

(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
2025 年 1 月 23 日 (23.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/015603 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/47 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01) *A61K 9/127* (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

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。

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/108370

(22) 国际申请日: 2023 年 7 月 20 日 (20.07.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 帝邈生物科技(新加坡)有限公司
(**PANEXO BIOTECH SG PTE.LTD**) [SG/SG]; 新加坡
巴耶利巴路 60 号 12-03 号, 新加坡巴耶利
峇广场, Singapore 409051 (SG)。

(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)。

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))。

(72) 发明人: 王伊(**WANG, Yi**); 中国北京市丰台区西四环
中路78号首汇广场9号楼, Beijing 100141 (CN)。
董亚南(**DONG, Yanan**); 中国北京市丰台区西四环
中路78号首汇广场9号楼, Beijing 100141 (CN)。
高峰(**GAO, Feng**); 中国北京市丰台区西四环中
路78号首汇广场9号楼, Beijing 100141 (CN)。李
艳芳(**LI, Yanfang**); 中国北京市丰台区西四环中
路78号首汇广场9号楼, Beijing 100141 (CN)。薛
苗苗(**XUE, Miaomiao**); 中国北京市丰台区西四环
中路78号首汇广场9号楼, Beijing 100141 (CN)。
李俊(**LI, Jun**); 中国北京市丰台区西四环中路78
号首汇广场9号楼, Beijing 100141 (CN)。王丹枫
(**WANG, Danfeng**); 中国北京市丰台区西四环中路
78号首汇广场9号楼, Beijing 100141 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司
(**UNITALEN ATTORNEYS AT LAW CO., LTD.**);
中国北京市朝阳区建国门外大街22号赛特
广场七层, Beijing 100004 (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,

(54) **Title:** NANOVESICLES FOR DELIVERING BIOMACROMOLECULES TO CENTRAL NERVOUS SYSTEM

(54) 发明名称: 向中枢神经系统递送生物大分子的纳米囊泡

(57) **Abstract:** Provided are extracellular vesicles and a use thereof, and nanovesicles for delivering biomacromolecules to a central nervous system. Also provided is a truncated ApoE.

(57) 摘要: 提供细胞外囊泡及其应用, 提供向中枢神经系统递送生物大分子的纳米囊泡。提供ApoE的截短体。



WO 2025/015603 A1

说明书

发明名称: 向中枢神经系统递送生物大分子的纳米囊泡

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞外囊泡及其应用技术领域, 尤其涉及向中枢神经系统递送生物大分子的纳米囊泡。

背景技术

[0002] 细胞衍生的纳米囊泡(Nanovesicle, NV)包括细胞分泌的细胞外囊泡(Extracellular Vesicles即EV, 如外泌体Exosome等)以及由细胞膜重构而成的合成纳米囊泡(Synthetic nanovesicle, SyNV)。纳米囊泡的表面与内部均含有多样化的功能性蛋白质分子, 内部通常还装载有核酸分子(如miRNA、lncRNA等)。通过重组表达或者理化装填的方法, 可在纳米囊泡上装载特定的蛋白或者核酸分子。因此, 纳米囊泡是生物大分子药物递送的理想载体。但是包括外泌体在内的纳米囊泡在体内进行药物递送时面临一个长期无法解决的问题: 绝大多数纳米囊泡颗粒都被肝脏捕获并清除, 导致纳米囊泡向肝脏以外的器官递送药物的生物利用度极低。尤其是对于穿透血脑屏障向脑组织递送药物, 天然的纳米囊泡更难实现。

[0003] 实现纳米囊泡向脑组织递送生物大分子药物需要两个途径结合: 1)提高囊泡对脑组织或特定脑组织细胞的靶向性以及提高穿透血脑屏障的能力; 2)延长纳米囊泡的血浆循环时间(即降低肝脏对纳米囊泡的捕获与清除)。当前已报道的研发工作主要围绕第一个途径, 例如通过培养神经干细胞(NSC)获取其分泌的外泌体, 利用NSC外泌体的归巢性能提升血脑屏障穿透能力(Robin L.Webb, et al.Stroke. 2018; Vol.49); 另外也有通过在工程化EV表面装载Angiopep-2、RVG、穿膜肽(CPP)和ApoB多肽等的手段实现血脑屏障穿透力的提升。此外还有通过定点超声波、鼻腔给药等物理、生理手段促进EV入脑。

[0004] 现有的利用囊泡向脑组织递送药物的方案大多存在一些不足, 例如神经干细胞的规模化培养以及EV药物装载存在较大技术瓶颈, 成药性很有限。EV表面装载BBB穿透多肽的方法对于血脑屏障穿透能力提升不大, 并且由于没有解决肝脏捕获清除问题, 整体的脑组织生物利用度相对于天然纳米囊泡的提升有限。鼻腔

给药方法一方面的确可以提升EV入脑颗粒数，但另一方面由于EV既不像细胞一样具备主动迁移能力、又不像小分子药一样具备快速自由扩散能力，入脑后聚集在嗅觉中枢附近无法到达其它脑组织区域。定点超声波方法对局部血脑屏障造成一过性破坏，促进药物穿透，并非特异性针对囊泡类药物，实现成本高，技术难度大。因此，目前对于实现囊泡向脑组织高效递送生物大分子药仍然缺乏高性价比的手段。

[0005] ApoE蛋白是一种会促进脂纳米颗粒(LNP)类药物或mRNA型疫苗向肝脏富集并被清除的蛋白分子，在人血液循环中广泛存在。根据已有文献推断，ApoE不仅无法促进NV入脑，还可能加速NV被肝脏清除。目前尚无关于利用ApoE蛋白促进囊泡向脑组织递送药物的报道。

[0006] 发明内容

[0007] 有鉴于此，本发明要解决的技术问题在于提供向中枢神经系统递送生物大分子的纳米囊泡，以期提高药物在囊泡中的装载效率，提高治疗效果。

[0008] 本发明提供了APOE的截短体，其氨基酸序列如SEQ ID NO.1~3中任一项所示。

[0009] ApoE即载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)有三种亚型APOE2, APOE3和APOE4, 他们的氨基酸序列分别为: APOE2如SEQ ID NO: 4所示, APOE3如SEQ ID NO: 5所示, APOE4如SEQ ID NO: 6所示。此前研究表明, ApoE3与支架蛋白等配合, 能够实现治疗药物的模块化装载, 提高装载效率。本发明在此基础上, 对ApoE进行筛选和改造, 特别是构建了ApoE的截短体。结果表明, 相对于ApoE3, 构建获得的三个截短体能够进一步提高装载效果。

[0010] 本发明提供的三个截短体分为:

[0011] ApoE3第1-191位氨基酸残基组成的截短体, 记作ApoE3(1-191), 其氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示。

[0012] ApoE4第1-191位氨基酸残基组成的截短体, 记作ApoE4(1-191), 其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

[0013] ApoE2第1-191位氨基酸残基组成的截短体, 记作ApoE2(1-191), 其氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示。

