

1 Ein oraler Impfstoff gegen SARS-CoV-2 RBD mRNA aus Rindermilch

2 Exosomen induzieren *in vivo* eine neutralisierende Antikörperantwort

3 Quan Zhang^{1#}, Miao Wang^{1#}, Chunle Han¹, Zhijun Wen¹, Xiaozhu Meng¹, Dongles

4 Qi¹, Na Wang¹, Huanqing Du¹, Jianhong Wang¹, Lu Lu^{1*}, Xiaohu Ge^{1,2*}

5 Tingo¹ Exosomes Technology Co., Ltd, Tianjin, China

6 Tingo² Regenerative Medicine Technology Co., Ltd, Tianjin, China

7 Diese[#] Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

8 *Korrespondenz an lulu@tingocell.com (Lu Lu) und gexiaohu@tingocell.com

9 (Xiaohu Ge)

10 Zusammenfassung

11 Das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus Typ 2 (SARS-CoV-2), das

12 Ursachen der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) wurden zahlreich vorgestellt

13 Herausforderungen für die globale Gesundheit. Die Impfstoffe umfassen Nanopartikel auf Lipidbasis

14 mRNA, inaktiviertes Virus und rekombiniertes Protein, wurden zur Vorbeugung eingesetzt

15 SARS-CoV-2-Infektionen in Kliniken und sind immens hilfreich gegen die

16 Epidemie. Hier stellen wir zunächst einen oralen mRNA-Impfstoff auf Rinderbasis vor

17 aus Milch stammende Exosomen (Milk-Exos), die den SARS-CoV-2-Rezeptor kodieren

18- Bindungsdomäne (RBD) als Immunogen. Die Ergebnisse zeigten, dass RBD-mRNA

19, die von aus Milch stammenden Exosomen abgegeben werden, können in 293 das sezernierte RBD-Peptid produzieren

20 Zellen *in vitro* und stimulierte neutralisierende Antikörper gegen RBD in Mäusen. Diese

21 Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ein aus Rindermilch gewonnener Exosomen-basierter mRNA-Impfstoff dies könnte

22 dienen als neue Strategie zur Prävention einer SARS-CoV-2-Infektion. Mittlerweile ist es auch so

23 kann als neues orales Abgabesystem für mRNA fungieren.

24 **Schlüsselwörter:** Aus Rindermilch gewonnene Exosomen; SARS-CoV-2; Rezeptorbindung

25 Domänen; mRNA; orale Impfstoffe; neutralisierender Antikörper

26 **Zusammenfassung in einem Satz:** Orale SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoff auf Rinderbasis

27 aus Milch gewonnene Exosomen können bei Mäusen neutralisierende Antikörper stimulieren.

28 Einführungen

29 COVID-19 weist typischerweise Symptome auf, die bei vielen Atemwegsinfektionen üblich sind.

30 einschließlich Fieber und Husten. In vielen Fällen verläuft die Erkrankung jedoch schwerwiegender

31 Erkrankungen, die akute Atemnot, disseminierte Erkrankungen usw. umfassen können

32 Todesfälle (1-3). Das SARS-CoV-2-Spike-Protein ist eine homotrimere Transmembran

33 Glykoproteine, bestehend aus S1- und S2-Untereinheiten. Wenn Spike-Protein interagiert mit

34 spezifische Rezeptoren auf Wirtszellen, seine Rezeptorbindungsdomäne (RBD) befindet sich an

35 den C-Terminus von S1 und kann spezifisch an den Rezeptor binden

36 Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) und initiiert die Membranfusion

37 zwischen Virus und Wirtszelle (4-7). Studien haben gezeigt, dass RBD der Hauptgrund ist

38 Ziel der meisten neutralisierenden Aktivität im Immenserum, was auf RBD hindeutet

39 könnte ein potenzielles Ziel für den 2019-nCoV-Impfstoff oder die Therapie sein (8-10).

40 Zu den verfügbaren Plattformen für COVID-19-Impfstoffe gehören derzeit auch inaktivierte

41 Impfstoffe, attenuierte Lebendimpfstoffe, rekombinante Proteinimpfstoffe, virale Vektoren

42 Impfstoffe und Nukleinsäureimpfstoffe (11). Im Jahr 2021 sind die Einnahmen von COVID-19

43 Impfstoffprodukte globaler Schlüsselunternehmen zeigten, dass Pfizer und German

44 Die Einnahmen aus mRNA-Impfstoffen von BioNTech beliefen sich auf 367,8 Milliarden US-Dollar und 213,6 Milliarden US-Dollar

45 Milliarden Dollar, was mehr als der Hälfte des weltweiten Impfstoffs entspricht

46 Marktanteil. Der mRNA-Impfstoff von Pfizer machte den höchsten Anteil aus

47 , weil es wegen seiner Sicherheit schnell große Aufmerksamkeit und Werbung erregte, hoch

48 Effizienz und kurze Produktionszyklen. Im Vergleich zu anderen Impfstofftechnologien

49 Plattformen bietet auch die mRNA-Impfstoffplattform diese Vorteile, darunter 1.

50 eine hervorragende Immunwirkung; 2. ein kurzer F&E-Zyklus; 3. Praktisches Großformat

51 Produktionen (12, 13); 4. kein Risiko einer Infektion oder Genomintegration (14-16); 5. die

52 Das menschliche Expressionssystem exprimiert Antigene mit guter immunogener Erholung

53 (17); 6 die Stimulierung der humoralen und zellulären Immunität (18, 19); 7. kein Adjuvans,

54 und so weiter. Allerdings sind mRNA-Impfstoffe auch fehlerhaft und weisen einen hohen technischen Aufwand auf

55 Patentbeschränkungen für Barrieren und Lieferttechnologien; sie sind instabil und

56 unbequem zu konservieren und zu transportieren. Traditionell ist eine intramuskuläre Injektion erforderlich

57 Injektionen und eine professionelle Operation.

58 Die meisten Impfstoffe, die derzeit in klinischen Studien getestet werden, werden intramuskulär oder intramuskulär injiziert

59 subkutan, wodurch die Immunaktivierung auf die wenigen entwässernden Lymphknoten beschränkt wird

60 (20, 21). Es wird angenommen, dass die orale Verabreichung ein höheres und besseres Sicherheitsprofil aufweist

61 Patientencompliance und niedrigere medizinische Kosten als Injektionen (20, 22). Der

62 Schwierigkeiten des komplexen Magen-Darm-Umfelds und des Darmepithels

63 Hindernisse haben den Einsatz oraler Impfstoffe eingeschränkt. Mit dem Überfluss interagieren

64 Immunzellen in der Lamina prima, die ein idealer oraler Impfstoff vertragen muss

65 Magen-Darm-Umgebung und überwinden Darmepithelbarrieren (23).

66 Exosomen sind aus Zellen stammende, membranöse Vesikel, die in fast allen Körperzellen vorkommen

67 Flüssigkeiten. Exosomen haben einen Durchmesser zwischen 35 und 120 nm

68 besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die von der Membran der Zelle stammt

69 Herkunft. Aufgrund seiner natürlichen Transportfunktion hat es in letzter Zeit an Aufmerksamkeit gewonnen

70 molekulare Ladungen (z. B. DNA, kleine RNAs, Proteine und Lipide) zwischen entfernten

71 Zellen im Körper. Es wurde bestätigt, dass Rindermilch reich an Exosomen ist

72 weist das Potenzial auf, als Nanoträger für den Arzneimitteltransport zu dienen (24). Milch ist ein

73 kostengünstigere und zugänglichere Quelle im Vergleich zu Zellkulturmedien.

74 Darüber hinaus können Milch-Exos als natürlich wünschenswerte orale Verabreichung zusätzliche Vorteile bieten

75 Lieferdienstleister, was darauf hindeutet, dass Milk-Exos eine bequemere Lösung darstellt

76 und patientenfreundliche Therapiemodalität (25). Unter Berücksichtigung des Biologischen

77 Eigenschaften von Milch-Exosomen und die Bewältigung der technologischen Herausforderungen von

78 mRNA-Impfstoffe haben wir derzeit eine Methode zur Herstellung von Milch beschrieben

79 Exosomen, die mit RBD-mRNA beladen sind, haben ihre Wirksamkeit bewertet

80, das mRNA liefert, hat eine neuartige funktionelle Technologieplattform für orale Impfstoffe entwickelt

81 basierend auf Milch-Exosomen und untersuchte die vorläufige Wirksamkeit des Romans

82 oraler Impfstoff basierend auf Milch-Exosomen bei Mäusen, um eine humorale Immunität auszulösen

83 SARS-CoV-2-Spike-Proteine.

84 Ergebnisse

85 Vorbereitung von aus Rindermilch gewonnenen Exosomen

86 Um unsere Herstellungsmethoden zu bewerten, wurden aus Rindermilch gewonnene Exosomen (Milch-Exos)

87 wurden durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (DC) isoliert und gereinigt (Abb. 1A).

