(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2024 年 11 月 28 日 (28.11.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/239165 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 47/56 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/095383

(22) 国际申请日: 2023 年 5 月 19 日 (19.05.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 浙江大学 (**ZHEJIANG UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 浙江大学金华研究院 (**JINHUA INSTITUTE OF ZHEJIANG UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国浙江省金华市金义新区金华科技城浙大网新孵化园 A1-b, Zhejiang 321299 (CN)。

(72) 发明人: 顾臻 (**GU, Zhen**); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 李洪军 (**LI, Hongjun**); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 梁亭西子 (**LIANG, Tingxizi**); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (**SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE**); 中国上海市徐汇区小木桥路 681 号外经大厦 21 楼, Shanghai 200032 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:
— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** ORTHOGONAL REACTION CONTROLLED PHASE-SEPARATED AGGREGATE, METHOD FOR PREPARING SAME, AND USE

(54) 发明名称: 一种正交反应调控的相分离凝集体及制备其的方法和应用

(57) **Abstract:** An orthogonal reaction controlled phase-separated aggregate, a method for preparing same, and a use. A nucleic acid-protein combination which can form a phase-separated aggregate comprises: a modified protein and modified nucleic acids, wherein the nucleic acids comprise DNA and RNA, and the modified protein and the modified nucleic acids can undergo a click-to-release reaction, so that phase separation occurs to the protein and the nucleic acids to form the phase-separated aggregate. The nucleic acid-protein combination realizes the controllable preparation of the aggregate and the long-term retention of active ingredients. The nucleic acid-protein combination comprises two separated components extracellularly, and a phase-separated aggregate can be formed intracellularly by means of a click chemistry reaction, so that the anti-tumor effect of a drug is improved, and the survival time of a mouse having a tumor is prolonged.

(57) 摘要: 一种正交反应调控的相分离凝集体及其制备方法和应用。可形成相分离凝集体的核酸蛋白组合包含：修饰的蛋白质和修饰的核酸，所述核酸包括DNA和RNA，所述修饰的蛋白质与修饰的核酸可发生点击-释放反应，使蛋白质与核酸发生相分离，形成所述相分离凝集体。所述核酸蛋白组合实现了凝集体可控的制备和活性成分的长效保留。所述核酸蛋白组合在胞外包括分离的两种组分，在胞内可以通过点击化学反应形成相分离凝集体，提高药物的抗肿瘤效果，延长患肿瘤小鼠的生存时间。

WO 2024/239165 A1

一种正交反应调控的相分离凝集体及制备其的方法和应用

技术领域

本发明涉及药物递送领域，具体涉及一种正交反应调控的相分离凝集体及制备其的方法和应用。

背景技术

在利用化疗药物治疗癌症的过程中，会逐渐产生多药耐药性，进入肿瘤细胞的药物会被耐药细胞过表达的蛋白（ABC 转运蛋白）主动泵出，从而造成治疗失败，并引起肿瘤复发和转移。通过研究新的策略增强药物在耐药细胞中的保留可维持有效治疗剂量，获得最佳治疗效果。

液-液相分离（Liquid-Liquid phase separation, LLPS）通过蛋白质、DNA 和 RNA 等生物大分子之间发生多重相互作用，形成无膜细胞器，如应激颗粒（stress granules）、核仁（nucleoli）或卡哈尔体（Cajal bodies）等，近年来引起了广泛的关注。当下关于液-液相分离的研究偏向于机制探究，集中于揭示液-液相分离的内在驱动力、细胞内区室化的具体过程以及其与一系列生理活动的关联，如细胞内通讯、转录调节、压力响应和疾病发生等，但关于液-液相分离体系的实际应用探索相对较少。在细胞内拥挤环境中，充满着蛋白质、核酸等生物大分子，在体积排斥的情况下，这些生物大分子倾向于形成浓缩的凝集体，使得其中的分子浓度比细胞质高几百倍，从而改变分子的存在状态和生化反应平衡。受此启发，申请人设想相分离凝集体可被用于浓缩癌症治疗制剂，从而提高有效药物剂量，避免耐药肿瘤对药物的清除，从而提高癌症治疗效果。但是由于凝集体的动态性质及其易受环境参数影响，对凝集体进行可控制备具有较大挑战。

生物正交反应是指能在活体细胞或组织中，在不干扰生物自身生化反应的条件下可以进行的反应，具有较好的生化反应控制能力和生物安全性，可为上述生物分子凝集体的不稳性提供解决方案。因此，我们提出了一种原位组装液-液相分离凝集体的合成手段，利用生物正交的点击-释放策略实现了相分离体系的体外封存及细胞内的恢复，从而形成可控的长效保留药物的凝集体，增强了癌症治疗效果。

发明内容

本发明的目的在于提供一种正交反应调控的相分离凝集体及制备其的方法和应用，用于解决癌症或耐药菌感染治疗过程中的耐药性问题。

为解决上述技术问题，本发明第一方面提供了一种可形成相分离凝集体的核酸蛋白组合，其包含：修饰的蛋白质和修饰的核酸，所述核酸包括 DNA 和 RNA，所述修饰的蛋白质与修饰的核酸可发生点击-释放反应，使蛋白质与核酸发生相分离，形成所述相分离凝集体。

在一些实施方案中，所述点击-释放反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行。

在一些实施方案中，所述修饰的蛋白质为（2E）TCO 修饰的蛋白质即蛋白质-TCO，所述修饰的核酸为四嗪修饰的核酸即核酸-Tz。

在一些实施方案中，当所述点击-释放反应在体外无细胞的溶液中进行时，所述蛋白质的浓度大于 1mg/mL，优选小于 5mg/mL，所述 DNA 的浓度大于 20μM，优选小于 100uM。

在一些实施方案中，所述蛋白质的浓度大于 2mg/mL 且小于 5mg/mL，所述 DNA 的浓度大于 30μM 且小于 100uM。

在一些实施方案中，当所述点击-释放反应在胞内进行时，所述蛋白质的浓度大于 50μg/mL，优选小于 200μg/mL，所述 DNA 的浓度大于 1μM，优选小于 10μM。

在一些实施方案中，所述蛋白质的浓度大于 100μg/mL 且小于 200μg/mL，所述 DNA 的浓度大于 5μM 且小于 10μM。

在一些实施方案中，所述蛋白质选自具相分离能力的蛋白质，优选富含氨基的蛋白质；所述核酸选自富含重复碱基序列且能稳定存在的核酸，例如包含重复 C-G 碱基对的双链 DNA 或双链 RNA。

在一些实施方案中，所述富含氨基的蛋白质包括组蛋白或朊病毒样蛋白，例如 FUS（融合肉瘤）。

在一些实施方案中，所述蛋白质的分子量范围为 10-20 kDa。

在一些实施方案中，所述核酸的长度为 25~30 bp。

在一些实施方案中，所述组蛋白选自组蛋白 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 中的一种或多种；所述 DNA 的两条单链核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 1（序列-1）和 SEQ ID NO: 2（序列-2）所示。

本发明第二方面提供了一种药物组合，其包含本发明第一方面所述的核酸蛋白组合和药物。

在一些实施方案中，所述药物嵌入核酸的 C-G 碱基对中。

在一些实施方案中，所述药物选自阿霉素、米托蒽醌（Mitoxantrone）、顺铂（Cisplatin）和四环素中的一种或多种。

本发明第三方面提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含本发明第一方面所述的核酸蛋

白组合。

在一些实施方案中，所述试剂盒还包含（2E）TCO、（4E）TCO、叠氮和四嗪中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述试剂盒还包含选自阿霉素、米托蒽醌、顺铂和四环素中的一种或多种的药物。

本发明第四方面提供了一种制备凝集体的方法，所述方法包含如下步骤：

将本发明第一方面所述的核酸蛋白组合中的蛋白质-TCO 和核酸-Tz 反应，产生所述凝集体。

在一些实施方案中，所述反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行。

在一些实施方案中，所述方法还包括以下步骤：

（1）将蛋白质与（2E）TCO-PEG4-NHS 反应，制备蛋白质-TCO；

（2）将叠氮修饰的双链 DNA 或双链 RNA 与 DBCO-Tz 反应，制备双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz。

本发明第五方面提供了一种制备含药物的凝集体的方法，所述方法包含如下步骤：

（1）将药物载入本发明第一方面所述的核酸蛋白组合中的核酸-Tz 例如双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz；

（2）将蛋白质-TCO 和包载药物的双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz 反应，产生所述含药物的凝集体。

在一些实施方案中，所述反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行。

在一些实施方案中，所述方法包括以下步骤：

（1）将蛋白质与（2E）TCO-PEG4-NHS 反应，制备蛋白质-TCO；

（2）将叠氮修饰的双链 DNA 或双链 RNA 与 DBCO-Tz 反应，制备双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz；

（3）将药物载入双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz；

（4）将所述蛋白质-TCO 和包载药物的双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz 反应，产生含药物的凝集体。

在一些实施方案中，所述反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行。

本发明第六方面提供了本发明第一方面所述的核酸蛋白组合或本发明第二方面所述的药物组合在制备治疗肿瘤或耐药菌感染的药物或试剂盒中的应用。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：

本发明创新性地提出了一种核酸蛋白组合和利用该核酸蛋白组合制备相分离凝集体的方法；实现了凝集体可控制备和活性成分的长效保留。所述核酸蛋白组合在胞外包括分离的两种组分，在胞内可以通过点击化学反应形成相分离凝集体，可以显著提高药物的抗肿瘤效果，使患肿瘤的小鼠生存时间显著延长，基于所述凝集体的药物保留策略可显著提高药物疗效。

附图说明

图 1A 为组蛋白和带荧光素 FITC 的 DNA 形成的液滴在共聚焦显微镜下的形貌。比例尺为 20 微米。

图 1B 为组蛋白、DNA 和凝集体溶液的照片。

图 1C 为组蛋白、DNA 和凝集体的浊度测试。

图 1D 为液滴的荧光漂白后恢复情况。

图 2A 为结合药物阿霉素的 DNA 双链序列构成。

图 2B 为所构建的凝集体对药物的吸附情况。

图 2C 为药物吸附至凝集体中的时间曲线。

图 3A 为点击-释放反应的类型。

图 3B 为基于（2E）TCO 基团的点击-释放反应和基于（4E）TCO 基团的点击-连接反应的示意图。

图 3C 为和 TCO 基团反应后，Tz 基团在 530 nm 处吸光度的衰减。

图 3D 为（2E）TCO 和（4E）TCO 基团分别和 Tz 基团反应后，负载分子罗丹明 B（RB）的释放曲线。

图 4A 为组蛋白与（2E）TCO-PEG4-NHS 反应前后的分子量变化的质谱表征。

图 4B 为叠氮修饰的 DNA 与 DBCO-Tz 反应前后的分子量变化的质谱表征。

图 5 为本发明实施例中生物正交反应触发的液液相分离凝集体形成过程，图上方为点击-释放反应触发的凝集体形成过程，下方为点击-连接反应的对照组。

图 6 为本发明实施例中细胞内凝集体的形成，图左为 2E-conjugate 在细胞内发生点击-释放反应形成凝集体的共聚焦图，图右为 4E-conjugate 在细胞内发生点击-连接反应未能触发凝集体形成的对照组。比例尺为 20 微米。

图 7A 为 2E-conjugate 对 4T1 癌细胞活性的影响。

图 7B 为 2E-conjugate 对耐药癌细胞 4T1/ADR 的毒性测试。

图 8A 为单独药物和细胞内形成的载药凝集体对 4T1 细胞的杀伤效果验证。

图 8B 为单独药物和细胞内形成的载药凝集体对 4T1/ADR 细胞杀伤效果验证。

图 9A 为单独药物、凝集体/药物及非凝集体/药物作用 12 小时后，在 4T1 细胞内的保留率。

图 9B 为单独药物、凝集体/药物及非凝集体/药物作用 12 小时后，在 4T1/ADR 细胞内的保留率。

图 9C 为不同组别在 4T1/ADR 细胞的随时间变化的药物保留检测。

图 10A 为阿霉素、凝集体/药物及非凝集体/药物组在细胞内随时间变化的含量。

图 10B 为图 10A 的统计学分析，表明了不同时间点细胞内的平均药物荧光强度。

图 11A 为 Cy5 标记的凝集体+药物组和 Cy5 标记的非凝集体+药物组作用于细胞后，药物和凝集体的荧光共定位情况。比例尺为 20 微米。

图 11B 为图 11A 的统计学分析，表明了不同时间点不同组别的药物与凝集体的荧光共定位系数。

图 11C 为图 11A 的统计学分析，表明了不同时间点不同组别的平均药物吸附强度。

图 12A 为在 4T1 小鼠肿瘤模型中，各组小鼠治疗后不同天数的肿瘤生物发光成像图。

图 12B 为在 4T1 小鼠肿瘤模型中，各组小鼠治疗后肿瘤生长情况。

图 13A 为在 4T1 小鼠肿瘤模型中，各组小鼠治疗后平均肿瘤生长曲线。

图 13B 为在 4T1 小鼠肿瘤模型中，各组小鼠治疗后的生存曲线。

图 14A 为在 4T1/ADR 小鼠肿瘤模型中，各组小鼠治疗后平均肿瘤生长曲线。

图 14B 为在 4T1/ADR 小鼠肿瘤模型中，各组小鼠治疗后肿瘤生长情况。

图 14C 为在 4T1/ADR 小鼠肿瘤模型中，治疗 12 天后各组小鼠肿瘤实物图。

图 15A 为瘤内注射药物和制剂后的药物保留情况。

图 15B 为瘤内形成的药物库对经尾静脉注射药物的吸附情况。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

