

(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 10 月 24 日 (24.10.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/217142 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/69 (2017.01) **A61K 9/51** (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/077929

(22) 国际申请日: 2024 年 2 月 21 日 (21.02.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310410259.2 2023年4月17日 (17.04.2023) CN
202410150248.X 2024年2月2日 (02.02.2024) CN

(71) 申请人: 南京邮电大学 (NANJING UNIVERSITY OF POSTS AND TELECOMMUNICATIONS) [CN/CN]; 中国江苏省南京市栖霞区文苑路9号, Jiangsu 210000 (CN)。

(72) 发明人: 丁显光 (DING, Xianguang); 中国江苏省南京市栖霞区文苑路9号, Jiangsu 210000 (CN)。张晶晶 (ZHANG, Jingjing); 中国江苏省南京市栖霞区文苑路9号, Jiangsu 210000 (CN)。王智

雨 (WANG, Zhiyu); 中国江苏省南京市栖霞区文苑路9号, Jiangsu 210000 (CN)。

(74) 代理人: 芜湖思诚知识产权代理有限公司 (WUHU SICHENG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国安徽省芜湖市高新区服务外包产业园4栋10楼1015室, Anhui 241000 (CN)。

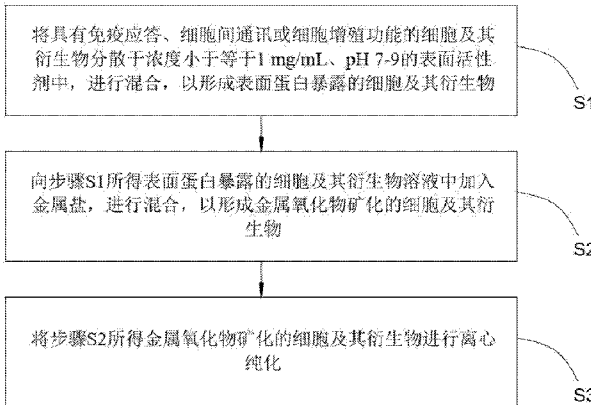
(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR,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

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: BIOMINERALIZED COMPOSITE NANOMATERIAL, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 生物矿化复合结构纳米材料、制备方法及其应用

[图1]



- S1 Disperse cells having an immune response, intercellular communication or cell proliferation function and derivatives thereof in a surfactant having a concentration of less than or equal to 1 mg/mL and having a pH of 7-9, and perform mixing to form surface protein-exposed cells and derivatives thereof
- S2 Add a metal salt to the solution of the surface protein-exposed cells and the derivatives thereof obtained in step S1, and perform mixing to form metal oxide mineralized cells and derivatives thereof
- S3 Perform centrifugal purification on the metal oxide mineralized cells and the derivatives thereof obtained in step S2

(57) Abstract: A biomaterialized composite nanomaterial, and a preparation method therefor and a use thereof. The nanomaterial takes a cell and a derivative thereof as a core, and mineralizes the core to form a protective layer of the cell and the derivative thereof, and a hydrophilic shell targeting tumor cells, and the shell has a modified end covalently bonded to the cell and the derivative thereof and a hydrophilic end targeting tumor cells. Preferably, the core is composed of a cell or a cell sub-structure or an extracellular vesicle derivative; the shell is composed of an iron oxide or a manganese oxide or an aluminum oxide in a metal salt. The nanomaterial can be used as a novel vaccine for immunotherapy, can protect a cell and a derivative thereof, can target tumor cells, improves efficiency, and reduces toxic and side effects on patients; the preparation method has the advantages of easy operation, controllable conditions and large-scale production.

[见续页]



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))。

(57) 摘要：一种生物矿化复合结构纳米材料、制备方法及其应用，以细胞及其衍生物作为内核，矿化所述内核形成作为细胞及其衍生物的保护层以及靶向肿瘤细胞的亲水性外壳，该外壳具有与细胞及其衍生物共价键合的修饰端和靶向肿瘤细胞的亲水端。优选，内核由细胞或细胞亚结构或细胞外囊泡衍生物构成；外壳由金属盐中的铁氧化物或锰氧化物或铝氧化物构成。该纳米材料既可作为免疫治疗的新型疫苗，又可对细胞及其衍生物进行保护，还对肿瘤细胞有靶向性，提高效率，降低对患者的毒副作用；其制备方法具有简单易操作、条件易控制、可大规模生产的优点。

说明书

发明名称: 生物矿化复合结构纳米材料、制备方法及其应用 技术领域

[0001] 本发明涉及生物-材料复合技术领域，特别是涉及细胞及其细胞衍生物的生物矿化复合结构制备，以及其在新型疫苗、细胞衍生物保护以及肿瘤治疗方面的应用。

背景技术

[0002] 在中国，每天约有一万人查出患有癌症，癌症是人类健康生存的重大威胁。探索和开发各种各样的癌症治疗方法具有重要的意义。目前，癌症治疗的常见方法有“外科手术”、“化学疗法”、“放射疗法”这三种。但是这三种方法往往会给患者带来极大的痛苦和副作用。近几年，“免疫疗法”逐渐兴起，更是被称为第四种治疗方法。免疫治疗是将人体本身的自然免疫能力发挥到最大的作用，或者帮助人体恢复已经丧失的免疫功能。这种方法是通过激发人体自身的免疫功能以治疗癌症，所以对人体的其他正常器官和组织没有任何影响。免疫疗法最大的特点就是可以持续的增强人体的免疫系统功能。此外，在病发的初期，专家们也期待通过免疫疗法的辅助特性，从而使其他的治疗方式达到更理想的效果。

