(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
2016 年 6 月 23 日 (23.06.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/095503 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 35/742 (2015.01) *A61K 31/337* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/083573

(22) 国际申请日: 2015 年 7 月 8 日 (08.07.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201410803072.X 2014 年 12 月 19 日 (19.12.2014) CN

(71) 申请人: **山东创新药物研发有限公司 (SHANDONG CHUANGXIN PHARMACEUTICAL RESEARCH & DEVELOPMENT CO., LTD)** [CN/CN]; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。

(72) 发明人: **邢来田 (XING, Laitian)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **王勇 (WANG, Yong)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **魏明谦 (WEI, Mingqian)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **邢艳秋 (XING, Yanqiu)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **李莲莲 (LI, Lianlian)**; 中国山东省高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **邢立超 (XING, Lichao)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **邓广霞 (DENG, Guangxia)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **孟红 (MENG, Hong)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。 **黄涛 (HUANG, Tao)**; 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。

杨冬霞 (YANG, Dongxia); 中国山东省济南市高新区舜华路 750 号, Shandong 250101 (CN)。

(74) 代理人: **济南金迪知识产权代理有限公司 (JINAN JINDI INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO.,LTD)**; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250101 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

根据细则 4.17 的声明:
— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

WO 2016/095503 A1

(54) **Title**: APPLICATION OF DERIVATIVE OF CLOSTRIDIUM GHONII

(54) **发明名称** : 一株戈氏梭菌驯化株的应用

(57) **Abstract**: Provided is an application of clostridium ghonii MW-DCG-HNCv-18 in the preparation of medicines for treating non-small-cell lung carcinoma. Also provided is a medicine that is used for treating non-small-cell lung carcinoma and uses clostridium ghonii MW-DCG-HNCv-18 and docetaxel as active ingredients.

(57) **摘要**: 提供一株戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 在制备治疗非小细胞肺癌药物中的应用。还提供一种以戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 和多西他赛为活性成分的治疗非小细胞肺癌的药物。

一株戈氏梭菌驯化株的应用

技术领域

本发明涉及一株戈氏梭菌驯化株（Derivatives of *Clostridium ghonii*, DCG）的应用，特别涉及戈氏梭菌驯化株在制备治疗非小细胞肺癌（*Non-small cell lung carcinoma*，NSCLC）药物中的应用，属于生物医药技术领域。

背景技术

目前实体肿瘤病理生理的理解越来越多的转向了其独特生长的微环境。实体瘤中心区以组织间压力升高、细胞 pH 降低、氧含量低以及肿瘤细胞异质性等为显著特点。肿瘤微环境也是肿瘤转移、侵润以及对对传统放化疗不敏感的重要原因。首先，实体肿瘤所包含的乏氧或坏死区域，由于乏氧区远离血管供血不丰富，并且肿瘤中心高组织间压的存在，使得乏氧区肿瘤细胞很难获得有效药物浓度，是传统化疗所不能有效治疗的地方。其次，放疗依赖于氧自由基的形成，造成有丝分裂细胞 DNA 的损伤，因此肿瘤中心氧自由基的缺乏减少了治疗过程中 DNA 损伤。第三，大多数化疗药物只对快速分裂肿瘤细胞有效，而对已停止分裂的乏氧肿瘤细胞、间质细胞及肿瘤组织结构等疗效差(纤连蛋白和胶原蛋白)。并且，传统放化疗常常缺乏对肿瘤细胞的特异性打击。

肿瘤厌氧微环境限制了传统放化疗及病毒疗法的疗效，但却为厌氧菌在肿瘤乏氧区内生长和发挥溶瘤特性提供了良好机会。DCG 为专性厌氧革兰氏阳性芽孢杆菌，其存在两种生长状态:芽孢和营养体。DCG 芽孢抗原性极弱，可作为制剂静脉注射降低对机体刺激。由于肿瘤血管组织结构紊乱，血液中的 DCG 芽孢极易进入肿瘤组织，在肿瘤低氧/坏死区萌发、繁殖，并分泌脂肪酶、蛋白酶等多种水解酶有效而不加区分的破坏肿瘤组织中各种细胞(肿瘤细胞、非癌间质细胞、活跃分裂、干细胞或静止细胞等)及肿瘤结构(纤连蛋白和胶原蛋白)，引起肿瘤大部分溶瘤坏死，实现肿瘤实质和间质的全部溶解消化。从根本上破坏并改变肿瘤微环境，这种肿瘤微环境的破坏有效抑制或逆转肿瘤生长和破坏再成瘤条件，甚至可导致整个肿瘤几乎完全破坏消失，为 NSCLC 深度治疗提供了可能。DCG 分泌水解酶溶解瘤组织引发的炎症反应直接参与活性氧簇、蛋白酶及其他降解酶对肿瘤细胞的破坏作用。更重要的是，炎症反应可刺激机体产生强大细胞免疫反应，破坏残存肿瘤细胞微环境。

