

(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
2022 年 9 月 15 日 (15.09.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/188013 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/76 (2006.01) *G01N 27/327* (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/079615

(22) 国际申请日: 2021 年 3 月 8 日 (08.03.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁
爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 史海斌 (SHI, Haibin); 中国江苏省苏
州市苏州工业园区仁爱路199号, Jiangsu
215123 (CN)。 毛秋莲 (MAO, Qiulian); 中
国江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路199
号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司
(SUZHOU CREATOR PATENT AND TRADEMARK
AGENCY, LTD); 中国江苏省苏州市姑苏区干将
西路93号5楼孙周强, Jiangsu 215002 (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,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) **Title:** CHEMILUMINESCENCE-MEDIATED NANOPARTICLE, SELF-ASSEMBLED AGGREGATE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 化学发光介导的纳米颗粒、自组装聚集体及其制备方法和应用

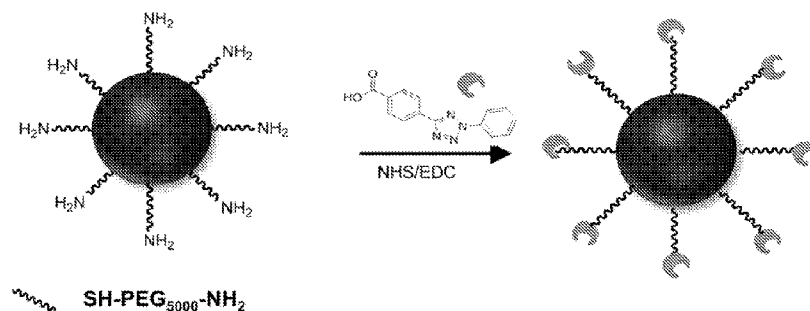


图 1

(57) **Abstract:** A chemiluminescence-mediated nanoparticle, a self-assembled aggregate, a preparation method therefor and a use thereof. The preparation method comprises the following steps: 1) PEG is modified on the surface of the nanoparticle; 2) photosensitive crosslinking agent is modified on the PEG terminal amino group; 3) luminol molecules are adsorbed on the surface of the modified photosensitive crosslinking agent to become chemiluminescent sources and 4) chemiluminescence-mediated nanoparticle self-assembly is performed. The method uses, for the first time, a non-external light source to induce crosslinking of the photosensitive crosslinking agent, thereby aggregating gold nanoparticles. The obtained chemiluminescence-mediated nanoparticle self-assembled aggregate have low toxicity and good photothermal therapeutic effects, are suitable for being developed into an anti-tumor drug based on photothermal therapy, and have important scientific research and economic values.

(57) **摘要:** 一种化学发光介导的纳米颗粒、自组装聚集体及其制备方法和应用。制备方法包括以下步骤: 1) 在纳米颗粒表面上修饰PEG; 2) 在PEG末端氨基上修饰光敏感交联剂; 3) 在修饰好光敏感交联剂表面吸附鲁米诺分子成为化学发光源和4) 化学发光介导的纳米颗粒自组装。该方法首次使用了非外照发光源诱导光敏感交联剂交联, 从而使得金纳米颗粒聚集。获得的化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体具有较低的毒性和较好的光热治疗效果, 适合于开发成一种基于光热疗法的抗肿瘤药物, 具有重要的科研及经济价值。

NA, RW, 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, 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))。

化学发光介导的纳米颗粒、自组装聚集体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米颗粒自组装技术领域，具体涉及化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体的制备方法，通过该方法制备的聚集体，以及该聚集体在制备基于光热疗法（photothermal therapy, PTT）的抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

[0002] 众所周知，纳米颗粒的性质与其尺寸、结构、形态有着密切的关系。具有不同尺寸、结构、形态的纳米颗粒会呈现出不同的表面效应和量子效应，进而表现出不同的光学、电学、磁学、力学和化学性质，这一特性在信息存储器、生物传感器、纳米器件、临床诊断材料等领域中具有重要的研究和应用价值。因此，纳米颗粒的可控自组装一直以来都是纳米技术领域中的研究热点。

[0003] 传统的纳米颗粒（尤其是金属纳米颗粒）自组装主要是通过纳米颗粒自发地组织或聚集成一种热力学稳定、分布均一、性能特殊的结构的过程。该过程主要依靠两个因素来形成自组装体系：其一是通过非共价键（特别是氢键）作用来形成稳定的纳米自组装体系；其二是纳米体系为了达到最低能级所产生的自发自组装。常用的纳米颗粒自组装方法主要包括溶剂挥发法、磁电光诱导法、界面法及模板法等。然而，由于依赖非共价键作用或电荷间作用，通过这些传统方法所获得的纳米自组装体系往往呈现出较差的重复性和稳定性，大大制约了材料在生物体系中的应用。

[0004] 为了克服传统方法的缺点，小分子交联剂的使用应运而生，现有技术利用外部刺激，例如酸性细胞外pH，癌症相关的酶和光诱导来组装小的纳米颗粒，以便将表面等离子体共振转移到近红外区域进行光热疗法；尽管在过去的十年中，基于光响应分子（例如生色团，螺吡喃，偶氮苯）的异构化或二聚化，已经进行了大量关于光触发自组装的体外研究。但其在体内的应用很少被研究，这可能是由于光响应分子合成复杂和紫外线的组织穿透力有限。与此同时，在体内

，外部照射穿透深度有限，对于深部的肿瘤并不能很好的诱导光敏剂发生交联，同时还一定程度上受到外部照射的条件要求，使得整体聚集效率并不是很高。

发明概述

技术问题

[0005] 为了克服上述现有技术中存在的问题，本发明开发出一种简单、快速、绿色、稳定、可控的纳米颗粒自组装方法。该方法不仅适用于同种纳米颗粒之间的自组装，而且适用于不同纳米颗粒之间的杂化组装，为多功能纳米复合材料的制备提供了新的策略与手段。

问题的解决方案

技术解决方案

[0006] 本发明采用如下技术方案：一种化学发光介导的纳米颗粒，包括带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒与带有交联剂的纳米颗粒。

[0007] 一种化学发光介导的纳米颗粒体系，包括带有交联剂和鲁米诺的纳米颗粒、带有交联剂的纳米颗粒、氧化剂、铁离子、水。优选的，带有交联剂的纳米颗粒与带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒的重量比为1：（0.8~1.2），优选为1：1。

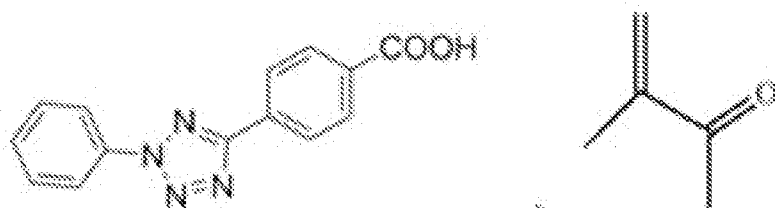
[0008] 一种化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体，由带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒与带有交联剂的纳米颗粒交联得到。

[0009] 本发明以带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒与带有交联剂的纳米颗粒组成化学发光介导的纳米颗粒，纳米颗粒间的交联自组装无需外源光照，在氧化剂（比如过氧化氢）、铁离子存在下进行，与肿瘤细胞内常规环境近似；本发明以带有交联剂和鲁米诺的纳米颗粒、带有交联剂的纳米颗粒、氧化剂、铁离子、水组成化学发光介导的纳米颗粒体系，可以在无外源光照（激发）下制备纳米颗粒自组装聚集体。本发明公开了上述化学发光介导的纳米颗粒或者化学发光介导的纳米颗粒体系在无外源光照下制备纳米颗粒自组装聚集体中的应用。

[0010] 本发明在没有外部激发的情况下，利用化学发光触发光敏剂的交联，显得尤为新颖，是一种简单、快速、可控的纳米颗粒自组装新方法，具有重大的研究及应用价值。

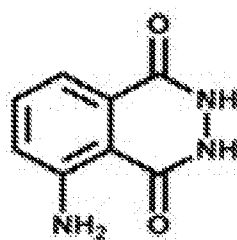
[0011] 本发明带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒与带有交联剂的纳米颗粒中，交联剂不同，比如带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒中的交联剂为交联剂A，带有交联剂的纳米颗粒中的交联剂为交联剂B；交联剂A优选为甲基丙烯酸，交联剂B优选为四噻唑。

[0012] 本发明中，交联剂的化学结构式如下：



。

[0013] 鲁米诺的化学结构式如下：



。

[0014] 上述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体的制备方法，包括以下步骤。

[0015] (1) 在纳米颗粒表面修饰交联剂，得到带有交联剂的纳米颗粒。

[0016] (2) 在纳米颗粒表面修饰交联剂与鲁米诺，得到带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒。

[0017] (3) 将步骤(1)带有交联剂的纳米颗粒、步骤(2)带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒交联，得到化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体。

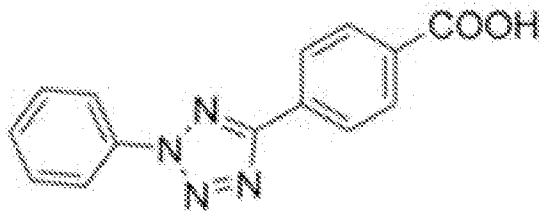
[0018] 本发明中，纳米颗粒为金属纳米颗粒、无机非金属纳米颗粒、有机纳米颗粒、无机-有机杂化纳米颗粒中的一种或几种；氧化剂为过氧化氢。

