

(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 7 日 (07.11.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/227301 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 47/42* (2017.01)
A61K 47/54 (2017.01) *A61K 47/26* (2006.01)
A61K 47/62 (2017.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/092187
- (22) 国际申请日: 2023 年 5 月 5 日 (05.05.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310490378.3 2023年5月4日 (04.05.2023) CN
- (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)。
- (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)。文苹 (WEN, Ping); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (74) 代理人: 杭州天昊专利代理事务所 (特殊普通合伙) (HANGZHOU TIANHAO PATENT AGENCY CO.LTD); 中国浙江省杭州市上城区红普路 788 号绿谷杭州东部创新中心 1 幢 1103, Zhejiang 310019 (CN)。

(54) **Title:** PROTEIN-NUCLEIC ACID AGGREGATE FOR DELIVERING BIOLOGICAL PREPARATION, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种递送生物制剂的蛋白质-核酸凝集体及其制备方法

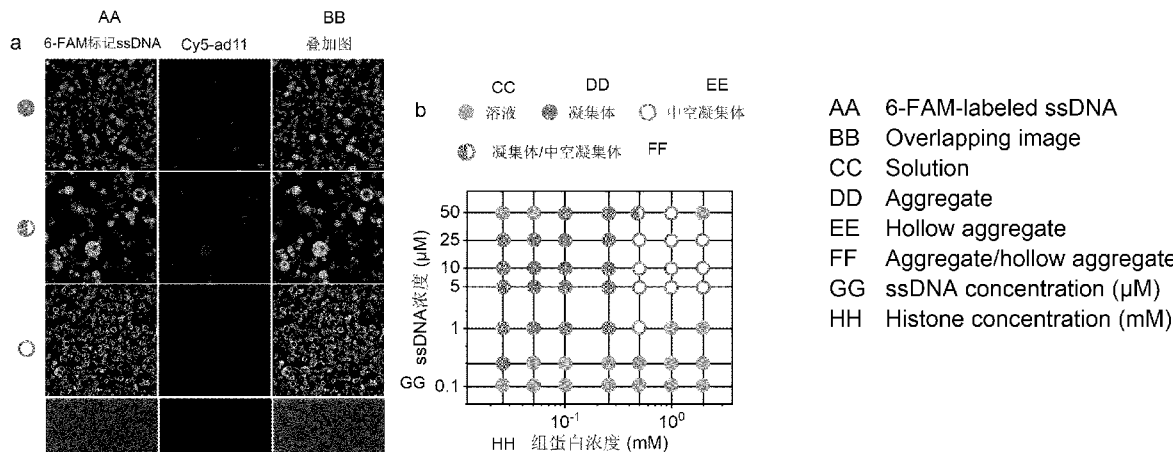


图 5

(57) **Abstract:** Provided in the present invention is a protein-nucleic acid aggregate carrier for delivering a biological preparation, which carrier comprises a histone and a group-modified single-stranded nucleic acid. The carrier has a hollow structure and is used for stable delivery of a biological preparation. The hollow protein-nucleic acid aggregate carrier can be obtained by means of mixing the histone and the modified single-stranded nucleic acid in a solvent at a specific final concentration, and can encapsulate various types of biological preparations for adjuvant treatment. The carrier has a stable structure and a good delivery effect in an organism, and has good application prospects.

(57) **摘要:** 本发明提供了一种递送生物制剂的蛋白质-核酸凝集体载体, 该载体包括组蛋白和被基团修饰的单链核酸; 其中所述的载体为中空的结构, 利用这样的载体稳定地递送生物制剂。将组蛋白与被修饰的单链核酸在溶剂中按照特定的终浓度混合后可获得中空的蛋白质-核酸凝集体载体, 可包载各种类的生物制剂用于辅助治疗。此载体在生物体内结构稳定, 递送效果好, 具有良好的应用前景。

[见续页]

(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)。

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))。

一种递送生物制剂的蛋白质-核酸凝集体及其制备方法

本申请主张中国在先申请，申请号：202310490378.3，申请日 2023 年5 月4 日的优先权；其所有的内容作为本发明的一部分。

技术领域

本发明涉及医学领域，具体涉及一种用于递送生物制剂的蛋白质-核酸凝集体及其制备方法。

背景技术

蛋白质和核酸等生物大分子通过弱多价相互作用及构象熵介导的液-液相分离（Liquid-liquid phase separation, LLPS）形成无膜的细胞器或凝集体，参与众多细胞关键生命活动的调控并与多种人类疾病密切相关。经 LLPS 形成的凝集体允许富集不同理化性质的生物分子，同时将其他生物分子隔离在凝集体之外。凝集体作为细胞内单独的区室，为富集的分子创造一个隔离的环境，从而实现分隔和调节细胞内的生化反应。LLPS 现象不仅局限于在生物学或病理学上发挥作用，也可以为仿生应用提供启发性线索。

随着多肽类、蛋白质、抗体药物、核酸、细菌和病毒等新型生物制剂的出现，对递送载体的要求也在不断的变化。多肽类和蛋白质的稳定性、核酸药物易被降解以及递送效率低、病毒存在安全性和易被机体免疫清除等局限限制了新型生物制剂在疾病治疗中的应用。针对这些挑战，传统的药物载体，如脂质体、纳米颗粒等，存在其载药量有限、易渗漏及生产工艺复杂等问题，因此药物递送领域亟需新型药物载体来解决生物制剂在疾病治疗方面新出现的挑战。

凝集体在形成过程中可以将生物大分子（多肽，蛋白质等）吸收招募到区室内，具备高效富集客体分子及有效保留其生物活性的优点，展现出了作为生物制剂递送载体的潜力。然而由 LLPS 可逆、动态形成的凝集体不受膜结构的限制，易聚结及受环境因素，如温度、pH、离子强度等影响，从而限制了其在药物递送领域中的应用。

这就需要进行对现有的递送系统进行改良，提供新的递送生物制剂的载体。

发明内容

本发明设计并生成了新的递送载体，该载体由蛋白与核酸凝集而成，其中，所述的凝集体为中空。该结构的具有如下的优点：具备优异的生理环境稳定性；生物相容性，能够高效地招募生物制剂并提升细胞对生物制剂的摄取效率，最终实现生物制剂的有效递送，从而改善疾病治疗效果。

本发明的目的在于提供一种递送载体，所述的载体是由蛋白质与核酸凝集而成，其中所述的载体是中空的结构或者载体内含有空间。利用该载体装载生物制剂，生物制剂可以是多肽类、蛋白质、抗体药物、核酸、细菌和病毒等，用于治疗疾病或者预防疾病，例如用于制备疫苗，传染病疫苗，肿瘤疫苗等等。

进一步的，所述的蛋白为组蛋白。在一些方式中，所述的组蛋白为多种蛋白的混合体。在一些方式中，所述的组蛋白来源于小牛胸腺的提取物。在一些方式中，所述的组蛋白包括 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 中的任意一种或多种。

在一些方式中，除了包含组蛋白，还可以包含非组蛋白序列特异性 DNA 结合蛋白。

本发明所述的组蛋白，具有如下特征：带正电荷，含 Arg、Lys 属碱性蛋白，只在细胞周期中的 S 期合成。共五种，分为核心组蛋白，H2A、H2B、H3、H4 和连接组蛋白（H1）。组蛋白结构高度保守，尤其是 H4。核心组蛋白由球形部和尾部构成，球形部借 Arg 与磷酸二脂骨架间的静电作用使 DNA 分子缠绕在组蛋白核心上，形成核小体，尾部含有大量 Arg 和 Lys，为转译后修饰的部位。H1 具有多样性，具有属和组织特异性。

本发明所述的非组蛋白序列特异性 DNA 结合蛋白具有如下特征：带负电，属酸性蛋白，在整个细胞周期都合成，能识别特异 DNA 序列，以氢键和离子键结合。非组蛋白序列特异性 DNA 结合蛋白的功能是帮助 DNA 折叠、复制；调节基因表达。

本发明所形成的中空凝集体表面带正电荷或接近电中性，与带负电荷的细胞膜产生相互作用；中空凝集体在生理条件下能保持结构稳定。

进一步的，所述的核酸为被修饰的单链核酸，例如脱氧核糖核酸（DNA）或者核糖核酸（RNA），或者 DNA 与 RNA 的混合体。

进一步的，所述的修饰基团包括与哺乳动物细胞膜类似的物质。

在一些方式中，修饰的基团可以是胆固醇、磷脂、糖脂、糖蛋白中的任意一种或多种。这里的蛋白可以是构成细胞膜的蛋白。可以理解，凡是构成细胞膜的分子都可以被用来修饰本发明所定义的单链核酸，如脂质、蛋白质以及少量糖类，比如磷脂，或者与构成细胞膜成分类似的物质，如两亲型物质，嵌段共聚物，经修饰的药物等，都可以用来修饰。从

机理上，凡是那些与细胞膜成分相似的物质都可以被用来对单链核酸进行修饰。比如本发明的一个具体实施方式中的胆固醇与细胞膜成分相似，可辅助其他组分跨膜运输。

在一些方式中，所述的修饰基团在单链核酸的 3'端或者 5'端，或者在 3'和 5'端同时修饰，当然也可以在靠近端部（3'端或者 5'端修饰）的位置修饰，可选的，也可以在单链核酸的中间位置进行修饰。修饰的比例为 0.1%-99%，可以是 1-95%，1-85%，1-75%，1-55%，1-45%。这里所谓的比例是指在所有组成单链核苷酸中被修饰的嘌呤碱或嘧啶碱基、核糖或脱氧核糖以及磷酸的官能团进行取代反应从而进行本发明的修饰。

