

(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 10 日 (10.10.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/207802 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/139394
- (22) 国际申请日: 2023 年 12 月 18 日 (18.12.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310346589.X 2023年4月3日 (03.04.2023) CN
- (71) 申请人: 天津大学 (TIANJIN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。
- (72) 发明人: 李晓红 (LI, Xiaohong); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。 陈力群 (CHEN, Liqun); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。 郭迪 (GUO, Di); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。 樊秀 (FAN,

Xiu); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。 常哲瀚 (CHANG, Zhehan); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。 史建新 (SHI, Jianxin); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。 胡楠 (HU, Nan); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300070 (CN)。

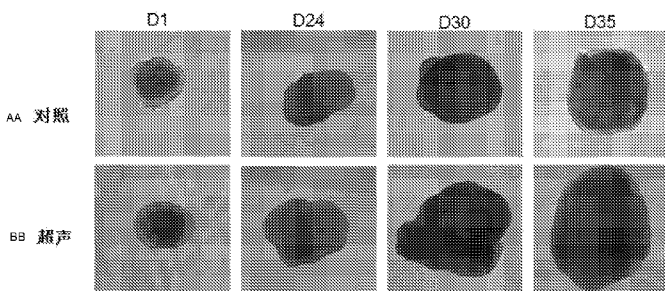
(74) 代理人: 北京知艺互联知识产权代理有限公司等 (BEIJING ZHIYI INTERNET INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD et al.); 中国北京市东城区安定门外大街 138 号 4 层 A 座 407-176, Beijing 100010 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: THREE-DIMENSIONAL BRAIN ORGANOID CULTURE METHOD BASED ON LOW-INTENSITY ULTRASOUND STIMULATION

(54) 发明名称: 一种基于低强度超声刺激的三维脑类器官的培养方法

[图2]



AA Control
BB Ultrasound

(57) Abstract: A three-dimensional brain organoid culture method based on low-intensity ultrasound stimulation. The method comprises: first, culturing a brain organoid; and then intervening the development of the brain organoid by means of low-intensity ultrasound. The optimization effect of the low-intensity ultrasound on the structure of the brain organoid throughout the development period is analyzed, and the effect of low-intensity ultrasound stimulation on the culture of a microcephaly brain organoid with knocked-out human abnormal spindle-like microcephaly-associated protein (ASPM) genes is studied. It is found for the first time that the low-intensity ultrasound stimulation can optimize brain organoid development, providing a reliable and effective in-vitro research model for the process of researching nervous system development, and providing a new way for researching the treatment for diseases related to neurodevelopment such as microcephaly.

(57) 摘要: 一种基于低强度超声刺激的三维脑类器官的培养方法, 该方法首先培养脑类器官, 然后通过低强度超声干预脑类器官的发育, 通过分析全发育周期低强度超声对脑类器官结构的优化作用, 并且研究了低强度超声刺激对人类异常纺锤体样小头畸形相关蛋白基因(ASPM)敲除的小头畸形脑类器官培养中的作用。首次发现低强度超声刺激优化了脑类器官发育, 可为研究神经系统发育过程提供可靠的、有效的体外研究模型, 并为研究小头畸形等神经发育相关疾病的治疗提供新途径。

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))。

说明书

发明名称: 一种基于低强度超声刺激的三维脑类器官的培养方法

背景技术

[0001] 神经系统发育经历神经诱导、图式形成、细胞命运决定及特化、神经细胞极性建立与迁移、神经环路形成等过程。深入开展神经发育的机制研究以指导预防及治疗这类重大神经发育缺陷疾病具有重要意义。小头畸形是胎儿期或婴儿期大脑发育异常导致的患儿头部明显变小的一种神经系统发育障碍性疾病。患者脑部发育不全，终身不能自理生活。目前，治疗手段有限，疗效不理想。

[0002] 脑类器官凭借细胞组成多样性高、结构组织复杂度高、电生理功能相对成熟、基因表达模式与人类相近等优点，是模拟婴儿脑发育过程的良好三维模型。ASPM是最常见的常染色体隐性小头畸形突变基因。当ASPM基因发生突变时，人脑尺寸将减少50%。而ASPM基因灭活仅能使小鼠的大脑萎缩10%，ASPM基因敲除小鼠在人类脑皮层发育的研究中只能提供十分有限的参考(Nature.2018; 556:370-375)。而研究表明，ASPM敲除的人源性脑类器官模型可较好地重现小头畸形的表型(Protein Cell.2017; 8(11):823-833)。