[0019] 本发明中，在纳米颗粒表面修饰氨基聚乙二醇，再与交联剂反应，得到带有交联剂的纳米颗粒；在纳米颗粒表面修饰氨基聚乙二醇，再与交联剂、鲁米诺反应，得到带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒。

[0020] 具体的，上述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体的制备方法，为以下步骤

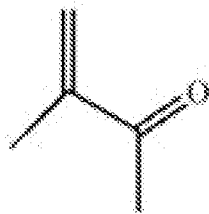
。醇；优选的：按照纳米颗粒：甲氧基聚乙二醇硫醇：氨基聚乙二醇硫醇=1~2：20：20的质量比，向纳米颗粒原液中加入甲氧基聚乙二醇硫醇和氨基聚乙二醇硫醇，于室温搅拌12~48小时，经超滤离心、加水重悬，得到经PEG修饰的氨基功能化纳米颗粒的母液。

[0021] 2) 在PEG末端氨基上修饰交联剂四噻唑；优选的：按照交联剂四噻唑：碳二胺：N-羟基琥珀酰亚胺=1：2~15：2~15的质量比加入DMSO 中，再加入步骤1) 获得的经PEG修饰的氨基功能化纳米颗粒的母液，于室温搅拌2~5小时，经超滤离心，得到带有交联剂的纳米颗粒；交联剂四噻唑如下：



。

[0022] 3) 在PEG末端氨基上修饰交联剂甲基丙烯酸；优选的：按照交联剂甲基丙烯酸：碳二胺：N-羟基琥珀酰亚胺=1：2~15：2~15的质量比加入乙醇中，再加入步骤1) 获得的经PEG修饰的氨基功能化纳米颗粒的母液，于室温搅拌2~5小时，经超滤离心，得到带有交联剂甲基丙烯酸的纳米颗粒；交联剂甲基丙烯酸如下：



。

[0023] 4) 在带有交联剂甲基丙烯酸的纳米颗粒表面搭载鲁米诺；优选的：按照带有交联剂甲基丙烯酸的纳米颗粒：鲁米诺= 1：2~15的质量比，将带有交联剂甲基丙烯酸的纳米颗粒加入鲁米诺溶液中，于室温搅拌2~36小时，经超滤离心，得到带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒。

[0024] 5) 化学发光介导的纳米颗粒自组装得到化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体；优选的：将步骤2) 制备的带有交联剂的纳米颗粒、步骤4) 制备的带有交

联剂、鲁米诺的纳米颗粒在过氧化氢、铁离子存在下，交联自组装得到化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体；带有交联剂的纳米颗粒与带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒的重量比为1：（0.8~1.2），优选为1：1。

[0025] 作为一个实施例，将步骤2)制备的带有交联剂的纳米颗粒、步骤4)制备的带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒分别加水重悬，然后将两种溶液（纳米颗粒等重量比）加入含有 H_2O_2 、 Fe^{3+} 的 H_2O 溶液中，反应15~90 min，得到纳米颗粒自组装聚集体。

[0026] 现有技术中的纳米颗粒大都适用于本发明的制备方法，能够最终实现化学发光介导的纳米颗粒自组装。优选的，在上述制备方法中，步骤（1）中所述纳米颗粒选自金属纳米颗粒、无机非金属纳米颗粒、有机纳米颗粒、无机-有机杂化纳米颗粒中的任意一种或其任意比例的混合物，更优选的，所述金属纳米颗粒为金纳米颗粒，所述无机非金属纳米颗粒为四氧化三铁纳米颗粒，所述有机纳米颗粒为聚多巴胺纳米颗粒。

[0027] 优选的，在上述制备方法中，步骤（1）中所述甲氧基聚乙二醇硫醇为两个末端分别由甲氧基和巯基修饰的聚乙二醇，其选自M-PEG₂₀₀₀-SH、M-PEG₅₀₀₀-SH、M-PEG₁₀₀₀₀-SH、M-PEG₂₀₀₀₀-SH中的任意一种或其任意比例的混合物；更优选的，所述甲氧基聚乙二醇硫醇为M-PEG₅₀₀₀-SH。

[0028] 优选的，在上述制备方法中，步骤（1）中所述氨基聚乙二醇硫醇为两个末端分别由氨基和巯基修饰的聚乙二醇，其选自NH₂-PEG₂₀₀₀-SH、NH₂-PEG₅₀₀₀-SH、NH₂-PEG₁₀₀₀₀-SH、NH₂-PEG₂₀₀₀₀-SH中的任意一种或其任意比例的混合物；更优选的，所述氨基聚乙二醇硫醇为NH₂-PEG₅₀₀₀-SH。

[0029] 本发明公开了上述化学发光介导的纳米颗粒或者化学发光介导的纳米颗粒体系在无外源光照下制备纳米颗粒自组装聚集体中的应用；上述化学发光介导的纳米颗粒或者化学发光介导的纳米颗粒体系或者化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体在制备纳米药物中的应用。纳米药物为治疗肿瘤的药物，优选为光热治疗药物。

发明的有益效果

有益效果

[0030] 由于上述技术方案的运用，本发明与现有技术相比具有如下优点。

[0031] (1) 本发明中首次使用了体积较小的光敏感交联剂四噻唑和甲基丙烯酸，成功避免了由于交联剂体积过大而导致的纳米颗粒沉淀。

[0032] (2) 通过设计交联剂的用量与反应时间，可有效调控纳米颗粒的自组装程度，从而实现纳米材料的可控自组装。

[0033] (3) 利用化学发光源照射实现相同或不同种类纳米颗粒的自组装，大大扩展了自组装技术的适用范围。

[0034] (4) 首次使用发光的鲁米诺来诱导紫外敏感性交联剂在体内或体外交联，从而使得金纳米颗粒可以有效的聚集，从而进一步增强肿瘤光声成像和肿瘤光热治疗的敏感性。

[0035] (5) 本发明的自组装方法具有简便、快捷、稳定、可控和绿色环保等特点，极大地节约了制备时间，是一种快速制备多功能纳米材料的普适性新方法，具有广阔的应用空间。

对附图的简要说明

附图说明

[0036] 图1为实施例3中带有交联剂的纳米颗粒 1修饰过程的示意图。

[0037] 图2为实施例4中交联剂甲基丙烯酸修饰的金纳米颗粒 2修饰过程的示意图。

[0038] 图3为实施例5中搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒3修饰过程的示意图。

[0039] 图4为不同修饰的金纳米粒TEM图。

[0040] 图5为实施例6中搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 3的化学发光成像的材料表征图。

[0041] 图6为实施例7中化学发光介导的纳米颗粒自组装过程的示意图。

[0042] 图7为实施例8中金纳米颗粒经紫外光照射诱导自组装前后TEM图像及交联前后的紫外吸收和粒径变化情况。

[0043] 图8为实施例9中金纳米颗粒经化学发光源诱导交联前后的光热性能研究。

[0044] 图9为实施例10中金纳米颗粒经化学发光源诱导自组装前后对细胞的毒性和光热治疗效果研究。

- [0045] 图10为对照组实施例3中带有交联剂的纳米颗粒1 (tAu) 和实施例4中交联剂甲基丙烯酸修饰的金纳米颗粒2 (mAu) 反应交联 (未交联)。
- [0046] 图11为单独的金纳米颗粒1 (tAu) 或者单独的金纳米颗粒2 (mAu) 在鲁米诺化学发光条件下不会发生聚集。
- [0047] 图12为直接照射溶液 (未经遮挡) 和透过1.5mL离心管壁间接照射 (遮挡) (tAu+mAu)。

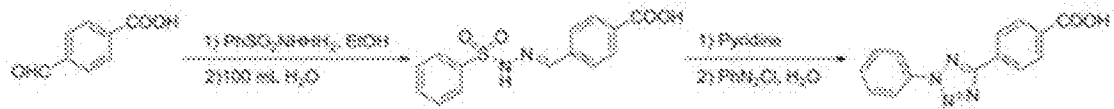
发明实施例

本发明的实施方式

- [0048] 本发明制备的带有交联剂的纳米颗粒、制备的带有交联剂/鲁米诺的纳米颗粒组成化学发光介导的纳米颗粒, 在无需外源光照条件下, 可以自组装得到聚集体。具体而言, 本发明提供了一种化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体的制备方法, 在没有外部激发的情况下将自发光在这种方式下应用于光敏剂的交联, 具有易于修饰、可控等优点, 为纳米颗粒自组装技术中的一种优异方法。
- [0049] 下文将结合附图和具体实施例来进一步阐述本发明。应当理解的是, 这些实施例仅用于解释和说明本发明中的技术方案, 而并非旨在限制本发明的范围。此外, 除非另有说明, 下列实施例中所使用的材料、试剂、仪器等均可通过商业手段获得; 除非另有说明, 实施例涉及的具体方法都为本领域常规方法。
- [0050] $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 阿拉丁上海试剂有限公司。
- [0051] 柠檬酸三钠 $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 国药集团化学试剂有限公司。
- [0052] 巯基-聚乙二醇-甲氧基 (SH-PEG₅₀₀₀-M) 北京键凯科技有限公司。
- [0053] 巯基-聚乙二醇-氨基 (SH-PEG₅₀₀₀-NH₂) 北京键凯科技有限公司。
- [0054] 浓盐酸 国药集团化学试剂有限公司。
- [0055] 4-甲酰基苯甲酸 百灵威科技有限公司。
- [0056] 苯磺酰肼 百灵威科技有限公司。
- [0057] 苯胺 百灵威科技有限公司。
- [0058] 吡啶 国药集团化学试剂有限公司。
- [0059] 亚硝酸钠 国药集团化学试剂有限公司。
- [0060] 二甲基亚砷 国药集团化学试剂有限公司。

