



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116751745 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 15

(21) 申请号 202310993902.9

A61K 9/48 (2006.01)

(22) 申请日 2023.08.09

A61K 9/19 (2006.01)

(71) 申请人 北京圣美细胞生命科学工程研究院  
有限公司

地址 100000 北京市顺义区临空经济核心区安泰大街9号18号楼207

(72) 发明人 杨晓晨

(74) 专利代理机构 成都顶峰专利事务所(普通合伙) 51224

专利代理师 叶昌威

(51) Int. Cl.

C12N 5/078 (2010.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 35/15 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

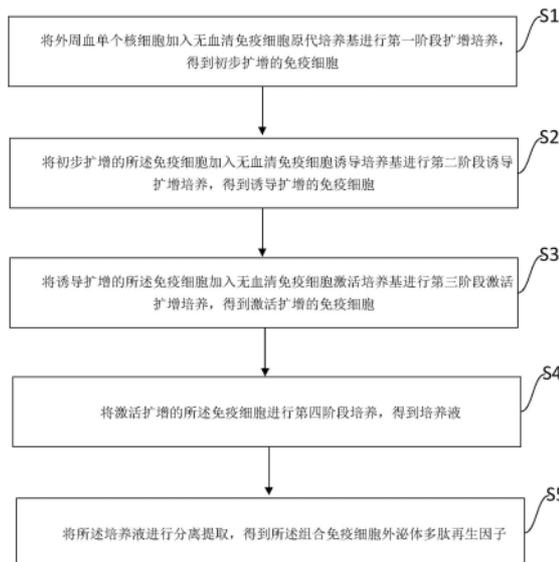
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

## (54) 发明名称

一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用

## (57) 摘要

本发明涉及一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用,涉及细胞治疗技术领域,本发明提供的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子对甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤细胞有着明显的抑制作用,具有明显而广谱的抗肿瘤活性,为研发能够有效治疗多种癌症的广谱抗癌药物提供了一种新的思路,具有实际的应用价值。



1. 一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其特征在于,所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的制备方法包括以下步骤:

将外周血单个核细胞加入无血清免疫细胞原代培养基进行第一阶段扩增培养,得到初步扩增的免疫细胞;

将初步扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞诱导培养基进行第二阶段诱导扩增培养,得到诱导扩增的免疫细胞;

将诱导扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞激活培养基进行第三阶段激活扩增培养,得到激活扩增的免疫细胞;

将激活扩增的所述免疫细胞进行第四阶段培养,得到培养液;

将所述培养液进行分离提取,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;

其中,所述无血清免疫细胞原代培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、LIF0.5-2.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素400-600U/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml;

所述无血清免疫细胞诱导培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、bFGF2-4ng/ml、BMP-40.5-0.8ug/ml、沙培林0.003-0.005KE/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml;

所述无血清免疫细胞激活培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、TGF- $\beta$ 1-2ng/ml、白藜芦醇40-60ng/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml。

2. 根据权利要求1所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其特征在于,所述第一阶段扩增培养的步骤包括:将外周血单个核细胞加入无血清免疫细胞原代培养基后,置于37℃温箱内孵育12个小时,然后去除贴壁细胞杂质完成传代培养。

3. 根据权利要求1所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其特征在于,所述第二阶段扩增培养的步骤包括:将初步扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞诱导培养基后,置于37℃培养箱中进行培养10-14天,每2天传代一次。

4. 根据权利要求1所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其特征在于,所述第三阶段扩增培养的步骤包括:将诱导扩增后的免疫细胞加入无血清免疫细胞激活培养基后,置于37℃培养箱中进行培养10-14天,每2天传代一次。

5. 根据权利要求1所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其特征在于,所述第四阶段扩增培养的步骤包括:将激活扩增的免疫细胞继续放于37℃培养箱中进行监测,根据监测的细胞形态,进行补液,直至扩增到标准细胞形态后,得到最终培养液。

6. 根据权利要求1所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其特征在于,将所述培养液进行分离提取,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的步骤包括以下过程:将培养液依次进行离心,后采用亲和层析柱进行蛋白纯化,收集洗脱液,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子。

7. 根据权利要求1~6任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其特征在于,所述无血清免疫细胞原代培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、LIF1.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素500U/ml和层粘连蛋白8ug/ml;

所述无血清免疫细胞诱导培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、bFGF3ng/ml、BMP-40.7ug/ml、沙培林0.004KE/ml和层粘连蛋白8ug/ml;

所述无血清免疫细胞激活培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、TGF- $\beta$

1.5ng/ml、白藜芦醇50ng/ml和层粘连蛋白8ug/ml。

8. 权利要求1-7任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子在制备治疗,和/或,预防肿瘤疾病药物中的应用;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

9. 一种用于治疗肿瘤疾病的口服肠溶胶囊,其特征在于,所述口服肠溶胶囊的药效成分包括权利要求1-7任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

10. 一种用于治疗肿瘤疾病的冻干粉制剂,其特征在于,所述冻干粉制剂的药效成分包括权利要求1-7任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

## 一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞治疗技术领域,尤其涉及一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用。

### 背景技术

[0002] 癌细胞常规地产生于我们的身体中但却不断地被健康免疫系统所破坏,在免疫系统未能破坏这些常规形成的患病细胞时,形成癌肿瘤。癌症已经成为全球的重大公共卫生问题,严重威胁人类健康,并且发病率和死亡率不断上升。其中,甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌均为高发病率癌症,且有着呈逐年递增的趋势。

[0003] 目前,癌症的治疗方式还是采用手术、放疗和化疗为主要的传统治疗方法,但其治疗效果并不乐观,同时高额的治疗成本也成为患者家庭的一大难题。靶向药的出现为肿瘤治疗提供了新的选择,但临床耐药问题也随之出现。因此,研发一种新型的能够有效治疗多种癌症的广谱抗癌药物显得十分的有意义。