[0003] 然而，将低强度超声应用于三维脑类器官发育的相关研究还未见报道。

发明内容

[0004] 鉴于此，本发明的目的是提供一种基于低强度超声刺激的三维脑类器官的培养方法。

[0005] 本发明目的是通过以下方式实现：

[0006] 本发明提供一种基于低强度超声刺激的三维脑类器官的培养方法，包括以下步骤：

[0007] (1)构建三维脑类器官：将胚胎干细胞或诱导性多能干细胞进行培养，分化为三维脑类器官；

[0008] (2)低强度超声优化脑类器官发育：利用低强度超声在脑类器官发育过程中进行刺激干预，在不同时间点记录三维脑类器官的结构变化。

- [0009] 基于上述技术方案,进一步地,步骤(1)中构建三维脑类器官的具体过程为:将胚胎干细胞或诱导性多能干细胞的单细胞悬液接种在超低黏附U型底孔板中,加入神经诱导培养基培养,形成拟胚体,培养至8-12天,转移到低黏附孔板中,加入神经分化培养基后摇床旋转培养,培养第16-20天,更换为成熟培养基继续旋转培养。
- [0010] 基于上述技术方案,进一步地,所述的神经诱导培养基为DMEM/F-12培养基,培养基中含有15%血清替代物,1%含非必须氨基酸的最低必需培养基,1% L-谷氨酰胺的替代品,100微摩尔/升 β -巯基乙醇,100纳摩尔/升 4-[6-[4-(1-哌嗪基)苯基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基]-喹啉盐酸盐,10 μ M SB431542,2 μ M MXAV939。
- [0011] 基于上述技术方案,进一步地,所述的神经分化培养基为50% DMEM/F-12培养基,培养基中含有50% Neurobasal 培养基,0.025% 胰岛素,0.5% 含非必须氨基酸的最低必需培养基,1% L-谷氨酰胺的替代品,1% 青霉素/链霉素,0.5% N2 supplement,1% B-27无血清添加剂,去除维生素A,50微摩尔/升 β -巯基乙醇。
- [0012] 基于上述技术方案,进一步地,所述的成熟培养基为50% DMEM/F-12培养基,培养基中含有50% Neurobasal 培养基,0.025% 胰岛素,0.5% 含非必须氨基酸的最低必需培养基,1% L-谷氨酰胺的替代品,1% 青霉素/链霉素,0.5% N-2添加剂,1% B-27无血清添加剂,50微摩尔/升 β -巯基乙醇,200微摩尔/升 抗坏血酸,20纳克/毫升 脑源性神经营养因子。
- [0013] 基于上述技术方案,进一步地,步骤(2)中所述的低强度超声的参数为脉冲强度为30-50mW/cm²,额定频率为1-5MHz,5-15%占空比,每天处理1-5min。
- [0014] 基于上述技术方案,进一步地,步骤(2)中刺激干预开始时间点为脑类器官发育的第15-20天。
- [0015] 本发明还提供所述的低强度超声刺激在构建小头畸形脑类器官疾病模型中的应用。
- [0016] 基于上述技术方案,进一步地,所述的小头畸形脑类器官疾病模型中敲除了人类异常纺锤体样小头畸形相关蛋白基因(ASPM)。

[0017] 本发明相对于现有技术具有的有益效果如下：

[0018] 本发明首次发现低强度超声刺激优化了脑类器官发育，提供一种基于低强度超声刺激的三维脑类器官的培养方法，可为研究神经系统发育过程提供可靠的、有效的体外研究模型，并为研究小头畸形等神经发育相关疾病的治疗提供了新途径。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例，下面将对实施例涉及的附图进行简单地介绍。

[0020] 图1为低强度超声干预脑类器官发育方案的时间轴；

[0021] 图2为低强度超声刺激处理不同时间的脑类器官光镜对比图；

[0022] 图3为低强度超声刺激处理不同时间的脑类器官免疫荧光对比图，其中，(A)：超声组增殖细胞(ki67)和神经祖细胞(SOX2)比例明显上升；(B)：超声组皮质神经元(TBR1)比例明显上升；(C)：超声组凋亡细胞(TUNEL)比例明显下降。

[0023] 图4为低强度超声刺激处理的脑类器官移植入宿主初级感觉皮层不同时间点的整合图；

[0024] 图5为ASPM敲除脑类器官及超声处理后的ASPM脑类器官光镜图，其中，(A)：ASPM敲除组和对照组的脑类器官光镜对比图；(B)：ASPM敲除组、对照组和超声处理后的ASPM敲除组的脑类器官光镜对比图。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例对本发明进行详细的说明，但本发明的实施方式不限于此，显而易见地，下面描述中的实施例仅是本发明的部分实施例，对于本领域技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，获得其他的类似的实施例均落入本发明的保护范围。

