

牛奶外泌体在制备药物载体中的应用

技术领域

5 本发明涉及药物制剂领域,特别涉及牛奶外泌体在制备药物载体中的应用。

背景技术

10 外泌体是指包含了复杂 RNA 和蛋白质的小膜泡 (30-150nm), 现今, 其特指直径在 40-100nm 的盘状囊泡。1983 年, 外泌体首次于绵羊网织红细胞中被发现, 1987 年 Johnstone 将其命名为"exosome"。多种细胞在正常及病理状态下均可分泌外泌体。其主要来源于细胞内容酶体微粒内陷形成的多囊泡体, 经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中。目前现有的外泌体纯化技术主要有以下几种方法

1、超速离心法 (差速离心)

15 超离法是最常用的外泌体纯化手段, 是外泌体提取的金标准, 但规模较小, 过程比较费时, 且回收率不稳定 (可能与转子类型有关), 纯度也受到质疑; 此外, 重复离心操作还有可能对囊泡造成损害, 从而降低其质量。

2、密度梯度离心

20 在超速离心力作用下, 使蔗糖溶液形成从低到高连续分布的密度阶层, 是一种区带分离法。密度梯度离心存在的问题是步骤繁琐, 耗时。

3、超滤离心

超滤离心法提取外泌体可能会阻塞过滤孔, 导致膜的寿命减短, 分离效率较低。

25 4、磁珠免疫法

磁珠法提取外泌体效率低, 外泌体生物活性易受 pH 和盐浓度影响, 不利于下游实验, 难以广泛普及。

5、PEG-base 沉淀法

-2-

聚乙二醇（PEG）沉淀外泌体存在不少问题：比如纯度和回收率低，杂蛋白较多（假阳性），颗粒大小不均一，产生难以去除的聚合物，机械力或者吐温-20等化学添加物将会破坏外泌体等。

6、试剂盒提取

- 5 商业化的外泌体提取试剂盒，提取外泌体规模小，并且会产生很多杂蛋白，外泌体纯度和回收率低。

因此本发明拟解决不依赖于离心，高效大规模提取牛奶外泌体的方法。

- 10 更重要的是，外泌体的载药是难点，本发明实现并提高了外泌体对蛋白药的载药。

目前蛋白药常用的给药方式是注射给药，注射给药复杂，并且存在安全性风险。

发明内容

- 15 有鉴于此，因此本发明采用牛奶外泌体作为药物载体，该外泌体来源于牛奶，安全可靠，又具有牛奶外泌体的功能性质，将其作为药物载体，可实现蛋白质药物的口服给药。通过利用牛奶外泌体装载利拉鲁肽，实现利拉鲁肽的口服给药，治疗二型糖尿病。

为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

- 20 本发明提供了牛奶外泌体在制备药物载体中的应用。在本发明的一些具体实施方案中，所述药物包括蛋白质药物。在本发明的一些具体实施方案中，所述药物包括利拉鲁肽。

- 25 本发明还提供了牛奶外泌体作为药物载体在制备预防和/或治疗疾病的药物中的应用。在本发明的一些具体实施方案中，所述药物包括蛋白质药物。在本发明的一些具体实施方案中，所述药物包括利拉鲁肽。在本发明的一些具体实施方案中，所述药物的给药途径为口服给药。在本发明的一些具体实施方案中，所述疾病包括II型糖尿病。

更重要的是，本发明还提供了口服药物，包括有效成分和作为药物载体的牛奶外泌体。

-3-

本发明中,所述应用或所述口服药物中,所述牛奶外泌体的制备方法,包括如下步骤:

步骤 1、前处理;

步骤 2、初步纯化、浓缩;

5 步骤 3、精纯;

所述前处理包括去除脂肪和/或去除蛋白;

所述初步纯化、浓缩采用切向流超滤;

所述精纯包括 CIMmultus QA 柱纯化、Capto core700 柱纯化、S400 分子筛色谱法纯化中的一种或两者以上的组合。

10 在本发明的一些具体实施方案中,步骤 1 中去除脂肪包括:

(1) 采用静置自然沉降和过滤的方法去除脂肪; 和/或

(2) 采用离心的方法去除脂肪;

所述过滤包括深层过滤和/或囊式滤器过滤。

15 在本发明的一些具体实施方案中,步骤 1 中所述去除蛋白采用溶解蛋白法和/或沉淀蛋白法;

所述溶解蛋白法包括柠檬酸钠溶解法;

所述沉淀蛋白法包括 EDTA 沉淀蛋白法、磷酸钠沉淀蛋白法、硫酸铵沉淀蛋白法中的一种或两者的组合。

20 在本发明的一些具体实施方案中,所述柠檬酸钠溶解法包括如下步骤: 取等体积的牛奶与质量浓度为 2% 的柠檬酸钠溶液混合,冰浴震荡,滤膜过滤。

所述柠檬酸钠溶解法具体为: 将等体积的牛奶倒入质量浓度为 2% 的柠檬酸钠溶液中,摇床冰浴震荡 60min,牛奶样品均变澄清,将澄清的牛奶样品用 0.2 μm 滤膜进行过滤。

25 在本发明的一些具体实施方案中,所述 EDTA 沉淀蛋白法包括如下步骤: 取等体积的牛奶与 EDTA 溶液混合,室温静置,离心,滤膜过滤; 所述 EDTA 溶液的浓度为 0.35M, pH 值为 7.0。

在本发明的一些具体实施方案中,所述柠檬酸钠溶解法具体为: 取等体积的牛奶倒入 EDTA 溶液中,室温沉淀,静置 15min,沉淀后的牛奶样

品 12000rpm, 离心 40min, 接着将上清用 0.45 μm 和 0.2 μm 的滤膜进行过滤。

在本发明的一些具体实施方案中, 所述磷酸钠溶液的浓度为 1M, pH 值为 6.3。

5 在本发明的一些具体实施方案中, 所述磷酸钠沉淀蛋白法包括如下步骤:

不同的牛奶种类, 磷酸钠沉淀蛋白法的具体步骤不相同:

(1) 全脂牛奶

取牛奶于 16000rpm 离心 30min 去除脂肪, 将等体积的牛奶与磷酸钠
10 溶液混合, 搅拌, 沉淀, -80°C 冷冻;

(2) 脱脂牛奶

取牛奶于 16000rpm 离心 30min 去除脂肪, 将等体积的牛奶与磷酸钠溶液混合, 搅拌, 沉淀, 室温静置, 于 3500rpm 离心 10min, 收集上清经滤膜过滤。

