 10、11、12 中的组合物却显示出明显的协同作用 (q 分别为 > 1.00) 且其协同量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{共用物}}$) 为 $(0.2-20)/(1-25)$ ，同样说明益生菌组分提供局部化学协同作用与弱局部作用化合物提供的局部化学作用强弱无关。

以裸小鼠为实验对象，采用人胰腺癌细胞（PANC-1）为建模细胞，将 1×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模，建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 157.3 mm^3 ，将模型动物随机分为 13 组，按表 13 的药物进行给药，相关药物均为含水液体，按实施例 1 的方法配置而成，其中益生菌组分为破碎酿酒酵母菌上清组分，化疗药物为吉西它滨；各组均用药 1 次，注射量为 $100 \mu\text{l}$ /只/次，用药后第 7 天对动物进行安乐死，解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重，并根据阴性对照组计算抑瘤率。

表 13 不同组别的瘤重、抑瘤率数据

组号	研究药物	瘤重 ($\bar{x} \pm s_{\text{g}}$)	抑瘤率
----	------	-----------------------------------	-----

01	(生理盐水)	0.294 ± 0.189	—
1	0.2%益生菌组分	0.284 ± 0.115	3.3%
2	0.5%益生菌组分	0.278 ± 0.109	5.6%
3	10%益生菌组分	0.161 ± 0.080	45.1%
4	20%益生菌组分	0.140 ± 0.096	52.4%
5	5%吉西它滨	0.191 ± 0.077	35.1%
6	2.5%吉西它滨	0.204 ± 0.103	30.4%
7	0.1%吉西它滨	0.271 ± 0.114	7.8%
8	0.05%吉西它滨	0.278 ± 0.101	5.6%
9	0.2%益生菌组分/5%吉西它滨	0.172 ± 0.062	41.4%
10	0.5%益生菌组分/2.5%吉西它滨	0.107 ± 0.069	63.7%
11	10%益生菌组分/0.1%吉西它滨	0.101 ± 0.070	65.6%
12	20%益生菌组分/0.05%吉西它滨	0.117 ± 0.073	60.2%

同样的，组别 9 中的组合物均未显示出协同作用 ($q < 1.00$)，而组 10、11、12 中的组合物却显示出明显的协同作用 (q 分别为 > 1.00) 且其协同量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{共用物}}$) 为 $(0.2-20)/(0.05-2.5)$ ，也说明益生菌组分提供局部化学协同作用与弱局部作用化合物提供的局部化学作用强弱无关。

所述药物组合物中益生菌组分协同量比不是免疫增强协同所需，而是局部协同作用所需，因此是药理量比。优选的，所述益生菌组分与所述化学活性化合物共用时的药理量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{化学活性化合物}}$) 为 $(1-110)/(1-100)$ 。若所述化学活性化合物为细胞毒药物时，则 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{细胞毒药物}}$) 为 $(1-110)/(1-100)$ ；若所述化学活性化合物为弱局部作用化合物时，则 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{弱局部作用化合物}}$) 为 $(1-90)/(1-100)$ ；若所述弱局部作用化合物为氨基酸营养素时，则 $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{氨基酸营养素}}$ 为 $(1-20)/(1-100)$ ；若所述弱局部作用化合物为活体染料时，则 $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{活体染料}}$ 为 $(7-90)/(1-100)$ ；若所述弱局部作用化合物为酸化剂和/或碱化剂时，则 $W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{酸化剂或/和碱化剂}}$ 为 $(2-60)/(1-100)$ 。

实施例 8：局部协同作用药理研究及药理浓度优化

以裸小鼠为实验对象，采用人胰腺癌细胞 (PANC-1) 为建模细胞，将 1×10^6 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模，建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 152.8 mm^3 ，将模型动物随机分为 10 组，按表 14 的药物、剂量进行瘤内注射给药，相关药物均为液体制剂，益生菌组分为破碎酿酒酵母菌上清组分，化学活性化合物为精氨酸，按实施例 1 的方法配置而成；各组均用药 1 次，用药后第 7 天对动物进行安乐死，解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重，并根据阴性对照组计算抑瘤率。

表 13 不同药物、剂量的瘤重、抑瘤率数据

组别	药物	注射剂量 μl	瘤重 ($\bar{x} \pm s$, g)	抑瘤率
0	生理盐水	100	0.246 ± 0.123	—
1	0.1%益生菌组分	100	0.218 ± 0.096	11.3%

2	0.25%益生菌组分	200	0.189 ± 0.069	23.1%
3	0.5%益生菌组分	500	0.169 ± 0.088	31.4%
4	2%精氨酸	100	0.226 ± 0.104	8.1%
5	5%精氨酸	200	0.210 ± 0.113	14.7%
6	10%精氨酸	500	0.193 ± 0.075	21.4%
7	0.1%益生菌组分/2%精氨酸	100	0.206 ± 0.082	16.3%
8	0.25%益生菌组分/5%精氨酸	200	0.146 ± 0.091	40.7%
9	0.5%益生菌组分/10%精氨酸	500	0.089 ± 0.020	63.9%

由上表可知, 组别 7-9 是将相同组分、量比但浓度不同的益生菌组分/化学活性化合物注射入相同体积瘤体内, 其中组别 7 的药物组合物未显示协同作用 ($q < 1.00$), 而组别 8 的药物组合物则显示出明显的协同作用 ($q > 1.00$), 组别 9 的结果 ($q > 1.00$) 则进一步表明该协同作用存在给药浓度依赖性。

通常若药物组合物具有相同的活性成分的量比、给药剂量, 则其药物共用效应相同; 而益生菌组分可通过提供不同共用药理而获得不同共用药效。即使瘤内给药, 相同剂量不同给药浓度的益生菌组分的药效差异甚至可以超过动力学差异预期 (表 13 中 $F_2/F_1 > 200\%$)。

以上试验进一步证实, 本发明益生菌组分/共用物组合物通过局部病变内给药获得的短期药效主要来自它们混合共用产生的局部协同作用, 其中所述益生菌组分提供上述协同作用的药理浓度为其在以上实施例中提供局部作用的浓度, 因而所述益生菌组分与其共用物产生该局部协同作用的药理结构并非它们之间的量比而是它们之间的浓度比 (上述协同量比+益生菌组分提供局部作用所需浓度)。

以上实施例中提供该局部协同作用的浓度, 亚甲蓝类染料为其产生较弱局部作用的浓度 (0.5-1.5%), 其它弱局部作用化合物则为其产生较强局部作用的浓度 (1-35%), 细胞毒药物为其产生最大化普通局部化学作用的浓度 (0.1-5%)。

与其局部作用相关, 本发明益生菌组分/共用物组合物也优选按实施例 4 中所述给药体积/靶区体积比给药。

实施例 9: 普通动物模型中病变区给药的短期单用/共用药理研究及优化

以 BALB/c 小鼠为实验对象, 采用乳腺癌 4T1 细胞为建模细胞, 将 0.5×10^6 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模, 建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 160.1 mm^3 , 将模型动物随机分为 21 组, 按表 14 的药物、剂量分别进行静脉注射 (系列 A)、瘤内注射 (系列 B) 给药, 其中所给药物均为液体制剂, 按实施例 1 的方法配置而成; 各组均用药 2 次, 末次用药后第 7 天对动物进行安乐死, 解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重, 并根据系列 A 和系列 B 中相应的阴性对照组计算抑瘤率 r_A 和 r_B 。

表 14 不同药物组合、给药方式对瘤重、抑瘤率的影响

组别	药物类型	组成	r_A	r_B
01	阴性对照物	生理盐水	—	—
1	细胞毒阳性对照物	1%5-氟尿嘧啶	38.1%	44.1%

2	非特异性细胞毒阳性/局部作用 阳性对照物	75%乙醇	2.8%	21.3%
3	免疫增强阳性对照物	4×10^4 U/ml 白细胞介素-12	5.3%	4.6%
4	弱局部作用化合物	1%亚甲蓝	3.7%	13.4%
5	灭活益生菌	10%热灭活布拉氏酵母菌	1.6%	25.1%
6	益生菌半流体类组分	10% β -葡聚糖微粒经加热后降温处理形成的半流体	—	27.3%
7	益生菌水溶性组分	10%破碎布拉氏酵母菌上清组分	—	23.5%
8	益生菌(水不溶/水溶)组分混合物	10%破碎布拉氏酵母菌	—	26.7%
9	灭活益生菌/弱局部作用化合物	10%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝	2.4%	61.8%
10	益生菌半流体类组分/弱局部作用化合物	10% β -葡聚糖微粒/1%亚甲蓝经加热后降温处理形成的半流体	—	65.4%
11	益生菌水溶性组分/弱局部作用化合物	10%破碎布拉氏酵母菌上清组分/1%亚甲蓝	—	60.3%
12	益生菌混合物/弱局部作用化合物	10%破碎布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝	—	62.1%
13	灭活益生菌/弱局部作用化合物/细胞毒药物	10%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶	—	98.6%

实体肿瘤的药物化疗中,化疗药物进入靶区就可以攻击其靶,从而在短期内即显示出化疗药效。由表 14 可知,组别 1-5 的药物在普通动物模型中显示的疗效和药理行为与实验 2 中相应药物在免疫缺陷动物模型的结果一致,分别符合细胞毒作用、化学消融、免疫增强、和类化学消融的局部作用药理。