进一步的，所述的胆固醇修饰的单链脱氧核糖核酸的长度是任何 DNA 片段，长度大概在 5-1000bp，优选的，10-500bp，15-300bp，15-100bp。所述的核苷酸可以是 A，U，C，T，G 任意顺序组成的（5'-腺苷酸（5'-adenylic acid），5'-胸苷酸（5'-thymidylic acid），5'-鸟苷酸（5'-guanylic acid），5'-肌苷酸（5'-inosinic acid），3'-黄苷酸（3'-xanthylic acid），5'-胞苷酸（5'-cytidylic acid），5'-尿苷酸（5'-uridylic acid）），也可以是全部由单个的核苷酸分子 A，U，C，T，G 组成一定长度的。例如 5-AAAAAAAAAAAAAAAA-3，也可以是 5-UUUUUUUUUUUUUUUU-3，或者 5-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3，或者 5-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3，或者 5-GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3。当然，也可以是以上 5 种碱基组任意组成的单链核苷酸，例如 5-AAGGCCTTTTGTACTGGG-3 等等。这里所谓的单链，是主要为单链条的核酸，也包括具有发夹结构的单链核酸。这里的单链是与双链相对立的概念。

进一步的，所述单链核酸为人工合成或从植物，动物，人，低等生物中提取。

进一步的，所述的组蛋白与被修饰的单链核酸摩尔比为 1:500~1:20。

进一步的，所述的组蛋白与修饰的单链核酸与浓度比例为：1 μ M-50 μ M 的 ssDNA 与 0.25 mM-2 mM 的组蛋白混合。在一些方式中，所述的组蛋白终浓度为 0.5mM，修饰的单链核酸 ssDNA 终浓度为 10 μ M。

进一步的，所述的载体中包括能够被载体递送的生物制剂，所述的生物制剂包括多肽类、蛋白质、抗体药物、核酸、细菌、病毒中的一种或多种。

进一步的，所述的载体是由组蛋白与修饰的单链核酸凝集而成。

另一方面，本发明提供一种中空的蛋白质-核酸凝集体载体的制备方法：将组蛋白与被修饰的单链核酸、溶剂混合制得，所述的载体为中空的。在一些方式中，所述组蛋白与被修饰的单链核酸摩尔比为 1：500~1：20。

进一步的，制备步骤所采用的溶剂为 PBS 溶液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中的任意一种或多种。

在一些方式中，溶剂为 1XPBS，其 pH 为 7.4；或者 0.1~0.01 M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，其 pH 为 5~6.5；或者 0.1~0.01 M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液，其 pH 为 6.5~8。

进一步的，所述的组蛋白与需要递送的生物试剂混合，然后再与修饰的单链核酸混合。

进一步的，所述生物制剂包括：多肽类、蛋白质、抗体药物、核酸、细菌、病毒中的一种或多种。

进一步的，所述被修饰的单链核酸的终浓度为 0.1 μ M~50 μ M，组蛋白的终浓度为 0.025mM~2mM。

在一些方式中，采用 5'端修饰胆固醇的ssDNA在终浓度为 10 μ M，与组蛋白终浓度为 0.5mM的条件下，混合 2.25*10⁷pfu的ad11 腺病毒，病毒分子通过相分离的分子富集作用，选择性地富集在中空凝集体的相分离区域，形成包载腺病毒的凝聚体。将包载了ad11 腺病毒的凝集体制剂皮下注射用于治疗小鼠肿瘤。

再一方面，本发明提供中空的蛋白质-核酸凝集体载体用于制备递送载体的用途，所述递送载体用于向生物体递送生物制剂。

再一方面，本发明提供中空的蛋白质-核酸凝集体载体包载腺病毒用于制备提高肿瘤治疗效果的制剂的用途。

另一方面，本发明提供修饰的单链核酸用于制备中空的蛋白质-核酸凝集体载体的用途，在一些方式中，所述修饰的基团为胆固醇、磷脂、糖脂、糖蛋白中的一种或多种。

在一些方式中，所述的修饰可以是胆固醇修饰或者与细胞膜近似的物质的修饰，包括磷脂、蛋白质等修饰。

进一步的，所述的修饰基团为胆固醇。

本发明所提供的中空的蛋白质-核酸凝集体具有以下有益效果：

(1) 明确了产生中空凝集体所必须的条件为被修饰的单链核酸，其修饰为与生物细胞膜成分相似的分子，被修饰的单链核酸不受限制，可修饰的分子选择多、可选修饰方式多，适用范围广。

(2) 明确了产生中空凝集体所需要的组蛋白与被修饰单链核酸的浓度配比，在本发明所提供的浓度范围内可稳定地形成中空凝集体，在最优的两者浓度配比下可以获得的空中凝集体比例最高。

(3) 形成的中空凝集体载体在生理环境内结构稳定,生物相容性高,高效招募生物制剂并提升细胞对生物制剂的摄取效率,实现有效递送,辅助疾病治疗。形成中空凝集体避免了非中空凝集体体积太大、容易集团、结构稳定性差、结构不规则、尺寸过大,导致其递送效率低的问题。

(4) 可递送的生物制剂包括多肽类、蛋白质、抗体药物、核酸、细菌、病毒等,应用范围广泛。

附图说明

图1(a)-(c)为本发明实施例1中的基于蛋白质和核酸之间的液-液相分离相图及相的形式。

图1(a)为罗丹明B标记的组蛋白和6-FAM标记的经过修饰的单链核苷酸ssDNA经LLPS形成的凝集体及中空凝集体在共聚焦显微镜下的形貌;比例尺为10微米。

图1(b)为组蛋白和ssDNA之间的部分相图,从图1(b)可以看出,两者的比例比较关键的,在一个范围内,才能得到中空的结构。

图1(c)为通过将组蛋白和ssDNA以不同比例混合的电位图。

图1(d)为胆固醇修饰在单链脱氧核糖核酸的3'端的结构式。

图1(e)为胆固醇修饰在单链脱氧核糖核酸的5'端的结构式。

图2为本发明实施例2中的组蛋白及未修饰胆固醇的单链脱氧核糖核酸(5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3')之间的液-液相分离相图及相的形式。

图2(a)为组蛋白和未修饰胆固醇的单链脱氧核糖核酸之间的部分相图。(b)为组蛋白和Cy5标记的核酸形成的混合溶液。(c)为组蛋白和花氰染料Cy5(红色)标记的核酸经LLPS形成的凝集体。(d)为组蛋白和Cy5标记的核酸经LLPS形成的团聚物。比例尺为50微米。未经胆固醇修饰的单链脱氧核糖核酸与组蛋白在图a的条件下不能形成中空凝集体结构。

图3为本发明实施例中凝集体与中空凝集体的结构与形貌表征。(a, d)分别为凝集体与中空凝集体的三维共聚焦显微镜图像。(b, e)分别为凝集体液滴与中空凝集体的扫描电镜图。(c, f)分别为凝集体液滴与中空凝集体的冷冻透射电镜图。

图4为本发明实施例中LLPS过程形成的组装体的性能表征。(a)为凝集体液滴的融合现象。(b)凝集体液滴的荧光漂白后恢复共聚焦显微镜组图及荧光强度分析。(c)为中空凝集体的荧光漂白后恢复共聚焦显微镜组图及荧光强度分析。比例尺为5微米。

图5为本发明实施例中的基于蛋白质和核酸之间的液-液相分离装载病毒的相图及相的形式。(a)为罗丹明B标记的组蛋白、6-FAM标记的ssDNA及Cy5(蓝色)标记的腺病毒ad11(Cy5-ad11)经LLPS形成的凝集体及中空凝集体在共聚焦显微镜下的形貌。比例尺为10微米。(b)为三者之间的部分相图。

图6为本发明实施例中凝集体液滴及中空凝集体对生物制剂的富集。图6(a)为对组蛋白、ssDNA以及ad11病毒的荧光强度分析图,比例尺为5微米。图6(b)为凝集体和中空凝集体对ad11病毒的装载率对比图。

图7为本发明实施例中病毒在相分离体系中的分布。(a)为单独病毒的透射电镜图片。(b)为病毒在蛋白质-核酸溶液中的透射电镜图片。(c)为病毒在蛋白质-核酸凝集体液滴内的冷冻透射电镜图片。(d)为病毒在蛋白质-核酸中空凝集体内的冷冻透射电镜图片。比例尺为100纳米。

图8为本发明实施例中凝集体液滴及中空凝集体的结构稳定性研究。(a)为凝集体液滴及中空凝集体在初始时刻以及48小时后的浊度以及形貌变化。(b)为凝集体液滴及中空凝集体在初始时刻以及48小时后的粒径变化。比例尺为10微米。从图8(b)可以看出,中空的凝集的粒径变化小,在48小时后基本没有变化(图8(b)的左边两个柱状图);而凝集体液滴的粒径显著变化,从大约2321 nm变化到8619 nm(图8(b)的右边的两个柱状图)。

图9A为本发明实施例中凝集体液滴及中空凝集体作为病毒载体在小鼠肺上皮细胞(TC-1)及高表达受体CD46的TC-1细胞系中的病毒摄取情况。(a)为ad11或者ad11溶液、ad11/凝集体及ad11/中空凝集体在TC-1细胞系中的摄取情况及病毒含量统计。(b)为ad11或者ad11溶液、ad11/凝集体及ad11/中空凝集体在高表达CD46的TC-1细胞系中的摄取情况及病毒含量统计。比例尺为20微米。