实施例 1：凝集体的制备和药物存储库的构建

将 4μL 组蛋白（5mg/mL，生工生物工程（上海）股份有限公司），4μL DNA（100μM，生工生物工程（上海）股份有限公司）和 2μL PEG 3350（250 mg/mL，上海麦克林生化科技股份有限公司）充分混合均匀，转移到载玻片上，盖上盖玻片，置于显微镜下观察形貌。用酶标仪测定 600nm 处的吸光度值以反映溶液浊度，在激光共聚焦显微镜下观察，利用激光漂白选定区域，监测漂白区域荧光强度恢复情况。结果表明，组蛋白和 DNA 之间会发生液-液相分离，形成液滴（图 1A），伴随溶液浊度增加（图 1B、图 1C），且液滴具有动态性质，在激光漂白其中部分区域后，可在 50 s 内恢复 DNA 的荧光强度（图 1D）。

将等量的 Seq-1（序列-1）和 Seq-2（序列-2）溶于 PBS 缓冲液（pH=7.4），40℃孵育 15 min，形成 DNA 双链。将 50μL PBS，组蛋白（2mg/mL），DNA 双链（50μM）和凝集体（C histone=2 mg/mL, C DNA duplex=50μM）分别和 50μL 阿霉素（以下简称 Dox）（5μM，上海麦克林生化科技股份有限公司）混合，在 30min 内监测阿霉素的荧光强度变化。结果表明，通过设计 DNA 双链序列，使得抗癌药物阿霉素可以嵌入 DNA 双链的 C-G 碱基对中（图 2A），药物的荧光强度淬灭证实成功负载（图 2B）。DNA 在与组蛋白形成相分离凝结体后，也可用于吸附药物，并在 30 分钟内达到吸附平衡（图 2C）。

实施例 2：生物正交反应

1、点击反应：

申请人对不同类型点击-释放反应（图 3A）进行了实验摸索，发现仅一种反应类型适用于胞内形成组蛋白和核酸的凝集体，即基于 Tz-TCO 反应对的点击-释放反应，其他基于 Tz-vinyl ethers 和 Tz-vinyl boronic acid 的点击-释放正交反应无法触发胞内相分离凝集体形成。在进行此类型反应时，选择（2E）TCO 基团和（4E）TCO 基团分别修饰组蛋白，发现仅（2E）TCO 基团修饰的情况下能够形成凝集体。具体操作如下：

将 5μL 梯度浓度的(2E)TCO-PEG4-NHS 或(4E)TCO-PEG4-NHS（0.02，0.05，0.1，0.2，0.5，1mM）（西安瑞禧生物科技有限公司）分别和 5μL Methyltetrazine-DBCO（1mM，美国 Click Chemistry Tools 公司）在室温下反应 5min 后测溶液吸光度，Tz 基团在 530nm 处的衰减用于反映 TCO 和 Tz 基团之间的点击反应。

2、释放反应：

首先将 RB-PEG-NH2 与(2E)TCO-PEG4-NHS Ester 或(4E)TCO-PEG4-NHS Ester 反应得到(2E)TCO-RB 或(4E)TCO-RB。然后，将 75μL(2E)TCO-RB 或(4E)TCO-RB(120μg/mL)与 75μL Duplex-Tz（(100μM)）混合后，置于微量透析管内管（Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device，10K MWCO），外管透析液为 13.5mL PBS。在特定时间检测，100μL 外管透析液

被取出用于检测 RB-PEG-NH_2（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）释放量（测定透析液在 530nm 波长激发下，在 590nm 处的发射荧光强度）。结果表明，基于（2E）TCO 基团和 Tz 基团的点击-释放反应可以释放出带氨基的负载物，基于（4E）TCO 基团和 Tz 基团的点击-连接反应无法释放负载物（图 3B），因此被用于后续实验的对照组。点击-释放和点击-连接反应均可使得 Tz 基团的结构发生改变，在 530nm 处的吸光度值降低（图 3C）。相比于点击-连接反应，点击-释放反应可在约 4 小时内释放出 80%以上的负载物（图 3D）。

3、组蛋白修饰：

将 2.5mg histone 溶于 10mLNaHCO_3 水溶液(0.1M，pH=8.4)，加入 50μL(2E)TCO-PEG4-NHS 或(4E)TCO-PEG4-NHS(10mg/mL in DMSO)。室温反应 4h 后，超纯水透析 1 天后冷冻干燥。

4、DNA 修饰：

将 1mL DNA-N_3（20μM in PBS buffer）与 100μL DBCO-Tz（1mM in PBS buffer）混合，置于振荡器上，600rpm，室温反应 72h。透析后冻干。结果表明，将组蛋白与（2E）TCO-PEG4-NHS 反应，将叠氮修饰的 DNA 与 DBCO-Tz 反应，使得组蛋白和 DNA 上分别连接 TCO 基团和 Tz 基团，记为 Histone-TCO 和 DNA-Tz，质谱表征修饰前后分子量的变化，证实了组蛋白与 TCO 基团、DNA 与 Tz 基团连接的成功（图 4A、图 4B）。

将 4μL(2E)Histone-TCO(5mg/mL)或(4E)Histone-TCO(5mg/mL)，4μL DNA-FITC(100μM)和 2μL PEG 3350(250mg/mL)充分混合后，转移到载玻片上，盖上盖玻片，置于共聚焦显微镜下观察。结果表明，将 DNA-Tz 与（2E）Histone-TCO 或（4E）Histone-TCO 反应，（2E）Histone-TCO 与 DNA-Tz 发生点击-释放反应，释放出带氨基的组蛋白与 DNA 发生相分离，形成大量凝集体；而（4E）Histone-TCO 与 DNA-Tz 发生点击-连接反应，无法释放出带氨基的组蛋白，凝集体形成量有限（图 5）。说明本发明中所提出的生物正交反应控制的液液相分离是可行的。

实施例 3：细胞内凝集体的形成、生物相容性测试和凝集体在细胞层面的抗癌效果

用 4T1/ADR 细胞孵育等浓度的蛋白核酸连接物 2E-conjugate 或 4E-conjugate，组蛋白和 DNA 双链浓度分别为 50μg/mL 和 1μM，共聚焦显微镜下观察不同时间点凝集体的形成。结果表明，细胞内也可观察到点击-释放反应触发的相分离凝集体形成（图 6）。

将 4T1 和 4T1/ADR 细胞分别以 5×10^3/well 的密度接种于九十六孔板，贴壁 24h 后，将梯度浓度的 2E-conjugate 加入到培养基中作用 48h，随后，细胞孵育 MTT 溶液(0.5mg/mL)4h。随后 100μL DMSO 用于溶解形成的蓝紫色结晶甲臜。细胞活性通过酶标

仪测定 490nm 吸光度反映。计算公式：Cell viability=$OD490nm_{(Treatment\ group)}$/$OD490nm_{(Control\ group)}$×100%。结果表明，细胞内形成的凝集体对 4T1 癌细胞和耐药 4T1 细胞（4T1/ADR）活性均无显著影响（图 7A、图 7B），说明了制剂具有较好的生物相容性。

将负载药物的 2E-conjugate（即 2E-conjugate/Dox），以梯度浓度单独药物 Dox 作为对照组（即阿霉素组，下同），梯度浓度 2E-conjugate/Dox 作为实验组（即凝集体/药物组），其余操作不变，观察 4T1 和 4T1/ADR 细胞的细胞活性。结果表明，细胞内形成的凝集体显著提高了药物对 4T1 细胞细胞和 4T1/ADR 细胞的杀伤效果，且随着阿霉素浓度增加，杀伤能力越强（图 8A、图 8B）。

实施例 4：细胞内药物保留情况

将耐药细胞接种于九十六孔板，贴壁 24h 后孵育 Dox、2E-conjugate/Dox（即凝集体/药物组，下同）和 4E-conjugate/Dox（即非凝集体/药物组，下同）4h（药物浓度均为 10μM）。随后，除去培养基，PBS 洗涤两遍，孵育不含药物的新鲜培养基，在一定时间间隔内，撤去培养基换上新鲜培养基，并测定细胞内药物荧光强度。结果表明，通过定量细胞内药物荧光强度，证实了凝集体在 4T1 细胞和 4T1/ADR 细胞中均提高了药物的保留率（图 9A、图 9B），且随着时间变化，在作用 24h 后依旧可以检测到药物保留（图 9C）。

细胞接种于共聚焦皿，贴壁 24h 后，持续孵育单独药物 Dox、2E-conjugate/Dox 和 4E-conjugate/Dox 不同时间，这些制剂中，药物浓度均为 10μM，组蛋白和 DNA 双链浓度分别为 200μg/mL 和 10μM。随后除去培养基，PBS 洗涤细胞两遍，Hoechst 33342 染色细胞核后固定细胞，观察细胞内药物荧光强度。结果表明，通过共聚焦定性实验，随着时间变化，荧光强度增加（图 10A），证实了带红色荧光的药物可以被凝集体长效保留在细胞内（图 10B）。

实施例 5：凝集体对药物的吸附

用 4T1/ADR 细胞预处理不含药物的 2E-conjugate-Cy5（在制备 DNA-Tz 时，用 Cy5 对 DNA 同时进行修饰）和 4E-conjugate-Cy5 4h 以形成细胞内凝集体，随后除去培养基，换为包含药物的培养基（药物浓度为 10μM）孵育不同时间，共聚焦显微镜下观察药物和 Cy5 标记的 DNA 的荧光共定位情况。荧光共定位系数和药物吸附量用 Image J 软件分析。结果表明，相比于非凝集体组，带红色荧光的药物可以被吸附至 Cy5 标记的凝集体中（图 11A），且表明了不同时间点凝集体+药物组的荧光共定位系数高于非凝集体+药物组（图 11B），平均药物吸附强度也是凝集体+药物组高于凝集体+药物组（图 11C），证实了凝集

体对药物的吸附能力强。

实施例 6：体内药效实验

将 4T1 或 4T1/ADR 细胞分别接种于 Balb/c 裸鼠后背部，待肿瘤体积增长到约 100mm^3，将小鼠随机分为四组，每组 6 只，并分别给药，G1 组：PBS；G2 组：2E-conjugate；G3 组：Dox；G4 组：2E-conjugate/Dox，对于 4T1 和 4T1/ADR 荷瘤小鼠，药物浓度分别为 0.25mg/kg 和 2.5mg/kg，每三天给一次药，每隔两天测量肿瘤体积和小鼠体重，当小鼠肿瘤体积超过 1500mm^3，安乐死小鼠。结果表明，在 4T1 小鼠肿瘤模型中肿瘤发光成像图显示凝集体/药物组的肿瘤最小（图 12A），凝集体/药物组的肿瘤尺寸最小（图 12B），随着治疗天数增加，凝集体/药物组肿尺寸增加缓慢（图 13A），且存活比率显著增加（图 13B）。在 4T1 及 4T1/ADR 小鼠肿瘤模型中，给药后凝集体/药物组肿尺寸增加缓慢（图 14A）、凝集体/药物组的肿瘤尺寸最小（图 14B）且小鼠肿瘤体积有了显著程度的抑制（图 14C）。体内药效实验证实了凝集体可以显著提高药物的抗肿瘤效果，小鼠生存时间显著延长，基于凝集体的药物保留策略可显著提高药物疗效。

实施例 7：药物在肿瘤组织的积累情况

1、药物保留：

荷瘤小鼠瘤内注射 Dox，2E-conjugate/Dox，4E-conjugate/Dox，24h 后，安乐死小鼠，取出肿瘤组织，制作冰冻切片，DAPI 染色细胞后，共聚焦显微镜下观察药物在肿瘤组织内的保留情况。

2、药物吸附：

荷瘤小鼠瘤内注射 PBS、2E-conjugate, 4E-conjugate，同时尾静脉注射阿霉素，24h 后，安乐死小鼠，取出肿瘤组织，制作冰冻切片，DAPI 染色细胞后，共聚焦显微镜下观察药物在肿瘤组织内的吸附情况。结果表明，肿瘤组织切片证实了生物正交的点击-释放反应不仅可作为药物递送体系，利用较大的尺寸阻滞效果提高药物在细胞内的保留（图 15A），还可通过瘤内形成的药物库吸附尾静脉注射的药物，从而实现肿瘤组织内的药物提升（图 15B），增强抗肿瘤疗效。

虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求

1. 一种可形成相分离凝集体的核酸蛋白组合，其特征在于，其包含：修饰的蛋白质和修饰的核酸，所述核酸包括 DNA 和 RNA，所述修饰的蛋白质与修饰的核酸可发生点击-释放反应，使蛋白质与核酸发生相分离，形成所述相分离凝集体。

2. 如权利要求 1 所述的核酸蛋白组合，其特征在于，所述点击-释放反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行；和/或，所述修饰的蛋白质为（2E）TCO 修饰的蛋白质即蛋白质-TCO，所述修饰的核酸为四嗪修饰的核酸即核酸-Tz；

较佳地，当所述点击-释放反应在体外无细胞的溶液中进行时，所述蛋白质的浓度大于 1mg/mL，优选小于 5 mg/mL，所述 DNA 的浓度大于 20μM，优选小于 100 μM；更佳地，所述蛋白质的浓度大于 2mg/mL 且小于 5 mg/mL，所述 DNA 的浓度大于 30μM 且小于 100μM；

或，当所述点击-释放反应在胞内进行时，所述蛋白质的浓度大于 50μg/mL，优选小于 200μg/mL，所述 DNA 的浓度大于 1μM，优选小于 10μM；更佳地，所述蛋白质的浓度大于 100μg/mL 且小于 200μg/mL，所述 DNA 的浓度大于 5μM 且小于 10μM。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的核酸蛋白组合，其特征在于，所述蛋白质选自具相分离能力的蛋白质，优选富含氨基的蛋白质；所述核酸选自富含重复碱基序列且能稳定存在的核酸，例如包含重复 C-G 碱基对的双链 DNA 或双链 RNA；

优选地，所述富含氨基的蛋白质包括组蛋白或朊病毒样蛋白，例如 FUS；和/或，所述蛋白质的分子量范围为 10-20 kDa；和/或，所述核酸的长度为 25~30 bp；

更优选地，所述组蛋白选自组蛋白 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 中的一种或多种；所述 DNA 的两条单链核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示。

4. 一种药物组合，其特征在于，其包含如权利要求 1~3 任一项所述的核酸蛋白组合和药物；

优选地，所述药物嵌入核酸的 C-G 碱基对中；和/或，所述药物选自阿霉素、米托蒽醌、顺铂和四环素中的一种或多种。

5. 一种试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包含如权利要求 1~3 任一项所述的核酸蛋白组合；

优选地，还包含（2E）TCO、（4E）TCO、叠氮和四嗪中的一种或多种；和/或，还包含选自阿霉素、米托蒽醌、顺铂和四环素中的一种或多种的药物。

6. 一种制备凝集体的方法，其特征在于，所述方法包含如下步骤：

将如权利要求 1~3 任一项所述的核酸蛋白组合中的蛋白质-TCO 和核酸-Tz 反应，产

生所述凝集体；

优选地，所述反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括以下步骤：

（1）将蛋白质与（2E）TCO-PEG4-NHS 反应，制备蛋白质-TCO；

（2）将叠氮修饰的双链 DNA 或双链 RNA 与 DBCO-Tz 反应，制备双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz。

8. 一种制备含药物的凝集体的方法，其特征在于，所述方法包含如下步骤：

（1）将药物载入如权利要求 1~3 任一项所述的核酸蛋白组合中的核酸-Tz 例如双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz；

（2）将蛋白质-TCO 和包载药物的双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz 反应，产生所述含药物的凝集体；优选地，所述反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

（1）将蛋白质与（2E）TCO-PEG4-NHS 反应，制备蛋白质-TCO；

（2）将叠氮修饰的双链 DNA 或双链 RNA 与 DBCO-Tz 反应，制备双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz；

（3）将药物载入双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz；

（4）将所述蛋白质-TCO 和包载药物的双链 DNA-Tz 或双链 RNA-Tz 反应，产生含药物的凝集体；优选地，所述反应在体外无细胞的溶液中或胞内进行。

10. 如权利要求 1~3 任一项所述的核酸蛋白组合或如权利要求 4 所述的药物组合在制备治疗肿瘤或耐药菌感染的药物或试剂盒中的应用。

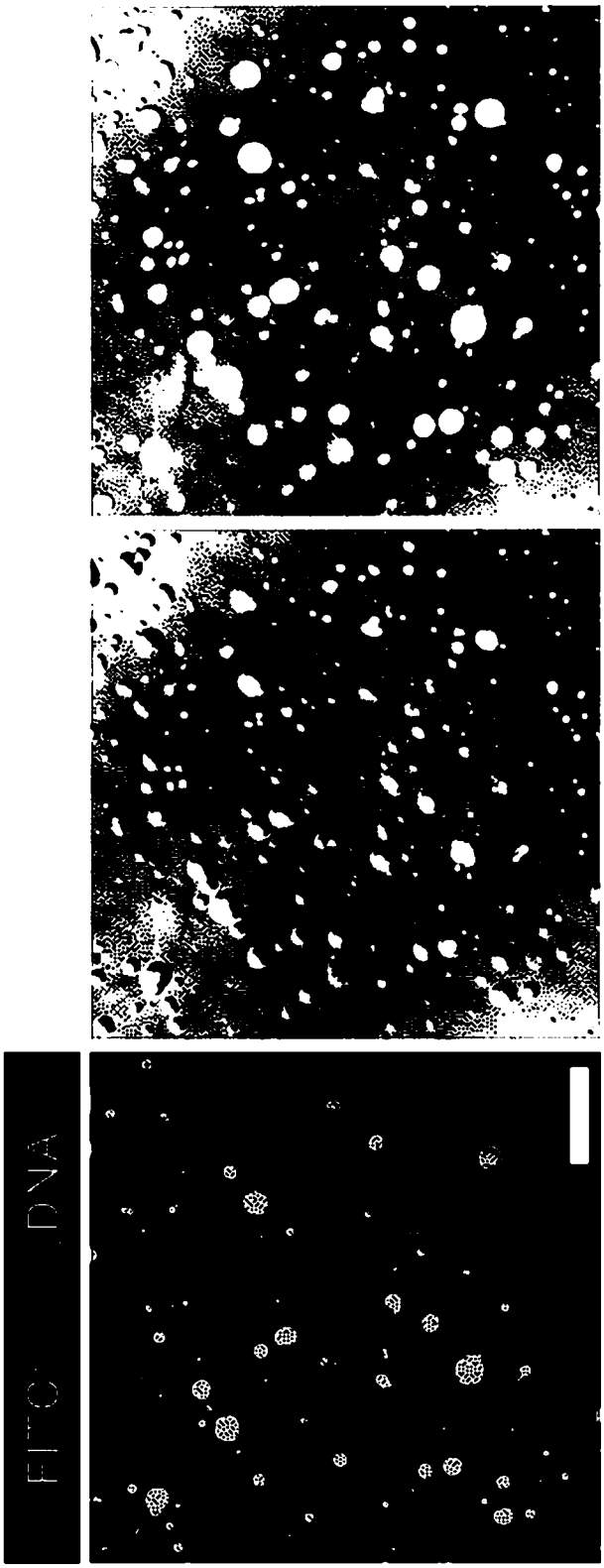


图 1A

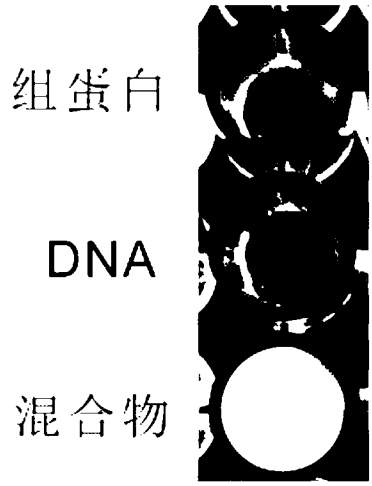


图 1B

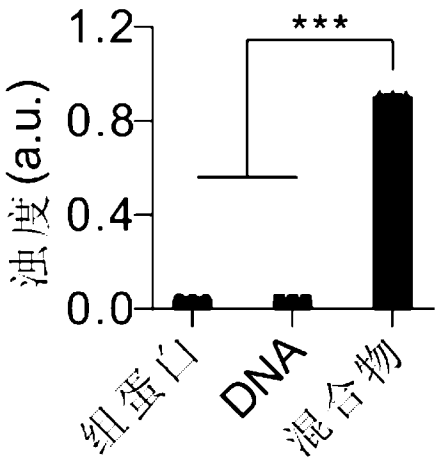


图 1C

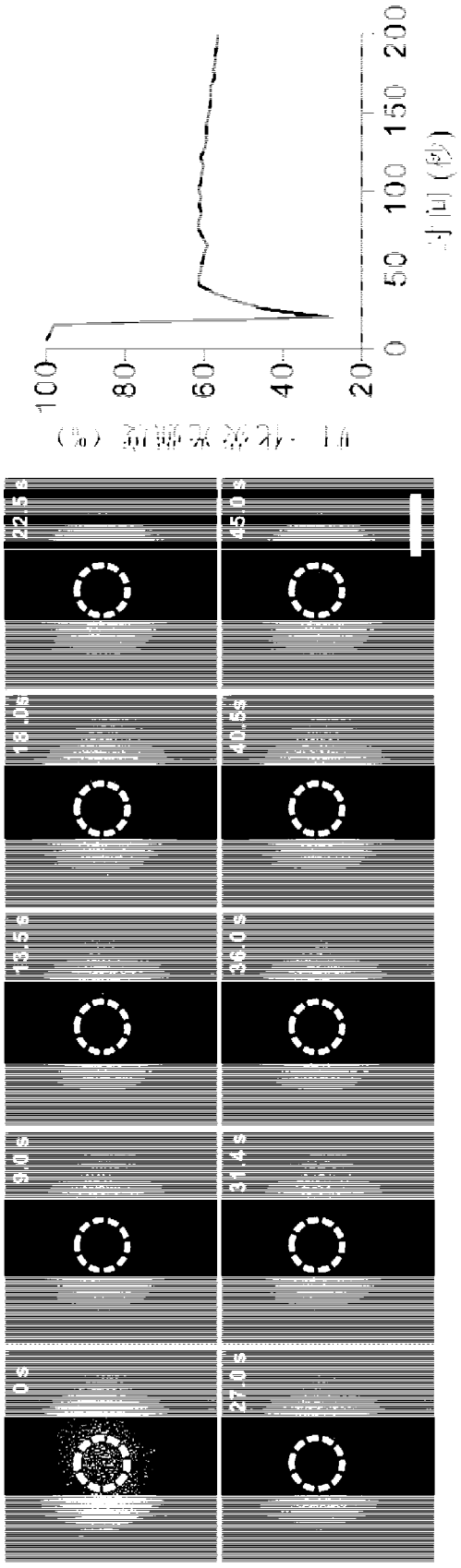
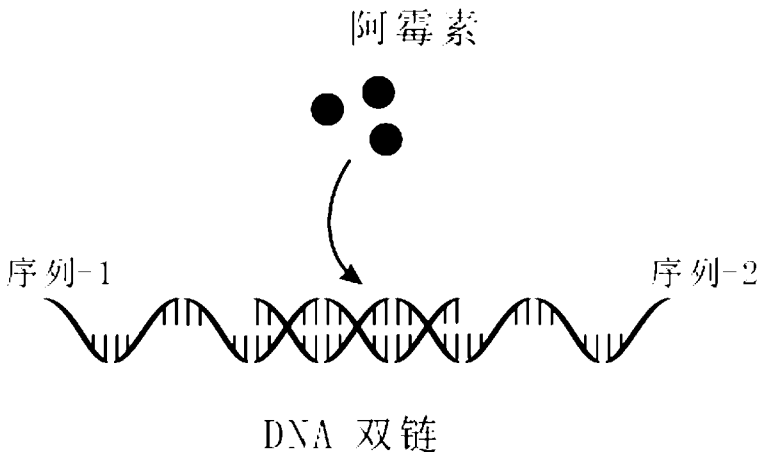

100
80
60
40
20
0
50
100
150
200
时间 (秒)
2.5 s
45.0 s
18.0 s
40.5 s
13.5 s
36.0 s
9.0 s
31.5 s
0 s
27.0 s

图 1D



序列-1：5'-AAA AAAAAAAAAAAAAAACCCGCCCGCCCG-3'
序列-2：5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAACGGGCGGGCGGG-3'

图 2A

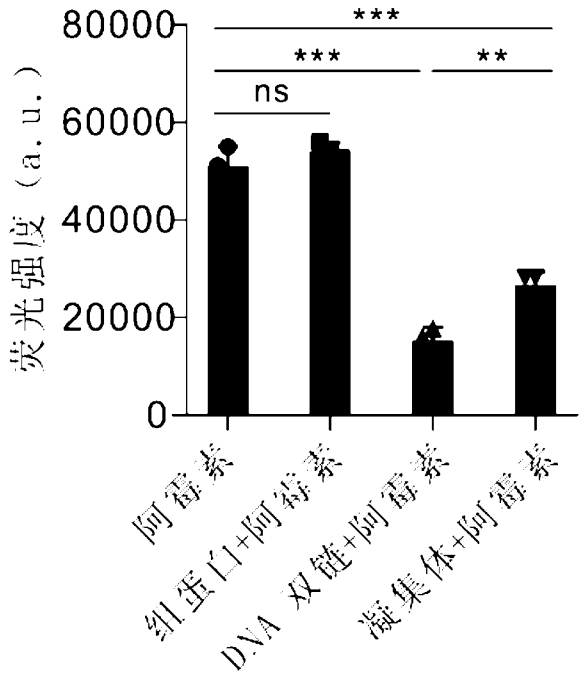


图 2B

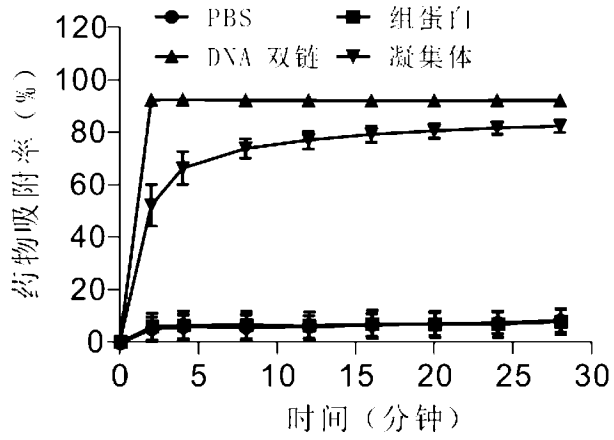


图 2C

点击-释放反应类型反应

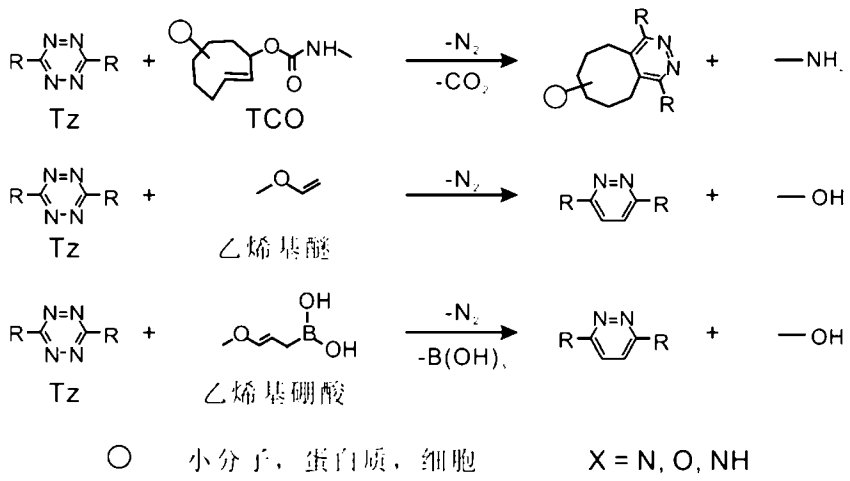


图 3A

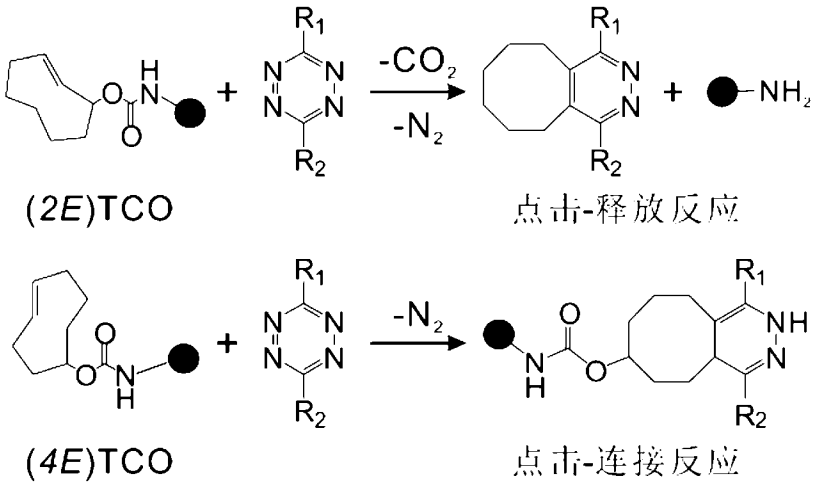


图 3B

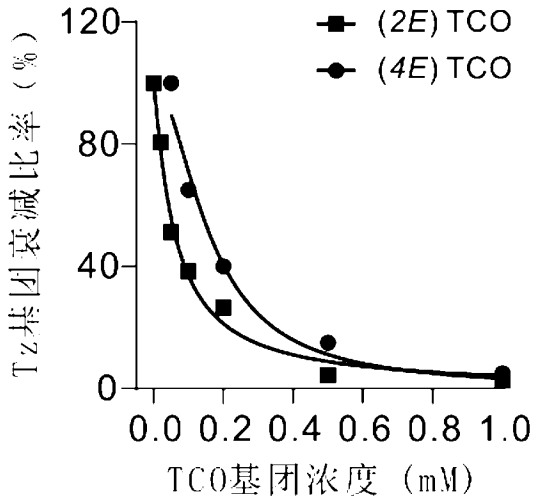

120
80
40
0
Tz基团衰减比率（%）
(2E) TCO
(4E) TCO
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
TCO基团浓度（mM）

图 3C

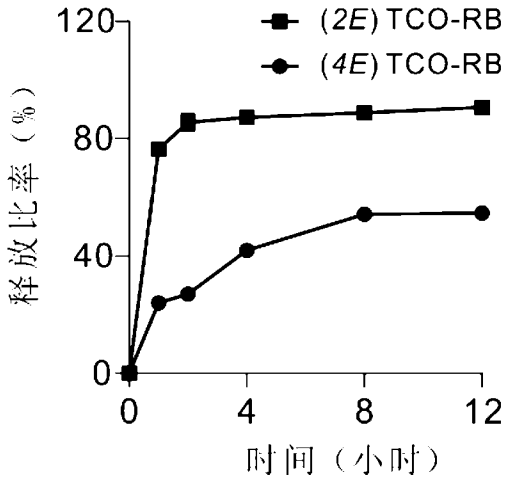

120
80
40
0
释放比率（%）
(2E) TCO-RB
(4E) TCO-RB
0
4
8
12
时间（小时）

图 3D

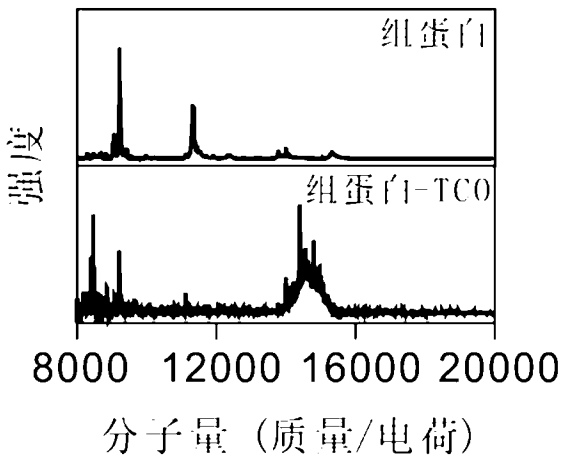

强度
组蛋白
组蛋白-TCO
8000 12000 16000 20000
分子量（质量/电荷）

图 4A

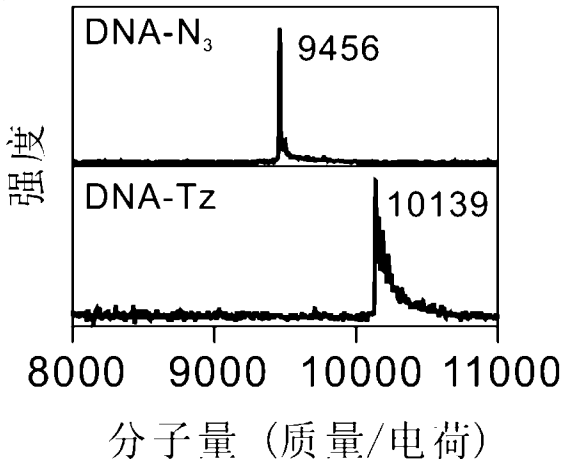


图 4B

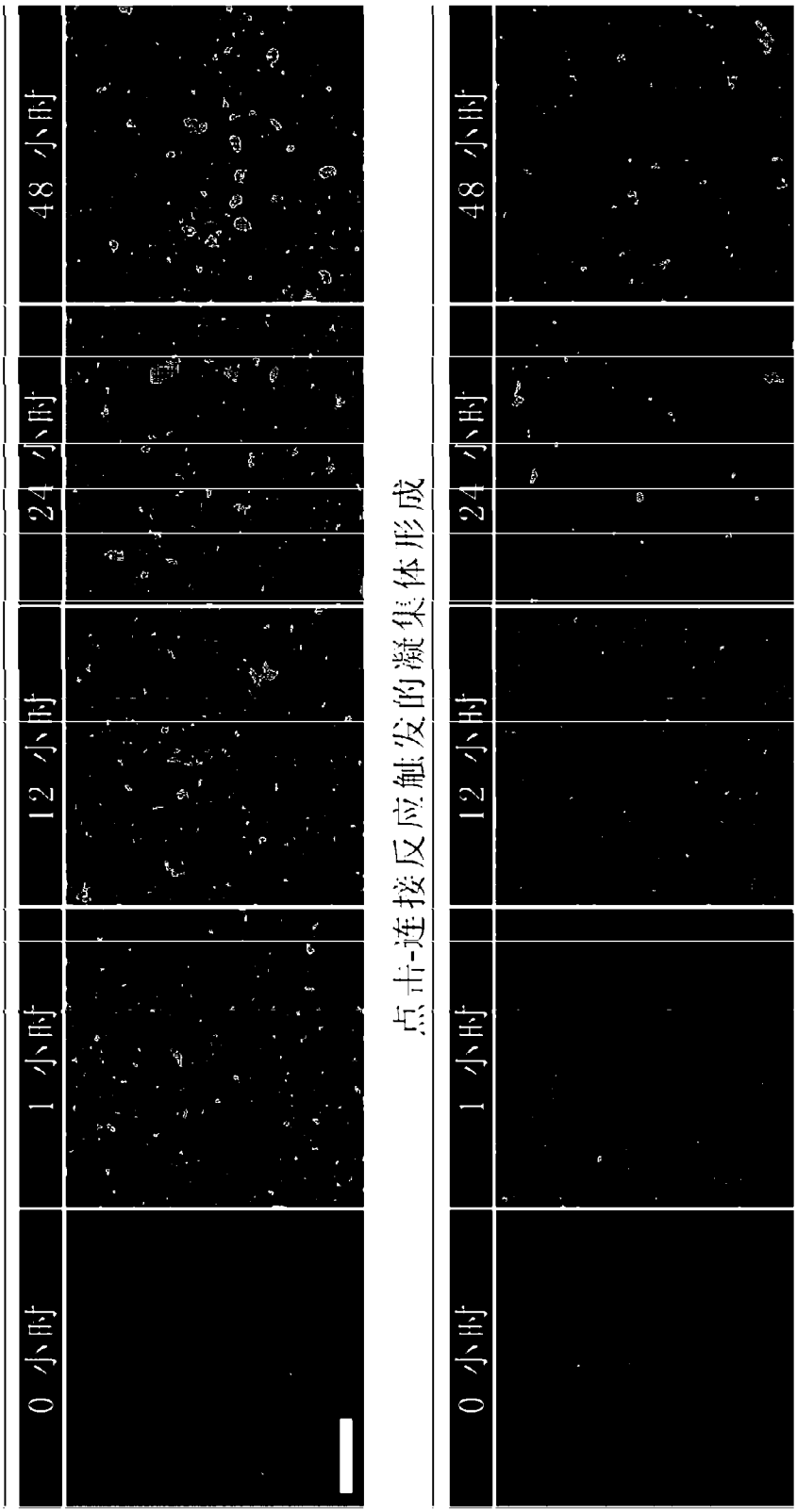

点击-释放触发的凝集体形成
0 小时
1 小时
12 小时
24 小时
48 小时
点击-连接反应触发的凝集体形成
0 小时
1 小时
12 小时
24 小时
48 小时