- [0061] 乙醇 上海凌峰化学试剂有限公司。
- [0062] 乙酸乙酯 上海凌峰化学试剂有限公司。
- [0063] 石油醚 上海凌峰化学试剂有限公司。
- [0064] N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 阿拉丁上海试剂有限公司。
- [0065] 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 阿拉丁上海试剂有限公司。
- [0066] 30% H_2O_2 国药集团化学试剂有限公司。
- [0067] 铁氰化钾 国药集团化学试剂有限公司。
- [0068] 鲁米诺 阿拉丁上海试剂有限公司。
- [0069] ME204 电子分析天平 梅特勒-托利多上海有限公司。
- [0070] KQ-100KD 超声清洗仪 昆山市超声仪器有限公司。
- [0071] Direct Q5 超纯水系统 美国 Merk Millipore 公司。
- [0072] Agilent 1260 高效液相色谱仪 美国安捷伦公司。
- [0073] Alpha-4LSCplus RC6 冷冻干燥机 美国阿尔法公司。
- [0074] Tecnai G2 spirit BioTwin 透射电子显微镜 美国 FEI 公司。
- [0075] Lambda 750 UV-vis-NIR 紫外光谱仪 美国 PerkinElmer 公司。
- [0076] Nano ZS90 DLS 纳米粒度仪 英国马尔文有限公司。
- [0077] WFH-204B 手提式紫外分析仪 杭州奇威仪器有限公司。
- [0078] Hei-VAP Precision ML/G3 旋转蒸发仪 德国 Heidolph 公司。
- [0079] D-405nm-HS-1W-15031117 激光器 长春新产业光电技术有限公司。
- [0080] MDL-N-808 nm-10W 激光器 长春新产业光电技术有限公司。
- [0081] Ax5 Series 热成像仪 美国FLIR公司。
- [0082] 实施例1：交联剂四噻唑的合成与表征。

[0083]



[0084] (1) 向盛有4-甲酰基苯甲酸 (1.50 g, 10 mmol) 的圆底烧瓶中加入65 mL的乙醇溶液, 随后加入苯磺酰肼于室温搅拌30 min。反应结束后, 用100 mL 超纯水沉淀产物, 随后抽滤干燥, 可得腙加和产物2.7 g, 收率2.7 g (88.8%)。称取1.2 g腙加和产物溶于1.5 mL吡啶溶液中, 制成溶液A。

[0085] (2) 向苯胺 (0.46 mL, 5 mmol) 中滴加 NaNO_2 (0.17 g, 5 mmol) 溶液 (15 mL), 制成溶液B。

[0086] (3) 将溶液B加入溶液A中, 于0℃搅拌6 h, 待反应结束后, 低压旋蒸蒸发掉溶剂, 加入100 mL水沉淀产物, 再抽滤、干燥, 得到4-(2-苯基-2H-四唑-5-基) 苯甲酸的粗产物, 经硅胶柱层析 (乙酸乙酯: 石油醚=2: 1) 提纯后, 得到0.524 g目标产物交联剂四噻唑, 产率为70%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 8.34-8.28 (m, 2H), 8.22-8.14 (m, 4H), 7.72 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 7.65 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H)。

[0087] 实施例2: 金纳米颗粒的制备及其表面的PEG修饰: 向超纯水 (100 mL) 中加入1wt%的氯金酸溶液 (0.6 mL), 加热至沸腾后加入1wt%的柠檬酸钠溶液 (3 mL), 待体系变成酒红色后, 继续煮沸30 min, 得到金纳米颗粒原液。

[0088] 待冷却后, 向其中依次加入M-PEG₅₀₀₀-SH (20 mg) 和 NH_2 -PEG₅₀₀₀-SH (20 mg), 于室温搅拌24 h。经超滤离心 (5000 rpm $\times$ 10 min) 3次, 用超纯水重悬, 得到PEG修饰的氨基功能化金纳米颗粒母液3mL, 浓度为3.8mg/mL。

[0089] 实施例3: 金纳米颗粒表面PEG末端修饰交联剂四噻唑: 将交联剂四噻唑: 碳二胺: N-羟基琥珀酰亚胺=1: 10: 10的质量比加入1.4mL 二甲基亚砜中, 室温活化20分钟, 得到活化好的交联剂溶液。

[0090] 如图1所示, 取1mL实施例2中制得的经PEG修饰的氨基功能化金纳米颗粒母液, 向其中加入上述活化好的交联剂溶液 (含10.5 mg 的交联剂), 于室温搅拌反应3h。经超滤离心 (5000 rpm $\times$ 10 min) 3次后, 得到带有交联剂的金纳米颗

粒1, 为tAu, 制得母液, 为4mg/mL。

[0091] 实施例4: 金纳米颗粒表面PEG末端修饰交联剂甲基丙烯酸: 将交联剂甲基丙烯酸: 碳二胺: N-羟基琥珀酰亚胺=1: 10: 10的质量比加入1. 4mL 乙醇中, 室温活化20分钟, 得到活化好的交联剂溶液。

[0092] 如图2所示, 取1mL实施例2中制得的经PEG修饰的氨基功能化金纳米颗粒母液, 向其中加入上述活化好的交联剂溶液(含2 mL甲基丙烯酸), 室温搅拌反应3 h。经超滤离心(5000 rpm × 10 min) 3次后, 得到经交联剂甲基丙烯酸修饰的金纳米颗粒2, 为mAu, 制得母液, 4mg/mL。

[0093] 实施例5: 搭载化学发光鲁米诺: 如图3所示, 将实施例4中得到的金纳米颗粒2 (mAu) 母液与鲁米诺水溶液(1 mg 金纳米颗粒对应10 mg 鲁米诺) 混合, 振荡20 h后, 经超滤离心(5000 rpm × 10 min) 3次后, 得到搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 3, 为mAu/Lu, 制得母液, 4mg/mL。

[0094] 图4为不同修饰的金纳米粒TEM图。其中, a为PEG修饰的氨基功能化金纳米颗粒的电镜图, b为实施例3中得到的带有交联剂的金纳米颗粒1 (tAu) 的电镜图, c为实施例4中得到的带有交联剂的金纳米颗粒2 (mAu) 的电镜图, d为实施例5中得到的搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒3 (mAu/Lu) 的电镜图, 可以看出这四种金纳米颗粒的尺寸分布较为均匀(约为20 nm), 本发明的颗粒在溶液中的分散性较好, 不会聚集, 也不会因为表面修饰交联剂体积过大而导致纳米颗粒沉淀聚集。

[0095] 实施例6: 搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 3 的发光强度及信号: 将实施例5中制得的搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 3用超纯水重悬, 同时准备含有200mM H_2O_2 、100mM Fe^{3+}

(铁氰化钾)的1mL水溶液, 向其中加入搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 3, 静置0~90 min, 期间没有外界激发光源。测试经交联剂甲基丙烯酸修饰的金纳米颗粒2、搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 3、鲁米诺的发光强度; 如图5a所示, 为屏蔽激发光源后接收到的荧光强度值, 搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 (mAu/Lu) 与单纯鲁

米诺 (Lu) 荧光信号重合。说明体外 H_2O_2 和 Fe^{3+} 的环境中可以使鲁米诺发出波长在 450 nm 左右的光；如图 5b、5c 所示，随着静置时间的延长，金纳米颗粒 3 的发光强度逐渐减弱。

[0096] 实施例 7：化学发光源介导的金纳米颗粒自组装：如图 6 所示，取等量的实施例 3 中制得的金纳米颗粒 1 (tAu) 和实施例 5 中制得的金纳米颗粒 3 (mAu/Lu)，其中金纳米颗粒 1、金纳米颗粒 3 重量一致，均为 50 μ g。加入含 200 mM H_2O_2 和 100 mM Fe^{3+} 的水溶液中，总体积为 1 mL，交联反应时间 45 min，得到紫外光介导的纳米颗粒自组装聚集体。

[0097] 实施例 8：金纳米颗粒自组装前后的粒径分布和紫外吸收的变化：取等量的实施例 3 中制得的金纳米颗粒 1 (tAu) 和实施例 5 中制得的金纳米颗粒 3 (mAu/Lu)，其中金纳米颗粒 1、金纳米颗粒 3 重量一致，均为 50 μ g。加入含 200 mM H_2O_2 和 100 mM Fe^{3+} 的水溶液中，总体积为 1 mL，交联反应时间 45 min，得到紫外光介导的纳米颗粒自组装聚集体。测试其 TEM、粒径分布 (DLS) 和紫外吸收情况，取样时间为 0 min、15 min、30 min。如图 7a~7c 所示，鲁米诺发光前的金纳米颗粒 (金纳米颗粒反应母液) 水合粒径约为 50 nm，其电镜 (TEM) 为分散的，大小均一的 20 nm 左右的圆形颗粒 (图 7a)，发光产生化学反应后 15 min 的金纳米颗粒开始逐渐聚集，水合粒径最大可以为 280 nm 左右，其电镜如图 7b，呈逐渐聚集状态，而 30 min 后的水合粒径最大约为 400 nm 左右，其电镜成团聚集，可以聚集成很大的颗粒 (图 7c)。此外，纳米颗粒的聚集程度随反应时间的延长而增强 (见图 7d)。图 7e 是金纳米颗粒光介导聚集后的紫外吸收变化，鲁米诺发光前的金纳米颗粒紫外吸收最大在 523 nm 左右，鲁米诺发光产生化学发光后 15 min 的最大紫外吸收在 523 nm 之后发生了抬起，而 30 min 后除了在 530 nm 左右有一个吸收峰以外，最大紫外吸收右移到了 700 nm–800 nm 之间。