图9B中的1表示单独的病毒(ad11), 2表示单独的病毒溶液(ad11溶液), 3表示凝集体/病毒(ad11/凝集体)(非中空); 4表示中空凝集体/病毒(ad11/中空凝集体), 说明中空的装载有病毒更加稳定, 被细胞摄取的病毒数量最高, 与非中空的相比, 显著差异(是归一化处理

后,以单纯病毒组的数量为1的情况下,ad11/溶液大概为3,而ad11/凝集体大概为5,而ad11/中空凝集体的载量大概为7)。

图10为本发明实施例中ad11在肿瘤组织的积累情况。比例尺为100微米。

图11为本发明实施例中在TC-1小鼠肿瘤模型中的体内药效数据。(a)为治疗10天后各组小鼠肿瘤实物图。(b)为各组小鼠治疗10天后肿瘤重量。(c)为各组小鼠治疗后平均肿瘤生长曲线。从图可以看出,对于肿瘤尺寸来讲,ad11/中空凝集体处理小肿瘤的尺寸基本保持不变,而其他处理(PBS, 单纯的中空凝集体,单纯的病毒处理,非中空的凝集体下的肿瘤尺寸在12天内快速的增大,与ad11/中空凝集体处理小肿瘤的尺寸呈现极显著差异),从图11B中也可以看出,10天后重量也出现显著变化,ad11/中空凝集体处理下的重量大约是0.5g,而PBS, 单纯的中空凝集体,单纯的病毒处理,非中空的凝集体下的重量分别大约为2.4g, 2.3g, 1.9g, 1.8g., 与这些处理呈显著或者极显著差异。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细描述,需要指出的是,以下所述实施例旨在便于对本发明的理解,而对其不起任何限定作用。本实施例中使用的试剂均为已知产品,通过购买市售产品获得。

实施例1: 组蛋白与经过修饰的单链核酸形成中空的凝集体。

分别配置罗丹明 B 标记的组蛋白(Histone)(购买于生工生物工程(上海)股份有限公司,产品编号 A002544)和 6-羧基荧光素(6-FAM)标记的胆固醇修饰的 ssDNA (5'-Cholestery-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-6-FAM-3'(SEQ NO: 1))不同浓度的溶液,两种溶液混合至 Histone 终浓度为 2 mM、1mM、0.5mM、0.25mM、0.1mM、0.05mM、0.025mM, ssDNA 终浓度为 50 μ M、25 μ M、10 μ M、5 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.1 μ M。溶剂为 1XPBS (pH 7.4)。图 1 (b) 为在激光共聚焦显微镜下观察体系内相的形态来绘制对应条件下的相图,随着二者浓度以及体系内电势变化,分别展现出相的三种形式:均一的溶液、液滴状凝集体(非中空)以及中空凝集体。实验发现,胆固醇修饰在单链脱氧核糖核酸的 5'或者 3'端,图 1 (d) 为胆固醇修饰在单链脱氧核糖核酸的 3' 端的结构式,图 1 (e) 为胆固醇修饰在单链脱氧核糖核酸的 5' 端的结构式,都可以形成上述相分离组装体。

能够形成中空凝集体的条件为 1 μ M-50 μ M 的 ssDNA 与 0.25 mM-2 mM 的组蛋白混合。

其中，在组蛋白终浓度为 0.5mM，ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下，产生中空的凝集的比例最高。

可以理解，除了本实施例子 1 的具体方式外，能够修饰的基团除了胆固醇之外，其它的修饰也是可行的，例如磷脂、蛋白质等，与细胞膜的组成相似的物质都可以用来对核酸进行修饰。通过我们的实验，都是可以获得中空的凝集体。另外，对于核酸，可以是任意的单链核酸物质，例如 DNA，RNA 等等，这些核酸物质可以是人工合成的，也可以是从植物，动物，人，低等生物中提取出来的单链核酸，这些单链核酸物质的长度可以是任意的长度，一般是小于 1000bp，或者小于 500bp，小于 100bp，或者 10-80bp 之间。在另外的一些方式中，这些单链核苷酸可以是一条或者多条不同的序列，不同长度的混合体，不过这些单链核酸都需要经过修饰。对于修饰的位置，可以是核酸的两端，例如 5' 或者 3' 端，或者 5' 和 3' 端，也可以是靠近核酸的端部，例如距离 5' 或者 3' 端的 10-1 个核苷酸的位置进行修饰也是可以的。这个通过本发明的公开，是可以任意进行选择，比如在核酸的中间位置进行修饰。通过我们的实验，以上的选择以及组合在一起，我们也能够获得中空的凝集体。

实施例子 2：组蛋白与未经修饰的单链核苷酸不能形成中空的凝集体

如图 2，分别配置 Histone（与实施例子 1 相同的）和花氰染料 Cy5 标记的 ssDNA（序列为 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-Cy5-3'）不同浓度的溶液，两种溶液混合至 Histone 终浓度为 2 mM、1mM、0.5mM、0.25mM、0.1mM、0.05mM、0.025mM，ssDNA 终浓度为 50 μ M、25 μ M、10 μ M、5 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.1 μ M。在荧光显微镜下观察体系内相的形态来绘制对应条件下的相图。随着二者浓度以及比例变化，展现出相的三种形式：均一的溶液、液滴状凝集体以及团聚物。未修饰胆固醇的 ssDNA 与组蛋白在该条件下未能得到中空凝集体。

本实验说明，单链核酸必须经过修饰，才能形成中空的结结构，而不经修饰，是不能形成中空的结结构的，至于修饰的比例、与组蛋白的浓度比，都是可以通过实验调整出来的。

实施例子 3：本发明实施例子中凝集体与中空凝集体的结构与形貌表征

如图 3，在组蛋白终浓度为 0.25mM，ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体，在组蛋白终浓度为 0.5 mM，ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体。根据共聚焦显微镜、扫描电镜及冷冻透射电镜的表征方法，证明了凝集体液滴为实心的球体、中空凝集体为含水相内腔，相分离得到的中空球体结构（如图 3d 文字描述），具体

组蛋白与修饰的单链核酸与实施例子 1 相同。

实施例子 4：本发明实施例中对 LLPS 过程形成的组装体的性能表征

如图 4，在组蛋白终浓度为 0.25 mM，ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体，在组蛋白终浓度为 0.5 mM，ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体（具体组蛋白与修饰的单链核酸与实施例子 1 相同）。相分离组装出来的结构具有液态体系的特征，如分子运动性和可变形性。相邻液滴相互接触后（0s）会发生融合现象，融合后（180 秒）在液滴表面张力的作用下趋于形成球形的结构，以此验证蛋白质-核酸发生相分离。此外，还可以通过光漂白荧光恢复实验来证明组装体是由 LLPS 过程形成。通过对凝集体液滴及中空凝集体的特定区域（白色箭头）进行光漂白（50%光强，光漂白时间为 10 s），然后检测荧光恢复情况。共聚焦显微镜图像显示两种组装体的漂白区域的荧光逐渐恢复，其中凝集体在 60 s 后荧光几乎完全恢复，而中空凝集体 1200 s 后荧光恢复到 60%，这证明两种相分离组装体具有液体的分子运动性，而凝集体分子流动性更强。这在后面的应用中其实是缺点，流动性强，导致结构稳定性变差，限制后续应用，相反，中空凝集体流动性并不强，结构稳定，方便后续的实际生物制剂的递送。

实施例子 5：本发明实施例中的基于蛋白质和核酸之间的液-液相分离装载病毒的相图及相的形式。

如图 5，分别配置罗丹明B标记的组蛋白（Histone）和 6-羧基荧光素（6-FAM）标记的胆固醇修饰的 ssDNA（5'-Cholestery-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-6-FAM-3'）不同浓度的溶液，两种溶液混合至Histone终浓度为 2 mM、1mM、0.5mM、0.25mM、0.1mM、0.05mM、0.025mM，ssDNA终浓度为 50 μ M、25 μ M、10 μ M、5 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.1 μ M，在组蛋白与ssDNA混合前先与病毒数量为 2.25*10⁷pfu的Cy5 标记的腺病毒（Cy5-ad11）混合（Cy5-ad11 由Beijing Bio-Targeting Therapeutics Technology Co., Ltd (Beijing, China)赠送）（空斑形成单位（plaque forming unit），缩写pfu），组蛋白与被修饰的单链核酸在相分离的过程中将Cy5-ad11 招募到组装的区室内。与单纯的蛋白质和核酸的体系相比，Cy5-ad11 加入的体系同样含均一的溶液、液滴状凝集体以及中空凝集体三种形式。

通过我们的实验，如果把同样的腺病毒先与修饰的核酸混合，然后再与组蛋白混合，也可以获得三种不同的状态物质：均一的溶液、液滴状凝集体以及中空凝集体三种形式。相对而言，让腺病毒与组蛋白混合，获得的中空的凝集体的效率低一些。