### 发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供了一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用,该组合免疫细胞外泌体多肽再生因子对甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤细胞有着明显的抑制作用,具有明显而广谱的抗肿瘤活性,为研发能够有效治疗多种癌症的广谱抗癌药物提供了一种新的思路,具有实际的应用价值。

[0005] 第一方面,本发明提供了一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的制备方法包括以下步骤:

将外周血单个核细胞加入无血清免疫细胞原代培养基进行第一阶段扩增培养,得到初步扩增的免疫细胞;

将初步扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞诱导培养基进行第二阶段诱导扩增培养,得到诱导扩增的免疫细胞;

将诱导扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞激活培养基进行第三阶段激活扩增培养,得到激活扩增的免疫细胞;

将激活扩增的所述免疫细胞进行第四阶段培养,得到培养液;

将所述培养液进行分离提取,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;

其中,所述无血清免疫细胞原代培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、LIF0.5-2.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素400-600U/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml;

所述无血清免疫细胞诱导培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、bFGF2-4ng/ml、BMP-40.5-0.8ug/ml、沙培林0.003-0.005KE/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml;

所述无血清免疫细胞激活培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、TGF- $\beta$ 1-2ng/ml、白藜芦醇40-60ng/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml。

[0006] 进一步地,所述第一阶段扩增培养的步骤包括包括:将外周血单个核细胞加入无血清免疫细胞原代培养基后,置于37℃温箱内孵育12个小时,然后去除贴壁细胞杂质完成传代培养。

[0007] 进一步地,所述第二阶段扩增培养的步骤包括包括:将初步扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞诱导培养基后,置于37℃培养箱中进行培养10-14天,每2天传代一次。

[0008] 进一步地,所述第三阶段扩增培养的步骤包括包括:将诱导扩增后的免疫细胞加入无血清免疫细胞激活培养基后,置于37℃培养箱中进行培养10-14天,每2天传代一次。

[0009] 进一步地,所述第四阶段扩增培养的步骤包括包括:将激活扩增的免疫细胞继续放于37℃培养箱中进行监测,根据监测的细胞形态,进行补液,直至扩增到标准细胞形态后,得到最终培养液。

[0010] 进一步地,将所述培养液进行分离提取,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的步骤包括以下过程:将培养液依次进行离心,后采用亲和层析柱进行蛋白纯化,收集洗脱液,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子。

[0011] 进一步地,所述无血清免疫细胞原代培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、LIF1.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素500U/ml和层粘连蛋白8ug/ml;

所述无血清免疫细胞诱导培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、bFGF3ng/ml、BMP-40.7ug/ml、沙培林0.004KE/ml和层粘连蛋白8ug/ml;

所述无血清免疫细胞激活培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、TGF- $\beta$ 1.5ng/ml、白藜芦醇50ng/ml和层粘连蛋白8ug/ml。

[0012] 第二方面,本发明提供了第一方面任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子在制备治疗,和/或,预防肿瘤疾病药物中的应用;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

[0013] 第三方面,本发明提供了一种用于治疗肿瘤疾病的口服肠溶胶囊,所述口服肠溶胶囊的药效成分包括第一方面任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

[0014] 第四方面,本发明提供了一种用于治疗肿瘤疾病的冻干粉制剂,所述冻干粉制剂的药效成分包括第一方面任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

[0015] 本发明实施例提供的上述技术方案与现有技术相比至少具有如下优点:

本发明实施例提供了一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用,该组合免疫细胞外泌体多肽再生因子通过在第一阶段扩增培养、第二阶段诱导扩增培养和第三阶段激活扩增培养分别加入特定的培养成分,最后将所得培养液进行分离提取,得到了一种具有明显而广谱的抗肿瘤活性的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子。该组合免疫细胞外泌体多肽再生因子对甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤细胞有着明显的抑制作用,为研发能够有效治疗多种癌症的广谱抗癌药物提供了一种新的思路,具有实际的应用价值。

## 附图说明

[0016] 此处的附图被并入说明书中并构成本说明书的一部分,示出了符合本发明的实施例,并与说明书一起用于解释本发明的原理。

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,对于本领域普通技术人员而言,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1为本发明实施例提供的一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的制备方法的流程示意图;

图2为本发明典型病例2中胃癌患者治疗前检测结果图;

图3为本发明典型病例2中胃癌患者治疗前检测结果图;

图4为本发明典型病例3中肺癌患者治疗前检测结果图;

图5为本发明典型病例3中肺癌患者治疗前检测结果图。

## 具体实施方式

[0019] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0020] 除非另有特别说明,本发明中用到的各种原材料、试剂、仪器和设备等,均可通过市场购买得到或者可通过现有方法制备得到。

[0021] 第一方面,本发明提供了一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,如图1所示,所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的制备方法包括以下步骤:

将外周血单个核细胞加入无血清免疫细胞原代培养基进行第一阶段扩增培养,得到初步扩增的免疫细胞;

将初步扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞诱导培养基进行第二阶段诱导扩增培养,得到诱导扩增的免疫细胞;

将诱导扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞激活培养基进行第三阶段激活扩增培养,得到激活扩增的免疫细胞;

将激活扩增的所述免疫细胞进行第四阶段培养,得到培养液;

将所述培养液进行分离提取,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;

其中,所述无血清免疫细胞原代培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、LIF0.5-2.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素400-600U/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml;

所述无血清免疫细胞诱导培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、bFGF2-4ng/ml、BMP-40.5-0.8ug/ml、沙培林0.003-0.005KE/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml;

所述无血清免疫细胞激活培养基中包括以下成分:IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、TGF- $\beta$ 1-2ng/ml、白藜芦醇40-60ng/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml。