- [0014] 本发明还提供了编码如前所述截短体的核酸。
- [0015] 作为优选，
- [0016] 编码截短体ApoE3(1-191)的核酸序列如SEQ ID NO：7所示。
- [0017] 编码截短体ApoE4(1-191)的核酸序列如SEQ ID NO：8所示。
- [0018] 编码截短体ApoE2(1-191)的核酸序列如SEQ ID NO：9所示。
- [0019] 本发明还提供了一种核酸构建体，包括：入脑模块、支架模块、跨膜区模块和膜内区锚定模块；所述入脑模块为编码如前所述截短体的核酸或者为如SEQ ID NO：4~5任一项所示的核酸。
- [0020] 本发明所述的核酸构建体中，各模块在同一个读码框中，也可以不在同一个读码框中，本发明对此不做限定。同样的，各模块可以在同一个载体上，也可以不在同一个载体上，本发明对此亦不做限定。本发明实施例中，以各模块在同一个读码框中为例进行效果验证，其中所述入脑模块、支架模块、跨膜区模块和膜内区锚定模块自5'端至3'端依次序连接。
- [0021] 优选地，所述核酸构建体还包括信号标记模块和/或效应模块。所述信号标记模块和/或效应模块与入脑模块、支架模块、跨膜区模块和膜内区锚定模块在同一个读码框中，也可以不在同一个读码框中，本发明对此不做限定。同样的，信号标记模块和/或效应模块与前述入脑模块、支架模块、跨膜区模块和膜内区锚定模块可以在同一个载体上，也可以不在同一个载体上，本发明对此亦不做限定。本发明实施例中，所述效应模块/检测模块的5'端与膜内锚定区模块的3'端相连。作为优选，所述信号标记模块和/或效应模块与膜内区锚定模块通过linker连接。
- [0022] 所述效应模块包括治疗脑部疾病的蛋白类药物的编码核酸或核酸类药物。
- [0023] 所述信号标记模块包括荧光蛋白模块和/或化学发光模块中的任一种或多种；
- [0024] 优选地，所述荧光蛋白模块包括绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白或黄色荧光蛋白中的任一种或多种；所述化学发光模块包括Nanoluc或Rluc。优选地，本发明各模块之间直接相连或通过连接模块相连，所述连接模块包括连接肽linker的编码核酸。

- [0025] 所述连接肽分为刚性连接肽和柔性连接肽，刚性连接肽的常用序列包括(EAAA K)_n(n=1-3)，柔性连接肽的常用序列包括(GGGGS)_n(n=1-5)。优选地，本发明的连接肽的氨基酸序列为(GGGGS)₃。
- [0026] 优选地，本发明设计的核酸构建体由以下模块组成：
- [0027] 入脑模块(BBB-penetrating module)-支架模块(Scaffold)-跨膜区模块(TMD)-膜内区锚定模块(ICD)-效应模块/检测模块(Cargo/Detection module)。其中，入脑模块(BBB-penetrating module)代表膜外装载的前述ApoE某亚型蛋白的全长或截短体；支架模块(Scaffold)代表膜外的支架蛋白，连接在效应蛋白的C端；跨膜区模块(TMD)代表跨膜区，N和C端分别连接EVs膜外和膜内序列；膜内区锚定模块(ICD)代表跨膜蛋白的膜内区，含有S-棕榈酰半胱氨酸，可锚定在EVs膜上；效应模块/检测模块(Cargo/Detection module)代表膜内装载的效应蛋白或检测蛋白。实际上，各个模块为编码相应蛋白/功能区的核酸分子。
- [0028] 优选地，所述入脑模块为编码入脑蛋白或功能蛋白的核酸片段。
- [0029] 优选地，所述入脑模块包括Transferrin、ApoB-RBD、APOE或其截短体、hCD 24、ScFv、GDNF或Blr(group B, leucine rich)中的任一种或多种。
- [0030] 优选地，所述支架模块包括Fc、Foldon、Fc+NPTN-Ig1-3、ITGB1-I-EGF1-4、Foldon+NPTN-Ig1-3或NPTN-Ig1-3中的任一种或多种。
- [0031] 优选地，所述跨膜区模块包括EWI-F-TMD、EWI-2-TMD、ITGB1-TMD、TMD_Mut_10、TMD_Mut_13、TMD_Mut_17、NPTN-TMD中的任一种或多种。
- [0032] 优选地，所述跨膜区模块包括TMD_Mut_10、TMD_Mut_13、TMD_Mut_17或NPTN-TMD中的任一种或多种；
- [0033] 其中，所述TMD_Mut_10的核苷酸序列编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.10；
- [0034] 所述TMD_Mut_13的核苷酸序列编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.11；
- [0035] 所述TMD_Mut_17的核苷酸序列编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.12；
- [0036] 所述NPTN-TMD的核苷酸序列编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.13。

- [0037] 优选地，所述膜内区锚定模块含有编码S-棕榈酰半胱氨酸的核苷酸序列，所述膜内区锚定模块包括EWI-F-ICD或EWI-2-ICD。
- [0038] 进一步的，本发明还提供了包含如前所述核酸构建体的质粒、表达载体或表达盒。
- [0039] 更进一步的，本发明还提供了包含如前所述的质粒、表达载体或表达盒的转化体或重组细胞。
- [0040] 更进一步的，本发明还提供了一种工程化EVs，其采用如前所述的转化体或重组细胞制备得到。
- [0041] 更进一步的，本发明还提供了一种由如前所述核酸构建体表达的蛋白。
- [0042] 更进一步的，本发明还提供了如前所述的核酸构建体、如前所述的质粒、表达载体或表达盒、如前所述的转化体或重组细胞、如前所述的工程化EVs和/或如前所述蛋白在制备药物或试剂中的应用，所述药物以所述效应模块为活性成分。
- [0043] 本发明对ApoE进行筛选和改造，特别是构建了ApoE的截短体。结果表明，相对于ApoE3，构建获得的三个截短体能够进一步提高装载效果。通过在NV表面装载ApoE截短体蛋白或ApoE蛋白使NV模拟脂蛋白颗粒，其穿透血脑屏障的能力远强于前述的入脑多肽序列(RVG, Angiopep-2等)。并且，装载有ApoE的NV在体内的血浆循环半衰期也有明显改善，显示肝脏清除的下降，这是前述入脑多肽序列所无法实现的。

附图说明

- [0044] 图1示各组质粒NV酶活数据图；
- [0045] 图2示各组Transwell结果；
- [0046] 图3示各组小鼠脑组织不同时间点数据；
- [0047] 图4示小鼠肝组织不同时间点数据图；
- [0048] 图5示不同截短体对应NV酶活表征；
- [0049] 图6示不同截短体NV酶活数据；
- [0050] 图7示不同截短体NV给药30分钟小鼠脑组织颗粒数；
- [0051] 图8示不同NV的酶活数据；

- [0052] 图9示24h不同NV Transwell穿透颗粒数；
- [0053] 图10示不同NV给药30分钟小鼠脑组织颗粒数；
- [0054] 图11示本发明核酸构建体示意图。

具体实施方式

- [0055] 本发明提供了向中枢神经系统递送生物大分子的纳米囊泡，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。

- [0056] APOE2的氨基酸序列为(SEQ ID NO.4):

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTL
SEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRA
RLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRL
ASHLRKLRKRLLRDADDLQKCLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPL
VEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDRDL
EVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQW
AGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

- [0057] APOE3的氨基酸序列为(SEQ ID NO.5):

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTL
SEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRA
RLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRL
ASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPL
VEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDRDL
EVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQW
AGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

- [0058] APOE3(1-191)的氨基酸序列为(SEQ ID NO.1):

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTL
SEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRA
RLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRL
ASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPL
VEQGRVR

