

1 Doustna szczepionka przeciwko mRNA SARS-CoV-2 RBD pochodzącej z mleka krowiego

2 egzosomów indukuje odpowiedź przeciwciał neutralizujących in vivo

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

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

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

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

7 Autorzy[#] ci w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy.

8 *Korespondencja z lulu@tingocell.com (Lu Lu) i gexiaohu@tingocell.com

9 (Xiaohu Ge)

10 Streszczenie

11 Zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej koronawirus typu 2 (SARS-CoV-2).

12 powoduje, że choroba koronawirusowa 2019 (COVID-19) jest liczna

13 wyzwań dla globalnego zdrowia. Szczepionki, w tym nanocząsteczki na bazie lipidów

14 mRNA, inaktywowany wirus i rekombinowane białko zostały użyte do zapobiegania

15 infekcji SARS-CoV-2 w klinikach i są niezwykle pomocne w zwalczaniu

16 epidemia. Tutaj po raz pierwszy przedstawiamy doustną szczepionkę mRNA na bazie bydła

17 egzosomów pochodzących z mleka (milk-exos), które kodują receptor SARS-CoV-2

18 domeny wiążącej (RBD) jako immunogen. Wyniki wykazały, że mRNA RBD

19 dostarczane przez egzosomy pochodzące z mleka mogą wytwarzać wydzielany peptyd RBD w 293

20 komórek in vitro i stymulowano przeciwciała neutralizujące przeciwko RBD u myszy. Te

21 wyników wykazało, że szczepionka mRNA na bazie egzosomów pochodzących z mleka krowiego może

22 służyć jako nowa strategia zapobiegania zakażeniu SARS-CoV-2. Tymczasem to również

23 może działać jako nowy doustny system dostarczania mRNA.

24 Słowa kluczowe: egzosomy pochodzące z mleka krowiego; SARS-CoV-2; wiązanie receptora

25 domen; mRNA; szczepionki doustne; przeciwciała neutralizujące

26 Podsumowanie w jednym zdaniu: Doustna szczepionka mRNA SARS-CoV-2 na bazie bydłowej

27 egzosomów pochodzących z mleka może stymulować przeciwciała neutralizujące u myszy.

28 Wprowadzenie

29 COVID-19 zazwyczaj wykazuje objawy wspólne dla wielu infekcji dróg oddechowych,

30 , w tym gorączka i kaszel. Mimo to w wielu przypadkach postępuje do cięższego

31 choroba, która może obejmować ostrą niewydolność oddechową, chorobę rozsianą i

32 śmierć (1-3). Białko SARS-CoV-2 Spike jest homotrimeryczną transbłoną

33 glikoproteina złożona z podjednostek S1 i S2. Kiedy białko kolca wchodzi w interakcję z

34 specyficznych receptorów na komórkach gospodarza, jego domena wiążąca receptor (RBD) znajduje się w

35 na C-końcu S1 i może specyficznie wiązać się z receptorem

36 enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2) i inicjuje fuzję błony

37 między wirusem a komórką gospodarza (4-7). Badania wykazały, że RBD jest głównym

38 jest celem większości aktywności neutralizującej w surowicy odpornościowej, co sugeruje, że RBD

39 może być potencjalnym celem szczepionki lub terapii 2019-nCoV (8-10).

40 Obecnie wśród dostępnych platform szczepionek na COVID-19 znajdują się szczepionki inaktywowane

41 szczepionek, żywe atenuowane szczepionki, rekombinowane szczepionki białkowe, wektor wirusowy

42 szczepionki i szczepionki z kwasami nukleinowymi (11). W 2021 roku przychody z COVID-19

43 produkty szczepionek światowych kluczowych przedsiębiorstw wykazały, że Pfizer i niemiecki

44 Przychody BioNTech ze szczepionek mRNA wyniosły 367,8 miliardów dolarów i 213,6

odpowiednio 45 miliardów dolarów, co stanowi ponad połowę światowych szczepionek

46 udział w rynku. Szczepionka mRNA firmy Pfizer stanowiła najwyższy odsetek

47 , ponieważ szybko przyciągnął wielką uwagę i promocję ze względu na swoje bezpieczeństwo, wysokie

48 wydajność i krótkie cykle produkcyjne. W porównaniu z innymi technologiami szczepionek

49 platform, platforma szczepionek mRNA ma również te zalety, w tym 1.

50 doskonały efekt immunologiczny; 2. krótki cykl B+R; 3. wygodny na dużą skalę

51 produkcji (12, 13); 4. brak ryzyka infekcji lub integracji genomu (14-16); 5

52 ludzki system ekspresyjny ekspresuje antygeny z dobrą regeneracją immunogenną

53 (17); 6 stymulacja odporności humoralnej i komórkowej (18, 19); 7. brak adiuwantu,

54 i tak dalej. Jednak szczepionki mRNA są również wadliwe i mają wysoki poziom techniczny

55 barier i ograniczeń patentowych technologii dostarczania; są niestabilne i

56 niewygodne w przechowywaniu i transporcie. Tradycyjnie wymaga podania domięśniowego

57 zastrzyków i profesjonalna operacja.

58 Większość szczepionek poddawanych obecnie badaniom klinicznym jest wstrzykiwana domięśniowo lub

59 podskórnie, ograniczając aktywację immunologiczną do kilku drenujących węzłów chłonnych

60 (20, 21). Uważa się, że podawanie doustne ma wyższy profil bezpieczeństwa, lepszy

61 przestrzeganie zaleceń przez pacjenta i niższe koszty medyczne niż zastrzyki (20, 22). The

62 trudności złożonego środowiska żołądkowo-jelitowego i nabłonka jelitowego

63 bariery ograniczyły stosowanie szczepionek doustnych. Aby wchodzić w interakcje z bogatymi

64 komórek odpornościowych w blaszce prima, idealna szczepionka doustna musi tolerować

65 środowiska żołądkowo-jelitowego i pokonać bariery nabłonkowe jelit (23).

66 Egzosomy to pochodzące z komórek, błoniaste pęcherzyki obecne w prawie wszystkich

67 płynów. Egzosomy mają rozmiary w zakresie od 35 do 120 nm średnicy

68 składa się z dwuwarstwy fosfolipidowej pochodzącej z błony komórkowej

69 pochodzenie. Ostatnio zwrócił na siebie uwagę ze względu na swoją naturalną rolę wahadłowca

70 ładunków molekularnych (np. DNA, małe RNA, białka i lipidy) między odległymi

71 komórki w organizmie. Potwierdzono, że mleko krowie jest bogate w egzosomy i

72 wykazuje podobny potencjał, aby służyć jako nanonośniki do dostarczania leków (24). Mleko to A

73 bardziej przystępne cenowo i dostępne źródło w porównaniu z pożywkami do hodowli komórkowych.

74 Co więcej, mleko-exos może zapewnić dodatkowe korzyści jako naturalnie pożądane doustnie

75 przewoźników dostawczych, co wskazuje, że mleko-exos stanowią wygodniejszą opcję

76 i przyjazną dla pacjenta metodą leczenia (25). Biorąc pod uwagę biologiczne

77 właściwości egzosomów mleka i pokonywanie wyzwań technologicznych

78 szczepionek mRNA, obecnie opisaliśmy sposób wytwarzania mleka

79 egzosomów, które są obciążone mRNA RBD, oceniło ich skuteczność w

80 , dostarczając funkcjonalny mRNA, opracowali nowatorską platformę technologii szczepionek doustnych

81 na podstawie egzosomów mleka i zbadali wstępną skuteczność powieści

82 doustna szczepionka oparta na egzosomach mleka u myszy w celu wywołania humoralnej odporności na

83 białka szczytowe SARS-CoV-2.

84 Wyniki

85 Przygotowanie egzosomów pochodzących z mleka krowiego

86 Aby ocenić nasze metody przygotowania, egzosomy pochodzące z mleka krowiego (milk-exos)

87 wyizolowano i oczyszczono przez ultrawierowanie w gradiencie gęstości (DC) (ryc. 1A).