15 在本发明的一些具体实施方案中, 所述磷酸钠沉淀蛋白法具体包括如下步骤: 取牛奶 16000rpm, 离心 30min 去除脂肪, 将等体积的牛奶倒入磷酸钠溶液中, 磁力搅拌器 350rpm, 搅拌 15min, 沉淀后的牛奶样品 3500rpm, 离心 10min, 接着将上清依次用 0.8 μm , 0.45 μm 和 0.2 μm 的滤膜进行过滤。

20 在本发明的一些具体实施方案中, 所述硫酸铵沉淀蛋白法包括如下步骤: 取等体积的牛奶与硫酸铵溶液混合, 室温静置, 离心, 滤膜过滤; 所述硫酸铵溶液的浓度为 3.0M。

在本发明的一些具体实施方案中, 所述硫酸铵沉淀蛋白法具体包括如下步骤: 将等体积的牛奶倒入硫酸铵溶液中, 边倒边轻轻用玻璃棒搅拌,
25 室温进行沉淀, 静置 1.5h, 沉淀后的牛奶样品 6000rpm, 离心 20min, 接着将上清依次用 0.8 μm , 0.45 μm 和 0.2 μm 的滤膜进行过滤。

本发明还提供了治疗疾病的方法, 以牛奶外泌体为药物载体, 担载药物施用于动物体。

在本发明的一些具体实施方案中, 所述药物包括蛋白质药物。

-5-

在本发明的一些具体实施方案中，所述药物包括利拉鲁肽。

在本发明的一些具体实施方案中，所述药物的给药途径为口服给药。

在本发明的一些具体实施方案中，所述疾病包括 II 型糖尿病。

5 本发明采用牛奶外泌体作为药物载体，该外泌体来源于牛奶，安全可靠，又具有牛奶外泌体的功能性质，将其作为药物载体，可实现蛋白质药物的口服给药。通过利用牛奶外泌体装载利拉鲁肽，实现利拉鲁肽的口服给药，治疗二型糖尿病。

附图说明

10 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。

图1示 TFF+BE-SEC 和 UC 提取牛奶外泌体工艺路线图；

图2示TEM 下 3 种方法提取的外泌体的形态表现 (Bar=500 nm)
(A: TFF; B: TFF+BE- SEC; C: UC)；

15 图3示3种方法提取外泌体的粒径分布 (A: TFF; B: TFF+BE- SEC; C: UC.)；

图4示3种方法提取牛奶外泌体的 SEC-HPLC 色谱图 (A: TFF; B: TFF+BE- SEC; C: UC.)；

20 图5示超声后的利拉鲁肽溶液 (左，超声后有较多沉淀析出，溶液呈胶体状) 及牛奶外泌体-利拉鲁肽混合液 (右)；

图6示Core700柱子纯化牛奶外泌体超声装载利拉鲁肽样品；

图7示Core700柱子纯化超声处理的利拉鲁肽样品；

图8示QA柱纯化Milk 外泌体和利拉鲁肽超声后样品；

图9示QA柱纯化超声处理的利拉鲁肽样品；

25 图10示超声并过Core700后的利拉鲁肽溶液及外泌体-利拉鲁肽混合液对荧光素酶表达量的影响 (阳性对照均为0.375ug/ml未经超声处理的利拉鲁肽原料药处理组)；

图11示探索利用电转方法实现外泌体转装载PKH67的条件；其中，图11A示不同电压条件下电转PKH67-外泌体混合液(100μF电容)，样品FITC

-6-

阳性率和颗粒浓度；图11B示 500V电压不同电容条件下电转PKH67-外泌体混合液，样品FITC阳性率和颗粒浓度；

图12示Core700柱子纯化牛奶外泌体电穿孔装载利拉鲁肽样品；

图13示Core700柱子纯化电穿孔处理利拉鲁肽样品；

5 图14示电转并过core700后的利拉鲁肽溶液及外泌体-利拉鲁肽混合液对荧光素酶表达量的影响（阳性对照均为0.375ug/ml未经电转处理的利拉鲁肽原料药处理组）；

图15示探索利用孵育方法实现外泌体转装载PKH67的条件；其中，图15A示不同温度条件下孵育PKH67-外泌体混合液（0.5h），样品FITC阳性
10 率和颗粒浓度；图15B示50℃孵育不同时间，样品FITC阳性率和颗粒浓度；

图16示Core700柱子纯化电穿孔处理利拉鲁肽样品；

图17示共孵育并过Core700后的利拉鲁肽溶液及外泌体-利拉鲁肽混合液对荧光素酶表达量的影响（阳性对照均为0.375ug/ml未经共孵育处理的利拉鲁肽原料药处理组）；

15 图18示外泌体装载不同药物的细胞药效；

图19示纳米流式检测灌胃给药不同时间点小鼠血清中阳性外泌体颗粒数；

图20示纳米流式检测舌下给药不同时间点小鼠血清中阳性外泌体颗粒数；

20 图21示小鼠舌下给不同载药的外泌体，1小时后灌胃葡萄糖溶液，检测小鼠血糖的随时间的变化；

图22示小鼠舌下给不同浓度的外泌体-利拉鲁肽，检测小鼠随机血糖随时间的变化；

25 图23示小鼠禁食6小时后，舌下给不同浓度的外泌体-利拉鲁肽，检测小鼠空腹血糖随时间的变化。

具体实施方式

本发明公开了牛奶外泌体在制备药物载体中的应用，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类

-7-

似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

- 5 本发明提供的牛奶外泌体在制备药物载体中的应用中,所用原料及试剂均可由市场购得。

下面结合实施例,进一步阐述本发明:

实施例1 可工业放大的牛外泌体纯化工艺

- 10 1) 采用不同蛋白去除方法对牛奶样品进行预处理

a. EDTA 沉淀蛋白法: 将脱脂牛奶与相同体积、不同浓度、不同 pH 的 EDTA 混合, 室温孵育 15 min, 沉淀酪蛋白。EDTA 的浓度为 $0.15\sim 0.35\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 值为 6.0~8.0。12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 40 min, 上清依次采用 0.80、0.45 和 0.20 μm 滤膜过滤。