[0003] 传统的免疫疗法包括免疫细胞治疗和免疫检查点阻滞剂治疗两种方法。免疫细胞治疗是指，把人体的免疫细胞(初始T细胞，NK细胞等)从血液里面分离出来，在体外培养后重新注入到体内，从而识别和杀死肿瘤细胞。免疫检查点阻滞剂治疗是指，人体内的免疫系统可以识别自身的正常细胞，并不予以排斥。一旦肿瘤细胞学会这种免疫识别方法后，就会像正常细胞一样不受免疫系统的排斥或者攻击。通过向体内注射免疫检查点阻滞剂，使肿瘤细胞丧失免疫识别功能，从而被免疫系统识别并消灭。

[0004] 相较于传统的免疫疗法，生物-材料复合技术是一种低损高效的治疗方法：1) 提升免疫学响应，实现小剂量的条件下取得更大治疗效益，有利于减少剂量减低潜在毒性作用；2) 能够实现多治疗功能的集成，同时集成内核细胞及其衍生

物的生物疗效，以及外壳生物金属矿化物的生物活性，多效应增强；3）保护内核细胞及其衍生物，一方面使保存更稳定，一方面能避免体内酶切导致的活性丧失。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种适合作为新型疫苗、细胞衍生物保护以及肿瘤治疗的生物-材料复合技术，同时适合作为免疫检查点抑制剂的生物矿化复合结构纳米材料。

[0006] 与传统合成技术相比，由于本发明的方法采用温和水相合成条件，对内载细胞及其衍生物结构不构成活性和功能破坏，使之能保持原有治疗活性；与传统矿化方法相比，本发明的方法可实现几十纳米尺度的内载成分包裹。此外，其生物矿化结构除了能实现对内载细胞成分的活性维持，自身还具有免疫学活性，可实现治疗效应的增益。另外，该矿化外壳层可以进行后续化学修饰，实现进一步功能化。

[0007] 本发明采用如下技术方案：

[0008] 本发明提供了一种生物矿化复合结构纳米材料，其粒径为3 nm–20 μm，包括：

[0009] 内核，所述内核为具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物及病原微生物结构；

[0010] 矿化所述内核的纳米材料，所选用的纳米材料作为细胞及其衍生物的保护层，以及靶向肿瘤细胞的亲水性外壳，所述外壳具有与细胞及其衍生物共价键合的修饰端和靶向肿瘤细胞的亲水端。

[0011] 进一步地，所述内核由细胞或细胞亚结构或细胞外囊泡衍生物构成。

[0012] 进一步地，所述外壳由铁氧化物、锰氧化物、铝氧化物等金属氧化物构成。

[0013] 本发明还提供了上述的生物矿化复合结构纳米材料的制备方法，包括如下步骤：

[0014] S1.将具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物分散于浓度小于等于1 mg/mL、pH 7–9的表面活性剂中，进行混合，以形成表面蛋白暴露的细胞及其衍生物；

- [0015] S2.向步骤S1所得表面蛋白暴露的细胞及其衍生物溶液中加入金属盐，进行混合，以形成金属氧化物矿化的细胞及其衍生物；
- [0016] S3.将步骤S2所得金属氧化物矿化的细胞及其衍生物进行离心纯化。
- [0017] 进一步地，步骤S1中表面活性剂的聚乙烯吡咯烷酮或蛋白质或多肽，浓度为1mg/mL -10mg/mL。
- [0018] 进一步地，步骤S1的混合时间为5至20分钟；步骤S2的混合时间为30分钟至1小时。
- [0019] 进一步地，步骤S1还包括：混合后，离心，收集表面蛋白暴露的细胞及其衍生物；步骤S2还包括：混合后，离心，收集Fe³⁺纳米粒子沉淀。
- [0020] 进一步地，该制备方法还包括具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物的步骤。
- [0021] 本发明还提供了上述的生物矿化复合结构纳米材料作为具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物应用于新型疫苗、细胞衍生物保护以及肿瘤治疗等方面。
- [0022] 与现有技术相比，本发明的有益效果在于：
- [0023] 1.本发明的纳米材料以具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物作为内核，在内核外矿化所述内核的纳米材料，所选用的纳米材料作为细胞及其衍生物的保护层，以及靶向肿瘤细胞的亲水性外壳，所述外壳具有与细胞及其衍生物共价键合的修饰端和靶向肿瘤细胞的亲水端。
- [0024] 2.本发明形成了一种具有多功能的生物矿化复合结构纳米材料，既可作为新型疫苗，又可作为免疫治疗中的免疫检查点阻滞剂，还具有肿瘤细胞靶向性，提高效率，降低对患者的毒副作用。
- [0025] 3.本发明的生物矿化纳米材料的制备方法具有简单易操作、条件易控制、可大规模生产的优点。

附图说明

- [0026] 图1是本发明实施例提供的一种生物矿化复合结构纳米材料的制备方法的流程图。
- [0027] 图2是本发明实施例提供的一种水合氧化铁纳米材料的透射电镜图。

