

(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 12 月 19 日 (19.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/255532 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/54 (2017.01) *A61K 35/17* (2015.01)

A61K 47/34 (2017.01) *A61P 25/28* (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/093953

(22) 国际申请日: 2024 年 5 月 17 日 (17.05.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310709290.6 2023年6月14日 (14.06.2023) CN

(71) 申请人: 西湖实验室 (生命科学和生物学浙江省实验室) (WESTLAKE LABORATORY OF LIFE SCIENCES AND BIOMEDICINE) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区石龙山街 18 号, Zhejiang 310024 (CN)。中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市

南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

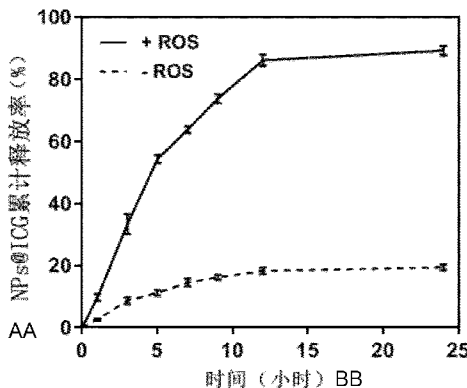
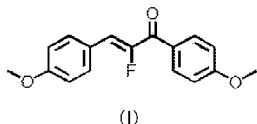
(72) 发明人: 张云龙 (ZHANG, Yunlong); 中国浙江省杭州市西湖区石龙山街 18 号, Zhejiang 310024 (CN)。梁锐晶 (LIANG, Ruijing); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。刘妍 (LIU, Yan); 中国浙江省杭州市西湖区石龙山街 18 号, Zhejiang 310024 (CN)。张梦然 (ZHANG, Mengran); 中国浙江省杭州市西湖区石龙山街 18 号, Zhejiang 310024 (CN)。任健 (REN, Jian); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。马润方 (MA, Runfang); 中国浙江省杭州市西湖区石龙山街 18 号, Zhejiang 310024 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司 (JIAQUAN IP LAW); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西 100 号富力盈泰广场 A 栋 910, Guangdong 510627 (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,

(54) Title: NK NANO PHARMACEUTICAL FORMULATION, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: NK 纳米药物制剂及其制备方法和应用



AA NPs@ICG cumulative release rate (%)
BB Time (hour)

图 6

(57) Abstract: The present application relates to the technical field of medicines. Disclosed are an NK nano pharmaceutical formulation, and a preparation method therefor and a use thereof. The NK nano pharmaceutical formulation comprises NK cells and a compound grafted on the surfaces of the NK cells and having a structural formula of (I).

(57) 摘要: 属于药物技术领域, 公开了 NK 纳米药物制剂及其制备方法和应用。该 NK 纳米药物制剂, 包括 NK 细胞和接枝在 NK 细胞表面的结构式为 (I) 的化合物。

[见续页]



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:

- 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))。

NK 纳米药物制剂及其制备方法和应用

技术领域

本申请属于药物技术领域，特别涉及 NK 纳米药物制剂及其制备方法和应用。

背景技术

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种中老年常见的神经退行性疾病，临床症状主要表现为静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高和姿势平衡障碍。随着人口老龄化的到来，PD 的发病率逐年递增。流行病学资料显示，65 岁以上该病的患病率为 1.67%。PD 的主要病理变化表现为中脑黑质多巴胺能 (Dopamine, DA) 神经元进行性变性和死亡，残存神经元内出现由 α -突触核蛋白 (α -synuclein) 聚集形成的嗜酸性蛋白包涵体。PD 病因目前尚不完全清楚，大多数学者认为 PD 是遗传和环境因素等多因素引发的疾病。迄今已发现多种基因的异常表达与 PD 有关，其中 PARK1/SNCA 编码的 α -synuclein 是与 PD 关系最为密切的蛋白之一 (参考文献: (1) Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Hench J, Moors TE, Navarro PP, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nature neuroscience*. 2019; 22: 1099-109. (2) Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015; 386: 896-912. (3) Shahnawaz M, Mukherjee A, Pritzkow S, Mendez N, Rabadia P, Liu X, et al. Discriminating alpha-synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature*. 2020; 578: 273-7. (4) Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by alpha-synuclein oligomers. *Science*. 2017; 358: 1440-3)。自噬功能障碍和氧化应激损伤等是 PD 发病的重要机制。近年来，多种促自噬和抗氧化应激小分子药物，比如针对 NLRP3 和 RIPK 的抑制剂，被证实可以保护 PD 中 DA 神经元损伤 (参见文献: (5) Xu D, Zhao H, Jin M, Zhu H, Shan B, Geng J, et al. Modulating TRADD to restore cellular homeostasis and inhibit apoptosis. *Nature*. 2020; 587: 133-8. (6) Han X, Sun S, Sun Y, Song Q, Zhu J, Song N, et al. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease. *Autophagy*. 2019; 15: 1860-81. (7) Cheng J, Liao Y, Dong Y, Hu H, Yang N, Kong X, et al. Microglial autophagy defect causes parkinson disease-like symptoms by accelerating inflammasome activation in mice. *Autophagy*. 2020; 16: 2193-205.)。然而这些药物对 α -synuclein 病理的改善尚不清楚，且此类药物应用于治疗 PD 的安全性和有效性尚待商榷。诸多天然药物，比如芒果苷、角鲨胺、茶多酚等也被报道可以减轻 α -synuclein 造成的氧化应激损伤、线粒体功能障碍和免疫炎症反应，来保护多巴胺神经元，进而在 PD 中发挥神经保护效应 (参见文献: (8) Feng ST, Wang ZZ,

Yuan YH, Sun HM, Chen NH, Zhang Y. Mangiferin: A multipotent natural product preventing neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's disease models. *Pharmacological research*. 2019; 146: 104336. (9) Perni M, Galvagnion C, Maltsev A, Meisl G, Muller MB, Challa PK, et al. A natural product inhibits the initiation of alpha-synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114: E1009-E17. (10) Zhou ZD, Xie SP, Saw WT, Ho PGH, Wang H, Lei Z, et al. The Therapeutic Implications of Tea Polyphenols Against Dopamine (DA) Neuron Degeneration in Parkinson's Disease (PD). *Cells*. 2019; 8.)。2019 年 Madeo Frank 团队率先报道了一种来源于明日叶的黄酮类天然药物-4,4'-二甲氧基查耳酮 (DMC) 可以不依赖于 mTORC1 信号通路, 激活 GATA 转录因子, 促进酵母、线虫、果蝇、小鼠和灵长类等不同物种的自噬水平, 进而发挥保护效应 (参见文献: (11) Carmona-Gutierrez D, Zimmermann A, Kainz K, Pietrocola F, Chen G, Maglioni S, et al. The flavonoid 4,4'-dimethoxychalcone promotes autophagy-dependent longevity across species. *Nature communications*. 2019; 10: 651.)。明日叶盛产于日本, 在明朝李时珍的《本草纲目》和日本《大和本草》中都有详细记载其功效主治。现代药理学研究发现, 明日叶含有类黄酮、胆碱、香豆素等多种活性成分, 其中最主要的是查尔酮类化合物。查尔酮是黄酮类化合物的一种, 具有显著的抗氧化作用。DMC 促进自噬效果显著, 且安全性较好, 然而其生物利用度较低, 靶向性不强, 且其对 PD 中 α -synuclein 病理作用不显著。

因此, 亟需提供一种新的药物, 提高其透过血脑屏障的效率, 提高生物利用度, 清除细胞内、外的 α -synuclein, 改善帕金森病模型的行为障碍和脑内病理损伤。

发明内容

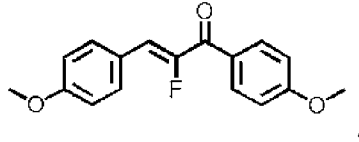
本申请旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此, 本申请提出 NK 纳米药物制剂及其制备方法和应用。本申请所述 NK 纳米药物制剂的制备方法操作简单、快速, 且制备出来的 NK 纳米药物制剂性质稳定、安全性高, 改善了 DMC (4,4'-二甲氧基查耳酮) 血脑屏障低通透性、靶向性差、对 PD 中 α -synuclein 病理作用不显著等问题。本申请 NK 纳米药物制剂性在抗帕金森病的应用中, 通过血脑屏障后, 在脑内氧化应激损伤环境下, NK 纳米药物制剂中的 NK 细胞和靶向小分子药物分别释放, 通过清除细胞内外的 α -synuclein 改善帕金森病小鼠的运动行为障碍, 可作为新型的神经保护药物用于抗神经退行性疾病的治疗中。