- 15 b. 磷酸钠沉淀蛋白法: 在磷酸钠溶液中加入等量的脱脂牛奶。对磷酸钠的浓度和 pH 范围进行几次预实验, 如采用 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 5.3、pH 6.5 和 pH 7.6)、 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 5.2、pH 6.3 和 pH 7.6) 和 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 6.0、pH 7.0 和 pH 8.0) 磷酸钠。4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀蛋白, 沉淀后的上清依次通过 0.80、0.45 和 0.20 μm 滤膜过滤。

- 20 c. 柠檬酸钠溶解蛋白法: 将脱脂乳与等量的 2%、4%、6%、8% 和 16% 的柠檬酸钠混合, 冰上孵育 2 h 溶解酪蛋白, 0.20 μm 滤膜过滤。

2) TFF 法初纯和浓缩牛奶外泌体

- 预处理后的牛奶上清采用相对分子质量为 750 000 的中空纤维柱进行处理。设置系统参数 TMP 最大压力为 2 个大气压, 报警压力为 2 个大气压; 体积: 最小体积为 100 mL, 报警体积为 100 mL。将样品倒入循环杯中, 采用 1 $\times$ PBS 进行置换, 直至透过的蛋白浓度为 $0.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 将杯中的液体继续浓缩到原液的 1/20 收集样品。

3) BE-SEC 和 UC 精纯牛奶外泌体 BE-SEC:

ÄKTA Pure 25 纯化系统采用超纯水进行冲洗, 并连接 HiScreen

Capto Core 700 柱继续采用超纯水冲洗 3 个柱体积，冲洗结束继续采用缓冲液 1×PBS 平衡 3 个柱体积，将初纯样品采用 HiScreen CaptoCore 700 柱进行纯化，流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，收集流穿出峰位置样品，即为牛奶外泌体。

5 实验结果：

如图 1 所示，采用蛋白沉淀的方法获取预处理样品，并采用 TFF 结合 BE-SEC 的纯化方法，获得牛奶外泌体。通过与传统外泌体提取方法——UC 进行对比证明本工艺方法所获的样品得率和纯度更高。

10 如图 2 所示，TFF、BE-SEC 和 UC 提取的外泌体在 TEM 下均能观察到膜结构，呈现出茶托状或圆盘状。但 TEM 下 UC 提取的外泌体拍摄背景较杂，蛋白聚集物较多。蛋白沉淀预处理样品，并采用 TFF 结合 BE-SEC 的纯化方法背景比较干净。

采用 NanoFCM 检测外泌体的颗粒粒径、浓度和纯度的结果如图 3 所示：TFF 获得的外泌体平均粒径为 $(66.92 \pm 16.39) \text{ nm}$ ，得率为 3.6×10^{13} 个颗粒 $\cdot \text{L}^{-1}$ ，纯度为 58%；TFF+BE-SEC 制备的牛奶外泌体直径大小较为集中，为 30~150 nm，外泌体平均粒径为 $(66.41 \pm 15.81) \text{ nm}$ ，得率为 2.5×10^{13} 个颗粒 $\cdot \text{L}^{-1}$ ，纯度为 90%；UC 获得的外泌体平均粒径为 $(68.87 \pm 18.04) \text{ nm}$ ，得率为 2.4×10^{11} 个颗粒 $\cdot \text{L}^{-1}$ ，纯度为 25%。说明 TFF+BE-SEC 制备的外泌体得率更高，纯度更高。

20 如图 4 所示：采用 HPLC 检测外泌体样品中游离蛋白（粒径小于外泌体尺寸）含量。3 种方法提取所得牛奶外泌体中在 TSKgel G6000 PWXL 柱上的保留时间均为 8 min。但 TFF 与 BE-SEC 提取的外泌体样品较 UC 所得样品的杂质峰 ($\text{RT} > 8 \text{ min}$) 比例更小，TFF+BE-SEC 所得终产物更体现为单一峰。

25 采用蛋白沉淀预处理牛奶加上 TFF 结合 BE-SEC 的纯化方法，能获得得率和纯度更高的外泌体样品，更重要的是 TFF 可实现样品从几升至上百升的初纯和浓缩，将 TFF 与 BE-SEC 结合，最终可实现牛奶外泌体的规模制备。

实施例 2 牛奶外泌体载药工艺——超声装载法

原理：由于超声能够打乱膜中脂质链的排列出现暂时性的小孔，因此对外泌体进行低频率的连续超声，声波引起包封空气膨胀，囊泡内压升高达到双分子层的弹性极限，磷脂层出现孔隙，由于膜外药物浓度高，渗透压的差异使得药物通过孔隙向脂质体内扩散。

操作步骤：

利用 PKH67 探索超声装载最优条件：PKH67 与牛奶外泌体室温共孵育 30min 后，细胞破碎仪分别摸索超声功率 150w/300w/450w/600w/800w/1000w/1200w，并探索超声时间 0s/50s/250s/500s/750s/20min/30min/1h/2h/4h/6h。超声后的样品利用 NanoFCM 检测样品颗粒数，及 PKH67 阳性率。根据超声装载优化后条件，探索超声体积，超声后的样品利用 NanoFCM 检测样品颗粒数，粒径及 PKH67 阳性率。

实验结果：

表 1 超声功率和超声时间对外泌体装载阳性率的影响

时 间 功率	0s	50s	250s	500s	750s	20min	30min	1h	2h	4h	6h
0w	5.4%	6.1%	7.2%	8.3%	8.9%	10.3%	10.0%	15.2%	15.4%	27.5%	31.0%
150w	5.4%	8.6%	23.5%	31.4%	31.9%	40.3%	47.6%	45.5%	48.3%	50.1%	50.6%
300w	5.4%	9.7%	12.1%	19.3%	35.0%	33.6%	50.6%	45.1%	48.3%	58.0%	52.7%
450w	5.4%	15.8%	31.2%	60.2%	54.6%	44.5%	63.3%	74.3%	76.1%	75.9%	79.1%
600w	5.4%	15.4%	67.6%	77.6%	76.1%	78.1%	76.5%	78.6%	85.6%	74.1%	78.7%
800w	5.4%	30.0%	65.5%	78.1%	78.4%	75.4%	80.4%	79.3%	78.0%	80.1%	80.0%
1000w	5.4%	42.2%	64.8%	77.3%	77.2%	80.4%	87.8%	80.0%	85.7%	81.2%	88.1%
1200w	5.4%	41.0%	66.3%	77.5%	78.9%	75.5%	75.4%	88.7%	88.3%	85.0%	87.5%