88 Sechs Komponenten wurden durch DC gesammelt, darunter F1 etwa 5 ml und F2

89 bis F6 waren alle 7 ml (Abb. 1B). Charakterisierung der isolierten Milch-Exos

90 biophysikalisch, Biomarker (CD9, TGS110) und Morphologie wurden verwendet

91 bestimmen die Exosomen enthaltende Fraktion. Exosomen waren hauptsächlich

92 konzentriert in F3 und F4 (Abb. 1C, D). Die Morphologie zeigte eine reiche

93 Fülle gemischter Populationen von Exosomen mit überwiegend intakten Vesikeln

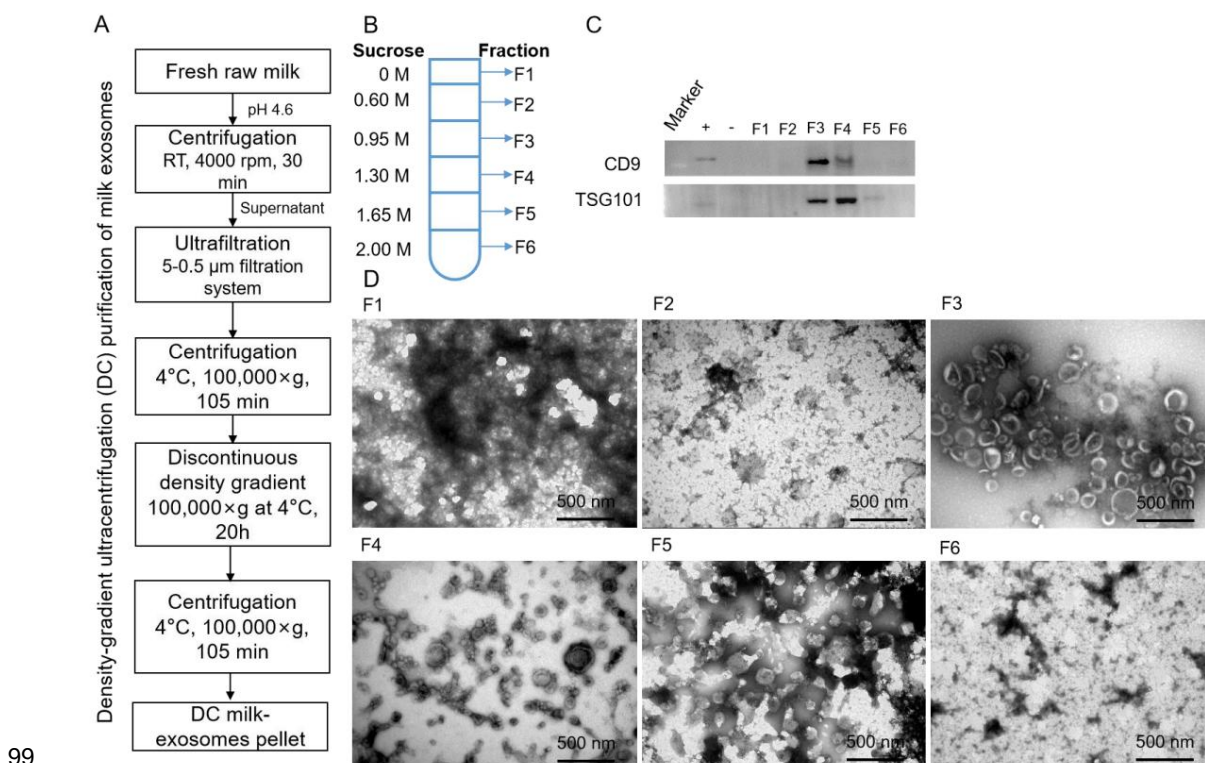
94 im Einklang mit der klassischen Exosomen-ähnlichen Morphologie und einer typischen becherartigen Form

95- Struktur (Abb. 1D). Milch-Exosomen sind charakteristisch für Exosomen im Bereich von

96 30–150 nm Durchmesser wurden in 0,95 mol/l–1,30 mol/l Saccharose beobachtet. As

97 Fraktionen 3 und 4 waren an Exosomen angereichert und wurden für diese zusammengefasst

98 weitere Analyse.



100 **Abbildung 1. Identifizierung von aus Rindermilch stammenden Exosomen in Fraktionen von**

101 **Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.** (A) Schematische Darstellung des

102 Hauptschritte bei der Isolierung von Exosomen aus Rinderrohmilch. (B) F1-F6

103 stellt die entsprechenden Saccharosekonzentrationen dar. (C) Das Exosom

104- Suspension wurde mittels Western Blot analysiert. Immunoblots zeigten Exosomen

105- Marker in verschiedenen Milch-Exosomenfraktionen. +, Positivkontrolle (das Protein von

106 HaCat-Zellen); -, Negativkontrolle (das Protein der Hela-Zellen). (D) Die Morphologie

107 verschiedener Fraktionen, erhalten durch TEM. (Maßstabsbalken = 500 nm).

108 **Reinigung und Charakterisierung von Exosomen aus Rindermilch durch**

109 **Dichtegradienten-Ultrazentrifugation**

110 Die Morphologie der gepoolten Exosomenfraktion zeigte eine reiche Fülle von

111 Exosomen im Einklang mit der klassischen exosomenähnlichen Morphologie (Abb. 2A), Größe

Verteilung (Abb. 2B) und Proteinmarker (Abb. 2C). Ein Drei-Wege-Venn

Das 113- Diagramm der Proteine ergab 1022 Proteine, die allen Datensätzen gemeinsam sind, und 961

In allen drei DC-Milch-Exos wurden gemeinsam 114 Proteine identifiziert, wie in Abbildung dargestellt

115 2C. Die proteomische Analyse der Proben zeigte, dass das Exosom-Protein lysiert

116 wurden vorbereitet und mittels Clusteranalyse auf lebenswichtige exosomale Membranen überprüft

117 Marker CD9, CD63, CD81 und TSG101. Das Fehlen des Mikrovesikels

118 Oberflächenmarker GM130 und Calnexin sowie das Fehlen der

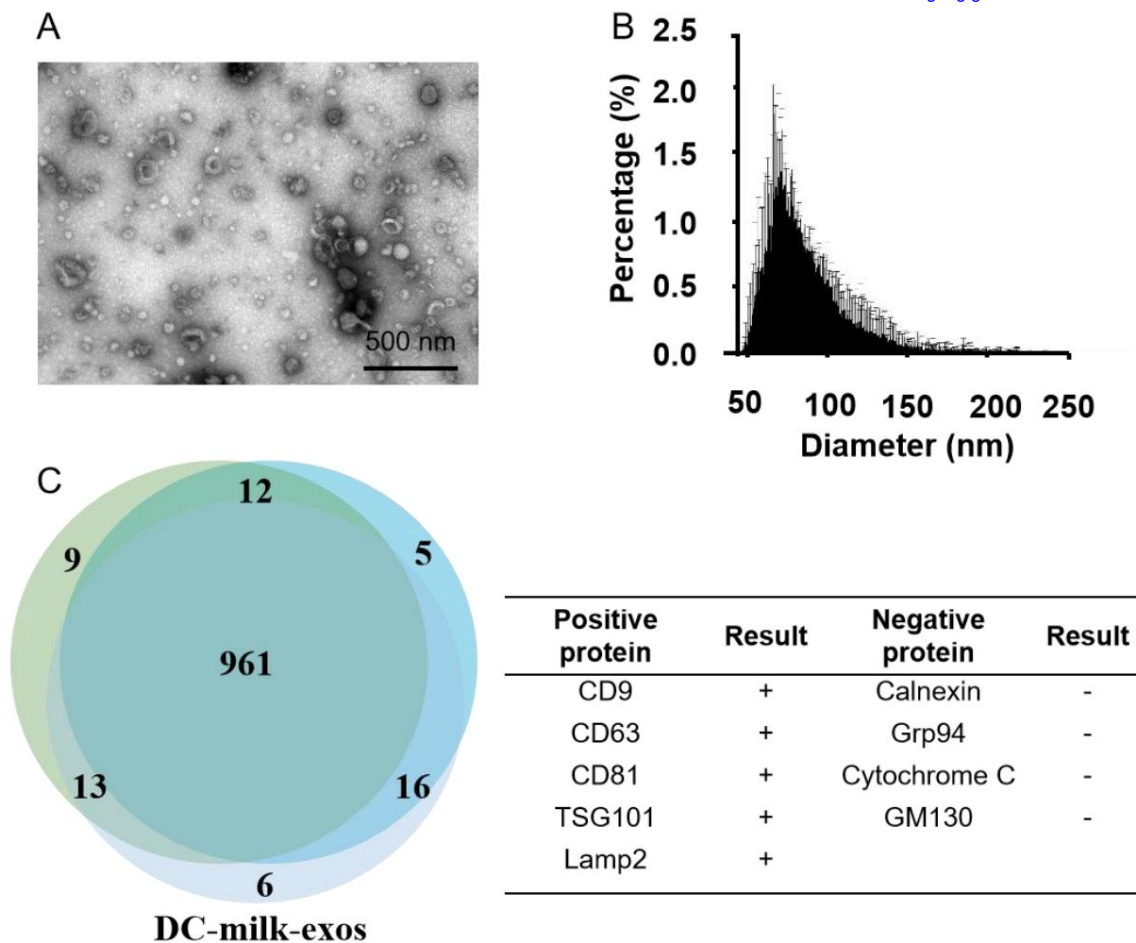
119 Endoplasmatisches Retikulum (ER) Marker Calnexin, bestätigte, dass die isoliert