实施例子 6：本发明实施例中凝集体液滴及中空凝集体对生物制剂的富集

如图 6 (a)，在组蛋白终浓度为 0.25 mM，ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体，在组蛋白终浓度为 0.5 mM，ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体，各体系总体积为 40 μ L，Cy5-ad11 数量为 9*10⁷pfu。相分离体系具备优异的分子富集能力，促进对生物制剂的高效负载。通过对组蛋白、ssDNA 和病毒的荧光强度和距离分布的分析，证实了相分离结构域对病毒的有效富集（比例尺为 5 微米）。分析软件为 Image J。在组蛋白终浓度为 0.25 mM，ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下以及在组蛋白终浓度为 0.5 mM，ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备富集病毒的两种组装体，利用实时荧光定量技术计算两种组装体对病毒的装载率，凝集体装载率为 92.8%，中空凝集体为 81.4%，如图 6 (b)。

实施例子 7：本发明实施例中病毒在相分离体系中的分布。

如图 7，在组蛋白终浓度为 0.5 mM，ssDNA 终浓度为 0.1 μ M 的条件下得到溶液；在组蛋白终浓度为 0.25 mM，ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体；在组蛋白终浓度为 0.5 mM，ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体；各体系总体积为 40 μ L，Cy5-ad11 数量为 9*10⁷pfu。溶液中病毒是团聚在一起的状态（图 7b）。病毒通过相分离的分子富集作用分隔在凝集体液滴以及中空凝集体内，与外界环境隔绝。其中，如图 7 (c)，在凝集体中，病毒均匀分散在凝集体液滴内。如图 7 (d) 在中空凝集体中，病毒选择性的富集到中空凝集体相分离区域，分布在环形区域内，与组蛋白以及单链核酸共定位。

实施例子 8：本发明实施例中凝集体液滴及中空凝集体的结构稳定性研究

如图 8，在组蛋白终浓度为 0.25 mM，ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体，在组蛋白终浓度为 0.5 mM，ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体。与中空凝集体（图 8 (b) 中的 A）相比，凝集体（非中空，图 8 (b) 中的 B）液滴具备更强的液体流动性和可变形性，因此随着时间变化凝集体液滴之间趋于聚结。该特性表现在凝集体体系浊度逐渐降低、凝集体聚结成团以及粒径显著增加。由于凝集体结构稳定性差、结构不规则、尺寸过大，导致后续凝集体递送病毒至肿瘤细胞内的效率降低，进而影响肿瘤治疗效果。相反，中空凝集体或者载体滴液体流动性和可变形性比非中空的要弱一些，因此随着时间变化中空凝集体之间不会凝集，这样，结构更加稳定，更加规则，尺寸合适，能够把所需要递送的物质递送到细胞内。

实施例子 9：本发明实施例中凝集体液滴及中空凝集体作为病毒载体在小鼠肺上皮细胞（TC-1）及高表达受体 CD46 的 TC-1 细胞系中的病毒摄取情况

如图 9, 在组蛋白终浓度为 0.25 mM, ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体, 在组蛋白终浓度为 0.5 mM, ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体, Cy5-ad11 (腺病毒) 数量为 1*10⁷pfu。将上述溶液加入到小鼠肺上皮细胞 (TC-1) 及高表达受体 CD46 的 TC-1 细胞系中, 细胞数量为 500000, 病毒数量每个细胞 20pfu。上述体系在 37°C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中孵育 4 个小时, 去除游离的病毒/组装体。通过鬼笔环肽染细胞骨架, 以及 Hoechst 33342 染细胞核的过程及激光共聚焦显微镜的观察, 证实了以中空凝集体作为载体, 标记 Cy5 的腺病毒 ad11 在细胞内的摄取效率显著提升。利用实时荧光定量技术测定细胞内病毒的含量, 同样验证了上述结论。

实施例子 10: 本发明实施例中 ad11 在肿瘤组织的积累情况 (比例尺为 100 微米)

在组蛋白终浓度为 0.25 mM, ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体, 在组蛋白终浓度为 0.5 mM, ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体。如图 10, 培养未处理的 TC-1 细胞, 皮下荷瘤细胞数量 2*10⁶ 注射 100 μ L 构建动物模型。实验鼠选择 C57/BL-6J, 8 周龄雌鼠。饲养实验鼠至肿瘤尺寸为 100mm³, 瘤内注射制剂。制剂包括: PBS 组、ad11 组、ad11/凝集体组和 ad11/中空凝集体组。其中 PBS 组为对照组, 瘤内注射 50 μ L 1XPBS (pH 7.4); ad11 组为单纯病毒组, 瘤内注射剂量为 50 μ L, 病毒数量为 1*10⁸pfu; ad11/凝集体组组成: 组蛋白终浓度为 0.25 mM, ssDNA 终浓度为 50 μ M, 病毒数量为 1*10⁸pfu, 瘤内注射剂量为 50 μ L; ad11/中空凝集体组组成: 在组蛋白终浓度为 0.5 mM, ssDNA 终浓度为 10 μ M, 病毒数量为 1*10⁸pfu, 瘤内注射剂量为 50 μ L。其中病毒标记了 Cy5 荧光, 对肿瘤组织的冰冻切片进行 DAPI 染色处理。

利用荧光显微镜拍摄肿瘤组织切片图片, 证实了中空凝集体作为生物制剂递送载体, 利用优异的递送能力, 提高细胞对病毒摄取效率。具体表现在 ad11/中空凝集体处理的肿瘤组织中 Cy5 荧光强度高于其他组别, 实现肿瘤组织内的病毒含量提升, 溶瘤病毒通过自我复制在肿瘤细胞中大量增殖, 最终使肿瘤细胞裂解, 进而释放更多的溶瘤病毒, 引起肿瘤溶解来增强抗肿瘤疗效。

实施例子 11: 本发明实施例中在 TC-1 小鼠肿瘤模型中的体内药效数据

在组蛋白终浓度为 0.25 mM, ssDNA 终浓度为 50 μ M 的条件下制备得到凝集体, 在组蛋白终浓度为 0.5 mM, ssDNA 终浓度为 10 μ M 的条件下制备得到中空凝集体。如图 10, 培养未处理的 TC-1 细胞, 皮下荷瘤细胞数量 2*10⁶ 注射 100 μ L 构建动物模型。实验鼠选择 C57/BL-6J, 8 周龄雌鼠。饲养实验鼠至肿瘤尺寸为 100mm³, 瘤内注射制剂。制剂包括: PBS 组、ad11 组、ad11/凝集体组和 ad11/中空凝集体组。其中 PBS 组为对照组, 瘤内注射 50 μ L

1XPBS (pH 7.4) ; ad11 组为单纯病毒组, 瘤内注射剂量为 50 μ L, 病毒数量为 1×10^8 pfu; ad11/凝集体组组成: 组蛋白终浓度为 0.25 mM, ssDNA 终浓度为 50 μ M, 病毒数量为 1×10^8 pfu, 瘤内注射剂量为 50 μ L; ad11/中空凝集体组组成: 在组蛋白终浓度为 0.5 mM, ssDNA 终浓度为 10 μ M, 病毒数量为 1×10^8 pfu, 瘤内注射剂量为 50 μ L。两天注射一次制剂, 记录肿瘤尺寸。体内药效实验证实了中空凝集体可以显著提高病毒的抗肿瘤效果, 在 TC-1 小鼠肿瘤模型中, 给药后小鼠肿瘤体积有了显著程度的抑制, 中空凝集体作为病毒递送载体可显著改善治疗疗效。从图 11 可以看出, 采用中空的凝集体递送抗肿瘤药物, 可以显著抑制肿瘤的体积增大或者重量的增加, 与凝集体带有相同的抗肿瘤药物相比, 具有极显著差异。

本发明说明书中提到的所有专利和出版物都表示这些是本领域的公开技术, 本发明可以使用。这里所引用的所有专利和出版物都被同样列在参考文献中, 跟每一个出版物具体的单独被参考引用一样。这里所述的本发明可以在缺乏任何一种元素或多种元素, 一种限制或多种限制的情况下实现, 这里这种限制没有特别说明。例如这里每一个实例中术语“包含”, “实质由.....组成”和“由.....组成”可以用两者之一的其余 2 个术语代替。这里的所谓的“一个”仅仅表示“一”的意思, 而不排除仅仅只是包括一个, 也可以表示包括 2 个以上。这里采用的术语和表达方式所描述方式, 而不受其限制, 这里也没有任何意图来指明此书描述的这些术语和解释排除了任何等同的特征, 但是可以知道, 可以在本发明和权利要求的范围内做任何合适的改变或修改。可以理解, 本发明所描述的实施例都是一些优选的实施例和特点, 任何本领域的一般技术人员都可以根据本发明描述的精髓下做一些更改和变化, 这些更改和变化也被认为属于本发明的范围和独立权利要求以及附属权利要求所限制的范围。