表 2 超声功率和超声时间对外泌体颗粒数 (10¹⁰particals/mL) 的影响

时间 功率	0s	50s	250s	500s	750s	20min	30min	1h	2h	4h	6h
0w	7.39	7.90	7.68	7.21	6.56	6.43	5.88	6.31	5.21	5.10	4.52
150w	7.39	6.77	7.33	6.88	6.21	6.07	6.22	5.77	5.48	5.09	4.71
300w	7.39	6.53	7.08	7.01	6.38	6.37	6.11	6.41	5.88	4.87	5.00
450w	7.39	7.01	6.81	6.55	4.56	5.21	5.43	6.01	4.78	4.45	4.03
600w	7.39	5.91	5.99	5.76	3.80	3.90	4.01	3.54	3.48	3.61	3.67
800w	7.39	5.90	6.42	5.87	4.22	5.11	4.63	4.37	3.71	3.31	3.44
1000w	7.39	6.44	6.53	6.11	5.89	5.33	5.41	3.51	2.69	2.24	2.30
1200w	7.39	6.54	7.11	6.38	6.67	7.31	6.06	2.67	3.08	2.87	2.01

表 3 不同超声体积对外泌体装载的影响 (600w 超声 500s)

超声体积 (ml)	阳性率 (%)	颗粒浓度 (10 ¹⁰ particals/mL)
3	77.8	5.23
10	75.3	5.60
50	80.1	4.85
100	78.1	5.08
200	75.6	4.66
500	74.7	4.97

不同功率超声后外泌体装载效率有很大区别，超声后阳性率在 5%-90%之间；450W-1200W 功率，超声时间超过 20min，装载效率差距不明显，基本稳定在 80%左右。随着超声时间延长，颗粒数有所下降。且可实现 3ml-500ml 体系的装载规模,装载后颗粒数和装载阳性率比较稳定。

超声装载利拉鲁肽:

按照 1 × 10¹¹ 个外泌体颗粒与 5mg 利拉鲁肽的比例混合，进行超声，超声后用 Core700 或 QA 柱进行纯化，超声前后溶液状态有明显变化，如

图 5 所示：超声后的利拉鲁肽溶液（左，超声后有较多沉淀析出，溶液呈胶体状）及牛奶外泌体-利拉鲁肽混合液（右）。

取利拉鲁肽 25mg，及利拉鲁肽 25mg 与 5×10^{11} 个外泌体颗粒混合液超声，超声后过 Core700，收集流穿。结果如图 6~7 所示，5mL Core700 色谱柱，收集进样开始后 2-4mL 的流穿样品，此部分为装载利拉鲁肽的外泌体颗粒，游离利拉鲁肽吸附在色谱柱上，进而洗脱被去除。

取利拉鲁肽 250mg，及利拉鲁肽 250mg 与 5×10^{12} 个外泌体颗粒混合，超声，超声后经 QA 柱纯化，收集流穿和洗脱各组分样品。结果如图 8~9 所示，装载利拉鲁肽的外泌体和游离利拉鲁肽根据带电荷量的差异，在不同盐浓度分别被洗脱。

接种 GLP-1R-CHO 细胞至 96 孔板，细胞培养 24h 后，将培养基更换为含有空白牛奶外泌体，或 $10^5/\text{mL}$, $10^6/\text{mL}$, $10^7/\text{mL}$, $10^8/\text{mL}$, $10^9/\text{mL}$, $10^{10}/\text{mL}$ 的 milk-外泌体-liraglutide，以及对对应颗粒浓度的利拉鲁肽溶液培养 5h。收样按照荧光素酶试剂盒说明书进行收样，没孔加入 100ul 细胞裂解液进行裂解细胞，裂解 5min，收集细胞裂解液用 1200rpm，离心 5min，然后加入底物（孵育 5min）然后用酶标仪进行检测荧光。结果如图 10 和表 4 所示。

表 4

	外泌体-利拉鲁肽_Core700			利拉鲁肽(超声处理)_Core700		
空白	20617	19685	22845	19513	20557	21774
阳性对照	160126	161819	164485	166442	168105	182139
空白外泌体	21244	24053	24830	22927	25572	26806
1×10^{10}	117775	129093	137324	23620	23463	23987
1×10^9	49581	52138	56060	22659	23782	25679
1×10^8	24063	25156	24889	24413	23676	23367
1×10^7	20066	20339	22143	23953	23706	24012
1×10^6	17023	18083	20867	22732	22735	22400
1×10^5	18999	17390	18551	17634	17430	21039

实验结论：从原料药与牛奶外泌体-利拉鲁肽混合液超声后的液体形

- 12 -

状对比看出,在含有外泌体的时候,利拉鲁肽不会析出,而是负载到外泌体上。牛奶外泌体-利拉鲁肽混合液超声后,经过 QA 纯化,色谱图显示超声装载后样品在高盐洗脱中(电导率 70.44 Ms/cm) A260/A280 吸收比例提高至 1.88,外泌体经超声后双层膜被打破,此处为释放出的核酸内容物的吸收峰,超声时间延长后外泌体颗粒数有所下降。在经过 core700 或 QA 纯化后,按比例稀释给药处理细胞,能看到检测的荧光素酶表达情况呈剂量依赖。 1×10^{10} 颗粒数牛奶外泌体-外泌体-利拉鲁肽处理细胞,显著提高细胞荧光素酶的表达量,说明实现了牛奶外泌体对利拉鲁肽的装载,并且仍具有生物活性。

10

实施例 3 牛奶外泌体载药工艺——电穿孔法

原理:电穿孔是微生物学技术,其中将电场施加到细胞以增加细胞膜的渗透性,从而允许化学品,药物或 DNA 被引入细胞。

操作步骤:

15 利用 PKH67 探索电穿孔装载药物最优条件:PKH67 与牛奶外泌体室温共孵育 30min 后,电穿孔仪按电压 100-500v,电容 100-500uF 进行实。电转后的样品利用 NanoFCM 检测样品颗粒数,粒径及 PKH67 阳性率。

取利拉鲁肽 25mg,及利拉鲁肽 25mg 与 5×10^{11} 个外泌体颗粒混合液进行电转,电转后过 core700 除去游离的利拉鲁肽,收集流穿。

20 接种 GLP-1R-CHO 细胞至 96 孔板,细胞培养 24h 后,将培养基更换为含有空白牛奶外泌体,或 $10^5/\text{mL}$, $10^6/\text{mL}$, $10^7/\text{mL}$, $10^8/\text{mL}$, $10^9/\text{mL}$, $10^{10}/\text{mL}$ 的 milk-外泌体-liraglutide,以及对应颗粒浓度的利拉鲁肽溶液培养 5h。收样按照荧光素酶试剂盒说明书进行收样,没孔加入 100ul 细胞裂解液进行裂解细胞,裂解 5min, 25 收集细胞裂解液用 1200rpm,离心 5min,然后加入底物(孵育 5min)然后用酶标仪进行检测荧光。