根据本申请的技术方案, 本申请的 NK 纳米药物制剂中自噬效果显著、清除 α -synuclein 效果好, 且无显著毒性的先导化合物 (化合物名为 2-Propen-1-one, 2-fluoro-1,3-bis(4-methoxyphenyl)-(E)-, $C_{17}H_{15}FO_3$, 分子量为 286.30, 命名为 F-DMC)。通过对 F-DMC 药理学活性研究, 证实了其抗 PD 的显著效果。结合细胞治疗, 将自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK cell) 和该 F-DMC 进行接枝, 促进 F-DMC 顺利通过血脑屏障, 在脑内氧化应激损伤条件下, NK 细胞和 F-DMC 连接被切断, 释放的 NK 细胞可以清除细胞外的 α -synuclein, 而被多

巴胺神经元摄取的 F-DMC，可以通过促进自噬，清除细胞内的 α -synuclein。在双重作用下，完成对病理性 α -synuclein 的清除和降解，从而改善 PD 模型的行为障碍和脑内病理损伤。这种治疗模式有望为神经退行性疾病治疗提供新的借鉴。

本申请的第一方面提供 NK 纳米药物制剂。

具体的，NK 纳米药物制剂，包括 NK 细胞和接枝在所述 NK 细胞表面的 $C_{17}H_{15}FO_3$ 。



所述 $C_{17}H_{15}FO_3$ 的结构式为

优选的，所述 NK 纳米药物制剂还包括聚乳酸-羟基乙酸共聚物和/或活性氧响应性磷脂。所述 $C_{17}H_{15}FO_3$ 经聚乳酸-羟基乙酸共聚物和/或活性氧响应性磷脂包覆后，然后与 NK 细胞进行接枝。

优选的，所述聚乳酸-羟基乙酸共聚物的重均分子量为 30 k-60 k，优选 45 k-55 k，更优选 48 k-50 k。

优选的，所述聚乳酸-羟基乙酸共聚物中，聚乳酸结构与羟基乙酸结构的摩尔比为 1: (0.8-1.2)，优选 1: 1。

优选的，所述活性氧响应性磷脂（简称 ROS 响应性磷脂）为二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇。

优选的，所述二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇中的聚乙二醇为聚乙二醇 2000、聚乙二醇 4000、聚乙二醇 6000 中的至少一种，优选聚乙二醇 2000。所述硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇为活性氧响应性磷脂。

本申请的第二方面提供 NK 纳米药物制剂的制备方法。

具体的，NK 纳米药物制剂的制备方法，包括以下步骤：

(1) 取 $C_{17}H_{15}FO_3$ 、聚乳酸-羟基乙酸共聚物和/或活性氧响应性磷脂与有机溶剂混合，超声分散，加水，透析，制得 NPs@F-DMC；

(2) 将靶向肽 RVG29 与所述 NPs@F-DMC 混合，制得 RVG-NPs@F-DMC；

(3) 将 NK 细胞加入含有三 (2-羧乙基)-膦酸盐的磷酸缓冲盐溶液中，孵育，洗涤，得到经过三 (2-羧乙基)-膦酸盐处理过的 NK 细胞，然后将所述 RVG-NPs@F-DMC 与经过三 (2-羧乙基)-膦酸盐处理过的 NK 细胞混合，孵育，制得 NK 纳米药物制剂（记为 NK cell-NPs@F-DMC）。

优选的，步骤 (1) 中，所述 $C_{17}H_{15}FO_3$ 、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、活性氧响应性磷脂的质量比为 1: (0.8-3): (0.8-3)，优选 1: (1-2): (1-2)。

优选的，步骤（1）中，所述有机溶剂包括乙醇和/或二甲基亚砜。当有机溶剂为乙醇和二甲基亚砜的混合物时，乙醇与二甲基亚砜的体积比为 1：（7-10），优选 1：9。

优选的，步骤（1）中，所述 $C_{17}H_{15}FO_3$ 与有机溶剂的质量体积比为 1 mg：（0.1-1） mL，优选 1 mg：（0.1-0.5） mL。

优选的，步骤（1）中，所述超声的功率为 20-50 W，优选 30-35 W。

优选的，步骤（1）中，所述水为超纯水。

优选的，步骤（1）中，加入水是在超声分散的时候滴加。

优选的，步骤（1）中，所述水的体积为 1-20 mL，优选 2-10 mL。

优选的，步骤（1）中，所述透析是采用透析袋进行，且采用超纯水透析 40-48 小时。

进一步优选的，所述透析袋的截留分子量为 3000 Da-3500 Da。透析的作用在于除去 $C_{17}H_{15}FO_3$ 与有机溶剂。

优选的，步骤（2）中，取 1-5 μ g 靶向肽 RVG29 与步骤（1）制备的 NPs@F-DMC 混合 0.5-4 小时，超滤，去除游离的靶向肽 RVG29，制得所述 RVG-NPs@F-DMC，4°C 以下保存备用。

优选的，步骤（3）中，所述含有三（2-羧乙基）-膦酸盐的磷酸缓冲盐溶液中，三（2-羧乙基）-膦酸盐的浓度为 0.1-1 mg/mL，优选 0.1-0.5 mg/mL。

优选的，步骤（3）中，所述含有三（2-羧乙基）-膦酸盐的磷酸缓冲盐溶液中，磷酸缓冲盐溶液的体积为 1-15 mL，优选 1-10 mL。

优选的，步骤（3）中，将数量为 $(1-10) \times 10^6$ 个的 NK 细胞加入到含有三（2-羧乙基）-膦酸盐的磷酸缓冲盐溶液中。

优选的，步骤（3）中，所述孵育的温度为 35-37°C，孵育的时间为 5-50 分钟，优选孵育的温度为 37°C，孵育的时间为 10-45 分钟。孵育完后用磷酸缓冲盐溶液洗涤 2-10 次。

优选的，步骤（3）中，将 1 mL 的 RVG-NPs@F-DMC 与经过三（2-羧乙基）-膦酸盐处理过的 NK 细胞混合。混合后，RVG-NPs@F-DMC 的浓度为 10-50 μ g/mL，优选 5-60 μ g/mL。

优选的，步骤（3）中，制得 NK 纳米药物制剂前，还用磷酸缓冲盐溶液进行洗涤 2-10 次。

优选的，步骤（3）中，孵育后，离心 2-10 次，并用磷酸缓冲盐溶液分散，除去游离 RVG29、三（2-羧乙基）-膦酸盐等杂质，制得 NK 纳米药物制剂。

优选的，NK 纳米药物制剂的制备方法，包括以下步骤：

（1）取 $C_{17}H_{15}FO_3$ 、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、活性氧响应性磷脂与有机溶剂混合，超声分散，加水，透析，制得 NPs@F-DMC；其中 $C_{17}H_{15}FO_3$ 、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、活性氧响应性磷脂的质量比为 1：（0.8-3）：（0.8-3）， $C_{17}H_{15}FO_3$ 与有机溶剂的质量体积比为 1 mg：

(0.1-1) mL, 透析是采用透析袋进行, 且采用超纯水透析 40-48 小时, 所述透析袋的截留分子量为 3500 Da, 超声的功率为 20-50 W;

(2) 取 1-5 μg 靶向肽 RVG29 与步骤 (1) 制备的 NPs@F-DMC 混合 0.5-4 小时, 超滤, 制得 RVG-NPs@F-DMC;

(3) 将数量为 $(1-10) \times 10^6$ 个的 NK 细胞加入含有三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐的磷酸缓冲盐溶液中, 在 35-37°C 下孵育 5-50 分钟, 磷酸缓冲盐溶液进行洗涤 2-10 次, 得到经过三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐处理过的 NK 细胞; 然后将 1 mL 的 RVG-NPs@F-DMC 与经过三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐处理过的 NK 细胞混合, 在 35-37°C 下孵育 5-50 分钟, 离心, 磷酸缓冲盐溶液进行洗涤 2-10 次, 制得 NK 纳米药物制剂 (记为 NK cell-NPs@F-DMC); 其中含有三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐的磷酸缓冲盐溶液中, 三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐的浓度为 0.1-1 mg/mL, 磷酸缓冲盐溶液的体积为 1-15 mL。

本申请的第三方面提供 NK 纳米药物制剂的应用。

上述 NK 纳米药物制剂在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用。

优选的, 所述神经退行性疾病包括帕金森病。

一种治疗帕金森病的药物, 包括上述 NK 纳米药物制剂。

相对于现有技术, 本申请的有益效果如下:

本申请的 NK 纳米药物制剂中将自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK cell) 和 F-DMC 进行接枝, 促进 F-DMC 顺利通过血脑屏障, 在脑内氧化应激损伤条件下, NK 细胞和 F-DMC 连接被切断, 释放的 NK 细胞可以清除细胞外的 α -synuclein, 而被多巴胺神经元摄取的 F-DMC, 可以通过促进自噬, 清除细胞内的 α -synuclein。在双重作用下, 完成对病理性 α -synuclein 的清除和降解, 从而改善 PD 模型的行为障碍和脑内病理损伤。这种治疗模式有望为神经退行性疾病治疗提供新的借鉴。