图 5

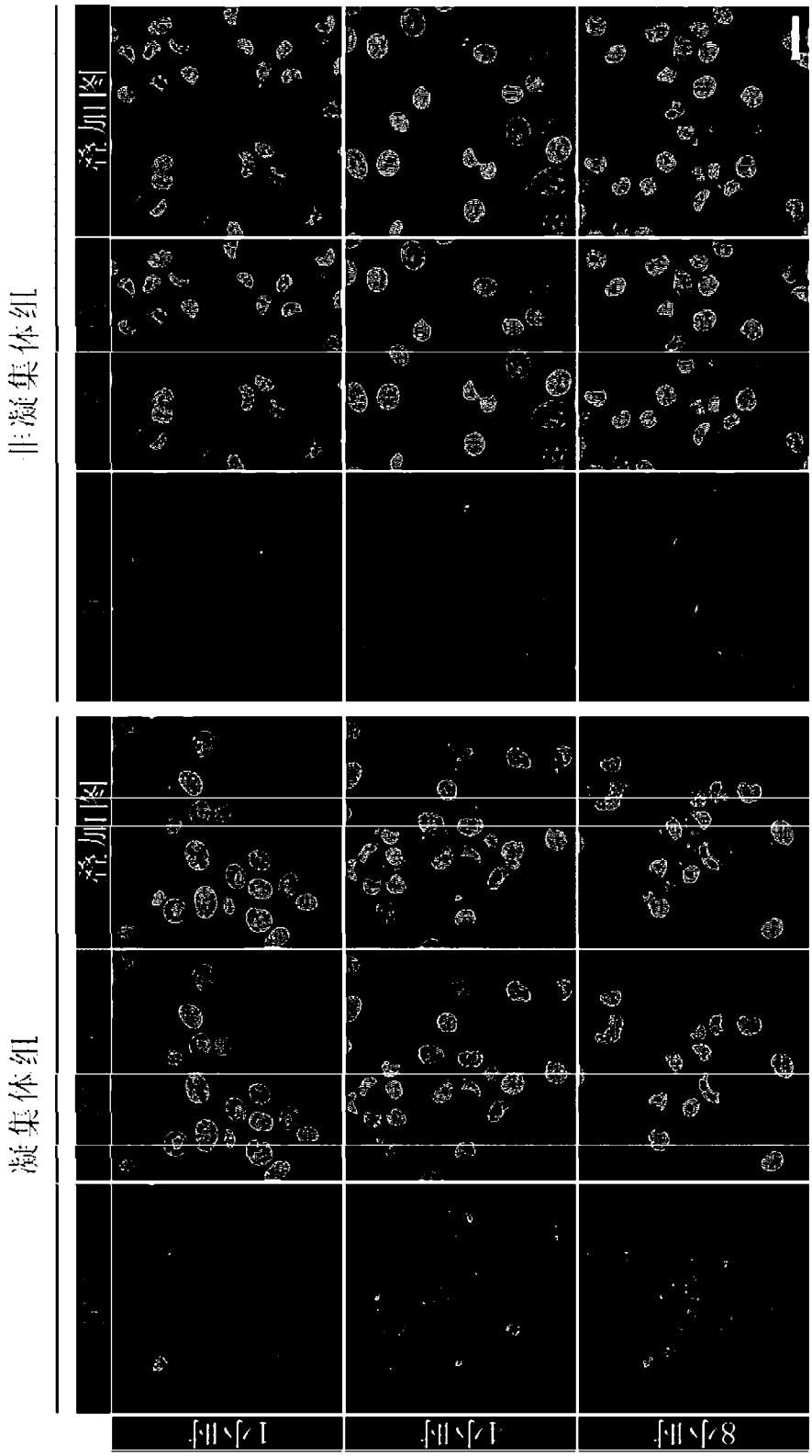


图 6

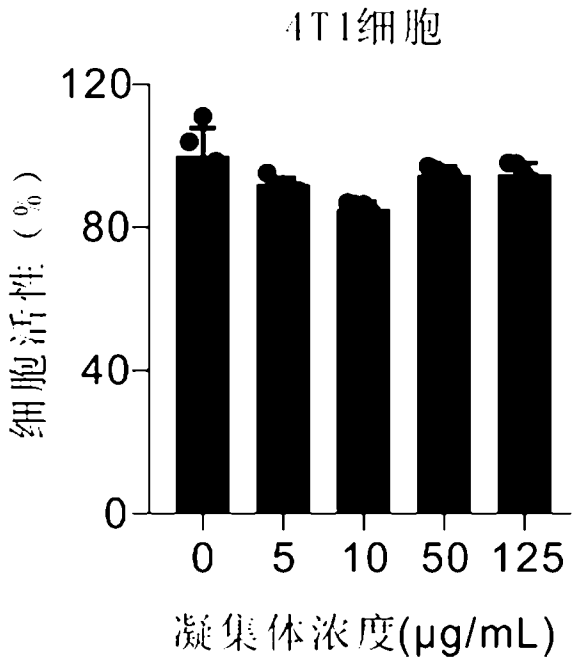

4T1细胞
120
80
40
0
细胞活性（%）
0
5
10
50
125
凝集体浓度(μg/mL)

图 7A

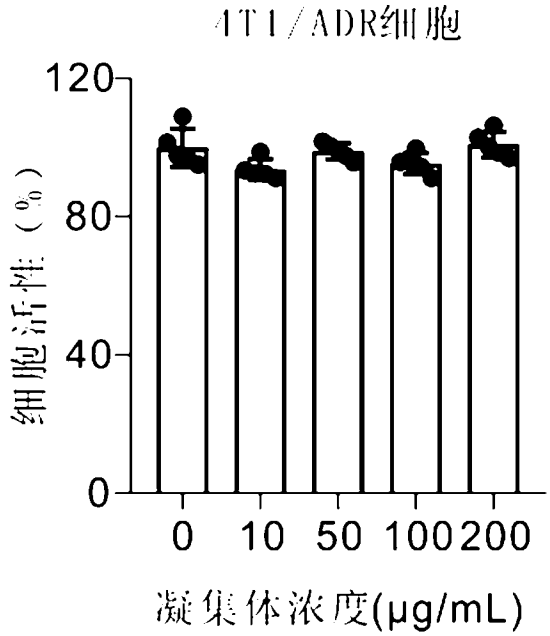

4T1/ADR细胞
120
80
40
0
细胞活性（%）
0
10
50
100
200
凝集体浓度(μg/mL)

图 7B

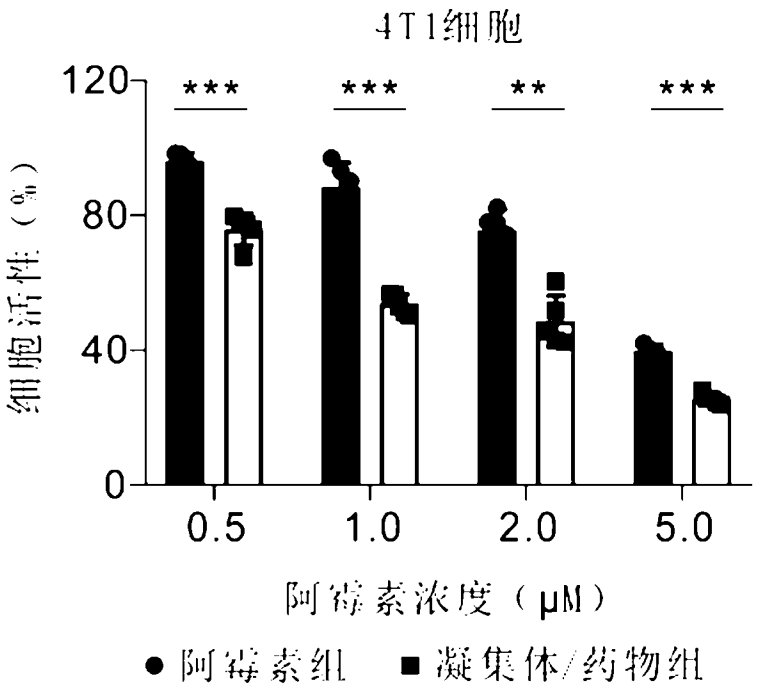

4T1细胞
120
80
40
0
***
***
**
***
细胞活性（%）
0.5
1.0
2.0
5.0
阿霉素浓度（μM）
阿霉素组
凝集体/药物组

图 8A

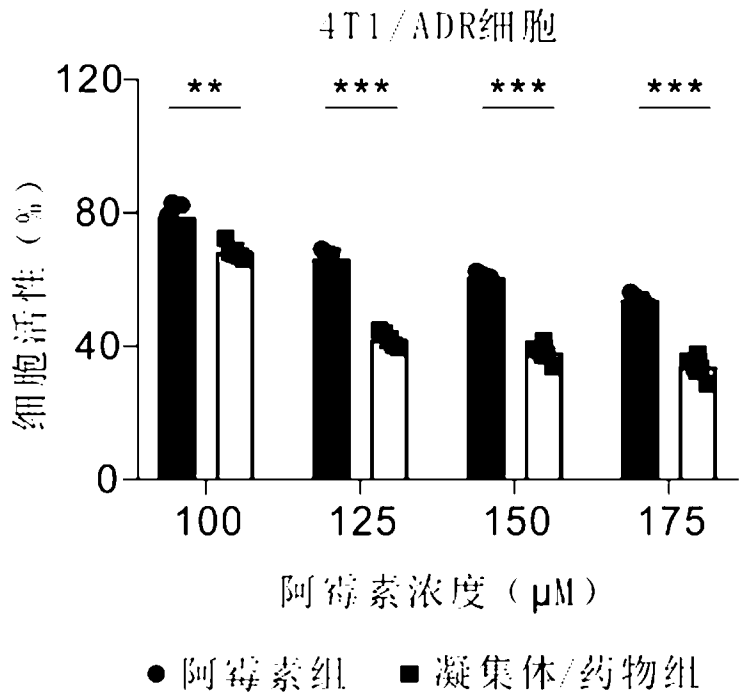

4T1/ADR细胞
120
80
40
0
**
***
***
***
细胞活性（%）
100
125
150
175
阿霉素浓度（μM）
阿霉素组
凝集体/药物组