[0059] 编码截短体ApoE3(1-191)的核酸序列为(SEQ ID NO: 7):

AAAGTGGAGCAGGCCGTGGAGACAGAGCCCGAGCCCGAGCTG
AGGCAGCAGACAGAGTGGCAGAGCGGGCAGCGGTGGGAGCTGGC
CCTGGGCCCGTTCTGGGACTACCTGAGGTGGGTGCAGACCCTGTCC
GAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGACACAGGA
GCTCAGGGCCCTGATGGATGAGACCATGAAGGAGCTGAAGGCCTAC
AAGTCCGAGCTGGAGGAGCAGCTGACACCCGTGGCCGAGGAGACA
CGGGCCAGGCTGAGCAAGGAGCTCCAGGCCGCCCAGGCCAGGCTG
GGGGCCGACATGGAGGATGTGTGCGGCAGGCTGGTGCAGTACAGG
GGGGAGGTGCAGGCCATGCTGGGGCAGAGCACCGAGGAGCTGAGG
GTGAGGCTGGCCAGCCACCTGAGGAAGCTGCGGAAGAGGCTGCTG
AGGGATGCCGATGACCTGCAGAAGAGGCTGGCCGTGTACCAGGCC
GGGGCCAGGGAGGGCGCCGAGAGGGGGCTGAGCGCCATCAGGGA
GAGGCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGCCGGGTGAGG

[0060] APOE2(1-191)的氨基酸序列为(SEQ ID NO.3):

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTL
SEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRA
RLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRL
ASHLRKLRKRLLRDADDLQKCLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPL
VEQGRVR

[0061] 编码截短体ApoE2(1-191)的核酸序列为(SEQ ID NO: 9):

AAAGTGGAGCAGGCCGTGGAGACAGAGCCCGAGCCCGAGCTG
AGGCAGCAGACAGAGTGGCAGAGCGGGCAGCGGTGGGAGCTGGC
CCTGGGCCGGTTCTGGGACTACCTGAGGTGGGTGCAGACCCTGTCC
GAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGACACAGGA
GCTCAGGGCCCTGATGGATGAGACCATGAAGGAGCTGAAGGCCTAC
AAGTCCGAGCTGGAGGAGCAGCTGACACCCGTGGCCGAGGAGACA
CGGGCCAGGCTGAGCAAGGAGCTCCAGGCCGCCAGGCCAGGCTG
GGGGCCGACATGGAGGATGTGTGCGGCAGGCTGGTGCAGTACAGG
GGGGAGGTGCAGGCCATGCTGGGGCAGAGCACCGAGGAGCTGAGG
GTGAGGCTGGCCAGCCACCTGAGGAAGCTGCGGAAGAGGCTGCTG
AGGGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGTCTGGCCGTGTACCAGGCCG
GGGCCAGGGAGGGCGCCGAGAGGGGGCTGAGCGCCATCAGGGAG
AGGCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGCCGGGTGAGG

[0062] APOE4的氨基酸序列为(SEQ ID NO.6):

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTL
SEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRA
RLSKELQAAQARLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRL
ASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPL
VEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDRDL
EVKEQVAEVRAKLEEQAAQIRLQAEAFQARLKSWEPLVEDMQRQW
AGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

[0063] APOE4(1-191)的氨基酸序列为(SEQ ID NO.2):

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTL
SEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRA
RLSKELQAAQARLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRL
ASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPL
VEQGRVR

[0064] 编码截短体ApoE4(1-191)的核酸序列为(SEQ ID NO: 8):

AAAGTGGAGCAGGCCGTCGAGACCGAGCCCGAGCCCGAGCTG
CGGCAGCAGACCGAGTGGCAGTCCGGGCAGCGCTGGGAGCTGGCC
CTGGGGAGGTTCTGGGATTACCTGCGGTGGGTGCAGACTCTGAGCG
AGCAGGTGCAGGAGGAGCTCCTGTCCAGCCAGGTCACCCAGGAGC
TGAGGGCCCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGCTGAAGGCCTACA
AGAGCGAGCTGGAGGAGCAGCTGACACCCGTGGCCGAGGAGACA
AGGGCCCCGGCTGAGCAAGGAGCTGCAGGCCGCCAGGCCCGGCTG
GGCGCCGACATGGAGGACGTCAGGGGGCCGGCTGGTGCAGTACCGG
GGGGAGGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGTCCACAGAGGAGCTGCGG
GTCAGGCTGGCCAGCCACCTGCGGAAGCTGAGGAAGCGGCTGCTG
CGGGATGCCGACGACCTGCAGAAGCGGCTGGCCGTGTACCAGGCC
GGCGCCAGGGAGGGCGCCGAGAGGGGGCCTCTCCGCCATCAGGGAG
CGGCTGGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGCCGGGTCCGG

[0065] ApoE(130-149)的氨基酸序列为(SEQ ID NO.14):

TEELRVRLASHLRKLRKRL

[0066] Angiopep-2的氨基酸序列为(SEQ ID NO.15):

TFFYGGSRGKRNNFKTEEYS

[0067] RVG的氨基酸序列为(SEQ ID NO.16):

KSVRTWNEIIPSKGSLRVGGRCHPHVN

[0068] linker的氨基酸序列为(SEQ ID NO.17):

GGGSGGGSGGGGS

[0069] Ig3(NPTN)的氨基酸序列为(SEQ ID NO.18):

SPDITGHKRSENKNEGQDATMYCKSVGYPHPDWIWRKKENGMP
MDIVNTSGRFFIINKENYTELNIVNLQITEDPGEYECNATNAIGSASVVT
VLRVRSHLAP

[0070] TMD(NPTN)的氨基酸序列为(SEQ ID NO.13):

LWPFLGILAEIILVVIIVVY

[0071] ICD(EWI-F)的氨基酸序列为(SEQ ID NO.19):

HWCKKKEVQETRERRRLMSMEMD

[0072] Nanoluc的氨基酸序列为(SEQ ID NO.20):

**VFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRI
VLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILH
YGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGLAVFDGKKITVTGTLWNGNKKIIDERL
INPDGSLLFRVTINGVTGWRLCER**

[0073] TMD_Mut_10的氨基酸序列为SEQ ID NO.10;

LLIGVNLLTVIGLWFLILYCSL

[0074] TMD_Mut_13的氨基酸序列为SEQ ID NO.11:

LLIGVGLLTVIGLLLFLILYCSS

[0075] TMD_Mut_17的氨基酸序列为SEQ ID NO.12:

LLIGVGLSTVIGLLSCLISYCSS

[0076] 本发明采用的试材皆为普通市售品，皆可于市场购得。

[0077] 下面结合实施例，进一步阐述本发明：

[0078] 实施例1：构建装载有全长人源ApoE2、ApoE3或ApoE4蛋白的NV

[0079] 目的：在NV表面装载不同亚型的全长人源ApoE蛋白并评价该组NV相对野生型NV的血脑屏障穿透以及抵抗肝脏清除的能力

[0080] 方法：

[0081] 1、构建：

[0082] 以pHEK293_Ultra_Expression_I(Takara)为载体，分别构建了：

[0083] 表达质粒ApoE2-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc、

[0084] 表达质粒ApoE3-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc、

[0085] 表达质粒ApoE4-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc表达质粒，

[0086] 同时构建了不含装载模块的对照质粒：

[0087] Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc。

[0088] 2、装载

[0089] 利用前装载的方式，分别将以上质粒转染到Expi HEK293F细胞，转染时细胞密度 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ ，质粒与PEI质量比1 : 1.5，转染后细胞继续培养72h，收集细胞及上清进行NV制备，制备后的NV即完成了装载。

