

# (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  
2019 年 5 月 16 日 (16.05.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/090897 A1**

(51) 国际专利分类号:

*A61L 27/40* (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)

*A61L 27/54* (2006.01) *C12N 5/075* (2010.01)

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/116620

(22) 国际申请日: 2017 年 12 月 15 日 (15.12.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201711085422.3 2017年11月7日 (07.11.2017) CN

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN  
INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/  
CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学  
苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(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,  
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))。

(72) 发明人: 张键(ZHANG, Jian); 中国广东省深圳市  
南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong  
518055 (CN)。 杨雅莉(YANG, Yali); 中国广东  
省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068  
号, Guangdong 518055 (CN)。 赵华山(ZHAO,  
Huashan); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城  
学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING  
CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳  
北路99号楼2单元905, Beijing 100123 (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,  
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,

(54) Title: 3D PRINTED BIOLOGICAL ARTIFICIAL OVARY SCAFFOLD CAPABLE OF ACTIVATING PRIMORDIAL FOLLICLES, ARTIFICIAL OVARY THEREOF, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种能够激活原始卵泡的3D打印人造卵巢生物支架及其人造卵巢和用途

(57) Abstract: A 3D printed biological scaffold capable of activating primordial follicles in ovarian cortex. By means of 3D printing technology, a primordial follicle activator and a hormone and a growth factor that are capable of promoting follicular development are mixed with a scaffold material for shaping by printing; then ovarian cortical fragments containing primordial follicles are implanted in the printed scaffold. After being implanted into a body, the cortical fragments can obtain better scaffold-based protection and richer nutrition supply, and the biological scaffold slowly degrades in the body to slowly release the follicle activator, thereby continuously activating the primordial follicles.

(57) 摘要: 一种能够激活卵巢皮质内原始卵泡的3D打印生物支架。利用3D打印技术, 将原始卵泡激活剂和能够促进卵泡发育的激素和生长因子混入支架材料中, 打印成型, 然后移入含有原始卵泡的卵巢皮质碎片, 移植回体内后, 皮质碎片能有更好的支架保护和更丰富的营养供给, 生物支架在体内缓慢降解, 缓释出卵泡激活剂, 持续激活原始卵泡。

WO 2019/090897 A1

## 一种能够激活原始卵泡的 3D 打印人造卵巢生物支架及其人造卵巢和用途

### 技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种能够激活卵巢皮质内原始卵泡的 3D 打印生物支架的制备。

### 背景技术

随着我国社会经济的快速发展，女性地位越来越高，同时也面临着越来越大的工作、心理压力，育龄女性生育年龄不断推迟；再加上环境污染越来越严重，各种有毒有害物质离生活越来越近，社会和环境因素相结合，引发了大量生殖健康问题；而自二胎政策开放后，高龄产妇也越来越多。因此，如何让卵巢功能已逐渐衰退的超育龄女性顺利完成妊娠过程，近年来已成为一大研究热点。

除了育龄女性的妊娠问题，近年来，由于生活节奏快，工作压力大，许多女性进入“围绝经期”有提前趋势，对身体和心理健康都有诸多不利影响，如情绪不稳定、易怒、抑郁、记忆力衰退等各种更年期症状、皮肤老化、肥胖、骨质疏松等。如何调节老龄化时期妇女的生理与心理状态，延缓衰老，缓解围绝经期的症状，提高绝经后的生活质量，在人口逐渐老龄化的社会，也越来越值得关注。

#### （一）卵巢功能衰竭

随着年龄的增长，女性卵巢功能逐渐衰竭至月经永久性停止，这一生理现象被称为绝经。当卵巢内卵泡用尽，或剩余卵泡对促性腺激素丧失了反应，卵泡不在发育和分泌雌激素，不能刺激子宫内膜生长，导致绝经。