图 8B

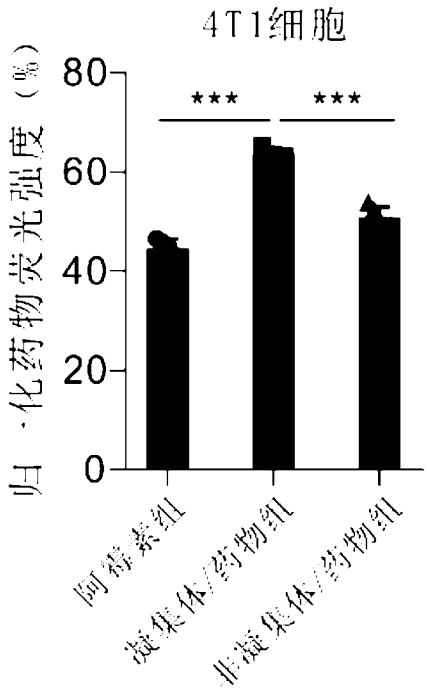

4T1细胞
归一化药物荧光强度（%）
80
60
40
20
0
***
***
阿霉素组
凝集体/药物组
非凝集体/药物组

图 9A

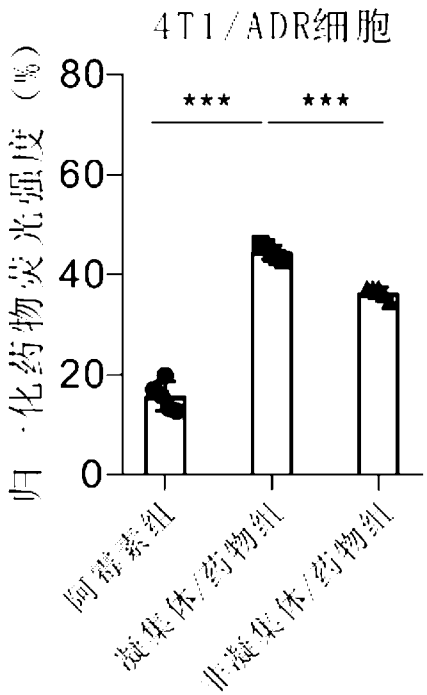

4T1/ADR细胞
归一化药物荧光强度（%）
80
60
40
20
0
***
***
阿霉素组
凝集体/药物组
非凝集体/药物组

图 9B

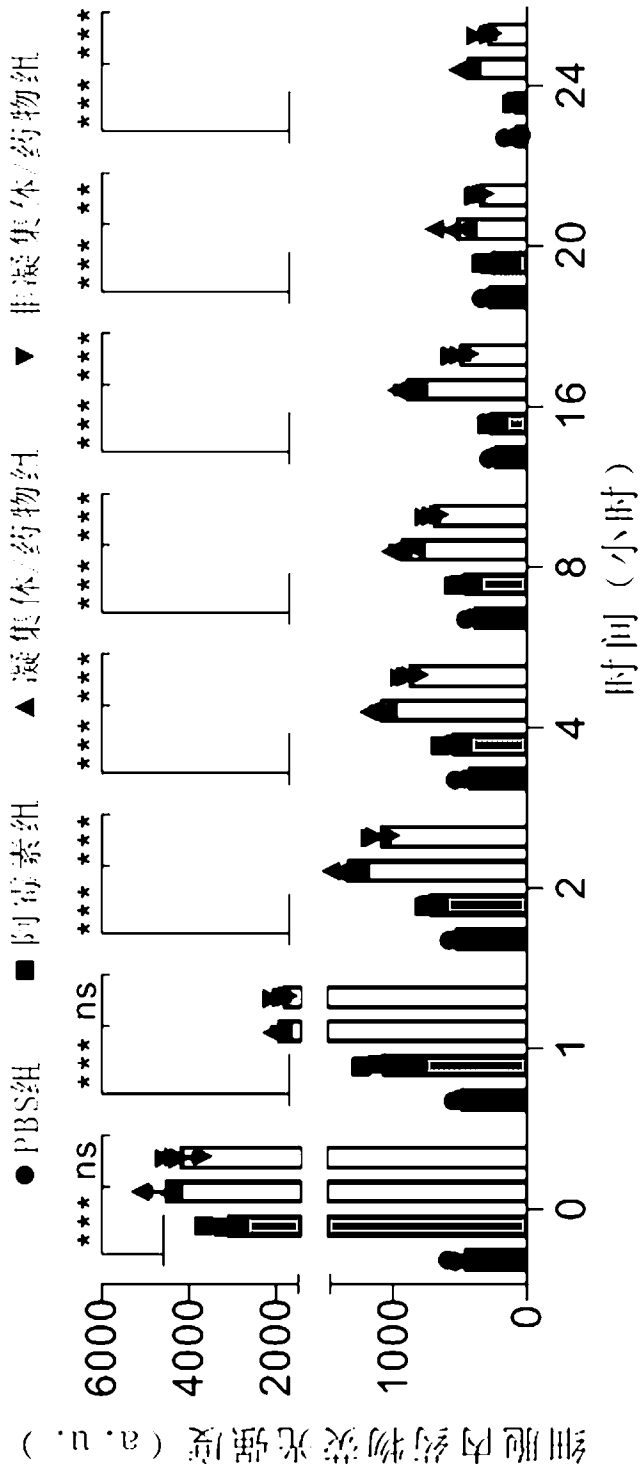

● PBS组
■ 阿霉素组
▲ 凝集体药物组
▼ 非凝集体药物组
细胞内药物荧光强度（a. u.）
6000
4000
2000
1000
0
0
1
2
4
8
16
20
24
时间（小时）
*** ns
*** ns
*** ***
*** ***
*** ***
*** ***
*** **
*** ***

图 9C

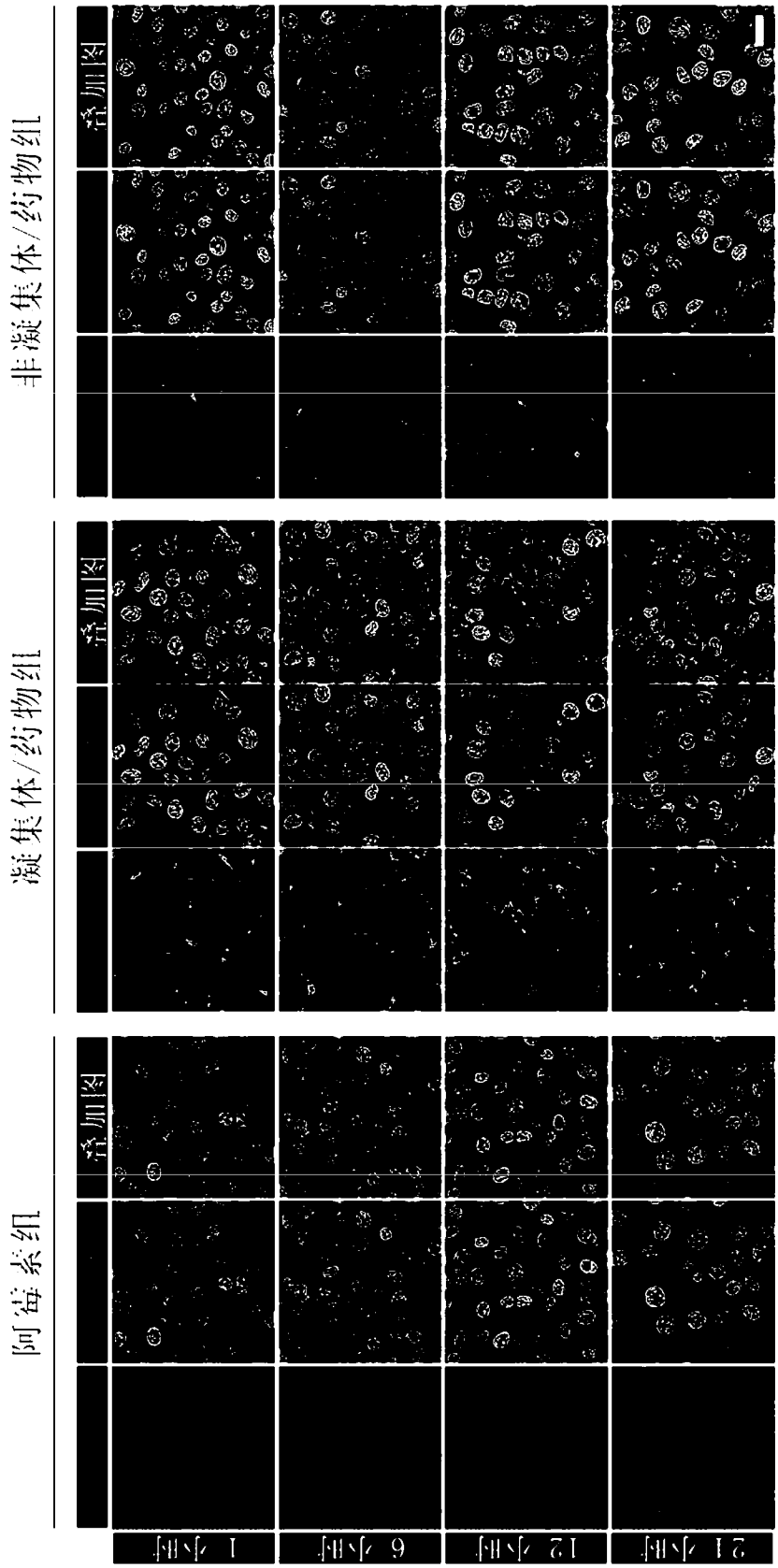


图 10A

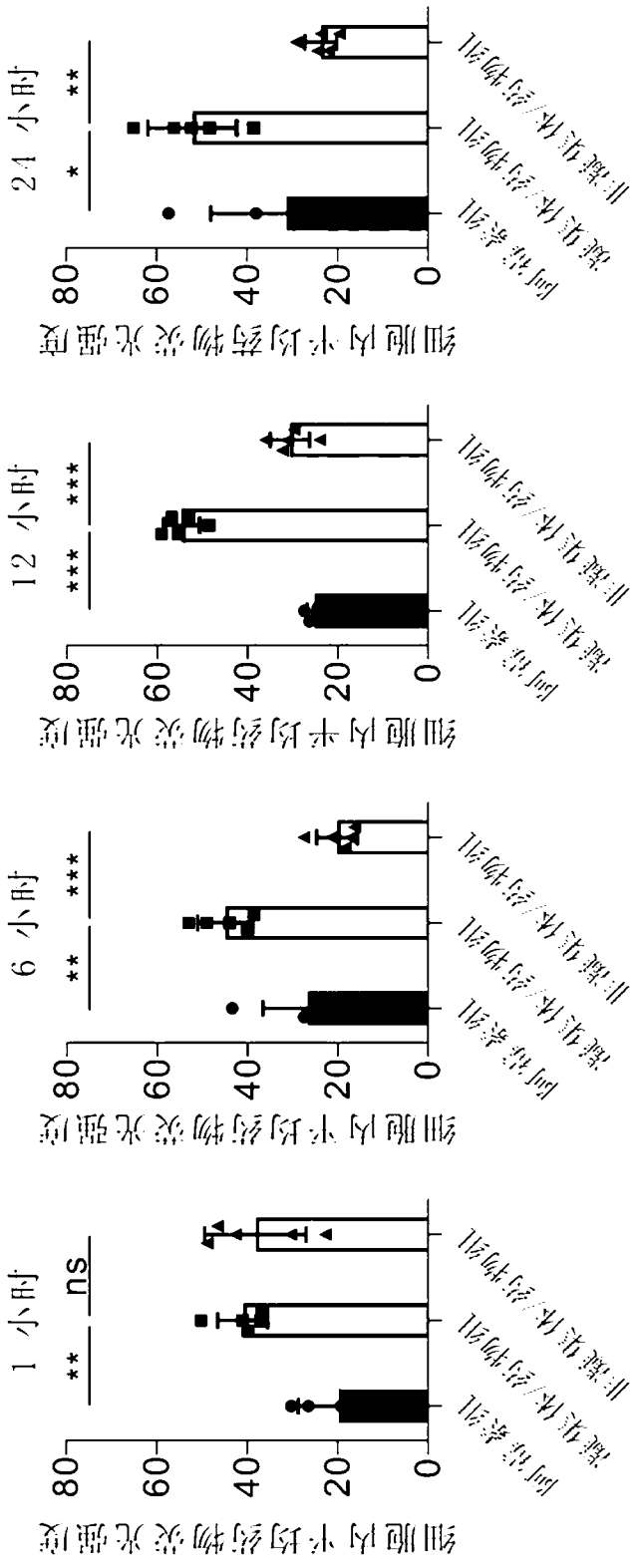

1 小时
6 小时
12 小时
24 小时
细胞内平均药物荧光强度
0
20
40
60
80
ns
**
***
阿帕替尼
康龙化成药物乳
非康龙化成药物乳

图 10B

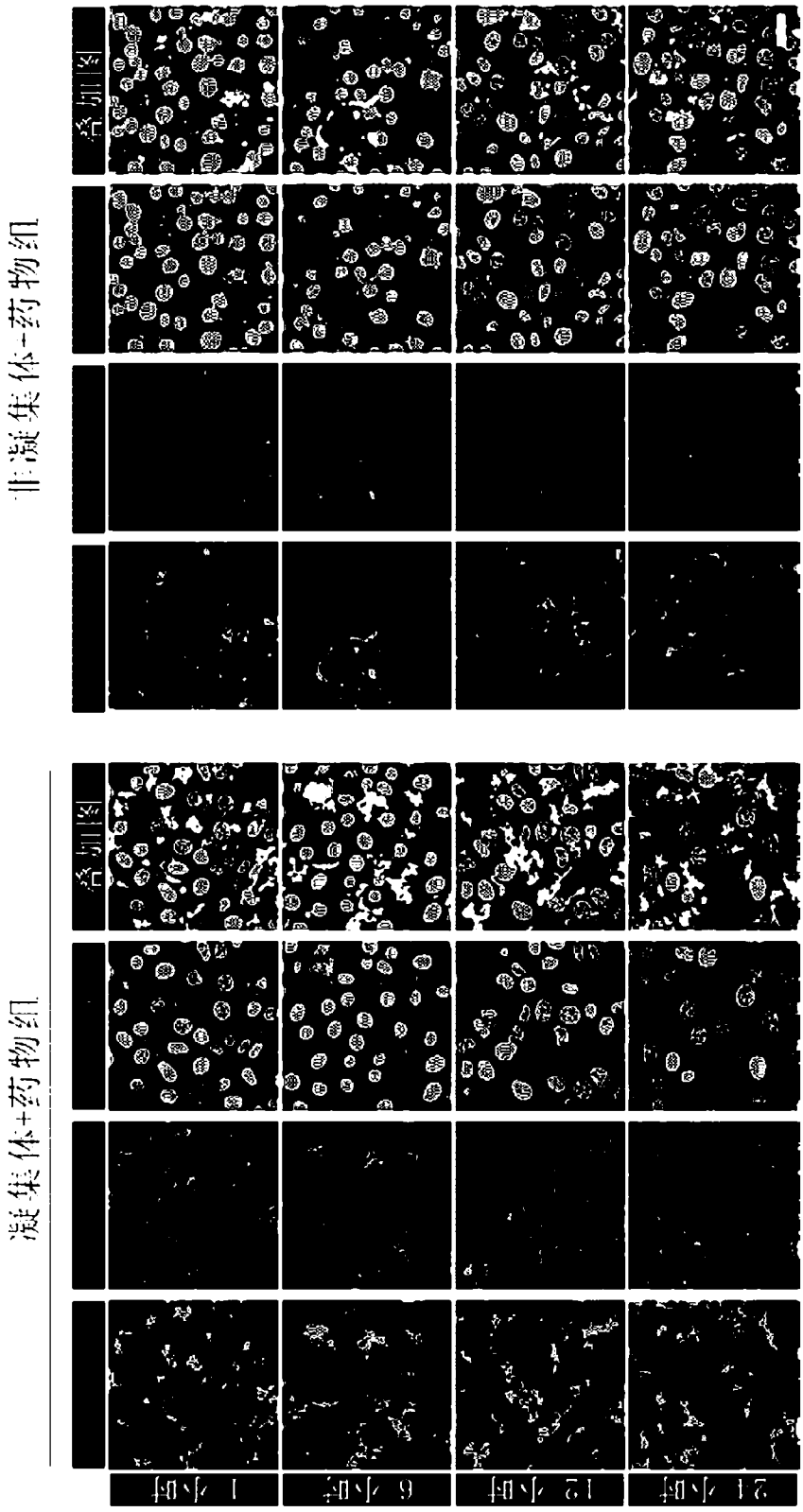


图 11A

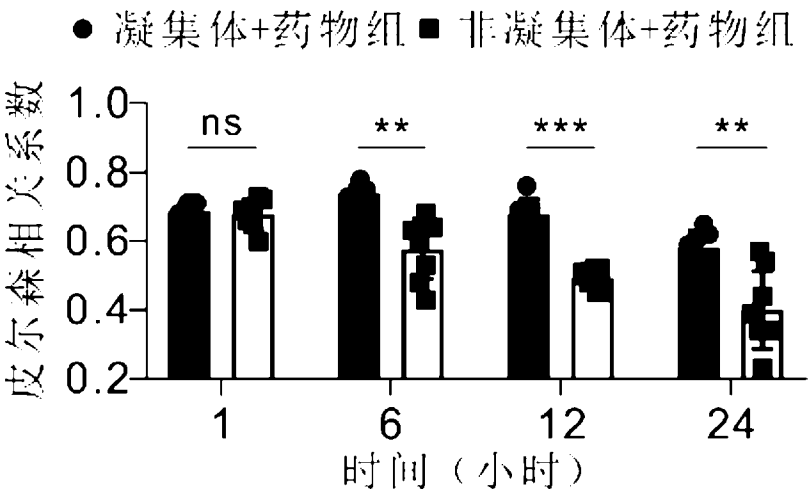

● 凝集体+药物组 ■ 非凝集体+药物组
皮尔森相关系数
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
ns
**
***
**
1
6
12
24
时间（小时）