[0090] 3、制备

[0091] 培养后的细胞上清通过切向流过滤(TFF)与体积排阻层析(SEC)相结合的方法，制备NV，即收集的细胞上清首先通过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器过滤后，经300KD膜包及中空纤维柱洗滤浓缩至1*PBS缓冲液中，将浓缩液经Capto Core700层析柱进一步纯化，去除杂蛋白，收集流穿液并通过10KD浓缩管浓缩。

[0092] 培养后的细胞首先通过含10U/mL核酸酶的0.1*PBS缓冲液重悬，120rpm搅拌5 min左右进行低渗涨破，后将细胞悬液通过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器反复过滤4次后，恢复至1*PBS盐浓度，补加核酸酶，4℃消化16h左右，经300KD中空纤维柱洗滤浓缩，浓缩液终体积为50mL后，将浓缩液经Capto Core700层析柱进一步纯化，去除杂蛋白，收集流穿液并通过10KD浓缩管浓缩。细胞来源NV和上清来源NV可合并使用。

[0093] 转染了对照质粒细胞及上清用同样的方法制备得到对照Nanoluc NV。

[0094] 4、表征

[0095] NanoFCM检测NV的颗粒浓度；将细胞上清和细胞来源NV合并使用，将NV加入到Nanoluc底物中，通过酶标仪检测Nanoluc酶活，验证Nanoluc的表达。

[0096] 5、Transwell试验

[0097] 小鼠bEND.3细胞按 5×10^5 cells/孔接种至 $0.1 \mu\text{m}$ 孔径的Transwell培养板，37℃，5%二氧化碳细胞培养箱培养至细胞汇合度达80%~90%后，小心弃掉Transwell孔内培养基，用细胞培养基将不同NV稀释至相同颗粒数后，加入Transwell孔内，37℃，5%二氧化碳细胞培养箱培养，培养2h、4h、6h、8h、24h，取Transwell下室液体检测Nanoluc酶活，利用NV检测的酶活和对应的颗粒数做标曲，计算出每种组织中的NV颗粒数。

[0098] 6、小鼠体内试验

[0099] 小鼠尾静脉给药，给药后0.5h，2h，4h及6h取材：摘取眼球取血，将血液经4℃、3000g离心20mins，取上清即为血浆，检测血浆中的Nanoluc酶活；灌流后取

肝脏和脑，肝脏和脑组织分别加入PBS，匀浆后12000rpm离心10min，取上清，检测上清中的Nanoluc酶活。利用NV检测的酶活和对应的颗粒数做标曲，计算出每种组织中的NV颗粒数。

[0100] 结果：

[0101] NV酶活表征(表1+图1)：制备获得的ApoE4 NV单位Nanoluc酶活较高，而ApoE2 NV及ApoE3 NV的酶活与对照Nanoluc NV酶活相近，说明ApoE4 NV的装载效率高于ApoE2 NV及ApoE3 NV。

[0102] 表1.NV酶活数据

样品名称	酶活 RLU(每 1E8 颗粒)		
ApoE2 NV	45745	47672	45608
ApoE3 NV	43158	46011	55755
ApoE4 NV	125495	115867	123664
Nanoluc NV	49653	40770	46945

[0103] Transwell结果(表2+图2)：与对照NV相比，ApoE2 NV、ApoE3 NV、ApoE4 NV均可显著通过bEND.3细胞分泌至下室，培养24h后ApoE4 NV在Transwell下室检测到的颗粒数最高约2.3E9个颗粒，而对照NV培养24h后下室颗粒数仅为7E7个颗粒。

[0104] 表2：Transwell各时间点穿透的颗粒数

时间点	ApoE2 NV	ApoE3 NV	ApoE4 NV	Nanoluc NV
2h	1.14E+07	8.96E+07	9.95E+07	7.18E+06
4h	1.38E+07	1.10E+08	1.19E+08	7.38E+06
6h	1.33E+07	9.46E+07	1.69E+08	7.63E+06
8h	1.28E+07	9.39E+07	1.93E+08	7.26E+06
24h	7.73E+07	6.82E+08	2.36E+09	1.73E+07

[0105] 小鼠体内结果(表3+图3，图4)：ApoE2 NV、ApoE3 NV、ApoE4 NV与对照NV比较均有显著的穿透血脑屏障的能力，给药后0.5h脑组织中NV达到峰值，2h及2h后脑组织中颗粒数逐渐减少；ApoE2 NV、ApoE3 NV、ApoE4 NV均能够抵抗

肝脏清除的能力，2h后对照NV在肝脏中几乎被完全清除，实验组NV仍有 $>1E9$ 个颗粒。

[0106] 表3.小鼠体内不同组织中的颗粒数

组织	时间点	ApoE2 NV	ApoE3 NV	ApoE4 NV	Nanoluc NV
脑	0.5h	2.26E+06	2.06E+06	2.57E+06	1.28E+05
	2h	3.68E+05	4.68E+05	6.09E+05	1.15E+05
	4h	2.35E+05	3.15E+05	1.79E+05	1.00E+00
	6h	1.21E+05	1.21E+05	5.27E+04	6.99E+04
肝	0.5h	8.05E+09	8.38E+09	9.05E+09	1.68E+09
	2h	2.05E+09	2.79E+09	2.45E+09	6.32E+07
	4h	7.49E+08	8.82E+08	8.49E+08	2.89E+07
	6h	2.89E+08	1.99E+08	3.89E+08	9.83E+06

[0107] 实施例2：构建装载有人源ApoE2、ApoE3或ApoE4蛋白不同截短体的NV

[0108] 目的：在NV表面装载不同亚型的人源ApoE蛋白的截短体并评价该组NV相对野生型NV的血脑屏障穿透能力

[0109] 方法：

[0110] 1、构建：

[0111] 发明人设计了ApoE不同的截短体序列，ApoE3(1-191)、ApoE4(1-191)、ApoE2(1-191)、ApoE(130-149)，以pHEK293_Ultra_Expression_I(Takara)为载体，分别构建了：

[0112] 表达质粒ApoE3(1-191)-linker-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc、

[0113] 表达质粒ApoE4(1-191)-linker-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc、

[0114] 表达质粒ApoE2(1-191)-linker-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc、

[0115] 表达质粒ApoE(130-149)-linker-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc。

[0116] 2、装载

[0117] 装载方法同实施例1。

[0118] 3、制备

[0119] 制备方法同实施例1。

[0120] 4、表征

[0121] NanoFCM检测NV的颗粒浓度；NV加入到Nanoluc底物中，通过酶标仪检测Nanoluc酶活，验证Nanoluc的表达。

[0122] 5、Transwell试验

[0123] 方法同实施例1。

[0124] 6、小鼠体内试验

[0125] 小鼠尾静脉给药，给药后0.5h取材：摘取眼球取血，将血液经4℃、3000g离心20mins，取上清即为血浆，检测血浆中的Nanoluc酶活；灌流后取肝脏和脑，肝脏和脑组织分别加入PBS，匀浆后12000rpm离心10min，取上清，检测上清中的Nanoluc酶活。利用NV检测的酶活和对应的颗粒数做标曲，计算出每种组织中的NV颗粒数。