88 DC zebrało sześć składników, wśród których F1 wynosił około 5 ml, a F2

89 do F6 miały objętość 7 ml (ryc. 1B). Aby scharakteryzować izolowane mleko-exos

90 biofizycznie, biomarkery (CD9, TGS110) i morfologię wykorzystano do

91 określić frakcję zawierającą egzosomy. Egzosomy były głównie

92 skoncentrowane w F3 i F4 (ryc. 1C, D). Morfologia wykazała bogactwo

93 obfitość mieszanych populacji egzosomów z przeważnie nienaruszonymi pęcherzykami

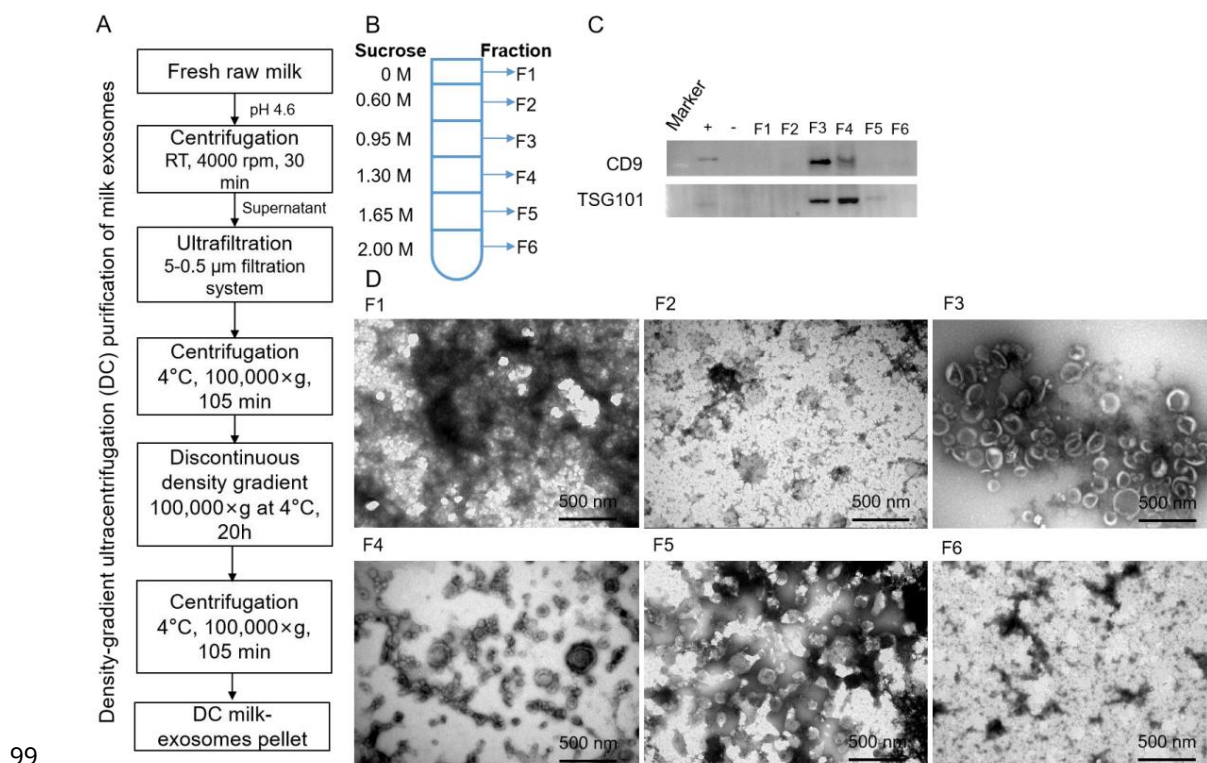
94 zgodne z klasyczną morfologią podobną do egzosomu i typowym kubkiem

95 struktura (ryc. 1D). Egzosomy mleka są charakterystyczne dla egzosomów w zakresie

96 o średnicy 30-150 nm zaobserwowano w 0,95 mol/l-1,30 mol/l sacharozy. Jak

97 frakcji 3 i 4 wzbogacono w egzosomy, połączono je razem

98 dalsza analiza.



100 Rycina 1. Identyfikacja egzosomów pochodzących z mleka krowiego we frakcjach

Ultrawierowanie w gradiencie gęstości 101 . (A) Schematyczne przedstawienie

102 główne etapy izolowania egzosomów z surowego mleka krowiego. (B) F1–F6

103 przedstawia odpowiednie stężenia sacharozy. (C) Egzosom

Zawiesinę 104 analizowano metodą Western blot. Immunobloty wykazały egzosomy

105 w różnych frakcjach egzosomów mleka. +, kontrola pozytywna (białko z

106 komórek HaCat); -, kontrola negatywna (białko komórek Hela). (D) Morfologia

107 różnych frakcji uzyskanych metodą TEM. (Słupki skali = 500 nm).

108 Oczyszczanie i charakterystyka egzosomów pochodzących z mleka krowiego wg

Ultrawierowanie w gradiencie gęstości 109

110 Morfologia połączonej frakcji egzosomów wykazywała bogatą obfitość

111 egzosomów zgodnych z klasyczną morfologią podobną do egzosomów (ryc. 2A), rozmiar

rozkład 112 (ryc. 2B) i markery białkowe (ryc. 2C). Trójdrożny Venn

Diagram 113 białek ujawnił 1022 białek wspólnych dla wszystkich zbiorów danych i 961

114 białek zostało powszechnie zidentyfikowanych we wszystkich trzech exos-mleko DC, jak pokazano na rycinie

115 2C. Analiza proteomiczna próbek wykazała, że lizaty białek egzosomów

Przygotowano 116 i zweryfikowano za pomocą analizy skupień pod kątem żywej błony egzosomalnej

117 znaczników CD9, CD63, CD81 i TSG101. Brak mikropęcherzyków

118 markerów powierzchniowych GM130 i kalneksyny, a także ich brak

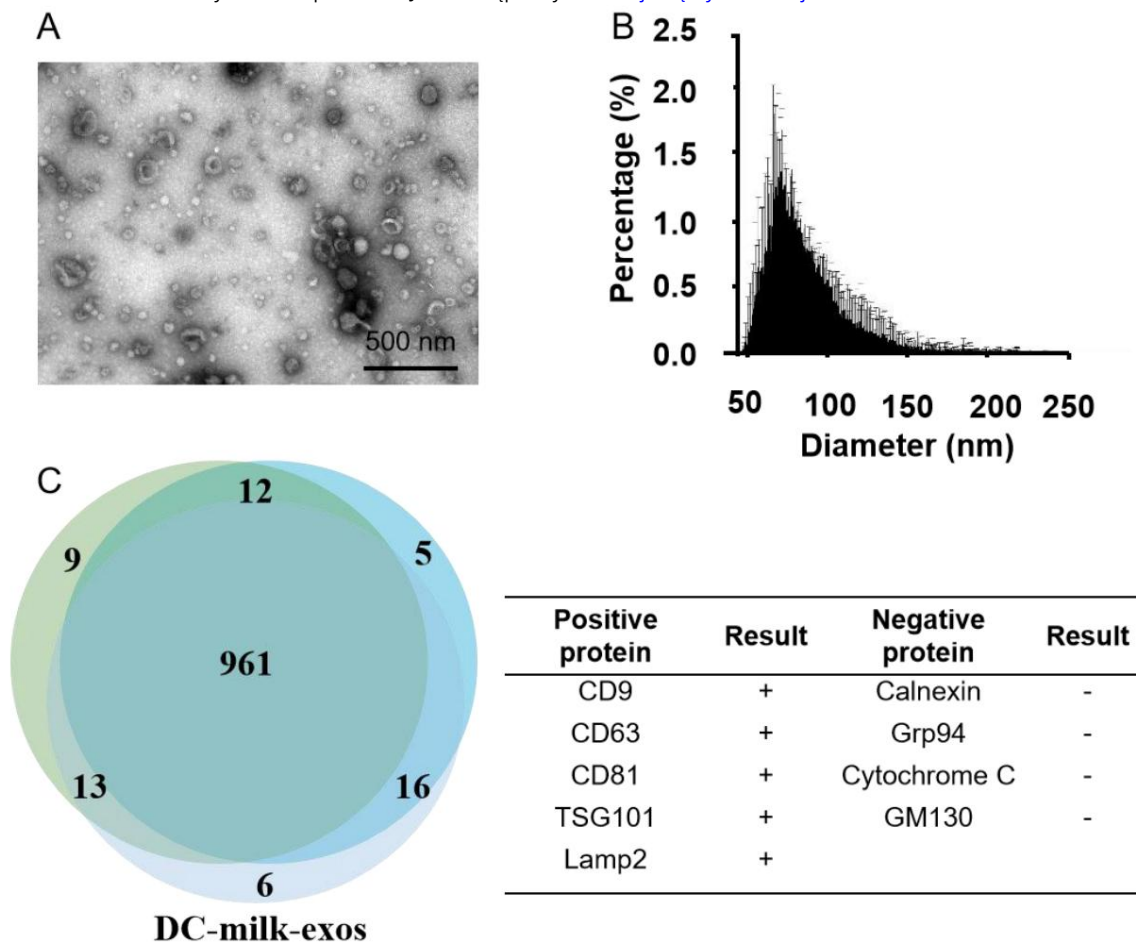
119 marker retikulum endoplazmatycznego (ER) kalneksyna potwierdziła, że wyizolowany