120 Milch-Exos waren nicht mit anderen multivesikulären Körpern kontaminiert (Abb. 2C).

121 Drei Chargen von Exosomen aus Rindermilch, die durch einen Dichtegradienten gewonnen wurden

122 Ultrazentrifugen (DC-Milch-Exos) wurden analysiert und ergaben, dass dies der Fall war

123 Keine Unterschiede zwischen mehreren Chargen DC-Milch-Exos.



124

125 **Abbildung 2. Charakterisierung von DC-Milch-Exos.** (A) Die Morphologie und (B) die

126 Die Partikelgrößenanalyse wurde mittels TEM bzw. nanoFCM ermittelt. (C)A

127 Drei-Wege-Venn-Diagramm von Proteinen aus drei Chargen DC-Milch-Exos

128 ergab 1022 Proteine, die allen Datensätzen gemeinsam sind. Clusteranalyse für vital

129 exosomale Membranmarker CD9, CD63, CD81, TSG101, Mikrovesikeloberfläche

130 Marker GM130 und Endoplasmatisches Retikulum (ER) Marker Calnexin sind angegeben

131 in der Tabelle. Abkürzungen: TEM, Transmissionselektronenmikroskop;

132 DC-Milch-Exos, aus Rindermilch gewonnene Exosomen nach Dichtegradient

133 Ultrazentrifugation. Maßstabsbalken = 500 nm.

134 **Laden von RBD-mRNA-Exosomen aus Milch**

135 Um festzustellen, ob DC-Milch-Exos mit exogenen Substanzen beladen werden könnten, *in vitro*

Mit 136 synthetisierten mRNAs haben wir einen Rezeptorbindungstest entworfen und synthetisiert

137- Domänen-mRNA (RBD), die immunogene Formen des SARS-CoV-2-Spikes kodiert.

138 Die RBD-kodierende Sequenzregion (CDS) ist 675 Basenpaare (bp) lang und hat die

139 FLAG-Tag. Untersuchung der *in vitro* synthetisierten RBD-mRNA unter Verwendung von a

140 Bioanalyzer (Agilent) bestätigten, dass die RBD-mRNA-Probe als einzelne Bande verlief

141 von 1100 bps (Abb. 3A), was der Größe entspricht, die wir *in vitro* erwartet hatten

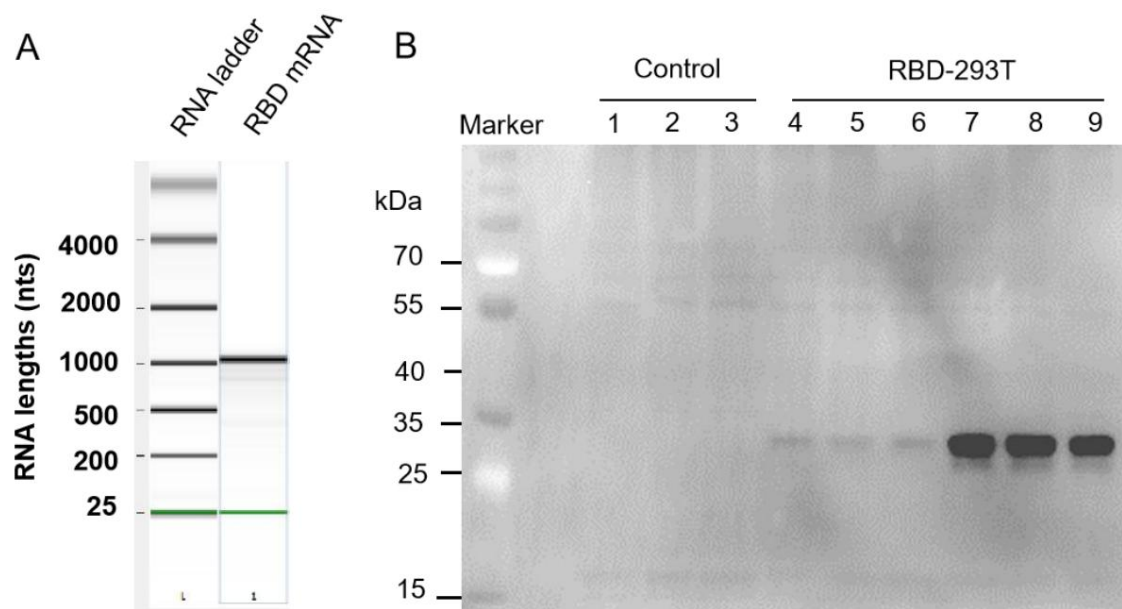
142 Transkription. Um seine Funktionalität zu beurteilen, wurde die RBD-mRNA transfiziert

143 293T-Zellen und die RBD-Peptidexpression wurden am nächsten Tag abgefragt

144 Western Blot (Abb. 3B). Diese Ergebnisse zeigten, dass RBD-mRNA synthetisiert wurde

145 laut *In-vitro*-Transkription (IVT) und hatte eine Translationsfunktion, die dies konnte

146 in Zellen in RBD-Protein übersetzt werden.



147

148 **Abbildung 3. Charakterisierung der SARS-CoV-2-Rezeptorbindungsdomäne (RBD)**

149 mRNAs. (A) Gelartiges Bild der *in vitro* synthetisierten RBD-mRNA, die mit abgefragt wurde

150 ein RNA-Chip auf einem Agilent Bioanalyzer. Daten für RNA-Marker, RBD-mRNA, sind

151 dargestellt von links nach rechts. (B) Western Blot für SARS-CoV-2 RBD-Protein

152- Expression in 293T-Zellen, wenn die RBD-mRNA in 293T-Zellen transfiziert wurde

153 mit einer zusätzlichen 24-stündigen Behandlung zusammen mit 1 μ g und 3 μ g RBD-mRNA. Fahrspuren

154 1-3: Kontrollen; Spuren 4–6: 1 μ g RBD-293T; Spuren 7–9: 3 μ g RBD-293T.

155 Um die IVT-RBD-mRNA in DC-Milch-Exos zu laden, haben wir sie zunächst mit kationischen Substanzen gemischt

156 Lipide (DOTAP) zur Erzeugung von Lipid-mRNAs. Dann haben wir die Lipid-mRNA hinein geladen

157 DC-Milch-Exos durch mischungsinduzierte Aufteilung (Abb. 4A). Beide Prozesse sind

158 angetrieben durch die Anziehungskraft der Ladung, was zur Einkapselung von führt