组别 9 的药物在普通动物模型中显示的疗效($r_{9B} > r_{4B}$ 和 $r_{9B} > r_{5B}$)、共用作用($q > 1.00$)和共用行为($r_{9B}/r_{9A} > 200\%$)与实验 5 中相应药物在免疫缺陷动物模型的结果一致,即益生菌组分在上述提供局部作用的条件下还可以向弱局部作用化合物提供局部药效协同作用和局部安全性协同作用。组别 10-13 的结果对此进一步证实。

下述实验给出一个以动物正常组织为局部病变模型的研究例:

以 BALB/c 小鼠为实验对象,将模型动物随机分为 4 组,每组 6 只,按表 15 的药物进行给药;各组均用药 1 次,给药至右腿外侧肌肉块内,注射量 100 μ l/只,给药后第 7 天对动物进行安乐死,解剖取出小鼠右腿外侧肌肉块标本,并进行大体病理分析,切片测量区别于正常肌肉的异常区域面积,如坏死、结节等。

表 15 各组的用药组分

组别	药物类型	具体组分	异常区域面积 mm^2
1	化学消融剂	75%乙醇水溶液	33.16 ± 13.44
2	益生菌组分	10%热灭活布拉氏酵母菌	34.01 ± 14.24
3	益生菌组分/化学活性物质	10%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝	49.61 ± 23.27

4	益生菌组分/化学活性物质 1/化学活性物质 2	10%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶	78.00±4.31
---	-------------------------	-----------------------------	------------

上述试验和其它类似试验的短期药效结果显示, 本申请所述益生菌组分作为局部活性成分在普通动物模型中与在实施例 2-8 的免疫缺陷动物模型中有一致的药理, 均是通过提供局部作用或局部协同作用对药理靶(药物渗透区内的组织)进行破坏。

根据以上实施例 2-9 的结果以及其它类似试验的结果, 用于局部病变内时, 包含益生菌组分及其共用物的本发明局部药物组合物(简称现本发明组合物)在以下方面超过现有技术中任何可预期的包含益生菌组分/共用物的非局部药物组合物(简称现有技术组合物)的预期:

1)、其共用药理超预期: 本发明组合物中的益生菌组分与其共用物是局部活性组分之间的共用, 其共用药理包括它们各自局部作用的共用, 其所产生的短期协同作用主要为局部协同作用, 超过了现有技术中益生菌组分与其共用物之间的任何涉及与其非局部活性(例如免疫作用、抗病毒作用、肿瘤细胞毒作用、或瘤体血管破坏作用等)共用的药理预期;

2)、其药理方法超预期: 本发明组合物中的益生菌组分与其共用物必须严格限定于皆为局部给药才能产生短期协同作用, 而现有技术任何可预期的益生菌组分与共用物的共用药理方法则不必限于局部给药、优选为全身性给药;

3)、其活性组分的优选方案超预期: 在组分种类数目优选上, 本发明组合物优选 3 或更多(例如益生菌组分/弱局部作用化合物/细胞毒药物), 尽管 2 组分协同组合物(例如益生菌组分/弱局部作用化合物)已超出预期。在共用物种类的选择上, 益生菌组分出人意料地并未向乙醇、却可以向弱局部作用化合物或/和细胞毒药物提供局部协同作用。在具体药物优选上, 除了益生菌组分为提供局部作用的前述优选方案外, 共用物也优选包含主要提供局部作用而非全身性作用的弱局部作用化合物的一种或多种药物, 例如弱局部作用化合物中的一种或多种、弱局部作用化合物和细胞毒药物、弱局部作用化合物和免疫增强剂、等等;

4)、其活性组分间的共用药理结构预期: 本发明组合物必须包括益生菌组分的局部作用药理浓度, 因而其共用药理结构参数为浓度比而非现有技术组合物中的量比。益生菌组分提供共用作用的药理浓度为其在以上实施例中提供局部作用的浓度。所述弱局部作用化合物的药理浓度分别为: 氨基酸类营养剂为 5-25%、亚甲蓝类染料为 0.5-3%或 0.5-1.5%、奎宁类药物为 3-10%、弱酸为 3-20%、强碱为 1-10%、弱碱为 1-20%、酸化剂或/碱化剂的 pH 缓冲系统总浓度为 3-25%;

5)、其技术效果超预期: 本发明组合物可提供现有技术组合物所不能提供的局部活性(局部作用或局部协同作用), 至少在给药区域内提供现有技术组合物所不能提供的较高局部治疗效果。优选的, 本申请的药物组合物可用于任何病变组织(如包含肿瘤细胞或/和成纤维细胞)的破坏性治疗(如瘤体减荷)。更优选的, 本申请的药物组合物可用于任何全身性药物(细胞毒药物、抗病毒药物、抗细菌药物、血管抑制药物、免疫药物等)难以治疗、而病变内给药又切实可行的局部病变的治疗。

实施例 10: 普通动物模型中病变区给药的中长期单用/共用药理研究及优化

以 BALB/c 小鼠为实验对象, 采用乳腺癌 4T1 细胞为建模细胞, 将 0.5×10^6 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模, 建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 107.4 mm^3 , 将模型动物随机分为 17 组;

按表 16 的药物进行给药, 其中的药物按实施例 1 的方法配置而成; 各组均用药 2 次, 每次间隔 7 日; 组别 13、14 的给药量为 300 μ l/只/次, 其它组为 100 μ l/只/次; 组别 15 的给药方式为右前肢腋下给药, 其它组为瘤内注射给药; 组别 16 为序贯给药(首次给药为益生菌半流体类组分/细胞毒药物/弱局部作用化合物, 末次给药为灭活益生菌), 其它组两次给药均为同一药物。末次用药后第 7、21 天分别测量各组瘤体体积 (V_{7d} 、 V_{21d}), 并从阴性对照组分别计算用药后第 7、21 天的相对瘤体增值率 (R_{7d} 、 R_{21d}), 从而可分别算出短期疗效($100\%-R_{7d}$) 和中长期疗效($100\%-R_{21d}$)。

表 16 不同药物用药后第 7、21 天的抑瘤结果

组别	药物类别	具体组分	R_{7d}	R_{21d}
01	阴性对照物	生理盐水	=	=
1	细胞毒阳性对照物	1%5-氟尿嘧啶	51%	93%
2	非特异性细胞毒阳性/局部作用阳性对照物	85%乙醇	47%	95%
3	免疫增强阳性对照物	4×10^4 U/ml 白细胞介素-12	95%	96%
4	弱局部作用化合物	1%亚甲蓝	87%	105%
5	灭活益生菌	2.5%热灭活布拉氏酵母菌	76%	61%
6	益生菌半流体类组分	5% β -葡聚糖微粒经加热后降温处理形成的半流体	71%	65%
7	益生菌水不溶/水溶性组分混合物	2.5%破碎布拉氏酵母菌	73%	63%
8	灭活益生菌/细胞毒药物	2.5%热灭活布拉氏酵母菌/1%5-氟尿嘧啶	50%	51%
9	益生菌半流体类组分/细胞毒药物	5% β -葡聚糖微粒/1%5-氟尿嘧啶经加热后降温处理形成的半流体	47%	53%
10	益生菌水溶性组分/细胞毒药物	2.5%破碎布拉氏酵母菌/1%5-氟尿嘧啶	43%	48%
11	灭活益生菌/细胞毒药物/弱局部作用化合物	2.5%热灭活布拉氏酵母菌/1%5-氟尿嘧啶/1%亚甲蓝	23%	12%
12	益生菌半流体类组分/细胞毒药物/弱局部作用化合物	5% β -葡聚糖微粒/1%5-氟尿嘧啶/1%亚甲蓝经加热后降温处理形成的半流体	22%	11%
13	益生菌半流体类组分稀释物	1 体积 5% β -葡聚糖微粒经加热后降温处理形成的半流体加 2 体积水的稀释物	93%	92%
14	益生菌半流体类组分/细胞毒药物稀释物	1 体积 5% β -葡聚糖微粒/1%5-氟尿嘧啶经加热后降温处理形成的半流体加 2 体积水的稀释物	71%	93%
15	益生菌半流体类组分	5% β -葡聚糖微粒经加热后降温处理形成的半流体	95%	94%
16	灭活益生菌+益生菌半流体类组分/细胞毒药物/弱局部作用化合物	5% β -葡聚糖微粒/1%5-氟尿嘧啶/1%亚甲蓝经加热后降温处理形成的半流体、和 2.5%热灭活布拉氏酵母菌	27%	22%

众所周知, 化疗药物的效应动力学特征为药物在攻击在、药物代谢后则攻击不再, 而免疫增强剂的药物效应几乎显示不出瘤体变化。组别 1、2 在第 21、7 天的相对瘤体增值率 R 的比值(R_{21}/R_7) 大于 1.50, 表明短期药物效应的抑瘤效果明显减小。组别 3 的相对瘤体增值率一直很高, 符合单独使用免疫增强剂