实验结果如图 11~14、表 5~7 所示:

表 5 电压对外泌体装载的影响

电压 V	阳性率%	浓度 颗粒数 × 10 ¹⁰ /mL
0	7.12	8.55
100	8.2	2.8
200	28.5	2.52
300	39	2.26
400	62.9	1.56
500	59.5	2.14

表 6 电容对外泌体装载的影响

电容 uF	阳性率%	浓度 颗粒数 × 10 ¹⁰ /mL
0	6.35	8.55
100	46.8	3.2
200	51.8	3.78
300	71.2	2.78
400	69.8	2.96
500	57.1	2.11

5

表 7

	外泌体-利拉鲁肽_Core700			利拉鲁肽(电穿孔)_Core700		
空白	16617	15685	21845	17513	18557	19774
阳性对照	170126	131819	144485	196442	128105	122139
空白外泌体	18244	20053	24830	22927	18572	20806
1 × 10 ¹⁰	97775	92093	87324	20620	20463	20987
1 × 10 ⁹	50581	42138	46060	21659	22782	18679
1 × 10 ⁸	22063	22156	22889	19413	18676	20367
1 × 10 ⁷	20066	20339	22143	23953	23706	24012
1 × 10 ⁶	17023	18083	20867	22732	22735	22400
1 × 10 ⁵	18999	17390	18551	17634	17430	21039

实施例 4 牛奶外泌体载药工艺——共孵育法

原理：利用物质间的相互作用力，使得药物吸附在药物载体上。

操作步骤：

利用 PKH67 探索共孵育装载药物最优条件：PKH67 与牛奶外泌体室
5 温共孵育 30min 后，样品置于 4℃，37℃，50℃共孵育 30min，1h，2h，
500rpm 摇晃。共孵育后的样品利用 NanoFCM 检测样品颗粒数，粒径及
PKH67 阳性率。

取利拉鲁肽 25mg，及利拉鲁肽 25mg 与 5×10^{11} 个外泌体颗粒混合液
进行共孵育共孵育后的样品过 Core700 除去游离的利拉鲁肽，收集流穿。

10 接种 GLP-1R-CHO 细胞至 96 孔板，细胞培养 24h 后，将培养基
更换为含有空白牛奶外泌体，或
10⁵/mL,10⁶/mL,10⁷/mL,10⁸/mL,10⁹/mL,10¹⁰/mL 的 milk-外泌体-liraglutide，
以及对应颗粒浓度的利拉鲁肽溶液培养 5h。收样按照荧光素酶试剂盒说
15 明书进行收样，没孔加入 100ul 细胞裂解液进行裂解细胞，裂解 5min，
收集细胞裂解液用 1200rpm，离心 5min，然后加入底物（孵育 5min）然
后用酶标仪进行检测荧光。

实验结果如图 14~17、表 8~10 所示。

表 8 孵育温度对外泌体装载的影响

温度	阳性率%	浓度 颗粒数 × 10 ¹⁰ /mL
4℃	7.12	8.55
37℃	8.2	3.18
42℃	28.5	3.32
50℃	49	3.26
60℃	22.9	1.56

表 9 孵育时长对外泌体装载的影响

时长	阳性率%	浓度 颗粒数 × 10 ¹⁰ /mL
0.5h	32.1	3.6
1h	46.8	3.78
2h	29.8	3.78

— 15 —

4h	21.2	2.78
8h	9.8	1.96

表 10 共孵育法细胞药效

	外泌体-利拉鲁肽_Core700			利拉鲁肽(孵育)_Core700		
空白	16617	15685	21845	17513	18557	19774
阳性对照	190126	131819	144485	156442	128105	122139
空白外泌体	18244	20053	24830	22927	18572	20806
1×10^{10}	77775	72093	87324	14620	15463	13987
1×10^9	40581	32138	46060	11659	12782	11679
1×10^8	12063	12156	12889	9413	8676	80367
1×10^7	10066	10339	12143	7953	7306	74012
1×10^6	7023	8083	7867	5732	6735	6400
1×10^5	6999	7390	6551	4634	5430	4039

实验结论：在经过 core700 纯化后，按比例稀释给药处理细胞，能看到检测的荧光素酶表达情况呈剂量依赖。 1×10^{10} 颗粒数牛奶外泌体-外泌体-利拉鲁肽处理细胞，显著提高细胞荧光素酶的表达量，说明实现了牛奶外泌体对利拉鲁肽的装载，并且仍具有生物活性。

实施例 5 牛奶外泌体装载不同 T2DM 药物

目前，市面上具有多种治疗二型糖尿病（ type 2 diabetes mellitus，T2DM）的药物，如德谷胰岛素，地特胰岛素，利拉鲁肽，索马鲁肽，以及已在国外上市的 Tirzepatide。本发明实现了牛奶外泌体装载不同的 T2DM 药物，从而可将这些药物的给药方式从注射该为口服，解决市面上无口服糖尿病药物的困境。

操作：

- 1) 根据 4.2 介绍的牛奶外泌体的载药方式，选择电穿孔方法，利用牛奶外泌体分别装载德谷胰岛素，地特胰岛素，利拉鲁肽，索马鲁肽，Tirzepatide，并经过 core700 柱纯化；
- 2) 接种 GLP-1R-CHO 细胞至 96 孔板，细胞培养 24h 后，将培养基更换为含有空白牛奶外泌体，或

10⁵/mL,10⁶/mL,10⁷/mL,10⁸/mL,10⁹/mL,10¹⁰/mL 的装载不同药物的牛奶外泌体,,培养 5h.收样按照荧光素酶试剂盒说明书进行收样,没孔加入 100ul 细胞裂解液进行裂解细胞,裂解 5min,收集细胞裂解液用 1200rpm,离心 5min,然后加入底物(孵育 5min)然后用酶标仪进行检测荧光。

5 实验结果如图 18、表 11 所示:

表 11 外泌体装载不同药物的细胞药效

	外泌体-利拉鲁肽			外泌体-Tirzepatide			外泌体-索马鲁肽		
空白	16617	15685	21845	17513	18557	19774	20617	19685	22845
阳性对照	170126	171819	144485	206442	208105	212139	160126	161819	164485
空白外泌体	23244	24053	24830	22927	26572	20806	21244	24053	24830
1 × 10 ¹⁰	97775	92093	87324	110620	110463	120987	97775	99093	87324
1 × 10 ⁹	50581	42138	46060	51659	52782	58679	49581	52138	56060
1 × 10 ⁸	22063	22156	22889	19413	18676	20367	24063	25156	24889
1 × 10 ⁷	20066	20339	22143	23953	23706	24012	20066	20339	22143
1 × 10 ⁶	17023	18083	20867	22732	22735	22400	17023	18083	20867
1 × 10 ⁵	18999	17390	18551	17634	17430	21039	18999	17390	18551

实验结论:

从结果上看,负载不同药物的牛奶外泌体均能使细胞释放 GLP,并且具剂量依赖性。说明本发明能实现对不同类型的蛋白多肽类药物的装

10 载。

实施例 6 牛奶外泌体舌下给药

原理: 本发明利用舌下粘膜未角质化,毛细血管丰富,血流速度快的特点,针对牛奶外泌体经过胃肠道易被胃酸破坏,导致装载的药物生物利

15 用度低,以及利拉鲁肽口服会被降解等问题,将装载利拉鲁肽的牛奶外泌体制成舌下片,实现利拉鲁肽口服给药,并且可通过舌下粘膜吸收,通过颈静脉和上腔静脉直接进入血液循环,起效迅速;并且服药时无需用水,置于舌下含化,服用方便,口感好。

实验操作:

- 17 -

A. 将 PKH67 标记的牛奶外泌体，分别尝试灌胃，舌下给药，以及制备肠溶胶囊给药；

B. 给药后，采集不同时间点的小鼠血液，利用纳米流式检测血液中的阳性颗粒数，确定外泌体的入血吸收效果。

5 结果如图 19~20、表 12~14 所示：

表 12 灌胃给药数据

给药方式	阳性颗粒数					
PBS	8.70×10^7	1.74×10^7	6.46×10^7	3.57×10^7	4.29×10^7	6.83×10^7
PKH67-15min	3.30×10^8	2.44×10^8	2.01×10^8	2.09×10^8	3.04×10^8	9.87×10^7
尾静脉	1.68×10^{11}	2.34×10^{11}	2.12×10^{11}	1.98×10^{11}	2.01×10^{11}	2.05×10^{11}
5min	1.85×10^9	2.32×10^9	1.94×10^9	2.05×10^9	1.77×10^9	2.11×10^9
15min	7.48×10^8	3.66×10^8	6.96×10^8	4.87×10^8	6.12×10^8	5.34×10^8
30min	4.00×10^8	2.62×10^8	1.57×10^8	3.56×10^8	1.22×10^8	3.19×10^8
45min	3.30×10^8	2.26×10^8	1.22×10^8	2.98×10^8	3.09×10^8	1.78×10^8
1h	2.44×10^8	2.08×10^8	1.74×10^8	1.35×10^8	9.98×10^7	2.04×10^8
2h	1.57×10^8	2.78×10^8	1.39×10^8	1.34×10^8	1.24×10^8	8.99×10^7
4h	1.39×10^8	1.04×10^8	1.57×10^8	1.02×10^8	1.11×10^8	8.34×10^7

表 13 舌下给药数据

给药方式	阳性颗粒数					
PBS	6.60×10^7	6.60×10^7	5.89×10^7	6.01×10^7	5.46×10^7	5.28×10^7
尾静脉	2.60×10^{11}	2.30×10^{11}	2.45×10^{11}	1.98×10^{11}	2.45×10^{11}	2.19×10^{11}
30min	7.88×10^9	5.78×10^9	6.56×10^9	2.89×10^{10}	4.02×10^{10}	3.27×10^{10}
1h	3.50×10^9	5.08×10^9	1.04×10^9	7.54×10^8	4.78×10^9	1.67×10^9
2h	1.11×10^9	5.36×10^8	8.97×10^8	7.29×10^8	1.02×10^9	6.92×10^8
4h	4.26×10^8	4.72×10^8	4.72×10^8	6.30×10^8	2.78×10^9	3.10×10^9

表 14 肠溶胶囊数据

	mean	SD
0min	4.58×10^7	2.67×10^7
30min	6.10×10^7	1.89×10^7
1h	1.53×10^7	9.87×10^6
2h	1.53×10^7	8.22×10^6
3h	3.05×10^7	1.24×10^7
4h	6.86×10^7	2.78×10^7
5h	1.30×10^8	9.18×10^6
8h	1.53×10^7	7.35×10^6
22h	9.92×10^7	3.22×10^7

通过灌胃给小鼠 PKH67 标记的牛奶外泌体，不同时间点采集血液检测阳性颗粒，每只小鼠灌胃 4×10^{11} 颗粒，5min 时检测到颗粒最高，小鼠血液中检测到 2×10^9 阳性颗粒，因此，相当于有 0.5% 的外泌体进入到了血液。当舌下给 PKH67 标记的牛奶外泌体时，5min 检测到的阳性颗粒数最多，约为 2×10^{10} 阳性颗粒，相当于有 5% 的外泌体进入到了血液。而尝试肠溶胶囊给药，在小鼠血液中，给药组的阳性颗粒数并未显著增加。因此，舌下给药的生物利用度明显高于灌胃给药的生物利用度。

10 实施例 7 牛奶外泌体舌下片剂

实验操作：装载利拉鲁肽的牛奶外泌体冻干粉，与崩解剂，填充剂，粘合剂，润滑剂，矫味剂混合后，制备成舌下片。每 1000 片利拉鲁肽牛奶外泌体舌下片中，主药的含量为 10^5 - 10^{17} 颗粒数，崩解剂的含量为 1-50g，填充剂的含量为 20-400g；矫味剂 0-50g，粘合剂 5-100g，润滑剂 1g-10g；