159 Lipid-mRNAs in Milch-Exos-Membranen. Zur Charakterisierung der RBD-mRNA

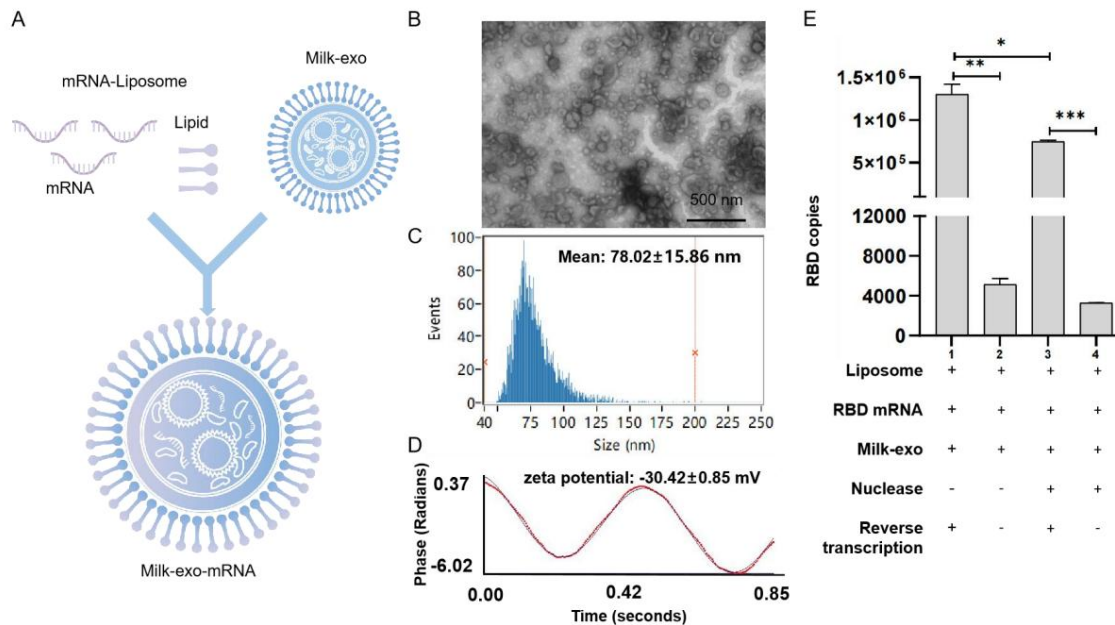
160 Milch-Exos biophysikalisch, die Morphologie und Größenverteilung sowie das Zeta-Potenzial

161 Analyse durchgeführt (Abb. 4B-D). Um die Ladeeffizienz zu bestimmen

162 Prozess waren die Produkte von drei unabhängigen mRNA-Beladungsreaktionen

163 untersucht. Das zeigte ein TaqMan-basierter quantitativer Echtzeit-PCR-Assay

Die Ladeeffizienz von 164 erreichte 57,3 % (Abb. 4E).



165

166 **Abbildung 4. Charakterisierung eines aus Milch gewonnenen, auf Exosomen basierenden Impfstoffs für**

167 **SARS-CoV-2.** (A) Flussdiagramm der Impfstoffvorbereitung für SARS-CoV-2. Der

168 Morphologie (B), Partikelgrößenverteilung (C), Zetapotentialanalyse (D) und

Es wurden 169 RBD-mRNA-Beladungseffizienzen (E) durchgeführt. Maßstabsbalken = 500 nm.

170 **Überprüfung oraler Impfstoffe gegen RBD-mRNA-DC-Milch-Exos *in vitro* und *in***

171 **leben**

172 Als nächstes testeten wir, ob mit RBD-mRNA beladene Milch-Exos liefern können

173 RBD-mRNA in menschliche funktionelle Zellen. Western-Blot- und ELISA-Ergebnisse

174 stellte fest, dass RBD-mRNA-beladene Milch-Exos mRNA in 293 Zellen transportieren können

175 und produzieren 24 Stunden später RBD-Peptid. (Abb. 5A, B, $p < 0,01$).

176 Zur weiteren Bestätigung der Fähigkeit, neutralisierende Antikörper zu stimulieren, RBD

177 mRNA-Milch-Exos wurden in den Zwölffingerdarm (id) von 9–11 Wochen alten Kindern injiziert

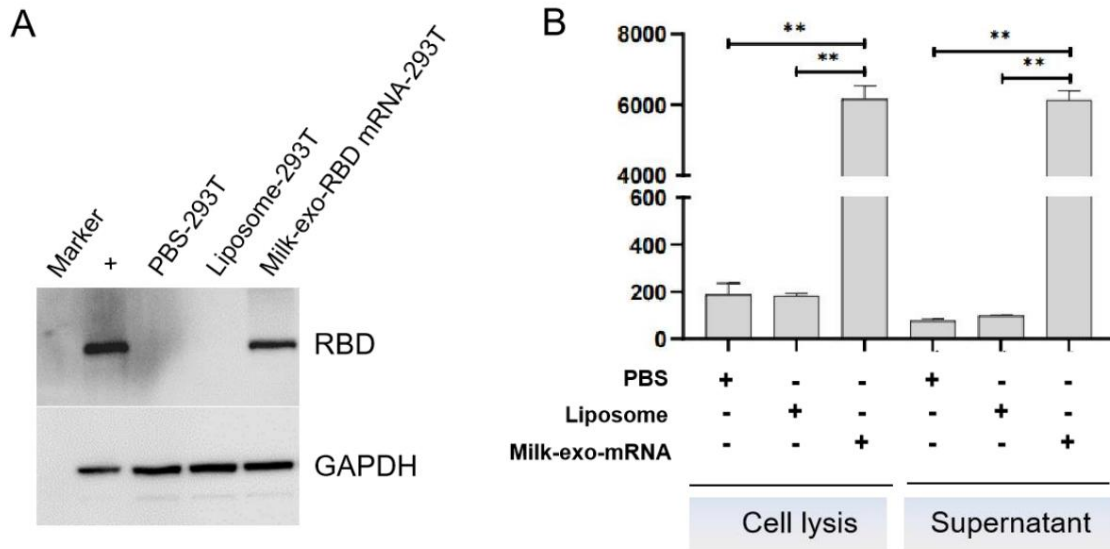
178 weibliche BALB/c-Mäuse (Abb. 6A). An den Tagen 0, 7, 14, 21 wurde Blut (0,1 ml) entnommen.

179 28, 35, 42 und 49 zum Antikörpernachweis, bevor die Tiere getötet wurden.

180 Mithilfe von ELISA-Kits, die für den Nachweis von aus Mäusen stammenden Antikörpern geeignet sind, beobachteten wir

181 , dass geimpfte Tiere einen relativ konstanten Grad an Neutralisierung erzeugten

182 Antikörper gegen RBD nach der zweiten Injektion (Abb. 6B, C).



183

184 **Abbildung 5. mRNA-beladene Exosome liefern funktionelle SARS-CoV-2-RBD**

185 mRNA sind menschliche Zellen *in vitro*.

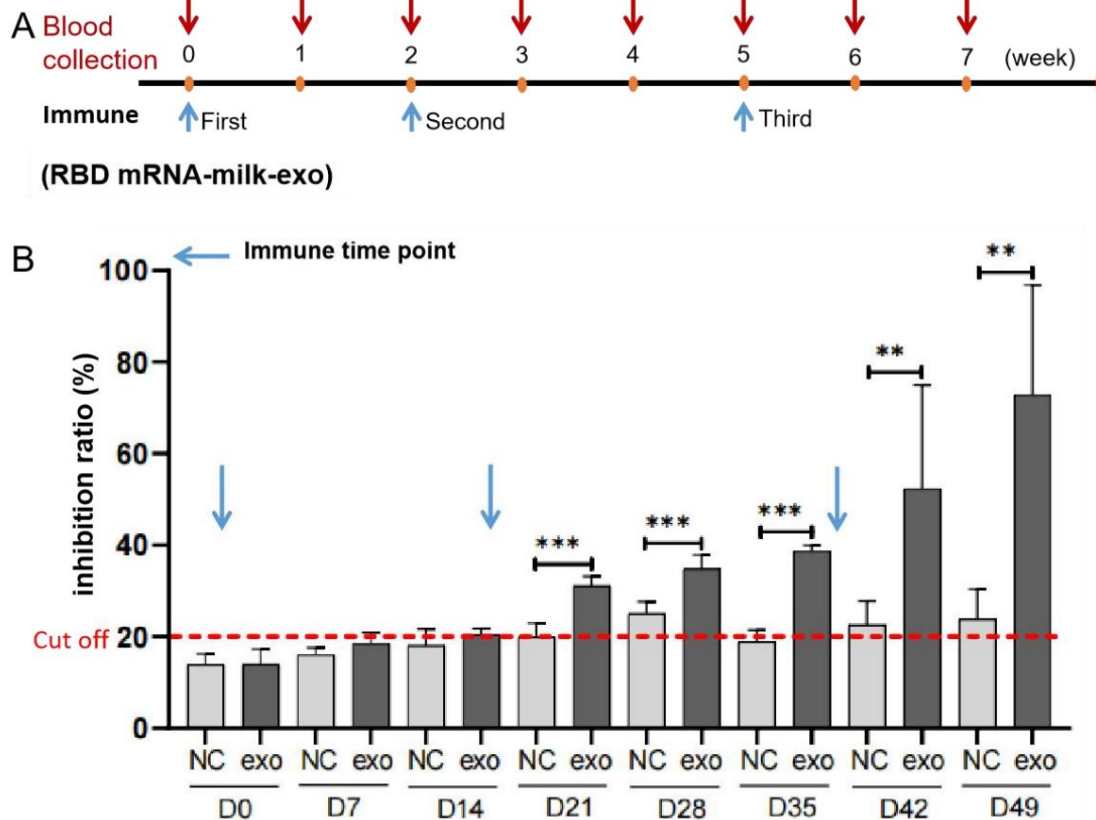
186 (A) Western-Blot-Analyse der Expression von oral verabreichter RBD-mRNA