[0098] 实施例 9：金纳米颗粒光介导自组装后光热特性研究：取 4 mL 含 200 mM H_2O_2 、100 mM Fe^{3+} 、200 μ g/mL tAu 和 200 μ g/mL mAu/Lu 水溶液，分 4 管，每管 1 mL，分别静置交联反应 0 min、15 min、30 min、45 min，得到紫外光介导的纳米颗粒自组装聚集体，测其光热特性。如图 8a 所示，横坐标为照射时间，

金纳米颗粒自组装聚集体经近红外激光照射（808 nm，1 W/cm²），照射时间越长，温度升高越大。如图8b所示，横坐标为静置交联反应时间，随着交联反应时间的延长，在45 min时，光热升温效果最明显，温度可升高28.6℃。交联反应时间在60min时，光热升温效果与45min差不多。

[0099] 取等量实施例3中制得的金纳米颗粒 1（tAu）和实施例5中制得的金纳米颗粒 3（mAu/Lu），其中金纳米颗粒 1、金纳米颗粒 3重量一致。加入含200 mM H₂O₂和100 mM Fe³⁺

的水溶液中，总体积为1mL，其中金纳米颗粒总浓度分别为0，50，100，200，400和600 μg/mL，在反应45min后，经808 nm近红外激光照射（10 min）后，如图8c所示，横坐标为照射时间，随着金纳米颗粒浓度的增大，温度升高越大。如图8d所示，浓度为600 μg/mL是升温效果最为明显，温度升高约40℃。均表明金纳米颗粒光介导聚集后具有较好的光热效应。

[0100] 同样的方法测试了实施例2、3、4、5的材料（400 μg/mL），照射600s后，升温全部低于10℃，具体的，tAu升温8.58929℃、mAu升温9.21509℃、tAu+mAu（等量混合）升温9.45201℃。

[0101] 将实施例4中得到的金纳米颗粒2（mAu）母液与鲁米诺水溶液（1 mg 金纳米颗粒对应12mg 鲁米诺）混合，振荡20 h后，经超滤离心（5000 rpm × 10 min）3次后，得到搭载化学发光源鲁米诺与光敏感交联剂的金纳米颗粒 3-1（mAu/Lu-1）母液。取1mL含200 mM H₂O₂、100 mM Fe³⁺、200 μg/mL tAu 和 200 μg/mL mAu/Lu-1 水溶液置入一个反应管，静置交联反应45 min，经近红外激光照射（808 nm，1 W/cm²）600s后，温度可升高24.7℃。

[0102] 取1mL含200 mM H₂O₂、100 mM Fe³⁺、180 μg/mL tAu 和 220 μg/mL mAu/Lu水溶液置入一个反应管，静置交联反应45 min，经近红外激光照射（808 nm，1 W/cm²）600s后，温度可升高22.1℃。

[0103] 取1mL含200 mM H₂O₂、100 mM Fe³⁺、250 μg/mL tAu 和 150 μg/mL mAu/Lu水溶液置入一个反应管，静置交联反应45 min，经近红外激光照射（808 nm，1 W/cm²）600s后，温度可升高20.3℃。

[0104] 实施例10：金纳米颗粒化学发光光介导自组装后的细胞毒性及光热治疗效果：

细胞毒性实验方法：小鼠乳腺癌细胞（4T1）在96孔板中（密度8000个/孔）培养，孵育24 h后，分别向各个孔中加入0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的实施例3、4、5的材料孵育24h后，测MTT。从图9a中可以看出，不同浓度经PEG修饰的氨基功能化金纳米颗粒对小鼠乳腺癌细胞（4T1）在24 h具有很低的毒性。

[0105] 细胞内光热治疗实验方法：小鼠乳腺癌细胞（4T1）在96孔板中（密度8000个/孔）培养，孵育24 h后，分为六组（PBS组，PBS+NIR组，tAu+mAu组，tAu+mAu+NIR组，tAu+mAu/Lu组，tAu+mAu/Lu+NIR组），PBS指只有细胞不加任何材料处理；tAu指加入实施例3中制得的金纳米颗粒 1；mAu指加入实施例4中制得的金纳米颗粒 2，mAu/Lu指加入实施例5中制得的金纳米颗粒 3；NIR指808 nm的近红外光照射（1 W/cm²，10 min）；细胞生长24 h后测MTT；全部没有外源紫外光照，含有金纳米粒子的组别中，金纳米粒子总量为50 $\mu\text{g/mL/孔}$ 。如图9b所示，tAu+mAu/Lu+NIR组细胞存活率较其他组别明显下降，说明本发明的方法能够在细胞内原位实现金纳米颗粒的自组装，并具有较好的光热治疗效果，能够有效杀死肿瘤细胞。

[0106] 细胞内光热治疗实验方法（live&dead）：小鼠乳腺癌细胞（4T1）在6孔板中培养，分为6组（PBS组，PBS+NIR组，tAu+mAu组，tAu+mAu+NIR组，tAu+mAu/Lu组，tAu+mAu/Lu+NIR组），PBS指只有细胞不加任何材料处理；tAu指加入实施例3中制得的金纳米颗粒 1；mAu指加入实施例4中制得的金纳米颗粒 2，mAu/Lu指加入实施例5中制得的金纳米颗粒 3，含有金纳米粒子的组别中，金纳米粒子总量为50 $\mu\text{g/mL/孔}$ ；NIR指808 nm的近红外光照射（1 W/cm²，10 min）；NIR指808 nm的近红外光照射（1 W/cm²，10 min）；细胞生长24 h后用live&dead染色试剂盒染色30 min，荧光显微镜下10倍拍照；全部没有外源紫外光照。如图9c所示，金纳米颗粒在细胞内经紫外光照射会诱导自组装，经近红外光照射后，具有较好的光热治疗效果，能够有效杀死肿瘤细胞。

[0107] 取等量的实施例3中制得的金纳米颗粒 1（tAu）和实施例4中制得的金纳米颗粒 2（mAu），其中金纳米颗粒 1、金纳米颗粒 2重量一致，均为50 μg 。加入含200 mM H₂O₂和100 mM Fe³⁺的水溶液中，总体积为1mL，放置时间30 min，测试其透射电镜TEM，取样时间为0 min、15 min和30 min。如图10，金纳米颗

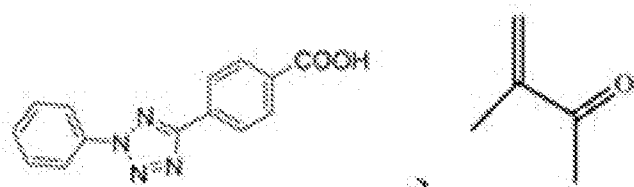
粒并未发生聚集，说明单纯的反应环境并不会使实施例3中2制得的金纳米颗粒1 (tAu) 和实施例4中制得的金纳米颗粒2 (mAu) 聚集。用粒径观察其聚集情况（放置时间30 min），如图11。

[0108] 分别取50 μ g的实施例3中制得的金纳米颗粒1 (tAu) 和50 μ g实施例4中制得的金纳米颗粒2 (mAu)，分别加入含200 mM H_2O_2 和100 mM Fe^{3+} 的水溶液中，各自再加入化学发光剂鲁米诺30 μ g，总体积为1mL，放置30 min，用粒径观察其聚集情况，如图11，都小于100nm，可以发现单独的金纳米颗粒1 (tAu) 或者单独的金纳米颗粒2 (mAu) 在鲁米诺化学发光条件下不会发生聚集，以PEG修饰的氨基功能化金纳米颗粒 (Au) 作对照。将50 μ g实施例5中制得的金纳米颗粒3 (mAu/Lu) 加入含200 mM H_2O_2 和100 mM Fe^{3+} 的水溶液中，总体积为1mL，放置30 min，用粒径观察也无聚集情况。

[0109] 取等量的实施例3中制得的金纳米颗粒 1 (tAu) 和实施例4中制得的金纳米颗粒 2 (mAu)，其中金纳米颗粒 1、金纳米颗粒 3重量一致，均为50 μ g，加入水溶液中，总体积为1mL；配置两份一样的体系，一份用405nm激光器0.5w/cm²照射不同时间，另一份用405nm激光器0.5w/cm²透过1.5mL离心管壁间接照射（遮挡）。如图12，其中a图为直接照射溶液（未经遮挡），b为透过1.5mL离心管壁间接照射（遮挡）。可以发现，未经遮挡的405nm激光器可使实施例3中带有交联剂的金纳米颗粒1 (tAu) 和实施例4中经交联剂甲基丙烯酸修饰的金纳米颗粒2 (mAu) 发生交联，如图a所示，15min即可形成较大的聚集体，30min时基本全部团聚；而遮挡后的b图的交联效率明显降低，不如实施例8中化学发光介导的金纳米颗粒聚集效果好，15分钟时的水合粒径95nm，30分钟时的水合粒径在200nm。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种化学发光介导的纳米颗粒，其特征在于，包括带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒与带有交联剂的纳米颗粒。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述化学发光介导的纳米颗粒，其特征在于，在纳米颗粒表面修饰氨基聚乙二醇，再与交联剂反应，得到带有交联剂的纳米颗粒；在纳米颗粒表面修饰氨基聚乙二醇，再与交联剂、鲁米诺反应，得到带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒。
- [权利要求 3] 一种化学发光介导的纳米颗粒体系，其特征在于，包括带有交联剂和鲁米诺的纳米颗粒、带有交联剂的纳米颗粒、氧化剂、铁离子、水。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述化学发光介导的纳米颗粒体系，其特征在于，所述氧化剂为过氧化氢。
- [权利要求 5] 一种化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体，其特征在于，所述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体由带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒与带有交联剂的纳米颗粒交联得到。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体，其特征在于，交联剂的化学结构式如下：