120 exos mleka nie było zanieczyszczonych innymi ciałami wielopęcherzykowymi (ryc. 2C).

121 Trzy partie egzosomów pochodzących z mleka krowiego otrzymane za pomocą gradientu gęstości

Przeanalizowano 122 ultrawierowanie (DC-milk-exos) i wskazano, że tak

123 brak różnic między wieloma partiami DC-milk-exos.



124

125 Rysunek 2. Charakterystyka DC-milk-exos. (A) Morfologia i (B)

126 analizę wielkości cząstek wykryto odpowiednio za pomocą TEM i nanoFCM. (C) A

127 trójdrożny diagram Venna białek z trzech partii DC-mleko-exos

128 ujawniło 1022 białek wspólnych dla wszystkich zestawów danych. Analiza skupień dla witalności

129 egzosomalnych markerów błonowych CD9, CD63, CD81, TSG101, powierzchnia mikropęcherzyków

Wskazano 130 markerów GM130 i marker retikulum endoplazmatycznego (ER) kalneksyna

131 na stole. Skrót: TEM, transmisyjny mikroskop elektronowy;

132 DC-milk-exos, egzosomy pochodzące z mleka krowiego według gradientu gęstości

133 ultrawierowanie. Paski skali = 500 nm.

134 Ładowanie RBD mRNA Egzosomy pochodzące z mleka

135 Aby ustalić, czy DC-milk-exos można załadować egzogennym, in vitro

136 zsyntetyzowanych mRNA, zaprojektowaliśmy i zsyntetyzowaliśmy testowe wiązanie receptora

mRNA domeny 137 (RBD) kodujący immunogenne formy kolca SARS-CoV-2.

138 Region sekwencji kodującej RBD (CDS) ma długość 675 par zasad (pz) i ma

139 znacznik FLAGA. Badanie mRNA RBD zsyntetyzowanego in vitro przy użyciu a

140 bioanalyzer (Agilent) potwierdził, że próbka mRNA RBD przebiegała jako pojedynczy prążek

141 z 1100 bps (ryc. 3A), zgodne z rozmiarem, który spodziewaliśmy się zaprojektować in vitro

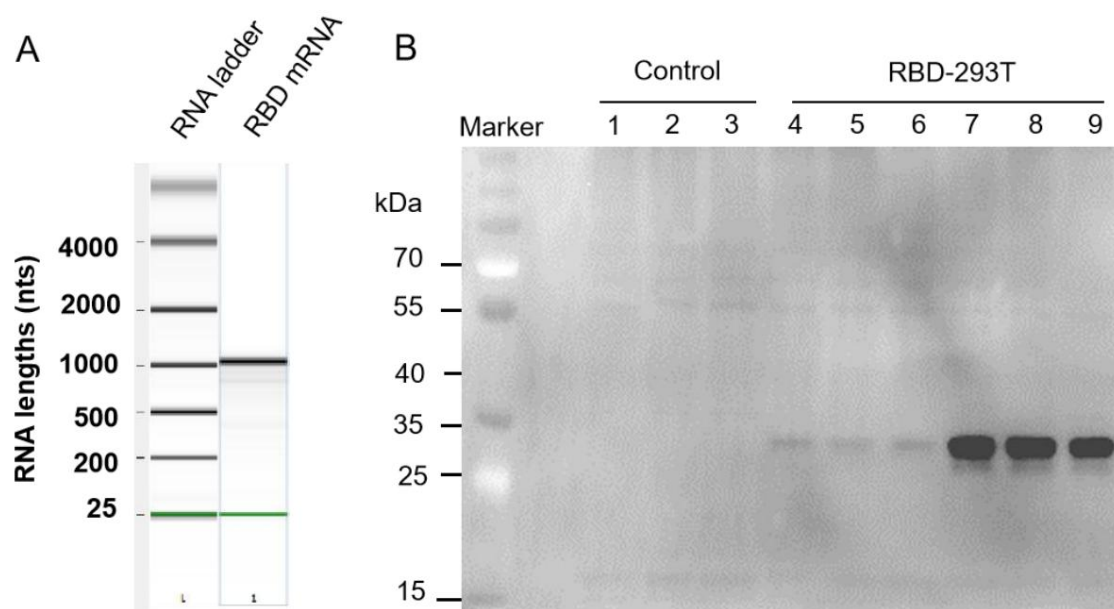
142 transkrypcja. Aby ocenić jego funkcjonalność, transfekowano mRNA RBD

143 komórek 293T i ekspresję peptydu RBD zbadano następnego dnia przez

144 western blot (ryc. 3B). Wyniki te wskazują, że zsyntetyzowano mRNA RBD

145 zgodnie z transkrypcją in vitro (IVT) i miał funkcję translacyjną, która mogła

146 ulegać translacji do białka RBD w komórkach.



147

148 Rycina 3. Charakterystyka domeny wiążącej receptor SARS-CoV-2 (RBD)

149 mRNA. (A) Żelopodobny obraz zsyntetyzowanego in vitro mRNA RBD zbadanego przy użyciu

150 chip RNA na Agilent Bioanalyzer. Dane dla markerów RNA, mRNA RBD, są

151 przedstawione od lewej do prawej. (B) Western blot dla białka RBD SARS-CoV-2

152 Ekspresja w komórkach 293T, gdy mRNA RBD transfekowano do komórek 293T

153 z dodatkowymi 24 godzinami traktowania wraz z 1 µg i 3 µg mRNA RBD. pasy

154 1-3: kontrola; Ścieżki 4-6: 1 µg RBD-293T; Ścieżki 7-9: 3 µg RBD-293T.