目前对绝经期最常用的治疗措施是激素替代/补充疗法，即在更年期女性缺乏激素的时候，用外源激素来补充。虽然对改善绝经期综合症状有一定效果，但也存在一些弊端，如：激素治疗并不适用于所有人，患有乳腺、子宫疾病和糖尿病、高血压等疾病的患者需慎用；激素治疗时每个人所需的量也不同，医生很难给出最合适的剂量，而体内激素过多会引发诸如子宫内膜癌、卵巢癌或乳腺癌等无法控制的副作用；外源给予的激素为人工合成，无论从成分上还是比例上始终无法替代自身分泌激素的效果。

#### （二）卵巢早衰（premature ovarian failure, POF）

女性的平均自然绝经年龄为 50 岁左右，当这一现象出现在 40 岁之前时，

称为卵巢早衰，约占育龄妇女的 1%-3%。卵巢早衰主要是由于卵巢中的原始卵泡过早耗竭或者原始卵泡不能发育而致。

目前，辅助生殖技术如试管婴儿技术等已经成为治疗不孕不育症的关键技术，然而，试管婴儿技术的关键是必须要求母亲提供一枚高质量的成熟卵子，如果母亲无卵可排或排卵功能低下，比如对于卵巢早衰症患者，那么这项技术则爱莫能助。

### （三）多囊卵巢综合征

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄妇女较常见的内分泌综合征，发病率占育龄期妇女的 6~10%，其主要表现为月经稀发或闭经、不孕、卵巢多囊性变、肥胖、多毛、高雄激素血症等。对于 PCOS 患者的治疗，包括手术治疗、药物治疗和辅助生育技术。

其中，对 PCOS 患者采用辅助生育技术，尤其是对于应用 6 个月以上标准的促排卵周期治疗后有排卵但仍未妊娠的 PCOS 患者，或多种药物促排卵治疗及辅助治疗无排卵并急待妊娠的患者，可以选择胚胎移植的辅助生育技术，包括体外受精技术(In vitro fertilization, IVF)和卵母细胞体外成熟技术(In vitro maturation, IVM)。

### （四）卵巢癌 (Ovarian Cancer, OAC)

卵巢癌是发生于卵巢的一种发病率较高的恶性肿瘤，除了干扰卵巢激素的正常分泌，还会破坏大部分卵巢组织，造成不孕症，严重危害妇女生殖健康。

卵巢癌的治疗以手术为主，辅以化学、放射、免疫治疗等。手术治疗是最有效的治疗手段，手术范围原则上尽可能切除原发肿瘤及所有的转移灶，对有生育要求者，符合条件者可行保守性手术保留生育能力。

当大部分卵巢组织被肿瘤或其他原因破坏导致卵泡发育障碍时，卵泡皮质中还存在大量的原始卵泡，卵巢皮质组织冷冻是当今较为常见的生育力保护的措施，如何在之后的体外培养中使其激活、生长和排卵，是当下的研究热点。

## 发明内容

目前已有研究发现很多与原始卵泡激活相关的信号通路和靶点，如 PTEN 与 PI3K-mTOR 信号通路、LKB1-AMPK 信号通路等，本发明利用 3D 打印技术，将原始卵泡激活剂和能够促进卵泡发育的激素和生长因子混入支架材料中，打印

成型，然后移入含有原始卵泡的卵巢皮质碎片，移植回体内后，皮质碎片能有更好的支架保护和更丰富的营养供给，生物支架在体内缓慢降解，缓释出卵泡激活剂，持续激活原始卵泡。

本发明一个方面提供了一种模拟人造卵巢的生物支架，其通过 3D 打印方式获得，3D 打印采用的打印材料为生物相容性材料、原始卵泡激活剂、原始卵泡发育促进剂的混合物。

本发明一个方面提供了一种人造卵巢，其中包含了生物支架以及镶嵌于生物支架中的包含原始卵泡的组织碎片，其中生物支架通过 3D 打印获得，其打印材料为生物相容性材料、原始卵泡激活剂、卵泡发育促进剂的混合物。