[0022] 本发明实施例提供了一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用,该组合免疫细胞外泌体多肽再生因子通过在第一阶段扩增培养、第二阶段诱导扩增培养和第三阶段激活扩增培养分别加入特定的培养成分,由外周血单个核细胞经特定培养基扩增培养成DC细胞+NK细胞+T细胞+B细胞,后继续培养一段时间,最后将所得培养液进行分离提取,得到了一种具有明显而广谱的抗肿瘤活性的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子。该组合免疫细

胞外泌体多肽再生因子对甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤细胞有着明显的抑制作用,为研发能够有效治疗多种癌症的广谱抗癌药物提供了一种新的思路,具有实际的应用价值。

[0023] 本发明中外周血单个核细胞可直接购买市售产品,也可按照从采自人体的新鲜血液按照现有外周血单个核细胞的分离制备方法进行制备得到。

[0024] 本发明中进行第一阶段扩增培养时,所采用的无血清免疫细胞原代培养基是在现有市售T细胞基础培养基中额外加入“IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、LIF0.5-2.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素400-600U/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml”所得。优选地,所述无血清免疫细胞原代培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、LIF1.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素500U/ml和层粘连蛋白8ug/ml。

[0025] 本发明中进行第二阶段诱导扩增培养时,所采用的无血清免疫细胞诱导培养基是在现有市售T细胞基础培养基中额外加入“IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、bFGF2-4ng/ml、BMP-40.5-0.8ug/ml、沙培林0.003-0.005KE/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml”所得。优选地,所述无血清免疫细胞诱导培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、bFGF3ng/ml、BMP-40.7ug/ml、沙培林0.004KE/ml和层粘连蛋白8ug/ml。

[0026] 本发明中进行第三阶段诱导扩增培养时,所采用的无血清免疫细胞激活培养基是在现有市售T细胞基础培养基中额外加入“IL2600-1000U/ml、IL101200-1500U/ml、TGF- $\beta$ 1-2ng/ml、白藜芦醇40-60ng/ml和层粘连蛋白5-10ug/ml”所得。优选地,所述无血清免疫细胞激活培养基中包括以下成分:IL2800U/ml、IL101350U/ml、TGF- $\beta$ 1.5ng/ml、白藜芦醇50ng/ml和层粘连蛋白8ug/ml。

[0027] 在一些具体实施例中,所述第一阶段扩增培养的步骤包括包括:将外周血单个核细胞加入无血清免疫细胞原代培养基后,置于37℃温箱内孵育12个小时,然后去除贴壁细胞杂质完成传代培养。

[0028] 在一些具体实施例中,所述第二阶段扩增培养的步骤包括包括:将初步扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞诱导培养基后,置于37℃培养箱中进行培养10-14天,每2天传代一次。

[0029] 在一些具体实施例中,所述第三阶段扩增培养的步骤包括包括:将诱导扩增后的免疫细胞加入无血清免疫细胞激活培养基后,置于37℃培养箱中进行培养10-14天,每2天传代一次。

[0030] 在一些具体实施例中,所述第四阶段扩增培养的步骤包括包括:将激活扩增的免疫细胞继续放于37℃培养箱中进行监测,根据监测的细胞形态,进行补液,直至扩增到标准细胞形态后,得到最终培养液;其中,在一些具体实施例中,标准细胞形态可理解为标准成熟的T细胞形态。

[0031] 在一些具体实施例中,将所述培养液进行分离提取,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的步骤包括以下过程:将培养液依次进行离心,后采用亲和层析柱进行蛋白纯化,收集洗脱液,得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子。具体地,可包括以下过程:

将培养液进行离心分离后,得上清液;然后采用MabSelect TMSuRe™亲和层析柱,使用5个柱体积平衡缓冲液进行平衡,将经步骤1初步纯化的样品加载到亲和层析柱上,使

用5个柱体积的淋洗缓冲液进行淋洗,使用5个柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱,使用预放有中和液容器收集获得的目的蛋白洗脱物,中和后的目的蛋白溶液的pH为6.5~8.0。使用5个柱体积的再生液进行再生,使用3个柱体积的清洗液清洗层析柱,最后使用5个柱体积的平衡缓冲液平衡层析柱,最后使用保存液将层析柱保存;其中,平衡缓冲液:20mMTris-HCl,150mMNaCl,pH7.2;淋洗缓冲液:20mMTris-HCl,150mMNaCl,pH7.2;洗脱缓冲液:100mM柠檬酸缓冲液,0.1M蔗糖,pH3.4;中和液:1MTris-HCl,pH8.5;再生液:100mMHAc;清洗液:0.1MNaOH;保存液:20体积%乙醇。

[0032] 需要说明的是,本发明实施例提供组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的制备方法中所涉及的组分原料,若无特殊的限定或说明,如IL2(白细胞介素-2)、IL10(白介素10)、LIF(白血病抑制因子)、 $\gamma$ -干扰素、层粘连蛋白、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)、BMP-4(骨形态发生蛋白4)、沙培林、TGF- $\beta$ (转化生长因子- $\beta$ )、白藜芦醇等各组分均可直接采用市售产品。同时,本发明实施例提供组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的制备方法中所涉及的操作步骤,若无特殊的说明或具体限定,均可按照本领域常规操作方式进行,本申请文件不再一一赘述。

[0033] 第二方面,本发明提供了第一方面任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子在制备治疗,和/或,预防肿瘤疾病药物中的应用;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

[0034] 本发明提供的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子对甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤细胞有着明显的抑制作用,为研发能够有效治疗多种癌症的广谱抗癌药物提供了一种新的思路,具有实际的应用价值。

[0035] 第三方面,本发明提供了一种用于治疗肿瘤疾病的口服肠溶胶囊,所述口服肠溶胶囊的药效成分包括第一方面任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

[0036] 本发明提供的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子可制备成口服肠溶胶囊,其制备方法可按照现有口服肠溶胶囊制备工艺进行,具体包括以下过程:直接购买肠溶空心胶囊后加入制备完成的冻干粉末即可。