[0028] 图3是本发明实施例提供的一种生物矿化复合结构纳米材料的透射电镜图。

[0029] 图4是本发明实施例提供的一种生物矿化复合结构纳米材料的小动物成像治疗效果图。

具体实施方式

[0030] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0031] 此外，下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0032] 本发明利用了纳米包裹技术，使用具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物、靶向肿瘤细胞的亲水性纳米材料形成生物矿化纳米结构，以将无机纳米材料和生物有机体集为一体。

[0033] 本发明的生物矿化复合结构纳米材料为免疫治疗生物复合纳米材料，其内核为具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物。例如，本发明的具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物可为细胞外囊泡、蛋白质、海拉细胞，但不排除其他可用的具有免疫治疗功能的细胞及其衍生物。

[0034] 矿化所述内核之前采用表面活性剂对细胞及其衍生物表面进行清洗，暴露表面蛋白。本发明对表面活性剂的来源没有特殊的限制，采用本领域技术人员熟知的表面活性剂如聚乙烯吡咯烷酮即可，如可以采用市售商品，也可以采用本领域技术人员熟知的其他表面活性剂。

[0035] 生物矿化复合结构纳米材料的外壳由亲水性化合物构成，用于提高纳米材料的水相稳定性，保护纳米材料在体内的作用时间，并可以进行化学修饰以提供纳米材料的靶向性等功能，一方面，该外壳具有与细胞及其衍生物表面蛋白共价键合的修饰端，另一方面，该外壳具有靶向肿瘤细胞的亲水端，该亲水端延伸在该纳米材料的外部。

[0036] 本发明的生物复合结构纳米材料以具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物作为内核，采用活性剂聚乙烯吡咯烷酮暴露表面蛋白，在细

胞及其衍生物外吸附有三价铁离子，并将亲水性化合物作为其外壳，形成了一种具有多功能的生物矿化复合结构纳米材料，即可作为新型疫苗，又可作为免疫治疗中的免疫检查点阻滞剂，还具有肿瘤细胞靶向性，提高效率，降低对患者的毒副作用。

[0037] 图1示出了根据本发明的实施方案，制备生物矿化复合结构纳米材料的方法流程。从图1所示可见，制备方法主要包括三个步骤：首先，将免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物分散于活性剂聚乙烯吡咯烷酮溶液中，聚乙烯吡咯烷酮物质浓度小于等于1 mg/mL、pH 7-9的表面活性剂中，进行混合，以形成表面蛋白暴露的细胞及其衍生物。之后，将所得表面蛋白暴露的细胞及其衍生物溶液分散于高锰酸铁氧化生成的三价铁离子的水溶液中，进行混合，以形成 Fe^{3+} 矿化的细胞及其衍生物。最后，离心纯化，获取 Fe^{3+} 矿化的细胞及其衍生物。本发明的所有步骤，均在室温下完成。

[0038] 在活性剂聚乙烯吡咯烷酮暴露细胞及其衍生物表面蛋白步骤中，为了保证聚乙烯吡咯烷酮暴露内核外蛋白的效果及反应效率，本发明的表面活性剂的聚乙烯吡咯烷酮小于等于5 mg/mL，其中，以1 mg/mL 至4 mg/mL为佳。制备方法中所提及的混合，可以采用常规的混合方法，如搅拌，来使体系均匀地形成纳米结构。根据选用原料以及相对量的不同，混合时间通常可以为5-20分钟。本发明对表面活性剂聚乙烯吡咯烷酮的来源没有特殊的限制，采用本领域技术人员熟知的表面活性剂聚乙烯吡咯烷酮即可，如可以采用市售商品，也可以采用本领域技术人员熟知的其他表面活性剂。

[0039] 之后，在 Fe^{3+} 的吸附步骤中，三价铁离子的水溶液为水合氧化铁溶液。制备方法中所提及的混合，可以采用常规的混合方法，如搅拌，来使体系均匀地形成纳米结构。混合时间是根据选用原料以及相对量的不同进行选择，属于本领域普通技术人员作出的常规选择。

[0040] 最后，在纳米材料矿化生物有机体形成步骤中，混合时间可为30分钟至1小时。

[0041] 上述的三个步骤中在各个纳米粒子形成之后，可以采用离心的方式进行分离，即混合后，离心，收集表面蛋白暴露的细胞及其衍生物、 Fe^{3+} 纳米粒子沉淀或生

物矿化复合结构纳米材料沉淀。本发明的还可为所得上述各个纳米粒子或纳米材料进行洗涤，本发明对所述的离心或洗涤的方法没有特殊的限制，采用本领域技术人员熟知的离心或洗涤的技术方案即可。在本发明中，所述洗涤的溶剂优选为去离子水，所述洗涤的次数优选为3次到5次。

[0042] 本发明的生物矿化结构纳米材料的制备方法具有简单易操作、条件易控制、可大规模生产的优点。

[0043] 本发明所制备的生物矿化结构纳米材料的保存方式没有特殊的限制，可以将其分散在水性介质中，以液态形式保存，也可以以固体形式保存。以液体保存时，水性介质可为双蒸水、生理盐水、表面活性剂、组织培养液中的一种或多种。

[0044] 本发明所得的纳米材料的粒径为3 nm–20 μm。

[0045] 本发明对所得的三价铁纳米材料进行了透射电镜分析。分析结果表明：本发明所得的三价铁纳米聚集成团块状，为无定形–弱结晶的水合氧化铁。

[0046] 本发明对以细胞外囊泡为内核制备的生物矿化复合结构纳米材料进行透射电子显微镜观察。本发明对所述生物矿化复合结构纳米材料的方法没有特殊的限制，采用本领域技术人员熟知的透射电子显微镜的技术方案即可。测试结果表明：本发明的生物矿化复合结构纳米材料尺寸在20 nm–200 nm左右，无需负染也能观察到细胞外囊泡的结构。

