

外泌体作为药物递送载体的研究进展

居怡, SERAG Amani Hamood Ali, 施戈韬, 高博*

(上海宇玫博生物科技有限公司, 上海 201318)

[摘要] 外泌体是一种由细胞主动分泌的纳米级脂质双层囊泡, 其腔内或脂质双分子层中包裹着蛋白质、脂质和核酸等多种生物成分。外泌体具有低免疫原性、高物理化学稳定性、高组织穿透能力, 以及先天的运输能力, 因此有望成为一类新型的药物递送载体。目前, 外泌体作为药物递送载体的研究已取得了可喜的进展, 有关外泌体分离以及提高其药物负载和递送效率的新方法不断涌现。然而, 仍有许多困难制约了外泌体的临床应用。综述了外泌体作为药物递送载体的研究进展, 对外泌体大规模生产和纯化中的技术难点进行了分析, 并总结了外泌体用于药物递送的法规问题。

[关键词] 外泌体; 药物递送载体; 临床试验; 规模化生产

[中图分类号] R94

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2023) 11-0804-13

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2023.11.002

Research Progress of Exosomes as Drug Delivery Carriers

JU Yi, SERAG Amani Hamood Ali, SHI Getao, GAO Bo

(Umibio (Shanghai) Co. Ltd., Shanghai 201318, China)

[Abstract] Exosomes are nanoscale lipid bilayer vesicles actively secreted by cells. Different biological components such as proteins, lipids and nucleic acids are encapsulated in the cavity or lipid bilayer of exosomes. Exosomes exhibit low immunogenicity, high physicochemical stability, high tissue penetration ability, and innate transport ability, so they are expected to become a new class of drug delivery carriers. The research on exosomes as drug delivery carriers has seen significant progress. The novel methods for isolating exosomes and improving their drug loading and delivery efficiency are constantly emerging. However, there are still many difficulties restricting the clinical application of exosomes. This article reviews the research progress of exosomes as drug delivery carriers, analyzes the technical difficulties in the large-scale production and purification of exosomes, and summarizes the regulatory concerns for the use of exosomes in drug delivery.

[Key words] exosome; drug delivery carrier; clinical trial; scale production

1 外泌体简介

细胞外囊泡 (extracellular vesicle, EV), 根据大小、功能、来源的不同, 可分为3种类型: 外泌体、微囊泡和凋亡小体^[1]。外泌体是多囊泡体与细胞膜融合后分泌的直径为30~150 nm的EV, 微囊泡是细胞膜通过出芽直接脱落的直径为100~1 000 nm的EV, 凋亡小体是细胞在凋亡过程中释放的直径为50~5 000 nm的EV。EV是由大多数细胞通过多种机制形成的异质性细胞衍生囊泡。EV通过多种体液 (如血液、淋巴液、唾液、脑脊液、尿液、乳汁和支气管肺泡灌洗液) 向相应的靶细胞传递生物信号, 这些信号包括各种非编码RNA、编码RNA、DNA链、

蛋白质和脂质^[2]。

EV作为疾病的生物标志物和药物递送载体备受关注, 这种关注主要集中在EV的一种重要亚型——外泌体^[3]。检测外泌体标志物能够实时动态地反映患者的疾病状态, 因此在疾病的早期筛查、无创诊断、疗效监控、辅助用药等领域有着广阔的应用前景^[4]。此外, 外泌体作为药物的潜在载体, 在肿瘤等疾病的治疗中也展现出巨大的潜力。然而, 在粒径范围、内含物类型和生物学功能等方面, EV亚群存在不同程度的重叠与区别。迄今为止, 外泌体的分离方法尚无公认的“金标准”。由于技术的限制, 无论采用何种方法, 都无法将外泌体与其他EV亚群彻底分离, 因此, 目前在递送载体方面的研究和应用中, 外泌体常与其他EV亚群混合使用。

哺乳动物和植物细胞均能产生外泌体。外泌体是一个具有高度异质性的群体, 其异质性表现在多

接受日期: 2023-09-08

*** 通信作者:** 高博, 博士, CEO;

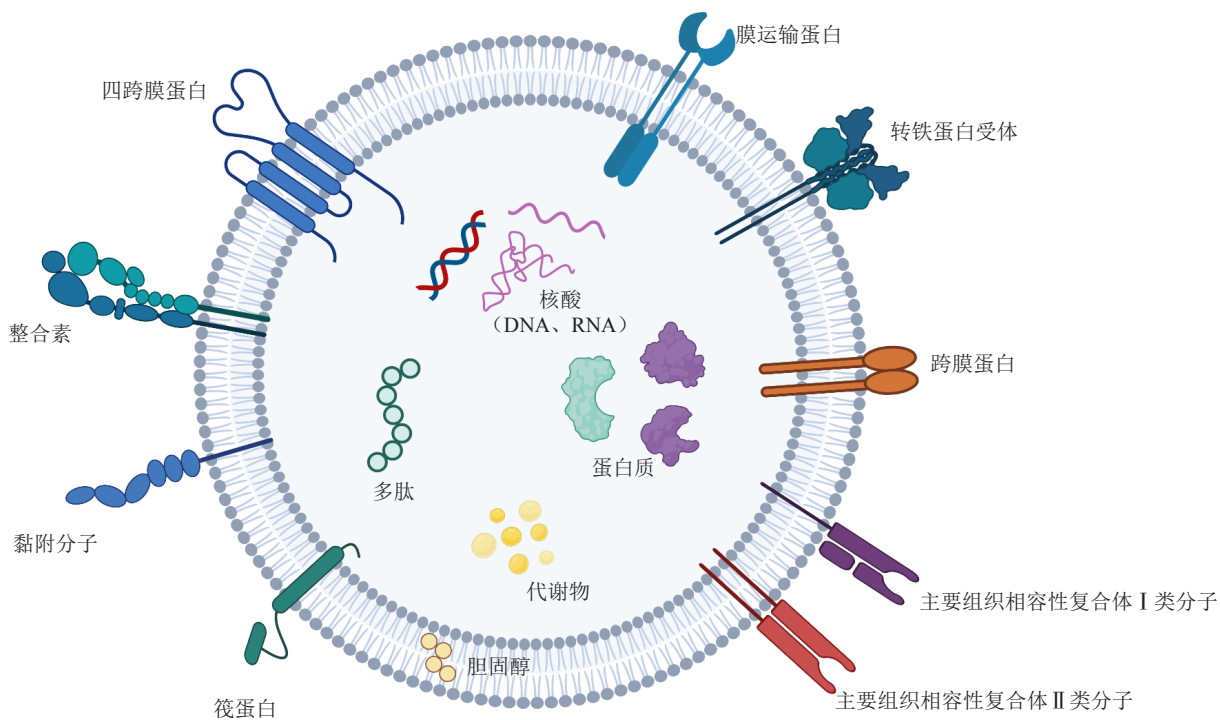
研究方向: 病毒载体、外泌体研究;