中国专利文献 CN103374538A(申请号 201210310374.4)公开了无毒非致病性戈氏梭菌(Clostridium ghonii)的衍生细菌菌株，其能抑制一种或多种实体瘤的生长、逆转或破坏一种或多种实体瘤。本发明还涉及包含所述衍生细菌菌株的组合物，用于靶向实体瘤的溶解。

但由于实体瘤的形成原因不同，因此不同菌株对实体瘤的作用都是特异性的。因此，进一步研究各种菌株对不同实体瘤的特异作用，成为本领域的研究热点。

发明内容

本发明针对现有技术的不足，提供一株驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株的应用。

一株驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株在制备治疗非小细胞肺癌药物中的应用。

驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株在强化梭菌-琼脂培养基上其菌落为白色，圆形，直径约为 1~2mm，边缘粗糙，稍粘，其大小一致。其营养体为单独生长的短杆长直细胞，菌体宽约 0.3~1.5μm、长 8~16μm，革兰氏染色呈阳性。芽孢位于菌体近末端，呈卵圆形。该菌株为已知菌株，可以由澳大利亚国家计量研究院获得，菌株保藏号为 V12/001485。

一种治疗非小细胞肺癌的药物，包括以驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株和多西他赛为药效成分，与药学上可接受的辅料制成的药物组合物。

根据本发明优选的，所述的驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株芽孢与多西他赛的比例为每毫克多西他赛联合 5×10^6 个~3.0×10^7 个菌株芽孢。

进一步优选的，所述的驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株芽孢与多西他赛的比例为每毫克多西他赛联合 1.0×10^7 个~2.0×10^7 个菌株芽孢。

更优选的，所述驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株芽孢与多西他赛的比例为每毫克多西他赛联合 1.5×10^7 个菌株芽孢。

根据本发明优选的，所述的治疗非小细胞肺癌的药物剂型为芽孢冻干粉针剂。芽孢冻干粉针可采用低温冷冻干燥技术制备。

根据本发明进一步优选的，所述芽孢冻干粉针剂与溶媒混合使用，溶媒选自林格氏液、质量浓度为 0.9%的生理盐水、磷酸盐缓冲液。溶媒需要满足非毒性、可注射用的要求。通过静脉、脊柱内、肌注、皮下、肿瘤瘤内注射和腹腔等方式给药。

有益效果

1、本发明首次发现 MW-DCG-HNCv-18 菌株菌对非小细胞肺癌具有特异性抑制作用，对非小细胞肺癌抑制效果显著优于现有已知的其他类似菌株，并通过筛选发现其与多西他赛注射液联用时，对非小细胞肺癌抑制效果更加突出，为治疗非小细胞肺癌提供了新的途径；

2、本发明所述 DCG 芽孢具有专性厌氧的特点，并能向肿瘤乏氧区移动，引起肿瘤大部分溶瘤坏死，当它们到达富氧肿瘤边缘时，细菌增殖和移动发生停滞，边缘残存肿瘤组织仍有复发的潜能，而多西他赛可在较低剂量下杀伤肿瘤组织边缘富氧环境中快速分裂肿瘤细胞。同时，化疗药物又可通过破坏肿瘤血管，加剧肿瘤内部缺氧程度，更有利于 DCG 定殖，提高溶瘤效果。二者协同形成具有肿瘤靶向性的立体、高效靶向性的溶瘤效应，达到优势互补、内外夹击、产生“超叠加作用”。

附图说明

图 1 是实施例 1 MW-DCG-HNCv-18 抗肿瘤效果照片；

图 2 是实施例 2 实验检测获得的各实验组的肿瘤生长曲线；

图 3 是实施例 2 检测第 20 天抗肿瘤效果的结果照片。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明的技术方案做进一步阐述，但本发明所保护范围不限于此。