并不显示明显疗效的预期。组别 1-3 中的阳性对照物(5-氟尿嘧啶、乙醇、白细胞介素-12)显示的中长期药效合乎其药理(分别为细胞毒药理、免疫增强药理、局部作用药理)预期的效应动力学(R_{21}/R_7)构建了一个比较研究系统。

组别 1-7 的药物组合物在第 7 日的短期药效与实施例 9 中的结果一致,。组别 5-7 中的益生菌组分的短期药效合乎其作为类似于组别 2 中的化学消融剂的局部活性成分的预期,似乎也理应显示与组别 2 中的化学消融剂一致的中长期药效。出人意料地,益生菌组分显示出完全不同的效应动力学(R_{21}/R_7 明显小于 100%),大大地超出所有阳性对照物药理的中长期药效预期。不同益生菌组分显示出几乎相同的效应动力学,独立于它们的细菌免疫原性。具有类似情况的还有组别 8-12,其中的益生菌组分/共用物显示出局部协同作用($q_{7d}>1.00$)、中长期协同作用($q_{21d}>1.00$)、和完全不同于上述阳性对照物的效应动力学($R_{21}/R_7<100\%$)。

组别 13 与组别 5 (给药组分、剂量相同)相比,益生菌组分给药浓度不是其局部作用药理的优选浓度,显示为短期药效差异大于 200%。组别 14 与组别 6 (给药组分及量比、剂量相同)相比,组合物给药浓度不是其局部协同作用药理的优选浓度,也显示为短期药效差异大于 200%。而组别 13、14 的中长期药效(R_{21})也大大不如组别 5、6。更进一步,组别 13、14 的效应动力学(R_{21}/R_7 近似或大于 100%)明显不同于组别 5、6 (R_{21}/R_7 明显小于 100%)。组别 15 的结果则类似于组别 13,似乎益生菌组分在病变外的局部作用(短期药效)及其次生作用(中长期药效、效应动力学)同样太弱。组别 16 序贯给药的组合物(益生菌半流体类组分/细胞毒药物/弱局部作用化合物、灭活益生菌各一次)的中长期药效在二次给药二种相同药物(灭活益生菌和益生菌半流体类组分/细胞毒药物/弱局部作用化合物,它们在组 5、12 中显示不同的短期(局部作用)疗效)之间,进一步说明这类药物的中长期疗效与其短期(局部作用)疗效相关。

上述结果表明,组别 5-12 的益生菌组分显示出超出组别 1-3 药理、甚至于超出其简单局部作用药理预期的中长期作用,也就是与化学作用或免疫增强作用不同的新药理。该新药理的产生至少须满足上述实施例 2-4 中局部作用药理条件(包括优选细菌免疫原性最小化的益生菌组分、等),因而可以合理推出其为该局部作用的次生(协同)作用。

综上,本申请的组合物经病变内给药后的短期作用主要为局部作用(或局部协同作用),长期作用则主要为局部作用(或局部协同作用)产生的次生作用,例如次生免疫作用。本申请的组合物完全不同于疫苗等免疫药物,其中起抗原作用的物质包括给药后产生的原位抗原等原位免疫物质。此外,益生菌组分如同其它外源物质一样还可能具有非特异性抗原作用,用于加强该原位免疫物质的药效。

本申请的组合物具有包括局部作用(或局部协同作用)及其次生免疫作用的化学/免疫药理功能,从而大大超过现有技术关于益生菌组分的药效预期,成为治疗药物而非现有技术的免疫增强剂;通过限定局部病变内给药、局部作用浓度阈值、局部作用体积阈值、局部协同组合物等可对任何任何局部病变疾病提供有效治疗;避免细胞毒药物所必须的一个疗程内高频次大剂给药,安全性高和顺应性好。本申请的组合物可用于细胞毒药物、抗病毒药物、抗细菌药物、血管抑制药物、免疫药物等难以治疗的局部病变疾病的治疗,例如间质比大于 25%的实体肿瘤。相对于其他药物,本申请所述的组合物除用作组织毒/免疫药物,还可以将成纤维细胞作为作用靶点用于治疗上述适应症,而成纤维细胞及其产生的纤维等沉积物往往是难治性局部病变疾病的主要特点之一。

实施例 11：普通动物模型中病变区外局部给药的单用/共用药理研究及优化

尽管在实施例 9 中通过瘤外给药的药效不明显，但瘤外给药的研究仍未放弃。以 BALB/c 小鼠为实验对象，采用乳腺癌 4T1 细胞为建模细胞，将 0.25×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模。建模后第 5 日，将目测明显出瘤的试验动物随机分为 12 组，每组 10 只，按表 17 的药物、剂量进行给药，其中的药物按实施例 1 的方法配置而成；组别 10、11 为一日二处给药不同药物（益生菌组分/共用物组合物进行瘤内给药，同日将益生菌组分单药于动物左侧腋下皮内给药），其它组均两次于动物腋下皮内给药，每次间隔 7 日，每次均为同一药物。自组别 1-11 的末次给药后第 7、21 日分别测量瘤体体积 (V_{7d} 、 V_{21d})，并从阴性对照组分别计算用药后第 7、21 天的相对瘤体增值率 (R_{7d} 、 R_{21d})，从而可分别算出短期疗效 ($100\% - R_{7d}$) 和中长期疗效 ($100\% - R_{21d}$)，以及根据短期疗效和中长期疗效分别计算短期药效的实际/预期比 q_{7d} 和中长期药效的实际/预期比 q_{21d} 。

表 17 不同药物用药后第 7、21 天的抑瘤结果

组别	药物类别	具体组分	剂量	R_{7d}	R_{21d}
01	阴性对照物	生理盐水	120	—	—
1	细胞毒阳性对照物	1%5-氟尿嘧啶	120	73%	93%
2	局部作用阳性对照物	85%乙醇	120	92%	107%
3	免疫增强阳性对照物	4×10^4 U/ml 白细胞介素-12	120	99%	97%
4	弱局部作用化合物	20%耐氨酸	120	96%	102%
5	灭活益生菌	10%热灭活布拉氏酵母菌	120	94%	71%
6	益生菌水不溶颗粒	10% β -葡聚糖微粒	120	95%	75%
7	灭活益生菌/弱局部作用化合物	10%热灭活布拉氏酵母菌 /20%耐氨酸	120	97%	74%
8	灭活益生菌	10%热灭活布拉氏酵母菌	10	96%	95%
9	灭活益生菌/弱局部作用化合物	10%热灭活布拉氏酵母菌 /20%耐氨酸	10	93%	91%
10	益生菌组分单药+益生菌组分/共用物组合物	10%热灭活布拉氏酵母菌 +10%益生菌水不溶颗粒 /20%耐氨酸	120	14%	23%
11	益生菌组分单药+益生菌组分/共用物组合物	10%益生菌水不溶颗粒 +10%益生菌水不溶颗粒 /20%耐氨酸	120	11%	21%

*: 剂量 (μ l/只/次)

由表 17 可知，组别 1-3 中的阳性对照物(5-氟尿嘧啶、乙醇、白细胞介素-12)显示的结果合乎其药理(分别为细胞毒药理、免疫增强药理、局部作用药理)预期，均无法提供有意义的中长期药效。组别 5-7 的短期药效主要是局部作用或局部协同作用，其无意义结果与组别 2 一致。出人意料地，组别 5-7 观察到不可忽略的中长期药效，显示出大大不同于对照物组别 1-3 任何药理的新药理。使用常规疫苗剂量 (20mg/kg) 的组别 8、9 未能观察到与超常规疫苗剂量 (240mg/kg) 组别组 5、6 相同的中长期药效，显示出

后者的新药理与局部作用的关系更加密切。组别 10、11 瘤内给药益生菌组分/共用物组合物的同日瘤外给药益生菌组分单药, 它们的短期药效主要是瘤内局部协同作用, 而中长期药效则为该瘤内局部协同作用和组别 5、6 显示的瘤外局部作用的次生作用的共作用。

实验中观察发现, 组别 5、6 的在注射时大多数实验动物产生较强挣扎反应, 说明益生菌组分单药应在止痛条件下使用以避免安全性风险; 而组别 7 则难以解释地未观察到上述强烈反应, 说明益生菌组分与弱局部作用化合物和/或细胞毒药物的协同药物组合物具有超单药效应预期的安全性。

以下实施例对本申请的组合物在腋下皮下的局部作用进行进一步研究。

以 BALB/c 小鼠为实验对象, 随机分为 A、B 两组, 每组 6 只; 以 10% 热灭活布拉氏酵母菌和 10% 热灭活布拉氏酵母菌/20% 耐氨酸分别对 A、B 组用药, 各组均用药 1 次, 给药至右前腿腋下皮内, 注射量 100 μ l/只。用药后 7 日, 对动物进行安乐死, 解剖取出小鼠右前腿腋下皮内结节标本, 切片冲洗后测量区别于正常肌肉的异常区域的面积, 如坏死、结节等的横切面。