Tel: 021-60521508; **E-mail:** bogao@umibio.cn

个方面, 包括大小异质性、内含物异质性、功能异质性和细胞来源异质性^[5]。不同细胞来源的外泌体其大小、表面受体和内容物往往具有不同特征。细胞靶向分子、细胞黏附分子、代谢物和核酸等在外泌体的形成过程中被包裹在囊泡腔内或脂质双层内, 但由于细胞所处的微环境及内在生物特征差异, 外泌体所含物质的种类和数量也不尽相同。外泌体对靶细胞的作用也可能存在差异, 这种功能异质性可能诱导细胞凋亡、免疫调节等不同生物学反应。器官组织(无论是否是肿瘤组织)所具有的特殊性质也可能导致外泌体的异质性。这些特征的不同组合使外泌体呈现出复杂的异质性, 并赋予其诱导复

杂生物学反应的独特能力。

从结构上看, 外泌体具有单层膜的结构, 其水性核心周围被脂质双分子层所环绕, 同时在其腔内或脂质双分子层中包裹了多种生物成分, 如蛋白质、脂质和核酸等(见图1)。当外泌体被用作药物递送系统时, 疏水性药物可分散在其脂质双分子层内, 而亲水性药物则扩散到外泌体的腔内^[6]。从载药机制的角度来看, 由于外泌体药物递送系统的结构与脂质体相似, 因此可将其视为与脂质体性质相当的药物载体。同时, 基于其穿透能力强、血液循环时间长、生物相容性好、生物分布广等独特优点, 外泌体有望成为一种比脂质体更具优势的天然药物载体。



注: 该图由 BioRender.com 创作, 已获授权

图1 外泌体的典型结构

Figure 1 Typical structure of exosomes

2 外泌体作为药物载体的研究现状

外泌体作为天然的药物递送载体, 可通过基因工程和化学修饰来提高药物靶向细胞或器官的能力, 从而限制药物对正常组织和细胞的伤害, 减轻药物毒副作用。外泌体载药技术分为两类: 外源性载药技术和内源性载药技术。外源性载药技术系从细胞培养液或其他生物体液中分离和纯化外泌体, 并通

过物理或化学手段将所需药物负载至外泌体表面或内部; 而内源性载药技术系通过生物工程技术改造的方式使供体细胞产生包含特定药物的外泌体。作为药物载体, 外泌体能够以高效且特异的方式将药物分子递送到靶细胞, 为疾病的靶向治疗提供了一种新的思路和实用的技术。然而, 由于这是一项新的发现, 尚未进行临床评估, 外泌体作为药物递送

系统的应用还面临着许多阻碍和困难。目前存在的主要问题包括: 外泌体纯化的缺陷、表征的不足、负载效率低、靶向性差以及需要克服外泌体异质性^[7]。此外, 新型外泌体药物进入临床试验前需要符合良好生产规范 (good manufacturing practice of medical products, GMP) 的标准, 以确保其质量和一致性。外泌体的 GMP 生产主要涉及以下 3 个方面: 上游细胞培养系统、下游纯化系统和外泌体质量控制。由于外泌体是由细胞产生的, 因此可以利用大规模细胞培养技术来构建生产系统。由于宿主细胞分泌囊泡的颗粒大小和特征与病毒相似, 下游纯化系统理想情况下应遵循病毒类疫苗制造的过程。质量控制是外泌体 GMP 生产面临的一大难题。尽管先前的研究已经对外泌体的标记物进行了表征, 但产生外泌体的细胞类型各不相同。目前对外泌体的评估大多数集中在临床前或临床研究中的生产和使用上, 针对外泌体质量控制的法规和指导原则尚未出台。本文介绍了来自人类和植物、用于治疗研究的外泌体, 并对外泌体作为药物递送载体的研究进展进行总结。

3 外泌体相关药物的临床试验进展

外泌体作为一种以囊泡形式存在的新型递送系

统, 在多种疾病的治疗中有着广泛的应用前景。在基于外泌体的人类临床研究中, 外泌体相关药物的生物相容性、实用性和安全性是当前亟需先进技术手段来解决的一个重要课题。在临床试验中, 来源于植物和人类细胞的外泌体被用于各种治疗环境的研究^[1]。越来越多的生物技术公司正在开发基于人类/植物来源外泌体的疗法, 以解决各种疗法的药物递送问题, 其中包括 Evox Therapeutics、Carmine Therapeutics、Exopharm、Aruna Bio、Capricor Therapeutics 和 Mantra Bio 等公司。其开发的疗法涵盖了小分子疗法、蛋白质疗法、RNA 疗法、病毒基因疗法, 甚至是基于成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 技术的基因编辑工具疗法, 展现了外泌体在药物递送领域的多样化应用。大型医药公司与拥有外泌体创新技术平台的新兴企业之间的合作日益增多, 推动了基于外泌体的治疗方法的临床试验不断涌现^[8]。目前, 多项外泌体相关临床研究正处于规划或试验阶段, 已有的研究结果显示, 外泌体治疗是安全且耐受性良好的。外泌体在多种疾病的诊断和治疗中都展现出良好的应用潜力, 包括新型冠状病毒感染 (COVID-19)、癌症和免疫性疾病等^[9]。表 1 总结了基于外泌体的各类疗法的临床试验信息。

表 1 基于外泌体的各类疗法临床试验一览

Table 1 Summary of clinical trials of various exosome-based therapies

临床试验名称	研究开始年份	适应证	干预/治疗方式	临床阶段	申办机构	国家	登记号
应用于家族性高胆固醇血症、基于外泌体的 Ldlr mRNA 纳米递送平台	2021	家族性高胆固醇血症	装载低密度脂蛋白受体 mRNA 的外泌体	I 期	空军军医大学唐都医院	中国	NCT05043181
间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 衍生外泌体治疗中度 COVID-19 患者过度炎症的疗效和安全性研究	2022	COVID-19	静脉注射 MSC 外泌体; 静脉注射安慰剂; COVID-19 标准治疗	III 期	Dermama Bioteknologi Laboratorium	印度尼西亚	NCT05216562
MSC 衍生外泌体治疗 COVID-19	2021	由 COVID-19 引起的急性呼吸窘迫综合征	静脉注射 MSC 外泌体	II 期	AVEM Healthcare	美国	NCT04798716
外泌体吸入法治疗 COVID-19 的安全性和有效性研究	2020	COVID-19	MSC 外泌体; 安慰剂吸入	II 期	Olga Tyumina	俄罗斯	NCT04602442
HIV 感染过程中炎症、NK 细胞、反义蛋白和外泌体与免疫应答的关系研究	2022	HIV 感染	无	不适用	蒙彼利埃大学医学院	法国	NCT05243381
评估 exoASO-STAT6 在晚期肝癌、原发性胃癌和结直肠癌肝转移患者中的安全性、耐受性和初步抗肿瘤活性	2022	晚期肝癌; 胃癌肝转移; 结直肠癌肝转移	药物: DK-004	I 期	Codiak BioSciences	美国	NCT05375604