附图说明

图 1 为 F-DMC 与 DMC 的结构图。

图 2 为 F-DMC 显著促进多巴胺能神经元 MN9D 细胞的自噬水平图。

图 3 为 F-DMC 显著促进多巴胺能神经元 MN9D 细胞对于病理性 α -synuclein 的清除效果图。

图 4 为实施例 1 制备的 NPs@F-DMC 和 RVG-NPs@F-DMC 的粒径检测结果。

图 5 为 NK 细胞和实施例 1 制备的 NK 纳米药物制剂的扫描电镜图。

图 6 为标记的 NK 纳米药物制剂 (NK cell-NPs@ICG) ROS 响应释药性能检测结果。

图 7 为实施例 1 的 NK 纳米药物制剂治疗改善了 AAV-A53T α -Syn 模型小鼠的运动行为

障碍结果。

图 8 为实施例 1 的 NK 纳米药物制剂治疗改善了 AAV-A53T α -Syn 模型小鼠的多巴胺神经元损伤结果。

图 9 为实施例 1 的 NK 纳米药物制剂治疗降低了 AAV-A53T α -Syn 模型小鼠的病理性 α -synuclein 表达。

具体实施方式

为了让本领域技术人员更加清楚明白本申请所述技术方案，现列举以下实施例进行说明。需要指出的是，以下实施例对本申请要求的保护范围不构成限制作用。

以下实施例中所用的原料、试剂或装置如无特殊说明，均可从常规商业途径得到，或者可以通过现有已知方法得到。

实施例 1：NK 纳米药物制剂的制备

NK 纳米药物制剂的制备方法，包括以下步骤：

(1) 取 5 mg $C_{17}H_{15}FO_3$ (F-DMC，购买自美国 ChemDiv 公司)、10 mg 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (聚乳酸-羟基乙酸共聚物的重均分子量为 50 k，聚乳酸-羟基乙酸共聚物中，聚乳酸结构与羟基乙酸结构的摩尔比为 1:1)、10 mg 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 (二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇中的聚乙二醇为聚乙二醇 2000) 与 1 mL 有机溶剂 (有机溶剂为乙醇和二甲基亚砜的混合物，乙醇与二甲基亚砜的体积比为 1:9) 混合，在功率为 30 W 的超声条件下滴加 5 mL 超纯水分散，然后透析 (透析是采用透析袋进行，且采用超纯水透析 48 小时，透析袋的截留分子量为 3500 Da)，制得 NPs@F-DMC；

(2) 取 2 μ g 靶向肽 RVG29 与步骤 (1) 制备的 NPs@F-DMC 混合 2 小时，超滤游离的靶向肽 RVG29，制得 RVG-NPs@F-DMC；

(3) 将数量为 5×10^6 个的 NK 细胞加入含有三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐的磷酸缓冲盐溶液 (三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐的浓度为 0.3 mg/mL，磷酸缓冲盐溶液的体积为 5 mL，磷酸缓冲盐溶液简称 PBS) 中，37°C 下孵育 20 分钟，用磷酸缓冲盐溶液进行洗涤 3 次，得到经过三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐处理过的 NK 细胞，然后将 1 mL 的 RVG-NPs@F-DMC (浓度为 20 μ g/mL) 与 1×10^5 个过三 (2-羧乙基)-膦盐酸盐处理过的 NK 细胞混合，37°C 下孵育 30 分钟，磷酸缓冲盐溶液进行洗涤 3 次，制得 NK 纳米药物制剂 (记为 NK cell-NPs@F-DMC)。

实施例 2：NK 纳米药物制剂的制备

NK 纳米药物制剂的制备方法，包括以下步骤：

(1) 取 5 mg $C_{17}H_{15}FO_3$ (F-DMC)、5 mg 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (聚乳酸-羟基乙酸共聚物的重均分子量为 50k，聚乳酸-羟基乙酸共聚物中，聚乳酸结构与羟基乙酸结构的摩尔比

为 1: 1)、5 mg 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 (二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇中的聚乙二醇为聚乙二醇 2000) 与 1 mL 有机溶剂 (有机溶剂为乙醇和二甲基亚砜的混合物, 乙醇与二甲基亚砜的体积比为 1: 9) 混合, 在功率为 30 W 的超声条件下滴加 10 mL 超纯水分散, 然后透析 (透析是采用透析袋进行, 且采用超纯水透析 48 小时, 透析袋的截留分子量为 3500 Da), 制得 NPs@F-DMC;

(2) 取 2 μ g 靶向肽 RVG29 与步骤 (1) 制备的 NPs@F-DMC 混合 1 小时, 超滤游离的靶向肽 RVG29, 制得 RVG-NPs@F-DMC;

(3) 将数量为 2×10^6 个的 NK 细胞加入含有三 (2-羧乙基)-膦酸盐的磷酸缓冲盐溶液 (三 (2-羧乙基)-膦酸盐的浓度为 0.1 mg/mL, 磷酸缓冲盐溶液的体积为 3 mL) 中, 37°C 下孵育 45 分钟, 用磷酸缓冲盐溶液进行洗涤 3 次, 得到经过三 (2-羧乙基)-膦酸盐处理过的 NK 细胞, 然后将 1 mL 的 RVG-NPs@F-DMC (浓度为 20 μ g/mL) 与 1×10^5 个经过三 (2-羧乙基)-膦酸盐处理过的 NK 细胞混合, 37°C 下孵育 30 分钟, 磷酸缓冲盐溶液进行洗涤 3 次, 制得 NK 纳米药物制剂 (记为 NK cell-NPs@F-DMC)。

产品效果测试方法如下:

1. NK 纳米药物制剂 ROS 响应释药实验

用质量比为 2% 的近红外荧光染料 ICG 代替 F-DMC, 制得标记纳米药物制剂 (记为 RVG-NPs@ICG), 进一步制得标记的 NK 纳米药物制剂 (记为 NK cell-NPs@ICG)。将标记的 NK 纳米药物制剂 (NK cell-NPs@ICG) 与含 ROS 的培养基 (400 mM 的 H_2O_2 和 3.2 μ M 的氯化铜)、以及不含 ROS 的培养基在 37°C 共孵育。在不同的时间点进行低速离心 (300 g, 3 分钟), 取一定体积的上清液测量其荧光强度, 并向共孵育培养皿中补入相同体积的培养基, 通过如下公式计算不同时间点的 NPs@ICG 释放量, 结果如图 6 所示。

$$NPs@ICG \text{ 累计释放率} = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} (F_i) + V_0 F_n}{V_0 F_0};$$

式中: V_e 为置换体积, V_0 为释放液的体积, F_i 为第 i 次置换取样时释放液中荧光强度。

2. 细胞活力实验

(1) 96 孔板加入 100 μ L 细胞悬液, 每孔 5000 个细胞。

(2) 细胞培养箱培养 24 h 后对细胞进行实验处理。

(3) 到达时间后, 弃上清, 将 CCK-8 检测试剂与完全培养基按 1: 9 的比例配置工作液, 完全移除旧培养基, 每孔加入 100 μ L 工作液, 放细胞培养箱温育。

(4) 温育 1 h 后, 用 450 nm 波长测试吸光度。

3. 电镜检测

透射电镜检测实验步骤如下：

- (1) 2.5%戊二醛的 0.1M PBS 固定液常温固定 1 小时，0.1M PBS 漂洗 3 次。
- (2) 使用 1%四氧化钨染色 30 分钟，蒸馏水冲洗三次，每次 15 分钟。
- (3) 依次用 50%、70%、90%和 100%的酒精 4℃脱水，每个梯度 15-20 分钟。
- (4) 丙酮/包埋剂（1：1），室温 1 小时，丙酮/包埋剂（1：3），4℃过夜，纯包埋剂，4℃过夜。
- (5) 树脂渗透样本在 65℃烘箱内固化 24 小时。
- (6) 超微切片机切片，厚度 50-100 nm。
- (7) 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色。
- (8) 透射电镜观察、拍照。

4. PD 模型制备及药物治疗

PD 模型应用大脑定位注射 AAV-A53T α -Syn 病毒。大脑定位注射步骤如下：C57BL/6J 小鼠吸入异氟烷麻醉后，俯卧位将小鼠固定在小鼠脑立体定位仪上，门齿低于耳杆 2.3 mm，保证前后囟在同一水平面上。剪去头部毛发，用碘伏消毒头部皮肤，依次剪开头皮，剥离骨膜。黑质坐标为前囟后 3.0 mm，中线旁开 1.3 mm，骨膜下 4.7 mm。注射对照病毒或者 AAV-A53T α -Syn 病毒 0.5 μ L。注射完毕，停针 10 min，缓慢拔针，缝一针，保暖。肌肉注射青霉素。清醒后置笼喂养。病毒注射完 1 个月后，尾静脉给予 PBS、NK 细胞（NK Cell）、纳米包载 F-DMC（NPs@F-DMC），NK 细胞连接 F-DMC（NK Cell-NPs@F-DMC），隔天一次，一共治疗 8 次。最后一次治疗结束后，进行行为学等检测。