187- Impfstoff in 293T-Zellen. (B) Der ELISA-Nachweis von RBD, exprimiert in 293T-Zellen

188- Lysat und 24 Stunden nach der Milchgewinnung in den Kulturüberstand abgesondert

189 Exosomenbasierte Impfstofftransfektion. Die Daten werden als mittlerer Standard dargestellt

190 Abweichung bei einer Gruppengröße von drei Personen. **P < 0,01 vs. PBS.



191

192 **Abbildung 6. Validierung von SARS-CoV-2 RBD-mRNA-beladenen Milch-Exosomen**

193 **liefert funktionelle SARS-CoV-2-RBD-mRNA *in vivo*.**

194 (A) Mausimmunisierungs- und Serumprobenentnahmeplan. BALB/c-Mäuse erhielten die

195 gleiche Dosen eines oralen Impfstoffs gegen das aus Milch gewonnene SARS-CoV-2

196 Exosomen (N = 5) oder die Kontrollsalzlösung (N = 3) am Tag 0 und wurden erneut geboostet

197 an den Tagen 14 und 35. Seren wurden an den Tagen 0 (vor der Impfung), 7, 14, 21,

198 28, 35, 42 und 49 (nach der Impfung). Der blaue und rote Pfeil repräsentierten das

199 Zeitpunkte der Impfung bzw. Blutentnahme. (B) Die

200 neutralisierende Antikörper des oralen Impfstoffs gegen SARS-CoV-2 werden aus Milch gewonnen

201 Exosomen im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Die rot gepunktete Linie dargestellt

202 der Grenzwert neutralisierender Antikörper gegen das RBD-Peptid. N = 3

203 (Kontrolle), N = 5 (RBD-DC-Milch-Exos), und die Daten werden als Mittelwert ± STD dargestellt.

204 **P < 0,01, ***P < 0,001 vs. Kontrollgruppe.

205 **Diskussion**

206 In dieser Studie haben wir gezeigt, dass ein oraler Impfstoff gegen SARS-CoV-2 basiert

207 aus Rindermilch gewonnene Exosomen könnten *in vitro* und *in vivo* funktionelle mRNA liefern

208 und induzieren Anti-S-Antikörperreaktionen. Wir haben das zunächst erfolgreich überprüft

209 technische Machbarkeit der oralen mRNA-Verabreichung auf Basis von Rindermilch

210 Exosomen als Transportmittel.

211 Im Vergleich zur Injektion galt die orale Verabreichung im Allgemeinen als wirksamer

212 besseres Sicherheitsprofil, bessere Patient compliance und niedrigere medizinische Kosten (20, 22).

213 Wie Liposomen haben Exosomen eine Bi-Lipid-Membran und einen wässrigen Kern;

Daher könnten sie potenziell mit hydrophilen und lipophilen Wirkstoffen beladen sein

215 (26). Allerdings ist die praktische Anwendung von Exosomen-basierten Therapeutika in

Die klinische Transformation von 216 blieb eine ständige Herausforderung. Viele Studien isoliert

217 Exosomen aus Zellkulturmedien mit geringer Ausbeute und geringen Kosten, was eine Skalierung ermöglicht

218 Produktion schwierig (27). Eine kostengünstige und skalierbare Quelle sollte optimiert werden

219 basierend auf den aktuellen Einschränkungen.

220 Es wurde berichtet, dass aus Rindermilch gewonnene Exosomen ein ähnliches Potenzial aufwiesen

221 als Nanoträger für den Arzneimitteltransport dienen (24). Milch war erschwinglicher und

222 zugängliche Quelle im Vergleich zu Zellkulturmedien. Darüber hinaus Rind

223 aus Milch gewonnene Exosomen könnten zusätzliche Vorteile bieten, die von Natur aus wünschenswert sind

224 orale Verabreichungsträger, was darauf hinweist, dass Exosomen aus Rindermilch stammen

225 stellen eine bequemere und patientenfreundlichere Therapiemethode dar (25).

226 Hier stellten wir einen oralen Impfstoff vor, der sich von den bisherigen unterschied

227 auf Nanomaterialien basierende orale Impfstoffverabreichungstechnologien sind darin enthalten

228 aus Rindermilch gewonnene Exosomen und die aus Milch gewonnenen Exosomen oral

229 Der mRNA-Impfstoff COVID-19 verfügte über eine Technologie zur Verabreichung und Industrialisierung

230 Funktionen. Obwohl die Ergebnisse dieser Studie auf die positiven Auswirkungen von hinweisen

231 einen oralen Impfstoff zur Vorbeugung des neuartigen Coronavirus und bot a

232 potenzielles Regiment für den klinischen Einsatz, wir mussten die Anzahl erhöhen

233 Tiere untersucht und die Wirksamkeit des oralen Impfstoffs bei verschiedenen Tieren weiter überprüft

234 Modelle (z. B. große Tiere) in zukünftigen Studien. Darüber hinaus ist die präzise

235 molekulare Mechanismen und Sicherheit mussten weiter untersucht werden.

236 Obwohl die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation der Goldstandard für ist

Zur Exosomenisolierung und -reinigung wurden mehrere Studien durchgeführt

238 Extraktion von Exosomen aus Kuhmilch allein durch Differentialzentrifugation (28,

239 29) oder Fällungstechniken (30, 31). In Verbindung mit Differential

240- Zentrifugation verwendeten wir die Dichtegradienten-Ultrazentrifugationsmethode

241 Exosomen aus Milch isolieren, die im Wesentlichen frei von Kontaminationen waren

242 Mikrosesikel. Die endgültige Probenreinheit könnte 100 % erreichen. Im Gegensatz dazu ist die

Die in dieser Studie verwendete Technik zur Reinigung von Exosomen ist nicht mit großtechnischen Verfahren vereinbar

244 Exosomenproduktion, was eines der Hindernisse für den Fortschritt von ist

245 Industrialisierung. Die gute Nachricht ist, dass wir das etabliert haben

246 Chromatographie-basiertes neuartiges Herstellungsverfahren zur Reinigung von Exosomen

247 Rindermilch mit besserer Qualität als die Produktion von DC (Daten werden nicht angezeigt).

248 Es wird bald ein mRNA-Abgabesystem geben, das auf Milch basiert

249 Exosomen werden als Plattform für die Entwicklung von mRNA-Therapeutika dienen

250 aktuelle Zukunft.

251 **Materialien und Methoden**

252 **Zelllinien und Zellkultur**

253 293T-Zellen (SCSP-502) (humane embryonale Nierenepithelzellen) waren

254 gekauft von der Zellbank des Typischen Kulturerhaltungsausschusses,

255 Chinesische Akademie der Wissenschaften (Shanghai, China). Es wurden 293T-Zellen gezüchtet

256 DMEM, ergänzt mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) und 1 % Penicillin/Strep

257- Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration in einer feuchten Atmosphäre. Der

258 gepoolte Zellen wurden in DMEM, das 10 % (Vol./Vol.) FBS enthielt, unter Wechseln gehalten

259 das Medium jeden zweiten Tag. Wenn die Konfluenz der kultivierten Zellen 80 % erreichte,

260 wurden sie durch Behandlung mit 0,25 % (Gew./Vol.) Trypsin und 0,1 % (Gew./Vol.)

261 Ethylendiamintetraessigsäure (Gibco) gewaschen und in einer Dichte von 1×10⁴ Zellen erneut ausgesät

262 pro cm². Für Experimente wurden kultivierte Zellen vor der zweiten Passage verwendet. Für RBD

263 mRNA-Expression *in vitro*, Zellen wurden mit mRNA transfiziert

264 Lipofectamine Messenger MAX, wie vom Hersteller empfohlen (Thermo

265 Fischer).

266 **Dichtegradienten-Ultrazentrifugationsreinigung von Milch-Exos (The**

267 **DC-Milch-Exos)**

268 Milch-Exosomen wurden durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (DC) isoliert. Knapp,

269 Die kaseinfreie Molke wurde bei 100.000 g zentrifugiert (Beckman Coulter, USA).

270.105 Minuten, um die Milch-Exos auszufällen, resuspendiert in 1 ml PBS. Der

271 konzentrierte Milchexos wurden einer diskontinuierlichen Dichte ausgesetzt

272 Gradient bestehend aus 2 mol/L, 1,65 mol/L, 1,3 mol/L, 0,95 mol/L und 0,6 mol/L

273 Saccharose (7 ml Volumen für jeden Winkel) in 250 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7,4).

274 Sie wurden 20 Stunden lang bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert. Die Milch-Exos-Fraktion

275 zwischen den Fraktionen 3 (1,3 mol/L) und 4 (1,65 mol/L) wurde gesammelt. zu entfernen

276 Saccharose, die Fraktion wurde in PBS auf ein Endvolumen von 40 ml verdünnt und

277 105 Min. bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 resuspendiert

278 ml PBS. Die DC-Milch-Exos wurden vor der Verwendung bei -80 °C gelagert.