在本发明的技术方案中，生物相容性材料模拟卵巢组织中包含的组分，其选自胶原 I、海藻酸钠、明胶、琼脂糖、基质胶（Matrigel）、透明质酸、壳聚糖、葡聚糖中的一种或者几种任意组合。优选为海藻酸钠和明胶的混合物、海藻酸钠和基质胶的混合物、明胶和基质胶的混合物、胶原 I 和海藻酸钠和明胶的混合物、胶原 I 和海藻酸钠和基质胶的混合物、胶原 I 和明胶和基质胶的混合物。

在本发明的技术方案中，制备得到的生物支架先紫外交联，再用  $\text{CaCl}_2$  交联。可泡在  $\text{CaCl}_2$  中-20℃短期保存，或-80℃冰箱长期保存，使用之前用 PBS 或生理盐水浸泡清洗。

在本发明的技术方案中，促进卵泡发育的激素或生长因子选自卵泡刺激素（FSH）、黄体生成素（LH）、表皮细胞生长因子（EGF）、胰岛素-转铁蛋白-硒（ITS）中的一种或几种的组合。优选为卵泡刺激素、卵泡刺激素和黄体生成素的组合、卵泡刺激素和黄体生成素和表皮细胞生长因子的组合、卵泡刺激素和黄体生成素和表皮细胞生长因子和胰岛素-转铁蛋白-硒的组合。更优选地，卵泡刺激素（FSH）用量为 10-1000 mIU/ml、黄体生成素（LH）1-100 mIU/ml、表皮细胞生长因子（EGF）0.1-100ng/ml、胰岛素-转铁蛋白-硒（ITS）。胰岛素-转铁蛋白-硒中包含 1-100 ug/ml 重组人胰岛素，1-100 ug/ml 人转铁蛋白（基本无铁）以及 0.1-100 ng/ml 亚硒酸钠。

在本发明的技术方案中，原始卵泡激活剂包括与原始卵泡激活相关的信号通路激动剂或抑制剂，和基础培养液。其中，相关信号通路激动剂或抑制剂选自 PTEN 抑制剂、PI3K 信号通路激活剂、AKT 信号通路激活剂、mTOR 信号通路激活剂的中一种或几种的组合。

在本发明的技术方案中,PTEN 抑制剂选自 SF1670 (0.5-100uM)、VO-Ohipic trihydrate (0.1-100nM)、pic 型 bpv(0.1-100nM)、phen 型 bpv (0.1-100nM)中的一种或多种的组合;

在本发明的技术方案中,PI3K 信号通路激动剂选自 1,3-二咖啡酰奎宁酸 (0.1-100uM)、740 Y-P (PDGFR 740Y-P) (0.1-300ug/ml) 一种或多种的组合。

在本发明的技术方案中,AKT 信号通路激动剂选自 1,3-二咖啡酰奎宁酸 (0.1-100uM)、去氧穿心莲内酯 (0.1-100mM)、SC79 (0.1-10ug/ml) 一种或多种的组合。

在本发明的技术方案中, mTOR 信号通路激动剂选自 MHY1485 (0.1-10uM)、PA (0.1-200uM)、PRO (0.1-100uM) 一种或多种的组合。

在本发明的技术方案中,基础培养液中包含用于培养原始卵泡的培养溶液,优选包括培养基、抗生物、碳源、蛋白酶抑制剂,优选包含  $\alpha$ MEM、FBS/BSA、丙酮酸钠、青霉素、链霉素。更优选以  $\alpha$ MEM 为母液,内含 10%FBS、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素。