续表 1

临床试验名称	研究开始年份	适应症	干预/治疗方式	临床阶段	申办机构	国家	登记号
脐带 MSC 衍生外泌体对慢性移植抗宿主病患者干眼症的影响	2020	干眼症	脐带 MSC 衍生外泌体	II 期	中山大学中山眼科中心	中国	NCT04213248
MSC 衍生的外泌体在预防脱发中的作用	2022	脱发	外泌体	不适用	伊斯法罕医科大学	伊朗	NCT05658094
多能干细胞来源的 MSC 外泌体 (PSC-MSC-Exo) 滴眼液治疗屈光手术后及眼睑痉挛相关的干眼症的安全性和功效研究	2023	干眼症	多能干细胞来源的 MSC 外泌体 (PSC-MSC-Exo) 滴眼液	II 期	浙江大学医学院第二附属医院	中国	NCT05738629
细胞外囊泡富集的 MSC 治疗骨组织缺损	2022	节段性骨折; 骨质流失	细胞外囊泡富集的 MSC; 骨缺损的标准治疗	II 期	白俄罗斯国家科学院生物物理与细胞工程研究所	白俄罗斯	NCT05520125
循环细胞外囊泡在创伤性脑损伤早期疾病评估及预后中的应用	2022	创伤性脑损伤	无	不适用	空军军医大学唐都医院	中国	NCT05279599
MSC 来源的细胞外囊泡治疗烧伤的初步安全性研究	2021	烧伤	药物: AGL-102	I 期	Aegle Therapeutics	美国	NCT05078385
鞘内靶向给药治疗癌症相关疼痛的前瞻性评价	2023	癌症疼痛; 慢性疼痛; 神经病理性疼痛	鞘内靶向给药	不适用	Aurora Health Care	美国	NCT05674240
MSC 和干细胞外泌体对色素性视网膜炎患者视觉功能的影响	2022	视网膜色素变性	眼球筋膜下注射 MSC、MSC 衍生外泌体或安慰剂	III 期	埃尔吉耶斯大学	土耳其	NCT05413148
外泌体治疗 KRAS G12D 突变的转移性胰腺癌患者	2018	转移性胰腺癌; 胰腺导管腺癌	含有 KRAS G12D siRNA 的 MSC 来源的外泌体	I 期	安德森癌症中心	美国	NCT03608631

数据来源: ClinicalTrials.gov

4 外泌体药物载体在大规模生产和纯化中的现状与问题

外泌体作为药物递送载体的应用受到多种因素的影响, 包括来源、装载方式及转运能力等, 其中, 缺乏高效、均匀的载药方法是制约外泌体临床应用的重要因素^[10]。此外, 监管机构尚未发布关于如何测试外泌体的安全性和有效性的指导意见, 因此如何对外泌体相关药物进行安全性和有效性验证, 并建立符合 GMP 标准的外泌体生产制备工艺, 是目前亟待解决的问题。针对目前外泌体在临床应用中存在的问题, 本章节将对外泌体的来源、外泌体装载技术和生产管理进行概述, 以期对外泌体的研究与应用提供新思路。

4.1 药用外泌体的来源及质量控制问题

4.1.1 药用外泌体的来源 外泌体是一种生物制品, 可来源于多种类型的细胞, 包括免疫细胞、癌症细胞和干细胞等, 同时也可来源于多种生理液体, 如血液、脑脊液、胆汁、羊水、腹水、母乳、尿液、精液和唾液等。目前可通过 GMP 级大规模生产获

得的动物来源外泌体主要包括: 骨髓 MSC 外泌体、脂肪 MSC 外泌体、树突状细胞外泌体、人类胚胎肾细胞 293 (也称 HEK293 细胞) 外泌体和牛奶外泌体等^[1,11]。

MSC 是一种特定类型的干细胞, 由于其具有多谱系分化的潜能, 对再生和恢复至关重要。MSC 具有分化为肌细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞和内皮细胞等多种组织细胞的能力。人类脐带、脂肪组织、骨髓和胚胎是重要的 MSC 来源^[12]。MSC 可以从多种人体组织中分离并具有显著的离体增殖能力, 因此被视为制备治疗性外泌体的重要来源细胞。Mendt 等^[13]开发了一种基于 GMP 标准的可规模化的外泌体提取方法, 该方法系从人骨髓源性 MSC (human bone marrow mesenchymal stem cell, hBM-MSC) 中提取外泌体, 其产量是人包皮成纤维细胞的 3 倍。使用 hBM-MSC 来源的外泌体治疗的最常见疾病是软骨异常或骨关节炎, hBM-MSC 来源的外泌体已被证明可靶向骨骼并刺激成骨分化。由人脂肪组织衍生的 MSC (human adipose derived

MSC, hAD-MSC) 产生的外泌体已被证明具有多种活性, 如促进组织愈合、减少损伤和抗炎^[3]。脂肪组织可从健康成年捐赠者的腹部和臀部的脂肪组织中获取, 并可通过使用特定的培养基对脂肪组织中的 MSC 进行筛选和培养。

免疫细胞产生的外泌体也备受研究人员的关注。免疫细胞炎症是一种保护身体免受感染或损伤的免疫反应, 然而, 不受控制的炎症可能导致多种疾病。炎症的基本介质是先天免疫分子, 如细胞因子、趋化因子和先天免疫细胞等。外泌体作为一种治疗免疫系统过度活跃的创新疗法越来越受到欢迎。树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和巨噬细胞产生的外泌体已被证明具有抗免疫吞噬作用, DC 产生的外泌体可通过肽-主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 激活 CD4⁺ 或 CD8⁺T 细胞, 从而诱导细胞产生适应性免疫反应^[14]。

HEK293 细胞因其高转染效率、易于培养和大量产生外泌体的能力, 作为外泌体供体被广泛应用于各种研究。与干细胞相比, HEK293 细胞系的大规模培养条件相对完善、技术更加成熟。尽管最初的 HEK293 细胞系是一个贴壁细胞系, 但研究人员通过驯化已经建立了许多能够进行悬浮培养的 HEK293 衍生的细胞系, 如 HEK293S、HEK293F 等。此外, HEK293 还被广泛应用于生物药物的生产, 对该细胞系使用最常见的转染试剂能够表现出高转染效率, 同时该细胞系生长速率高、新陈代谢快, 能在短时间内产生大量重组蛋白。更重要的是, HEK293 细胞能够产生与人类自身合成蛋白质最相似的蛋白质, 具有较低的免疫原性^[15], 是一种生产蛋白或多肽类药物的理想工具。

牛奶中富含丰富的营养物质, 如蛋白质、钙和维生素 D 等, 是平衡膳食中不可或缺的重要组成部分。牛奶来源的外泌体具备多项优势。第一, 牛奶来源的外泌体适用于规模化生产。由于牛奶易得, 且其衍生的外泌体具有高产率、无细胞毒性等优点, 在生产成本、安全性、稳定性和可用性方面具有独特优势。第二, 牛奶来源的外泌体本身具备治疗效果。牛奶来源的外泌体生物相容性高、免疫原性低, 同时具备在胃消化过程中保持自身完整的能力、通

过胃肠道内吞作用进入血液的能力、将其所含蛋白质和 microRNA 转移到免疫细胞的能力以及控制免疫反应和生长的能力^[16]。研究表明, 牛奶来源的外泌体可减轻关节炎^[17]。第三, 牛奶来源的外泌体也适用于口服药物的开发, 例如利用牛奶来源外泌体负载紫杉醇, 其口服给药表现出比注射紫杉醇更低的毒性和不良反应^[18]。作为纳米级药物载体, 牛奶来源的外泌体口服给药的生物利用度相当可观。