图 11B

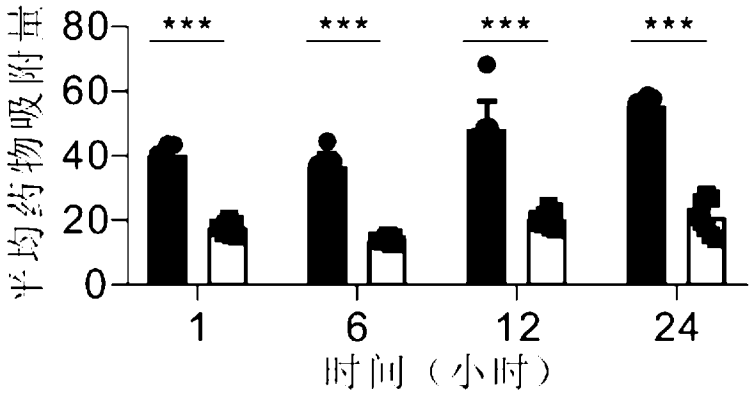

平均药物吸附量
80
60
40
20
0
***
***
***
***
1
6
12
24
时间（小时）

图 11C



图 12A

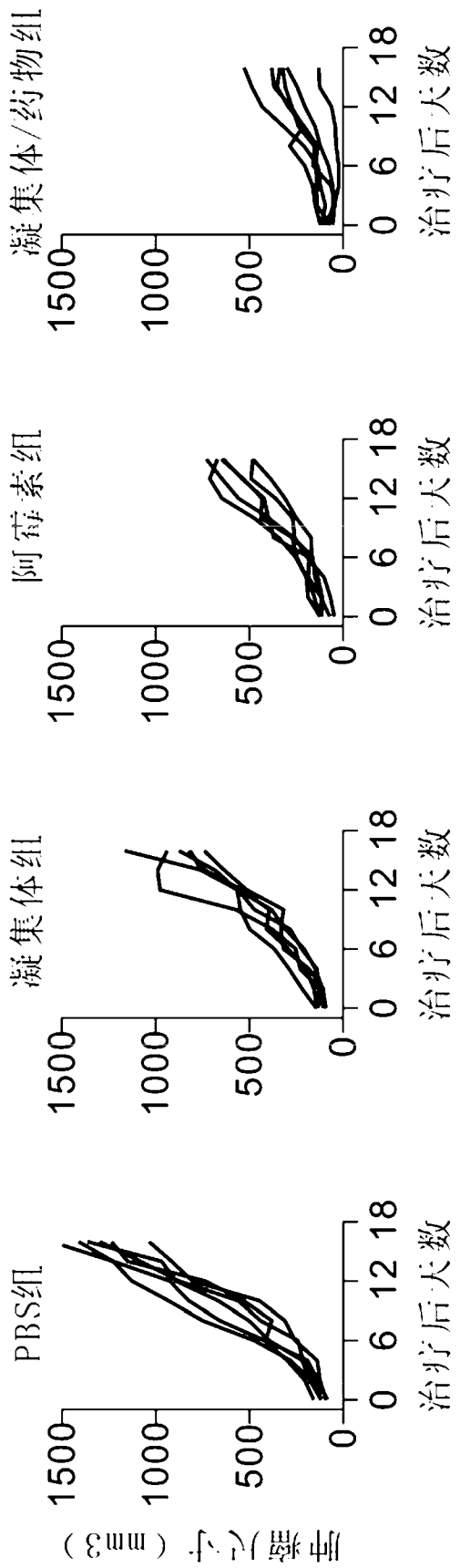


图 12B

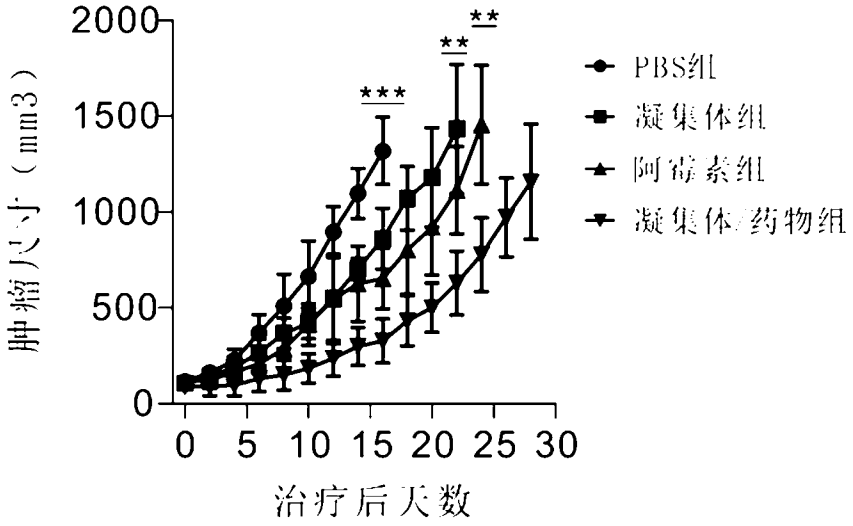


图 13A

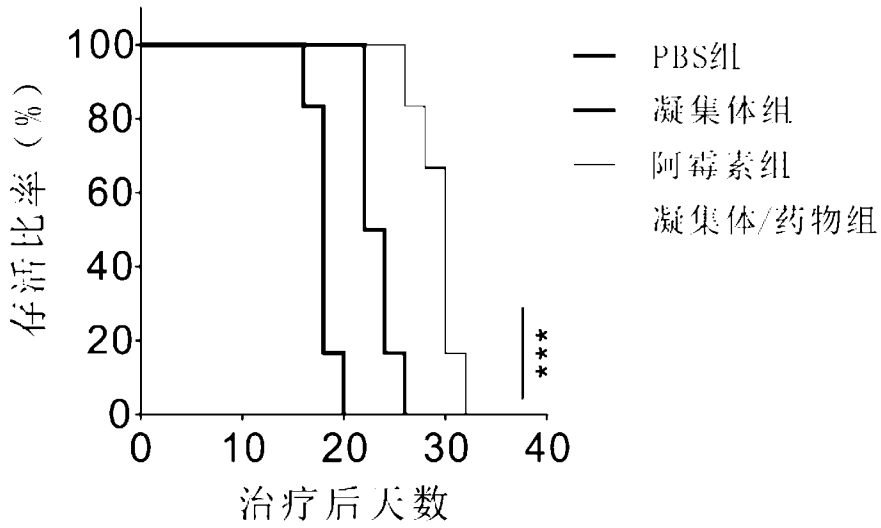


图 13B

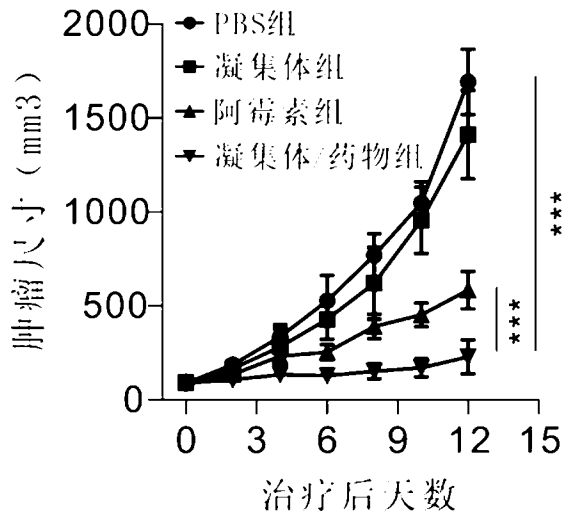


图 14A

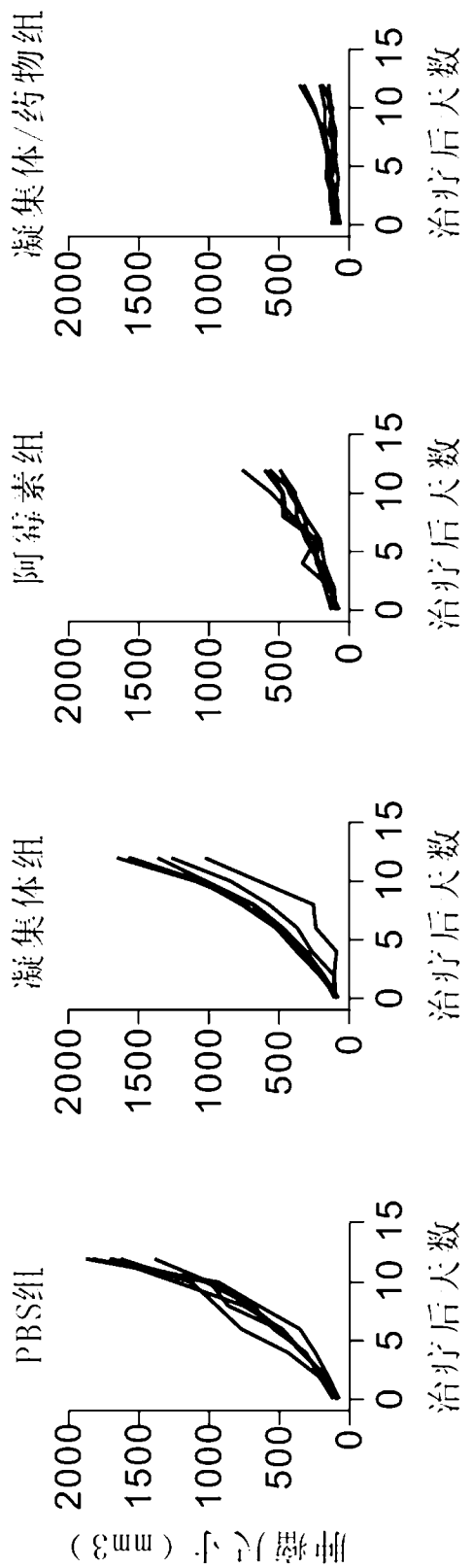

PBS组
凝集体组
阿霉素组
凝集体/药物组
肿瘤体积（mm3）
2000
1500
1000
500
0
0 5 10 15
治疗后天数

图 14B

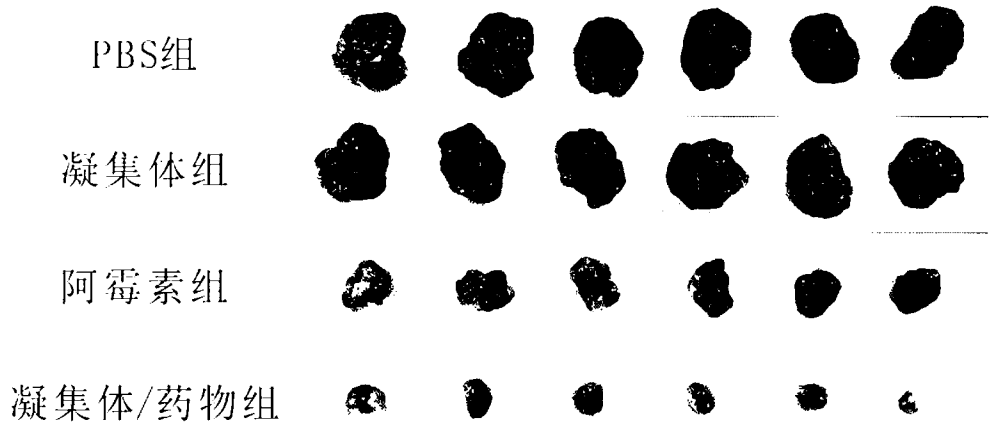


图 14C

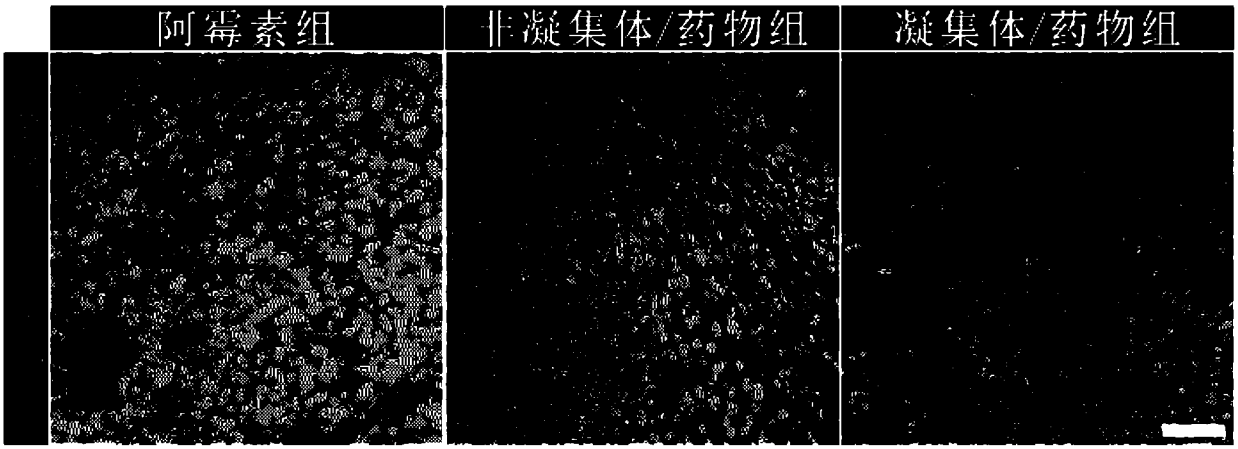


图 15A

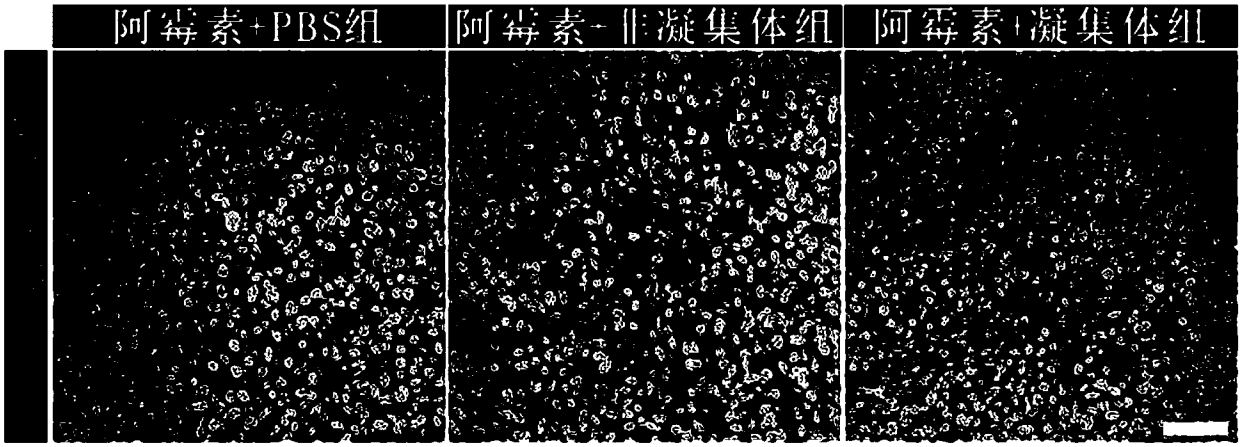


图 15B

PCT/CN2023/095383

A. 主题的分类

A61K47/69(2017.01)i；A61K47/56(2017.01)i；A61K47/42(2017.01)i；A61K31/704(2006.01)i；A61P35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：A61K，A61P，C07C，C07D，C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

数据库：CJFD,CNTXT,DWPI,ENTXTC,WPABSC,CNABS,VEN,CNKI,PUBMED,STN,中国专利生物序列检索系统;
关键词:点击，释放，生物正交，反式环辛烯多肽，TCO，四嗪，核酸，DNA，RNA，蛋白，阿霉素，多柔比星，米托蒽醌，顺铂，四环素，CG，嵌入，组蛋白，阮蛋白，FUS，肿瘤，癌，click-to-release，tetrazine，Tz，bioorthogonal，trans-cyclooctene，nucleotides，protein，DOX，doxorubicin，adriamycin，mitoxantrone，tetracycline，cisplatin，histone，prion，intercalat+，cancer，tumor，anticancer，antitumor

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 112779240 A (北京大学) 2021年5月11日 (2021 - 05 - 11) 摘要，权利要求1-14	1-10
A	CN 115135628 A (泰克沃尔科斯制药有限公司；维也纳工业大学) 2022年9月30日 (2022 - 09 - 30) 权利要求1-14，说明书第[0851]-[0853]，[1230]-[1235]段，附图1-6	1-10
A	GB 1440626 A (FARMACEUTICI ITALIA) 1976年6月23日 (1976 - 06 - 23) 权利要求1-10	1-10
A	US 2018078649 A1 (THE METHODIST HOSPITAL SYSTEM) 2018年3月22日 (2018 - 03 - 22) 权利要求1-45	1-10
A	WO 2012061402 A2 (UNIV SYRACUSE) 2012年5月10日 (2012 - 05 - 10) 说明书第[0004]段	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“D” 申请人在国际申请中引证的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2024年1月22日	2024年2月8日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	韦轶 电话号码 (+86) 010-62412193

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2018004338 A1 (TAGWORKS PHARMACEUTICALS B V) 2018年1月4日 (2018 - 01 - 04) 摘要，权利要求1-35，说明书实施例1-9，1-23	1-10
A	WO 2022072949 A2 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL) 2022年4月7日 (2022 - 04 - 07) 说明书第1页第3段至第3页第1段	1-10
A	王晓蒙等. "四嗪生物正交点击-释放反应释放多肽研究与应用" 药学学报, 第55卷，第07期，2020年4月24日 (2020 - 04 - 24)，1634-1646 第1635页右栏第2段	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/095383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/69(2017.01)i; A61K47/56(2017.01)i; A61K47/42(2017.01)i; A61K31/704(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P, C07C, C07D, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CJFD, CNTXT, DWPI, ENTXTC, WPABSC, CNABS, VEN, CNKI, PUBMED, STN, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System; keywords: 点击, 释放, 生物正交, 反式环辛烯多肽, TCO, 四嗪, 核酸, DNA, RNA, 蛋白, 阿霉素, 多柔比星, 米托蒽醌, 顺铂, 四环素, CG, 嵌入, 组蛋白, 阮蛋白, FUS, 肿瘤, 癌, click-to-release, tetrazine, Tz, bioorthogonal, trans-cyclooctene, nucleotides, protein, DOX, doxorubicin, adriamycin, mitoxantrone, tetracycline, cisplatin, histone, prion, intercalat+, cancer, tumor, anticancer, antitumor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112779240 A (PEKING UNIVERSITY) 11 May 2021 (2021-05-11) abstract, and claims 1-14	1-10
A	CN 115135628 A (TAGWORKS PHARMACEUTICALS B.V.; TECHNISCHE UNIVERSITAT WIEN) 30 September 2022 (2022-09-30) claims 1-14, and description, paragraphs [0851]-[0853] and [1230]-[1235], and figures 1-6	1-10
A	GB 1440626 A (FARMACEUTICI ITALIA) 23 June 1976 (1976-06-23) claims 1-10	1-10
A	US 2018078649 A1 (THE METHODIST HOSPITAL SYSTEM) 22 March 2018 (2018-03-22) claims 1-45	1-10
A	WO 2012061402 A2 (UNIV SYRACUSE) 10 May 2012 (2012-05-10) description, paragraph [0004]	1-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 January 2024	**08 February 2024**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018004338 A1 (TAGWORKS PHARMACEUTICALS B.V.) 04 January 2018 (2018-01-04) abstract, claims 1-35, and description, embodiments 1-9 and 1-23	1-10