菌株来源

MW-DCG-HNCv-18 菌株来源于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号为 V12/001485。

MW-DCG-LCv-26 菌株来源于澳大利亚国家计量研究院，菌株保藏号 V12/001486。

MW-DCG-CCv-17 菌株来源于澳大利亚国家计量研究院， 菌株保藏号 V12/001487。

Clostridium novyi –NT 菌株来源于 ATCC，菌株保藏号 ATCC®7659™。

西妥昔单抗(5mg/ml)购自德国 MERCK Serono，生产批号：132393 ，生产日期：2013 年 2 月。

多西他赛购自齐鲁制药有限公司，批号：3030062TA，生产日期：2013 年 03 月 18 日。

阿霉素购自深圳万乐药业有限公司，批号：1206E4。生产日期：2013 年 4 月。

实施例 1

研究方法：

①非小细胞肺癌模型建立

采用细胞皮下注射法将非小细胞肺癌 A549 细胞缓慢注入雌性 Balb/c-nu/nu 裸小鼠(5 周龄，20g)右背部股外侧皮下处，待肿瘤体积长至 300mm^3 时，进行体内抗肿瘤试验。

②动物分组与处理

对照组：n=15 只（n 代表每组的动物数量），尾静脉注射 PBS 缓冲液 0.2ml；

MW-DCG-HNCv-18 芽孢组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg.body weight)。

MW-DCG-LCv-26 芽孢组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg.body weight)。

MW-DCG-CCv-17 芽孢组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg.body weight)。

C.novyi–NT 芽孢组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg.body weight)。

③检测指标

以游标卡尺测量裸鼠移植瘤长径(a)和横径(b)，每周 3～4 次。同时对荷瘤鼠一般情况包括体重、取食、饮水、精神状态、行为、皮毛颜色、排泄及死亡情况等进行观察记录。

④评价标准

根据每次测量的肿瘤长径和横径数据计算肿瘤体积($V = 1/2\times a\times b^2$)，绘制曲线，动态观察肿瘤的变化。

抑瘤率(%)=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%。

肿瘤坏死率(%)=坏死区横截面面积/整个肿瘤横截面面积×100%。

肿瘤溶瘤率(%)=发生肿瘤溶瘤动物数量/该组动物总数量×100%。

荷瘤鼠总体生存期：各组裸鼠经治疗后待其自然死亡，计算存活时间。

结果

组别	抑瘤率	坏死率	溶瘤率	平均存活天数	毒性水平
对照组	0	0	0	25.0天	无
MW-DCG-HNCv-18 组	51.1%	76.55%	100%	45.8天	无
MW-DCG-LCv-26 组	39.3%	65.00%	68%	36.3天	无
MW-DCG-CCv-17 组	36.9%	59.27%	68%	34.5天	无
C.novyi–NT 组	47.8%	71.42%	84%	32.0天	有(体重下降)

由此可见，(1)有效性：与MW-DCG-LCv-26、MW-DCG-CCv-17菌株相比，MW-DCG-HNCv-18对NSCLC荷瘤鼠模型肿瘤抑瘤率、坏死率和溶瘤率分别为51.1%、76.55%和100%，均显著高于MW-DCG-LCv-26、MW-DCG-CCv-17菌株。与C.novyi–NT菌株相比，MW-DCG-HNCv-18菌株的抑瘤率、坏死率和溶瘤率虽高于前者，但差异不显著。同时，研究结果显示，MW-DCG-HNCv-18芽孢组注射芽孢第35天后出现大面积坏死，而对照组肿瘤体积持续增大（图1）。

(2)安全性：与MW-DCG-LCv-26、MW-DCG-CCv-17和C.novyi–NT菌株相比，MW-DCG-HNCv-18菌株延长了荷瘤鼠平均存活天数，并显著长于C.novyi–NT组荷瘤鼠的平均存活天数。研究发现，C.novyi–NT组荷瘤鼠体重下降，而其它三组荷瘤鼠体重未见变化。

可见，与MW-DCG-LCv-26、MW-DCG-CCv-17和C.novyi–NT菌株相比，MW-DCG-HNCv-18菌株表现出良好的有效性和安全性。

实施例 2

研究方法：

①非小细胞肺癌模型建立

采用细胞皮下注射法将非小细胞肺癌 A549 细胞缓慢注入雌性 Balb/c-nu/nu 裸小鼠（5 周龄，20g）右背部股外侧皮下处，待肿瘤体积长至 300mm^3 时，进行体内试验。