[0026] 实施例1

[0027] 脑类器官构建：待H9人胚胎干细胞生长融合度高达80%时，使用accutase消化10min形成单细胞悬液，使用含50 μ M Y27632神经诱导培养基(DMEM/F-12，15%血清替代物，1% 含非必须氨基酸的最低必需培养基，1% L-谷氨酰胺的

替代品, 100微摩尔/升 β -巯基乙醇, 100纳摩尔/升 4-[6-[4-(1-哌嗪基)苯基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基]-喹啉盐酸盐, 10 μ M SB431542, 2微摩尔/升 3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-D]嘧啶-4-酮)重悬后, 以9000个细胞/孔, 每孔150 μ L的比例将细胞接种在超低黏附U型底96孔板中, 形成拟胚体。每2天使用不含Y27632的神经诱导培养基半量换液一次。培养第10天时, 使用5mL巴士吸管将其转移至低黏附6孔板中, 每孔6-8个拟胚体, 每孔3mL神经分化培养基(50% DMEM/F-12, 50% Neurobasal 培养基, 0.025% 胰岛素, 0.5% 含非必须氨基酸的最低必需培养基, 1% L-谷氨酰胺的替代品, 1% 青霉素/链霉素, 0.5% N-2添加剂, 1% B-27无血清添加剂, 去除维生素A, 50微摩尔/升 β -巯基乙醇), 80rpm摇床旋转培养, 每隔2天全量换液一次。培养第18天, 更换为成熟培养基(50% DMEM/F-12, 50% Neurobasal 培养基, 0.025% 胰岛素, 0.5% 含非必须氨基酸的最低必需培养基, 1% L-谷氨酰胺的替代品, 1% 青霉素/链霉素, 0.5% N-2添加剂, 1% B-27无血清添加剂, 50微摩尔/升 β -巯基乙醇, 200微摩尔/升 抗坏血酸, 20纳克/毫升 脑源性神经营养因子), 每隔3-4天全量换液一次。

[0028] 实施例2

[0029] 低强度超声刺激干预脑类器官发育: 从脑类器官发育第18天开始处理, 约6-8个脑类器官培养在含3mL成熟培养基的低黏附6孔板每孔中, 在低黏附6孔板每孔底部涂抹无菌耦合剂(<1mm厚), 超声探头(ME Sonicator 740, 5平方厘米)放置在孔板下方, 紧密接触, 无空隙产生。调整超声波治疗仪的参数: 脉冲强度为40mW/cm², 额定频率为3MHz, 10%占空比, 每天处理2min。处理后擦拭底板耦合剂, 将孔板放回80rpm摇床持续培养。在脑类器官发育的第35天、第55天、第75天进行神经祖细胞(SOX2)、皮质神经元(TBR1)、增殖细胞(ki67)、凋亡细胞(TUNEL)比例检测。结果如图3所示, 可以看出低强度超声刺激处理后的脑类器官表现为尺寸增大, 神经祖细胞, 皮质神经元比例增加, 增殖细胞比例明显增加, 凋亡细胞比例显著减少, 有效促进脑类器官的结构发育。

[0030] 实施例3

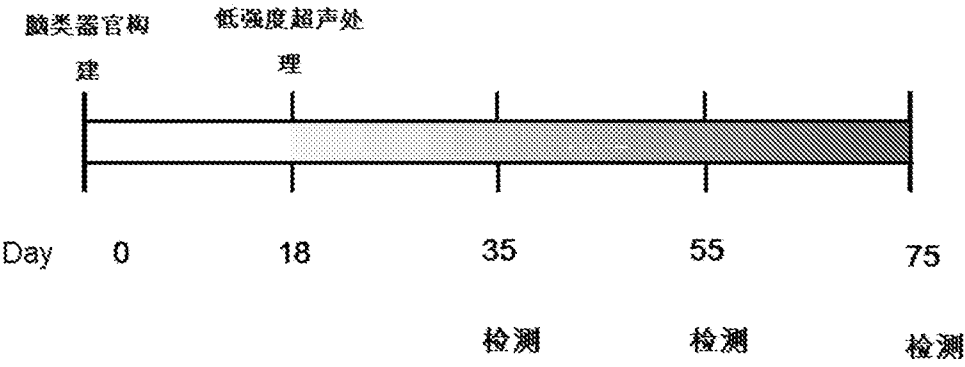
- [0031] 低强度超声刺激干预后的脑类器官整合能力检测：将第40天的超声处理的携带GFP的脑类器官移植入Nod-SCID小鼠初级感觉皮层中，在移植第2个月和移植第5个月检测脑类器官在宿主中的存活能力和与宿主的整合能力。结果见图4，低强度超声刺激处理后的脑类器官移植后在宿主中存活能力明显增高，与宿主整合能力明显提高。
- [0032] 实施例4
- [0033] ASPM敲除的小头畸形脑类器官模型构建及超声处理：采用Crispr-cas9介导的ASPM敲除的慢病毒感染胚胎干细胞，药筛两周后挑选单细胞克隆，进行基因片段验证及敲除效果鉴定，构建ASPM敲除的胚胎干细胞系。
- [0034] 随后，按照实施例1中的人脑类器官构建方法进行培养与鉴定。待第30天后，按照实施例2中的低强度超声干预普通脑类器官的参数方案进行处理与检测，具体结果见图5，可以看出，低强度超声处理后的小头畸形脑类器官表现为尺寸明显增大。
- [0035] 最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