植物来源的外泌体体积小、组织穿透性强, 在不同的酸碱度和温度下都能维持较好的理化稳定性, 是一种理想的药物递送载体^[19]。目前, 公开报道的植物来源外泌体包括葡萄外泌体^[20]、生姜外泌体^[21]、芦荟外泌体^[22]、人参外泌体^[23]、甘草外泌体^[24]、红景天外泌体^[25]、西蓝花外泌体^[26]、葡萄柚外泌体^[27]、小麦外泌体^[28]、大蒜外泌体^[29]、蒲公英外泌体^[30]、洋葱外泌体^[31]等。在功能方面, 植物来源外泌体含有多种生物活性成分, 赋予了其多种治疗能力, 包括保肝、抗肿瘤、抗氧化、抗炎和组织再生作用。例如, Ju 等^[20]报道葡萄来源的外泌体可以穿过肠黏液层, 靶向肠干细胞, 诱导肠干细胞的增殖, 从而缓解葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的小鼠结肠炎。

目前, ClinicalTrials.gov 上已能检索到多项有关植物外泌体的临床研究。例如, 一项 I 期临床试验 (NCT01668849) 正在探索葡萄外泌体作为抗炎药物的应用价值, 该研究旨在确定其是否可以消除头颈部癌症患者在放化疗期间发生的口腔黏膜炎症。另外, 一项编号为 NCT01294072 的临床研究旨在探索植物外泌体如何能更有效地将姜黄素递送到健康的结肠组织和结肠癌组织中。口服姜黄素的生物利用度非常低, 而使用植物外泌体或可有效解决姜黄素的递送问题。

4.1.2 药用外泌体的质量控制问题 与脂质体和其他纳米载体相比, 基于外泌体的递送平台在相容性、稳定性、组织穿透性、靶向能力和固有生物活性等方面具有一定优势。外泌体的来源广泛, 一方面为其提取带来了便利, 但在另一方面, 外泌体来源的多样性、其本身的异质性对外泌体制剂的质量形成了一定隐患^[32]。如何在来源上对外泌体进行严格控

制, 确保其可追溯性、稳定性及合法性, 是目前外泌体类新药研发面临的首要难题。

根据不同亲本细胞的不同状态, 外泌体在携带核酸和蛋白质方面具有高度异质性。不需要的分子可能会影响外泌体的功能, 甚至产生有害的副作用。为了确保外泌体在临床使用中的安全性, 应严格控制外泌体来源(如物种、细胞类型和培养条件), 并对其蛋白质组学和基因组学进行精确、灵敏和高通量的分析。其中, 细胞来源的外泌体其生产需遵循 GMP 标准, 对细胞安全生产的基本要求包括: 有细胞采集、加工、检定、保存和临床应用全过程的标准操作程序(standard operation procedure, SOP)和完整的质量管理记录; 整个过程必须遵循细胞产品质量控制(quality control, QC)标准, 并拥有与其配套的检测设备和检测方法; 细胞库的细胞必须保证可溯源; 按照批准的细胞产品质量控制标准对每批次细胞产品进行严格检测, 包括细菌、真菌、支原体和内毒素的检测。

在外泌体的分离纯化过程中, 相对宽泛的尺寸范围导致外泌体与其他细胞外囊泡混合, 从而削弱了外泌体的靶向能力, 最终会对外泌体制剂的产品质量产生影响。因此, 在外泌体的分离纯化过程中, 应选择适当的纯化方法, 以获得尺寸均匀的外泌体亚群。此外, 在小规模实验室应用中, 可以使用传统技术来实现外泌体的分离, 而在临床试验和药物开发的上游和下游操作中, 则需要快速且可扩展的技术。传统的外泌体制备方法在大规模生产上存在产量低、质量控制难、周期长、成本高的问题以及其他技术问题^[33]。因此, 在研发阶段, 探索与建立符合 GMP 标准的外泌体制备技术、下游纯化技术和质量控制系统显得尤为重要。

在市场监管方面, 无论是国外还是国内, 外泌体市场均无明确监管框架。针对外泌体疗法, 美国 FDA 在 2019 年发布了一份关于外泌体产品的公共安全声明, 并在 2020 年发布了关于含有干细胞和外泌体的再生医疗产品的消费者警报。如何对这些项目进行分类是显而易见的: 它们属于治疗产品类别^[8]。到目前为止, 监管机构还没有发布如何对外泌体进行安全和有效性测试的指导意见。但外泌体是细胞

产物, 其质量控制与指导原则可参照细胞产品相关原则。2017 年, 原国家食品药品监督管理总局(China Food and Drug Administration, CFDA)发布了《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》, 该指导原则对细胞治疗及其相关产品在使用血清及其他物料、细胞库等方面存在的风险进行了评估指导。2022 年 8 月, 我国牵头制定并发布干细胞国际标准 ISO24603, 外泌体研究也可参考该标准, 以标准化外泌体生产的上游步骤。

4.2 外泌体载药方法

在将外泌体用作药物载体时, 首要考虑的是高效装载药物的策略。脂质双分子层的膜结构作为外泌体的天然屏障, 能够防止装载物的变质。然而, 这种膜的存在使外泌体难以高效装载药物等外源性成分。通过物理或化学手段、生物工程技术的改造, 可以提高天然外泌体对药物的装载效率。此外, 针对外泌体外膜的工程化修饰, 可以改善外泌体在体内的生物分布, 提高其靶向性与治疗效果。以下总结了外泌体装载药物的策略, 并针对蛋白质/多肽类药物和小核酸类药物的外泌体装载方式进行了讨论。

4.2.1 载药策略 外泌体装载药物的策略可分为两种。一种为外源性载药途径, 即先将外泌体提取纯化, 再将治疗药物包载于外泌体中, 其优点是制备简易^[34]。目前, 常用的外源性载药方法包括电穿孔法、共孵育法、超声法、化学转染法及反复冻融法^[35]。然而, 外源性药物装载也存在一定缺陷, 如在装载过程中可能会破坏外泌体的完整性, 并且需要额外的纯化步骤来去除未被外泌体捕获的药物。另一种为内源性载药途径, 即通过基因工程技术处理或共孵育, 将目标分子(如核酸、蛋白和化学药物)先引入供体细胞, 再包装进外泌体中, 随后外泌体从供体细胞分泌, 最后通过分离提纯回收已载药的外泌体^[36]。内源性载药的优点是保留了外泌体的完整性和功能, 但操作复杂且实验周期长、制备成本高。

4.2.2 蛋白质/多肽类药物的装载 蛋白质和多肽类药物适用于多种疾病的治疗, 包括肿瘤、糖尿病、自身免疫性疾病、神经系统疾病等。然而, 由于其复杂的结构和生理活性, 蛋白质和多肽类药物对药物递送系统提出了较高的要求。利用外泌体装载蛋白