- [权利要求 7] 根据权利要求5所述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体，其特征在于，纳米颗粒为金属纳米颗粒、无机非金属纳米颗粒、有机纳米颗粒、无机-有机杂化纳米颗粒中的一种或几种。
- [权利要求 8] 权利要求5所述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：
- (1) 在纳米颗粒表面修饰交联剂，得到带有交联剂的纳米颗粒；
 - (2) 在纳米颗粒表面修饰交联剂与鲁米诺，得到带有交联剂、鲁米

诺的纳米颗粒；

(3) 将步骤(1)带有交联剂的纳米颗粒、步骤(2)带有交联剂、鲁米诺的纳米颗粒交联，得到化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体。

[权利要求 9] 根据权利要求8所述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体的制备方法，其特征在于，所述交联在氧化剂、铁离子存在下进行；所述交联无需外源光照。

[权利要求 10] 权利要求1所述化学发光介导的纳米颗粒或者权利要求3所述化学发光介导的纳米颗粒体系在无外源光照下制备纳米颗粒自组装聚集体中的应用；权利要求1所述化学发光介导的纳米颗粒或者权利要求3所述化学发光介导的纳米颗粒体系或者权利要求5所述化学发光介导的纳米颗粒自组装聚集体在制备纳米药物中的应用。