[0037] 第四方面,本发明提供了一种用于治疗肿瘤疾病的冻干粉制剂,所述冻干粉制剂的药效成分包括第一方面任一项所述的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;所述肿瘤疾病包括甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌中的至少一种。

[0038] 本发明提供的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子可制备成冻干粉制剂(用无菌水或生理盐水稀释后,可直接进行注射、回输),其制备方法可按照现有冻干粉制剂制备工艺进行,具体包括以下过程:直接用冻干机进行低温冻干。

[0039] 下面结合具体的实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照国家标准测定。若没有相应的国家标准,则按照通用的国际标准、常规条件、或按照制造厂商所建议的条件进行。

[0040] 实施例1

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的制备方法包括以下步骤:

将外周血单个核细胞加入无血清免疫细胞原代培养基,置于37℃温箱内孵育12个小时,然后去除贴壁细胞杂质完成传代培养天,完成第一阶段扩增培养,得到初步扩增的免疫细胞;

将初步扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞诱导培养基后,置于37℃培养箱中进行培养天,完成第二阶段诱导扩增培养12天,得到诱导扩增的免疫细胞;

将诱导扩增的所述免疫细胞加入无血清免疫细胞激活培养基后,置于37℃培养箱中进行培养天,完成第三阶段激活扩增培养12天,得到激活扩增的免疫细胞;

将激活扩增的所述免疫细胞继续放于37℃培养箱中进行监测,根据监测的细胞形态,进行补液,直至扩增到标准细胞形态后,完成第四阶段培养,得到培养液;

将所述培养液加入离心机分离,得上清液;然后采用MabSelectTMSuRe™亲和层析柱,使用5个柱体积平衡缓冲液进行平衡,将经步骤1初步纯化的样品加载到亲和层析柱上,使用5个柱体积的淋洗缓冲液进行淋洗,使用5个柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱,使用预放有中和液容器收集获得的目的蛋白洗脱物,中和后的目的蛋白溶液的pH为6.5~8.0。使用5个柱体积的再生液进行再生,使用3个柱体积的清洗液清洗层析柱,最后使用5个柱体积的平衡缓冲液平衡层析柱,最后使用保存液将层析柱保存;得到所述组合免疫细胞外泌体多肽再生因子;平衡缓冲液:20mMTris-HCl,150mMNaCl,pH7.2;淋洗缓冲液:20mMTris-HCl,150mMNaCl,pH7.2;洗脱缓冲液:100mM柠檬酸缓冲液,0.1M蔗糖,pH3.4;中和液:1MTris-HCl,pH8.5;再生液:100mMHAc;清洗液:0.1MNaOH;保存液:20体积%乙醇;

其中,所述无血清免疫细胞原代培养基是在现有T细胞基础培养基(无血清免疫细胞培养基)中额外加入以下成分:IL2600U/ml、IL101200U/ml、LIF0.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素400U/ml和层粘连蛋白5ug/ml;

所述无血清免疫细胞诱导培养基是在现有T细胞基础培养基(无血清免疫细胞培养基)中额外加入以下成分:IL2600U/ml、IL101200U/ml、bFGF2ng/ml、BMP-40.5ug/ml、沙培林0.003KE/ml和层粘连蛋白5ug/ml;

所述无血清免疫细胞激活培养基是在现有T细胞基础培养基(无血清免疫细胞培养基)中额外加入以下成分:IL2600U/ml、IL101200U/ml、TGF- $\beta$ 1ng/ml、白藜芦醇40ng/ml和层粘连蛋白5ug/ml。

#### [0041] 实施例2

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其制备方法与实施例1的区别仅在于:所述无血清免疫细胞原代培养基中额外加入成分为:IL21000U/ml、IL101500U/ml、LIF2.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素600U/ml和层粘连蛋白10ug/ml;所述无血清免疫细胞诱导培养基中额外加入成分为:IL21000U/ml、IL101500U/ml、bFGF4ng/ml、BMP-40.8ug/ml、沙培林0.005KE/ml和层粘连蛋白10ug/ml;所述无血清免疫细胞激活培养基中额外加入成分为:IL21000U/ml、IL101500U/ml、TGF- $\beta$ 2ng/ml、白藜芦醇60ng/ml和层粘连蛋白10ug/ml;其余步骤及参数均相同。

#### [0042] 实施例3

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其制备方法与实施例1的区别仅在于:所述无血清免疫细胞原代培养基中额外加入成分为:IL2800U/ml、IL101350U/ml、LIF1.5ng/ml、 $\gamma$ -干扰素500U/ml和层粘连蛋白8ug/ml;所述无血清免疫细胞诱导培养基中

额外加入成分为:IL2800U/ml、IL101350U/ml、bFGF3ng/ml、BMP-40.7ug/ml、沙培林0.004KE/ml和层粘连蛋白8ug/ml;所述无血清免疫细胞激活培养基中额外加入成分为:IL2800U/ml、IL101350U/ml、TGF- $\beta$ 1.5ng/ml、白藜芦醇50ng/ml和层粘连蛋白8ug/ml;其余步骤及参数均相同。

[0043] 对比例1

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其制备方法与实施例1的区别仅在于:将所述无血清免疫细胞原代培养基、所述无血清免疫细胞诱导培养基和所述无血清免疫细胞激活培养基中IL2均调整为IL4(白细胞介素-4);其余步骤及参数均相同。

[0044] 对比例2

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其制备方法与实施例1的区别仅在于:将所述无血清免疫细胞诱导培养基中BMP-4调整为SCF(重组人干细胞因子);其余步骤及参数均相同。

[0045] 对比例3

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其制备方法与实施例1的区别仅在于:将所述无血清免疫细胞激活培养基中TGF- $\beta$ 调整为TNF- $\alpha$ (肿瘤坏死因子- $\alpha$ );其余步骤及参数均相同。

[0046] 对比例4

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其制备方法与实施例1的区别仅在于:所述无血清免疫细胞激活培养基中未加入沙培林;其余步骤及参数均相同。