[0126] 结果：

[0127] NV酶活表征(表4+图5)：制备获得的不同截短体ApoE3(1-191)NV、ApoE4(1-191)NV、装载效率稍高，单位酶活比对照NV稍高，ApoE2(1-191)NV和ApoE(131-149)NV的装载效率稍低。

[0128] 表4.不同截短体对应NV酶活表征

样品名称	酶活 RLU(每 1E8 颗粒)		
ApoE3(1-191) NV	69862	69900	69750
ApoE4(1-191) NV	95698	95982	95486
ApoE2(1-191) NV	51229	51528	51350
ApoE(131-149) NV	33817	33792	33917
Nanoluc NV	54756	55758	54988

[0129] Transwell结果(表5+图6)：与对照NV相比，不同截短体ApoE3(1-191)NV、ApoE4(1-191)NV、ApoE2(1-191)NV、ApoE(131-149)NV均可显著通过Transwell细

胞分泌至下室，培养24h后ApoE4(1-191)NV在Transwell下室检测到的颗粒数最高>1E9个颗粒。

[0130] 表5.不同截短体NV酶活数据

时间点	ApoE3(1-191) NV	ApoE4(1-191) NV	ApoE2(1-191) NV	ApoE(131-149) NV	Nanoluc NV
2h	4.49E+07	9.25E+08	8.96E+07	5.82E+07	1.14E+07
4h	5.63E+07	8.52E+08	1.10E+08	8.38E+07	1.38E+07
6h	5.56E+07	7.46E+08	9.46E+07	8.31E+07	1.33E+07
8h	5.29E+07	5.52E+08	9.39E+07	8.33E+07	1.28E+07
24h	5.64E+08	1.40E+09	6.82E+08	9.17E+08	7.73E+07

[0131] 小鼠体内结果(表6+图7)：给药30min后进行检测，与对照NV相比，不同截短体ApoE3(1-191)NV、ApoE4(1-191)NV有显著穿透血脑屏障能力，ApoE2(1-191)NV穿透血脑屏障能力相对较弱，ApoE(131-149)NV则基本没有穿透血脑屏障的能力。

[0132] 表6.不同截短体NV给药30分钟小鼠脑组织颗粒数

分组	脑组织 NV 颗粒数[particles]
ApoE3(1-191) NV	1.43E+06
ApoE4(1-191) NV	3.16E+06
ApoE2(1-191) NV	4.48E+05
ApoE(131-149) NV	6.61E+04
Nanoluc NV	8.10E+04

[0133] 实施例3：ApoE-NV穿透血脑屏障的能力强于已报道的装载Angiopep-2，RVG等入脑多肽的EV

[0134] 目的：比较各类型ApoE-NV与已报道的EV在入脑能力上的差异。

[0135] 方法：

[0136] 1、构建：

[0137] 以pHEK293_Ultra_Expression_I(Takara)为载体，构建：

[0138] 表达质粒Angiopep-2-linker-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD) -ICD (EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc；

- [0139] 表达质粒RVG-linker-Ig3(NPTN-Ig3)-TMD(NPTN-TMD)-ICD(EWI-F-ICD)-linker-Nanoluc表达质粒
- [0140] 2、装载
- [0141] 装载方法同实施例1
- [0142] 3、制备
- [0143] 制备方法同实施例1。
- [0144] 4、表征
- [0145] NanoFCM检测NV的颗粒浓度；将NV加入到Nanoluc底物中，通过酶标仪检测Nanoluc酶活，验证Nanoluc的表达。
- [0146] 5、Transwell
- [0147] 方法同实施例1，培养24h，取Transwell下室液体检测Nanoluc酶活。同时用实施例1和2中各种ApoE NV与Angiopep-2 NV，RVG NV分别做比较。
- [0148] 6、小鼠体内试验
- [0149] 小鼠尾静脉给药，给药后30分钟取材：摘取眼球取血，将血液经4℃、3000g离心20mins，取上清即为血浆，检测血浆中的Nanoluc酶活；灌流后取肝脏和脑，肝脏和脑组织分别加入PBS，匀浆后12000rpm离心10min，取上清，检测上清中的Nanoluc酶活。利用NV检测的酶活和对应的颗粒数做标曲，计算出每种组织中的NV颗粒数。
- [0150] 结果：
- [0151] NV酶活表征(表7+图8)：制备获得的RVG NV、Angiopep-2 NV与对照NV单位装载量基本一致。
- [0152] 表7.不同NV的酶活数据

样品名称	酶活 RLU(每 1E8 颗粒)		
RVG NV	63098	63471	62951
Angiopep-2 NV	60337	61332	61007
Nanoluc NV	66029	64123	64201

- [0153] Transwell结果(表8+图9)：与对照NV相比，ApoE NV、RVG NV、Angiopep-2 NV均可显著通过Transwell细胞分泌至下室，培养24h后ApoE NV在Transwell下室

检测到的颗粒数均比下室中检测到的RVG NV、Angiopep-2 NV颗粒数大，尤其是ApoE4 NV和ApoE4(1-191)NV。

[0154] 表8. 24h不同NV Transwell穿透颗粒数

样品名称	下室颗粒数[particles]
ApoE2 NV	4.73E+08
ApoE3 NV	6.82E+08
ApoE4 NV	2.36E+09
ApoE3（1-191）NV	5.64E+08
ApoE4（1-191）NV	1.40E+09
ApoE3（23-165）NV	4.31E+08
RVG NV	2.64E+08
Angiopep-2 NV	1.06E+08
Nanoluc NV	1.73E+07

[0155] 小鼠体内结果(表9+图10)：给药30min后进行检测，与对照NV相比，ApoE NV、RVG NV、Angiopep-2 NV均具有穿透血脑屏障的能力，且各种ApoE NV穿透血脑屏障的能力均强于RVG及Angiopep-2。

[0156] 表9.不同NV给药30分钟小鼠脑组织颗粒数

样品名称	脑组织颗粒数[particles]
ApoE2 NV	2.26E+06
ApoE3 NV	2.06E+06
ApoE4 NV	2.57E+06
ApoE3（1-191）NV	1.42E+06
ApoE4（1-191）NV	1.72E+06
ApoE2（1-191）NV	8.19E+05
RVG NV	4.57E+05
Angiopep-2 NV	5.20E+05
Nanoluc NV	1.00E+05

[0157] 以上仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权利要求书

- [权利要求 1] APOE的截短体，其氨基酸序列如SEQ ID NO.1 ~ 3中任一项所示。
- [权利要求 2] 编码权利要求1所述截短体的核酸。
- [权利要求 3] 核酸构建体，包括：入脑模块、支架模块、跨膜区模块、膜内区锚定模块和效应与检测模块；
所述入脑模块为权利要求2所述核酸或者为如SEQ ID NO：4 ~ 5任一项所示的核酸。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的核酸构建体，其特征在于，
所述支架模块包括Fc、Foldon、Fc+NPTN-Ig1-3、ITGB1-I-EGF 1-4、Foldon+NPTN-Ig1-3或NPTN-Ig1-3中的任一种或多种；
所述跨膜区模块包括EWI-F-TMD、EWI-2-TMD、ITGB1-TMD、TMD_Mut_10、TMD_Mut_13、TMD_Mut_17或NPTN-TMD中的任一种或多种；
所述膜内区锚定模块含有编码S-棕榈酰半胱氨酸的核苷酸序列，
所述膜内区锚定模块包括EWI-F-ICD或EWI-2-ICD。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的核酸构建体，其特征在于，自5'端至3'端依次包括：入脑模块、NPTN-Ig1-3、NPTN-TMD和EWI-F-ICD。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的核酸构建体，其特征在于，还包括信号标记模块和/或效应模块；
所述检测模块包括荧光蛋白模块和/或化学发光模块中的任一种或多种；
所述效应模块包括治疗脑部疾病的蛋白类药物或核酸类药物。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的核酸构建体，其特征在于，所述信号标记模块与膜内区锚定模块通过linker连接；
所述荧光蛋白模块包括绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白或黄色荧光蛋白中的任一种或多种；