质/多肽类药物, 其装载效率易受供体细胞和受体细胞的影响, 且部分天然外泌体存在靶向性不强等缺点。因此, 实现对药物的精准靶向递送和有效提升药物荷载量, 已成为当前蛋白质/多肽类外泌体药物研发亟需解决的问题。“支架蛋白”挂载是一种重要的外泌体蛋白质/多肽类载药技术。“支架蛋白”是与外泌体组装相关的、天然高表达的一类外泌体特征蛋白质。“支架蛋白”挂载技术通过将特异性蛋白/多肽组分与“支架蛋白”连接, 构成融合蛋白, 从而提高药物在外泌体中的有效荷载量及外泌体的靶向性。2020年发表的一项科研成果报道了2种新型“支架蛋白”, 即PTGFRN和BASPI^[37]。研究发现, 在外泌体供体细胞中将目标蛋白[如细胞因子、抗体片段、RNA结合蛋白、疫苗抗原、Cas9和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等]与PTGFRN或BASPI融合表达, 可以将需要递送的蛋白质或多肽类药物搭载在外泌体膜的外侧或内侧, 这是一种新型、高效、稳定的外泌体内源载药方式。

4.2.3 小核酸药物的装载 外泌体是细胞释放的最小的细胞外囊泡之一, 已被证明可以携带不同的核酸, 其中包括microRNA。每个外泌体含有大约3 000个microRNA分子, 这些microRNA通过转录后抑制基因表达来调节细胞的生长和代谢^[14]。外泌体microRNA是癌症-宿主串扰的重要介质, 癌细胞释放的外泌体microRNA可以调节远处细胞的功能和表型, 尤其是通过促进肿瘤微环境中不同细胞间的相互作用, 从而影响肿瘤生长、侵袭、转移、血管生成和耐药性^[38]。从肿瘤治疗的角度来看, 外泌体可以被视为传递microRNA的靶向递送载体, 其在肿瘤组织中高效、特异地调节靶基因的表达, 进而对抗肿瘤治疗产生积极作用。常用的将microRNA药物装载到外泌体中的方法包括共孵育、电穿孔、超声、转染等。

4.3 外泌体载药在大规模生产和纯化中的现状与问题

作为细胞产物的生物制品, 外泌体产品的质量与宿主细胞的质量关系密切。药用外泌体制剂必须采用GMP级别的生产流程, 以确保其生物功能。在GMP方面, 本文主要讨论三大环节: 上游细胞

培养系统(包括来源和工艺放大问题, 其中外泌体来源已在前文讨论)、下游纯化系统和外泌体质量控制。此外, 外泌体的剂型对产品的疗效和安全性有重要影响, 在生产过程中需要注意选择合适的剂型。

4.3.1 工艺放大问题 外泌体药物从小规模研发扩展到工业化规模生产, 并进入后续临床试验的过程中, 临床级外泌体大规模生产是一项重要挑战。外泌体的产量高度依赖于其供体细胞, 受限于不同细胞分泌外泌体的能力以及大规模细胞培养的困难与高成本。对于药用外泌体行业, 其工业化水平仍处于起步阶段。到目前为止, 外泌体生产的升级尝试主要集中在中小型的“扩大规模”策略上, 通过培养瓶、细胞工厂或中型生物反应器生产8~10 L的外泌体供体细胞^[39]。开发和优化符合GMP标准的外泌体大规模制备工艺对于临床研究计划和未来市场供应都非常重要。此外, 探索能够保持外泌体活性的储存条件也至关重要。外泌体的活性可能受到储存容器和环境因素等的影响, 因此在生产过程中必须采用能够保持外泌体活性的储存条件。建议使用硅化罐储存, 并且对容器进行测试, 以避免外泌体黏附在表面^[39]。外泌体的存储方式包括冷冻(-20℃、-80℃)、真空干燥和液态保存(4℃)^[33]。尽管已有一些研究表明不同的储存条件对外泌体的功能存在影响, 但外泌体保存条件的标准仍未有统一定论, 而添加药物则使保持外泌体制剂稳定性变得更加复杂。

4.3.2 纯化问题 外泌体大规模分离方法的低效性是临床级外泌体开发的另一个障碍。不同类型细胞释放的外泌体在数量、物理化学特征和组成上可能存在差异。不同的分离提纯方法所得到的外泌体产量差距悬殊, 外泌体亚群也有所不同。外泌体分布在极其复杂的体系中, 单一方法很难获得高纯度的外泌体, 因此需要结合外泌体的不同物理化学和生化特性, 采用多种方法联合进行分离纯化, 这使得高产量的外泌体分离纯化变得非常具有挑战性。目前, 基于不同原理的技术已被用于外泌体分离, 包括超速离心法、超滤法、免疫亲和层析、基于电荷中和的聚合物沉淀法、尺寸排阻色谱、微流体技术、切向流过

滤等^[1,40]。尽管研究人员已经开发并优化了一些外泌体纯化方法,但目前仍然难以一种特定的方法解决所有相关的挑战,如分离效率低、样品损失、外泌体回收率和纯度低,以及批次间差异等问题。

4.3.3 质量检测方法和标准的问题 在质量控制方面,全面表征外泌体至关重要。鉴于外泌体的异质性,生产得到的外泌体可能存在均一性差的问题,为了确保外泌体终产品符合先前确定的关键质量属性,在研究外泌体的过程中,不可避免地需要对外泌体进行表征分析和质量控制,包括粒径和浓度测定、微生物和病毒因子等污染物检测、残留物检测、载药量评估和生物学功能检测,以评估外泌体的治疗活性与均一性^[41]。目前,外泌体的质量检测项目主要集中在粒径、颗粒数、表面蛋白质标志物及负载物等方面。在实际应用方面,外泌体作为药物递送载体受到装载效率不可控的限制,因此,明确的装载效率计算方案对于评估载药系统的稳定性和药物载量是十分必要的。装载效率可通过间接计算或直接计算来确定^[41],间接计算是指从总药物含量中减去游离药物含量来估计外泌体负载的药物量,而直接计算通常需要外泌体裂解和药物提取等步骤来量化负载药物。高质量的外泌体表征与量化能够对外泌体载药系统的潜在药效进行预测,然而,迄今为止尚无外泌体量化以及理化特征描述的行业“金标准”,寻找和开发外泌体表征与定量方法也是当前亟待解决的问题。

4.3.4 外泌体剂型对产品化的影响 目前市场上的外泌体产品主要分为3种剂型:冷冻形式的外泌体、液体形式的外泌体复配液和粉剂形式的外泌体冻干粉^[42]。冷冻外泌体主要用于实验室研究,其保存方法和应用参考了细胞的冷冻保存方法,对科研人员的操作手法和相应的设备要求较高,且冷冻复融将造成活性的大量丢失,因而重复性较差,制造成品率较低,不适合大规模生产。外泌体复配液是将外泌体悬浮在液体基质中,避免了使用过程中反复冷冻复融造成的活性损失,然而在常温下,外泌体内的活性成分易降解,难以满足长期储存及长途运输的要求。冻干工艺可以将外泌体冻干成固体以实现保存效果,当前冻干技术已被用于改善用作药物递

送载体的脂质体的长期稳定性。因此,冻干技术有潜力改善外泌体的保存稳定性,如果冻干的外泌体可以在室温条件下稳定保存,冻干技术将大大拓展外泌体的应用范围。在外泌体冻干工艺开发方面,需要重点解决的是冻干保护剂及缓冲体系的选择,同时冻干工艺的参数也会影响冻干效率及冻干后外泌体的完整性,这一点也需要重点关注。此外,未来需要对含核酸(如 microRNA)的外泌体进行更详细的评估,并探讨冻干对其稳定性的影响。