5. 行为学实验

(1) 旷场实验：旷场箱为长 50 cm、宽 50 cm、高 40 cm 且内壁涂黑的正方形敞箱，且敞箱顶部人工给予光照，敞箱被分为中心区域（长 25 cm、宽 25 cm）和外周区域。实验开始时将小鼠放置于敞箱正中央，且保持每只小鼠位置和方向一致，让小鼠在敞箱中自由活动 15 min。使用 Smart 3.0 视频跟踪软件记录小鼠运动的运动速度等。

(2) 滚轴实验：滚轴实验需要动物在滚轴上保持平衡并连续运动，是广泛采用的检测运动协调性的实验，滚轴直径 6 cm，转速 20 r/min，小鼠适应 5 次后，每次检测间隔 1 min，连续测 5 次取平均值。

(3) 爬杆实验：将一直径为 2 cm 的泡沫塑料小球固定于一根长 50 cm、直径 1 cm 的木杆顶端，木杆上缠 2 层纱布以防打滑。持小鼠尾部将其头向下置于杆顶（以小鼠双后肢置于球上为准），让其自然爬下，小鼠自站于杆顶至双前肢接触杆底平台为爬完全长。在造模后各组分别取一定数量小鼠进行爬杆实验，观察小鼠行为学改变，记录爬杆时间。

(4) 悬挂实验：自制有机玻璃试验箱，水平放置的金属杆直径 1.5 mm，距地面 30 cm，金属杆上方 1 cm 加盖，以避免小鼠翻坐于金属杆上，实验中小鼠悬挂于金属杆上，使其前爪握住金属杆，保持 10 s。悬挂得分计算如下：小鼠两只后爪握住杆得 3 分；小鼠一只后爪握住杆得 2 分；小鼠未能用双后爪握住杆得 1 分；跌落小鼠得分为 0。

6. 免疫印迹杂交实验

提取细胞的蛋白样品，运用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，按一定比例加入上样缓冲液，100°C沸水浴 5 min。电泳后将蛋白转移至 PVDF（聚偏二氟乙烯）膜。室温下，PVDF 膜用 TBST 缓冲液（即 Tris 盐缓冲液）漂洗 5 min，5%牛血清白蛋白封闭液封闭 2 h，TBST 缓冲液漂洗 3 次，每次 5 min。一抗 4°C孵育过夜。TBST 缓冲液漂洗膜 3 次，每次 5 min，再将膜与二抗室温下孵育 1 h，TBST 缓冲液漂洗。将化学发光试剂 A 液与 B 液等量混合，孵育 PVDF 膜 1 min，在曝光仪上进行曝光。

7. 免疫组织化学染色

小鼠吸入异氟烷麻醉后，应用预冷生理盐水和 4%多聚甲醛进行灌注。取小鼠大脑置于 4%多聚甲醛 4°C固定约 6 h，依次移入 20%、30%蔗糖溶液于 4°C冰箱中梯度脱水，OCT 包埋剂包埋组织，恒冷冰冻切片机连续冠状切片。切片置于 0.01M 枸橼酸盐缓冲液染色缸中，98°C水浴 10~15 min，自然冷却至室温，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min。0.3% Triton 和 5% BSA 破膜封闭 30 min，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min。滴加一抗，4°C湿盒内过夜，第二天，从冰箱拿出后室温复温 45 min，切片滴加二抗，37°C孵育 60 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。滴加 DAB 显色液于切片，室温，镜下检测反应时间，自来水流水冲洗。苏木素复染 2 min，盐酸酒精分色 1 次，自来水流水冲洗。梯度酒精脱水后，树脂封片，镜检。

8. 免疫荧光染色

切片经过 PBS 漂洗后，用含 0.3% Triton 和 5% BSA 的 PBS 液在 37°C下破膜封闭 1 h，一抗 4°C孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后二抗孵育 1h，阴干，甘油封片。在激光共聚焦显微镜下扫描，计算机数据采集，数字成像。

产品效果测试结果如下：

1. F-DMC 促进自噬的细胞实验验证

培养多巴胺神经元细胞系 MN9D，加入不同浓度的 F-DMC（0、5、10、50 和 100 μ M），将雷帕霉素（10 μ M）作为阳性对照。培养 24 小时后，通过免疫印迹杂交和电镜等实验进行观察，结果如图 2（图 2 中的“Ctrl”表示雷帕霉素阳性对照，LC3I、LC3II、p62、GAPDH 表示蛋白质）所示。

图 1 为 F-DMC 与 DMC 的结构图；图 1 中的 A 图表示 DMC 的二维结构，B 表示 F-DMC 的二维结构。

图 2 为 F-DMC 显著促进多巴胺能神经元 MN9D 细胞的自噬水平图。从图 2 可以看出 F-DMC 可以呈现浓度依赖性地促进 MN9D 细胞自噬的产生,具体表现为 LC3II/I 比例的增加(参见图 2 中的 A 图)。此外,在同等浓度(100 μ M)下, F-DMC 较 DMC 显著促进自噬产生(参见图 2 中的 B 图)。应用透射电镜观察, F-DMC 显著促进了自噬溶酶体的生成,具体表现为溶酶体数目的增加(参见图 2 中的 C 图)。细胞活力实验,显示不同浓度的 F-DMC 未显示有细胞毒性,证实了该药物的安全性(参见图 2 中的 D 图)。

2. F-DMC 显著促进病理性 α -synuclein 的清除和降解

应用人源性 α -synuclein 纤维体(h α -Syn)处理 MN9D 细胞,加入 F-DMC 和 DMC(100 μ M),培养 24 小时,结果如图 3 所示。

图 3(图 3 中的“Ctrl”表示雷帕霉素阳性对照)为 F-DMC 显著促进多巴胺能神经元 MN9D 细胞对于病理性 α -synuclein 的清除效果图;从图 3 可以看出,与 DMC 相比, F-DMC 可以显著清除 α -synuclein 纤维体(表现为降低磷酸化 α -synuclein 表达)(参见图 3 中的 A 图)。并且 50 μ M 和 100 μ M 的 F-DMC 可显著清除磷酸化 α -synuclein 和降低内源性 α -synuclein 表达,显示了较好的降解 α -synuclein 作用(参见图 3 中的 B 图)。

3. NK 纳米药物制剂中间物的表征

实施例 1 制备的 NPs@F-DMC 和 RVG-NPs@F-DMC,利用 Zetasizer Nano ZS 仪器检测粒径,结果如图 4 所示。

图 4 为实施例 1 制备的 NPs@F-DMC 和 RVG-NPs@F-DMC 的粒径检测结果。从图 4(图 4 中的“Size”表示尺寸,“PDI”表示多分散系数)可以看出, NPs@F-DMC 和 RVG-NPs@F-DMC 的粒径分布在 80-300 nm 之间(参见图 4 中的 A 图),其中平均粒径在 160.0 $\pm$ 6.9 nm 和 167.3 $\pm$ 6.5 nm(参见图 4 中的 B 图)。PDI 多分散系数分别是 0.445 和 0.403(参见图 4 中的 C 图)。

4. NK 纳米药物制剂扫描电镜表征结果

图 5 为 NK 细胞和实施例 1 制备的 NK 纳米药物制剂的扫描电镜图;图 5 中的“NK cell”表示 NK 细胞,“NK cell-NPs@F-DMC”表示实施例 1 制备的 NK 纳米药物制剂,在 NK 细胞表面接枝包载的药物如图 5 箭头所示。

5. NK 纳米药物制剂 ROS 响应释药实验

用质量比为 2%的近红外荧光染料 ICG 代替 F-DMC,参照实施例 1 的方法,制得荧光标记的纳米药物制剂(记为 RVG-NPs@ICG),进一步制得荧光标记的 NK 纳米药物制剂(记为 NK cell-NPs@ICG)。将荧光标记的 NK 纳米药物制剂(NK cell-NPs@ICG)与含 ROS 的培养基(400 mM 的 H₂O₂ 和 3.2 μ M 的氯化铜)、以及不含 ROS 的培养基在 37 $^{\circ}$ C 共孵育。在不同的时间点进行低速离心(300 g, 3 分钟),取一定体积的上清液测量其荧光强度,并向

共孵育培养皿中补入相同体积的培养基，通过如下公式计算不同时间点的 NPs@ICG 累计释放率，结果如图 6 所示。

$$(Er\%) = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} (F_i) + V_0 F_n}{V_0 F_0}$$