②动物分组与处理

对照组：n=15 只，尾静脉注射 PBS 缓冲液 0.2ml；

多西他赛组：n=15 只，第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量为 20mg/(kg.body weight)，多西他赛施用剂量为其最佳施用量。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢组：n=15 只，尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，3×10^8 个/(kg. body weight)。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合 Cetuximab（西妥昔单抗）组： n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg. body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射 Cetuximab（西妥昔单抗），剂量均为 70mg/(kg. body weight)，西妥昔单抗施用剂量为其最佳施用量。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合阿霉素组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射阿霉素，剂量均为 10mg/(kg. body weight)，阿霉素施用剂量为其最佳施用量。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

C.novyi–NT 芽孢联合多西他赛组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 C.novyi–NT 芽孢，剂量为 3×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

③检测指标

以游标卡尺测量裸鼠移植瘤长径(a)和横径(b)，每周 3～4 次，并计算各组肿瘤体积，动态观察上述细菌的抗肿瘤效果（图 2）。同时对荷瘤鼠体重、取食、饮水、精神状态、行为、皮毛颜色、排泄及死亡情况等进行观察记录。

④评价标准

根据每次测量的肿瘤长径和横径数据计算肿瘤体积($V = 1/2\times a\times b^2$)，绘制曲线，动态观察肿瘤的变化。

抑瘤率(%)=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%。

肿瘤坏死率(%)=坏死区面积/整个肿瘤面积×100%。

治愈率(%)=肿瘤完全消除动物数量/该组动物总数量×100%。

荷瘤鼠总体生存期：各组裸鼠经治疗后待其自然死亡，计算存活时间。

⑤结果

组别	抑瘤率	坏死率	治愈率	平均存活天数
对照组	0	0	0%	24.4天
多西他赛组	55.9%	22.2	0%	35.5天
MW-DCG-HNCv-18 组	51.4%	76.6	0%	43.8天
MW-DCG-HNCv-18+Cetuximab 组	59.9%	76.1%	13.3%	58.2天
MW-DCG-HNCv-18+阿霉素组	57.7%	74.7%	0%	47.0天
MW-DCG-HNCv-18+多西他赛组	79.8%	91.2%	26.7%	71.0天
C.novyi–NT+多西他赛组	67.4%	78.6%	13.3%	53.6天

由此可见，MW-DCG-HNCv-18 联合多西他赛对非小细胞肺癌荷瘤鼠模型抑瘤率、坏死率，显著高于其他联合给药组。MW-DCG-HNCv-18 联合多西他赛组荷瘤鼠肿瘤体积在给药第六天表现出抑制作用，并始终保持 $300mm^3$ 左右，而其它几组却表现出不同程度的增长（图 2）。同时，MW-DCG-HNCv-18 联合多西他赛组 26.7%荷瘤鼠肿瘤几乎完全的消除（图 3），视为治愈，显著高于其他三个联合给药组。MW-DCG-HNCv-18 联合多西他赛可延长荷瘤小鼠的存活期至 71.0 天，为对照组荷瘤鼠生存期的 2.9 倍，并显著长于 MW-DCG-HNCv-18 联合 Cetuximab 组、MW-DCG-HNCv-18 联合阿霉素组和 C.novyi–NT 联合多

西他赛组。可见，MW-DCG-HNCv-18 与多西他赛联合治疗非小细胞肺癌显示出超叠加作用。

实施例 3

研究方法：

①非小细胞肺癌模型建立

采用细胞皮下注射法将非小细胞肺癌 A549 细胞缓慢注入雌性 Balb/c-nu/nu 裸小鼠（5 周龄，20g）右背部股外侧皮下处，待肿瘤体积长至 300mm^3 时，进行体内试验。

②动物分组与处理

对照组：n=15 只，尾静脉注射 PBS 缓冲液 0.2ml；

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-1 组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢芽孢，剂量为 0.5×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-2 组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 1.0×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-3 组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 2.0×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-4 组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 3.0×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-5 组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 5.0×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-6 组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 6.0×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-7 组：n=15 只，第 1 天尾静脉注射 MW-DCG-HNCv-18 芽孢，剂量为 7.0×10^8 个/(kg.body weight)；第 4 天和第 11 天尾静脉注射多西他赛，剂量均为 20mg/(kg. body weight)。