所述化学发光模块包括Nanoluc或Rluc。

[权利要求 8] 包含权利要求3~7中任一项所述核酸构建体的质粒、表达载体或表达盒。

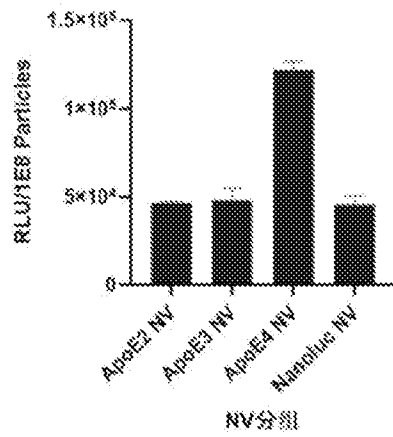
[权利要求 9] 包含权利要求8所述的质粒、表达载体或表达盒的转化体或重组细胞。

[权利要求 10] 一种工程化EVs，其特征在于，采用权利要求9所述的转化体或重组细胞制备得到。

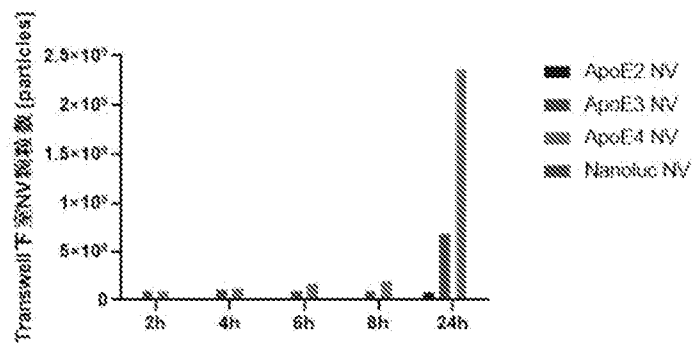
[权利要求 11] 一种由权利要求3~7中任一项所述核酸构建体表达的蛋白。

[权利要求 12] 权利要求3~7中任一项所述的核酸构建体、权利要求8所述的质粒、表达载体或表达盒、权利要求9所述的转化体或重组细胞、权利要求10所述的工程化EVs和/或权利要求11所述蛋白在制备药物或试剂中的应用，所述药物以所述效应模块为活性成分。

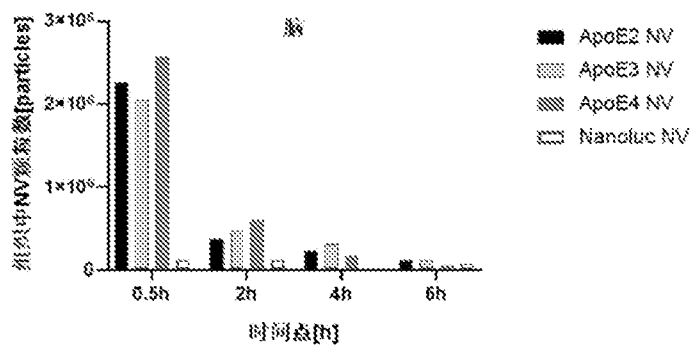
[图 1]



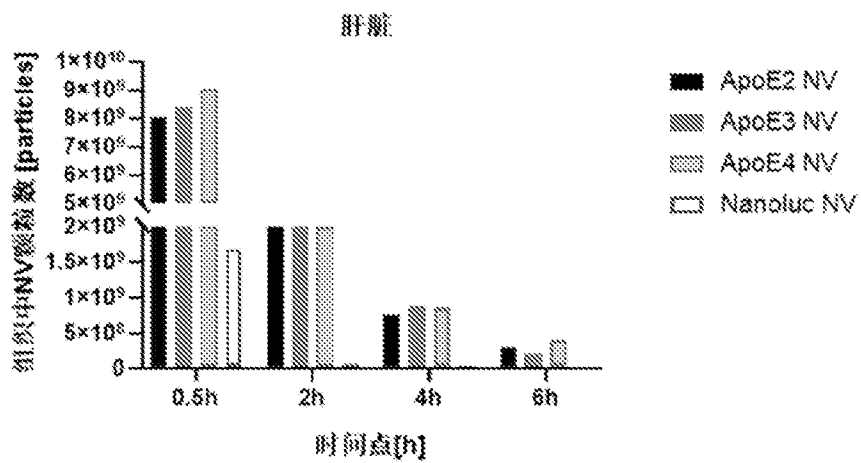
[图 2]



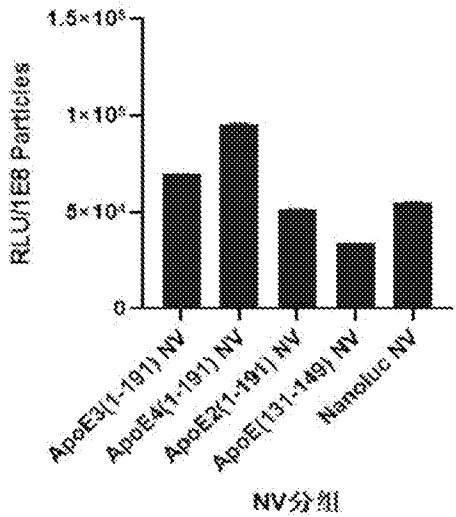
[图 3]



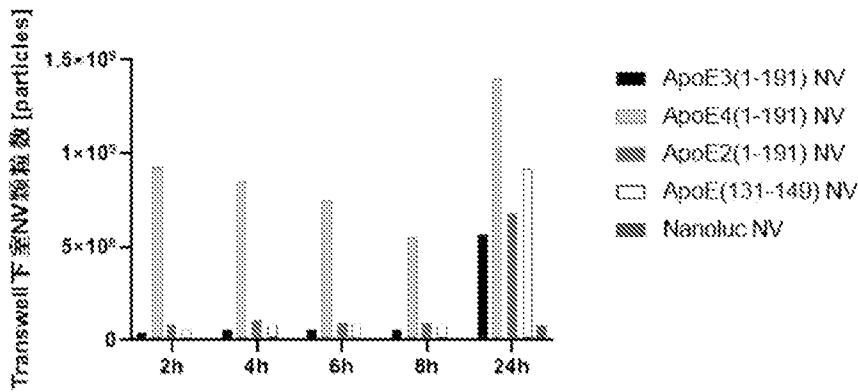
[图 4]