本发明的技术方案中,所述生物相容性支架上具有空隙,空隙的直径为卵巢皮质碎片大小的 1.5 倍-3 倍,优选为 2-2.5 倍。

在本发明的技术方案中,所述生物相容性支架的 3D 打印尺寸为:孔隙尺寸 (R): 100  $\mu$ m-800  $\mu$ m,优选为 150 $\mu$ m、200 $\mu$ m、250 $\mu$ m、300 $\mu$ m、350 $\mu$ m、400 $\mu$ m、450 $\mu$ m、500 $\mu$ m、550 $\mu$ m、600 $\mu$ m、650 $\mu$ m、700 $\mu$ m、750 $\mu$ m; 线条堆积夹角: 0°-180°,优选为 5°、10°、15°、20°、30°、40°、50°、60°、70°、80°、90°、100°、110°、120°、130°、140°、150°、160°、170°、175°。

在本发明的技术方案中,所述的生物支架的形状可以为圆形、椭圆形、长方形、正方形、不规则型等各种形状。其内部具有一定孔隙率的联通结构。

在本发明的技术方案中,所述的包含原始卵泡的组织碎片在植入生物支架前在使用原始卵泡激活剂中激活浸泡 0.1-24 小时,优选为 0.5-6 小时。

在本发明的技术方案中,包含原始卵泡的组织碎片选自包含原始卵泡的卵巢组织碎片、更优选为包含原始卵泡的卵巢皮质碎片。

本发明另一个方面一种制备人工卵巢的方法,其包括如下步骤:

采用 3D 打印方式打印生物相容性支架,打印生物相容性支架的材料为生物相容性材料以及原始卵泡激活剂、原始卵泡发育促进剂的混合物。

本发明另一个方面提供了一种制备人工卵巢的方法，其包括如下步骤：

1) 采用 3D 打印方式打印生物相容性支架，打印生物相容性支架的材料为生物相容性材料以及原始卵泡激活剂、原始卵泡发育促进剂的混合物；

2) 将包含原始卵泡的卵巢皮质碎片浸泡在原始卵泡激活剂和基础培养液的混合液中激活；

3) 将激活后的卵巢皮质碎片注入到步骤 1) 获得的 3D 打印生物相容性支架上，获得人工卵巢。

本发明另一个方面提供了本发明的人造卵巢作为药物筛选、卵泡研究模型的用途。

本发明另一个方面提供了本发明的人造卵巢治疗卵泡发育障碍疾病的用途。

在本发明的技术方案中，所述的卵泡发育障碍疾病选自卵巢功能衰竭、卵巢早衰、多囊卵巢综合症、卵巢癌、外伤导致的卵巢损伤。

本发明另一个方面提供了一种治疗卵泡发育障碍疾病的方法，其包括将本发明的人造卵巢移植至受试者体内的步骤。

本发明另一个方面提供了本发明所述的模拟人造卵巢的生物支架在制备人造卵巢中的用途。

本发明另一个方面提供了本发明所述的模拟人造卵巢的生物支架在制备模拟人造卵巢的医疗器械中的用途。

在本发明的技术方案中，含有原始卵泡激活剂和促进卵泡发育的激素或生长因子的生物相容性支架通过 3D 打印制成，冷冻的新鲜的含有原始卵泡的卵巢皮质碎片在含有不同浓度不同组合的原始卵泡激活剂的基础培养液中温育 0.5~6 小时后，转移入生物相容性支架的内部，然后移植回体内。

在本发明的技术方案中，所述的卵细胞、卵泡、原始卵泡、包含原始卵泡的组织，例如包含卵泡的卵巢皮质等均为非人类细胞，或者本发明所使用到的卵细胞、卵泡、原始卵泡、包含原始卵泡的组织均为商业化可以获得的。

有益效果

1、本发明采用在支架中混合了激素、生长因子等活性物质，能够缓慢释放，在皮质碎片注入 3D 打印支架内部，并移植回体内后，皮质碎片能有更好的支架保护和更丰富的营养供给。而生物支架在体内缓慢降解，缓释出卵泡激活剂，持续激活原始卵泡。