③检测指标

以游标卡尺测量裸鼠移植瘤长径(a)和横径(b)，每周 3～4 次。同时对荷瘤鼠体重、取食、饮水、精神状态、行为、皮毛颜色、排泄及死亡情况等进行观察记录。

④评价标准

根据每次测量的肿瘤长径和横径数据计算肿瘤体积($V = 1/2\times a\times b^2$)，绘制曲线，动态观察肿瘤的变化。

抑瘤率(%)=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%。

肿瘤坏死率(%)=坏死区横截面面积/整个肿瘤横截面面积×100%。

治愈率(%)=肿瘤完全消除动物数量/该组动物总数量×100%。

荷瘤鼠总体生存期：各组裸鼠经治疗后待其自然死亡，计算存活时间。

⑤结果

组别	抑瘤率	坏死率	治愈率	平均存活天数
对照组	0	0	0	26.8天
MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-1 组	52.4%	44.4%	0%	41.2天
MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-2 组	64.2%	76.1%	0%	49.0天
MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-3 组	68.9%	80.2%	13.3%	56.0天
MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-4 组	79.7%	90.7%	26.7%	71.3天
MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-5 组	79.4%	84.6%	13.3%	66.4天
MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-6 组	79.1%	85.5%	13.3%	66.0天
MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-7 组	79.5%	87.9%	0%	54.7天

由上述结果可见，MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-1 组治疗非小细胞肺癌的抑瘤率、坏死率、治愈率和平均存活天数均显著低于其它 MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛组。MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-2 组、MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-3 组和 MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-4 组随着 MW-DCG-HNCv-18 芽孢剂量的增加其抑瘤率、坏死率、治愈率和平均存活天数逐渐增高，并以 MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-4 组抗肿瘤作用为最佳。与 MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-4 组相比，MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-7 组抑瘤率和坏死率虽无显著差异，但其治愈率和平均存活天数均显著低于 MW-DCG-HNCv-18 芽孢联合多西他赛-4 组。考虑 MW-DCG-HNCv-18 芽孢生产成本，研究认为应以 1.0×10^{8}~6.0×10^{8} 个/(kg.body weight)的 MW-DCG-HNCv-18 芽孢为其联合多西他赛治疗非小细胞肺癌的优选范围，其中以 3.0×10^{8} 个/(kg.body weight)MW-DCG-HNCv-18 芽孢为联合多西他赛治疗非小细胞肺癌的最优剂量。

权 利 要 求 书

1、一株驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株在制备治疗非小细胞肺癌药物中的应用。

2、一种治疗非小细胞肺癌的药物，其特征在于，包括以驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株和多西他赛为药效成分，与药学上可接受的辅料制成的药物组合物。

3、如权利要求 2 所述的药物，其特征在于，所述的驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株芽孢与多西他赛的比例为每毫克多西他赛联合 5×10^6 个~3.0×10^7 个菌株芽孢。

4、如权利要求 3 所述的药物，其特征在于，所述的驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株芽孢与多西他赛的比例为每毫克多西他赛联合 1.0×10^7 个~2.0×10^7 个菌株芽孢。

5、如权利要求 4 所述的药物，其特征在于，所述驯化戈氏梭菌 MW-DCG-HNCv-18 菌株芽孢与多西他赛的比例为每毫克多西他赛联合 1.5×10^7 个菌株芽孢。