[0047] 在本发明的实施例中，可以将所得生物矿化复合结构纳米材料注入实验动物体内，观察所得纳米材料的靶向效果以及免疫治疗效果。

实施例1：

[0048] 本发明实施例1提供了一种细胞及其衍生物生物矿化复合材料，按照如下步骤制备：

[0049] (1) 通过梯度超速离心获取细胞外囊泡，用1 ml PBS重悬细胞外囊泡。

[0050] (2) 1 M高锰酸铁在水中反应生成水合氧化铁。

[0051] (3) 取100 μl所制取得细胞外囊泡悬浊液分散于1 ml PBS溶液中，加入20 μl水合氧化铁纳米材料，搅拌5 min，离心获取水合氧化铁矿化的细胞外囊泡。

[0052] 本发明对实施例1步骤(2)所得水合氧化铁纳米材料进行了透射电镜分析,结果如图2所示,由图2可知,水合氧化铁纳米材料聚集成团块状,为无定形-弱结晶的水合氧化铁。本发明还对实施例1所制备的生物矿化细胞外囊泡进行了透射电镜分析,结果如图3所示,由图3可知,本实施例的生物矿化外囊泡呈球形分布,直径在20 nm-200 nm之间,无需负染也能观察到细胞外囊泡的结构。将实施例1所得生物矿化复合结构纳米材料注入雄性Balb/C肿瘤鼠体内,观察所得生物矿化材料在小动物成像下的分布情况,结果如图4所示,由图4可知,注入的生物矿化材料靶向到肿瘤部位。

实施例2:

[0053] 本实施例提供了一种细胞及其衍生物生物矿化复合材料,按照如下步骤制备:

[0054] (1) 胰酶消化 1×10^6 个海拉细胞,用1 ml PBS重悬消化后的细胞;

[0055] (2) 1 M高锰酸铁在水中反应生成水合氧化铁;

[0056] (3) 取100 μ l所制取得海拉细胞悬浊液分散于1 ml PBS溶液中,加入20 μ l水合氧化铁纳米材料,搅拌5 min,离心获取水合氧化铁矿化的海拉细胞。

实施例3:

[0057] 本实施例提供了一种细胞及其衍生物生物矿化复合材料,按照如下步骤制备:

[0058] (1) 收集蛋白质;

[0059] (2) 1 M高锰酸铁在水中反应生成水合氧化铁;

[0060] (3) 取100 μ l所制取得蛋白质悬浊液分散于1 ml PBS溶液中,加入20 μ l水合氧化铁纳米材料,搅拌5 min,离心获取水合氧化铁矿化的蛋白质。

实施例4:

[0061] 本实施例提供了一种细胞及其衍生物生物矿化复合材料,按照如下步骤制备:

[0062] (1) 胰酶消化 1×10^6 个海拉细胞,用1 ml PBS重悬消化后的细胞;

[0063] (2) 1 M高锰酸钾在水中被还原为二氧化锰;

[0064] (3) 取100 μ l所制取得海拉细胞悬浊液分散于1 ml PBS溶液中,加入20 μ l二氧化锰溶液,搅拌5 min,离心获取二氧化锰矿化的海拉细胞。

实施例5:

- [0065] 本实施例提供了一种细胞及其衍生物生物矿化复合材料，按照如下步骤制备：
- [0066] （1）通过梯度超速离心获取细胞外囊泡，用1 ml PBS重悬细胞外囊泡；
- [0067] （2）制备氢氧化铜；
- [0068] （3）取100 μ l所制取得海拉细胞悬浊液分散于1 ml PBS溶液中，加入20 μ l氢氧化铜纳米材料，搅拌5 min，离心获取氢氧化铜矿化的海拉细胞。