[0047] 对比例5

本例提供一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,其制备方法与实施例1的区别仅在于:所述无血清免疫细胞激活培养基中未加入白藜芦醇;其余步骤及参数均相同。

[0048] 测试例

本例对实施例1-3和对比例1-5所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子进行体外多种肿瘤细胞增殖抑制效果测试。

[0049] 测试方法:使用MTT实验法检测化合物对多种肿瘤细胞的增殖抑制作用。

[0050] 阳性对照组:采用选择性PI3K $\delta/\gamma$ 抑制剂IPI-145。

[0051] 空白对照组:使用96孔板,设置3平行实验组。将多种肿瘤细胞(包括胰腺癌细胞PATU8999T、HepG2肝癌细胞、TPC-1甲状腺癌细胞、A549肺癌细胞、MGC-803胃癌细胞株)以每孔7500个细胞的密度铺于96孔板,孵育72小时后,加入10 $\mu$ LMTT孵育4小时,加入100 $\mu$ LMTTBuffer溶解细胞结晶,在560nm吸光度检测波长。

[0052] 实验组:共8组(实验组1加入实施例1所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,实验组2加入实施例2所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,实验组3加入实施例3所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,实验组4加入对比例1所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,实验组5加入对比例2所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,实验组6加入对比例3所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,实验组7加入对比例4所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,实验组8加入对比例5所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子),使用96孔板,每组设置3平行实验。实施例1-3和对比例1-5所得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子浓度设置为10 $\mu$ M,每孔加入5 $\mu$ L,与肿瘤细胞共同孵育72小时,加入10 $\mu$ LMTT孵

育4小时,加入100 $\mu$ LMTT缓冲液溶解细胞结晶,在560nm吸光度检测波长。

[0053] 测试结果如表1所示,设置活力的阈值为50%,结果表明10 $\mu$ M作用72小时之后,本发明提供的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子对甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤细胞有着明显的抑制作用,且抑制效果显著优于对比例1~5和阳性对照组。

[0054] 表1

组别	PATU8999T 细胞存活率 (%)	HepG2细胞存 活率 (%)	TPC-1细胞存 活率 (%)	A549细胞存 活率 (%)	MGC-803细 胞存活率 (%)
空白对照组	100%	100%	100%	100%	100%
阳性对照组	63%	52%	64%	71%	55%
实验组1	51%	39%	42%	52%	33%
实验组2	43%	30%	29%	40%	24%
实验组3	28%	24%	13%	19%	10%
实验组4	58%	45%	69%	60%	66%
实验组5	61%	70%	49%	59%	62%
实验组6	55%	48%	72%	63%	50%
实验组7	81%	76%	87%	84%	71%
实验组8	77%	75%	82%	83%	88%

#### 典型病例1

张先生65岁,于半年前发现颈部有一个硬块,大小约为鸡蛋大小,疼痛、吞咽困难,呕吐,气促、心悸。颈部可见一硬质肿块,大小约为6cmx5cm,质地较硬,表面凹凸,TSH、T3、T4、均升高,WBC升高出现继发感染,超声边界模糊,形态不规则诊断为甲状腺癌三期。

[0055] 治疗方法如下:

将实施例3所制得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子分别制备成口服肠溶胶囊(每颗种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子的含量为mg)和冻干粉制剂。具体治疗如下:

首先2020年2月3日至2020年2月11日,口服一周肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0056] 2020年2月12日,在CT引导下,将冻干粉剂加入无菌水,配制成浓度为2mg/ml的溶液后注射至甲状腺肿瘤处,注射量为15ml,病人主诉呕吐感减弱,炎症指标降低。

[0057] 2020年2月13日,进行第一轮回输组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,共计三次。

[0058] 2020年2月13日,第一轮第一次回输外泌体多肽再生因子组合物,回输量为200ml。呕吐感减弱,炎症指标持续降低,肿块无明显变化。

[0059] 2020年3月14日至4月21日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0060] 2020年4月22日,第一轮第二次回输组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,回输量为200ml,病人主诉吞咽困难感减轻,呕吐感明显减弱,呼吸较为正常,肿块质地较软,肿块减

小为 $4.3 \times 3.8$ cm。

[0061] 2020年4月23日至2020年5月30日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0062] 2020年5月31日,第一轮第三次回输组合免疫细胞外泌体多肽再生因子,回输量为200ml,血液检查TSH、T3、T4、开始下降,WBC下降,继发感染逐渐转好,肿块减小为 $2.3 \times 1.8$ cm。

[0063] 2020年6月1日至2020年7月10日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0064] 2020年7月11日,进行第二轮回输组合免疫细胞外泌体多肽再生因子。

[0065] 2020年7月11日,第二轮第一次回输外泌体多肽再生因子组合物,回输量为200ml。血液检查TSH、T3、T4、持续下降,WBC数值持续下降,肿块减小为 $1.3 \times 0.9$ cm

2020年7月11日至2020年8月20日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0066] 2020年8月21日,第二轮第二次回输外泌体多肽再生因子组合物,回输量为200ml,病人主诉吞咽困难消失,无呕吐,呼吸恢复正常,肿块质软,肿块减小为 $0.3 \times 0.4$ cm。

[0067] 2020年8月22日至2020年9月29日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0068] 2020年10月4日,第二轮第三次回输外泌体多肽再生因子组合物,回输量为200ml,血液检查TSH、T3、T4、恢复正常数值,WBC恢复至正常水平,无感染,肿块基本消失

2020年11月5日在CT引导下注射浓度为2mg/ml的冻干粉制剂无菌水溶液15ml至甲状腺肿瘤处,肿块完全消失,病人体征恢复正常。后续继续服用肠溶胶囊三周,每日服用量为一日一颗,防止复发。