6、如权利要求 2 所述的药物，其特征在于，所述的治疗非小细胞肺癌的药物剂型为芽孢冻干粉针剂。

7、如权利要求6所述的药物，其特征在于，所述芽孢冻干粉针剂与溶媒混合使用，溶媒选自林格氏液、质量浓度为0.9%的生理盐水、磷酸盐缓冲液。

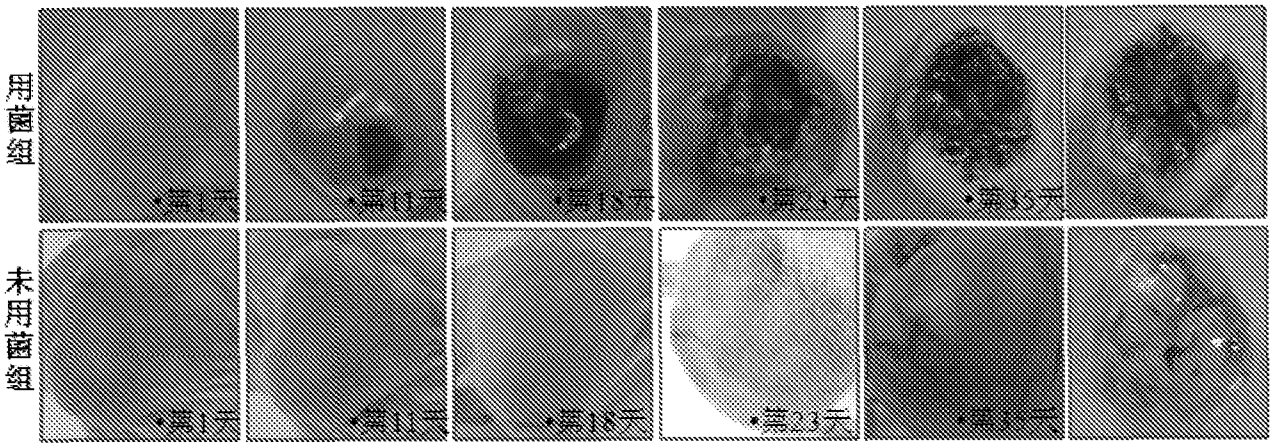

使用细菌
未使用细菌

图1

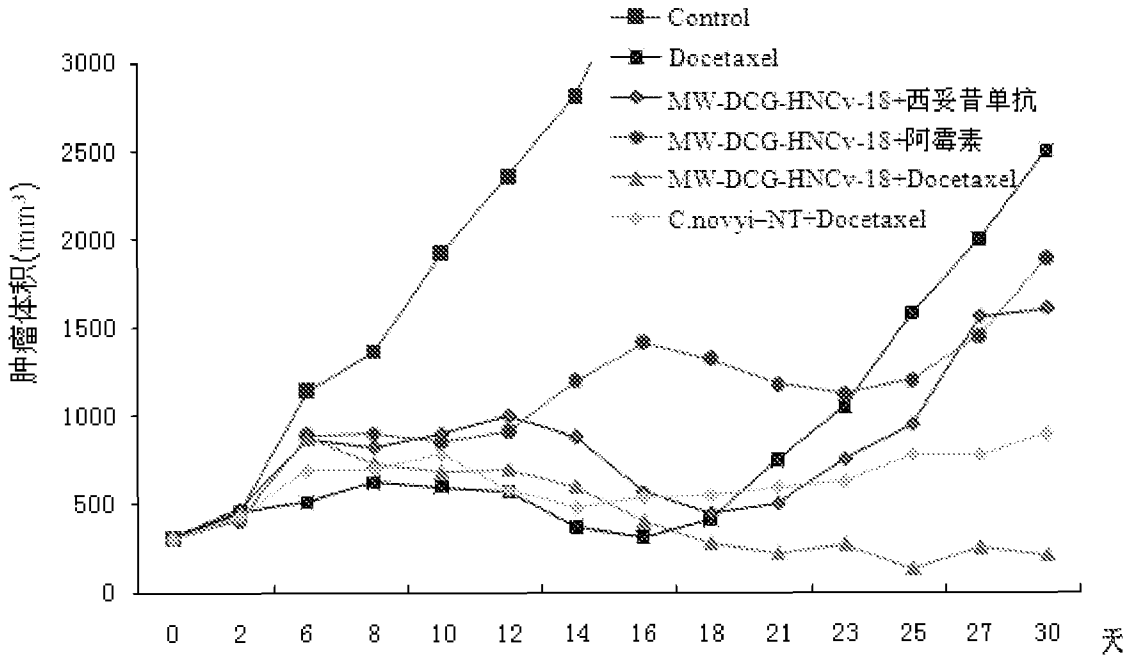
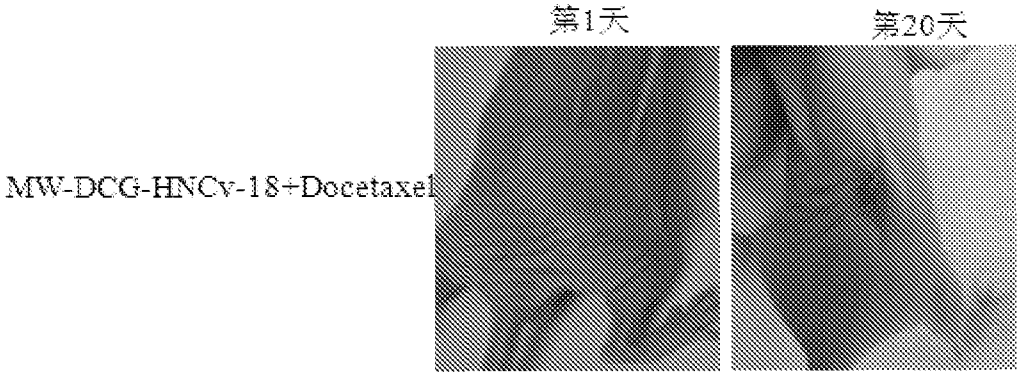