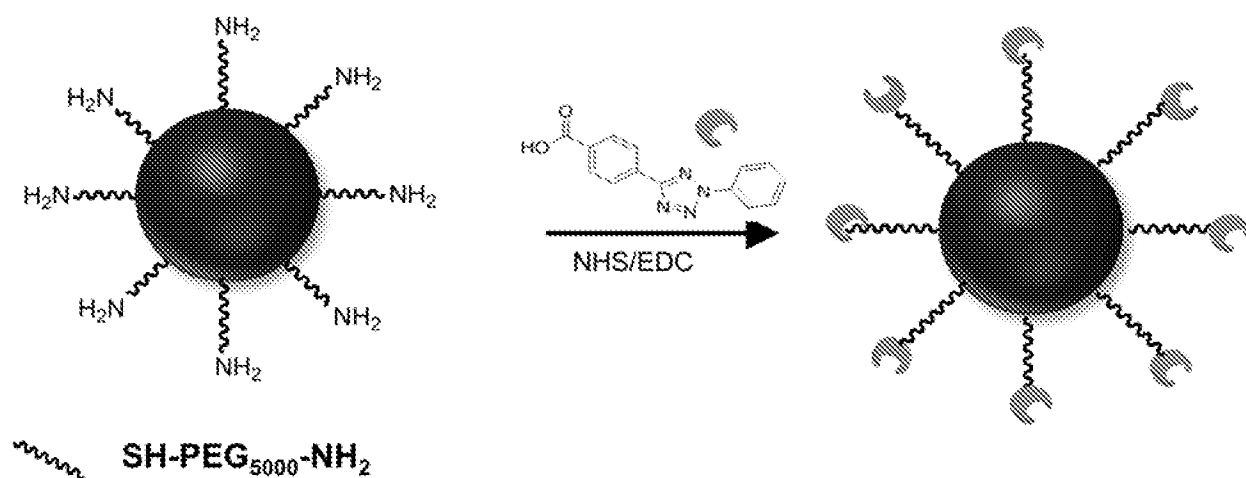


图 1

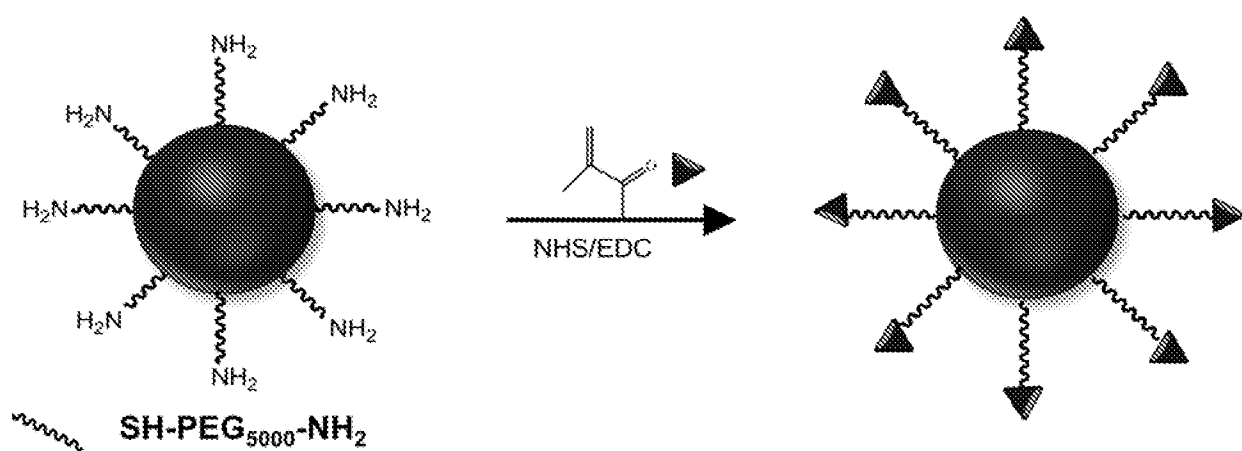


图 2

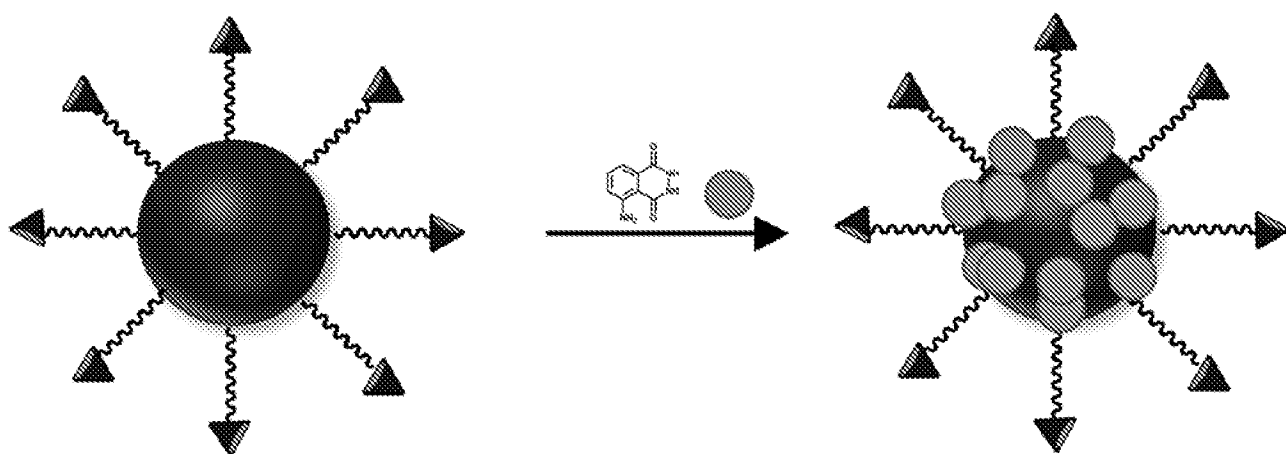


图 3

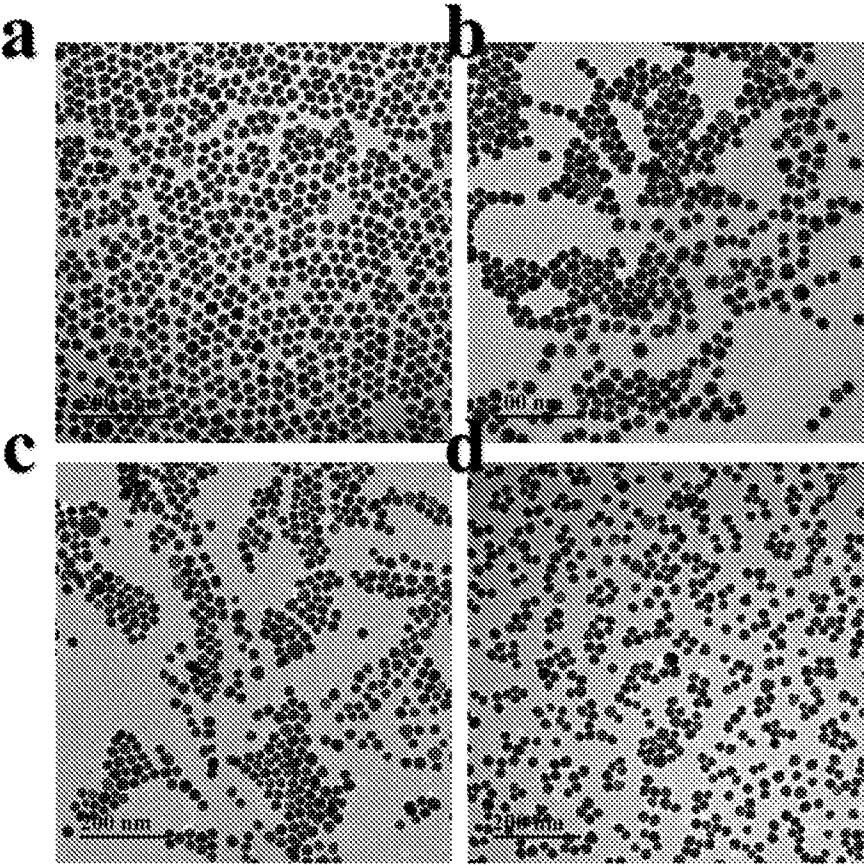


图 4

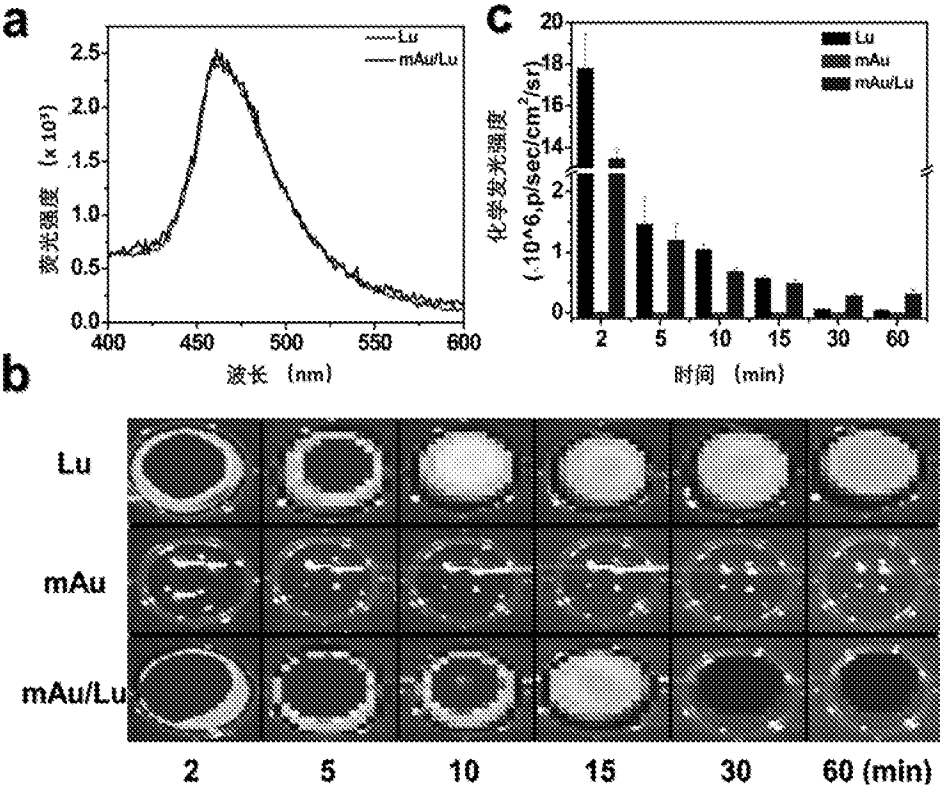


图 5

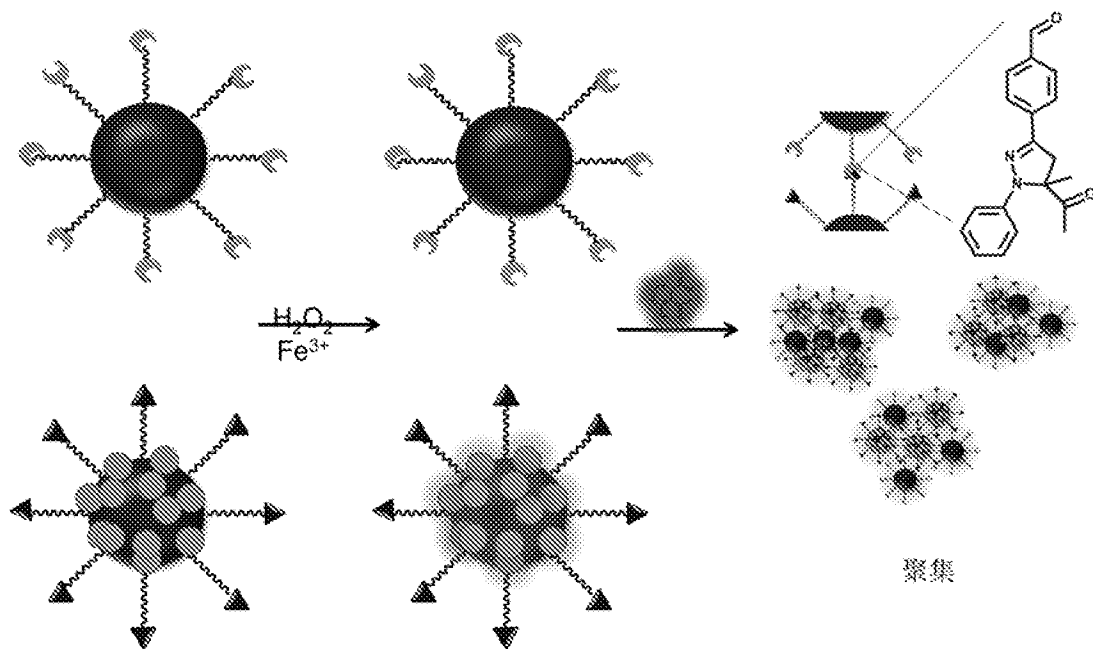


图 6

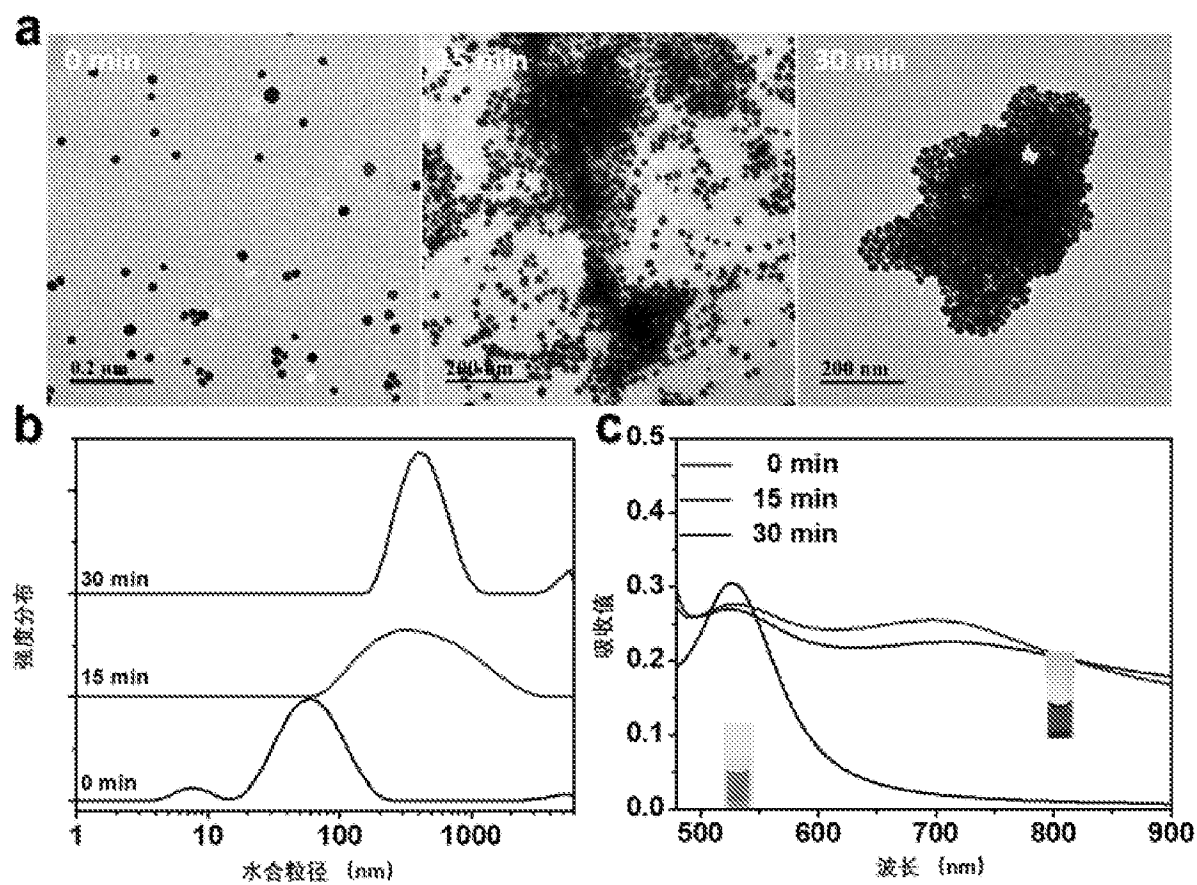


图 7

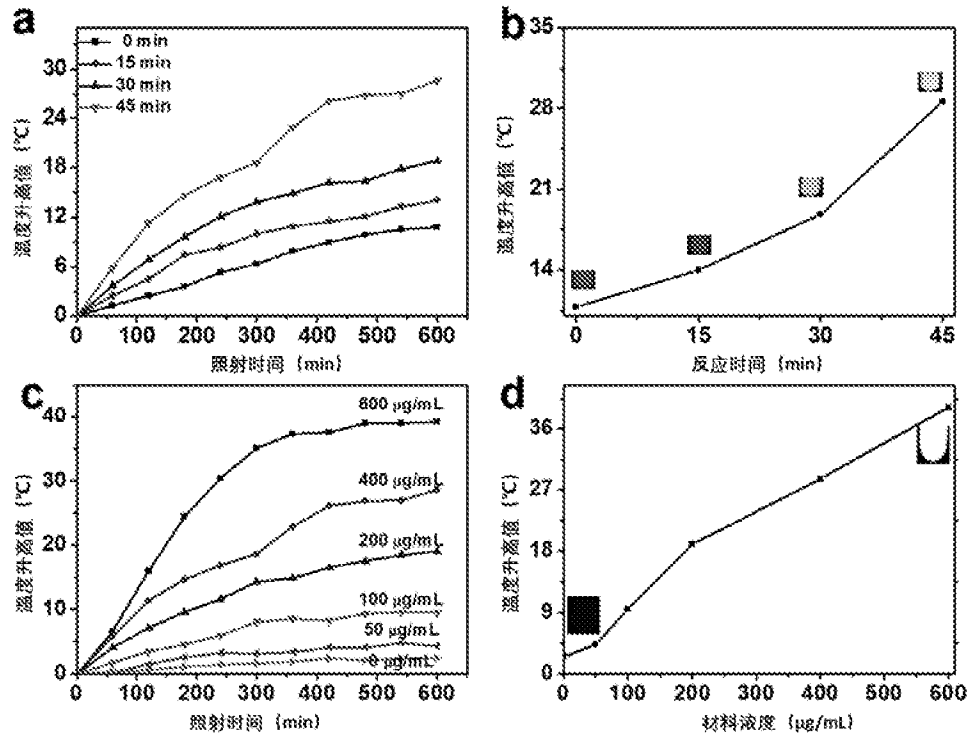


图 8