权利要求书

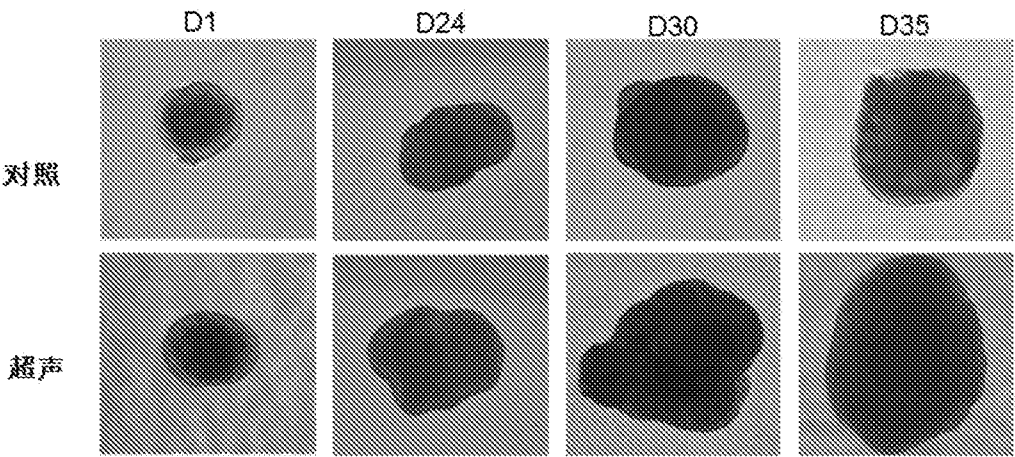
- [权利要求 1] 一种基于低强度超声刺激的三维脑类器官的培养方法，其特征在于，包括以下步骤：
- (1)构建三维脑类器官：将胚胎干细胞或诱导性多能干细胞进行培养，分化为三维脑类器官；
- (2)低强度超声优化脑类器官发育：利用低强度超声在脑类器官发育过程中进行刺激干预，在不同时间点记录三维脑类器官的结构变化。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的培养方法，其特征在于，步骤(1)中构建三维脑类器官的具体过程为：将胚胎干细胞或诱导性多能干细胞的单细胞悬液接种在超低黏附U型底孔板中，加入神经诱导培养基培养，形成拟胚体，培养至8-12天，转移到低黏附孔板中，加入神经分化培养基后摇床旋转培养，培养第16-20天，更换为成熟培养基继续旋转培养。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的培养方法，其特征在于，所述的神经诱导培养基为DMEM/F-12培养基，培养基中含有15%血清替代物，1%含非必须氨基酸的最低必需培养基，1%L-谷氨酰胺的替代品，100微摩尔/升 β -巯基乙醇，100纳摩尔/升4-[6-[4-(1-哌嗪基)苯基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基]-喹啉盐酸盐，10微摩尔/升4-[4-(1,3-苯并二唑-5-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]-苯酰胺水合物，2微摩尔/升3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-D]嘧啶-4-酮。
- [权利要求 4] 根据权利要求2所述的培养方法，其特征在于，所述的神经分化培养基为50%DMEM/F-12培养基，培养基中含有50%Neurobasal培养基，0.025%胰岛素，0.5%含非必须氨基酸的最低必需培养基，1%L-谷氨酰胺的替代品，1%青霉素/链霉素，0.5%N-2添加剂，1%B-27无血清添加剂，去除维生素A，50微摩尔/升 β -巯基乙醇。