5 外泌体载药的相关法规问题

当前,将外泌体推向临床治疗仍面临多重挑战。一是外泌体供体细胞的选择,选择自体细胞还是具有低免疫原性的同种异源细胞,这需要遵守相关法规和伦理审查要求,包括获得适当的临床试验批准、知情同意和隐私保护,并遵守监管机构的规定;二是药物装载和释放方式的确定,需要针对不同药物确定最佳的装载方法和条件,优化外泌体与药物之间的相互作用,以确保药物的稳定性和适当的释放速率;三是靶向输送和组织定位能力的改善,需要开发适合临床应用的表面修饰策略,如使用靶向肽、抗体或其他分子,让外泌体能够特异性地结合到靶细胞或组织上。在生产制备方面,外泌体制剂必须遵守 GMP 法规,其中包括上游外泌体来源选择、大规模细胞培养技术、下游外泌体分离纯化以及整个生产过程的质量控制等方面的规范。目前,国内外均未出台针对外泌体产品安全性、有效性和质量可控性的监管法规,亟需规范的方法和原则来填补这一空白。2022年10月31日,国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)食品药品审核查验中心发布《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》(以下简称《指南》),是我国在细胞治疗政策监管方面迈出的重大一步。《指南》指导药品上市许可持有人规范开展细胞治疗产品的生产和质量管理,保证产品质量,同时,这也为细胞治疗产品研发企业提供了更清晰的研发、生产和发展路径。细胞制备应符合《中华人民共和国药典》、《药品生产质量管理规范》、《药品注册管理办法》、《药品生产监督管理办法》、《药品

生产质量管理规范》及其附录、《药品注册核查管理规定》、《药品不良反应报告和监测管理办法》、《药品召回管理办法》、《药品说明书和标签管理规定》、《药品生产企业现场检查风险评定原则》、《医疗废物管理条例》与《病原微生物实验室生物安全管理条例》中的相关规定。目前新药申报要求申请人注明产品中所有能引起药理作用、代谢作用或免疫反应的物质, 并且最终配方中的非活性成分(辅料)也应予以申报。根据国际细胞外囊泡学会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)在2014年的提议及2018年的补充建议, 如果能将药物的整体疗效归因于外泌体装载的药物, 而非外泌体载体本身, 就能将外泌体看作是药物载体, 即按辅料进行申报。在这种情况下, 只需对外泌体进行安全评价, 而无需阐述其本身的功能和机制。如果新药的安全性、质量等指标符合要求, 并且能够针对该药物的作用机制提供科学可靠的证据, 即可获批开展临床试验。

外泌体的来源丰富多样, 要将同种异体外泌体、异种外泌体转化为临床上安全、有效的治疗产品, 就必须对供体细胞的选择、外泌体分离纯化、制剂制备、质量控制等生产环节进行持续的监控, 全面

评估产品的药理活性及其免疫学和致癌效应, 严格把控微生物污染等风险^[43]。如何筛选合适的检测手段, 是决定外泌体制剂是否能实现其临床应用的一个重大课题。当下, 国内尚未出台针对外泌体安全性和有效性检测标准的指导意见, 亟待通过完善已有的检测手段或寻求新的检测手段来验证外泌体载药的安全性与有效性。

6 外泌体国内外研究概况

近10年来, 国内外学者对外泌体在疾病治疗中的应用进行了大量研究。外泌体具有生物安全性高、靶向性强和稳定性高等优点, 被广泛研究用于多种疾病尤其是肿瘤的治疗^[44]。目前, Web of Science数据库中有近3万篇与外泌体相关的文献(包括期刊文献与专利文献), 其每年发表数量随着时间的推移呈稳定的指数增长, 同时也预示着外泌体行业的良好前景(见图2)。

在过去的5~6年里, 外泌体作为潜在的药物载体比脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)更受欢迎。自2018年起, 与外泌体相关的文献数量, 包括专利文献和期刊文献, 均已显著超过脂质纳米颗粒(见图3)。

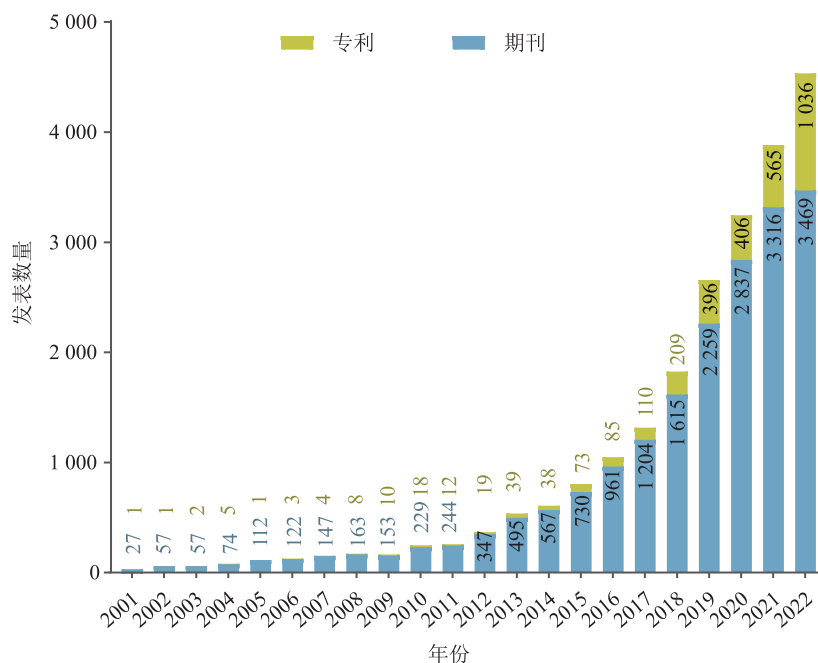
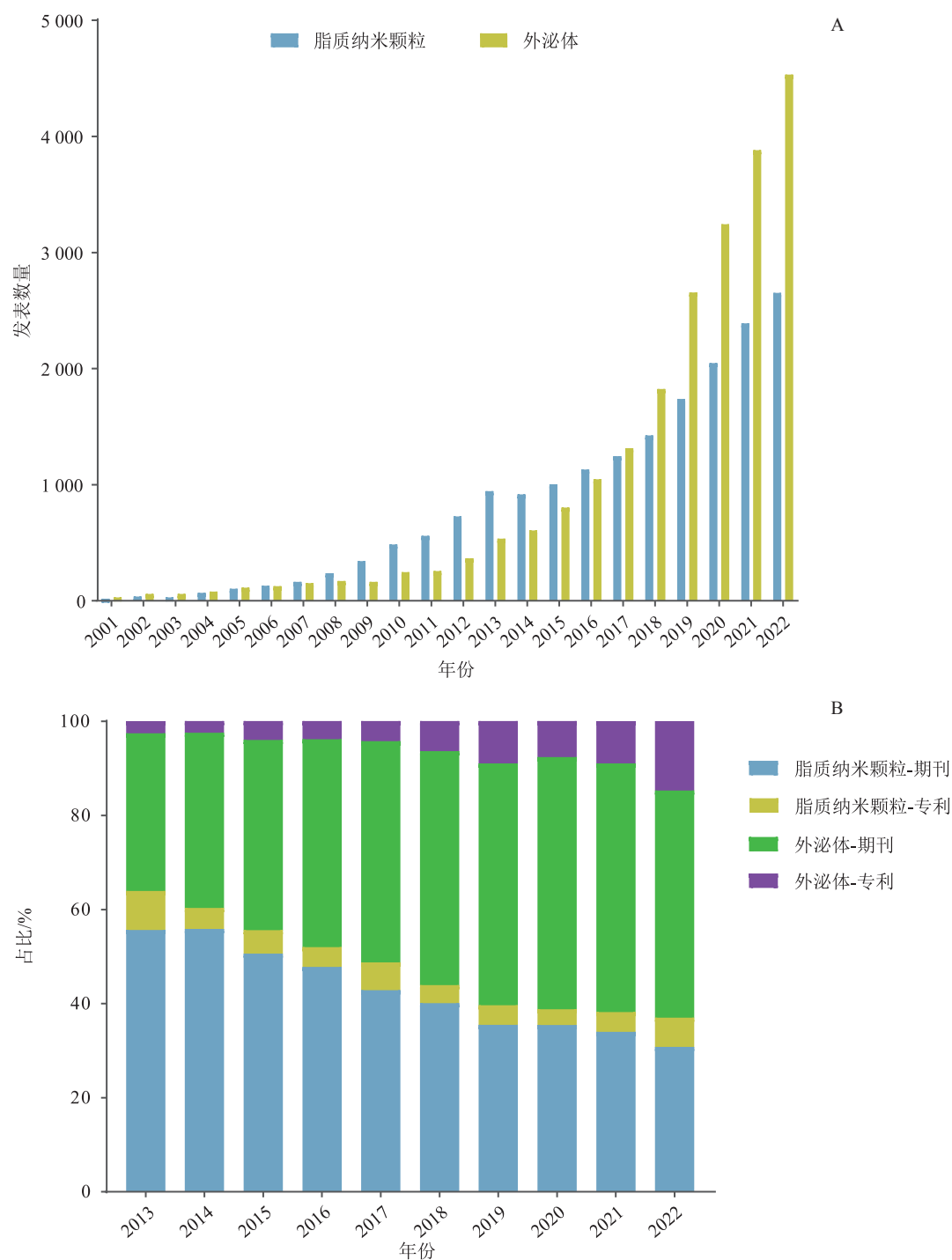