[0069] 典型病例2

患者男52岁恶心、胃剧痛,暖气,伴反酸、,腹胀,便血,便秘等。B超下显示胃体下部弯可见一大小约 $3.3 \times 3.8$ cm片状粘膜浅凹陷、底部粘膜充血糜烂结节不平、周围可见皱装纠集中断,病变向肛侧累及胃角,胃体小弯见大片不规则糜烂灶表面增生,胃窦部粘膜变苍白,透见粘膜下血管,散在糜烂。萎缩性胃炎伴糜烂,十二指肠球炎,反流性食管炎被诊断为胃癌。

[0070] 治疗方法如下:

将实施例3所制得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子分别制备成口服肠溶胶囊(与典型病例1中制备方法相同)和冻干粉制剂(与典型病例1中制备方法相同)。具体治疗如下:

首先2020年6月3日至2020年6月11日,口服一周肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0071] 2020年6月12日在CT引导下注射浓度为2mg/ml的冻干粉制剂无菌水溶液15ml至胃癌病灶处,病人主诉呕吐感减弱,胃痛有所减轻。

[0072] 2020年6月13日,进行第一轮回输共计三次。

[0073] 2020年6月13日,第一轮第一次回输冻干粉剂,回输量为200ml;呕吐感减弱、胃痛、腹胀、便血均有所减轻。

[0074] 2020年6月14日至6月30日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0075] 2020年7月1日,第一轮第二次回输冻干粉剂,回输量为200ml;病人主诉呕吐持续减轻,疼痛感明显减弱,反酸、腹胀、便血持续性减弱,肿块质地变软,肿块减小为 $2.3 \times 2.8$ cm。

- [0076] 2020年7月2日至2020年7月30日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。
- [0077] 2020年7月31日,第一轮第三次回输冻干粉剂,回输量为200ml;血液检查TSH、T3、T4、开始下降,WBC下降,继发感染逐渐转好,肿块减小为 $1.7 \times 1.8\text{cm}$ 。
- [0078] 2020年8月1日至2020年8月20日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。
- [0079] 2020年8月21日,进行第二轮回输。
- [0080] 2020年8月21日,第二轮第一次回输冻干粉剂,回输量为200ml。检查病人基本无呕吐现象出现,疼痛持续减弱,偶感夜间疼痛,腹胀感消失。肿块质软,肿块减小为 $1.1 \times 0.9\text{cm}$ 。
- [0081] 2020年8月21日至2020年9月20日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。
- [0082] 2020年9月21日,第二轮第二次回输冻干粉剂,回输量为200ml,无呕吐,疼痛基本消失,便血消失,肿块质软,肿块减小为 $0.5 \times 0.4\text{cm}$ 。
- [0083] 2020年9月22日至2020年10月29日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。
- [0084] 2020年10月30日,第二轮第三次回输冻干粉剂,回输量为200ml,无呕吐,无疼痛,无感染,检查癌症指标基于正常标,标肿块缩小 $0.13 \times 0.1\text{cm}$ 。
- [0085] 2020年11月1日,在CT引导下注射浓度为 $2\text{mg/ml}$ 的冻干粉制剂无菌水溶液 $15\text{ml}$ 至病灶处,肿块完全消失,病人体征恢复正常。后续继续服用肠溶胶囊三周,防止复发。
- [0086] 由图2和图3胃癌患者治疗前后的检测结果图进行对比可知:胃癌症状完全消失,治愈。
- [0087] 典型病例3
- 男,49岁,咳嗽,咳嗽时疼痛进行加重,胸痛,咳血。胸部CT示:右肺上叶后段见类圆形软组织结节影, $3.1\text{cm} \times 1.9\text{cm} \times 3.0\text{cm}$ ,边缘毛糙,内见偏心性小空洞形成,右肺内见多发小结节影;右侧胸腔少量积液,诊断为肺癌。
- [0088] 治疗方法如下:
- 将实施例3所制得的组合免疫细胞外泌体多肽再生因子分别制备成口服肠溶胶囊(与典型病例1中制备方法相同)和冻干粉制剂(与典型病例1中制备方法相同)。具体治疗如下:
- 首先2021年3月3日至2020年3月11日,口服一周肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。
- [0089] 2021年3月12日,在CT引导下注射浓度为 $2\text{mg/ml}$ 的冻干粉制剂无菌水溶液 $15\text{ml}$ 至肺癌病灶处。
- [0090] 2021年3月13日,进行第一轮回输共计三次。
- [0091] 2021年3月13日,第一次回输冻干粉剂,回输量为 $200\text{ml}$ ,病人咳嗽减轻,胸痛减弱。
- [0092] 2021年3月14日4月25日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。
- [0093] 2021年4月25日,第二次回输冻干粉剂,回输量为 $200\text{ml}$ ,病人主诉咳嗽持续减轻,疼痛感减弱,咳血减轻,肿块质地变软,肿块减小 $2.7 \times 1.5 \times 2.4\text{cm}$ 。
- [0094] 2021年4月26日至2021年6月5日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。
- [0095] 2021年6月5日,第三次回输冻干粉剂,回输量为 $200\text{ml}$ ,咳嗽减轻,疼痛感持续降低,肿块减小为 $2.0 \times 1.1 \times 1.2\text{cm}$ 。
- [0096] 2021年6月5日至2021年7月20日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0097] 2021年7月21日,进行第二轮回输。

[0098] 2021年7月21日,第二轮第一次回输冻干粉剂,回输量为200ml。检查疼痛持续减弱,偶发疼痛,阵发咳血,肿块质软,肿块减小为 $2.0 \times 0.9 \times 1.2\text{cm}$ 。

[0099] 2021年7月21日至2020年9月15日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0100] 2021年9月16日,第二轮第二次回输冻干粉剂,回输量为200ml,无咳血,疼痛基本消失,便血消失,肿块质软,肿块减小为 $1.1 \times 0.4 \times 0.37\text{cm}$ 。