- [权利要求 5] 根据权利要求2所述的培养方法，其特征在于，所述的成熟培养基为50%DMEM/F-12培养基，培养基中含有50% Neurobasal 培养基，0.025%胰岛素，0.5%含非必须氨基酸的最低必需培养基，1% L-谷氨酰胺的替代品，1%青霉素/链霉素，0.5% N-2添加剂，1% B-27无血清添加剂，50微摩尔/升 β -巯基乙醇，200微摩尔/升 抗坏血酸，20纳克/毫升 脑源性神经营养因子。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的培养方法，其特征在于，步骤(2)中所述的低强度超声的参数为脉冲强度为30–50mW/cm²，额定频率为1–5MHz，5–15%占空比，每天处理1–5min。
- [权利要求 7] 根据权利要求1所述的培养方法，其特征在于，步骤(2)中刺激干预开始时间点为脑类器官发育的第15–20天。
- [权利要求 8] 权利要求1所述的低强度超声刺激在构建小头畸形脑类器官疾病模型中的应用。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的应用，其特征在于，所述的小头畸形脑类器官疾病模型中敲除了人类异常纺锤体样小头畸形相关蛋白基因(ASPM)。

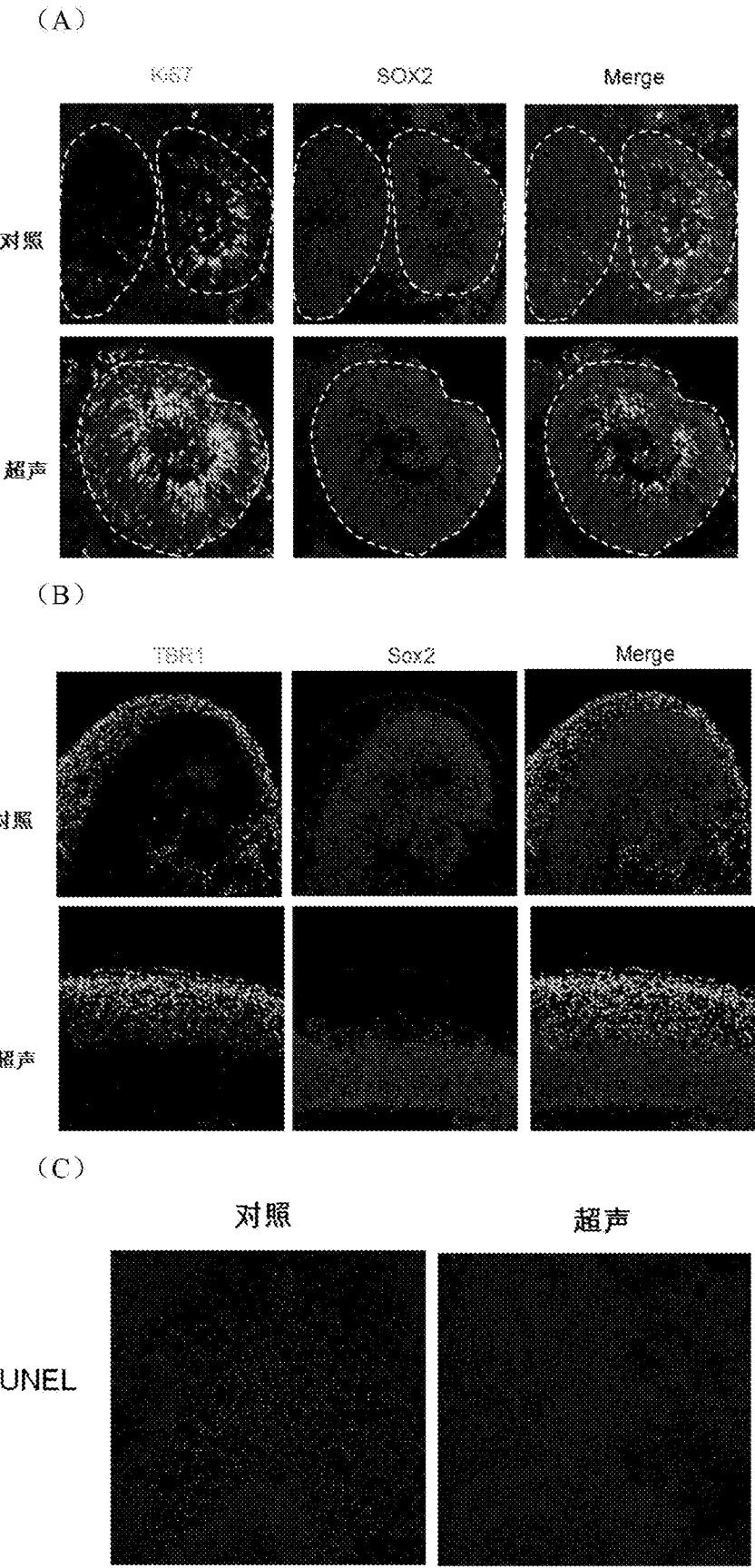
[图1]