所选用的崩解剂：微晶纤维素，交联羧甲基纤维素钠，交联聚乙烯吡咯烷酮，羧甲基淀粉钠，低取代羟丙基纤维素，淀粉，吐温，十二烷基硫酸钠中的仍一种或两种以上的混合物；

所选用的填充剂：微晶纤维素，微晶纤维素-甘露醇，微晶纤维素-微

-19-

粉硅胶，乳糖，淀粉，改性淀粉，甘露醇，山梨醇，木糖醇，赤藓糖，海藻糖，预胶化淀粉，糖粉，葡萄糖，糊精，硫酸钙中的任一种或两种以上的混合物。

所选用矫味剂：甜菊甙，糖粉，甘草甜素，阿司帕坦，三氯蔗糖，甜蜜素，索马甜，糖精等一种或两种以上的混合物。

所选用的粘合剂：纯化水，淀粉浆，羟丙基甲基纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，卡波姆，糊精，明胶浆，阿拉伯胶浆，海藻酸钠和糖浆中的一种或两种以上的混合物。

所用润滑剂：硬脂酸，硬脂酸镁，硬脂酸钙，微粉硅胶，滑石粉，氢化植物油，聚乙二醇 4000，聚乙二醇 6000，十二烷基硫酸钠，十二万级硫酸镁，富马酸硬脂酸钠中的任一种或两种以上的混合物。

最优配方如下： 1×10^{15} 颗粒外泌体-利拉鲁肽，4g 交联羧甲基纤维素钠，80g 甘露醇，25g 纯化水，3.5g 硬脂酸镁，按下述制备步骤进行制备

制备步骤如下：

15 第一步：将所述的主药冷冻干燥，过筛 80-120 目；

第二步：将填充剂，崩解剂，矫味剂，润滑剂烘干，粉碎，过筛 80-120 目预处理；

第三步：将预处理的主药，填充剂，矫味剂和崩解剂混合均匀；

第四步：将粘合剂加入混匀的上述无聊中，制成软材，制粒，干燥；

20 第五步：干颗粒加入润滑剂混匀，再进行压片得到成品。

实施例 8

将 1×10^{13} 颗粒数主药利拉鲁肽牛奶外泌体加入甘露醇 0.6g，冷冻干燥后，与填充剂 55g 微晶纤维素，1g 崩解剂羧甲基纤维素钠，1g 润滑剂硬脂酸镁进行烘干，粉碎，过筛混合，制成软材，用 20 目网筛制粒，并风干至水分 $\leq 3\%$ ，再加入润滑剂，进行总混，最后压片得到利拉鲁肽牛奶外泌体舌下片。

实施例 9

实验操作:

采用电穿孔方法, 将德谷胰岛素, 地特胰岛素, 利拉鲁肽, 索马鲁肽, Tirzepatide 装载到牛奶外泌体并进行纯化, 获得载药外泌体, 并按照上述
5 制剂配方制备舌下片;

每只小鼠舌下给药 1×10^{11} 颗粒数的舌下片, 注射葡萄糖后, 检测小鼠对糖耐受效果。

结果如图 21、表 15 所示:

表 15

Time (min)	-60	0	15	30	60	120
Vehicle	80	81	431	398	298	199
	83	85	452	382	301	203
	87	85	403	401	265	217
外泌体-利拉鲁肽	87	88	135	121	110	100
	82	86	146	135	109	102
	85	81	132	129	101	90
外泌体-Tirzepatide	91	93	101	99	95	93
	87	81	110	97	94	90
	89	84	109	98	92	88
外泌体-索马鲁肽	92	89	129	112	109	98
	91	93	137	130	110	95
	86	83	140	129	103	100
外泌体-地特胰岛素	86	88	139	120	106	90
	83	89	125	111	103	92
	82	80	131	109	101	95
外泌体-德谷胰岛素	88	81	135	121	107	95
	89	84	126	114	102	93
	81	89	139	117	109	90
外泌体-胰岛素	83	89	155	141	120	116

— 21 —

	81	88	189	139	126	120
	89	85	167	129	118	111

结果分析:

通过利用牛奶外泌体，可实现多种降血糖药物的装载。载药的外泌体通过口服给药，能够在 15min 内实现明显的降血糖效果。并且能够维持血糖的稳定，提高小鼠对糖的耐受反应。

5

实施例 10

采用电穿孔方法，将利拉鲁肽（不限于利拉鲁肽，也包括德谷胰岛素，地特胰岛素，索马鲁肽，Tirzepatide）装载到牛奶外泌体并进行纯化，获得载药外泌体，并按舌下片最优配方制备舌下片，此处以装载利拉鲁肽的牛奶外泌体的结果为例进行说明。

10

糖尿病小鼠舌下给不同浓度的装载利拉鲁肽的牛奶外泌体，检测小鼠的随机血糖。

结果如图 22、表 16 所示:

表 16

min	Blank									
0	277	245	288	266	329	312	289	287	290	321
30	302	282	340	299	340	340	323	319	307	285
60	215	234	265	221	298	284	290	290	279	320
120	194	194	238	213	259	251	283	283	261	266
150	210	219	253	220	223	225	275	274	281	272
180	225	211	327	340	298	291	284	284	273	297
210	235	267	262	273	320	322	296	291	286	279
240	306	259	243	249	299	316	314	316	307	309
300	169	150	296	255	320	303	340	333	320	286
min	1.5 × 10 ⁸ particles/只									
0	212	213	251	252	277	277	281	284	332	330
30	303	340	238	269	209	192	239	233	302	282

— 22 —

60	245	263	282	252	232	217	250	224	290	279
120	208	229	259	257	210	225	251	307	259	274
150	167	160	276	276	215	198	236	225	261	270
180	190	220	291	289	225	258	183	233	269	269
210	214	192	287	301	212	201	182	174	274	284
240	246	204	269	300	276	249	166	155	279	290
300	239	235	279	286	212	273	193	197	291	286
min	1.5×10^{10} particles/只									
0	298	254	271	253	292	281	299	274	310	302
30	340	333	166	156	258	272	198	176	192	192
60	207	205	75	78	197	169	89	82	179	189
120	209	199	95	91	212	210	187	285	192	196
150	188	190	166	186	220	240	219	211	227	219
180	191	194	151	165	218	232	229	221	231	228
210	237	219	162	156	221	229	235	230	239	239
240	226	175	211	199	229	231	239	231	228	240
300	221	202	209	206	237	230	238	229	242	241
min	1.5×10^{12} particles/只									
0	284	271	283	294	277	245	238	226	231	233
30	115	118	151	158	246	282	105	85	94	83
60	125	113	116	126	215	234	85	104	90	71
120	124	138	137	138	194	194	115	118	56	58
150	133	130	149	121	210	219	129	135	39	44
180	151	161	181	143	155	151	176	169	162	156
210	216	218	194	197	195	207	194	194	176	197
240	222	226	174	154	176	199	194	196	188	197
300	229	207	209	204	179	210	195	193	202	204