155 Aby załadować mRNA IVT RBD do DC milk-exos, najpierw zmieszaliśmy go z kationowym

156 lipidów (DOTAP) do generowania mRNA lipidów. Następnie załadowaliśmy lipid-mRNA do

157 DC-mleko-exos przez podział indukowany mieszaniem (ryc. 4A). Oba procesy są

158 napędzany przez siłę przyciągania ładunku, w wyniku hermetyzacji

159 mRNA lipidów do błon Milk-exos. Aby scharakteryzować mRNA RBD

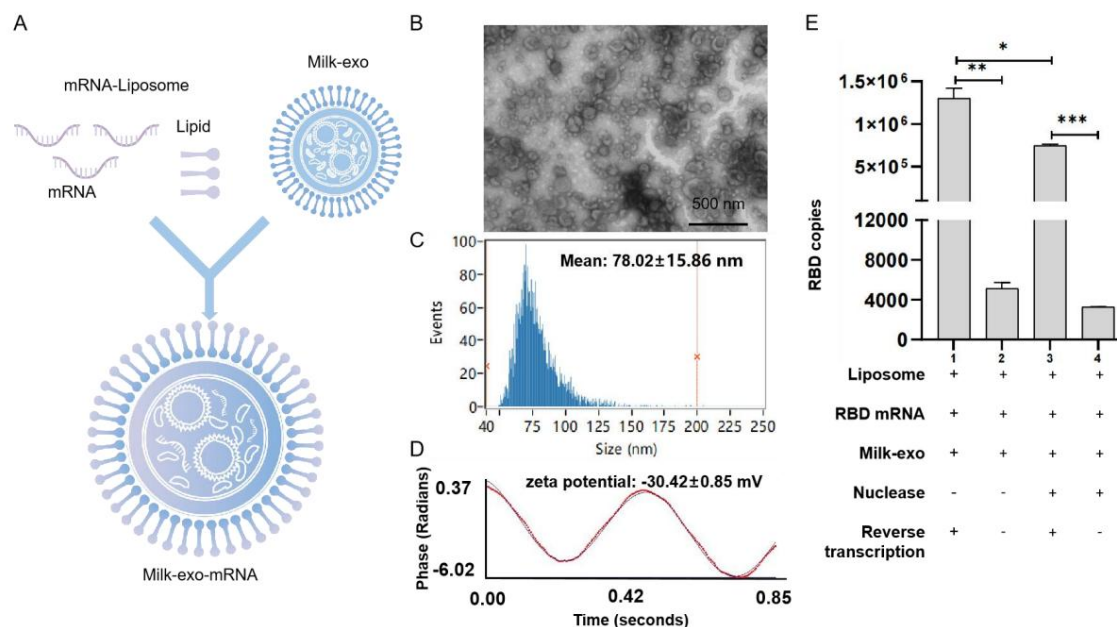
160 Milk-exos biofizycznie, morfologię i rozkład wielkości oraz potencjał zeta

161 przeprowadzono analizę (ryc. 4B-D). Aby określić efektywność ładowania tego

162 , produkty trzech niezależnych reakcji ładowania mRNA były

163 przebadanych. Wykazał to ilościowy test PCR w czasie rzeczywistym oparty na TaqMan

164 skuteczność ładowania osiągnęła 57,3% (ryc. 4E).



165

166 Rycina 4. Charakterystyka szczepionki opartej na egzosomach pochodzących z mleka dla

167 SARS-CoV-2. (A) Schemat przygotowania szczepionki przeciwko SARS-CoV-2. The

168 morfologia (B), rozkład wielkości cząstek (C), analiza potencjału zeta (D) i

Wykonano 169 wydajności ładowania mRNA RBD (E). Paski skali = 500 nm.

170 Weryfikacja szczepionek doustnych dla RBD mRNA-DC-milk-exos in vitro i in

171 żywych

172 Następnie sprawdziliśmy, czy Milk-exos załadowany mRNA RBD może dostarczyć

173 funkcjonalne mRNA RBD do ludzkich komórek. Wyniki Western blot i ELISA

174 ustalono, że Milk-exos załadowany mRNA RBD może dostarczać mRNA do 293 komórek

175 i wytwarzają peptyd RBD 24 godziny później. (Ryc. 5A, B, $p < 0,01$).

176 Aby dodatkowo potwierdzić zdolność do stymulacji przeciwciał neutralizujących, RBD

177 mRNA-milk-exos wstrzyknięto do dwunastnicy (id) 9-11-tygodniowego

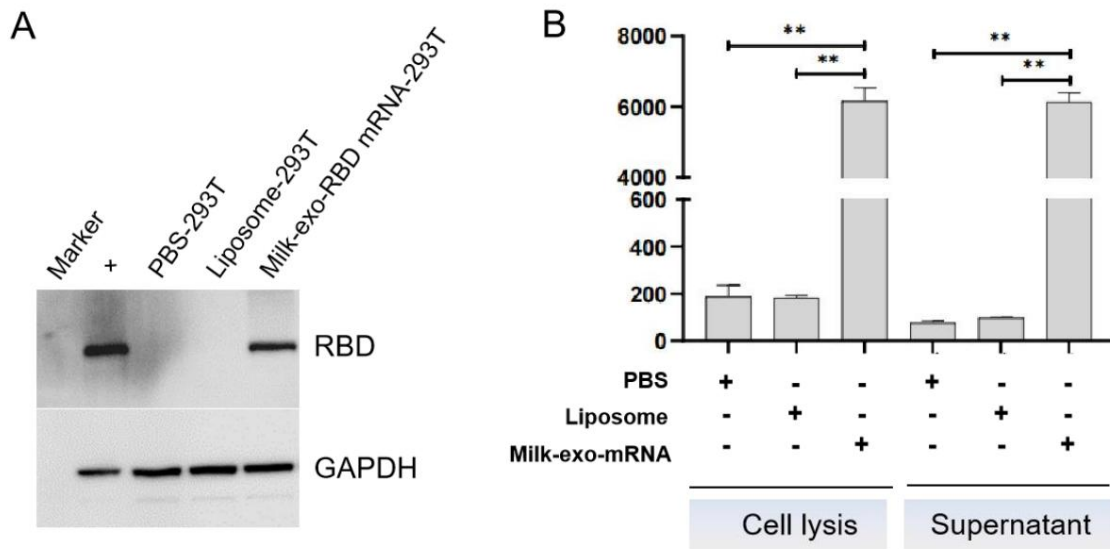
178 samic myszy BALB/c (ryc. 6A). Krew (0,1 ml) pobrano w dniach 0, 7, 14, 21,

179 28, 35, 42 i 49 do wykrywania przeciwciał przed uśmierceniem zwierząt.

180 Zaobserwowaliśmy, stosując zestawy ELISA przystosowane do wykrywania przeciwciał pochodzących od myszy

181 , że zaszczepione zwierzęta wytwarzały względnie stały poziom neutralizacji

182 przeciwciał przeciwko RBD po drugiej iniekcji (ryc. 6B, C).



183

184 Ryc. 5. Egzosomy obciążone mRNA dostarczają funkcjonalne SARS-CoV-2 RBD

185 mRNA do ludzkich komórek in vitro.

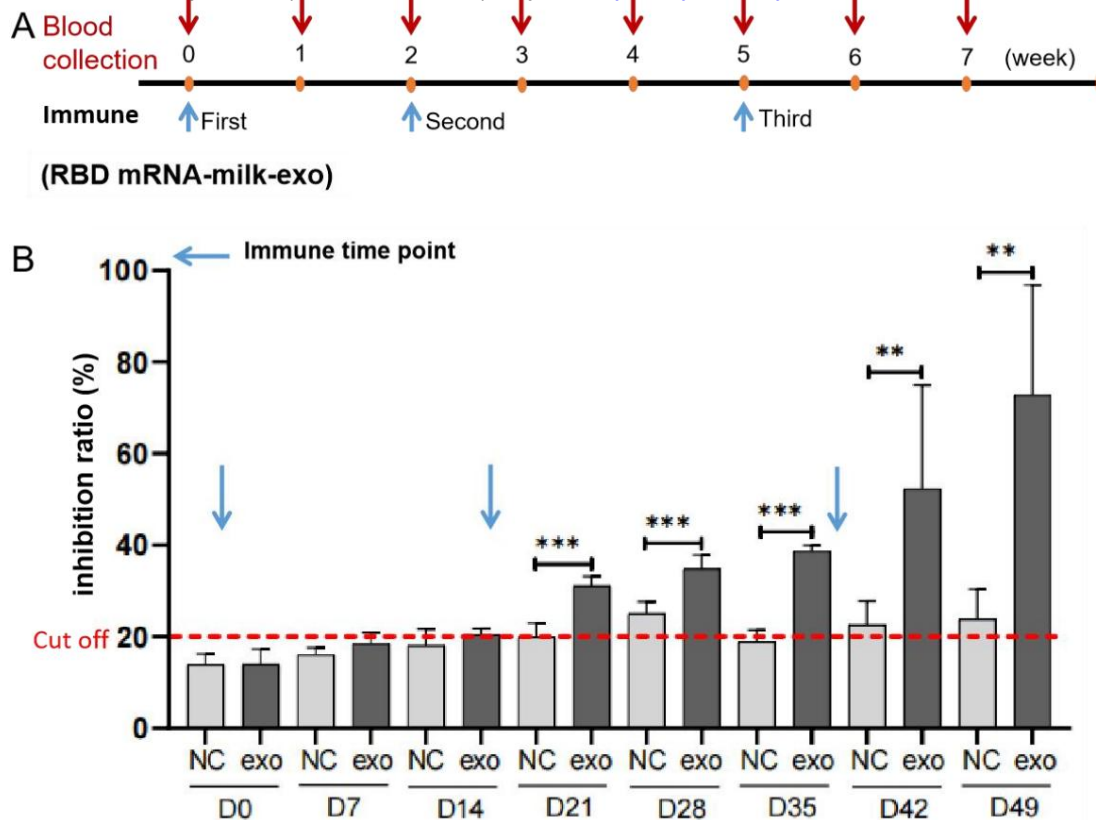
186 (A) Analiza Western blot ekspresji mRNA RBD dostarczonego doustnie