2、由于支架中加入了卵泡激活剂，从而大大缩短了原始卵泡体外激活的时间，为揭示原始卵泡激活的机制提供新的研究工具。

3、由于原始卵泡体外体外激活时间缩短，因此，可以在同一次手术中完成取出-激活-植入工序，在避免二次手术的基础上，减少病人等待时间，也为临床治疗卵巢早衰和辅助生殖技术提供新的选择。

4、使用本发明得人工卵巢后，卵泡激活分泌大量激素调节机体内分泌，为改善绝经期综合症状，延缓衰老提供新的研究方向。

## 具体实施方式

为了更清楚地理解本发明，现参照下列实施例进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，或按照仪器制造商所建议的条件。

本发明使用的 ITS 市售产品中包含 1.0 mg/ml 重组人胰岛素，0.55 mg/ml 人转铁蛋白 (基本无铁)和 0.5 µg/ml 亚硒酸钠。

### 实施例 1 3D 打印生物支架的设计及制备

(1) 结合计算机辅助设计( computer aided design, CAD), 采用三维打印技术构建生物支架，3D 生物支架的形状，选为圆形、长方形、正方形、椭圆形或不规则形，内部结构联通，具有孔隙；孔隙尺寸 (R)：400 µm；线条堆积夹角：30-120 度；

(2) 配制 3D 打印生物支架打印材料，其中包含生物相容性材料、原始卵泡激活剂、原始卵泡发育促进剂的混合物；生物相容性材料为 3%-5%海藻酸钠与 8%-10%明胶，海藻酸钠和明胶的质量比为 1：1，混合后室温条件下成凝胶状。在生物相容性材料中加入 740 Y-P 10ug/ml、PA 8 uM、PRO 2 uM、FSH 100mIU、LH 10mIU、EGF 5ng/ml、ITS(100 倍稀释后使用)。

(3) 以 3D 打印方式打印卵巢支架；

(4) 制备好的支架首先紫外交联 10 分钟，再用 CaCl<sub>2</sub> 交联，可泡在 CaCl<sub>2</sub> 中-20℃短期保存，或-80℃冰箱长期保存，使用之前用 PBS 或生理盐水浸泡清洗。