NPs@ICG 累计释放率

式中：V_e为置换体积，V₀为释放液的体积，F_i为第 i 次置换取样时释放液中荧光强度。

图 6 为荧光标记的 NK 纳米药物制剂 (NK cell-NPs@ICG) ROS 响应释药性能检测结果；从图 6 中可以看出，与无 ROS（即-Ros）的 PBS 处理组相比，在 ROS（即+ROS）存在的条件下，纳米药物制剂从细胞表面脱落的 12 小时，脱落效率超出 80%，证明该体系具有良好的 ROS 响应释放能力。

6. NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 显著改善了 AAV-A53T α-Syn 模型小鼠的运动行为障碍和多巴胺神经元损伤

应用 AAV-A53T α-Syn 制备 PD 小鼠模型，尾静脉注射药物进行治疗。实验分为 5 组，分别是对照组给予 PBS（野生型，wildtype，简称 WT），一个模型组给予 PBS（AAV-A53T α-Syn），一个模型组给予 NK 细胞（AAV-A53T α-Syn + NK Cell），一个模型组给予实施例 1 制备的 NPs@F-DMC（AAV-A53T α-Syn + NPs@F-DMC），一个模型组给予实施例 1 制备的 NK 纳米药物制剂（AAV-A53T α-Syn + NK Cell-RVG-NPs@F-DMC），然后进行了旷场实验、爬杆实验、滚轴实验、悬挂实验，结果如图 7 所示。

图 7 和图 8 为实施例 1 的 NK 纳米药物制剂治疗改善了 AAV-A53T α-Syn 模型小鼠的运动行为障碍和多巴胺神经元损伤结果；从图 7 可以看出，NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 实验组显著增加了小鼠在旷场实验中的运动速度（参见图 7 中 A 图）。

此外，治疗后小鼠的爬杆时间显著降低（参见图 7 中 B 图），在滚轴运动时间和悬挂时间显著延长（参见图 7 中 C、D 图）。这些行为学实验证实，PD 模型小鼠的运动行为障碍显著得到缓解。通过免疫组化染色检测其对多巴胺神经元的影响，结果表明，和其他组相比，NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 治疗后多巴胺神经元数目明显增加，说明 F-DMC 可以显著改善 PD 模型中神经元活性（参见图 8）。

7. NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 显著改善了 AAV-A53T α-Syn 模型小鼠的病理性 α-synuclein 表达

应用免疫印迹杂交实验进一步证实，实施例 1 的 NK 纳米药物制剂显著改善了 AAV-A53T α-Syn 模型小鼠的病理性 α-synuclein 表达，结果如图 9 所示。

图 9 为实施例 1 的 NK 纳米药物制剂治疗降低了 AAV-A53T α-Syn 模型小鼠的病理性 α-synuclein 表达。

从图 9 可以看出, 较模型组 (AAV-A53T α -Syn 组), NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 治疗可显著增加 TH 表达, 减少磷酸化 α -synuclein 表达, 显示 NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 给药体系对多巴胺神经元的保护效应 (参见图 9 中 A 图)。通过免疫荧光发现, NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 治疗后可以显著降低病理性 α -synuclein 的表达 (参见图 9 中 B 图, 箭头指示为磷酸化 α -synuclein)。从而证实, 该 NK Cell-RVG-NPs@F-DMC 给药体系可以显著清除病理性 α -synuclein, 从而对 PD 模型发挥神经保护作用。

权利要求书

1. NK 纳米药物制剂, 其特征在于, 包括 NK 细胞和接枝在所述 NK 细胞表面的 $C_{17}H_{15}FO_3$ 。
2. 根据权利要求 1 所述的 NK 纳米药物制剂, 其特征在于, 所述 NK 纳米药物制剂还包括聚乳酸-羟基乙酸共聚物和/或活性氧响应性磷脂, 所述 $C_{17}H_{15}FO_3$ 经聚乳酸-羟基乙酸共聚物和/或活性氧响应性磷脂包覆后, 然后与所述 NK 细胞进行接枝。
3. 根据权利要求 2 所述的 NK 纳米药物制剂, 其特征在于, 所述聚乳酸-羟基乙酸共聚物的重均分子量为 30 k-60 k。
4. 根据权利要求 2 所述的 NK 纳米药物制剂, 其特征在于, 所述活性氧响应性磷脂为二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇。
5. 一种 NK 纳米药物制剂的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - (1) 取 $C_{17}H_{15}FO_3$ 、聚乳酸-羟基乙酸共聚物和/或活性氧响应性磷脂与有机溶剂混合, 超声分散, 加水, 透析, 制得 NPs@F-DMC;
 - (2) 将靶向肽 RVG29 与步骤 (1) 制备的 NPs@F-DMC 混合, 制得 RVG-NPs@F-DMC;
 - (3) 将 NK 细胞加入含有三 (2-羧乙基)-膦酸盐的磷酸缓冲盐溶液中, 孵育, 洗涤, 得到经过三 (2-羧乙基)-膦酸盐处理过的 NK 细胞, 然后将所述 RVG-NPs@F-DMC 与经过三 (2-羧乙基)-膦酸盐处理过的 NK 细胞混合, 孵育, 制得 NK 纳米药物制剂。
6. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤 (1) 中, 所述 $C_{17}H_{15}FO_3$ 、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、活性氧响应性磷脂的质量比为 1: (0.8-3): (0.8-3)。
7. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤 (2) 中, 取 1-5 μg 靶向肽 RVG29 与步骤 (1) 制备的 NPs@F-DMC 混合 0.5-4 小时, 超滤, 去除游离的靶向肽 RVG29, 制得所述 RVG-NPs@F-DMC。
8. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤 (3) 中, 所述含有三 (2-羧乙基)-膦酸盐的磷酸缓冲盐溶液中, 三 (2-羧乙基)-膦酸盐的浓度为 0.1-1 mg/mL, 磷酸缓冲盐溶液的体积为 1-15 mL。
9. 权利要求 1-4 任一项所述的 NK 纳米药物制剂在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用。
10. 一种治疗帕金森病的药物, 其特征在于, 包括权利要求 1-4 任一项所述的 NK 纳米药物制剂。