权利要求书

- 1、一种载体，其特征在于，该载体包括组蛋白和被基团修饰的单链核酸，其中所述的载体为中空的结构。
- 2、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，所述的修饰基团包括与哺乳动物细胞膜类似的物质。
- 3、如权利要求 2 所述的载体，其特征在于，修饰基团为脂质、蛋白质、糖类、两亲性物质、嵌段共聚物、药物中的任意一种或多种。
- 4、如权利要求 3 所述的载体，其特征在于，所述的修饰的基团为胆固醇、磷脂、糖脂、糖蛋白中的任意一种或多种。
- 5、如权利要求 4 所述的载体，其特征在于，所述的修饰基团为胆固醇。
- 6、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，所述的基团修饰单链核酸的比例为 0.1%-99%。
- 7、如权利要求 1 所述的载体，所述组蛋白与被修饰的单链核酸摩尔比为 1:500~1:20。
- 8、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，所述基团修饰单链核酸的位置是在单链核酸的 3'端或者 5'端，或者在靠近 3'端或者 5'端的位置，或者在核酸中间的位置。
- 9、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，所述单链核酸为 DNA 和/或 RNA。
- 10、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，单链核酸为 A、U、C、T、G 任意顺序组成。
- 11、如权利要求 10 所述的载体，其特征在于，所述单链核酸为人工合成或从植物，动物，人，低等生物中提取。
- 12、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，所述单链核酸的长度为小于 1000bp。
- 13、如权利要求 12 所述的载体，其特征在于，所述单链核酸的长度为小于 500bp，或小于 100bp，或 10-80bp。
- 14、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，所述组蛋白包括 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 中的任意一种或多种。
- 15、如权利要求 14 所述的载体，其特征在于，除了包含组蛋白，还可以包含非组蛋白序列特异性 DNA 结合蛋白。
- 16、如权利要求 1 所述的载体，其特征在于，所述被修饰的单链核酸的终浓度为 0.1 μ M~50 μ M，组蛋白的终浓度为 0.025mM~2mM。
- 17、如权利要求 16 所述的载体，其特征在于，所述被修饰的单链核酸的终浓度为 10 μ M，组蛋白的终浓度为 0.5mM。

- 18、 根据权利要求 1 所述的载体，所述的载体中包括能够被载体递送的生物制剂，所述的生物制剂包括多肽类、蛋白质、抗体药物、核酸、细菌、病毒中的一种或多种。
- 19、 根据权利要求 1 所述的载体，所述的载体是由组蛋白与修饰的单链核酸凝集而成。
- 20、 一种中空载体的制备方法：其特征在于，将组蛋白与被修饰的单链核酸、溶剂混合制得，所述的载体为中空的结构。
- 21、 根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述溶剂为 PBS 溶液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中的任意一种或多种。
- 22、 根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述的组蛋白与需要递送的生物试剂混合，然后再与修饰的单链核酸混合。
- 23、 根据权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述生物制剂包括：多肽类、蛋白质、抗体药物、核酸、细菌、病毒中的一种或多种。
- 24、 根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述被修饰的单链核酸的终浓度为 $0.1\mu\text{M}\sim 50\mu\text{M}$ ，组蛋白的终浓度为 $0.025\text{mM}\sim 2\text{mM}$ 。
- 25、 如权利要求 1~15 任一项所述的中空的蛋白质-核酸凝集体载体用于制备递送载体的用途，其特征在于，所述递送载体用于向生物体递送生物制剂。
- 26、 如权利要求 1~15 任一项所述的中空的蛋白质-核酸凝集体载体包载腺病毒用于制备提高肿瘤治疗效果的制剂的用途。
- 27、 修饰的单链核酸用于制备中空的蛋白质-核酸凝集体载体的用途，其特征在于，所述修饰的基团为胆固醇、磷脂、糖脂、糖蛋白中的一种或多种。
- 28、 根据权利要求 27 所述的用途，所述的修饰基团为胆固醇。

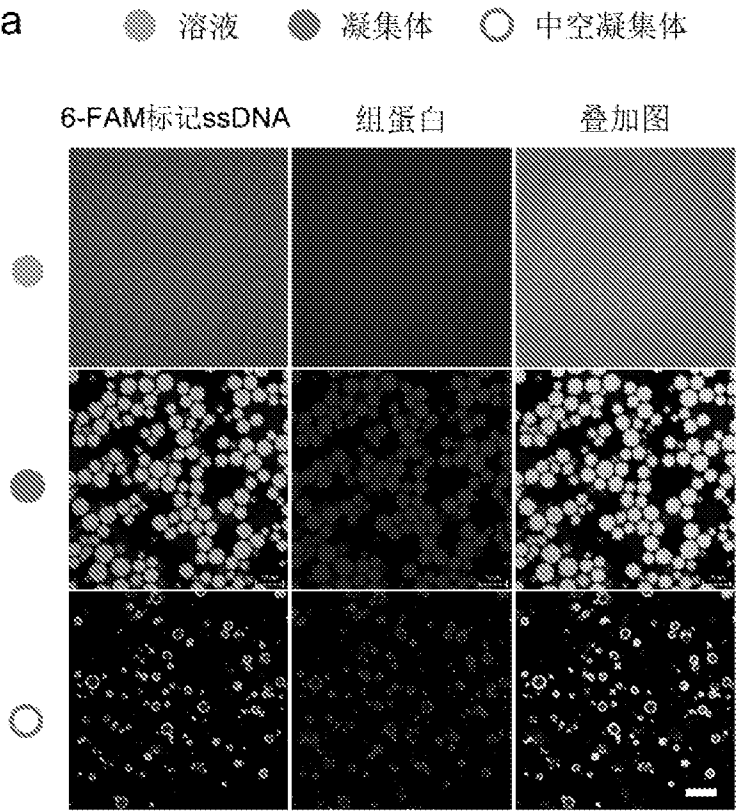


图 1 (a)

● 溶液 ● 凝集体 ○ 中空凝集体

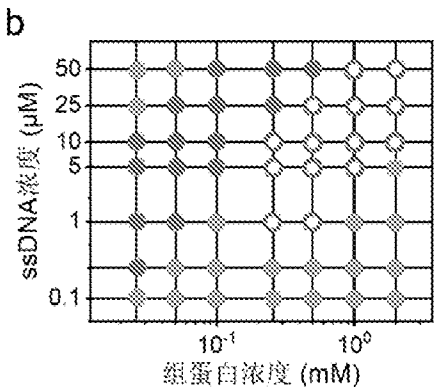


图 1 (b)

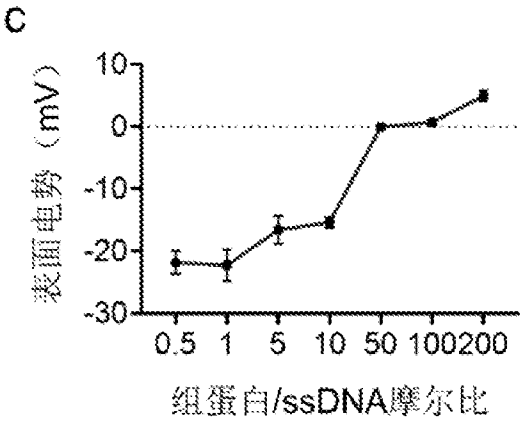


图 1 (c)

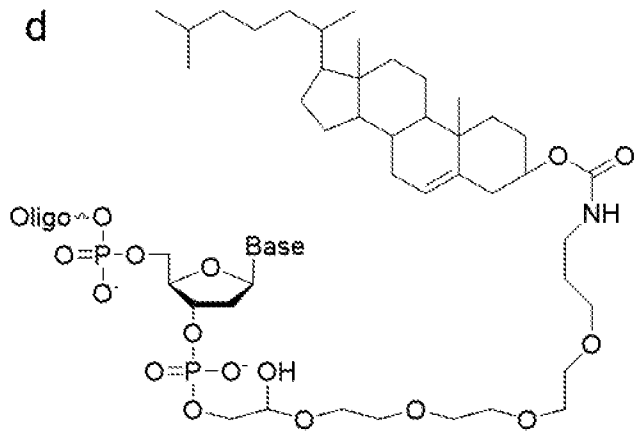


图 1 (d)

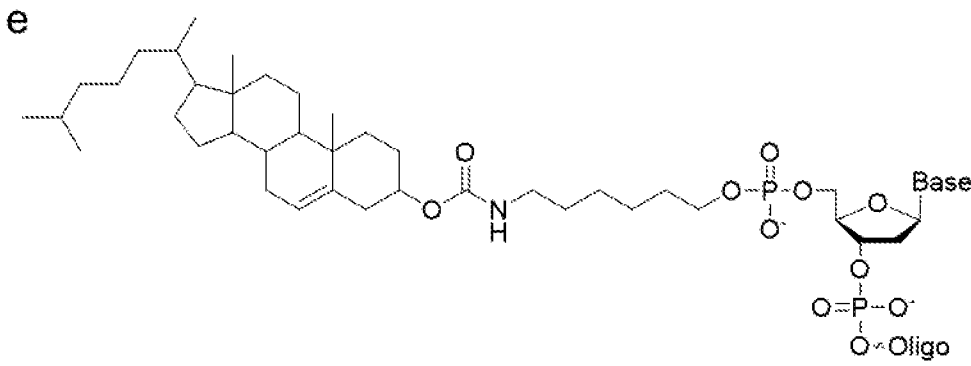


图 1 (e)