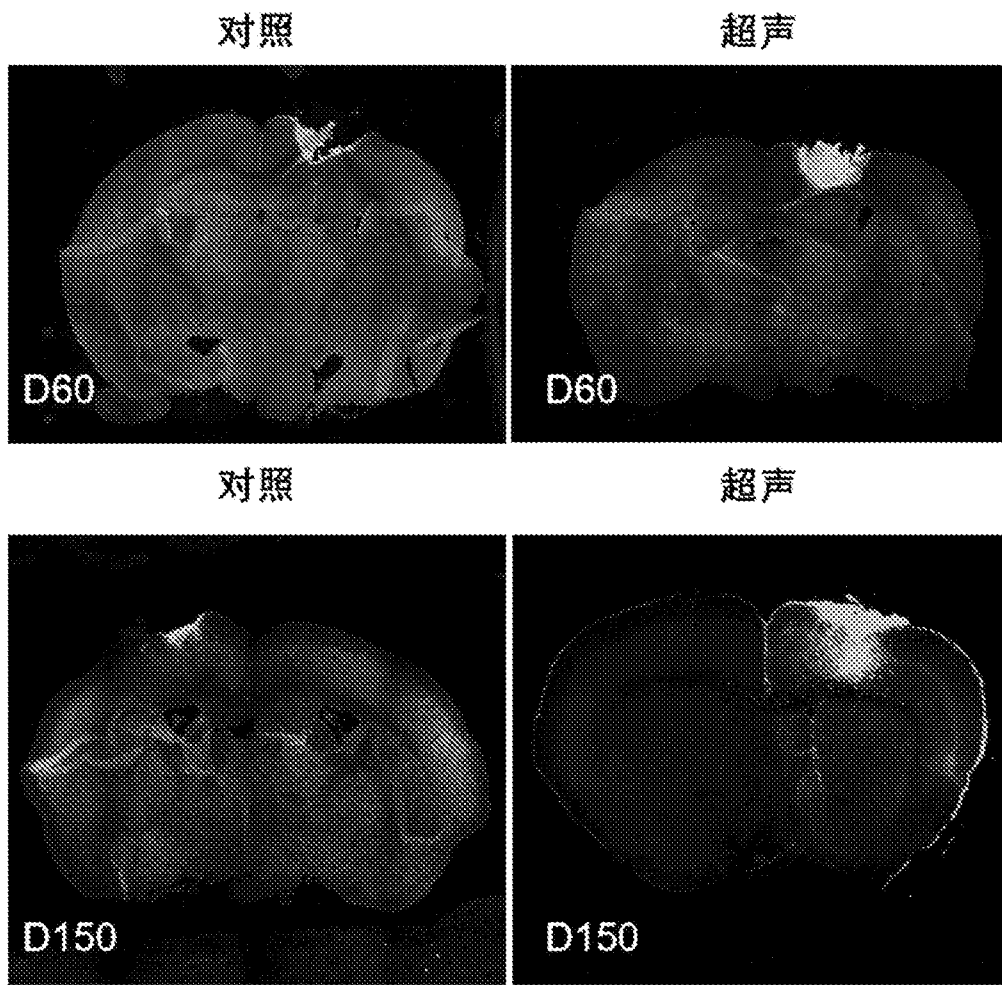
[图2]