Szczepionka 187 w komórkach 293T. (B) Detekcja ELISA RBD wyrażanego w komórce 293T

188 lizat i wydzielany do supernatantu hodowli po 24 godzinach od

189 transfekcja szczepionki na bazie egzosomów. Dane przedstawiono jako średni standard

Odchylenie 190 przy trzyosobowej grupie. **P < 0,01 w porównaniu z PBS.



191

192 Ryc. 6. Walidacja egzosomów mleka obciążonych mRNA SARS-CoV-2 RBD

193 dostarczanie funkcjonalnego mRNA SARS-CoV-2 RBD in vivo.

194 (A) Harmonogram immunizacji myszy i pobierania próbek surowicy. Myszy BALB/c otrzymywały

195 takich samych dawek szczepionki doustnej dla SARS-CoV-2 na bazie mleka

196 egzosomów (N = 5) lub kontrolny roztwór soli (N = 3) w dniu 0 i ponownie podano dawkę przypominającą

197 w dniach 14 i 35. Surowice pobrano w dniach 0 (przed szczepieniem), 7, 14, 21,

198 28, 35, 42 i 49 (po szczepieniu). Niebiesko-czerwona strzałka reprezentowała

199 punktów czasowych, odpowiednio, immunizacji i pobrania krwi. (B)

200 przeciwciał neutralizujących doustnej szczepionki na SARS-CoV-2 pochodzenia mlecznego

201 egzosomów w surowicy oznaczono metodą ELISA. Reprezentowana czerwona kropkowana linia

202 wartość odcięcia przeciwciał neutralizujących przeciwko peptydowi RBD. N = 3

203 (kontrola), N = 5 (RBD-DC-mleko-exos), a dane przedstawiono jako średnią ± STD.

204 **P < 0,01, *** P < 0,001 vs. grupa kontrolna.

205 Dyskusja

206 W tym badaniu wykazaliśmy, że doustna szczepionka na SARS-CoV-2 jest oparta

- 207 egzosomów pochodzących z mleka krowiego może dostarczać funkcjonalne mRNA in vitro i in vivo
- 208 i indukują odpowiedzi przeciwciał anti-S. Najpierw pomyślnie zweryfikowaliśmy plik
- 209 technicznej wykonalności doustnego dostarczania mRNA na bazie mleka krowiego
- 210 egzosomów jako nośników dostarczających.
- 211 Ogólnie uważano, że w porównaniu z iniekcją, podawanie doustne ma ok
- 212 lepszy profil bezpieczeństwa, lepsze przestrzeganie zaleceń przez pacjentów i niższe koszty medyczne (20, 22).
- 213 Podobnie jak liposomy, egzosomy mają błonę dwulipidową i wodny rdzeń;
- 214 dlatego potencjalnie mogą być obciążone lekami hydrofilowymi i lipofilowymi
- 215 (26). Jednak praktyczne zastosowanie terapii opartych na egzosomach w
- 216 transformacja kliniczna pozostawała ciągłym wyzwaniem. Wiele badań izolowanych
- 217 egzosomów z pożywek do hodowli komórkowych z niską wydajnością i kosztem, zwiększając skalę
- 218 produkcja trudna (27). Ekonomiczne i skalowalne źródło powinno być zoptymalizowane
- 219 w oparciu o obecne ograniczenia.
- 220 Doniesiono, że egzosomy pochodzące z mleka krowiego wykazywały podobny potencjał
- 221 służyć jako nanonośniki do dostarczania leków (24). Mleko było bardziej przystępne i
- 222 dostępne źródło w porównaniu z pożywkami do hodowli komórkowych. Poza tym było
- 223 egzosomy pochodzące z mleka mogą zapewnić dodatkowe korzyści, które są naturalnie pożądane
- 224 nośniki dostarczania doustnego, co wskazuje, że egzosomy pochodzące z mleka krowiego
- 225 stanowią wygodniejszą i bardziej przyjazną pacjentowi metodę terapeutyczną (25).
- 226 Tutaj przedstawiliśmy szczepionkę doustną, która różniła się od poprzedniej
- 227 technologii dostarczania szczepionek doustnych opartych na nanomateriałach
- 228 egzosomów pochodzących z mleka krowiego oraz egzosomów pochodzących z mleka pochodzących z jamy ustnej
- 229 szczepionka mRNA COVID-19 miała swoją technologię dostarczania i uprzemysłowienie
- 230 możliwości. Chociaż wyniki tego badania sugerowały korzystne efekty
- 231 doustną szczepionkę do zapobiegania nowemu koronawirusowi i zaferował

- 232 potencjalnych schematów do zastosowań klinicznych, musieliśmy zwiększyć liczbę
- 233 zwierząt i następnie zweryfikować skuteczność szczepionki doustnej u różnych zwierząt
- 234 modeli (takich jak duże zwierzęta) w przyszłych badaniach. Ponadto precyzyjny
- 235 mechanizmów molekularnych i bezpieczeństwa wymagało dalszych badań.
- 236 Chociaż ultrawierowanie w gradiencie gęstości było złotym standardem
- 237 izolacji i oczyszczania egzosomów, przeprowadzono kilka badań nad
- 238 ekstrakcją egzosomów z mleka krowiego przy użyciu samego wirowania różnicowego (28,
- 239 29) lub wytrącania (30, 31). W połączeniu z mechanizmem różnicowym
- 240 wirowania, zastosowaliśmy metody ultrawierowania w gradiencie gęstości
- 241 wyizolować egzosomy z mleka, które były zasadniczo wolne od zanieczyszczeń
- 242 mikropęcherzyki. Ostateczna czystość próbki może osiągnąć 100%. Dla kontrastu,
- Technika 243 zastosowana w tym badaniu do oczyszczania egzosomów jest niezgodna z dużą skalą
- 244 produkcji egzosomów, co jest jedną z przeszkód w rozwoju
- 245 uprzemysłowienia. Dobrą wiadomością jest to, że ustaliliśmy
- 246 oparty na chromatografii nowy proces produkcyjny do oczyszczania egzosomów
- 247 mleka krowiego o lepszej jakości niż produkowane przez DC (danych nie przedstawiono).
- 248 Wkrótce pojawi się system dostarczania mRNA na bazie mleka
- 249 egzosomów posłuży jako platforma do rozwoju terapii mRNA w
- 250 najbliższa przyszłość.
- 251 Materiały i metody
- 252 Linie komórkowe i hodowla komórkowa
- 253 komórki 293T (SCSP-502) (komórki nabłonka nerki embrionalnej człowieka) zostały
- 254 zakupione w Banku Komórek Komitetu Ochrony Kultury Typowej,
- 255 Chińska Akademia Nauk (Szanghaj, Chiny). Hodowano komórki 293T
- 256 DMEM uzupełnione 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1% penicyliną/paciorkowcem

257 w temperaturze 37°C i stężeniu 5% CO₂ w wilgotnej atmosferze. The

258 połączonych komórek utrzymywano w DMEM zawierającym 10% (obj./obj.) FBS, zmieniając

259 medium co drugi dzień. Gdy konfluencja hodowanych komórek osiągnęła 80%,

260 zostały one oddzielone przez potraktowanie 0,25% (wag./obj.) trypsyny i 0,1% (wag./obj.)