279 **Charakterisierung der DC-Milch-Exos-Morphologie durch Übertragung**

280 **Elektronenmikroskopie**

281 Die DC-Milch-Exos-Morphologie wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht

282 (TEM), wie zuvor beschrieben, mit einigen Modifikationen. Zuerst die DC-Milch-Exos

283 (100 μ g/ml) wurden durch Mischen mit einem gleichen Volumen von 4 % (w/v) fixiert.

284 Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Die ausgewählten Proben (10

285 μ L) wurde dann einem mit Formvar-Kohlenstoff beschichteten TEM-Gitter ausgesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt

3 Minuten bei 286 ° C erhitzen. Das Gitter wurde durch Zugabe von 10 μ L Uranyl gefärbt

287 Oxalatlösung (4 % Uranylacetat, 0,0075 M Oxalsäuren, pH 7). Die fleckig

288 Gitter wurde mit einem Hitachi 5600 plus Transmissionselektronenmikroskop untersucht

289 arbeiteten mit 120 KV und 50.000-facher Vergrößerung.

290 **Messung der Partikelgrößenverteilung von DC-Milch-Exos mittels NanoFCM**

291 Die Partikelgröße und Anzahl der Milch-Exos-Proben wurden durch charakterisiert

292 NanoFCM-Instrument (NanoFCM Inc., Xiamen, China) durch Befolgen der

293 Bedienungsanleitung. Ein Silica-Nanosphären-Cocktail (Kat. S16M-Exo, NanoFCM Inc.,

294 Xiamen, China) mit einer Mischung aus 68 nm, 91 nm, 113 nm und 155 nm

Zur Einstellung des Instruments zur Partikelgrößenmessung wurden 295 Standardkugeln verwendet.

296 Die Instrumentenparameter wurden wie folgt eingestellt: Laser, 10 mW, 488 nm; SS

297 Zerfall, 10 %; Probendruck, 1,0 kPa; Abtastperiode: 100 μ s; Zeit zum Aufzeichnen,

298 1 Minute.

299 **Proteomik**

300 Die Proteomik von DC-Milch-Exos wurde mittels LC-MS/MS mit Easy analysiert

301 NLC1200-Q Exactive- und Fusion Lumos Orbitrap-Massenspektrometer

302 (ThermoFisher), beide ausgestattet mit Nanoflow-Umkehrphasen-HPLC (Ultimate 3000).

303 RSLC, Dionex). Das Nano-HPLC-System war mit einer Acclaim PepMap ausgestattet

304 Nano-Trap-Säule (Dionex-C18, 100 \AA , 75 μ m \times 2 cm) und eine Acclaim Pepmap

305 RSLC-Analysesäule (Dionex-C18, 100 \AA , 75 μ m \times 25 cm). Typischerweise z

306 Bei jedem LC-MS/MS-Experiment wurde 1 μ L der Peptidmischung auf das geladen

307- Anreicherungssäule (Falle) bei einem isokratischen Fluss von 5 μ L/min 3 % CH₃CN

308 mit 0,1 % Ameisensäure für 5 Minuten vor der Anreicherungssäule

309 in Reihe mit der analytischen Säule geschaltet. Die für die LC verwendeten Eluenten waren

310 0,1 % (v/v) Ameisensäure (Lösungsmittel A) und 100 % CH₃CN/0,1 % (v/v) Ameisensäure. Der

Der verwendete Gradient 311 war 3 % B bis 25 % B für 23 Minuten, 25 % B bis 40 % B in 2 Minuten, 40 % B

312 auf 85 % B in 2 Minuten und 2 Minuten lang bei 85 % B gehalten, bevor 10 Minuten lang das Gleichgewicht hergestellt wird

313 Minuten bei 3 % B vor der nächsten Injektion. Alle Spektren wurden im Positivmodus aufgenommen

314 mit Full-Scan-MS-Spektren-Scanning im FT-Modus von m/z 300–1650 bei

315 Auflösungen von 70.000 (QE) und 120.000 (Lumos). Eine Schleusenmasse von 445,12003 m/z

Für beide Instrumente wurde 316 verwendet. Für MS/MS auf dem Lumos ist die „Höchstgeschwindigkeit“

317- Erfassungsmodus (3 s Zykluszeit) auf dem intensivsten Vorläufer wurde verwendet,

318 wobei mit einer Isolierung Peptidionen mit Ladungszuständen ≥ 2 isoliert wurden

319- Fenster von 1,6 m/z und fragmentiert mit HCD unter Verwendung einer normalisierten Kollisionsenergie

320 von 35. Für MSMS auf dem QE plus die 15 intensivsten Peptidionen mit Ladung

321 Zustände ≥ 2 wurden mit einem Isolationsfenster von 1,6 m/z isoliert und fragmentiert

322 HCD mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 35. Ein dynamischer Ausschluss von 30

Es wurden 323 Sekunden angewendet.

324 Die Rohdateien wurden mit Proteome Discover (Version 2.1, Thermo) durchsucht

325 Fisher, Deutschland) mit Sequest als Suchmaschine. Fragment und Peptid

326 Massentoleranzen wurden auf 20 mDa bzw. 10 ppm festgelegt, was eine

327 maximal 2 fehlende Spaltstellen. Die falschen Entdeckungsraten von Proteinen,

328 Peptide und Phosphosite betragen 1 Prozent. Die differentiellen Expressionsproteine

329 wurden von DAVID (Database for Annotation, Visualization, and) analysiert

330 Integriert Entdeckung) Bioinformatik Ressourcen 2021

331 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) mit empfohlenen analytischen Parametern

332 identifizieren die am signifikantesten angereicherten Signaltransduktionswege in den Daten

333 eingestellt.

334 **Western Blot**

335 Gesamtzell- und Milch-Exos-Proteine wurden mit RIPA-Lysepuffer extrahiert und

336 Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Protein-Assay-Kit (Thermo,

337 A53226). Anschließend wurde das Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen

338 Elektrophoresegele. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf a übertragen

339 Polyvinylidenfluoridmembran und blockiert in 5 % (Gew./Vol.) Rinderserum

340 Albumin (BSA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Dann war die Membran

341 inkubiert mit Anti-TSG101 (Abcam, ab125011), Anti-CD9 (Abcam, ab92726),

342 Anti-RBD (Abcam, ab277628) oder Anti-GAPDH (Proteintech, 60004-1) über Nacht

343 bei 4 °C. Nach dem Waschen in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween (TBST) wurde die

344 Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Sekundärantikörper wurde 1:10.000 mit 5 % verdünnt

345 (Gew./Vol.) BSA hinzugefügt und mit der Membran 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

346 Überschüssiger Sekundärantikörper wurde mit TBST von der Membran abgespült und a

Das Chemilumineszenzsignal 347 wurde mit dem FluorChem E-System erzeugt

348 (ProteinSimple, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers.

349 **Messung des Zetapotentials**

350 Das Zeta-Potential von Milch-Exosomen wurde dreimal bei 25 °C gemessen

351 Folgende Einstellungen sind erforderlich: Empfindlichkeit 85, Verschlusswert 70 und Bildrate 30

352 Bilder pro Sekunde, während die ZetaView-Software zum Sammeln und Analysieren verwendet wurde

353 Datum.

354 **Entwicklung eines oralen Impfstoffs gegen SARS-CoV-2 RBD-basiert**

355 **von DC-Milch abgeleitete Exosomen (RBD-DC-Milk-Exos)**

356 mRNA, die zur Expression der RBD-Proteine entwickelt wurde, wurde von einem kommerziellen Anbieter bezogen

357 Anbieter (Novoprotein). RBD-mRNAs wurden mit CIMmultus Oligo dT gereinigt

358 Säulen und resuspendiert in DNase- und RNase-freiem Wasser unter Verwendung von Nuklease-freiem

359 Spitzen und Röhrchen. Gereinigte RBD-mRNAs wurden zum Laden vorbereitet

360 DC-Milch-Exos durch Vorinkubation mit kationischen Lipiden, a

361 Lipid-mRNA-Produkt. Anschließend wurden Lipid-mRNAs in gereinigte DC-

362 Milch-Exos durch Mischen und Inkubieren, um einen oralen Impfstoff herzustellen. Der

363 Morphologie, Partikelgrößenverteilung und Zetapotential von RBD-mRNA-beladen

364 DC-Milch-Exos wurden mit TEM, dem NanoFCM-Instrument und Zeta charakterisiert

365 Freunde bzw. Die RBD-mRNA-Beladungseffizienz wurde nachgewiesen durch

366 Taqman-basierte quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR). RBD-mRNA-Expression

367 wurde mittels Western Blot und Enzymimmunoassay gemessen

368 (ELISA).