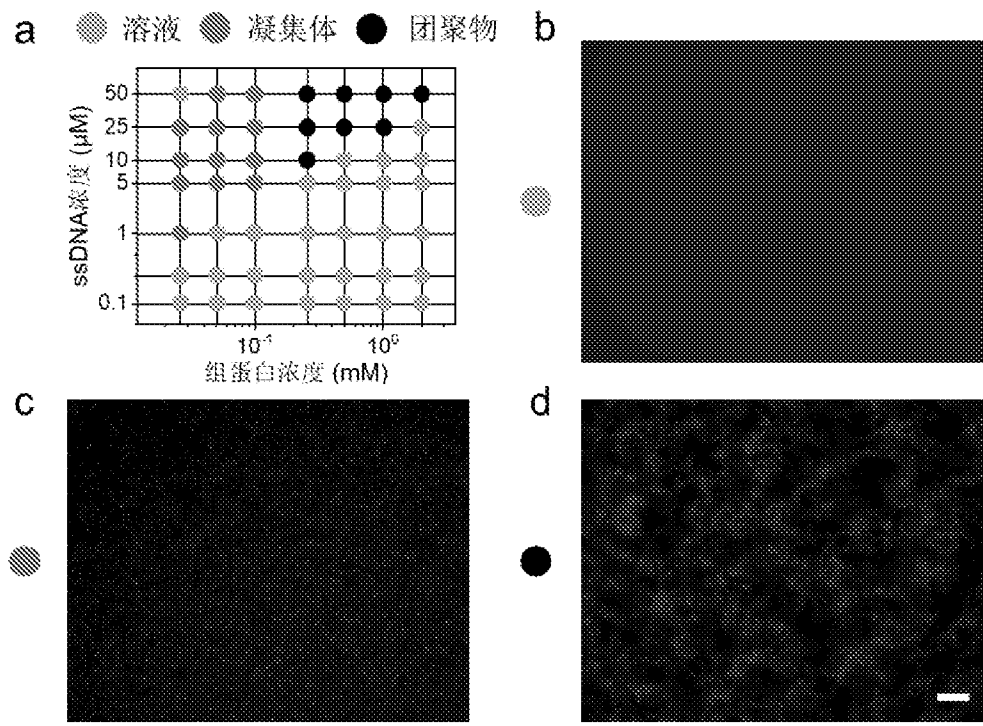


图 2

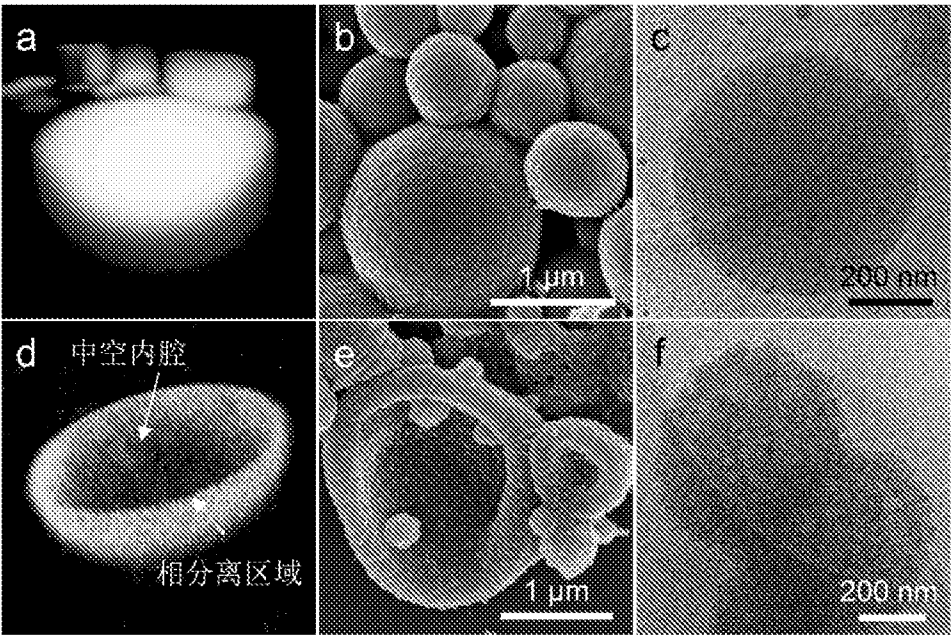


图 3

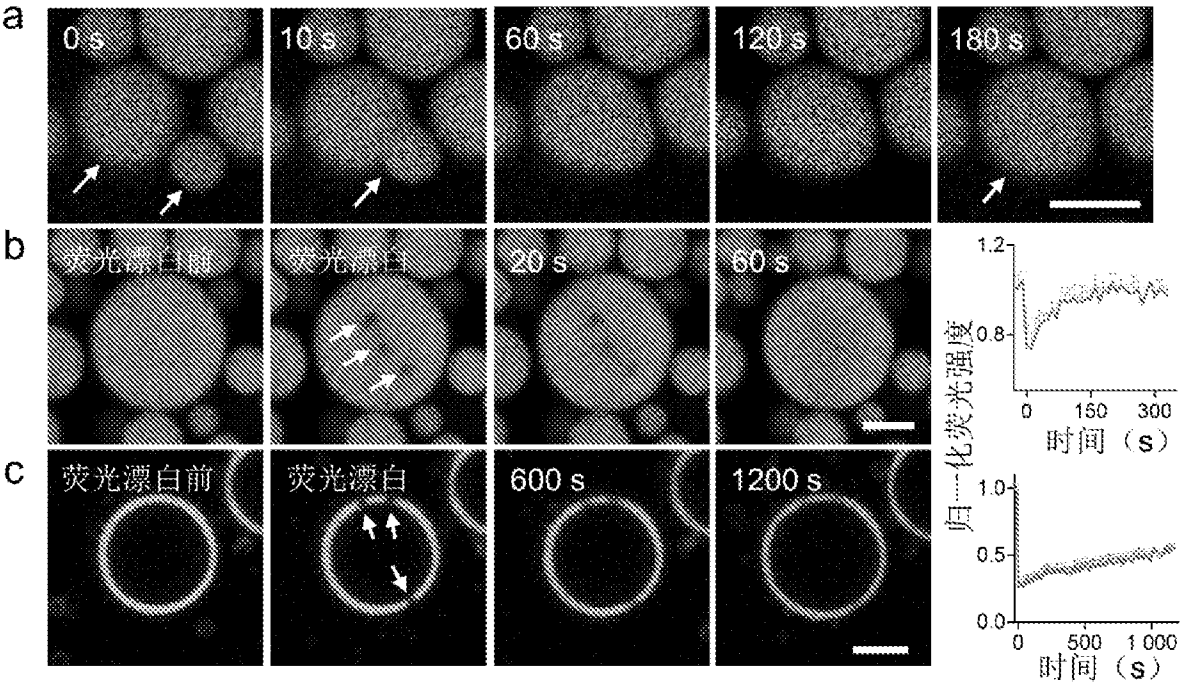


图 4

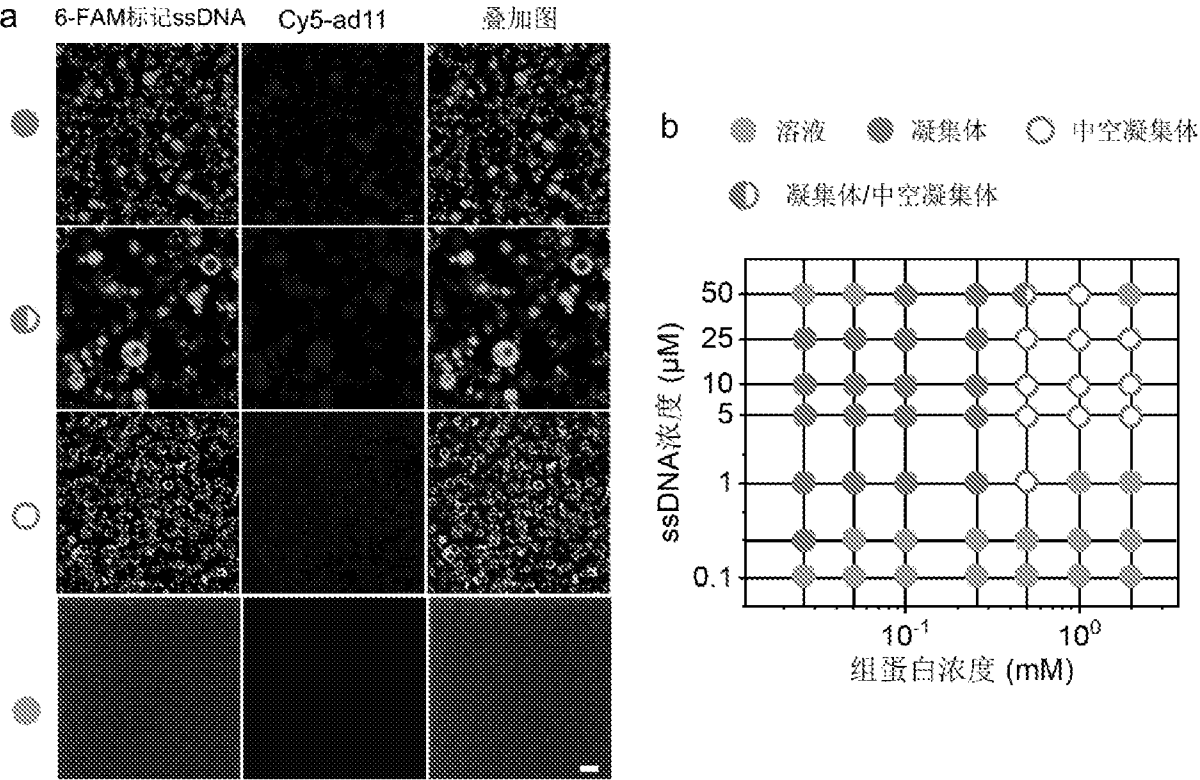


图 5

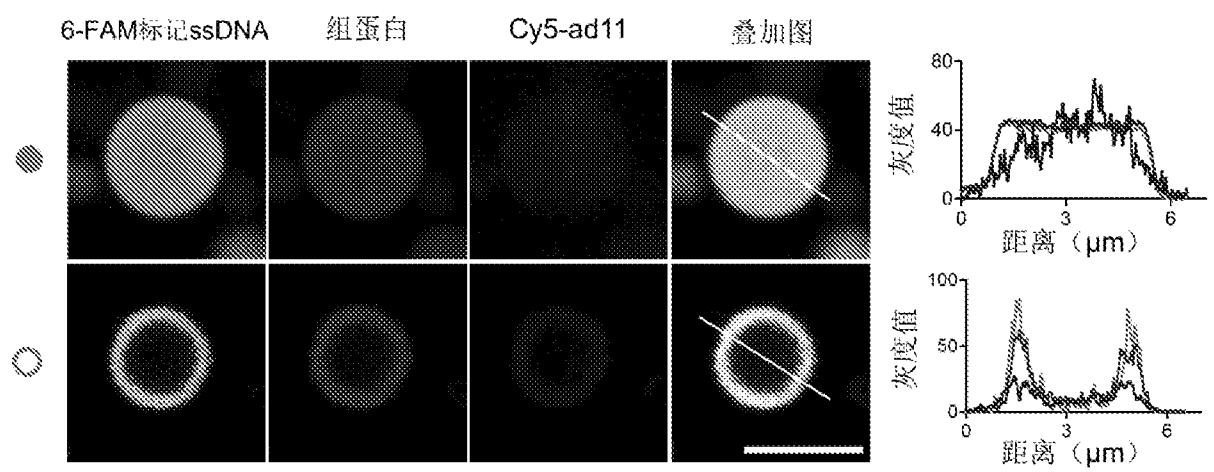


图 6 (a)

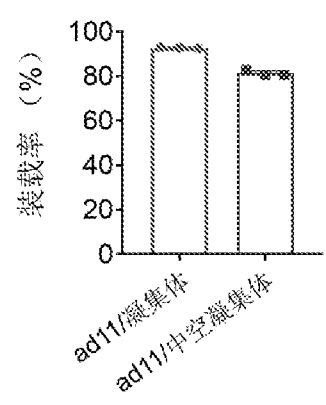