实施例6：

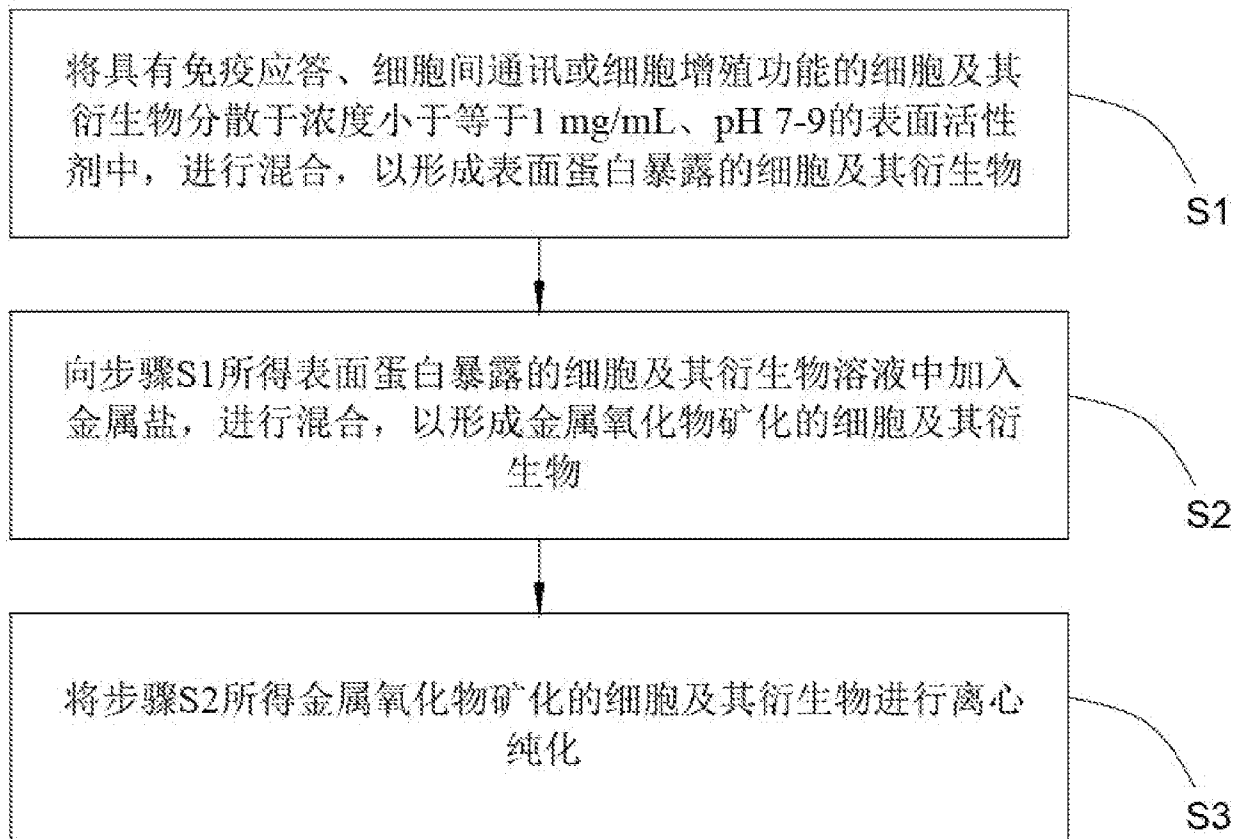
- [0069] 本实施例提供了一种细胞及其衍生物生物矿化复合材料，按照如下步骤制备：
- [0070] （1）胰酶消化 1×10^6 个海拉细胞，用1 ml PBS重悬消化后的细胞；
- [0071] （2）制备二氧化镁；
- [0072] （3）取100 μ l所制取得海拉细胞悬浊液分散于1 ml PBS溶液中，加入20 μ l二氧化镁，搅拌5 min，离心获取二氧化镁矿化的海拉细胞。
- [0073] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