261 kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Gibco) i ponownie zaszczepiony w gęstości 1 × 10⁴ komórek

262 na cm². Hodowane komórki przed pasażem drugim użyto do eksperymentów. dla RBD

263 mRNA in vitro, komórki transfekowano mRNA przy użyciu

264 Lipofectamine Messenger MAX zgodnie z sugestią producenta (Thermo

265 Rybak).

266 Ultrawirowanie w gradiencie gęstości, oczyszczanie mleka-exos (The

267 DC-mleko-exos)

268 egzozomów mleka wyizolowano przez ultrawirowanie w gradiencie gęstości (DC). Krótko,

269 bezkazeinową serwatkę odwirowano przy 100 000 g (Beckman Coulter, USA) przez

270 105 min, aby wytrącić mleko-exos, ponownie zawieszono w 1 ml PBS. The

271 skoncentrowanych exos mleka zostało poddanych działaniu nieciągłej gęstości

272 gradient składający się z 2 mol/l, 1,65 mol/l, 1,3 mol/l, 0,95 mol/l i 0,6 mol/l

273 sacharozy (objętość 7 ml dla każdego kąta) w 250 mM roztworze Tris-HCl (pH 7,4).

274 Wirowano je przy 100 000 g w temperaturze 4°C przez 20 godzin. Frakcja mleko-exos

Zebrano 275 pomiędzy frakcjami 3 (1,3 mol/l) i 4 (1,65 mol/l). Usuwać

276 sacharozę, frakcję rozcieńczono w PBS do końcowej objętości 40 ml i

277 wirowano przy 100 000 g w temperaturze 4°C przez 105 min. Pelet ponownie zawieszono w 1

278 ml PBS. DC-milk-exos przechowywano przed użyciem w temperaturze -80°C.

279 Charakterystyka morfologii DC-mleko-exos przez transmisję

mikroskopu elektronowego 280

281 Morfologia DC-mleko-exos została zbadana za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

282 (TEM), jak opisano wcześniej, z pewnymi modyfikacjami. Po pierwsze, DC-mleko-exos

283 (100 µg/ml) utrwalono przez zmieszanie z równą objętością 4% (wag./obj.)

284 paraformaldehydu w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Wybrany egzemplarz (10

285 μl) umieszczono następnie na siatce TEM pokrytej węglem formvar i trzymano w temperaturze pokojowej

286 przez 3 minuty. Siatkę barwiono przez dodanie 10 μl uranylu

287 roztwór szczawianu (4% octan uranylu, 0,0075 M kwasu szczawowego, pH 7). Poplamione

Siatkę 288 badano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego Hitachi 5600 plus

289 działał przy 120 KV i powiększeniu 50 000.

290 Pomiar rozkładu wielkości cząstek DC-mleko-exos za pomocą NanoFCM

291 Wielkość cząstek i liczbę próbek mleka-exos scharakteryzowano za pomocą

292 instrumentu NanoFCM (NanoFCM Inc., Xiamen, Chiny), postępując zgodnie z

293 instrukcją obsługi. Koktajl nanosfer krzemionki (kat. S16M-Exo, NanoFCM Inc.,

294 Xiamen, Chiny) zawierające mieszaninę 68 nm, 91 nm, 113 nm i 155 nm

Do ustawienia przyrządu do pomiaru wielkości cząstek zastosowano 295 standardowych kulek.

296 Parametry instrumentalne ustawiono w następujący sposób: Laser, 10 mW, 488 nm; SS

297 rozkład, 10%; ciśnienie próbkowania, 1,0 kPa; okres próbkowania, 100 μs ; czas na nagranie,

298 1 minuta.

299 Proteomika

300 Proteomika DC-milk-exos została przeanalizowana metodą LC-MS/MS przy użyciu Easy

Spektrometry masowe 301 NLC1200-Q Exactive i Fusion Lumos Orbitrap

302 (ThermoFisher), oba wyposażone w nanoflow HPLC z odwróconymi fazami (Ultimate 3000

303 RSLC, Dionex). System nano-HPLC został wyposażony w Acclaim PepMap

Kolumna nano-pułapek 304 (Dionex-C18, 100 \AA , 75 $\mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$) i mapa Peppe firmy Acclaim

Kolumna analityczna 305 RSLC (Dionex-C18, 100 \AA , 75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$). Zazwyczaj dla

306 każdego eksperymentu LC-MS/MS, 1 μl mieszaniny peptydów załadowano na

307 kolumna wzbogacająca (pułapka) przy przepływie izokratycznym 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 3% CH_3CN

308 zawierającego 0,1% kwasu mrówkowego przez 5 minut przed wzbogaceniem kolumny

309 przełączane w linii z kolumną analityczną. Eluentami stosowanymi do LC były

310 0,1% (v/v) kwas mrówkowy (rozpuszczalnik A) i 100% $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%$ (v/v) kwas mrówkowy. The

Stosowany gradient 311 to 3% B do 25% B przez 23 min, 25% B do 40% B w 2 min, 40% B

312 do 85% B w ciągu 2 minut i utrzymywane w 85% B przez 2 minuty przed zrównoważeniem przez 10

313 min w 3% B przed kolejnym wstrzyknięciem. Wszystkie widma zebrano w trybie dodatnim

314 przy użyciu pełnoskanowego skanowania widm MS w trybie FT od m/z 300-1650 przy

315 rozdzielczości 70 000 (QE) i 120 000 (Lumos). Masa śluzy 445,12003 m/z

316 użyto dla obu instrumentów. W przypadku MS/MS w Lumos „maksymalna prędkość”

Zastosowano tryb akwizycji 317 (czas cyklu 3 s) na najbardziej intensywnym prekursorze,

318 , przy czym jony peptydowe o stanach ładunku 2 wyizolowano za pomocą izolacji

319 1,6 m/z i pofragmentowane za pomocą HCD przy użyciu znormalizowanej energii zderzenia

320 z 35. Dla MSMS na QE plus, 15 najbardziej intensywnych jonów peptydowych z ładunkiem

Wyizolowano 321 stanów 2 z oknem izolacji 1,6 m/z i podzielono na fragmenty

322 HCD ze znormalizowaną energią zderzenia 35. Wykluczenie dynamiczne 30

Zastosowano 323 sekundy.

324 Surowe pliki zostały przeszukane przy użyciu Proteome Discover (wersja 2.1, Thermo

325 Fisher, Niemcy) z Sequest jako wyszukiwarką. Fragment i peptyd

326 tolerancji masy ustalono odpowiednio na 20 mDa i 10 ppm, co umożliwiło a

Maksymalnie 327 z 2 pominiętych miejsc cięcia. Fałszywe wskaźniki odkrywania białek,

328 peptydów, a fosfozoty stanowiły 1 procent. Zróżnicowane białka ekspresyjne

329 zostało przeanalizowanych przez firmę DAVID (Database for Annotation, Visualization, and

330 Zintegrowany Odkrycie) Bioinformatyka Ratunek 2021

331 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) z zalecanymi parametrami analitycznymi

332 identyfikują najbardziej znacząco wzbogacone szlaki transdukcji sygnału w danych

333 zestaw.