结果表明, A、B 的异常区域面积分别为 $30.15 \pm 11.31 \text{mm}^2$ 和 $45.74 \pm 13.71 \text{mm}^2$, 这与实施例 9 的结果相一致。本申请技术方案中的益生菌组分类似于高浓度乙醇, 经局部给药后首先显示的药效主要为局部作用(或局部协同作用), 其与实施例 2、5 和 9 中经瘤内给药后显示的局部作用(或局部协同作用)相一致, 主要是类似于化学消融的局部化学作用(或局部化学协同作用)。本申请的组合物经瘤外局部给药后的短期作用主要为对皮下药物渗透区组织的破坏, 中长期作用则主要是该破坏产生的次生作用。上表中组别 5-7 所观察到的中长期跨距作用说明该次生作用主要包括疫苗作用。因此, 本申请的组合物可提供完全不同于经典疫苗的瘤外疫苗作用, 其中起抗原作用的物质包括给药后组织破坏产出的非特异性抗原。此外, 与其它外源物质一样, 益生菌组分还具有非特异性抗原作用, 用于加强疫苗作用的药效。

由上可知, 用于局部病变外适当局部时, 本发明包含益生菌组分的组合物(本发明组合物)完全不同于通常的全身性作用药理(如以上细胞毒药理、免疫增强药理)或局部作用药理(如以上化学消融)组合物(通常组合物): 1)、目标药理: 本发明组合物可以提供足够强的局部作用的次生作用或次生协同作用(包括但不限于坏组织抗原作用及其它尚待研究的次生免疫反应), 这大大超过通常组合物的作用药理预期(例如化学消融所致几无影响的坏组织抗原作用); 2)、药理组成: 本发明组合物在局部病变外为产生足够强局部作用所必须满足的条件与以上实施例益生菌组分在局部病变内的局部作用药理组成相同, 这大大超过通常组合物的药理组成预期(如免疫原性较强甚至最大化的优选免疫增强组分、大剂量细胞毒药物优选、等等); 3)、技术效果: 本发明组合物可产生类似于治疗性疫苗的明显的中长期跨距抑制局部病变作用, 大大超过现有通常组合物的技术效果预期。

此外, 尽管目前尚无瘤外给药体积和瘤内靶区体积关系的发现, 但其给药体积的一个必要条件是能够形成作为抗原所需的结节, 如当瘤体总体积 $\geq 2.85 \text{cm}^3$, 则用药量 $> 0.01 \text{ml/kg}$ 人、 $0.015-0.25 \text{ml/kg}$ 人, 优选为 $0.020-0.25 \text{ml/kg}$ 人, 这就要求本申请中用于瘤外局部注射的包含益生菌组分的药物的给药体积为常规疫苗的给药体积的 2 倍或 3-100 倍, 优选 5-100 倍。

实施例 12: 次生(协同)作用进一步研究及方案优化

以 BALB/c 小鼠为实验对象, 其中以建模动物作为系列 A, 以不建模动物作为系列 B。建模动物采用乳腺癌 4T1 细胞为建模细胞, 将 0.25×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模, 建模成功裸

小鼠的瘤体平均体积为 173.6mm^3 ，将模型动物随机分为 18 组，每组 10 只，并按表 18 的药物经瘤内注射给药；另取 BALB/c 小鼠为实验对象，不建模直接将模型动物随机分为 18 组，每组 10 只，并按表 18 的药物经右后肢大腿肌肉内注射给药。含益生菌组分研究药物均为按实施例 1 的制备方法配置而成的含水剂，其它药物均为按现有公知的方法配置而成的水溶液；各组均给药 2 次，每次间隔 3 日，用药量：50ul/只/次。

系列 A 各组在第 1 次给药后第 10、30 日分别测量各组的瘤体体积并根据阴性对照计算瘤体抑制率 (r'_{10d} 、 r'_{30d})。系列 A 和系列 B 各组在第 1 次给药后第 30 日均在动物左侧前后腋部皮下分别以 1×10^5 个乳腺癌 4T1 细胞/只和 0.2×10^5 个成纤维 3T3 细胞/只进行细胞移植, 并在该细胞移植后第 10 日分别观测各组 4T1 细胞移植出瘤率 (S_{4T1}) 和 3T3 细胞移植出瘤率 (S_{3T3})。其中出瘤率 $S = (\text{出瘤动物数目} / \text{细胞移植动物数目}) \times 100\%$ 。

表 18 不同组别的抑瘤率、出瘤率数据

组别	药物组合类型	具体组分	系列 A				系列 B	
			r'_{10d}	r'_{30d}	S_{3T3}	S_{4T1}	S_{3T3}	S_{4T1}
01	阴性对照物	生理盐水	0	0	100%	100%	100%	100%
02	肿瘤细胞毒阳性对照物	1%5-氟尿嘧啶水溶液	38.5%	6.1%	100%	100%	100%	100%
03	免疫增强对照物	药用香菇多糖注射液-金陵药业股份有限公司	8.2%	5.7%	100%	100%	100%	100%
04	局部作用阳性对照物	无水乙醇	42.1%	3.2%	100%	100%	100%	100%
05	疫苗佐剂对照物	0.5%氢氧化铝佐剂悬浮水液	4.7%	3.9%	100%	100%	100%	100%
06	聚多糖对照物	5%淀粉水溶液	5.1%	4.7%	100%	100%	100%	100%
1	灭活益生菌	2.5%热灭活布拉氏酵母菌	33.5%	33.9%	100%	20%	100%	100%
2	益生菌组分半流体	5%β-葡聚糖经加热后降温处理形成的半流体	41.2%	40.1%	100%	20%	100%	100%
3	益生菌水溶性组分 1	5%羟甲基β-葡聚糖	43.5%	51.3%	100%	20%	100%	100%
4	益生菌水溶性组分 2	20%酿酒酵母菌核糖核酸水溶液	40.3%	52.7%	100%	20%	100%	100%
11	弱局部作用化合物/细胞毒药物-共用药 1	20%精氨酸/1%5-氟尿嘧啶水溶液	75.3%	5.4%	100%	100%	100%	100%
12	弱局部作用化合物/细胞毒药物-共用药 2	1%亚甲蓝/1%5-氟尿嘧啶水溶液	63.7%	9.1%	100%	100%	100%	100%
21	灭活益生菌/共用药 1	2.5%热灭活布拉氏酵母菌/20%精氨酸/1%5-氟	85.7%	68.5%	100%	0	100%	100%

		脲嘧啶水悬浮液						
22	灭活益生菌/共用药 2	2.5%热灭活布拉氏酵母菌/1%亚甲蓝/1%5-氟脲嘧啶水悬浮液	83 .2%	66 .9%	1 00%	0	1 00%	1 00%
23	益生菌组分半流体/ 共用药 1	5%β-葡聚糖/20%精氨酸/1%5-氟脲嘧啶水悬浮液经加热后降温处理形成的半流体	87.6%	74.1%	100%	0	100%	100%
24	益生菌组分半流体/ 共用药 2	5%β-葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟脲嘧啶水悬浮液经加热后降温处理形成的半流体	82.4%	73.4%	100%	0	100%	100%
25	益生菌水溶性组分 1/共用药 2	5%水溶性酿酒酵母菌β-葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氟脲嘧啶水溶液	89.2%	78.6%	100%	0	100%	100%
26	益生菌水溶性组分 2/共用药 2	20%酿酒酵母菌核糖核酸水溶液/1%亚甲蓝/1%5-氟脲嘧啶水溶液	91.3%	79.5%	100%	0	100%	100%

由表 18 可知, 系列 A 中的抑瘤率 r'_{10d} 、 r'_{30d} 分别表示药物在病变区给药产生针对局部病变的短期药效和中长期药效; 如前所述, 益生菌组分及其组合物的短期药效直接与局部作用有关, 而中长期药效, 尤其是明显高于化疗药物预期的中长期药效, 则与局部作用的次生作用或次生协同作用, 尤其是次生免疫作用有关。

在系列 A 中, 组别 02-06 中各对照物经瘤内注射给药后显示的药效均合乎它们各自的药理预期, 分别为细胞毒作用、免疫增强作用、化学消融作用、疫苗佐剂作用、条件局部作用(聚多糖), 其中的细胞毒作用(组别 02)和化学消融作用(组别 04)显示、而其它作用未显示短期药效(r'_{10d}), 而所有作用均未显示中长期药效(r'_{30d})。组别 1-4 中采用的益生菌组分单药则显示出明显的短期和中长期治疗作用。出人意料的是, 尽管其中的灭活益生菌的短期药效(r'_{10d})最高, 但其中长期药效(r'_{30d})却最低。

根据系列 A 中组合物(A/B)与相应组成物(A、B)的药效(r'_{10d} 、 r'_{30d}), 可计算出组合物共用的短期、中长期药效的实际/预期比(q_{10d} 、 q_{30d}), 其中 $q = r'_{A/B} / [r'_A + r'_B - (r'_A \times r'_B)]$ 。组别 21-26 中的益生菌组分/共用物形成的组合物的 q_{30d} 均大于 1.0, 甚至于大于 1.15, 其中长期药效大于组成物的中长期药效的加和预期, 药物共用时存在局部作用的次生协同作用。与上述组别 3-4 一致, 组别 22-26 的短期药效(r'_{10d})逊于组别 21, 它们的中长期药效(r'_{30d})却更高。