细则 26,
03.08.2023细则 26,
03.08.2023

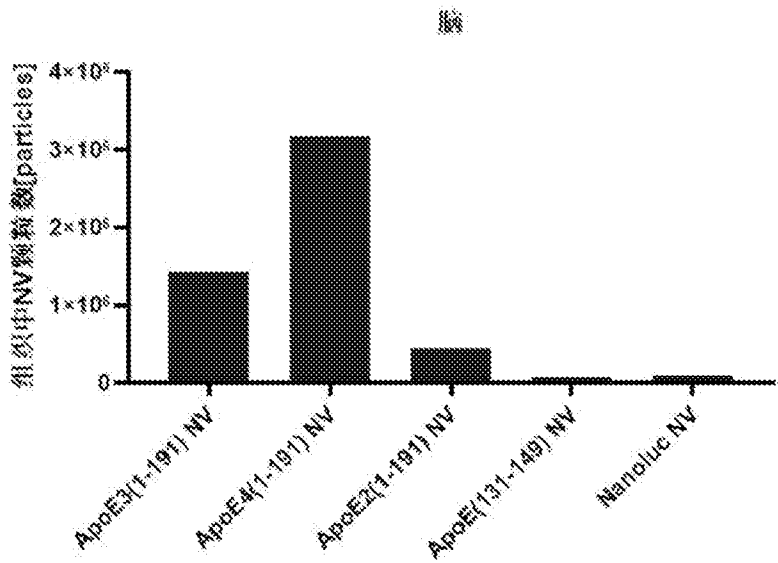
[图 5]



[图 6]

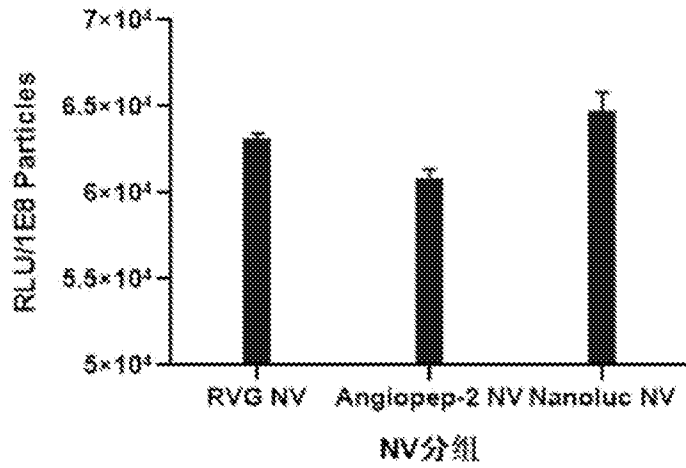


[图 7]

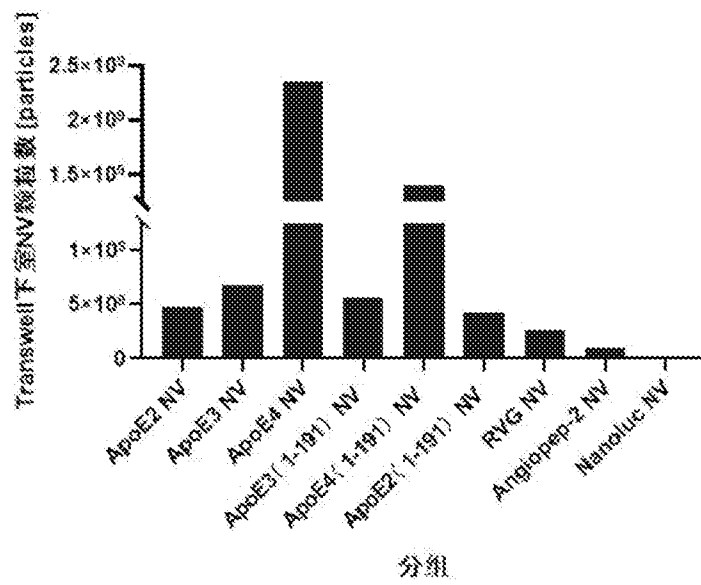


细则 26,
03.08.2023

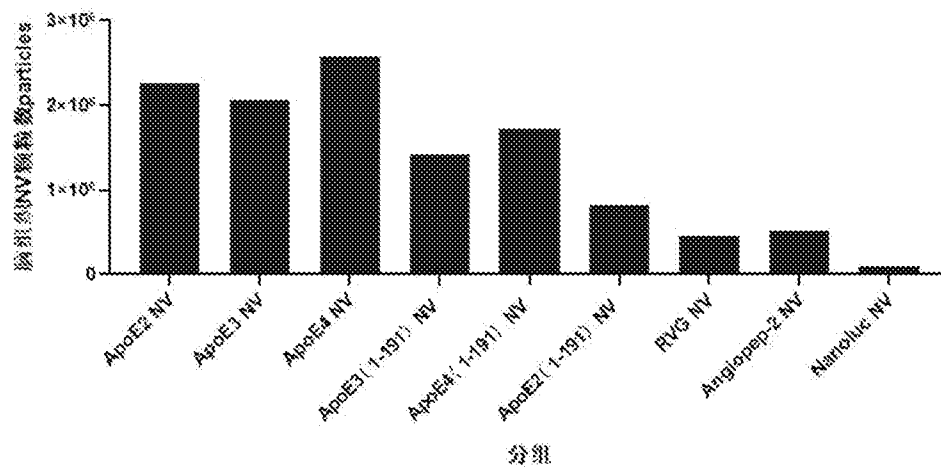
[图 8]



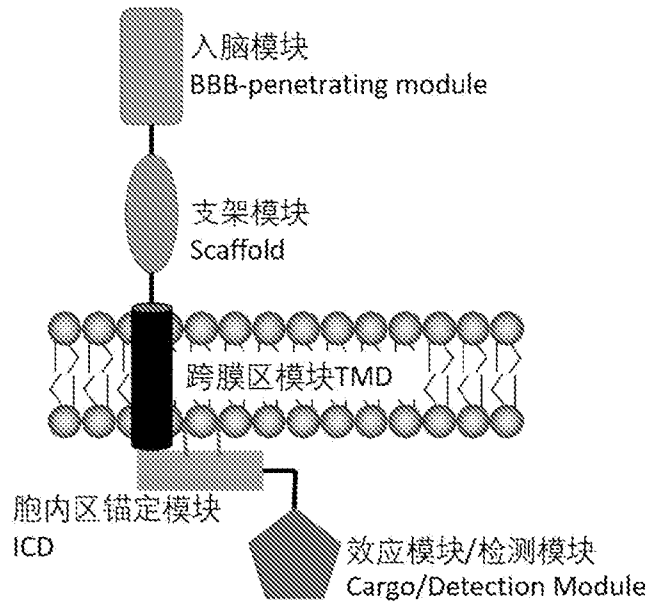
[图 9]



[图 10]



[图 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/108370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61P 25/00(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: C07K C12N A61K A61P

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)