[0101] 2020年9月17日至2020年10月22日,继续服用肠溶胶囊,每日服用量为一日一颗。

[0102] 2022年10月22日,第二轮第三次回输冻干粉剂,回输量为200ml,无呕吐,无疼痛,无感染,检查癌症指标基于正常标,标肿块缩小 $0.3 \times 0.1 \times 0.1\text{cm}$ 。

[0103] 2020年11月1日,在CT引导下注射浓度为 $2\text{mg/ml}$ 的冻干粉制剂无菌水溶液 $15\text{ml}$ 至病灶处,肿块完全消失,病人体征恢复正常。后续继续服用肠溶胶囊三周,,每日服用量为一日一颗,防止复发。

[0104] 由图4和图5肺癌患者治疗前后的检测结果图进行对比可知:肺癌症状完全消失,治愈。

[0105] 综上所述,本发明实施例提供了一种组合免疫细胞外泌体多肽再生因子及其应用,该组合免疫细胞外泌体多肽再生因子对甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤细胞有着明显的抑制作用,为研发能够有效治疗多种癌症的广谱抗癌药物提供了一种新的思路,具有实际的应用价值。

[0106] 本发明的各种实施例可以以一个范围的形式存在;应当理解,以一范围形式的描述仅仅是因为方便及简洁,不应理解为对本发明范围的硬性限制;因此,应当认为所述的范围描述已经具体公开所有可能的子范围以及该范围内的单一数值。例如,应当认为从1到6的范围描述已经具体公开子范围,例如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等,以及所述范围内的单一数字,例如1、2、3、4、5及6,此不管范围为何皆适用。另外,每当在本文中指出数值范围,是指包括所指范围内的任何引用的数字(分数或整数)。

[0107] 在本发明中,在未作相反说明的情况下,使用的方位词如“上”和“下”具体为附图中的图面方向。另外,在本发明说明书的描述中,术语“包括”“包含”等是指“包括但不限于”。在本文中,诸如“第一”和“第二”等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。在本文中,“和/或”,描述关联对象的关联关系,表示可以存在三种关系,例如,A和/或B,可以表示:单独存在A,同时存在A和B,单独存在B的情况。其中A,B可以是单数或者复数。在本文中,“至少一个”是指一个或者多个,“多个”是指两个或两个以上。“至少一种”、“以下至少一项(个)”或其类似表达,是指的这些项中的任意组合,包括单项(个)或复数项(个)的任意组合。例如,“a,b,或c中的至少一项(个)”,或,“a,b,和c中的至少一项(个)”,均可以表示:a,b,c,a-b(即a和b),a-c,b-c,或a-b-c,其中a,b,c分别可以是单个,也可以是多个。

[0108] 以上所述仅是本发明的具体实施方式,使本领域技术人员能够理解或实现本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所申请的原理和新颖特点相一