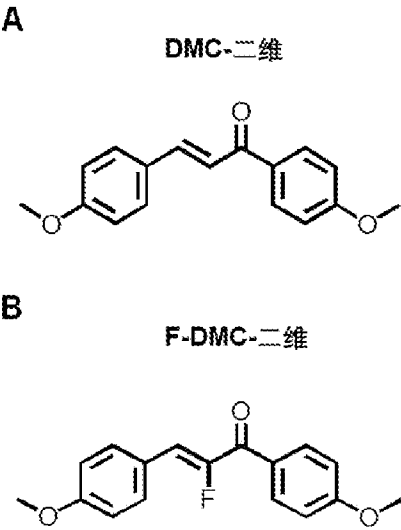


图 1

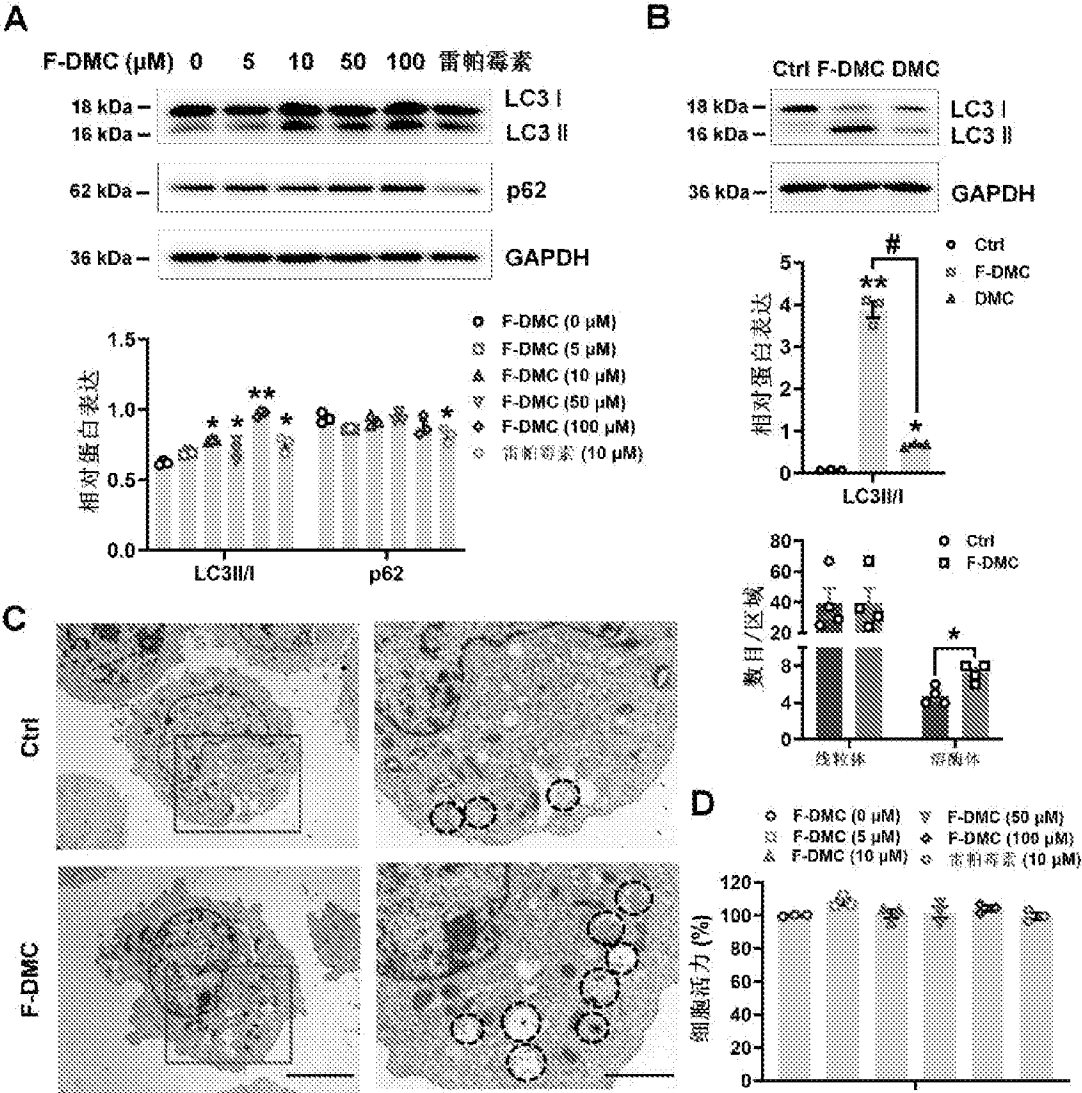


图 2

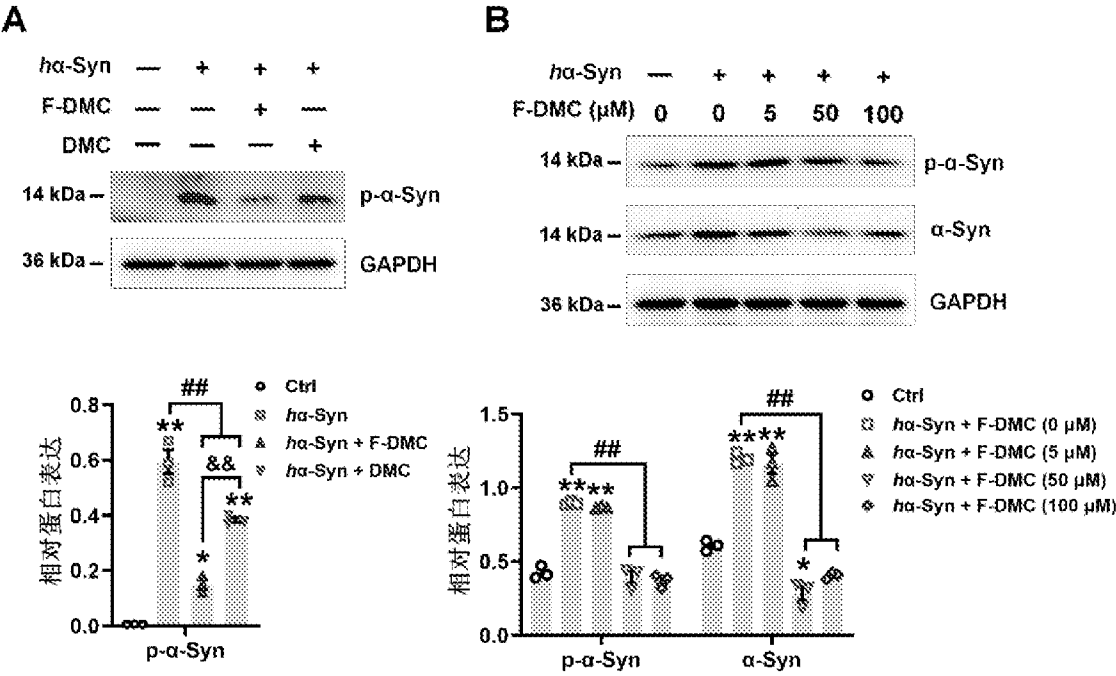


图 3

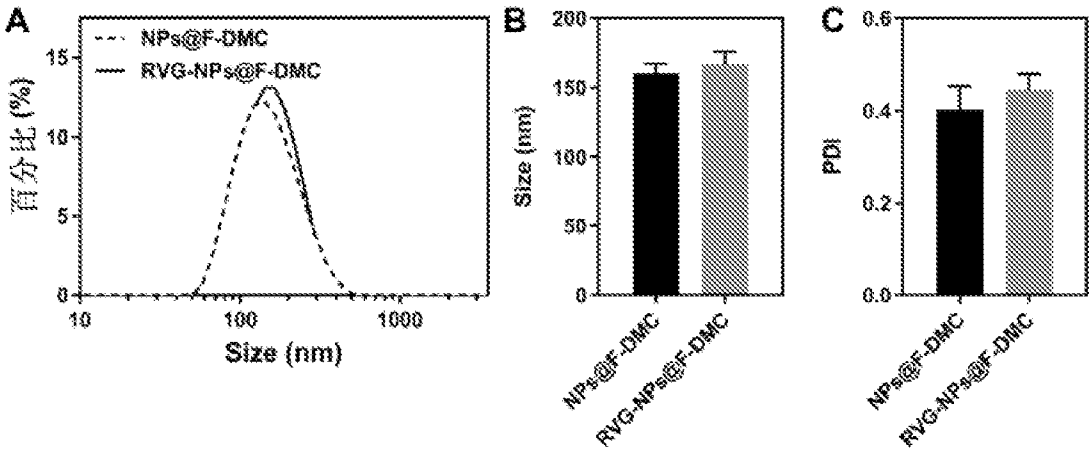


图 4