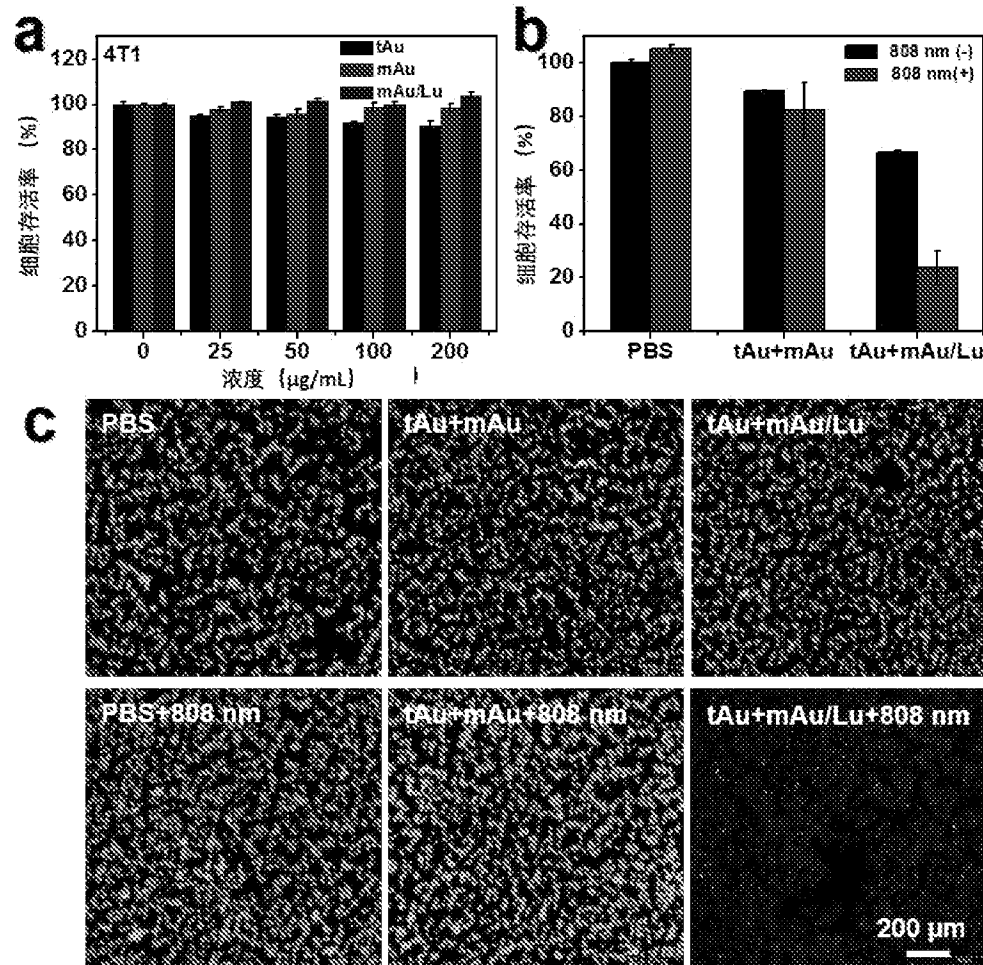


图 9

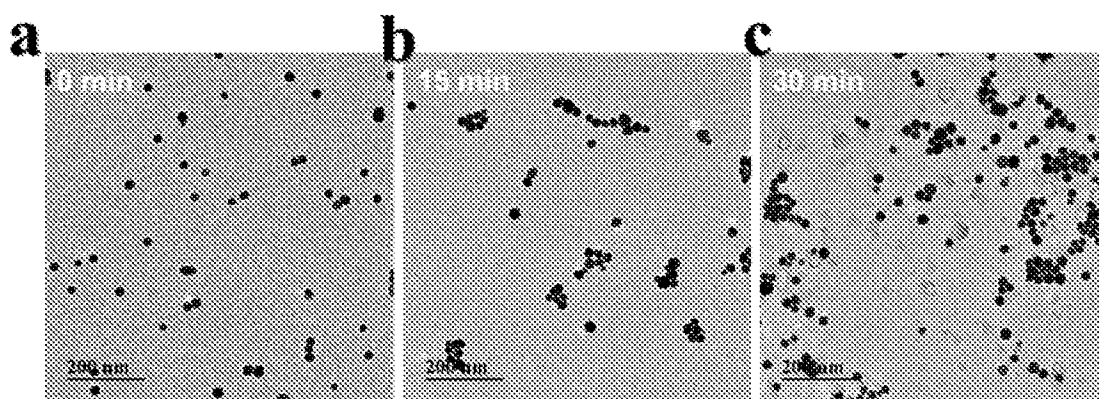


图 10

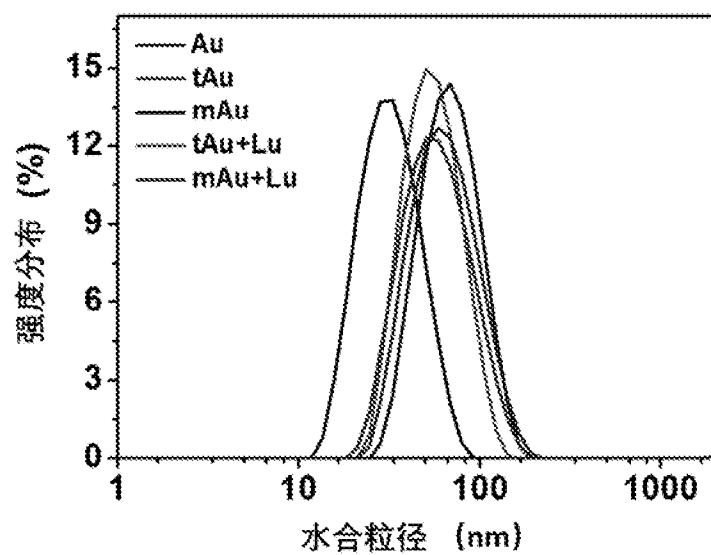


图 11

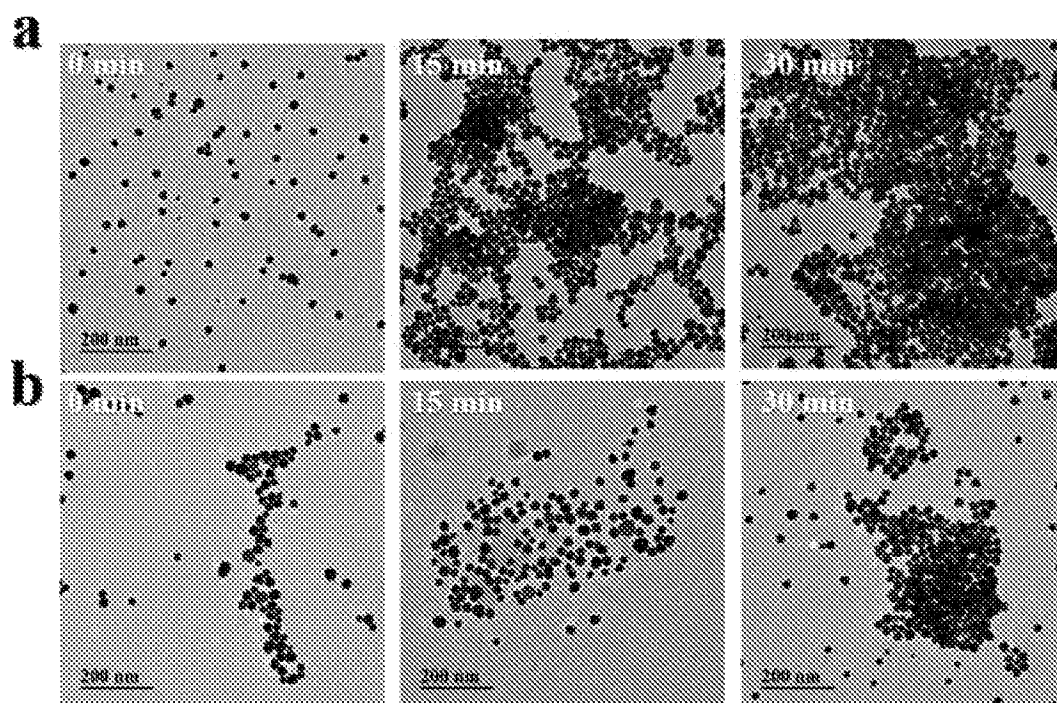


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/079615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/76(2006.01)i; G01N 33/531(2006.01)i; G01N 27/327(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)