结论：从随机血糖的结果上看，装载利拉鲁肽的外泌体能明显降低血糖。

实施例 11

采用电穿孔方法，将利拉鲁肽（不限于利拉鲁肽，也包括德谷胰岛素，地特胰岛素，索马鲁肽，Tirzepatide）装载到牛奶外泌体并进行纯化，获得载药外泌体，并制备舌下片，此处以装载利拉鲁肽的牛奶外泌体的结果
5 为例进行说明；

糖尿病小鼠禁食 6h 后，口腔给不同浓度的装载利拉鲁肽的牛奶外泌体，检测小鼠的空腹血糖。

结果如图 23、表 17 所示：

表 17

h	blank									
0	448.2	390.6	342	284.4	433.8	435.6	462.6	441	342	351
0.25	457.2	439.2	423	473.4	468	522	525.6	570.6	466.2	487.8
0.5	460.8	392.4	399.6	361.8	459	451.8	599.4	585	473.4	495
1	612	612	374.4	421.2	493.2	486	612	612	486	495
2	612	612	365.4	342	480.6	473.4	428.4	403.2	451.8	466.2
3	430.2	376.2	448.2	478.8	612	586.8	493.2	451.8	388.8	361.8
4	504	444.6	376.2	381.6	522	568.8	363.6	401.4	322.2	313.2
5	338.4	329.4	493.2	459	531	495	376.2	340.2	259.2	246.6
6	612	545.4	329.4	309.6	388.8	322.2	379.8	354.6	327.6	298.8
h	i.v. 1.5 × 10 ¹⁰ particles/只									
0	594	525.6	331.2	342	448.2	466.2	518.4	502.2	421.2	392.4
0.25	450	424.8	241.2	282.6	385.2	424.8	480.6	466.2	277.2	277.2
0.5	361.8	419.4	259.2	194.4	338.4	334.8	428.4	446.4	160.2	190.8
1	196.2	235.8	111.6	109.8	230.4	264.6	450	457.2	127.8	117
2	122.4	108	82.8	82.8	253.8	257.4	417.6	415.8	142.2	126
3	64.8	73.8	66.6	55.8	88.2	90	419.4	417.6	72	86.4
4	55.8	37.8	50.4	45	45	48.6	399.6	370.8	52.2	52.2

— 24 —

5	50.4	45	50.4	55.8	36	36	279	271.8	54	55.8
6	54	43.2	59.4	57.6	34.2	32.4	212.4	230.4	41.4	36
h	Oral 1.5×10^{12} particles/只									
0	502.2	428.4	352.8	351	414	451.8	435.6	471.6	351	423
0.25	516.6	599.4	558	504	532.8	612	612	576	612	612
0.5	511.2	487.8	379.8	437.4	496.8	453.6	457.2	466.2	428.4	365.4
1	612	594	180	216	329.4	300.6	257.4	244.8	228.6	223.2
2	457.2	462.6	151.2	135	210.6	271.8	262.8	210.6	257.4	226.8
3	417.6	498.6	120.6	115.2	241.2	235.8	196.2	153	185.4	199.8
4	462.6	493.2	95.4	88.2	196.2	136.8	192.6	169.2	163.8	169.2
5	336.6	347.4	73.8	66.6	118.8	108	95.4	106.2	154.8	160.2
6	286.2	316.8	77.4	64.8	70.2	73.8	100.8	90	169.2	156.6
h	Oral 1.5×10^{10} particles/只									
0	462.6	428.4	469.8	428.4	415.8	369	426.6	482.4	324	273.6
0.25	612	612	450	451.8	612	576	540	532.8	318.6	356.4
0.5	318.6	284.4	417.6	426.6	612	612	500.4	477	315	396
1	552.6	592.2	379.8	372.6	426.6	469.8	612	581.4	388.8	385.2
2	570.6	581.4	354.6	336.6	612	590.4	552.6	500.4	266.4	250.2
3	487.8	415.8	475.2	480.6	592.2	554.4	367.2	383.4	158.4	145.8
4	577.8	583.2	221.4	266.4	612	612	273.6	288	154.8	149.4
5	455.4	432	358.2	295.2	532.8	538.2	304.2	279	135	133.2
6	594	612	612	612	349.2	410.4	468	482.4	153	151.2

结论: 从空腹血糖的结果上看, 装载利拉鲁肽的外泌体能明显降低血糖。

以上对本发明所提供的牛奶外泌体在制备药物载体中的应用进行了详细介绍。本文应用了具体个例对本发明的原理及实施方式进行了阐述，以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出，对于本技术领域技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

10

15

权 利 要 求

- 1、牛奶外泌体在制备药物载体中的应用。
- 2、如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述药物包括蛋白质药
5 物。
- 3、如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于，所述药物包括利拉
鲁肽。
- 4、牛奶外泌体作为药物载体在制备预防和/或治疗疾病的药物中的应
用。
- 10 5、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述药物包括蛋白质药
物。
- 6、如权利要求 4 或 5 所述的应用，其特征在于，所述药物包括利拉
鲁肽。
- 7、如权利要求 4 至 6 任一项所述的应用，其特征在于，所述药物的
15 给药途径为口服给药。
- 8、如权利要求 4 至 7 任一项所述的应用，其特征在于，所述疾病包
括 II 型糖尿病。
- 9、口服药物，其特征在于，包括有效成分和作为药物载体的牛奶外
泌体。
- 20 10、如权利要求 1~8 任一项所述的应用或如权利要求 9 所述的口服
药物，其特征在于，所述牛奶外泌体的制备方法，包括如下步骤：
步骤 1、前处理；
步骤 2、初步纯化、浓缩；
步骤 3、精纯；
25 所述前处理包括去除脂肪和/或去除蛋白；
所述初步纯化、浓缩采用切向流超滤；
所述精纯包括 CIMmultus QA 柱纯化、Capto core700 柱纯化、S400
分子筛色谱法纯化中的一种或两者以上的组合。
- 11、治疗疾病的方法，其特征在于，以牛奶外泌体为药物载体，担载

— 27 —

药物施用于动物体。

12、如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述药物包括蛋白质药物。

13、如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述药物包括利拉鲁肽。
5

14、如权利要求 11 至 13 任一项所述的方法，其特征在于，所述药物的给药途径为口服给药。

15、如权利要求 11 至 14 任一项所述的方法，其特征在于，所述疾病包括 II 型糖尿病。

10