CNABS, WPABS, WPABSC, DWPL, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, EPTXTC, CNKI, PUBMED, ISI web of science, Genbank, EMBL, STN, 万方数据库, WANFANG DATABASE, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System. 纳米囊泡, 细胞外囊泡, 载脂蛋白E, 神经丝束蛋白, 神经质体, 神经激酶, 前列腺素F2受体负调节因子, 血脑屏障, 入脑, 支架, 跨膜, 胞内, nanovesicle, extracellular vesicles, APOE, apolipoprotein E, NPTN, neuroligin, prostaglandin F2 receptor negative regulator, EWI-F, PTGFRN, brain, blood-brain barrier, blood-brain-barrier, BBB, scaffold, TMD, transmembrane, ICD, intracellular, nanoluc, 对SEQ ID NO: 1-3, 7-9, 13, 18-20进行序列检索, sequence search for SEQ ID NOs: 1-3, 7-9, 13, and 18-20.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017218058 A1 (ALECTOR LLC.) 03 August 2017 (2017-08-03) see description, figure 1, and embodiment 10	1-2
Y	WO 2021211633 A2 (MANTRA BIO, INC.; GOTTLIEB, COLIN, DAVID) 21 October 2021 (2021-10-21) see description, paragraphs 163-227 and 262-263, and tables 3 and 5	3-12
Y	US 2014219974 A1 (PAN DAO; CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 07 August 2014 (2014-08-07) see description, paragraphs 3, 12, and 22	3-12
Y	US 2017218058 A1 (ALECTOR LLC.) 03 August 2017 (2017-08-03) see description, figure 1, and embodiment 10	3-12



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

10 August 2023

Date of mailing of the international search report

12 January 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/108370

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109891240 A (SPHINGOTEC GMBH) 14 June 2019 (2019-06-14) see description, paragraphs 9 and 370-371, SEQ ID NO: 5	1-2
X	WO 03038435 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS; LEROY, ARNAUD; AGGERBECK, LAWRENCE) 08 May 2003 (2003-05-08) see SEQ ID NO: 1	1-2
A	CN 104844704 A (EAST CHINA NORMAL UNIVERSITY) 19 August 2015 (2015-08-19) see description, paragraphs 10-50	1-12
A	CN 113616811 A (NANJING UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE) 09 November 2021 (2021-11-09) see claims 1-4, and description, paragraphs 9-12 and 30-38	1-12
A	GenBank Accession No. "UniProtKB/Swiss-Prot: Q9Y639.2" <i>Genebank</i> , 14 December 2022 (2022-12-14), see entire document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/108370

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 13ter.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
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/108370

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2017218058	A1	03 August 2017	US	2021403540	A1	30 December 2021
				US	2019367588	A1	05 December 2019
WO	2021211633	A2	21 October 2021	EP	4135665	A2	22 February 2023
				WO	2021211633	A3	23 December 2021
US	2014219974	A1	07 August 2014	WO	2012159052	A2	22 November 2012
				WO	2012159052	A3	31 January 2013
				EP	2709670	A2	26 March 2014
				EP	2709670	A4	21 January 2015
				US	10227387	B2	12 March 2019
CN	109891240	A	14 June 2019	US	2021223242	A1	22 July 2021
				JP	2019536007	A	12 December 2019
				MX	2019004219	A	10 June 2019
				EP	3309550	A1	18 April 2018
				EP	3526605	A1	21 August 2019
				JP	2023002599	A	10 January 2023
				AU	2017342043	A1	11 April 2019
				AU	2017342043	A8	02 May 2019
				RU	2019113771	A	13 November 2020
				RU	2019113771	A3	04 February 2021
				WO	2018069437	A1	19 April 2018
				CA	3039756	A1	19 April 2018
				BR	112019007096	A2	25 June 2019
WO	03038435	A1	08 May 2003	FR	2831959	A1	09 May 2003
				FR	2831959	B1	18 June 2004
CN	104844704	A	19 August 2015	None			
CN	113616811	A	09 November 2021	None			

A. 主题的分类

C07K 14/47(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61P 25/00(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: C07K C12N A61K A61P

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: CNABS, WPABS, WPABSC, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, EPTXTC, CNKI, PUBMED, ISI web of science, Genebank, EMBL, STN, 万方数据库, 百度学术, 中国专利生物序列检索系统。 检索词: 纳米囊泡, 细胞外囊泡, 载脂蛋白E, 神经丝束蛋白, 神经质体, 神经激酶, 前列腺素F2受体负调节因子, 血脑屏障, 入脑, 支架, 跨膜, 胞内, nanovesicle, exracellular vesicles, APOE, apolipoprotein E, NPTN, neu-roplastin, prostaglandin F2 receptor negative regulator, EWI-F, PTGFRN, brain, blood-brain barrier, blood-brain-ba rrier, BBB, scaffold, TMD, transmembrane, ICD, intracellular, nanoluc, 对SEQ ID NO:1-3, 7-9, 13, 18-20进行序列检索。

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
X	US 2017218058 A1 (ALECTOR LLC) 2017年8月3日 (2017 - 08 - 03) 参见说明书图1, 实施例10	1-2
Y	WO 2021211633 A2 (MANTRA BIO INC;GOTTLIEB COLIN DAVID;) 2021年10月21日 (2021 - 10 - 21) 参见说明书第163-227, 262-263段, 表3, 表5	3-12
Y	US 2014219974 A1 (PAN DAO;CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER;) 2014年8月7日 (2014 - 08 - 07) 参见说明书第3, 12, 22段	3-12
Y	US 2017218058 A1 (ALECTOR LLC) 2017年8月3日 (2017 - 08 - 03) 参见说明书图1, 实施例10	3-12

☒ 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

2023年8月10日

国际检索报告邮寄日期

2024年1月12日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

授权官员

王雪

电话号码 (+86) 010-62412261

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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
X	CN 109891240 A (斯弗因高泰克有限公司) 2019年6月14日 (2019 - 06 - 14) 参见说明书第9, 370-371段, SEQ ID NO:5	1-2
X	WO 03038435 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT;LEROY ARNAUD;AGGERBECK LAWRENCE;) 2003年5月8日 (2003 - 05 - 08) 参见SEQ ID NO:1	1-2
A	CN 104844704 A (华东师范大学) 2015年8月19日 (2015 - 08 - 19) 参见说明书第10-50段	1-12
A	CN 113616811 A (南京中医药大学) 2021年11月9日 (2021 - 11 - 09) 参见权利要求1-4, 说明书9-12, 30-38段	1-12
A	genebank accession no. "UniProtKB/Swiss-Prot: Q9Y639.2" Genebank, 2022年12月14日 (2022 - 12 - 14), 参见全文	1-12

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
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/108370

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)
US	2017218058	A1	2017年8月3日	US	2021403540	A1	2021年12月30日
				US	2019367588	A1	2019年12月5日
WO	2021211633	A2	2021年10月21日	EP	4135665	A2	2023年2月22日
				WO	2021211633	A3	2021年12月23日
US	2014219974	A1	2014年8月7日	WO	2012159052	A2	2012年11月22日
				WO	2012159052	A3	2013年1月31日
				EP	2709670	A2	2014年3月26日
				EP	2709670	A4	2015年1月21日
				US	10227387	B2	2019年3月12日
CN	109891240	A	2019年6月14日	US	2021223242	A1	2021年7月22日
				JP	2019536007	A	2019年12月12日
				MX	2019004219	A	2019年6月10日
				EP	3309550	A1	2018年4月18日
				EP	3526605	A1	2019年8月21日
				JP	2023002599	A	2023年1月10日
				AU	2017342043	A1	2019年4月11日
				AU	2017342043	A8	2019年5月2日
				RU	2019113771	A	2020年11月13日
				RU	2019113771	A3	2021年2月4日
				WO	2018069437	A1	2018年4月19日
				CA	3039756	A1	2018年4月19日
				BR	112019007096	A2	2019年6月25日
WO	03038435	A1	2003年5月8日	FR	2831959	A1	2003年5月9日
				FR	2831959	B1	2004年6月18日
CN	104844704	A	2015年8月19日	无			
CN	113616811	A	2021年11月9日	无			