G01N21/-; G01N33/-; G01N27/-

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)

WPI, EPODOC, CNPAT, 中国期刊网全文数据库, CHINA JOURNAL FULL-TEXT DATABASE: 鲁米诺, 交联, 纳米, 颗粒, 粒子, 发光, 聚乙二醇, 氨基, 氧化剂, 过氧化氢, 双氧水, 铁, 铁氰化, 四噻唑, 自组装, luminol, crosslink+, particle?, nano+, PEG, luminescence, ferricyanide, thiazole, hydrogen w peroxide, +amino, self w assembly

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106066324 A (UNIVERSITY OF JINAN) 02 November 2016 (2016-11-02) description, paragraphs 7-10 and embodiment 2	1-10
X	CN 105424921 A (SHANGHAI NORMAL UNIVERSITY) 23 March 2016 (2016-03-23) description, paragraphs 4-21	1, 3-9
A	CN 102520195 A (UNION MEDICAL & PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (TIANJIN), LTD.) 27 June 2012 (2012-06-27) entire document	1-10
A	EP 3338799 A1 (ALDER BIOPHARMACEUTICALS INC.) 27 June 2018 (2018-06-27) entire document	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

“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 October 2021

Date of mailing of the international search report

01 December 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/079615

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106066324	A	02 November 2016	CN	106066324	B	15 August 2017
CN	105424921	A	23 March 2016	CN	105424921	B	05 April 2017
CN	102520195	A	27 June 2012	CN	102520195	B	23 July 2014
EP	3338799	A1	27 June 2018	CN	103861106	A	18 June 2014
				EP	2361095	B1	20 December 2017
				AU	2009323009	A1	10 June 2010
				CN	102292107	A	21 December 2011
				JP	2015157855	A	03 September 2015
				JP	2012509871	A	26 April 2012
				BR	PI0921569	A2	24 September 2019
				EP	2367570	A4	31 July 2013
				AU	2009323002	B2	28 January 2016
				TW	201609139	A	16 March 2016
				HK	1256622	A1	27 September 2019
				WO	2010065072	A1	10 June 2010
				JP	2017048222	A	09 March 2017
				TW	201023890	A	01 July 2010
				KR	20110112308	A	12 October 2011
				KR	20110091780	A	12 August 2011
				EP	3338799	B1	07 April 2021
				EP	2367570	A2	28 September 2011
				MX	2019007500	A	04 September 2019
				JP	2012509873	A	26 April 2012
				CN	102438653	A	02 May 2012
				JP	6050430	B2	21 December 2016
				DK	3338799	T3	14 June 2021
				EP	2361096	A4	09 January 2013
				CN	102438653	B	23 April 2019
				JP	2015187132	A	29 October 2015
				JP	6050431	B2	21 December 2016
				EP	2376126	A4	24 July 2013
				EP	2361095	A4	24 July 2013
				TW	I498120	B	01 September 2015
				IL	212728	A	28 February 2018
				JP	2015164951	A	17 September 2015
				AU	2009323002	A1	10 June 2010
				MX	2019005415	A	12 August 2019
				JP	6035373	B2	30 November 2016
				AU	2016256810	A1	01 December 2016
				EP	2376126	A2	19 October 2011
				JP	5620918	B2	05 November 2014
				TW	I469793	B	21 January 2015
				AU	2009323007	B2	28 January 2016
				CA	2744400	C	15 January 2019
				CN	102292106	B	03 February 2016
				JP	5815098	B2	17 November 2015
				KR	20110112307	A	12 October 2011
				TW	201023888	A	01 July 2010
				KR	20110091781	A	12 August 2011
				NO	2367570	T3	19 May 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/079615

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 2361096 A1	31 August 2011
		EA 201100641 A1	30 January 2012
		EP 2361095 A1	31 August 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/079615

A. 主题的分类 G01N 21/76(2006.01)i; G01N 33/531(2006.01)i; G01N 27/327(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) G01N21/-; G01N33/-; G01N27/- 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)) WPI, EPDOC, CNPAT, 中国期刊网全文数据库: 鲁米诺, 交联, 纳米, 颗粒, 粒子, 发光, 聚乙二醇, 氨基, 氧化剂, 过氧化氢, 双氧水, 铁, 铁氰化, 四噻唑, 自组装, luminol, crosslink+, particle?, nano+, PEG, luminescence, ferricyanide, thiazole, hydrogen w peroxide, +amino, self w assembly																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 106066324 A (济南大学) 2016年 11月 2日 (2016 - 11 - 02) 说明书第7-10段和实施例2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105424921 A (上海师范大学) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 说明书第4-21段</td> <td>1, 3-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102520195 A (天津市协和医药科技集团有限公司) 2012年 6月 27日 (2012 - 06 - 27) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 3338799 A1 (奥尔德生物制药公司) 2018年 6月 27日 (2018 - 06 - 27) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 106066324 A (济南大学) 2016年 11月 2日 (2016 - 11 - 02) 说明书第7-10段和实施例2	1-10	X	CN 105424921 A (上海师范大学) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 说明书第4-21段	1, 3-9	A	CN 102520195 A (天津市协和医药科技集团有限公司) 2012年 6月 27日 (2012 - 06 - 27) 全文	1-10	A	EP 3338799 A1 (奥尔德生物制药公司) 2018年 6月 27日 (2018 - 06 - 27) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 106066324 A (济南大学) 2016年 11月 2日 (2016 - 11 - 02) 说明书第7-10段和实施例2	1-10															
X	CN 105424921 A (上海师范大学) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 说明书第4-21段	1, 3-9															
A	CN 102520195 A (天津市协和医药科技集团有限公司) 2012年 6月 27日 (2012 - 06 - 27) 全文	1-10															
A	EP 3338799 A1 (奥尔德生物制药公司) 2018年 6月 27日 (2018 - 06 - 27) 全文	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 “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 2021年 10月 18日		国际检索报告邮寄日期 2021年 12月 1日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 孙捷 电话号码 86-(10)-53962296															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/079615

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	106066324	A	2016年 11月 2日	CN	106066324	B	2017年 8月 15日
CN	105424921	A	2016年 3月 23日	CN	105424921	B	2017年 4月 5日
CN	102520195	A	2012年 6月 27日	CN	102520195	B	2014年 7月 23日
EP	3338799	A1	2018年 6月 27日	CN	103861106	A	2014年 6月 18日
				EP	2361095	B1	2017年 12月 20日
				AU	2009323009	A1	2010年 6月 10日
				CN	102292107	A	2011年 12月 21日
				JP	2015157855	A	2015年 9月 3日
				JP	2012509871	A	2012年 4月 26日
				BR	PI0921569	A2	2019年 9月 24日
				EP	2367570	A4	2013年 7月 31日
				AU	2009323002	B2	2016年 1月 28日
				TW	201609139	A	2016年 3月 16日
				HK	1256622	A1	2019年 9月 27日
				WO	2010065072	A1	2010年 6月 10日
				JP	2017048222	A	2017年 3月 9日
				TW	201023890	A	2010年 7月 1日
				KR	20110112308	A	2011年 10月 12日
				KR	20110091780	A	2011年 8月 12日
				EP	3338799	B1	2021年 4月 7日
				EP	2367570	A2	2011年 9月 28日
				MX	2019007500	A	2019年 9月 4日
				JP	2012509873	A	2012年 4月 26日
				CN	102438653	A	2012年 5月 2日
				JP	6050430	B2	2016年 12月 21日
				DK	3338799	T3	2021年 6月 14日
				EP	2361096	A4	2013年 1月 9日
				CN	102438653	B	2019年 4月 23日
				JP	2015187132	A	2015年 10月 29日
				JP	6050431	B2	2016年 12月 21日
				EP	2376126	A4	2013年 7月 24日
				EP	2361095	A4	2013年 7月 24日
				TW	I498120	B	2015年 9月 1日
				IL	212728	A	2018年 2月 28日
				JP	2015164951	A	2015年 9月 17日
				AU	2009323002	A1	2010年 6月 10日
				MX	2019005415	A	2019年 8月 12日
				JP	6035373	B2	2016年 11月 30日
				AU	2016256810	A1	2016年 12月 1日
				EP	2376126	A2	2011年 10月 19日
				JP	5620918	B2	2014年 11月 5日
				TW	I469793	B	2015年 1月 21日
				AU	2009323007	B2	2016年 1月 28日
				CA	2744400	C	2019年 1月 15日
				CN	102292106	B	2016年 2月 3日
				JP	5815098	B2	2015年 11月 17日
				KR	20110112307	A	2011年 10月 12日
				TW	201023888	A	2010年 7月 1日
				KR	20110091781	A	2011年 8月 12日
				NO	2367570	T3	2018年 5月 19日

国际申请号
PCT/CN2021/079615

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)
		EP 2361096 A1	2011年 8月 31日
		EA 201100641 A1	2012年 1月 30日
		EP 2361095 A1	2011年 8月 31日