此外, 表 18 中 S_{3T3} 和 S_{4T1} 分别代表针对移植细胞 3T3 和 4T1 的移植排斥。组别 01-06 的对照物无论系列 A 或 B 中的 S_{3T3} 和 S_{4T1} 均为 100%, 说明均未产生免疫治疗作用。在系列 A 中, 组别 1-4 中使用的益生菌组分产生的免疫作用尚不足以完全抑制非病原(S_{3T3} 为 100%), 但足以清除或至少强烈抑制病原(S_{4T1} 远小于 100%), 具有明显的特异性。说明相关药物生成的短期(局部)作用局限于局部病变, 其中长期(次生)作用却并非局限于局部病变, 而是包括了治疗免疫作用。组别 21-26 的药物组合物产生的免疫作用分别与组别 1-4 中相应的益生菌组分一致, 而针对病原(4T1)的免疫作用却更强, 具有更低的出瘤率。

在系列 B 中, 组别 1-4 中的益生菌组分以及组别 21-26 中的组合物产生的非特异性免疫作用也都不足以强烈抑制任何移植细胞 (4T1 和 3T3)。

通过比较表中, 尤其是系列 A 的组合物 (A/B) 及相应的组成物 (A、B) 针对同种病原的移植排斥作用 $[S_{4T1} \text{ 或 } S'_{4T1} = (1 - S_{4T1})]$, 可计算组合物共用药效中的免疫共用作用的实际/预期比 $q_{4T1} = S'_{A/B4T1} / [S'_{A4T1} + S'_{B4T1} - (S'_{A4T1} \times S'_{B4T1})]$ 。其中组别 21-26 中组合物的实际/预期比 q_{4T1} 均大于 1.00, 显示出免疫协同作用, 尤其是特异性免疫协同作用。益生菌组分及包含其的组合物首先在病变处产生局部作用, 说明中长期药效中的免疫作用或免疫协同作用, 尤其是特异性免疫作用或特异性免疫协同作用, 应当是局部作用的一种环境依赖型的次生作用。

根据以上结果以及其它类似试验的结果, 用于局部病变治疗时, 本发明所述的包含益生菌组分的局部药物组合物 (简称本发明组合物) 在以下方面超过现有技术中的任何非特异性免疫治疗的药物组合物 (简称现有技术组合物, 例如上述细胞毒药物、免疫增强剂、化学消融剂、疫苗佐剂、条件局部作用药物、等等) 的预期:

1)、其药理超预期: 本发明组合物的药理尤其是中长期药理包括现有技术组合物所没有的特殊局部作用 (或局部协同作用) 的次生作用 (或次生协同作用)、尤其是病原特异性免疫作用;

2)、其药理组成超预期: 在以上实施例益生菌组分局部作用药理组成基础上, 可以并不需要益生菌组分提供的局部作用最大化、甚至优选局部作用最小化, 如益生菌组分优选为选自细菌免疫原性和局部作用都很微弱的组分 (水溶性组分和半流体类组分)、益生菌组分药理浓度优选为选自较低而非较高的给药浓度 (水溶性聚多糖的给药浓度限制在 3-15% 或 3-5%、核酸的给药浓度限制在 10-25%、半流体类组分限制在 4-12%)、具有特定组合关系的多种 (优选为 2 种或 2 种以上) 共用药物等等;

3)、其技术效果超预期: 如在现有技术组合物并不产生的条件 (例如并无短期协同药效、甚至于为短期拮抗药效) 下可产生明显、甚至有效的中长期药效和跨距药效, 尤其是类似于治疗性疫苗的明显的特异性免疫作用, 使其适应症范围大大超过现有技术组合物。

实施例 13: 剂型研究及优化

以 BALB/c 裸小鼠为实验对象, 采用乳腺癌 4T1 细胞为建模细胞, 将 0.25×10^5 个细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模, 建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 291.7 mm^3 , 将模型动物随机分为 3 组, 其中 A、B、C 分别给以生理盐水、5% 灭活布拉氏酵母菌水悬液、5% 灭活布拉氏酵母菌加入生理盐水混合所得水悬液作为研究药物, 上述药物均按实施例 1 的制备方法配置而成。每组均瘤内注射给药 2 次, 每次间隔 2 天, 注射量为 $150 \mu\text{l}$ /只/次。第一次给药后第 10 日对动物进行安乐死, 解剖后剥离出肿瘤组织测定瘤重, 并根据阴性对照组计算抑瘤率 (r)。

结果表明, B 组的药物为局部剂型且不含渗透压调节剂, 而 C 组的药物为非局部剂型且含渗透压调节剂-氯化钠, 其中 B 组、C 组的抑瘤率分别为 19.8%、41.3%, C 组较 B 组明显更低, 说明渗透压调节剂会干扰组合物的免疫增强作用, 从而降低局部作用。在本实验条件下更是使益生菌组分从 B 组中提供有效治疗作用变为 C 组的无治疗作用。由上可知, 本申请组合物的剂型选择与现有技术组合物有着本质差异。具体的。现有技术中包含益生菌组分的组合物通常为口服剂型或常规注射剂型, 前者通常需包含固体赋形剂, 而后者通常需包含益生菌组分的渗透压提高剂 (盐或单糖) 以保证其药液与血液渗透压相

同或相近。而本申请所述的药物组合物仅须满足可提供该局部作用的要求，其优选方案可不包含固体赋形剂或渗透压提高剂，以避免降低局部作用。实际上，上述给药剂型也是局部作用药物的优选剂型。

实施例 14 中老年患者模型中的比较研究及进一步优化

以 8 月龄小鼠作为中老年患者模型中的实验对象，将 0.5×10^5 个小鼠乳腺癌 4T1 细胞/只注入右侧腋部皮下进行移植瘤建模，建模成功裸小鼠的瘤体平均体积为 117.3 mm^3 ，将模型动物随机分为 18 组。每组通过瘤内注射按照表 19 的药物分组给药 1 次，注射量 $50 \mu\text{l}$ /只；用药后在第 3 日、第 21 日测局部病变体积 (V)，并根据阴性对照组计算各时间的瘤体抑制率 (r'_{3d} 、 r'_{21d})，结果见下表。所用药物均按常规的水溶液制备方法或实施例 1 中的制备方法制备。根据不同时间 (3 日、21 日) 的药效 (r'_{3d} 、 r'_{21d}) 分别计算短期药效的实际/预期比 q_{3d} 和中长期药效的实际/预期比 q_{21d} 。

表 19 不同组别用药后的短效、长效数据

编号	药物类型	组分、用量	抑瘤率	
			r'_{3d}	r'_{21d}
01	阴性对照	生理盐水	0	0
1	糖类对照物 1	10%淀粉水溶液	3.1%	3.9%
2	糖类对照物 2	20%葡萄糖水溶液	3.1%	4.3%
3	糖类对照物 3	30%葡萄糖水溶液	20.8%	8.2%
4	益生菌组分 1	2.5%羟甲基葡聚糖水溶液	3.2%	4.5%
5	益生菌组分 2	5%羟甲基葡聚糖水溶液	2.9%	3.7%
6	益生菌组分 3	10%羟甲基葡聚糖水溶液	4.3%	6.5%
7	益生菌组分 4	20%羟甲基葡聚糖水溶液	7.6%	7.4%
8	益生菌组分 5	10%β-葡聚糖 (小分子) 水溶液	3.1%	2.8%
9	类似物	10%β-D-葡聚糖 (大麦) 水溶液 (100ul)	3.9%	5.1%
10	局部药物	1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	45.9%	31.1%
11	糖类对照物 1/局部药物	10%淀粉/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	44.7%	17.1%
12	糖类对照物 2/局部药物	20%葡萄糖/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	43.6%	14.3%
13	糖类对照物 3/局部药物	30%葡萄糖/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	63.2%	19.3%
14	益生菌组分 1/局部药物	2.5%羟甲基葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	61.3%	53.2%
15	益生菌组分 2/局部药物	5%羟甲基葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	67.1%	71.8%
16	益生菌组分 3/局部药物	10%羟甲基葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	59.3%	81.6%
17	益生菌组分 4/局部药物	20%羟甲基葡聚糖/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	47.9%	83.8%

18	益生菌组分 5/局部药物	10% β -葡聚糖(小分子)/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	46.4%	46.7%
19	类似物/局部药物	10% β -D-葡聚糖(大麦)/1%亚甲蓝/1%5-氯尿嘧啶水溶液	33.7%	31.6%

中老年患者模型与通常使用的年青患者模型在肿瘤形成和免疫能力方面并不一致。由表 19 可知, 组别 1-3 中的糖对照物在很高浓度(30%)才显示出短期药效($r'_{3d} > 15\%$), 而任何浓度均未显示中长期药效($r'_{21d} < 15\%$), 合乎糖营养素只有在很高浓度(30-50%)才可能提供局部作用、但不能提供有意义的次生作用的预期。组别 4-9 中的益生菌组分(包括类似物)未观察到有意义的短期药效($r'_{3d} < 15\%$)和中长期药效($r'_{21d} < 15\%$), 说明老年患者中局部给药时任何可产生短期药效和中长期药效的全身性机理(如细胞毒等化疗机理)所起作用可忽略不计, 而其局部作用也为最小化的局部作用。组别 10 中药物组合的局部作用明显有效($r_{3d} > 40\%$), 但其局部作用的有效性随时间衰减($r'_{21d} < 2/3 \times r'_{3d}$)。