### 实施例 2 3D 打印生物支架的设计及制备

实施例 2 制备的支架与实施例 1 的方法相同, 除步骤 (2) 中打印材料的配方, 所述打印材料的配方按照下表所列比例进行。

|    | 生物相容性材料                                            | 原始卵泡激活剂                               | 原始卵泡发育促进剂                                                                                     |
|----|----------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | 5%海藻酸钠和<br>10%明胶, 海藻酸钠和明胶的质量比为 1: 1                | 740 Y-P 10ug/ml、<br>PA 8 uM、PRO 2 uM  | FSH 100mIU/ml、LH 10mIU/ml、<br>EGF 5ng/ml、10 ug/ml 重组人胰岛素, 5.5 ug/ml 人转铁蛋白(基本无铁)和 50ng/ml 亚硒酸钠 |
| 2  | 3%海藻酸钠和<br>8%明胶, 海藻酸钠和明胶的质量比为 1: 1                 | 740 Y-P 5 ug/ml、<br>PA 4 uM +PRO 1 uM | FSH 100mIU/ml、LH 10mIU/ml、<br>EGF 5ng/ml、10 ug/ml 重组人胰岛素, 5.5 ug/ml 人转铁蛋白(基本无铁)和 50ng/ml 亚硒酸钠 |
| 3  | 5%海藻酸钠与基质胶, 海藻酸钠和基质胶的质量比为 1: 1                     | 740 Y-P 5ug/ml、<br>pic 型 bpv 2uM      | FSH 100mIU/ml、EGF 5ng/ml、<br>ITS10 ug/ml 重组人胰岛素, 5.5 ug/ml 人转铁蛋白(基本无铁)和 50ng/ml 亚硒酸钠          |
| 4  | 3%海藻酸钠与基质胶, 海藻酸钠和基质胶的质量比为 1: 1                     | 740 Y-P<br>2.5ug/ml、pic 型 bpv 1uM     | FSH 100mIU/ml、EGF 5ng/ml、<br>ITS10 ug/ml 重组人胰岛素, 5.5 ug/ml 人转铁蛋白(基本无铁)和 50ng/ml 亚硒酸钠          |
| 5  | 9%明胶和基质胶, 明胶和基质胶的质量比为 1: 1                         | 1,3-二咖啡酰奎宁酸 10uM                      | FSH 150mIU/ml、LH 15mIU/ml                                                                     |
| 6  | 9%明胶和基质胶, 明胶和基质胶的质量比为 1: 1                         | PDGFR 740Y-P<br>100ug/ml              | FSH 100mIU/ml                                                                                 |
| 7  | 5%海藻酸钠和<br>10%明胶, 海藻酸钠和明胶的质量比为 1: 1                | MHY1485 10uM                          | FSH 100mIU/ml                                                                                 |
| 8  | 5%海藻酸钠和<br>10%明胶和 I 胶原, 海藻酸钠和明胶和 I 胶原的质量比为 1: 1: 1 | PA 100uM                              | FSH 50mIU/ml、LH 5mIU/ml、<br>EGF 10ng/ml                                                       |
| 9  | 5%海藻酸钠和<br>10%明胶和 I 胶原, 海藻酸钠和明胶和 I 胶原的质量比为 1: 1: 1 | PRO 50uM                              | FSH 200mIU/ml、LH 10mIU/ml、<br>EGF 10ng/ml                                                     |
| 10 | 5%海藻酸钠和<br>10%明胶, 海藻酸钠和明胶的质量比为 1: 1                | 1,3-二咖啡酰奎宁酸 25uM 、<br>MHY1485 4uM     | FSH 200mIU/ml、LH 10mIU/ml、<br>EGF 10ng/ml                                                     |



|    |                                            |                                                       |                                                                                 |
|----|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 11 | 5%海藻酸钠和<br>10%明胶，海藻酸<br>钠和明胶的质量<br>比为 1: 1 | SF1670 4uM 、<br>1,3-二咖啡酰奎宁<br>酸 30uM 、<br>MHY1485 4uM | FSH 200mIU/ml、LH 10mIU/ml、<br>EGF 10ng/ml                                       |
| 12 | 8%明胶和琼脂糖，<br>明胶和琼脂糖的<br>质量比 1:1            | 1,3-二咖啡酰奎宁<br>酸 1uM、去氧穿心<br>莲内酯 10mM                  | FSH 10mIU/ml、ITS10 ug/ml 重<br>组人胰岛素，5.5 ug/ml 人转铁蛋<br>白(基本无铁)和 50ng/ml 亚硒酸<br>钠 |

## 实施例 2 原始卵泡的获得

对 3 日龄的雌性小鼠采用颈椎脱臼法处死，消毒皮肤后，背位无菌摘取卵巢，放入分离培养基中（L-15+10%FBS+100IU/ml 青霉素+100ug/ml 链霉素）。在实体显微镜下剔除卵巢周围附带组织，在分离液中清洗 3 遍。然后在镜下用胰岛素计量注射针刺卵巢，将小鼠卵巢分成含有原始卵泡的组织碎片。

## 实施例 3 原始卵泡的激活

激活剂为与原始卵泡激活相关的信号通路的激动剂或抑制剂，均属于现有技术，且可以从市场上购买得到。

冻存的或新鲜的含大量原始卵泡的卵巢皮质切碎后，在含不同组合卵泡激活剂的基础培养液中温育激活 0.5~6 小时后，生理盐水洗三次，去除外源物，然后移入打印好的生物支架，移植到双侧卵巢摘除的成年母鼠肾被膜下。