图 6 (b)

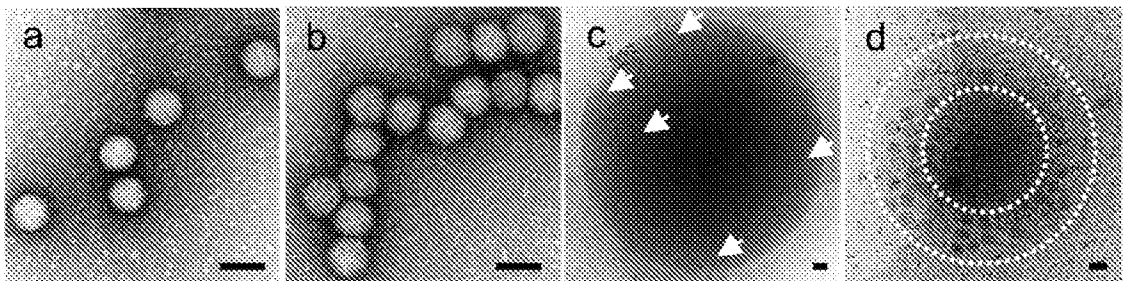


图 7

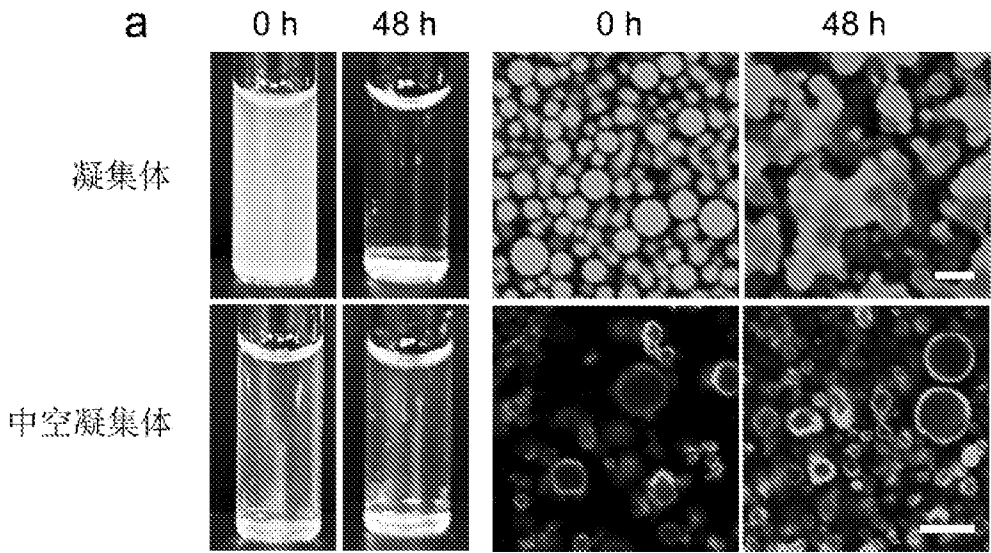


图 8 (a)

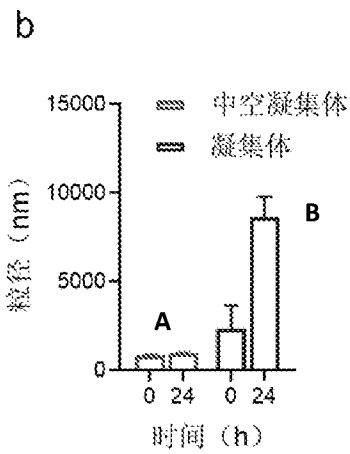


图 8 (b)

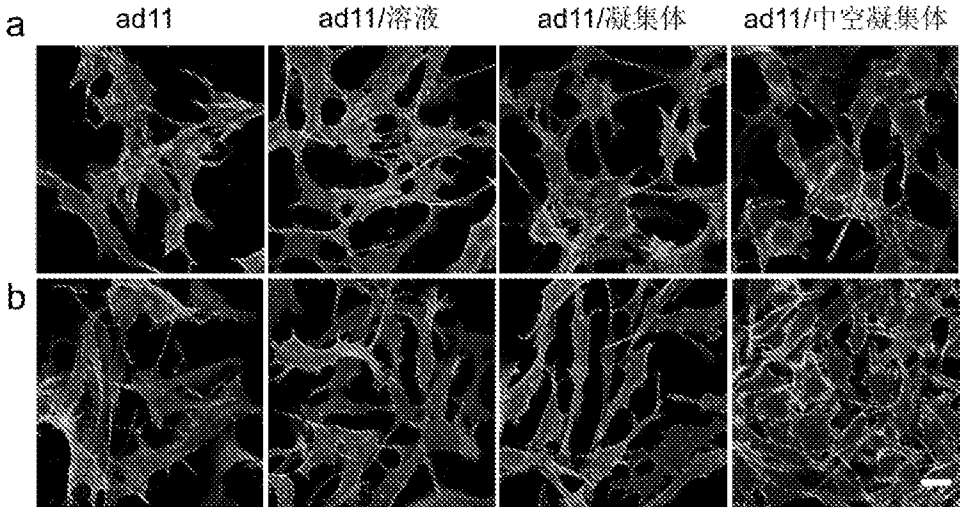


图 9A

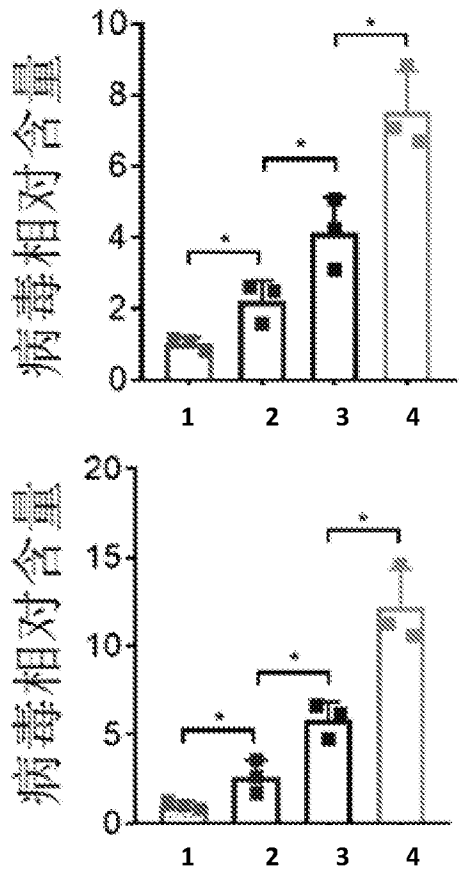
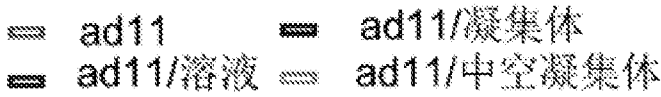