根据不同时间(3日、21日)的药效(r'_{3d} 、 r'_{21d})分别计算短期药效的实际/预期比 q_{3d} 和中长期药效的实际/预期比 q_{21d} 。组别 11-13 中的糖对照物在很高浓度(30%)才显示出局部协同作用($q_{3d} > 1.00$), 而任何浓度均未显示中长期协同作用(q_{21d} 均为小于 1.00), 合乎糖营养素只有在很高浓度(30-50%)才可能提供局部协同作用、但不能提供有意义的次生协同作用的预期。组别 14-19 中的益生菌组分及其类似物与组别 11、12 中的糖对照物的浓度类似, 局部作用也都最小化, 它们与相同局部药物的共用似乎也应当产生类似结果。然而与相同浓度的糖对照物比较, 益生菌组分(包括类似物)与相同局部药物共用的短期药效(r'_{3d})明显较高, 中长期药效(r'_{21d})的差异更是明显扩大。实际上, 益生菌组分(包括类似物)与相同局部药物共用的 q_{21d} 均大于 1.00, 大大超出根据糖对照物/局部药物作用预期的中长期协同作用。此外, 尽管结构非常相似, 益生菌组分/局部药物可以产生超出其它来源类似物/局部药物预期的短期作用和中长期协同作用。

考虑到益生菌组分(包括类似物)本身在本实施例条件下并未提供中长期药效, 以上结果的共用药理超过现有技术中协同作用的药理预期; 细菌抗原性最小化、局部作用最小化($r'_{3d} < 15\%$)、中长期药效最小化($r'_{21d} < 15\%$)的益生菌组分(包括类似物)在相关技术方案中可提供一种先前未经发现却很有用的药理功能-即在自身不一定显示较强、优选为最小化局部作用的条件下, 为不一定发生局部协同作用、或只发生较弱局部协同作用的共用物提供中长期药效协同作用的活性。在相关技术方案中, 包含益生菌组分(包括类似物)的中长期协同药物组合物的适应症范围有以下要求: 中老年患者, 其药物组合有以下要求: 局部作用最小化的益生菌组分(如水溶性组分和半流体类组分)、局部作用最小化的药理浓度(如水溶性聚多糖的给药浓度限制在 3-15%、核酸的给药浓度限制在 10-25%、半流体类组分限制在 4-12%等)。

本发明所述的包含益生菌组分的局部药物组合物(简称本发明组合物)除了在以上实施例中超过任何非特异性免疫治疗的药物组合物的预期之外, 根据本实施例以上结果(尤其是中长期结果)以及其它类似试验的结果, 其还尤其是在以下方面超过现有技术中的包含局部作用药物(例如乙醇、常规糖营养素等等)的局部药物组合物(简称现有技术组合物)的预期:

1)、其优选共用药理超预期: 现有技术组合物的基于现有协同定义(协同作用为多个特定活性成分的类似作用通过共用互相增强)的优选共用药理是在有利于组分局部作用(例如常规糖营养素局部作用

较大、甚至于最大化)的条件下进行的局部协同作用,而本发明组合物超出现有协同定义的优选共用药理是在并不明显有利于组分局部作用(例如益生菌组分局部作用较小、甚至于最小化,益生菌组分与其共用物不产生短期协同作用、甚至产生短期拮抗作用)的条件下产生的中长期协同作用,该中长期协同作用很可能包括超出各组分局部作用的免疫作用;

2)、其药理组成超预期:如在以上实施例中所超任何非特异性免疫治疗的药物组合物的药理组成预期。通常认为局部作用与局部刺激性正相关。然而,优选的益生菌半流体类组分或益生菌水溶性组分与益生菌颗粒组分(灭活益生菌、益生菌水不溶颗粒)相比具有明显较低的局部刺激性(局部给药时动物剧烈挣扎的比例),优选的共用物也并非局部刺激性较强的乙醇、而是局部刺激性较弱的弱局部作用化合物,等等;

3)、其技术效果超预期:本发明组合物可产生明显、甚至有效的中长期药效和全身性药效(跨距药效),大大超过现有技术组合物只能产生短期局部药效的技术效果预期。该中长期药效和全身性药效特别适应中老年、尤其是老年患者。此外,优选的本发明组合物显示几近于无的局部刺激性,而经典化学消融剂(如乙醇)的局部作用与局部刺激性正相关。

其中所述益生菌组分可提供局部协同作用或/和中长期协同作用的共用物还可以为包含选自其它药学上适宜的、可提供有意义的局部作用的药物(化学活性成分或/和生物活性成分)或药物组合。例如:

1)、选自包含碱金属氢氧化物、碱性无机盐、和选自以下组之一种或多种的组合:亚甲蓝及其类似物、免疫调节剂、细胞毒药物,如以下组合:浓度比($W_{\text{碱金属氢氧化物}}/W_{\text{碱性无机盐}}/W_{\text{亚甲蓝及其类似物}}$)为(1-5%)/(3-15%)/(0.35-5%)的碱金属氢氧化物/碱性无机盐/亚甲蓝及其类似物组合、浓度比($W_{\text{碱金属氢氧化物}}/W_{\text{碱性无机盐}}/W_{\text{免疫调节剂}}$)为(1-5%)/(3-15%)/(1-15%)的碱金属氢氧化物/碱性无机盐/免疫调节剂组合、浓度比($W_{\text{碱金属氢氧化物}}/W_{\text{碱性无机盐}}/W_{\text{细胞毒药物}}$)为(1-5%)/(3-15%)/(0.1-10%)的碱金属氢氧化物/碱性无机盐/细胞毒药物组合。

2)、选自包含碱性有机化合物、碱性无机盐、和选自以下组之一种或多种的组合:亚甲蓝及其类似物、免疫调节剂、细胞毒药物,如以下组合:浓度比($W_{\text{碱性有机化合物}}/W_{\text{碱性无机盐}}/W_{\text{亚甲蓝及其类似物}}$)为(5-25%)/(3-15%)/(0.35-5%)的碱性有机化合物/碱性无机盐/亚甲蓝及其类似物组合、浓度比($W_{\text{碱性有机化合物}}/W_{\text{碱性无机盐}}/W_{\text{免疫调节剂}}$)为(5-25%)/(3-15%)/(1-15%)的碱性有机化合物/碱性无机盐/免疫调节剂组合、浓度比($W_{\text{碱性有机化合物}}/W_{\text{碱性无机盐}}/W_{\text{细胞毒药物}}$)为(5-25%)/(3-15%)/(0.1-10%)的碱性有机化合物/碱性无机盐/细胞毒药物组合。

3)、选自包含碱性有机化合物、亚甲蓝及其类似物、和选自以下组之一种或多种的组合:免疫调节剂、细胞毒药物、非碱性氨基酸及其酸式盐,例如浓度比($W_{\text{碱性有机化合物}}/W_{\text{亚甲蓝及其类似物}}/W_{\text{免疫调节剂}}$)为(5-25%)/(0.35-3.5%)/(1-15%)的碱性有机化合物/亚甲蓝及其类似物/免疫调节剂组合、浓度比($W_{\text{碱性有机化合物}}/W_{\text{亚甲蓝及其类似物}}/W_{\text{细胞毒药物}}$)为(5-25%)/(0.35-3.5%)/(0.1-10%)的碱性有机化合物/亚甲蓝及其类似物/细胞毒药物组合、浓度比($W_{\text{碱性有机化合物}}/W_{\text{亚甲蓝及其类似物}}/W_{\text{非碱性氨基酸及其酸式盐}}$)为(5-25%)/(0.35-3.5%)/(10-25%)的碱性有机化合物/亚甲蓝及其类似物/非碱性氨基酸及其酸式盐组合。

4)、选自包含细胞毒药物和选自以下组之至少二种的组合:碱性有机化合物、免疫调节剂、多元醇、亚甲蓝及其类似物,例如以下组合:浓度比($W_{\text{细胞毒药物}}/W_{\text{碱性有机化合物}}/W_{\text{免疫调节剂}}$)为(0.1-10%)/(5-25%)

/ (1-15%) 的细胞毒药物/碱性有机化合物/免疫调节剂组合、浓度比 ($W_{\text{细胞毒药物}}/W_{\text{多元醇}}/W_{\text{亚甲蓝及其类似物}}$) 为 (0.1-10%) / (5-25%) / (0.35-3.5%) 的细胞毒药物/多元醇/亚甲蓝及其类似物组合、浓度比 ($W_{\text{细胞毒药物}}/W_{\text{亚甲蓝及其类似物}}/W_{\text{免疫调节剂}}$) 为 (0.1-10%) / (0.35-5%) / (1-15%) 的细胞毒药物/亚甲蓝及其类似物/免疫调节剂组合。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1、益生菌组分作为可提供治疗作用的活性成分在制备用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物中的应用，其中所述治疗作用包括涉及局部作用（或局部协同作用）的局部治疗或/和免疫治疗。