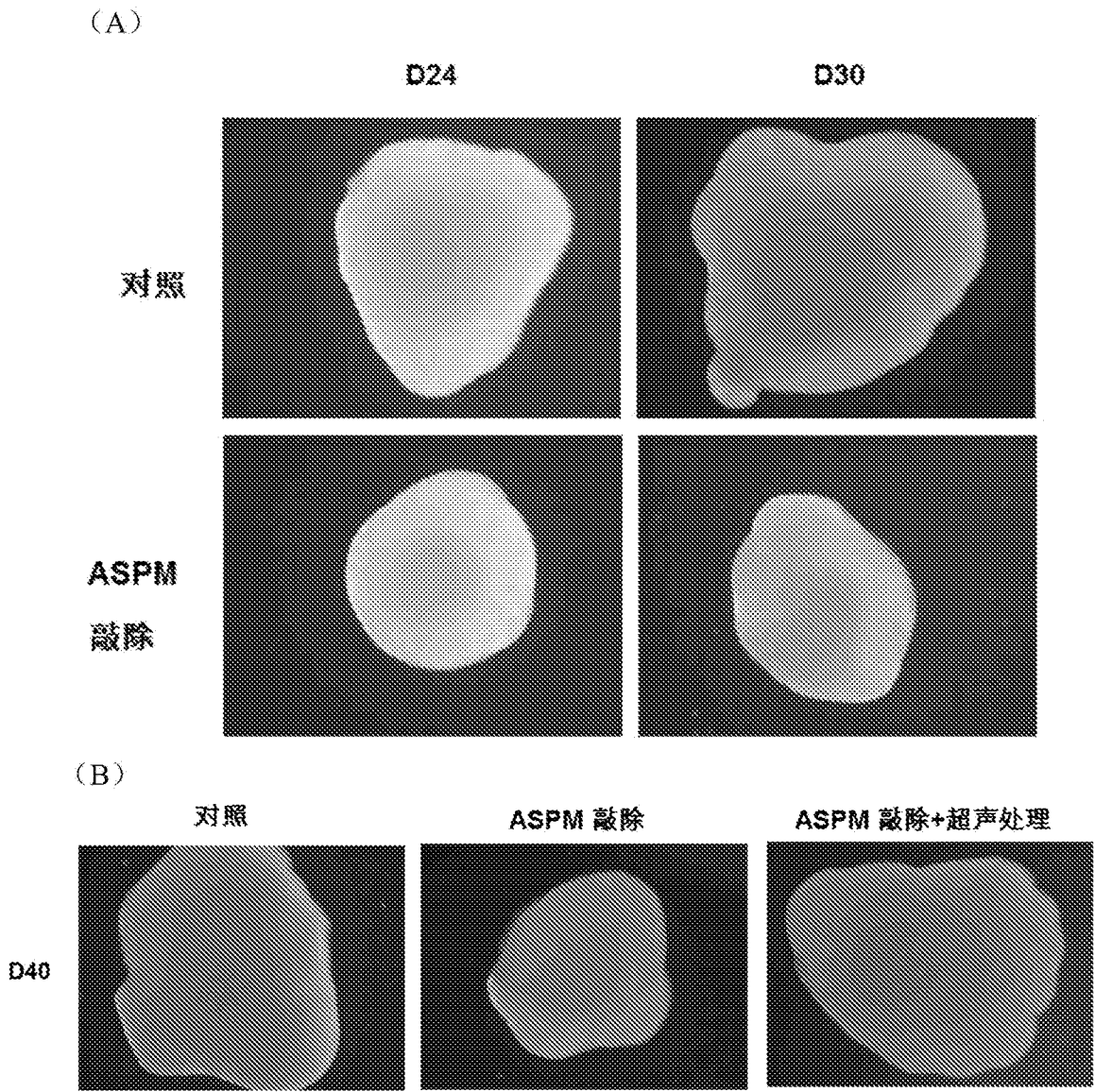
[图3]



[图4]



[图5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/139394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(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: C12N

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, ENTXT, ENTXTC, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, Pubmed, Baidu: 超声, 低强度, 刺激, 类脑器官, 脑类器官, 神经诱导培养基, 神经分化培养基, 成熟培养基, LDN193189, SB431542, XAV939, ASPM, organoid, 胚胎干细胞, 诱导性多能干细胞, 小头畸形, ESC, iPSC, embryonic stem cell, induced pluripotent stem cell, brain, organoid, neural induction medium, neural differentiation medium, low-intensity, ultrasound, B27, N2, mercaptoethanol, ascorbic acid, ASPM, microcephaly, 天津大学

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116376840 A (TIANJIN UNIVERSITY) 04 July 2023 (2023-07-04) claims 1-9	1-9
Y	XIANG, Yangfei et al. "Fusion of Regionally-specified hPSC-derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration" <i>Cell Stem Cell</i> , Vol. 21, No. 3, 07 September 2017 (2017-09-07), pages 14-15, "Method details"	1-7
Y	HOU, Xuandi et al. "Precise Ultrasound Neuromodulation in a Deep Brain Region Using Nano Gas Vesicles as Actuators" <i>Advanced Science</i> , Vol. 8, 21 September 2021 (2021-09-21), article 2101934, abstract, page 1, right-hand column, paragraph 1, and sections 2.2 and 2.4	1-9
Y	LI, Rui et al. "Recapitulating Cortical Development with Organoid Culture in Vitro and Modeling Abnormal Spindle-like (ASPM related primary) Microcephaly Disease" <i>Protein Cell</i> , Vol. 8, No. 11, 31 December 2017 (2017-12-31), abstract, and page 828, left-hand column	8-9