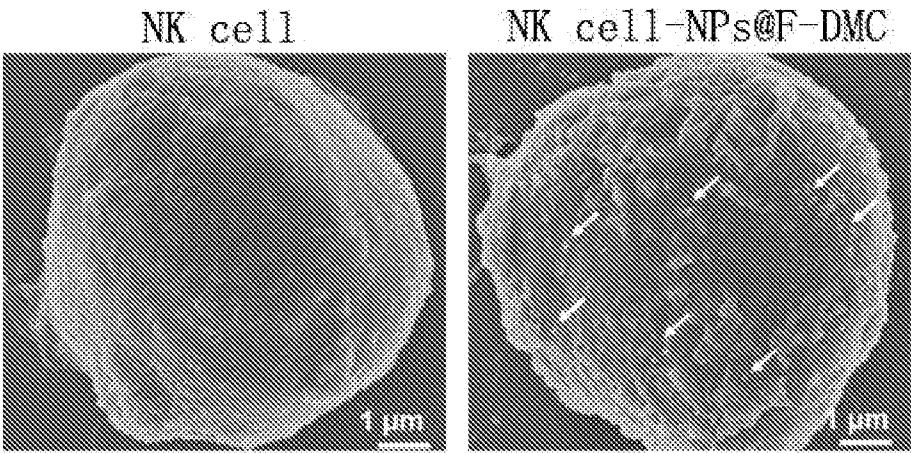


图 5

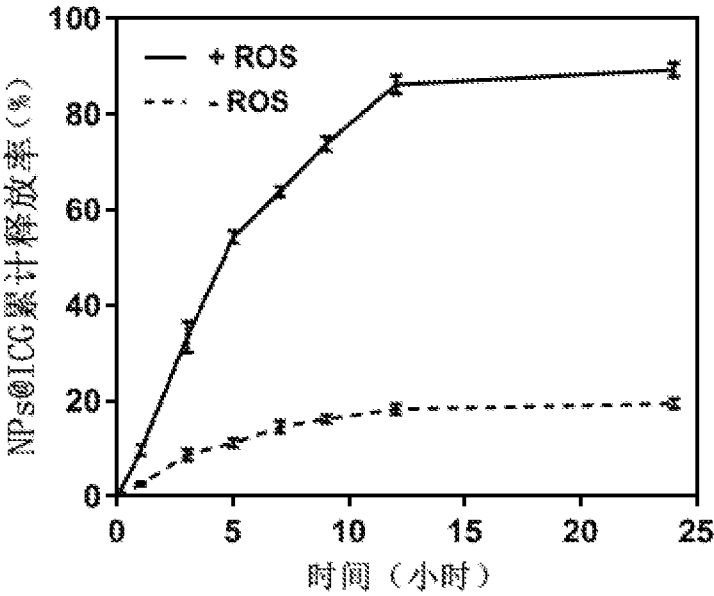


图 6

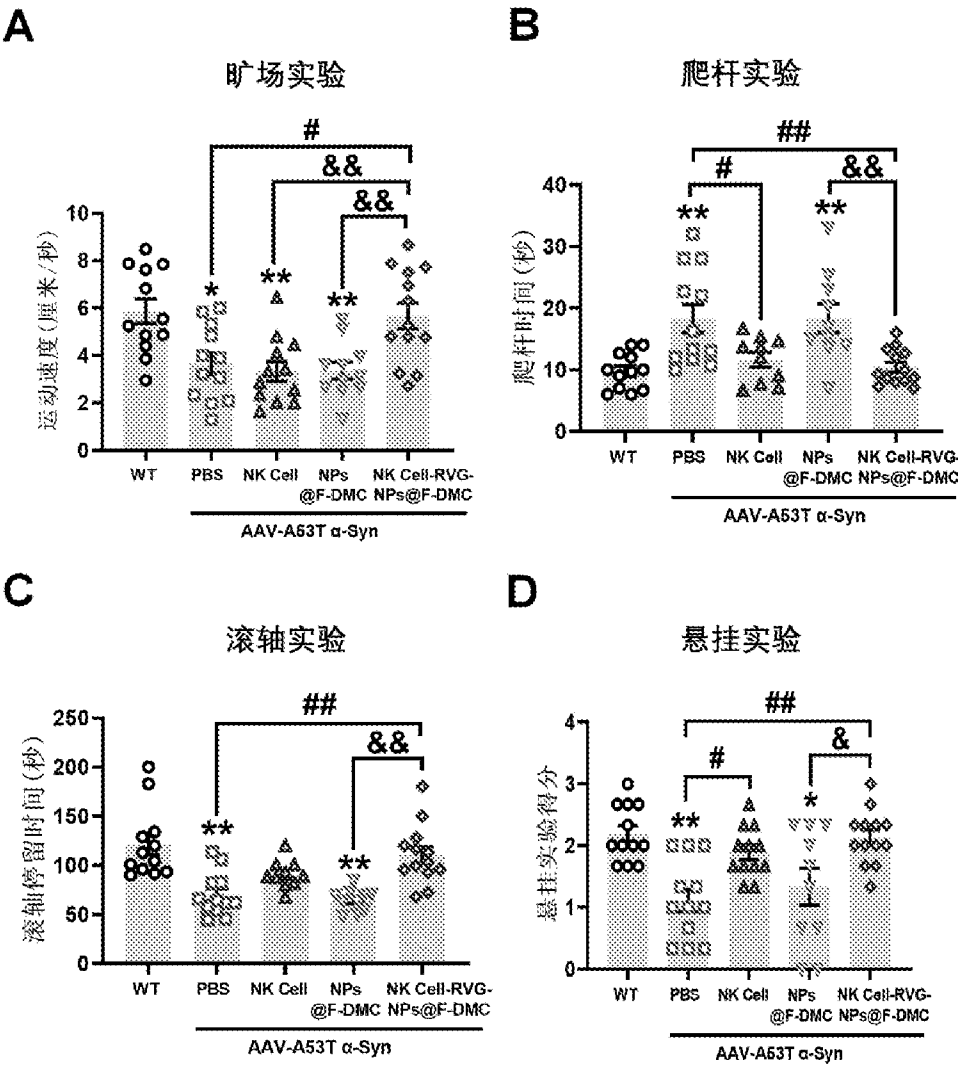


图 7

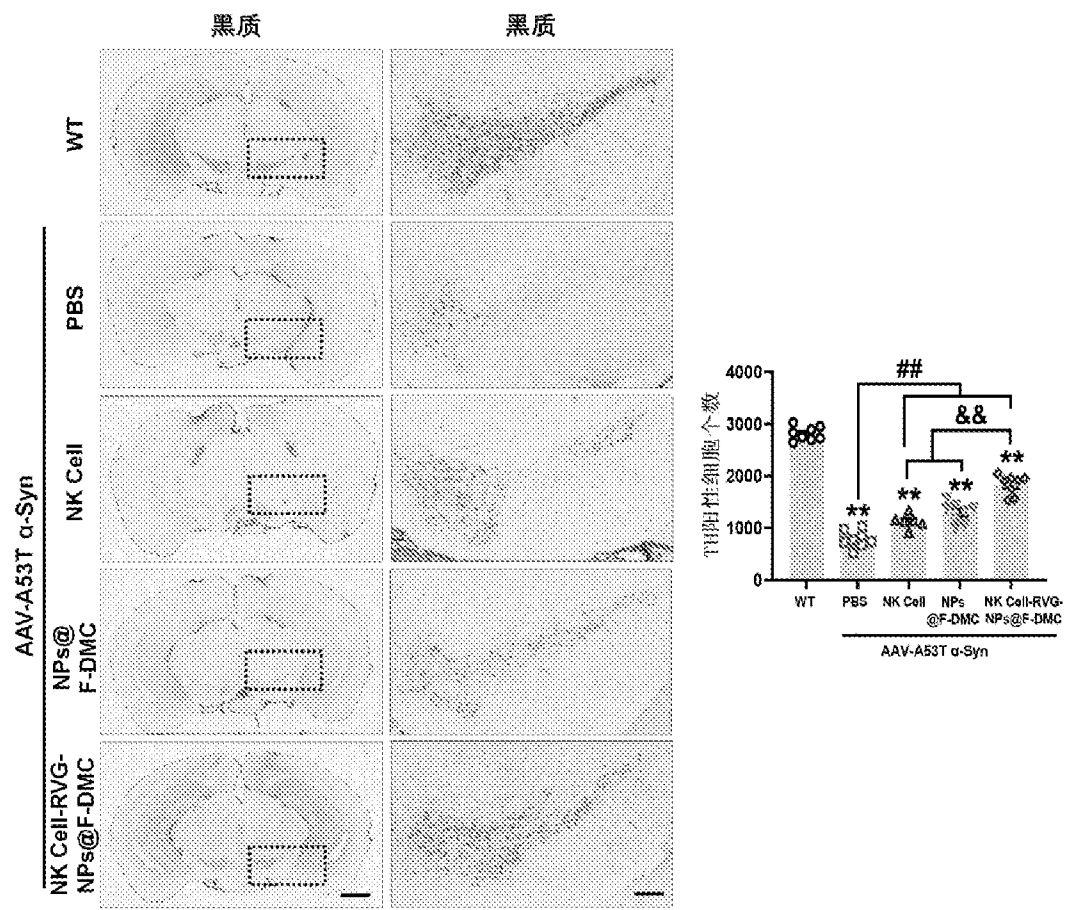
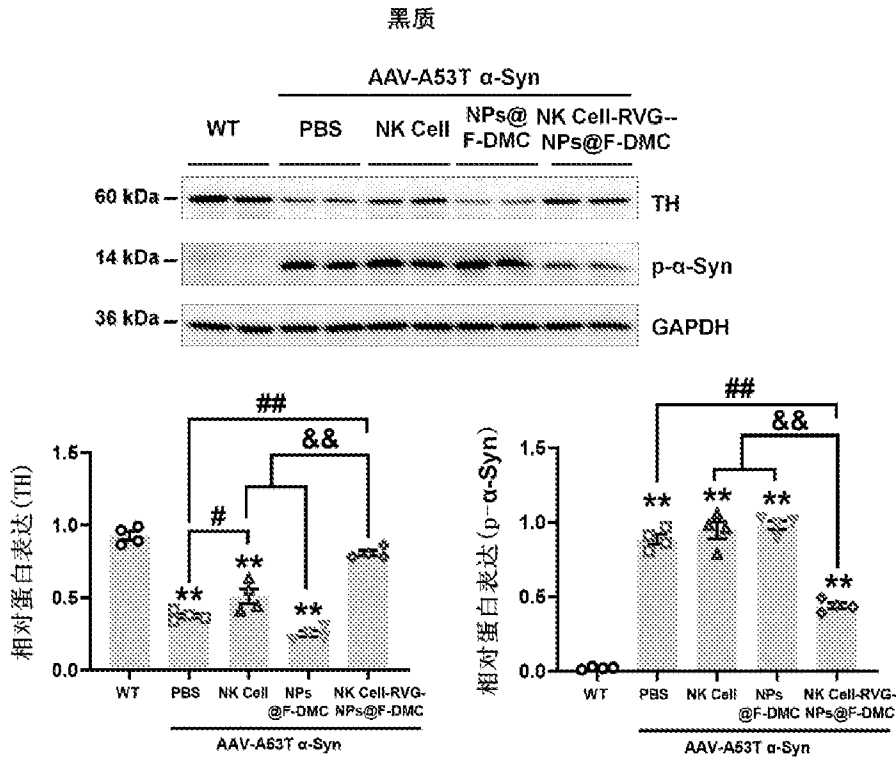