2、一种用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物，其包含可提供治疗作用的益生菌组分、以及药理学可接受的合适载体，但不包含专用于将血液渗透压增加至正常生理水平的盐或单糖，其中所述治疗作用包括涉及局部作用（或局部协同作用）的局部治疗或/和免疫治疗。

3、根据权利要求2或3的应用或药物组合物，其中所述药物组合物还包含能够与所述益生菌组分的所述治疗作用产生协同作用的化学活性成分或/和生物活性成分，以及在所述药物组合物中，所述益生菌组分与所述化学活性成分的量比（益生菌组分重量浓度/化学活性成分重量浓度）为 $(1-110)/(1-100)$ 或 $(1.5-100)/(0.1-1)$ ，或/和所述益生菌组分与所述生物活性成分的量比（益生菌组分重量浓度/生物活性成分重量浓度）为 $(60-180)/(0.1-60)$ 。

4、一种用于治疗局部病变疾病的局部药物组合物，其包含可提供治疗作用的益生菌组分、能够与所述益生菌组分的所述治疗作用产生协同作用的化学活性成分或/和生物活性成分，以及在所述药物组合物中，所述益生菌组分与所述化学活性成分的量比（益生菌组分重量浓度/化学活性成分重量浓度）为 $(1-110)/(1-100)$ 或 $(1.5-100)/(0.1-1)$ ，或/和所述益生菌组分与所述生物活性成分的量比（益生菌组分重量浓度/生物活性成分重量浓度）为 $(60-180)/(0.1-60)$ ，其中所述治疗作用包括涉及局部作用（或局部协同作用）的局部治疗或/和免疫治疗。

5、根据权利要求1-4之一的应用或药物组合物，其中所述益生菌组分为选自细菌免疫原性最小化的源于天然益生菌或其工程菌的制备物或该制备物的工程类似物，其中所述制备物优选为选自包括以下组及其衍生物之一或多种：益生菌水溶性组分、益生菌半流体类组分、益生菌组分水不溶颗粒、灭活益生菌。

6、根据权利要求5的应用或药物组合物，其中所述益生菌水溶性组分选自包括以下组及其衍生物之一或多种：益生菌或破碎益生菌上清组分、益生菌抽提物、益生菌细胞内水溶性组分、益生菌细胞壁组分的水溶性成分或非水溶成分的水溶性衍生物、益生菌核糖核酸；所述益生菌半流体类组分优选为选自其含水混合物可形成半流体类组合物的益生菌组分之一或多种，例如益生菌聚多糖及其类似物之一或多种；所述益生菌组分水不溶颗粒选自包括以下组及其衍生物之一或多种：破碎益生菌沉淀组分、益生菌细胞壁聚多糖颗粒、益生菌细胞壁聚多糖纳米颗粒；所述灭活益生菌优选为选自并不限定其皆为完整菌体的灭活益生菌；

其中所述益生菌水溶性组分选自包括以下组及其衍生物之一或多种：益生菌水溶性 β -葡聚糖、优选为选自纯度大于90%的水溶性 β -葡聚糖，益生菌 β -葡聚糖的水溶性衍生物、益生菌核糖核酸。

7、根据权利要求1-6之一的应用或药物组合物，其中所述益生菌选自包括以下组之天然菌或/和工程菌的一种或多种：益生芽孢杆菌、益生乳酸杆菌、益生双歧杆菌、益生真菌，其中：所述芽孢杆菌包括选自包括以下组之一或多种：地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌；所述乳酸杆菌包括选自包括以下组之一或多种：嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、短小乳杆菌和发酵乳杆菌；所述双歧杆菌包括选自包括以下组之一或多种：长双歧杆菌、青春双歧杆菌、短双歧杆菌、屎肠球菌、粪链球菌；所述真菌包括选自包括以下组之一或多种：酵母菌、布鲁氏酵母菌，

且其中所述酵母菌包括选自包括以下之一种或多种：酿酒酵母菌、德尔布有抱圆酵母菌、威克汉姆酵母菌、毕赤酵母菌、产阮假丝酵母、乳清酵母。

8、根据权利要求 1-7 之一应用或药物组合物，其中所述益生菌包括选自酿酒酵母菌或/和布魯氏酵母菌。

9、根据权利要求 1-8 之一应用或药物组合物，其中所述益生菌组分在该药物组合物中的浓度为 $>0.1\%$ 、 $\geq 0.25\%$ 、 $0.25-25\%$ 、优选为 $0.5-25\%$ 、更优选为 $1-5\%$ 、 $5-15\%$ 或 $15-25\%$ 。

10、根据权利要求 9 的应用或药物组合物，其中当所述益生菌组分包括所述灭活益生菌，则所述灭活益生菌在该药物组合物中的浓度为 $>0.3\%$ 、 $\geq 0.75\%$ 、 $0.75-15\%$ 、优选为 $1.5-15\%$ 或 $5-15\%$ ；当所述益生菌组分包括所述益生菌水溶性组分，则所述益生菌水溶性组分在该药物组合物中的浓度为 $>0.1\%$ 、或 $0.15-25\%$ 、优选为 $0.35-5\%$ 、 $5-15\%$ 或 $15-25\%$ ；当所述益生菌组分包括所述益生菌水不溶组分颗粒，则所述益生菌水不溶组分颗粒在该药物组合物中的浓度为 $>0.5\%$ 、或 $0.5-15\%$ 、优选为 $1.5-15\%$ 或 $5-15\%$ ；当该药物组合物为半流体类组合物，则所述益生菌半流体类组分在该药物组合物中的浓度为 $>2.5\%$ 、 $2.6-25\%$ 、优选为 $5-15\%$ 。

11、根据权利要求 3-10 之一应用或药物组合物，其中所述化学活性成分为包括选自弱局部作用化合物和/或细胞毒药物之一种或多种，以及其中当所述化学活性化合物包括细胞毒药物时，所述益生菌组分和细胞毒药物的量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{细胞毒药物}}$) 为 $(1-110)/(1-100)$ ；当所述化学活性化合物包括弱局部作用化合物时，所述益生菌组分和弱局部作用化合物的量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{弱局部作用化合物}}$) 为 $(1-90)/(1-100)$ 。

12、根据权利要求 11 的应用或药物组合物，其中所述弱局部作用化合物选自包括以下组之一种或多种：氨基酸类营养素、活体染料、奎宁类药物、低浓度酸化剂、低浓度碱化剂、包含酸化剂或/碱化剂的 pH 缓冲系统，以及其中当所述弱局部作用化合物包括所述氨基酸营养素时，所述益生菌组分和氨基酸营养素的量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{氨基酸营养素}}$) 为 $(1-20)/(1-100)$ ；当所述弱局部作用化合物包括所述活体染料时，所述益生菌组分和活体染料的量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{活体染料}}$) 为 $(7-90)/(1-100)$ ；当所述弱局部作用化合物包括所述奎宁类药物时，所述益生菌组分和奎宁类药物的量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{奎宁类药物}}$) 为 $(2-90)/(1-100)$ ；当所述弱局部作用化合物包括所述酸化剂或/和碱化剂时，所述益生菌组分和酸化剂或/和碱化剂的量比 ($W_{\text{益生菌组分}}/W_{\text{酸化剂或/和碱化剂}}$) 为 $(2-60)/(1-100)$ 。

13、根据权利要求 12 的应用或药物组合物，其中所述氨基酸类营养素为选自包括以下组中的氨基酸或其盐或者包含或由以下氨基酸构成的寡肽和多肽：精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸，以及所述氨基酸类营养素的浓度为 $>2.5\%$ 、或 $5-30\%$ 、优选为 $5-25\%$ 。

14、根据权利要求 12 的应用、药物组合物，其中所述活体染料为选自包括孟加拉红或/和以下亚甲蓝类染料之一种或多种：亚甲蓝、专利蓝、异硫蓝、新亚甲蓝，且其中所述孟加拉红的浓度为 $2.5\%-20\%$ ；所述亚甲蓝类染料的浓度为 $\geq 0.25\%$ 、或 $0.25-2.5\%$ 、优选为 $0.5-2.5\%$ 。

15、根据权利要求 12 的应用或药物组合物，其中所述酸化剂选自强酸或/和弱酸之一种或多种，且所述益生菌组分与所述酸化剂的量比 (益生菌组分重量浓度/酸化剂重量浓度) 为 $(1-20)/(0.5-50)$ ，以及所述酸化剂的浓度为 $\geq 0.5\%$ 、 $0.5-2\%$ (强酸)、或 $2-15\%$ (弱酸)，其中所述强酸例如为盐酸；所述弱酸例如为乙二酸、乙酸、乳酸、柠檬酸、苹果酸；所述碱化剂例如选自强碱或/和弱碱之一种或多种，且所

述益生菌组分与所述碱化剂的量比（益生菌组分重量浓度/碱化剂重量浓度）为（1-20）/（0.5-50），以及所述碱化剂的浓度为 $\geq 0.5\%$ 、0.5-5%（强碱）、或2-15%（弱碱），其中所述强碱例如为氢氧化钠、氢氧化钾；所述弱碱例如为磷酸二氢钠、碳酸氢钠、碳酸钠。