致的最宽的范围。

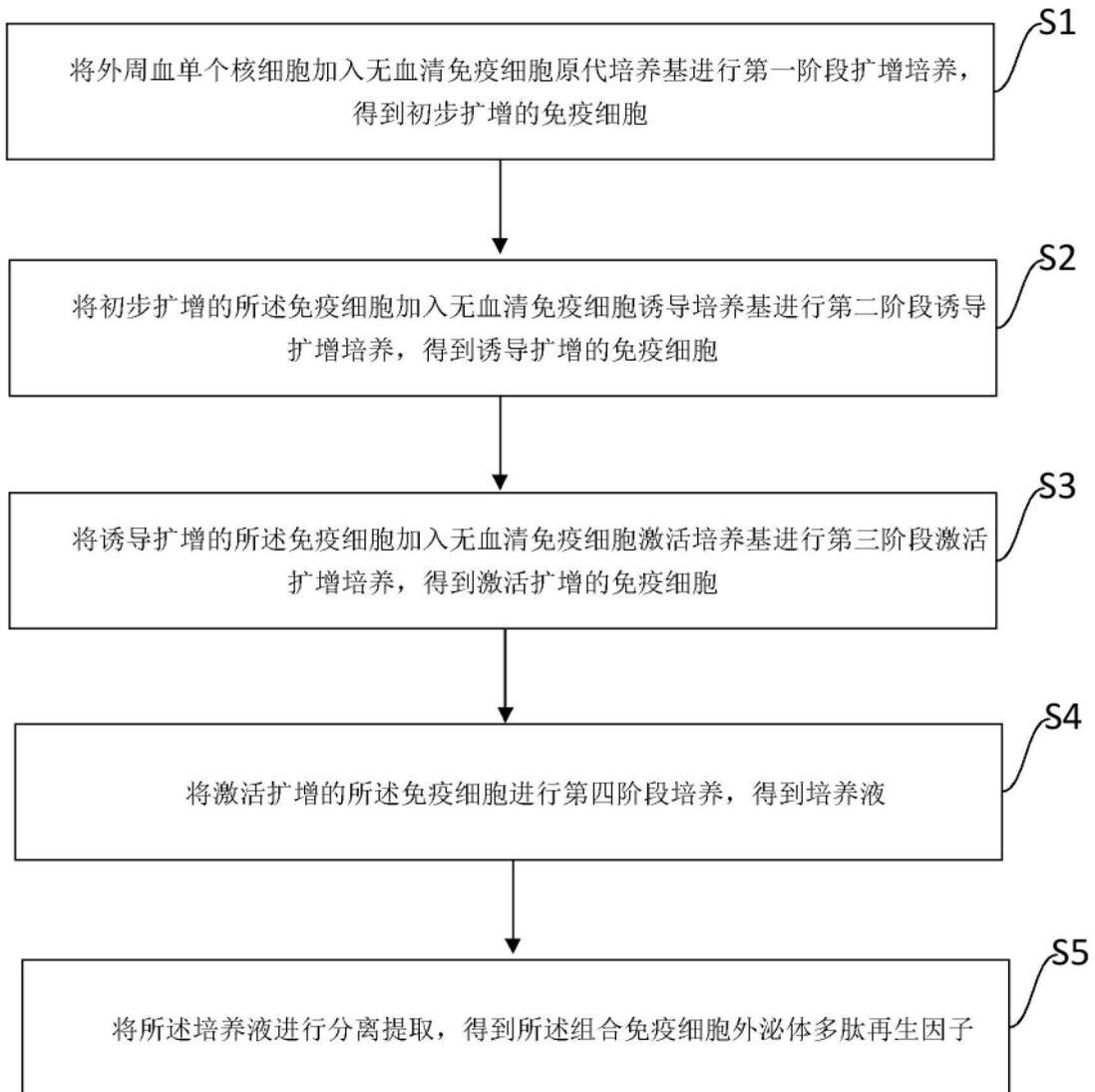


图1



图2

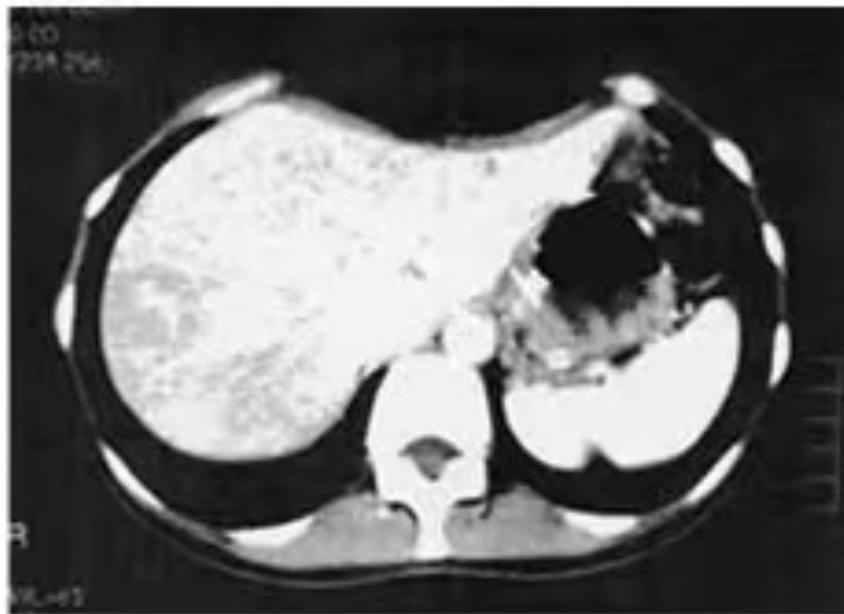


图3

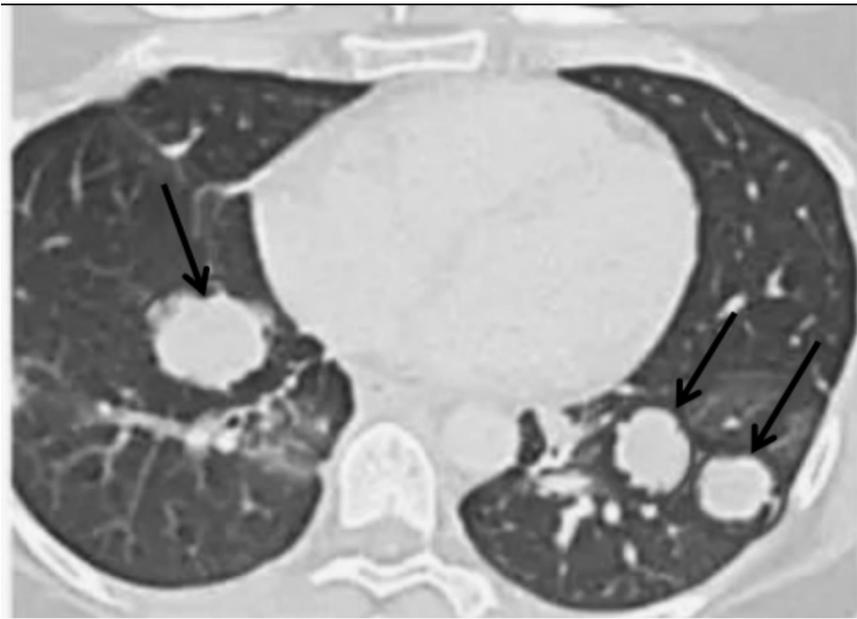


图4

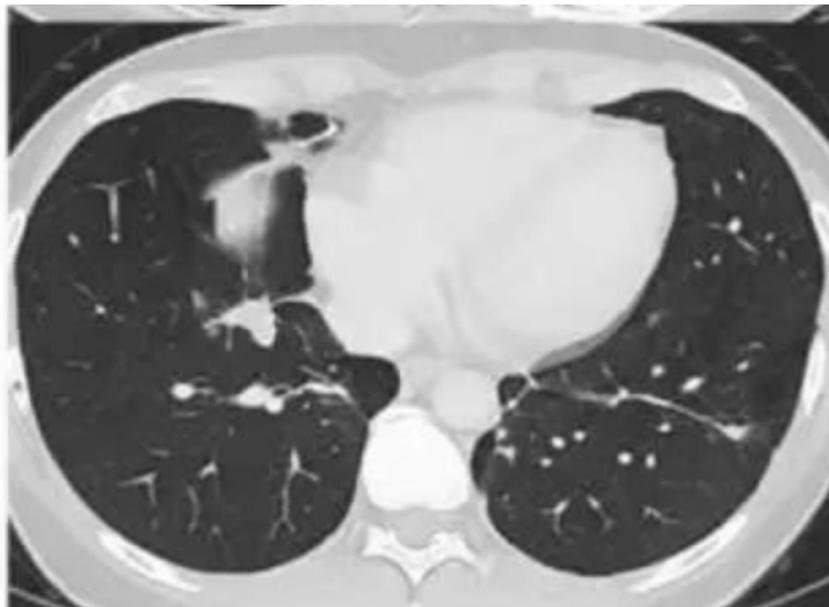


图5