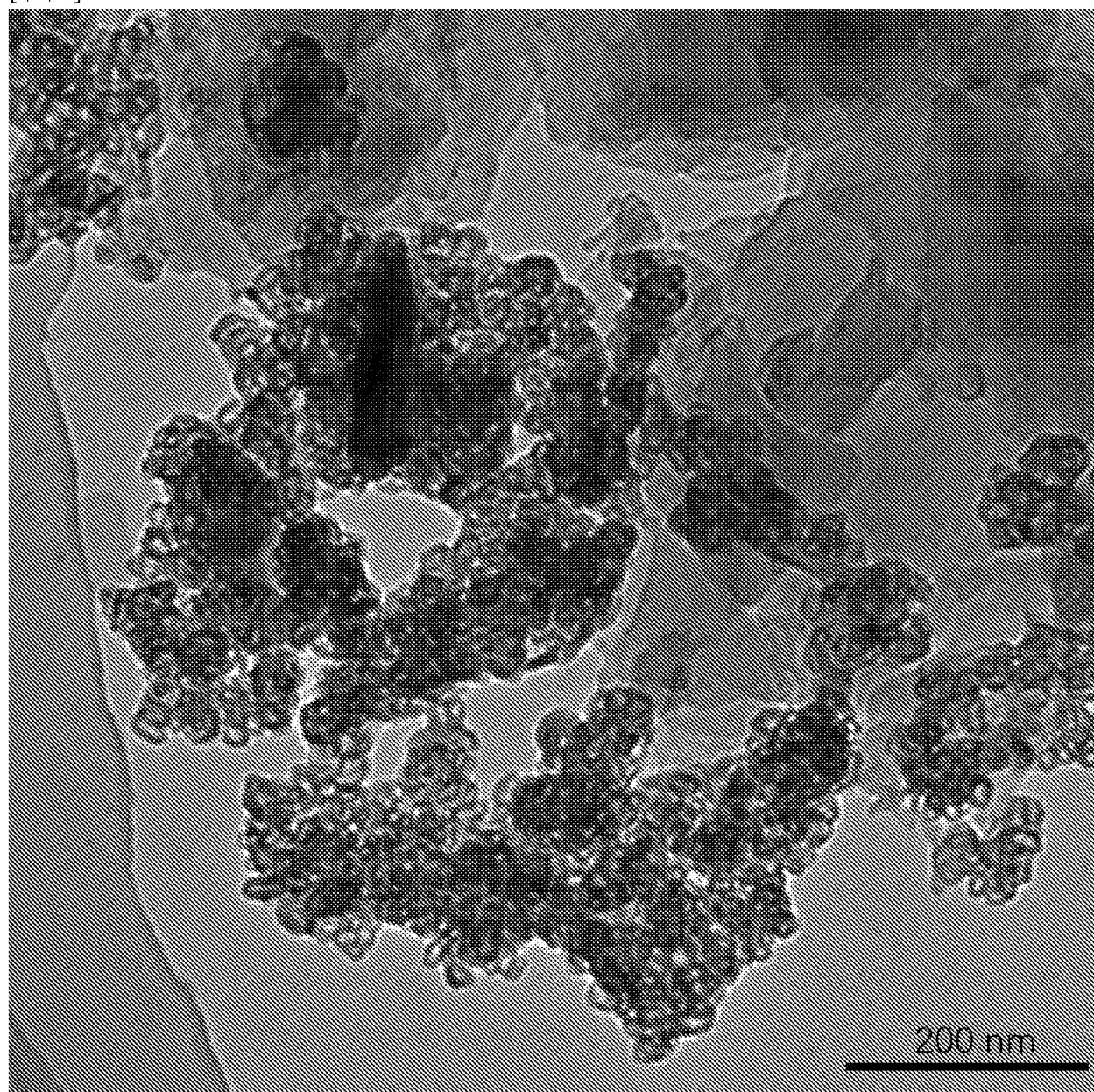
- [权利要求 1] 一种生物矿化复合结构纳米材料，其特征在于，其粒径为3 nm–20 μm ，包括：
- 内核，所述内核为具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物；
- 矿化所述内核的纳米材料，所选用的纳米材料作为细胞及其衍生物的保护层以及靶向肿瘤细胞的亲水性外壳，所述外壳具有与细胞及其衍生物共价键合的修饰端和靶向肿瘤细胞的亲水端。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的生物矿化复合结构纳米材料，其特征在于，
- 所述内核由细胞或细胞亚结构或细胞外囊泡衍生物构成；
- 所述外壳由金属盐中的铁氧化物或锰氧化物或铝氧化物构成。
- [权利要求 3] 一种制备权利要求2所述的生物矿化复合结构纳米材料的方法，其特征在于，包括如下步骤：
- S1.将具有免疫应答、细胞间通讯或细胞增殖功能的细胞及其衍生物分散于浓度小于等于1 mg/mL、pH 7–9的表面活性剂中，进行混合，以形成表面蛋白暴露的细胞及其衍生物；
- S2.向步骤S1所得表面蛋白暴露的细胞及其衍生物溶液中加入金属盐，进行混合，以形成金属氧化物矿化的细胞及其衍生物；
- S3.将步骤S2所得金属氧化物矿化的细胞及其衍生物进行离心纯化。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的生物矿化复合结构纳米材料的制备方法，其特征在于，步骤S1中的表面活性剂采用聚乙烯吡咯烷酮或蛋白质或多肽，其浓度为1mg/mL –10 mg/mL。
- [权利要求 5] 根据权利要求3所述的生物矿化复合结构纳米材料的制备方法，其特征在于，步骤S1的混合时间为5–20分钟；步骤S3的混合时间为30–60分钟。

- [权利要求 6] 根据权利要求3所述的生物矿化复合结构纳米材料的制备方法，其特征在于，步骤S1还包括：混合后，离心，收集表面蛋白暴露的细胞及其衍生物；
步骤S2还包括：混合后，离心，收集Fe³⁺纳米粒子沉淀。
- [权利要求 7] 权利要求1所述的生物矿化复合结构纳米材料的应用，其特征在于，其能够应用于新型疫苗或细胞衍生物保护。

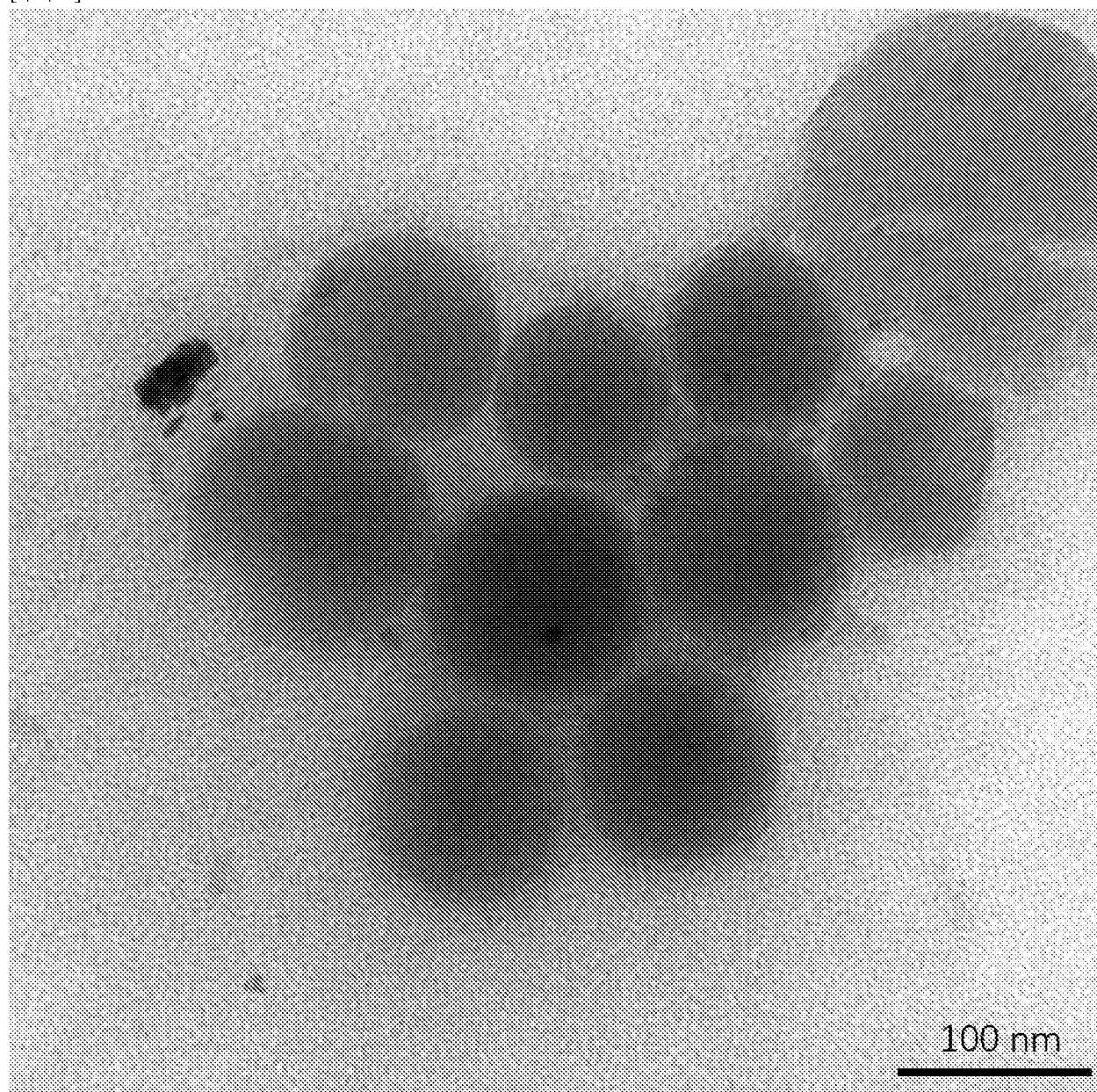
[图 1]