16、根据权利要求11的应用或药物组合物，其中所述细胞毒药物包括选自包括以下组之一或多种：

5 破坏DNA结构和功能的药物，例如环磷酰胺、卡莫司汀、金属铂络合物、多柔比星类药物、拓扑替康、伊立替康；嵌入DNA中干扰转录RNA的药物，例如抗肿瘤抗生素药物；干扰DNA合成的药物，例如5-氟尿嘧啶（5-Fu）、呋氟尿嘧啶、双呋氟尿嘧啶、阿糖胞苷、环胞苷、5-氮杂胞苷；影响蛋白质合成的药物，例如秋水仙碱类药物、长春碱类药物、紫杉烷类药物，且所述细胞毒药物的浓度为 $\geq 0.1\%$ 、0.1-15%。

10 17、根据权利要求1-16之一的应用或药物组合物，其中所述生物活性成分选自包括以下组之一或多种：抗原、免疫调节类抗体、细胞因子、佐剂。

18、一种治疗局部病变疾病的方法，其包括以下步骤：向有此需要的个体的局部病变内或/和局部病变外有利于产生局部作用（或局部协同作用）相关的次生免疫作用的局部施用治疗有效量的根据权利要求3-22之一的药物组合物。

15 19、根据权利要求18的方法，其中当所述益生菌组分包括所述灭活益生菌，则所述灭活益生菌在该药物组合物中的含量必须使得它的局部给药浓度为 $>0.3\%$ 、 $\geq 0.75\%$ 、0.75-15%、优选为1.5-15%或5-15%；当所述益生菌组分包括所述益生菌水溶性组分，则所述益生菌水溶性组分在该药物组合物中的含量必须使得它的局部给药浓度为 $>0.1\%$ 、或0.15-25%、优选为0.35-15%或5-15%；当所述益生菌组分包括所述益生菌水不溶组分，则所述益生菌水不溶组分在该药物组合物中的含量必须使得它的局部给药浓度为 $>0.5\%$ 、或0.5-15%、优选为1.5-15%或3.5-15%。

20 20、根据权利要求1-19之一的应用、药物组合物或方法，其中所述局部病变包含肿瘤细胞或/和成纤维细胞。

21、根据权利要求1-20之一的应用、药物组合物或方法，其中所述局部病变疾病包括肿瘤、非瘤肿大、局部炎症、分泌腺功能异常和皮肤病，其中所述肿瘤包括恶性和非恶性实体肿瘤。

25 22、根据权利要求21的应用、药物组合物或方法，其中所述实体肿瘤包括以下肿瘤及其次生肿瘤之一或多种：乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、肠癌、口腔癌、食道癌、胃癌、喉癌、睾丸癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、脑瘤、淋巴瘤。

23、根据权利要求1-22之一的应用、药物组合物或方法，其中所述治疗的适用患者选自包括以下组之一或多种：免疫抑制患者、可局部病变内给药的患者、局部病变组织可类化学消融的患者、局部病变内可产生次生免疫物质的患者、病变外给药区域内可产生次生免疫物质的患者。

30 24、包含益生菌组分以及药物学可接受的合适载体的药物组合物，其是用于治疗局部病变疾病，其中所述局部病变疾病包括实体肿瘤。

25、药物试剂盒，其包括一个或多个装有根据权利要求2-22之一所述的药物组合物的容器，其中还可包括如何向有需要的个体施用所述药物组合物的说明书或标签。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/122132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/741(2015.01)i; A61K 35/742(2015.01)i; A61K 35/747(2015.01)i; A61K 35/745(2015.01)i; A61K 36/064(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 5/00(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61K 36/00(2006.01)i; A61K 36/02(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; CNTXT; CNKI; USTXT; EPTXT; WOTXT; VEN; ISI web of knowledge; STNext; 成都夸常奥普医疗科技有限公司, 邹方霖, 邹礼常, 王建霞, 王艺羲, 益生菌, 局部, 肿瘤, 癌症, 载体, 芽孢杆菌, 乳酸杆菌, 双歧杆菌, 真菌, 酵母菌, 协同, 氨基酸, 染料, 活性成分, CHENGDU KUACHANGAOPU MEDICAL, ZOU Fanglin, ZOU Lichang, WANG Jianxia, WANG Yixi, Probiotics, topical, tumor, cancer, carrier, Bacillus, Lactobacillus, Bifidobacterium, fungal, yeast, synergistic, amino acid, dye, active ingredient

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012074351 A1 (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA) 07 June 2012 (2012-06-07) claims 1-3 and 20	claims 1-17, 20-23 (in part), 24, and 25
A	CN 110870914 A (CHENGDU KUACHANG AOPU MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 10 March 2020 (2020-03-10) entire document	claims 1-17, 20-23 (in part), 24, and 25



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

17 November 2021

Date of mailing of the international search report

29 November 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
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/CN2021/122132

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.: **18、19、20-23** (部分)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claim 18 relates to a method for treatment of a local lesion disease, which is a method for treatment for a living human body or animal body, and falls within the subject matter defined in PCT Rule 39.1(iv) that does not warrant a search conducted by the international searching authority.
 - [2] On the basis of the same reasoning, claims 19 and 20-23 (in part) fall within the subject matter defined in PCT Rule 39.1(iv) that does not warrant a search conducted by the international searching authority.
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/CN2021/122132

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
WO	2012074351	A1	07 June 2012	EP	2646042 A1	09 October 2013
				EP	2646042 A4	23 July 2014
				BR	112012021624 A2	07 February 2017
				KR	20130132398 A	04 December 2013
				KR	101747815 B1	15 June 2017
				SG	183544 A1	30 October 2012
				JP	2014500263 A	09 January 2014
				JP	5913353 B2	27 April 2016
				US	2016030492 A1	04 February 2016
				US	2013323215 A1	05 December 2013
				US	9480721 B2	01 November 2016
				AU	2010365001 A1	30 August 2012
				AU	2010365001 B2	12 December 2013
				IN	201206771 P1	17 January 2014
				SG	183544 B	20 April 2016
CN	110870914	A	10 March 2020	EP	3845247 A1	07 July 2021
				KR	20210055052 A	14 May 2021
				CN	112789059 A	11 May 2021
				WO	2020043185 A1	05 March 2020
				IN	202117014254 A	07 May 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/122132

A. 主题的分类

A61K 35/741(2015.01)i; A61K 35/742(2015.01)i; A61K 35/747(2015.01)i; A61K 35/745(2015.01)i;
A61K 36/064(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i;
A61P 37/04(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 5/00(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61K
35/12(2015.01)i; A61K 36/00(2006.01)i; A61K 36/02(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;CNTXT;CNKI;USTXT;EPTXT;WOTXT;VEN;ISI web of knowledge;STNext: 成都夸常奥普医疗科技有限公司, 邹方霖, 邹礼常, 王建霞, 王艺羲, 益生菌, 局部, 肿瘤, 癌症, 载体, 芽孢杆菌, 乳酸杆菌, 双歧杆菌, 真菌, 酵母菌, 协同, 氨基酸, 染料, 活性成分, CHENGDU KUACHANGAOPU MEDICAL, ZOU Fanglin, ZOU Lichang, WANG Jianxia, WANG Yixi, Probiotics, topical, tumor, cancer, carrier, Bacillus, Lactobacillus, Bifidobacterium, fungal, yeast, synergistic, amino acid, dye, active ingredient

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 2012074351 A1 (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA) 2012年 6月 7日 (2012 - 06 - 07) 权利要求1-3、20	权利要求1-17、20-23(部分)、24、25
A	CN 110870914 A (成都夸常奥普医疗科技有限公司) 2020年 3月 10日 (2020 - 03 - 10) 全文	权利要求1-17、20-23(部分)、24、25

☐ 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

2021年 11月 17日

国际检索报告邮寄日期

2021年 11月 29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

夏宇祥

电话号码 (86-512)88995697

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： 18、19、20-23（部分）
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18的主题是一种治疗局部病变疾病的方法，是对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1（iv）定义的不要求国际检索单位检索的主题。
[2] 基于同样的理由，权利要求19、20-23（部分）属于PCT细则39.1（iv）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/CN2021/122132

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	2012074351	A1	2012年 6月 7日	EP	2646042	A1	2013年 10月 9日
				EP	2646042	A4	2014年 7月 23日
				BR	112012021624	A2	2017年 2月 7日
				KR	20130132398	A	2013年 12月 4日
				KR	101747815	B1	2017年 6月 15日
				SG	183544	A1	2012年 10月 30日
				JP	2014500263	A	2014年 1月 9日
				JP	5913353	B2	2016年 4月 27日
				US	2016030492	A1	2016年 2月 4日
				US	2013323215	A1	2013年 12月 5日
				US	9480721	B2	2016年 11月 1日
				AU	2010365001	A1	2012年 8月 30日
				AU	2010365001	B2	2013年 12月 12日
				IN	201206771	P1	2014年 1月 17日
				SG	183544	B	2016年 4月 20日
CN	110870914	A	2020年 3月 10日	EP	3845247	A1	2021年 7月 7日
				KR	20210055052	A	2021年 5月 14日
				CN	112789059	A	2021年 5月 11日
				WO	2020043185	A1	2020年 3月 5日
				IN	202117014254	A	2021年 5月 7日