369 RNA-Extraktion und Taqman-basierter RT-qPCR-Assay

370 Gesamt-RNA wurde aus den RBD-DC-Milch-Exos mit TRIzol (Life)

371 Technologies, Carlsbad, CA). Erststrang-cDNA wurde unter Verwendung von synthetisiert

372 PrimeScript™ RT Kit (TaKaRa, Peking, China) erstellt und als Vorlage verwendet

373 bestimmen die Expression von RBD-Genen mit den angegebenen Primern und Sonden.

374 Die folgenden Primersequenzen wurden verwendet: RBD, vorwärts 5'-CTCCAGGGCAA

375 ACTGGAAAG-3' und umgekehrt 5'-AATTACCACCAACCTTAGAATCAAG-3',

376- Sonde, CCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAG, unter Verwendung von Premix Ex Taq™

377 (Probe qPCR) Reagenz (TaKaRa, Peking, China) in qRT-PCR. Das Radfahren

378 Parameter waren wie folgt: Eine PCR-Reaktion wurde mit 50 ng cDNA durchgeführt

379 Proben mit 0,2 µmol/L jedes Primers, 0,4 µmol/L RBD-Sonde und 10 µL

380 2xPremix Ex Taq Mix. Die folgenden Bedingungen wurden verwendet: 95 °C für 30 s, 40

381 Zyklen bei 95 °C für 5 s und 60 °C für 31 s in einem Thermofisher QuantStudio5 und

382 mit der speziellen Software analysiert.

383 ELISA-Assay

384 Das Zelllysate, der Kulturüberstand und das Serum wurden auf Protein homogenisiert

385 Extraktion. Das Spike-Protein RBD (Beyotime, Shanghai, China) und neutralisierend

386 Die Expression von Antikörpern (Vazyme, Nanjing, China) wurde mittels ELISA bestimmt

387 Bausätze gemäß Herstellerangaben.

388 Messung der RBD-Aktivität *in vitro*

389 Wir haben getestet, ob ein oraler Impfstoff gegen SARS-CoV-2 RBD-basiert ist

390 aus DC-Milch gewonnene Exosomen (RBD-DC-Milk-Exos) könnten funktionelle RBD liefern

391 mRNA in menschliche Zellen. Für *In-vitro*- Studien wurde der orale Impfstoff hinzugefügt

392- Formulierungen zu Kulturen menschlicher Zellen hinzugefügt, ließen die Zellen über Nacht wachsen, um RBD zu ermöglichen

393 mRNA-Aufnahme und -Expression und dann die Zellen auf RBD-Aktivität untersucht

394 Western Blot und ELISA.

395 Überprüfung der Abgabefunktion von RBD-DC-Milch-Exos *in vivo*.

396 Wir verwendeten altersentsprechende weibliche BALB/c-Mäuse (Speford (Beijing) Biotechnology).

397 Co., Ltd.). Alle Tierversuche wurden nach institutionellen Vorgaben durchgeführt

398 Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Tieren und wurde von der Experimentalbehörde genehmigt

399 Tierethikkommission von Youji (Tianjin) Pharmaceutical Technology Co., Ltd.

400 (IACUC-20220726-05.00). Weibliche BALB/c-Mäuse (23–26 g, Speford, Peking,

401 China) wurden in einer pathogenfreien Einrichtung mit Standardbedingungen untergebracht

402 Temperatur 24 °C, ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Zyklus sowie Nahrung und Wasser nach Belieben.

403 Mäuse wurden eingesetzt, um die Aktivität von RBD-mRNA-DC-Milch-Exos zu untersuchen

404 wird über eine Zwölffingerdarminjektion verabreicht. Die Mäuse wurden zufällig in zwei Gruppen eingeteilt:

405 1) die Kontrollgruppe (Kochsalzlösung, 1000 μ L) (N = 3); und 2) die RBD-DC-Milch-Exos (0,5

406 mg mRNA/1000 μ L) Gruppe (N = 5). Alle Behandlungen wurden im Zwölffingerdarm begonnen

407- Injektion an den Tagen 1, 15 und 36. Alle Mäuse wurden zwei Wochen nach der letzten Injektion getötet

408 Behandelte mit 1 % Isofluran. Blut wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tage 0,

409 7, 14, 21, 28, 35, 42 und 49). Überprüfung der neutralisierenden Antikörper des oralen

410- Impfstoff gegen SARS-CoV-2-basierte, aus Milch gewonnene Exosomen *in vivo* wurde von durchgeführt

411 ELISA-Analyse im Serum. N = 3 (Kontrolle), N = 5 (RBD mRNA-DC-Milch-Exos) und

412 Die Daten werden als Mittelwert \pm STD dargestellt. **P < 0,01, ***P < 0,001 vs. Kontrollen

413 Gruppen.

414 Statistische Analysen

415 Die Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Ein ungepaartes

Der 416- Studentent-T-Test wurde verwendet, um Daten mit nur zwei Sätzen zu analysieren. Eine einseitige Analyse

417 Varianz (ANOVA) wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob ein

418 signifikanter Unterschied zwischen mehr als zwei Datensätzen, gefolgt von Bonferronis

419 Post-Hoc-Test mit GraphPad Prism 6.0. P < 0,05 wurde als Statistik betrachtet

420 signifikant für Gruppenunterschiede. Sternchen (*) stellte $P < 0,05$ dar; ein Doppelgänger

421 Sternchen (**) repräsentierten $P < 0,01$; Ein dreifaches Sternchen (***) stellte $P < 0,001$ dar.

422 Referenzen

423 1. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Klinischer Verlauf und Ergebnisse von

424 schwerkranke Patienten mit SARS-CoV-2-Pneumonie in Wuhan, China: a

425 einzelzentrierte, retrospektive Beobachtungsstudie. *Lancet Respir Med* (2020)

426 8(5): 475-481. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5

427 2. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. Der

428 Inkubationszeit der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) Von öffentlich

429 gemeldete bestätigte Fälle: Einschätzung und Anwendung. *Ann Intern Med* (2020)

430 172(9): 577-582. doi: 10.7326/M20-0504

431 3. Huang NE, Qiao F. Eine datengesteuerte zeitabhängige Übertragungsrate für

432 Verfolgung einer Epidemie: eine Fallstudie von 2019-nCoV. *Sci Bull (Peking)* (2020) 65(6):

433 425-427. doi: 10.1016/j.scib.2020.02.005

434 4. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. Und Lungenentzündung

435- Ausbruch im Zusammenhang mit einem neuen Coronavirus, das wahrscheinlich von Fledermäusen stammt. *Natur* (2020)

436 579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7

437 5. Wände AC, Park YJ, Tortorici MA, Wand A, McGuire AT, Veasler D. Struktur,

438 Funktion und Antigenität des SARS-CoV-2-Spike-Glykoproteins. *Zelle* (2020)

439 183(6):1735. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058

440 6. Letko M, Marzi A, Munster V. Funktionelle Beurteilung von Zelleintritt und Rezeptor

441 Verwendung für SARS-CoV-2 und andere Betacoronaviren der Linie B. *Nat Microbiol*

442 (2020) 5(4):562-569. doi: 10.1038/s41564-020-0688-y

443 7. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S,

444 et al. Der Eintritt in SARS-CoV-2-Zellen hängt von ACE2 und TMPRSS2 ab und ist blockiert

445 war ein klinisch erprobter Proteaseinhibitor. *Zelle* (2020) 181(2):271-280.e278. doi:

446 10.1016/j.cell.2020.02.052

447 8. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al.

448 Angiotensin-Converting-Enzym 2 ist ein funktioneller Rezeptor für SARS

449 Coronavirus. *Nature* (2003) 426(6965):450-454. doi: 10.1038/nature02145

450 9. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Struktur der Spitze des SARS-Coronavirus

451 Rezeptorbindungsdomäne, komplexiert mit dem Rezeptor. *Wissenschaft* (2005)

452 309(5742):1864-1868. doi: 10.1126/science.1116480

453 10. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. die proximale

454 Herkunft von SARS-CoV-2. *Nat Med* (2020) 26(4):450-452. doi:

455 10.1038/s41591-020-0820-9

456 11. Hossain MK, Hassanzadeganroudsari M, Feehan J, Apostolopoulos V. The

457- Wettlauf um einen COVID-19-Impfstoff: Wo stehen wir? *Expert Rev-Impfstoffe* (2022)

458 21(3):355-376. doi: 10.1080/14760584.2022.2021074

459 12 Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al.