其中卵泡激活剂的基础培养液配方为：

| 原始卵泡激活剂                                  | 基础培养液                                                                   |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1 740 Y-P 5ug/ml、PA 4 uM、<br>PRO 1 uM    | $\alpha$ MEM 为母液，内含 10%FBS、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素     |
| 2 740 Y-P 2 ug/ml、PA 2 uM<br>+PRO 0.5 uM | $\alpha$ MEM 为母液，内含 3mg/ml BSA、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素 |
| 3 740 Y-P 2ug/ml、pic 型 bpv<br>1uM        | $\alpha$ MEM 为母液，内含 10%FBS、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素     |
| 4 740 Y-P 1ug/ml、pic 型 bpv<br>0.5uM      | $\alpha$ MEM 为母液，内含 3mg/ml BSA、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素 |

|    |                                         |                                                                          |
|----|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 1,3-二咖啡酰奎宁酸 5uM                         | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 10%FBS、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素     |
| 6  | PDGFR 740Y-P 50ug/ml                    | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 3mg/ml BSA、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素 |
| 7  | MHY1485 5uM                             | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 10%FBS、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素     |
| 8  | PA 50uM                                 | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 3mg/ml BSA、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素 |
| 9  | PRO 25uM                                | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 10%FBS、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素     |
| 10 | 1,3-二咖啡酰奎宁酸 12uM、<br>MHY1485 2uM        | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 3mg/ml BSA、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素 |
| 11 | SF1670 4uM、1,3-二咖啡酰奎宁酸 15uM、MHY1485 2uM | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 10%FBS、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素     |
| 12 | 1,3-二咖啡酰奎宁酸 0.5uM、去氧穿心莲内酯 5mM           | $\alpha$ MEM 为母液, 内含 3mg/ml BSA、5.5mg/ml 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素 |

#### 实施例 4 3D 打印生物支架和人工卵巢的制备以及效果

(1) 将实施例 2 制备得到的 3D 打印生物支架储存备用的生物支架预处理: 将在-80℃储存备用的卵巢生物支架取出, 在超净台中紫外放置, 室温 20 分钟, 然后在生理盐水中孵育 30 分钟, 清洗和灭菌同时进行。

(2) 将 3 天新生小鼠卵巢皮质碎片置于实施例 2 的基础培养液 1 号中培养 1-6 小时, 体外激活皮质中的大量原始卵泡。

(3) 培养后的皮质碎片注入 3D 打印生物支架中。

(4) 将含有皮质碎片的生物支架移植入双侧卵巢切除的成年母鼠(8-10 周)肾被膜下, 手术例大于等于 6。

(5) 分别于移植手术后的第 5,10,15 天处死母鼠,取出支架,石蜡包埋、5um 组织切片: H&E 染色,观察卵泡发育形态;免疫组织化学染色 PCNA 检测细胞增殖情况; TUNNEL 检测细胞凋亡。

结果显示:随着天数增加,进行试验的 12 组结果均显示出原始卵泡激活发育的状态,从照片可以看出部分原始卵泡成功激活并发育至腔前卵泡阶段,且发育中的卵泡颗粒细胞增殖。说明本发明的支架以及人工卵巢成功在体内激活了小鼠的原始卵泡,并促进其发育,能够为卵巢因病导致缺失或损伤提供替代方案。

1、一种模拟人造卵巢的生物支架，其通过 3D 打印方式获得，3D 打印采用的打印材料为生物相容性材料、原始卵泡激活剂、原始卵泡发育促进剂的混合物。

2、一种人造卵巢，其中包含了生物支架以及镶嵌于生物支架中的包含原始卵泡的组织碎片，其中生物支架通过 3D 打印获得，其打印材料为生物相容性材料、原始卵泡激活剂、卵泡发育促进剂的混合物。