A	WO 2022072949 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 07 April 2022 (2022-04-07) description, page 1, paragraph 3 to page 3, paragraph 1	1-10
A	王晓蒙等 (WANG, Xiaomeng et al.). "四嗪生物正交点击-释放反应释放多肽研究与应用 (Tetrazine Bioorthogonal Click-to-Release Reaction for Releasing Peptides)" *药学学报 (Acta Pharmaceutica Sinica),* Vol. 55, No. (07), 24 April 2020 (2020-04-24), 1634-1646 page 1635, right-hand column, paragraph 2	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/095383

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/095383

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **6-9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 relates to a method for preparing an aggregate, which method comprises the step of carrying out a reaction in a cell, and a disease treatment method cannot be excluded therefrom. Therefore, said claim falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which no search is required. On the basis of the same reasoning, a disease treatment method also cannot be excluded from claims 7-9, and therefore said claims fall within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which no search is required. The search report regarding claims 6-9 is provided for the technical solution that the reaction is carried out in a cell-free solution in vitro.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/095383

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112779240	A	11 May 2021	WO	2021093752	A1	20 May 2021
CN	115135628	A	30 September 2022	WO	2020256546	A1	24 December 2020
				AU	2020297253	A1	03 February 2022
				IL	289093	A	01 February 2022
				CA	3143925	A1	24 December 2020
				US	2023121556	A1	20 April 2023
				EP	3983363	A1	20 April 2022
				JP	2022537543	A	26 August 2022
GB	1440626	A	23 June 1976	FR	2227867	A1	29 November 1974
				FR	2227867	B1	18 August 1978
				BE	814415	A	30 October 1974
US	2018078649	A1	22 March 2018	WO	2016164743	A2	13 October 2016
				WO	2016164743	A3	24 November 2016
				US	10821189	B2	03 November 2020
WO	2012061402	A2	10 May 2012	US	2012141550	A1	07 June 2012
				US	8632789	B2	21 January 2014
				WO	2012061402	A3	05 July 2012
				EP	2635262	A2	11 September 2013
				EP	2635262	A4	25 May 2016
				CA	2816121	A1	10 May 2012
				CA	2816121	C	13 June 2017
WO	2018004338	A1	04 January 2018	EP	3474901	A1	01 May 2019
				US	2019247513	A1	15 August 2019
				US	11617799	B2	04 April 2023
				US	2023144534	A1	11 May 2023
WO	2022072949	A2	07 April 2022	WO	2022072949	A3	29 September 2022

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/095383

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/095383

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 6-9
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求6为制备凝集体的方法，包括在胞内进行反应的步骤，不能排除疾病的治疗方法，因此属于PCT实施细则第39.1(iv)规定的无须检索的情况。基于同样的理由，权利要求7-9也不能排除疾病的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1(iv)规定的无须检索的情况。权利要求6-9的检索报告是针对所述反应在体外无细胞的溶液中进行的技术方案给出的。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/095383

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112779240	A	2021年5月11日	WO	2021093752	A1	2021年5月20日
CN	115135628	A	2022年9月30日	WO	2020256546	A1	2020年12月24日
				AU	2020297253	A1	2022年2月3日
				IL	289093	A	2022年2月1日
				CA	3143925	A1	2020年12月24日
				US	2023121556	A1	2023年4月20日
				EP	3983363	A1	2022年4月20日
				JP	2022537543	A	2022年8月26日
GB	1440626	A	1976年6月23日	FR	2227867	A1	1974年11月29日
				FR	2227867	B1	1978年8月18日
				BE	814415	A	1974年10月30日
US	2018078649	A1	2018年3月22日	WO	2016164743	A2	2016年10月13日
				WO	2016164743	A3	2016年11月24日
				US	10821189	B2	2020年11月3日
WO	2012061402	A2	2012年5月10日	US	2012141550	A1	2012年6月7日
				US	8632789	B2	2014年1月21日
				WO	2012061402	A3	2012年7月5日
				EP	2635262	A2	2013年9月11日
				EP	2635262	A4	2016年5月25日
				CA	2816121	A1	2012年5月10日
				CA	2816121	C	2017年6月13日
WO	2018004338	A1	2018年1月4日	EP	3474901	A1	2019年5月1日
				US	2019247513	A1	2019年8月15日
				US	11617799	B2	2023年4月4日
				US	2023144534	A1	2023年5月11日
WO	2022072949	A2	2022年4月7日	WO	2022072949	A3	2022年9月29日