460 Sicherheit und Wirksamkeit des mRNA-Covid-19-Impfstoffs BNT162b2. *New Engl J Med*

461 (2020) 383(27):2603-2615. doi: 10.1056/NEJMoa2034577

462 13. Ho W, Gao M, Li F, Li Z, Zhang XQ, Xu X. Impfstoffe der nächsten Generation:

463 Nanopartikel-vermittelte DNA- und mRNA-Abgabe. *Adv Healthc Mater* (2021)

464 10(8):e2001812. doi: 10.1002/adhm

465 14. Kariko K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, et al.

466 Der Einbau von Pseudouridin in mRNA führt zu überlegener nichtimmunogener Wirkung

467- Vektor mit erhöhter Translationskapazität und biologischer Stabilität. *Mol Ther*

468 (2008) 16(11):1833-1840. doi: 10.1038/mt.2008.200

469 15. Thess A, Grund S, Mui BL, Hope MJ, Baumhof P, Fotin-Mleczek M, et al.

470 Sequenztechnisch hergestellte mRNA ohne chemische Nukleosidmodifikationen

471 ermöglicht eine wirksame Proteintherapie bei Großtieren. *Mol Ther* (2015)

472 23(9):1456-1464. doi: 10.1038/mt.2015.103

473 16. Kariko K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generierung des Optimums

474 mRNA für die Therapie: HPLC-Reinigung eliminiert die Immunaktivierung und verbessert

475 Übersetzung von Nukleosid-modifizierter, Protein-kodierender mRNA. *Nukleinsäuren Res*

476 (2011) 39(21):e142. doi: 10.1093/nar/gkr695

477 17. Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, et al. Sicherheit

478 und Immunogenität eines mRNA-Tollwutimpfstoffs bei gesunden Erwachsenen: Eine offene,

479 nicht-randomisierte, prospektive klinische Phase-I-Studie zum ersten Mal am Menschen. *Die Lancette* (2017)

480 390(10101):1511-1520. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3

481 18. Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, Dan JM, Moderbacher CR, Galvez RI, et al.

482 Humorales und zelluläres Immungedächtnis auf vier COVID19-Impfstoffe. *Zelle*. (2022)

483 185(14):2434-2451. doi: 10.1016/j.cell.2022.05.022

484 19. Laczko D, Hogan MJ, Toulmin SA, Hicks P, Lederer K, Gaudette BT, et al. UND

485 Einzelimmunisierungen mit nukleosidmodifizierten mRNA-Impfstoffen rufen starke Ergebnisse hervor

486 zelluläre und humorale Immunantworten gegen SARS-CoV-2 bei Mäusen. *Immunitäten*

487 (2020) 53(4):724-732e7. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.019

488 20. Vela Ramirez JE, Sharpe LA, Peppas NA. Aktueller Stand und Herausforderungen in

489 entwickeln orale Impfstoffe. *Adv Drug Deliv Rev* (2017) 114, 116–131. doi:

490 10/1016/j.addr.2017.04.008

491 21. Qin H, Zhao R, Qin Y, Zhu J, Chen L, Di C, et al. Entstehung einer Krebserkrankung

492 -Impfstoff mit in vivo durch Klick-Chemie vermittelter aktiver Lymphknotenakkumulation

493 für eine verbesserte Immuntherapie. *Adv Mater* (2021) 33(20): e2006007. doi:

494 10.1002/adma.202006007

495 22. Taddio A, Ipp M, Thivakaran S, Jamal A, Parikh C, Smart S, et al. Umfrage für

496 die Prävalenz von Impfverstößen aufgrund von Nadelangst bei Kindern

497 und Erwachsene. *Impfung* (2012) 30(32):4807-4812. doi:

498 10.1016/j.vaccine.2012.05.011

499 23. Kim SH, Jang YS. Die Entwicklung von Schleimhautimpfstoffen für beide Schleimhäute

500 und systemische Immuninduktion und die Rolle von Adjuvantien. *Klinikexp*

501 *Vaccine Res* (2017) 6(1):15–21. doi: 10.7774/cevr.2017.6.1.15

502 24. Somiya M, Yoshioka Y, Ochiya T. Biokompatibilität von hochreinem Rind

503 aus Milch gewonnene extrazelluläre Vesikel. *J Extracell Vesicles* (2018) 7(1):1440132.

504 10.1080/20013078.2018.1440132

505 25. Li D, Yao S, Zhou Z, Shi J, Huang Z, Wu Z. Hyaluronan-Dekoration von Milch

506 Exosome steuern die tumorspezifische Abgabe von Doxorubicin. *Kohlenhydrates* (2020)

507.493 :108032. 10.1016/j.carres.2020.108032

508 26. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomen: aktuell

509 Kenntnisse über ihre Zusammensetzung, biologische Funktionen sowie diagnostische und

510 therapeutische Potenziale. *Biochim Biophys Acta* (2012) 1820(7):940-948. doi:

511 10.1016/j.bbagen.2012.03.017

512 27. Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Agrawal AK, Kyakulaga AH, Wilcher SA, et

513 al. Milch-Exosomen – natürliche Nanopartikel für die siRNA-Abgabe. *Krebs Lett* (2019)

514449 :186-195. 10.1016/j.canlet.2019.02.011

515 28. Wolf T, Baier SR, Zemleni J. Der intestinale Transport von Rindermilch

516 Exosomen werden durch Endozytose in menschlichen Caco-2-Kolonkarzinomzellen vermittelt

517 und Ratten-Dünndarm-IEC-6-Zellen. *J Nutr* (2015) 145(10):2201–2206. doi:

518 10.3945/jn.115.218586

519 29. Izumi H, Tsuda M, Sato Y, Kosaka N, Ochiya T, Iwamoto H, et al., Bovine Milk

520 Exosomen enthalten microRNA und mRNA und werden vom Menschen aufgenommen

521 Makrophagen. *J Dairy Sci* (2015) 98(5):2920–2933. doi: 10.3168/jds.2014-9076

522 30. Pieters BC, Arntz OJ, Bennink MB, Broeren MG, van Caam AP, Koenders MI,

523 et al. Handelsübliche Kuhmilch enthält physikalisch stabile extrazelluläre Vesikel

524, die TGF-beta-Immunregulatoren exprimieren. *PLOS ONE* (2015) 10(3):e0121123. doi:

525 10.1371/journal.pone.0121123

526 31. Yamada T, Inoshima Y, Matsuda T, Ishiguro N. Vergleich der Methoden für

527 Isolierung von Exosomen aus Rindermilch. *J Vet Med Sci* (2012) 74(11):1523–1525.

528 doi: 10.1292/jvms.12-0032

529 **Danksagungen:**

530 Wir danken Hangping Rui für die administrative Unterstützung; und danken auch Fengbin Li, Mi

531 Chen, Lin Ma, Tonglin Cui und Xiaohan Dai für ihre hervorragende technische Leistung

532 Hilfe.

533 **Finanzierung:**

534 Die Finanzierung erfolgte durch Tingo Exosomes Technology Co., Ltd, Tianjin, China.

535 **Autorenbeiträge:** Alle Autoren haben das Manuskript rezensiert; XHG, LL, QZ,

536 MW und CLH entwickelten Ideen, gestalteten die Studie und Experimente. QZ,

537 MW, CLH und ZJW führten Experimente durch und produzierten Reagenzien; LL,

538 QZ, MW, CLH, XZM, DLQ, NW und JHW wurden experimentell analysiert

539 Datum; HQD überwachte Arbeit. LL und QZ haben das Manuskript geschrieben. Alle Autoren

540 haben zum Artikel beigetragen und die eingereichte Version genehmigt.

541 **Interessenkonflikt:** Die Autoren geben an, dass die Forschung durchgeführt wurde

542 das Fehlen jeglicher aufbaubarer kommerzieller oder finanzieller Beziehungen

543 als potenzieller Interessenkonflikt.

544 **Daten- und Materialverfügbarkeit:** Alle Daten sind im Haupttext oder im verfügbar

545 Zusatzmaterialien. Weitere Anfragen können an die entsprechende Stelle gerichtet werden

546 Autor.

547 **Ethik-Erklärung:** Die Tierstudie wurde von der überprüft und genehmigt

548 Ethikkommission für Versuchstiere von Youji (Tianjin) Pharmaceutical

549 Technology Co., Ltd. (IACUC-20220726-05.00).