334 Western blot

335 Całkowite białka komórkowe i exos mleka ekstrahowano buforem do lizy RIPA i

336 stężenie białka określono za pomocą zestawu do oznaczania białek BCA (Thermo,

337 A53226). Następnie białko naniesiono na żel SDS-poliakryloamidowy

338 żeli do elektroforezy. Po elektroforezie białka przenoszono na a

Membrana z polifluorku winylidenu 339 zablokowana w 5% (wag./obj.) surowicy bydlęcej

340 albumin (BSA) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Potem była membrana

341 inkubowano z anty-TSG101 (Abcam, ab125011), anty-CD9 (Abcam, ab92726),

342 anty-RBD (Abcam, ab277628) lub anty-GAPDH (Proteintech, 60004-1) przez noc

343 w 4°C. Po przemyciu solą fizjologiczną buforowaną Tris z Tween (TBST),

Przeciwciała drugorzędowe 344 peroksydazy chrzanowej (HRP) rozcieńczono 1:10 000 z 5%

345 (wag./obj.) BSA i inkubowano z membraną przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

346 Nadmiar drugorzędowego przeciwciała wypłukano z membrany za pomocą TBST i a

Sygnal chemiluminescencyjny 347 został wygenerowany przy użyciu systemu FluorChem E

348 (ProteinSimple, USA) zgodnie z protokołem producenta.

349 Pomiar potencjału zeta

350 Potencjał Zeta egzosomów mleka zmierzono trzykrotnie w temperaturze 25°C pod

351 następujące ustawienia: czułość 85, wartość migawki 70 i liczba klatek na sekundę 30

352 klatek na sekundę, podczas gdy do ich zbierania i analizy użyto oprogramowania ZetaView

353 dane.

354 Konstrukcja doustnej szczepionki na SARS-CoV-2 na bazie RBD

355 egzosomów pochodzących z mleka DC (RBD-DC-milk-exos)

356 mRNA zaprojektowany do ekspresji białek RBD otrzymano z handlu

357 dostawca (Novoprotein). mRNA RBD oczyszczono stosując CIMmultus Oligo dT

358 kolumn i ponownie zawieszono w wodzie wolnej od DNaz i RNaz przy użyciu wolnej od nukleaz

359 końcówek i rurek. Oczyszczone mRNA RBD przygotowano do załadowania

360 DC-milk-exos poprzez wstępną inkubację z lipidami kationowymi, generując

Produkt lipid-mRNA 361 . Lipid-mRNA następnie załadowano do oczyszczonego DC-

362 milk-exos poprzez mieszanie i inkubację w celu skonstruowania szczepionki doustnej. The

Morfologia 363 , rozkład wielkości cząstek i potencjał zeta załadowanego mRNA RBD

364 DC-milk-exos scharakteryzowano za pomocą TEM, instrumentu NanoFCM i Zeta

365 Koledzy, odpowiednio. Wydajność ładowania mRNA RBD została wykryta przez

366 Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym oparty na Taqman (qRT-PCR). Ekspresja mRNA RBD

367 mierzono stosując test Western blot i test immunoenzymatyczny

368 (ELISA).

Ekstrakcja 369 RNA i test RT-qPCR oparty na Taqman

370 Całkowity RNA wyekstrahowano z RBD-DC-milk-exos przy użyciu TRIzol (Life

371 Technologies, Carlsbad, Kalifornia). Pierwszą nić cDNA zsyntetyzowano stosując

PrimeScript 372 TM RT Kit (TaKaRa, Pekin, Chiny) i używany jako szablon do

373 określają ekspresję genów RBD za pomocą wskazanych starterów i sond.

374 Zastosowano następujące sekwencje starterów: RBD, forward 5'-CTCCAGGGCAA

375 ACTGGAAAG-3' i odwrócona 5'-AATTACCACCAACCTTAGAATCAAG-3',

Sonda 376 , CCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAG, przy użyciu Premix Ex TaqTM

377 (Probe qPCR) odczynnik (TaKaRa, Pekin, Chiny) w qRT-PCR. Jazda na rowerze

Parametry 378 były następujące: reakcję PCR przeprowadzono na 50 ng cDNA

379 próbek przy użyciu 0,2 $\mu\text{mol/l}$ każdego startera, 0,4 $\mu\text{mol/l}$ sondy RBD i 10 μl

380 2 \times Premix Ex Taq Mix. Zastosowano następujące warunki: 95°C przez 30 s, 40

381 cykli w 95°C przez 5 s i 60°C przez 31 s w Thermofisher QuantStudio5 i

382 analizowane za pomocą dedykowanego oprogramowania.

383 test ELISA

384 Lizat komórkowy, supernatant z hodowli i surowicę homogenizowano pod kątem białka

385 ekstrakcji. Kolec białkowy RBD (Beyotime, Szanghaj, Chiny) i neutralizujący

Ekspresje przeciwciała 386 (Vazyme, Nanjing, Chiny) określono za pomocą testu ELISA

387 zestawów zgodnie z zaleceniami producenta.

388 Pomiar aktywności RBD in vitro

389 Zbadaliśmy, czy doustna szczepionka przeciwko SARS-CoV-2 oparta na RBD

390 egzosomów pochodzących z mleka DC (RBD-DC-milk-exos) może zapewnić funkcjonalne RBD

391 mRNA do ludzkich komórek. W przypadku badań in vitro do szczepionki doustnej dodano otrzymaną szczepionkę

392 preparatów do hodowli komórek ludzkich, hodowano komórki przez noc, aby umożliwić RBD

393 mRNA i ekspresję, a następnie zbadano komórki pod kątem aktywności RBD za pomocą
394 western blot i ELISA.

395 Weryfikacja funkcji dostarczania RBD-DC-milk-exos in vivo.

396 Użyliśmy dobranych wiekowo samic myszy BALB/c (Spefdord (Beijing) Biotechnology
397 Co., Ltd.). Wszystkie doświadczenia na zwierzętach przeprowadzono po zakładzie
398 wytycznych dotyczących opieki nad zwierzętami i wykorzystania ich i został zatwierdzony przez Experimental
399 Komitet ds. Etyki Zwierząt Youji (Tianjin) Pharmaceutical Technology Co., Ltd.
400 (IACUC-20220726-05.00). Samice myszy BALB/c (23~26 g, Spefdord, Pekin,
401 Chiny) były trzymane w obiekcie wolnym od patogenów w standardowych warunkach
402 temperatura 24°C, 12-godzinny cykl światło/ciemność oraz jedzenie i woda ad libitum.
403 myszy wykorzystano do badania aktywności RBD mRNA-DC-milk-exos
404 podawane przez wstrzyknięcie do dwunastnicy. Myszy losowo podzielono na 2 grupy:
405 1) grupa kontrolna (sól fizjologiczna, 1000 µl) (N = 3); i 2) RBD-DC-mleko-exos (0,5
406 mg mRNA/1000 µl) (N = 5). Wszystkie zabiegi rozpoczęto przez dwunastnicę
407 w dniach 1, 15 i 36. Wszystkie myszy uśmiercono dwa tygodnie po ostatnim
408 zabiegów z 1% izofluranem. Krew pobierano w różnych punktach czasowych (dni 0,
409 7, 14, 21, 28, 35, 42 i 49). Weryfikacja przeciwciał neutralizujących jamy ustnej
Szczepionka 410 dla egzosomów pochodzących z mleka na bazie SARS-CoV-2 in vivo została wykonana przez
411 Analiza ELISA w surowicy. N = 3 (kontrola), N = 5 (mRNA RBD-DC-mleko-egzos) i
412 dane są prezentowane jako średnia ±STD. **P < 0,01, ***P < 0,001 vs. kontrola
grupa 413 .

414 Analizy statystyczne

415 Dane przedstawiono jako średnią i odchylenie standardowe. Niesparowany
Test t-Studenta 416 został użyty do analizy danych z tylko dwoma zestawami. Analiza jednokierunkowa
417 wariancji (ANOVA) przeprowadzono w celu ustalenia, czy istnieje a
418 znacząca różnica między więcej niż dwoma zestawami danych, a następnie Bonferroniego
419 test post hoc przy użyciu GraphPad Prism 6.0. P < 0,05 uznano statystycznie

420 istotnych dla różnic grupowych. Gwiazdka (*) reprezentowała $P < 0,05$; podwójny

421 gwiazdek (**) reprezentowało $P < 0,01$; potrójna gwiazdka (***) reprezentowała $P < 0,001$.