图2 外泌体相关期刊文献与专利文献的逐年发表情况

Figure 2 Annual publication of exosome-related journal literature and patent literature



A: 2001—2022 年期间外泌体与脂质纳米颗粒相关文献发表数量比较; B: 2013—2022 年外泌体与脂质纳米颗粒相关期刊文献与专利文献各自发表数量的占比

图 3 外泌体和脂质纳米颗粒相关文献的逐年发表情况

Figure 3 Annual publication of literature on exosomes and lipid nanoparticles

根据美国化学文摘社 (Chemical Abstracts Service, CAS) 发布的 2023 年度外泌体行业报告数据, 外泌体研究的关键参与国家——美国、中国、

韩国和日本在该研究方面处于领先地位, 与该主题相关的已发表期刊文献和专利文献数量最多^[32]。在外泌体相关专利数量方面, 企业和学术机构之间平

分秋色。MD Healthcare、Codiak Biosciences 和 Onco Therapy Science 是所有公司中拥有最多专利的企业, 而加利福尼亚大学、路易斯维尔大学和浙江大学是领先的学术机构。在专利分布方面, 世界知识产权组织 (World Intellectual Property Organization, WIPO) 收到的专利申请最多, 其次是美国专利商标局 (United States Patent and Trademark Office, USPTO) 和中国国家知识产权局 (China National Intellectual Property Administration, CNIPA)、欧洲专利局 (European Patent Office, EPO)、韩国特许厅 (Korean Intellectual Property Office, KIPO) 和日本特许厅 (Japan Patent Office, JPO) [32]。

2022年5月10日, 国家发改委印发《“十四五”生物经济发展规划》, 外泌体治疗产品首次进入国家生物经济发展规划。“生物经济创新能力提升工程”专栏关于“关键共性生物技术创新平台建设”中提到: “围绕加快创新药上市审批、强化上市后监管, 建设药品监管科学研究基地, 建设抗体药物、融合蛋白药物、生物仿制药、干细胞和细胞免疫治疗产品、基因治疗产品、外泌体治疗产品、中药等质量及安全性评价技术平台。”在国家政策的支持下, 国产外泌体产业发展将迎来新时代, 外泌体产业蓄势待发, 未来可期。

7 结语与展望

外泌体因其独特的特性及其在生理和病理过程

中的广泛作用, 已成为药物递送和诊断领域的后起之秀。外泌体作为天然纳米载体的应用前景是广阔的, 其在化妆品、医美和食品等领域中的潜在应用也在探索中。

然而, 外泌体的临床转化面临着诸多问题与挑战: 各种常见细胞均可用于外泌体生产制造, 细胞的代数及培养血清等因素的变化也会导致外泌体的不同; 扩大细胞培养规模是大量生产外泌体最直接的方法, 不同的提取方法会影响其产量以及外泌体亚群的均一性, 细胞培养的规模化以及分离提取流程需要标准化; 合格的体外表征与量化可以预测载药外泌体系统的预期治疗潜力, 需要进一步寻找与开发外泌体量化及其分子和物理特征描述的“金标准”; 外泌体产品需要额外程序进行把控, 以确保外泌体终产品满足关键质量属性; 冷冻干燥最有利于外泌体类治疗药物的商业化; 监管机构至今尚未发布如何测试外泌体安全性和有效性的指导意见, 需要对现有的方法进行改进或寻找新方法, 从而对外泌体的安全性和有效性进行证明。

外泌体行业的发展还处于早期阶段, 其拥有着巨大的发展机遇, 也面临着产业化的挑战。可以相信, 新型平台和先进技术的开发, 以及制药企业和科研机构的不懈探索必将加速外泌体基础研究和临床转化, 造福广大患者。

【参考文献】

- [1] Kimiz-Gebologlu I, Oncel S S. Exosomes: large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake[J]. *J Control Release*, 2022, 347: 533-543.
- [2] Rezaie J, Feghhi M, Etemadi T. A review on exosomes application in clinical trials: perspective, questions, and challenges[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 145. DOI:10.1186/s12964-022-00959-4.
- [3] EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield X O, *et al.* Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 347-357.
- [4] 白跃宗. 外泌体在肿瘤体外诊断中的临床研究和应用前景[J]. *药学进展*, 2023, 47(6): 433-441.
- [5] Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-228.
- [6] Rajput A, Varshney A, Bajaj R, *et al.* Exosomes as new generation vehicles for drug delivery: biomedical applications and future perspectives[J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7289. DOI:10.3390/molecules27217289.
- [7] Butreddy A, Kommineni N, Dudhipala N. Exosomes as naturally occurring vehicles for delivery of biopharmaceuticals: insights from drug delivery to clinical perspectives[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, 11(6): 1481. DOI:10.3390/nano11061481.
- [8] Silva A K A, Morille M, Piffoux M, *et al.* Development of extracellular vesicle-based medicinal products: a position paper of