Control
Docetaxel
MW-DCG-HNCv-18+西妥昔单抗
MW-DCG-HNCv-18+阿霉素
MW-DCG-HNCv-18+Docetaxel
C.novyi-NT+Docetaxel
肿瘤体积(mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 2 6 8 10 12 14 16 18 21 23 25 27 30
天

图2


第1天
第20天
MW-DCG-HNCv-18+Docetaxel

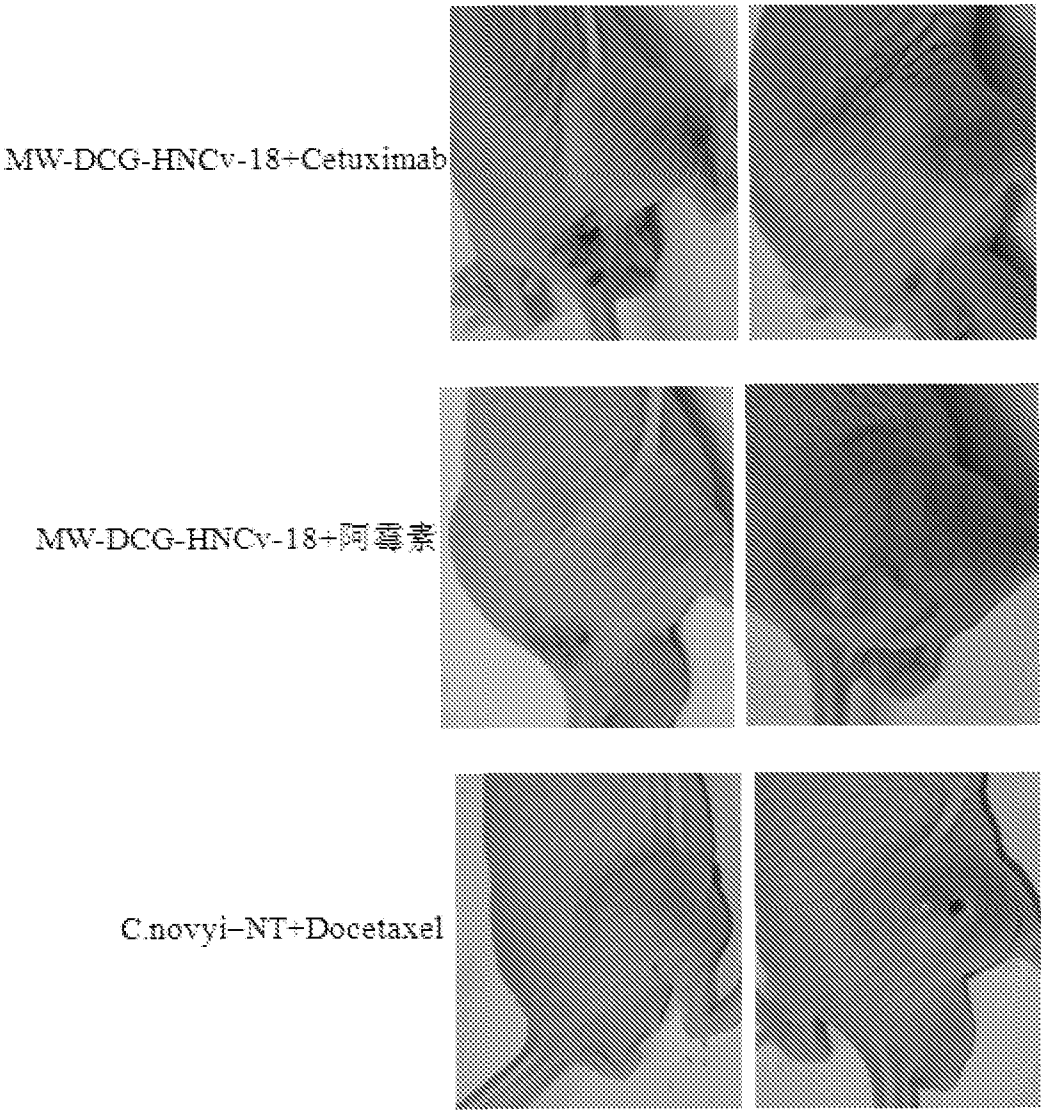

MW-DCG-HNCv-18+Cetuximab
MW-DCG-HNCv-18+阿霉素
C.novyi-NT+Docetaxel

图3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/083573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/742 (2015.01) i; A61P 35/00 (2006.01) n; A61K 31/337 (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)

CPRSABS, CNABS, WPI, EPODOC, SIPOABS, CNKI, BA, CA, PUBMED: clostridium ghonii, clostridium ghoni, docetaxel, non-small cell lung carcinoma

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104473973 A (SHANDONG CHUANGXIN PHARMACEUTICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.), 01 April 2015 (01.04.2015), claims 1-7	1-7
A	CN 103374538 A (GRIFFITH UNIVERSITY), 30 October 2013 (30.10.2013), claims 1-10, and description, pages 2-4	1-7
A	CN 104161747 A (SANOFI (CHINA) INVESTMENT CO., LTD.), 26 November 2014 (26.11.2014), the whole document	1-7
A	WO 2013173757 A1 (TEVA PHARM IND LTD.), 21 November 2013 (21.11.2013), the whole document	1-7

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 August 2015 (24.08.2015)	**23 September 2015 (23.09.2015)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **SONG, Zhigang** Telephone No.: (86-10) **62411078**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/083573

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104473973 A	01 April 2015	None	
CN 103374538 A	30 October 2013	WO 2013159155 A1	31 October 2013
		AU 2013252495 A1	18 December 2014
		EP 2841558 A1	04 March 2015
		US 2015147315 A1	28 May 2015
CN 104161747 A	26 November 2014	None	