图 8

A



B

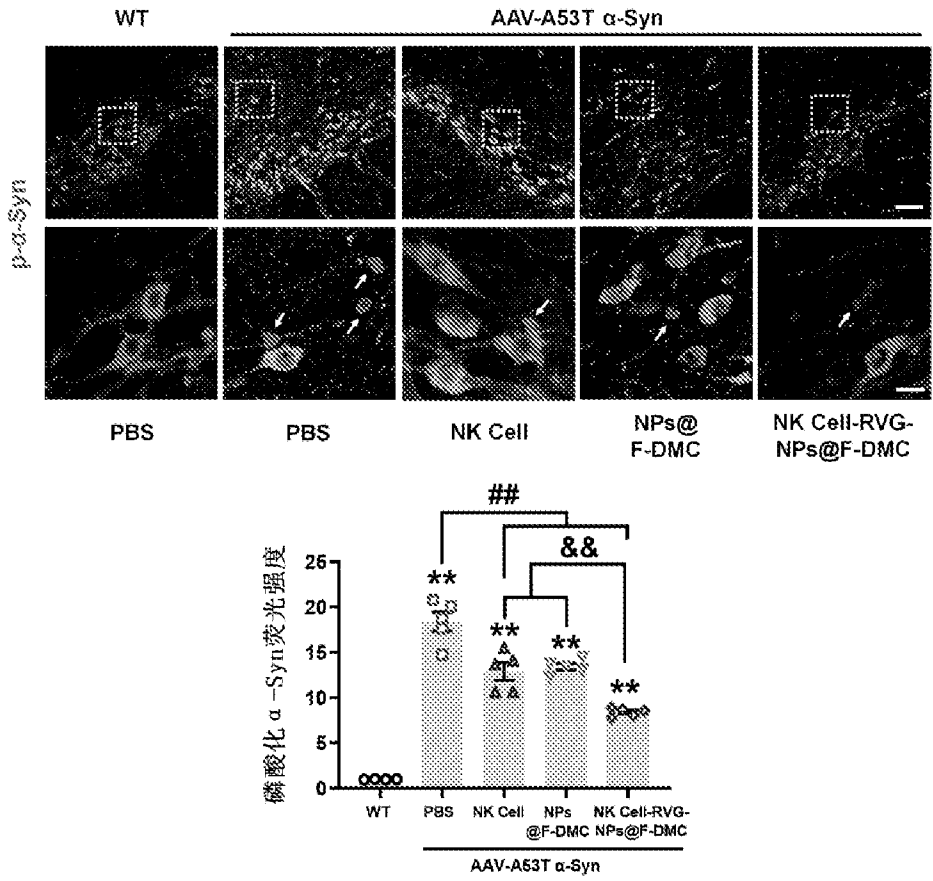


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/093953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/54(2017.01)i; A61K47/34(2017.01)i; A61K47/24(2006.01)i; A61K35/17(2015.01)i; A61P25/28(2006.01)i; A61P25/16(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

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, DWPI, WPABS, CNTXT, ENTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, STNEXT: 西湖实验室, 中国科学院深圳先进技术研究, 张元龙, NK细胞, F-DMC, 接枝, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物, 活性氧响应性磷脂, 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇, RVG29, 三(2-羟乙基)-膦盐酸盐, 巯基, 还原剂, 靶向, 血脑屏障, 神经退行性疾病, 帕金森, 结构检索, NK cell, dimethoxychalcone, polylactic acid-glycolic acid copolymer, PLGA, reactive oxygen species responsive phospholipids, distearoylphosphatidylethanolamine polyethylene glycol, DSPE-PEG, nanoparticle, tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride, TCEP, drug delivery, blood-brain barrier, BBB, neurodegenerative disease, parkinson

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116942839 A (WESTLAKE LABORATORY (LIFE SCIENCES AND BIOMEDICINE ZHEJIANG LABORATORY) et al.) 27 October 2023 (2023-10-27) claims 1-10	1-10
PA	CN 117257982 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 22 December 2023 (2023-12-22) claims 1-10, and description, paragraphs 0001-0035	1-10
A	ZHANG, Wenlong et al. "Trojan Horse Delivery of 4,4'-Dimethoxychalcone for Parkinsonian Neuroprotection" <i>Advanced Science</i> , Vol. 8, 03 March 2021 (2021-03-03), pages 1-17	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

18 August 2024

Date of mailing of the international search report

26 August 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/CN2024/093953

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 116236461 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 09 June 2023 (2023-06-09) claims 1-12 and 14, description, paragraph 0045, and embodiments 1-4	1-10
A	MENEES, Kelly B. et al. "New Insights and Implications of Natural Killer Cells in Parkinson's Disease" <i>Journal of Parkinson's Disease</i> , Vol. 12, 31 December 2022 (2022-12-31), pages S83-S92	1-10
A	GONG, Junwei et al. "4,4'-Dimethoxychalcone Regulates Redox Homeostasis by Targeting Riboflavin Metabolism in Parkinson's Disease Therapy" <i>Free Radical Biology and Medicine</i> , Vol. 174, 28 July 2021 (2021-07-28), pages 40-56	1-10
A	CN 116236564 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 09 June 2023 (2023-06-09) claims 1-12, and description, paragraphs 0001-0028	1-10
A	WU, Liya et al. "Magnetic Delivery of Fe ₃ O ₄ @polydopamine Nanoparticle-Loaded Natural Killer Cells Suggest a Promising Anticancer Treatment" <i>Biomaterials Science</i> , Vol. 6, 31 December 2018 (2018-12-31), pages 2714-2725	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/093953

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	116942839	A	27 October 2023	None	
CN	117257982	A	22 December 2023	None	
CN	116236461	A	09 June 2023	None	
CN	116236564	A	09 June 2023	None	

A. 主题的分类

A61K47/54(2017.01)i; A61K47/34(2017.01)i; A61K47/24(2006.01)i; A61K35/17(2015.01)i; A61P25/28(2006.01)i; A61P25/16(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

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))

CNABS, DWPI, WPABS, CNTXT, ENTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, STNEXT: 西湖实验室, 中国科学院深圳先进技术研究院, 张元龙, NK细胞, F-DMC, 接枝, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物, 活性氧响应性磷脂, 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇, RVG29, 三(2-羟乙基)-膦酸盐, 疏基, 还原剂, 靶向, 血脑屏障, 神经退行性疾病, 帕金森, 结构检索, NK cell, dimethoxychalcone, polylactic acid-glycolic acid copolymer, PLGA, reactive oxygen species responsive phospholipids, distearoylphosphatidylethanolamine polyethylene glycol, DSPE-PEG, nanoparticle, tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride, TCEP, drug delivery, blood-brain barrier, BBB, neurodegenerative disease, parkinson

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
PX	CN 116942839 A (西湖实验室(生命科学和生物医学浙江省实验室)等) 2023年10月27日 (2023 - 10 - 27) 权利要求1-10	1-10
PA	CN 117257982 A (深圳先进技术研究院) 2023年12月22日 (2023 - 12 - 22) 权利要求1-10, 说明书第0001-0035段	1-10
A	ZHANG, Wenlong等. "Trojan Horse Delivery of 4,4'-Dimethoxychalcone for Parkinsonian Neuroprotection" Advanced Science, 第8卷, 2021年3月3日 (2021 - 03 - 03), 第1-17页	1-10
A	CN 116236461 A (深圳先进技术研究院) 2023年6月9日 (2023 - 06 - 09) 权利要求1-12、14, 说明书第0045段, 实施例1-4	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

2024年8月18日

国际检索报告邮寄日期

2024年8月26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

张茜

电话号码 (+86) 010-53961878

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
A	MENEES, Kelly B.等. "New Insights and Implications of Natural Killer Cells in Parkinson' s Disease" Journal of Parkinson' s Disease, 第12卷，2022年12月31日 (2022 - 12 - 31)， 第S83-S92页	1-10
A	GONG, Junwei等. "4,4' -Dimethoxychalcone regulates redox homeostasis by targeting ribo-flavin metabolism in Parkinson' s disease therapy" Free Radical Biology and Medicine, 第174卷，2021年7月28日 (2021 - 07 - 28)， 第40-56页	1-10
A	CN 116236564 A (深圳先进技术研究院) 2023年6月9日 (2023 - 06 - 09) 权利要求1-12，说明书第0001-0028段	1-10
A	WU, Liya等. "Magnetic delivery of Fe3O4@polydopamine nanoparticle-loaded natural killer cells suggest a promising anticancer treatment" Biomaterials Science, 第6卷，2018年12月31日 (2018 - 12 - 31)， 第2714-2725页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/093953

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	116942839	A	2023年10月27日	无	
CN	117257982	A	2023年12月22日	无	
CN	116236461	A	2023年6月9日	无	
CN	116236564	A	2023年6月9日	无	