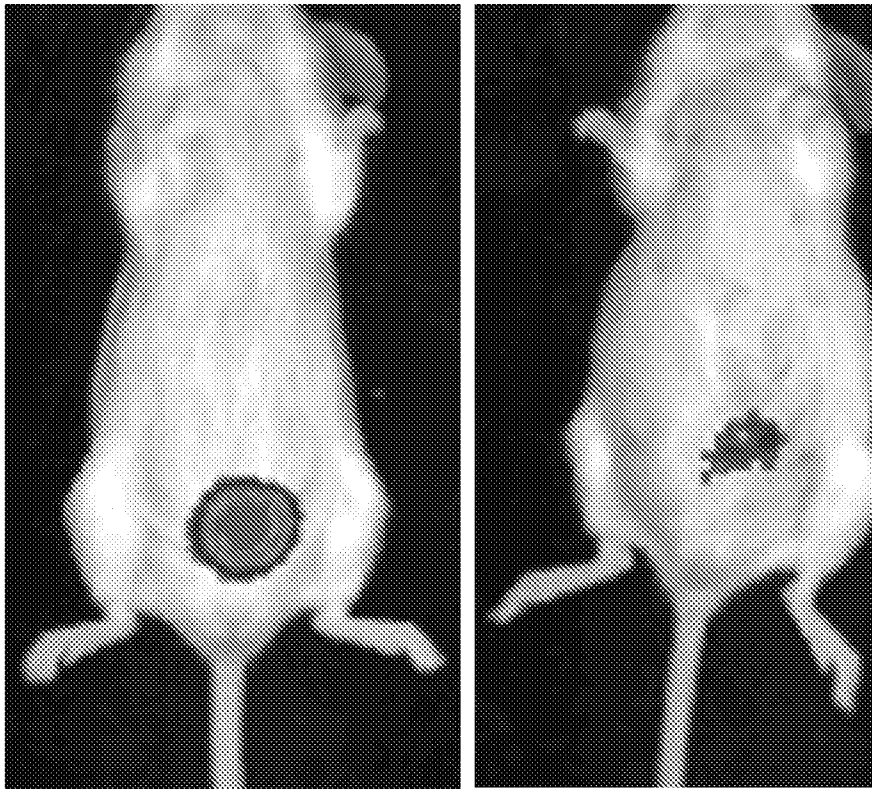
[图 2]



[图 3]



[图 4]