图 9B

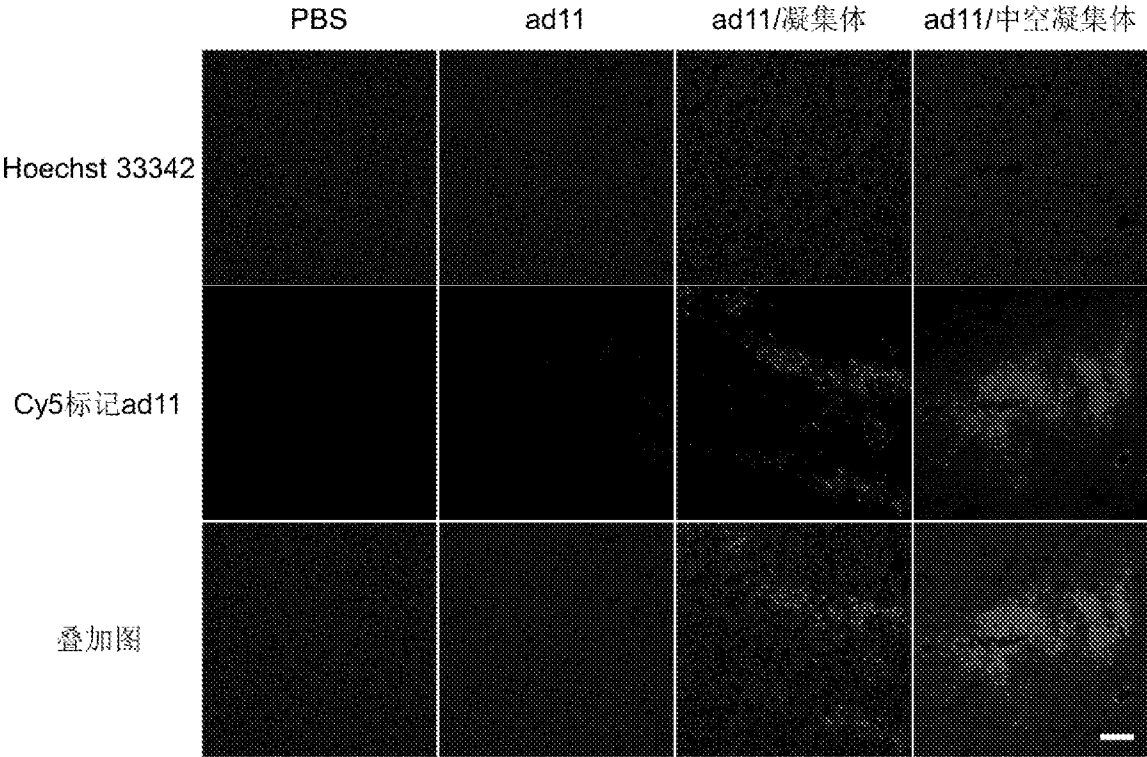


图 10

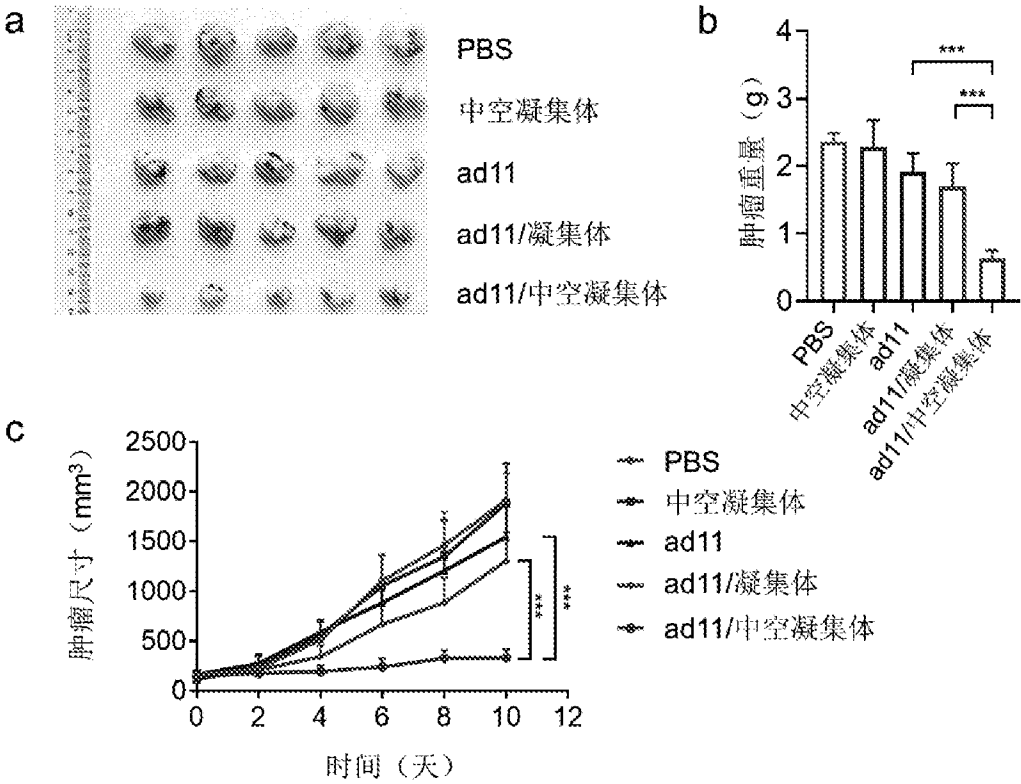


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/092187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/69(2017.01)i; A61K47/54(2017.01)i; A61K47/62(2017.01)i; A61K47/42(2017.01)i; A61K47/26(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

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)

CNXTX; ENTXTX; VCN; CJFD; DWPI; CNKI; WFNPL; NPTXT; NPABS; Web of Science; STNext; 读秀, DUXIU: 凝聚体, 凝集体, 无膜细胞器, 液液相分离, 组蛋白, 修饰, 核酸, 胆固醇, 载药, 递送, 负载, 空心, 中空, 空腔, condensate, coacervate, LLPS, Liquid-Liquid Phase Separation, Histone, H1, H2, H3, H4, Modifications, Nucleic Acids, DNA, RNA, Cholesterol, drug, delivery, hollow, cavity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Rupa Sarkar et al. "Interaction of Hoechst 33258 and Ethidium with Histone1-DNA Condensates" <i>Biomacromolecules</i> , Vol. 8, 29 September 2007 (2007-09-29), pages 3332-3339 abstract	1-28
A	WO 2023015190 A1 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 09 February 2023 (2023-02-09) claims 1-50	1-28
A	白春礼等 (BAI, Chunli et al.). "阳离子诱导DNA有序凝聚体的精细结构的研究 (The Investigations of the Cation-Induced Dan Condensates)" <i>中国科学基金 (Bulletin of National Natural Science Foundation of China)</i> , No. 5, 31 December 1999 (1999-12-31), pages 309-312 section 1	1-28



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 January 2024

Date of mailing of the international search report

24 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/CN2023/092187

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUN, Yue et al. "Phase-separating peptides for direct cytosolic delivery and redox-activated release of macromolecular therapeutics" <i>NATURE CHEMISTRY</i> , Vol. 14, 31 March 2022 (2022-03-31), pages 274–283 abstract	1-28
A	LIU, Songyang et al. "Enzyme-mediated nitric oxide production in vasoactive erythrocyte membrane-enclosed coacervate protocells" <i>NATURE CHEMISTRY</i> , Vol. 12, 31 December 2020 (2020-12-31), pages 1165-1173 abstract	1-28
A	Abigail L. Turner et al. "Highly disordered histone H1-DNA model complexes and their condensates" <i>PNAS</i> , Vol. 115, No. 47, 20 November 2018 (2018-11-20), pages 11964-11969 abstract	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/092187

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/CN2023/092187

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2023015190	A1	09 February 2023	None	

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:

A. 主题的分类

A61K47/69(2017.01)i; A61K47/54(2017.01)i; A61K47/62(2017.01)i; A61K47/42(2017.01)i; A61K47/26(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

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))

CNTEXT; ENTXTC; VCN; CJFD; DWPI; CNKI; WFNPL; NPTXT; NPABS; Web of Science; STNext; 读秀; 凝聚体, 凝集体, 无膜细胞器, 液液相分离, 组蛋白, 修饰, 核酸, 胆固醇, 载药, 递送, 负载, 空心, 中空, 空腔, condensate, coacervate, LLPS, Liquid-Liquid Phase Separation, Histone, H1, H2, H3, H4, Modifications, Nucleic Acids, DNA, RNA, Cholesterol, drug, delivery, hollow, cavity

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	Rupa Sarkar等. "Interaction of Hoechst 33258 and Ethidium with Histone1 -DNA Condensates" Biomacromolecules, 第8卷, 2007年9月29日 (2007 - 09 - 29), 第3332-3339页 摘要	1-28
A	WO 2023015190 A1 (UNIV PENNSYLVANIA) 2023年2月9日 (2023 - 02 - 09) 权利要求1-50	1-28
A	白春礼等. "阳离子诱导DNA有序凝聚体的精细结构的研究" 中国科学基金, 第5期, 1999年12月31日 (1999 - 12 - 31), 第309-312页 第1节	1-28
A	Yue Sun等. "Phase-separating peptides for direct cytosolic delivery and redox-activated release of macromolecular therapeutics" NATURE CHEMISTRY, 第14卷, 2022年3月31日 (2022 - 03 - 31), 第 274 - 283页 摘要	1-28

☒ 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1月10日

国际检索报告邮寄日期

2024年1月24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

齐洁

电话号码 (+86) 0512-88996496

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	Songyang Liu等. "Enzyme-mediated nitric oxide production in vasoactive erythrocyte membrane-enclosed coacervate protocells" NATURE CHEMISTRY, 第12卷, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第1165 - 1173页 摘要	1-28
A	Abigail L. Turner等. "Highly disordered histone H1-DNA model complexes and their condensates" PNAS, 第115卷, 第47期, 2018年11月20日 (2018 - 11 - 20), 第11964 - 11969页 摘要	1-28

国际申请号
PCT/CN2023/092187

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)