WO 2013173757 A1	21 November 2013	US 2013310440 A1	21 November 2013
		CA 2874092 A1	21 November 2013
		AU 2013262589 A1	22 January 2015
		KR 20150024843 A	09 March 2015
		EP 2849761 A1	25 March 2015
		WO 2013173757 A8	30 April 2015
		CN 104684564 A	03 June 2015
		JP 2015522542 A	06 August 2015

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2015/083573

A. 主题的分类

A61K 35/742(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)n; A61K 31/337(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））

CPRSABS, CNABS, WPI, EPODOC, SIPOABS, CNKI, BA, CA, PUBMED: 戈氏梭菌，多西他赛，非小细胞肺癌，clostridium ghonii, clostridium ghoni, docetaxel, non-small cell lung carcinoma

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
PX	CN 104473973 A (山东创新药物研发有限公司) 2015年 4月 1日 (2015-04-01) 权利要求1－7	1－7
A	CN 103374538 A (格里菲斯大学) 2013年 10月 30日 (2013-10-30) 权利要求1－10、说明书第2－4页	1－7
A	CN 104161747 A (诺菲中国投资有限公) 2014年 11月 26日 (2014-11-26) 全文	1－7
A	WO 2013173757 A1 (TEVA PHARM IND LTD) 2013年 11月 21日 (2013-11-21) 全文	1－7

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2015年 8月 24日	2015年 9月 23日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	宋智刚 电话号码 (86-10)62411078

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/083573

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	104473973	A	2015年 4月 1日	无			
CN	103374538	A	2013年 10月 30日	WO	2013159155	A1	2013年 10月 31日
				AU	2013252495	A1	2014年 12月 18日
				EP	2841558	A1	2015年 3月 4日
				US	2015147315	A1	2015年 5月 28日
CN	104161747	A	2014年 11月 26日	无			
WO	2013173757	A1	2013年 11月 21日	US	2013310440	A1	2013年 11月 21日
				CA	2874092	A1	2013年 11月 21日
				AU	2013262589	A1	2015年 1月 22日
				KR	20150024843	A	2015年 3月 9日
				EP	2849761	A1	2015年 3月 25日
				WO	2013173757	A8	2015年 4月 30日
				CN	104684564	A	2015年 6月 3日
				JP	2015522542	A	2015年 8月 6日