- the group "Extracellular vesicle translation to clinical perspectives -EVOLVE France"[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 179: 114001. DOI:10.1016/j.addr.2021.114001.
- [9] 张宁, 谢姝钰, 常国欣, 等. 细胞外囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用及应用[J]. *药学进展*, 2022, 46(2): 93-115.
- [10] Hussien B M, Faraj G S H, Rasul M F, *et al.* Strategies to overcome the main challenges of the use of exosomes as drug carrier for cancer therapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 323. DOI:10.1186/s12935-022-02743-3.
- [11] Wang J, Chen D, Ho E A. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems[J]. *J Control Release*, 2021, 329: 894-906.
- [12] Cai J, Wu J, Wang J, *et al.* Extracellular vesicles derived from different sources of mesenchymal stem cells: therapeutic effects and translational potential[J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 69. DOI:10.1186/s13578-020-00427-x.
- [13] Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, *et al.* Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(8): e99263. DOI:10.1172/jci.insight.99263.
- [14] Zhang Y, Liu Q, Zhang X, *et al.* Recent advances in exosome-mediated nucleic acid delivery for cancer therapy[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 279. DOI:10.1186/s12951-022-01472-z.
- [15] Hu J, Han J, Li H, *et al.* Human embryonic kidney 293 cells: a vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology[J]. *Cells Tissues Organs*, 2018, 205(1): 1-8.
- [16] Samuel M, Chisanga D, Liem M, *et al.* Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5933. DOI:10.1038/s41598-017-06288-8.
- [17] Arntz O J, Pieters B C, Oliveira M C, *et al.* Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(9): 1701-1712.
- [18] Agrawal A K, Aqil F, Jayabalan J, *et al.* Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(5): 1627-1636.
- [19] Cong M, Tan S, Li S, *et al.* Technology insight: plant-derived vesicles-how far from the clinical biotherapeutics and therapeutic drug carriers? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 182: 114108. DOI:10.1016/j.addr.2021.114108.
- [20] Ju S, Mu J, Dokland T, *et al.* Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(7): 1345-1357.
- [21] Teng Y, Ren Y, Sayed M, *et al.* Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota[J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24(5): 637-652.
- [22] Koken G Y, Abamor E S, Allahverdiyev A, *et al.* Wharton jelly derived mesenchymal stem cell's exosomes demonstrate significant antileishmanial and wound healing effects in combination with aloe-emodin: an *in vitro* study[J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111(12): 3232-3242.
- [23] Xu X H, Yuan T J, Dad H A, *et al.* Plant exosomes as novel nanoplatforms for microRNA transfer stimulate neural differentiation of stem cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(19): 8151-8159.
- [24] Deng K, Dai Z, Yang P, *et al.* LPS-induced macrophage exosomes promote the activation of hepatic stellate cells and the intervention study of total astragalus saponins combined with glycyrrhizic acid[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2023, 306(12): 3097-3105.
- [25] Liu Y, Weng W, Gao R, *et al.* New insights for cellular and molecular mechanisms of aging and aging-related diseases: herbal medicine as potential therapeutic approach[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4598167. DOI:10.1155/2019/4598167.
- [26] Del Pozo-Acebo L, López De Las Hazas M C, Tomé-Carneiro J, *et al.* Therapeutic potential of broccoli-derived extracellular vesicles as nanocarriers of exogenous miRNAs[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 185: 106472. DOI:10.1016/j.phrs.2022.106472.
- [27] Wang Q L, Zhuang X, Sriwastava M K, *et al.* Blood exosomes regulate the tissue distribution of grapefruit-derived nanovector via CD36 and IGF1R pathways[J]. *Theranostics*, 2018, 8(18): 4912-4924.
- [28] Ashraf S, Qadri S, Akbar S, *et al.* Biogenesis of exosomes laden with metallic silver-copper nanoparticles liaised by wheat germ agglutinin for targeted delivery of therapeutics to breast cancer[J]. *Adv Biol (Weinh)*, 2022, 6(7): e2200005. DOI:10.1002/adbi.202200005.
- [29] Sundaram K, Mu J, Kumar A, *et al.* Garlic exosome-like nanoparticles reverse high-fat diet induced obesity via the gut/brain axis[J]. *Theranostics*, 2022, 12(3): 1220-1246.
- [30] Zhang X, Pan Z, Wang Y, *et al.* Taraxacum officinale-derived exosome-like nanovesicles modulate gut metabolites to prevent intermittent hypoxia-induced hypertension[J]. *Biomed Pharmacother*,

- 2023, 161: 114572. DOI:10.1016/j.biopha.2023.114572.
- [31] Yamasaki M, Yamasaki Y, Furusho R, *et al.* Onion (*Allium cepa* L.)-derived nanoparticles inhibited LPS-induced nitrate production, however, their intracellular incorporation by endocytosis was not involved in this effect on RAW264 cells[J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2763. DOI:10.3390/molecules26092763.
- [32] Tenchov R, Sasso J M, Wang X, *et al.* Exosomes—nature's lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(11): 17802–17846.
- [33] Zhang Y, Bi J, Huang J, *et al.* Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917–6934.
- [34] Herrmann I K, Wood M J A, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform[J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(7): 748–759.
- [35] Han L, Zhao Z, He C, *et al.* Removing the stumbling block of exosome applications in clinical and translational medicine: expand production and improve accuracy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 57. DOI: 10.1186/s13287-023-03288-6.
- [36] Liang Y, Duan L, Lu J, *et al.* Engineering exosomes for targeted drug delivery[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183–3195.
- [37] Dooley K, Mcconnell R E, Xu K, *et al.* A versatile platform for generating engineered extracellular vesicles with defined therapeutic properties[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(5): 1729–1743.
- [38] Sun Z, Shi K, Yang S, *et al.* Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 147. DOI:10.1186/s12943-018-0897-7.
- [39] Elsharkasy O M, Nordin J Z, Hagey D W, *et al.* Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159: 332–343.
- [40] Yang D, Zhang W, Zhang H, *et al.* Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3684–3707.
- [41] Lai J J, Chau Z L, Chen S Y, *et al.* Exosome processing and characterization approaches for research and technology development[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(15): e2103222. DOI: 10.1002/advs.202103222.
- [42] Yuan F, Li Y M, Wang Z. Preserving extracellular vesicles for biomedical applications: consideration of storage stability before and after isolation[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 1501–1509.
- [43] Ludwig N, Whiteside T L, Reichert T E. Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4684. DOI:10.3390/ijms20194684.
- [44] Patil S M, Sawant S S, Kunda N K. Exosomes as drug delivery systems: a brief overview and progress update[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, 154: 259–269.



【专家介绍】高博：本科毕业于西安交通大学生物工程专业，硕士毕业于武汉大学病毒学专业，博士毕业于复旦大学神经生物学专业。2006—2015年在上海吉凯基因化学技术有限公司任分公司经理，负责重组病毒载体的开发和生产管理。2016至今任上海宇玫博生物科技有限公司 CEO，负责外泌体产品的开发和工艺研发，包括分离纯化、检测鉴定、载体标记、药物装载等工艺开发。参与多项国家、省市课题项目，拥有 18 项已授权发明专利，申请中的专利有 30 多项，参与发表了多篇 SCI 论文。