422 Referencje

423 1. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H i in. Przebieg kliniczny i wyniki

424 krytycznie chorych pacjentów z zapaleniem płuc SARS-CoV-2 w Wuhan w Chinach: a

425 jednoośrodkowe, retrospektywne badanie obserwacyjne. 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 i in. The

428 Okres inkubacji choroby koronawirusowej 2019 (COVID-19) Od Publicznie

429 zgłoszonych potwierdzonych przypadków: oszacowanie i zastosowanie. Ann Intern Med (2020)

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

431 3. Huang NE, Qiao F. Zależna od czasu szybkość transmisji danych dla

432 śledzenie epidemii: studium przypadku 2019-nCoV. Sci Bull (Pekin) (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. Zapalenie płuc

Epidemia 435 związana z nowym koronawirusem prawdopodobnie pochodzenia nietoperza. Przyroda (2020)

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

437 5. Ściany AC, Park YJ, Tortorici MA, Ściana A, McGuire AT, Veessler D. Struktura,

438 Funkcja i antygenowość glikoproteiny kolczastej SARS-CoV-2. Komórka (2020)

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

440 6. Letko M, Marzi A, Munster V. Funkcjonalna ocena wejścia do komórki i receptora

441 dla SARS-CoV-2 i innych betakoronawirusów linii 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 i in. Wejście do komórki SARS-CoV-2 zależy od ACE2 i TMPRSS2 i jest zablokowane

445 przez klinicznie udowodniony inhibitor proteazy. Komórka (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 i in.

448 Enzym konwertujący angiotensynę 2 jest funkcjonalnym receptorem SARS

449 koronawirus. Przyroda (2003) 426(6965):450-454. doi: 10.1038/natura02145

450 9. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Struktura skoku koronawirusa SARS

Domena wiążąca receptor 451 w kompleksie z receptorem. Nauka (2005)

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

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

454 pochodzenie 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.

457 wyścig o szczepionkę na COVID-19: dokąd zmierzamy? Szczepionki Expert Rev (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 Bezpieczeństwo i skuteczność szczepionki BNT162b2 mRNA covid-19. New English 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. Szczepionki nowej generacji:

463 Dostarczanie DNA i mRNA za pośrednictwem nanocząsteczek. Adv Mater Healthc (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 Włączenie pseudourydyny do mRNA daje lepszą nieimmunogenność

467 o zwiększonej zdolności translacyjnej i stabilności biologicznej. 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 mRNA modyfikowany sekwencyjnie bez chemicznych modyfikacji nukleozydowych

471 umożliwia skuteczną terapię białkową u dużych zwierząt. Mol Ther (2015)

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

473 16. Kariko K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generowanie optymalnego

474 mRNA do terapii: Oczyszczanie HPLC eliminuje aktywację immunologiczną i poprawia

475 translacja zmodyfikowanego nukleozydem mRNA kodującego białko. Kwasy nukleinowe 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 i in. Bezpieczeństwo

478 i immunogenność szczepionki mRNA przeciw wściekliznie u zdrowych dorosłych: otwarta próba,

479 nierandomizowanych, prospektywnych, pierwszych na ludziach badaniach klinicznych I fazy. Lancet (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 i in.

482 Humoralna i komórkowa pamięć immunologiczna na cztery szczepionki COVID19. Komórka. (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. A

485 pojedyncza immunizacja szczepionkami mRNA modyfikowanymi nukleozydami wywołuje silne

486 komórkowych i humoralnych odpowiedzi immunologicznych przeciwko SARS-CoV-2 u myszy. Odporność

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

488 20. Vela Ramirez JE, Sharpe LA, Peppas NA. Obecny stan i wyzwania w

489 opracowywuje szczepionki doustne. 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 i in. Rozwój raka

Szczepionka 492 wykorzystująca aktywną akumulację węzłów chłonnych za pośrednictwem chemii kliknięć in vivo

493 dla ulepszonej immunoterapii. 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 i in. Ankieta o

496 rozpowszechnienie nieprzestrzegania szczepień z powodu lęku przed igłą u dzieci

497 i dorosli ludzie. Szczepionka (2012) 30(32):4807-4812. doi:

498 10.1016/j.szczepionka.2012.05.011

499 23. Kim SH, Jang YS. Opracowanie szczepionek śluzówkowych dla obu błon śluzowych

500 i ogólnoustrojową indukcję odporności oraz role odgrywane przez adiuwanty. Clin Exp

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

502 24. Somiya M, Yoshioka Y, Ochiya T. Biozgodność wysokoczyszczzonego bydła

503 zewnątrzkomórkowe pęcherzyki pochodzące z mleka. Pęcherzyki J Extracell (2018) 7(1):1440132.

504 10.1080/20013078.2018.1440132

505 25. Li D, Yao S, Zhou Z, Shi J, Huang Z, Wu Z. Hialuronowa dekoracja mleka

506 egzosomów kieruje specyficznym dla nowotworu dostarczaniem dokсорubicyny. Węglowodany Res (2020)

507 493:108032. 10.1016/j.carres.2020.108032

508 26. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Egzosomy: prąd

509 wiedzy na temat ich składu, funkcji biologicznych oraz diagnostycznych i

510 potencjałów terapeutycznych. 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. Egzosomy mleka – naturalne nanocząsteczki do dostarczania siRNA. Rak Lett (2019)

514 449:186-195. 10.1016/j.canlet.2019.02.011

515 28. Wolf T, Baier SR, Zempleri J. Transport jelitowy mleka krowiego

516 egzosomów odbywa się za pośrednictwem endocytozy w ludzkich komórkach raka okrężnicy Caco-2

517 i komórki jelita cienkiego szczura IEC-6. 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., Mleko bydłce

520 egzosomów zawiera mikroRNA i mRNA i są pobierane przez człowieka

521 makrofagów. 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 i in. Komercyjne mleko krowie zawiera fizycznie stabilne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

524 wykazujące ekspresję immunoregulującego TGF-beta. PLoS ONE (2015) 10(3):e0121123. doi:

525 10.1371/journal.pone.0121123

526 31. Yamada T, Inoshima Y, Matsuda T, Ishiguro N. Porównanie metod

527 izolowania egzosomów z mleka krowiego. J Vet Med Sci (2012) 74(11):1523-1525.

528 doi: 10.1292/jvms.12-0032

529 Podziękowania:

530 Dziękujemy Hangping Rui za wsparcie administracyjne; a także dziękuję Fengbinowi Li, Mi

531 Chen, Lin Ma, Tonglin Cui i Xiaohan Dai za ich doskonałą technikę

532 pomoc.

533 Finansowanie:

534 Finansowanie zostało zapewnione przez Tingo Exosomes Technology Co., Ltd, Tianjin, Chiny.

535 Wkład autorów: Wszyscy autorzy dokonali przeglądu manuskryptu; XHG, LL, QZ,

536 MW, a CLH sformułował pomysły, zaprojektował badania i eksperymenty. QZ,

537 MW, CLH i ZJW przeprowadziły eksperymenty i wyprodukowały odczynniki; LL,

538 analizowanych eksperymentalnie QZ, MW, CLH, XZM, DLQ, NW i JHW

539 danych; Praca nadzorowana przez HQD. LL i QZ napisali manuskrypt. Wszyscy autorzy

540 przyczyniło się do powstania artykułu i zatwierdziło przesłaną wersję.

541 Konflikt interesów: Autorzy oświadczają, że badanie zostało przeprowadzone w r

542 brak jakichkolwiek powiązań handlowych lub finansowych, które można by interpretować

543 jako potencjalny konflikt interesów.

544 Dostępność danych i materiałów: Wszystkie dane są dostępne w tekście głównym lub w

545 materiałów uzupełniających. Dalsze zapytania można kierować do odpowiedniego

546 autor.

547 Oświadczenie etyczne: Badanie na zwierzętach zostało zweryfikowane i zatwierdzone przez

548 Komitet ds. Etyki Zwierząt Doświadczalnych firmy Youji (Tianjin) Pharmaceutical

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