细则 26,
12.03.2024

治疗前

治疗后

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/077929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K47/69(2017.01)i; A61K47/02(2006.01)i; A61K9/51(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:A61K,A61P 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) CNTXT, WPABSC, ENTXTC, VEN, DWPI, WPABS, ENTXT, CJFD, PubMed, ISI-Web of science, CNKI, 超星读秀, CHAOXING DUXIU: 生物矿化, 纳米, 内核, 细胞, 蛋白, 多肽, 氨基酸, 囊泡, 溶酶体, 抗体, 细胞因子, 矿化, 保护层, 亲水, 外壳, 共价键, 修饰端, 靶向, 肿瘤细胞, 亲水端, 铁, 铁氧化物, 锰, 锰氧化物, 铝, 铝氧化物, 表面活性剂, 聚乙烯吡咯烷酮, 聚维酮, PVP, 离心, 纯化, 疫苗, biomineralized nano, inner core, cell, proteins, polypeptides, amino acids, vesicles, lysosomes, antibodies, cytokines, mineraliz+, protective layer, hydroph+, shell, modified end covalent??, bond, target+, tumor cells, Iron oxides, Fe, manganese oxides, Mn, aluminium oxides, Al, surfactants, Polyvinylpyrrolidone, povidone, centrifugation, purification, vaccine		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 115887410 A (PEKING UNIVERSITY) 04 April 2023 (2023-04-04) claims 1-4 and 10, and description, paragraphs 6-29	1-7
Y	CN 105582554 A (SUZHOU INSTITUTE OF NANO-TECH AND NANO-BIONICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 18 May 2016 (2016-05-18) claims 1-4 and 10, and description, paragraphs 6-25	1-7
Y	CN 112791181 A (THE GBA NATIONAL INSTITUTE FOR NANOTECHNOLOGY INNOVATION; NATIONAL CENTER FOR NANOSCIENCE AND TECHNOLOGY, CHINA; INSTITUTE OF MEDICAL BIOLOGY CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 14 May 2021 (2021-05-14) claims 1-10, and abstract	1-7
☒ 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 31 May 2024		Date of mailing of the international search report 17 June 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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 109045285 A (NANJING UNIVERSITY OF POSTS AND TELECOMMUNICATIONS) 21 December 2018 (2018-12-21) claims 1-10, and description, paragraphs 25-35	1-7
Y	吴坤 (WU, Kun). "基于二氧化锰纳米材料构建的多模态纳米诊疗探针 (Multifunctional Nanotheramostis Probe Based on Manganese Dioxide Nanomaterials)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(工程科技I辑) (Science-Engineering (A), China Master's Theses Full-Text Database), No. no. 03, 15 March 2021 (2021-03-15), Abstract, and text, pages 48-50	1-7
Y	乔园园 (QIAO, Yuanyuan). "基于Fe(III)生物矿化多模态纳米探针的构建与肿瘤诊疗应用的研究 (Construction of Multimodal Nanoprobe Based on Fe(III) Biomineralization and its Application in Tumor Diagnosis and Treatment)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(工程科技I辑) (Science-Engineering (A), China Master's Theses Full-Text Database), No. no. 02, 15 February 2023 (2023-02-15), text, pp. 14-16	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/077929

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 7 sets forth "the use of the biomineralized composite structure nanomaterial of claim 1, characterized in that same can be applied to a new vaccine or cell derivative protection". The use relates to a method for preventing a disease, which falls within subject matter for which an international search is not required (PCT Rule 39.1(iv)). The examiner conducted a search on the basis of a reasonable expectation, that is, the subject matter of claim 7 is amended to "the use of the biomineralized composite structure nanomaterial of claim 1 in the preparation of a new vaccine or a drug for protecting a cell derivative".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/077929

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	115887410	A	04 April 2023	None			
CN	105582554	A	18 May 2016	CN	105582554	B	02 August 2019
CN	112791181	A	14 May 2021	CN	112791181	B	02 April 2024
				WO	2022165980	A1	11 August 2022
CN	109045285	A	21 December 2018	CN	109045285	B	10 December 2021

A. 主题的分类

A61K47/69(2017.01)i; A61K47/02(2006.01)i; A61K9/51(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:A61K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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 115887410 A (北京大学) 2023年4月4日 (2023 - 04 - 04) 权利要求1-4,10, 说明书第6-29段	1-7
Y	CN 105582554 A (中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所) 2016年5月18日 (2016 - 05 - 18) 权利要求1-4, 10, 说明书第6-25段	1-7
Y	CN 112791181 A (广东粤港澳大湾区国家纳米科技创新研究院 国家纳米科学中心 中国医学科学院医学生物学研究所) 2021年5月14日 (2021 - 05 - 14) 权利要求1-10, 说明书摘要	1-7
Y	CN 109045285 A (南京邮电大学) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-10, 说明书第25-35段	1-7

☒ 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5月31日

国际检索报告邮寄日期

2024年6月17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

周红涛

电话号码 (+86) 010-62411088

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
Y	吴坤. "基于二氧化锰纳米材料构建的多模态纳米诊疗探针" 中国优秀硕士学位论文全文数据库（工程科技 I 辑）， 第03期，2021年3月15日 (2021 - 03 - 15)， 论文摘要和正文第48-50页	1-7
Y	乔园园. "基于Fe（Ⅲ）生物矿化多模态纳米探针的构建与肿瘤诊疗应用的研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库（工程科技 I 辑）， 第02期，2023年2月15日 (2023 - 02 - 15)， 正文第14-16页	1-7

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.

☒

权利要求： 7
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求7要求保护“权利要求1所述的生物矿化复合结构纳米材料的应用，其特征在于，其能够应用于新型疫苗或细胞衍生物保护”，该应用涉及预防疾病的方法，属于PCT细则39.1(iv)定义的不要
求进行国际检索的主题。审查员基于合理预期，即，权利要求7的主题修改为“权利要求1所述的生
物矿化复合结构纳米材料在制备新型疫苗或保护细胞衍生物的药物中的应用”进行了检索。
2.

☐

权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3.

☐

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/077929

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	115887410	A	2023年4月4日	无	
CN	105582554	A	2016年5月18日	CN	105582554 B 2019年8月2日
CN	112791181	A	2021年5月14日	CN	112791181 B 2024年4月2日
				WO	2022165980 A1 2022年8月11日
CN	109045285	A	2018年12月21日	CN	109045285 B 2021年12月10日