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

06 March 2024

Date of mailing of the international search report

15 March 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/CN2023/139394

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAKIR, B. et al. "Development of Human Brain Organoids with Functional Vascular-like System" <i>Nature Methods</i> , Vol. 16, No. 11, 30 November 2019 (2019-11-30), pages 1169-1175	1-7
A	CN 112226410 A (GUANGZHOU WOMEN AND CHILDREN'S MEDICAL CENTER (GUANGZHOU MATERNAL AND CHILD HEALTH HOSPITAL, GUANGZHOU CHILDREN'S HOSPITAL, GUANGZHOU MATERNITY AND INFANT HOSPITAL, GUANGZHOU MATERNAL AND CHILD HEALTH AND FAMILY PLANNING SERVICE CENTER)) 15 January 2021 (2021-01-15) claims 1-10	1-9
A	WO 2022134229 A1 (WUHAN IREGENE THERAPEUTICS CO., LTD.) 30 June 2022 (2022-06-30) description, embodiment 5	1-9
A	COTERO, V, et al. "Noninvasive Sub-organ Ultrasound Stimulation for Targeted Neuromodulation" <i>Nature Communications</i> , Vol. 10, 12 March 2019 (2019-03-12), pages 1-12	1-9
A	许磊 等 (XU, Lei et al.). "人类3D大脑类器官研究进展 (Research Progresses of 3D Brain Organoids Derived from Pluripotent Stem Cells)" <i>南京医科大学学报 (自然科学版)</i> (<i>Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)</i>), Vol. 40, No. 1, 31 January 2020 (2020-01-31), pages 133-140	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/139394

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	116376840	A	04 July 2023	None	
CN	112226410	A	15 January 2021	None	
WO	2022134229	A1	30 June 2022	None	

A. 主题的分类

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(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: C12N

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,ENTXT,ENTXTC, CNKI, 万方数据库, Pubmed, Baidu:超声,低强度, 刺激,类脑器官,脑类器官,神经诱导培养基, 神经分化培养基, 成熟培养基, LDN193189, SB431542, XAV939, ASPM,organoid,胚胎干细胞, 诱导性多能干细胞, 小头畸形, ESC, iPSC, embryonic stem cell, induced pluripotent stem cell, brain, organoid, neural induction medium, neural differentiation medium, low-intensity, ultrasound, B27, N2, mercaptoethanol, ascorbic acid, ASPM, microcephaly, 天津大学

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 116376840 A (天津大学) 2023年7月4日 (2023 - 07 - 04) 权利要求1-9	1-9
Y	XIANG, Y.F. 等. "Fusion of regionally-specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration" Cell Stem Cell, 第21卷, 第3期, 2017年9月7日 (2017 - 09 - 07), 第14-15页 "Method details"	1-7
Y	HOU, X.D. 等. "Precise Ultrasound Neuromodulation in a Deep Brain Region Using Nano Gas Vesicles as Actuators" ADVANCED SCIENCE, 第8卷, 2021年9月21日 (2021 - 09 - 21), 第2101934篇, 摘要、第1页右栏第1段, 第2.2节, 第2.4节	1-9
Y	LI, R. 等. "Recapitulating cortical development with organoid culture in vitro and modeling abnormal spindle-like (ASPM related primary) microcephaly disease" Protein Cell, 第8卷, 第11期, 2017年12月31日 (2017 - 12 - 31), 摘要, 第828页左栏	8-9

☒ 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3月6日

国际检索报告邮寄日期

2024年3月15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

武雪梅

电话号码 (+86) 010-53961961

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	CAKIR, B. 等. "Development of human brain organoids with functional vascular-like system" Nat. Methods, 第16卷, 第11期, 2019年11月30日 (2019 - 11 - 30), 第1169-1175页	1-7
A	CN 112226410 A (广州市妇女儿童医疗中心 (广州市妇幼保健院、广州市儿童医院、广州市妇婴医院、广州市妇幼保健计划生育服务中心)) 2021年1月15日 (2021 - 01 - 15) 权利要求1-10	1-9
A	WO 2022134229 A1 (武汉睿健医药科技有限公司) 2022年6月30日 (2022 - 06 - 30) 说明书实施例5	1-9
A	COTERO, V, 等. "Noninvasive sub-organ ultrasound stimulation for targeted neuromodulation" NATURE COMMUNICATIONS, 第10卷, 2019年3月12日 (2019 - 03 - 12), 第1-12页	1-9
A	许磊 等. "人类3D大脑类器官研究进展" 南京医科大学学报 (自然科学版), 第40卷, 第1期, 2020年1月31日 (2020 - 01 - 31), 第133-140页	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/139394

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	116376840	A	2023年7月4日	无	
CN	112226410	A	2021年1月15日	无	
WO	2022134229	A1	2022年6月30日	无	