3、根据权利要求 1 中模拟人造卵巢的生物支架或权利要求 2 所述的人造卵巢，其中，促进卵泡发育的激素或生长因子选自卵泡刺激素（FSH）、黄体生成素（LH）、表皮细胞生长因子（EGF）、胰岛素-转铁蛋白-硒（ITS）中的一种或几种的组合；优选为卵泡刺激素、卵泡刺激素和黄体生成素的组合、卵泡刺激素和黄体生成素和表皮细胞生长因子的组合、卵泡刺激素和黄体生成素和表皮细胞生长因子和胰岛素-转铁蛋白-硒的组合。

4、根据权利要求 1 中模拟人造卵巢的生物支架或权利要求 2 所述的人造卵巢，其中，原始卵泡激活剂包括与原始卵泡激活相关的信号通路激动剂或抑制剂，和基础培养液；其中，相关信号通路激动剂或抑制剂选自 PTEN 抑制剂、PI3K 信号通路激动剂、AKT 信号通路激动剂、mTOR 信号通路激动剂的中一种或几种的组合；

优选地，PTEN 抑制剂选自 SF1670、VO-Ohpic trihydrate、pic 型 bpv(0.1-100nM)、phen 型 bpv 中的一种或多种的组合；PI3K 信号通路激动剂选自 1,3-二咖啡酰奎宁酸、740 Y-P 一种或多种的组合；AKT 信号通路激动剂选自 1,3-二咖啡酰奎宁酸、去氧穿心莲内酯、SC79 一种或多种的组合；mTOR 信号通路激动剂选自 MHY1485、PA、PRO 一种或多种的组合。

5、根据权利要求 2 所述的人造卵巢，其中，包含原始卵泡的组织碎片选自包含原始卵泡的卵巢组织碎片、更优选为包含原始卵泡的卵巢皮质碎片。

6、一种制备人工卵巢的方法，其包括如下步骤：

采用 3D 打印方式打印生物相容性支架，打印生物相容性支架的材料为生物

相容性材料以及原始卵泡激活剂、原始卵泡发育促进剂的混合物。

7、一种制备人工卵巢的方法，其包括如下步骤：

1) 采用 3D 打印方式打印生物相容性支架，打印生物相容性支架的材料为生物相容性材料以及原始卵泡激活剂、原始卵泡发育促进剂的混合物；

2) 将包含原始卵泡的卵巢皮质碎片浸泡在原始卵泡激活剂和基础培养液的混合液中激活；

3) 将激活后的卵巢皮质碎片注入到步骤 1) 获得的 3D 打印生物相容性支架上，获得人工卵巢。

8、权利要求 2 所述人造卵巢作为药物筛选、卵泡研究模型的用途。

9、权利要求 2 所述人造卵巢作为人造卵巢治疗卵泡发育障碍疾病的用途；优选地，所述的卵泡发育障碍疾病选自卵巢功能衰竭、卵巢早衰、多囊卵巢综合症、卵巢癌、外伤导致的卵巢损伤。

10、权利要求 1 所述的模拟人造卵巢的生物支架在制备人造卵巢中的用途。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2017/116620

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/40 (2006.01) i; A61L 27/54 (2006.01) i; C12N 5/071 (2010.01) i; C12N 5/075 (2010.01) 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)

A61L; 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)

USTXT, CNTXT, CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, WANFANG DATA: 深圳先进技术研究院, 人造, 卵巢, 卵泡, 支架, 激素, 激活, 促进, 生长因子, FSH, ITS, LH, EGF, 3D, 3-D, 打印, artificial, synthetic, ovarian, ovary, ovarium, germarium, ootheca, follicle, stents, bracket, scaffold, hormone, activator, promote, growth factor, print

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | CN 1962858 A (CHILDREN'S MEDICAL CENTER) 16 May 2007 (16.05.2007), description, page 5, paragraph 2, page 13, paragraph 3, page 19, paragraph 1 to page 25, paragraph 5 and page 35, paragraph 4      | 1-10                  |
| Y         | WO 2016123362 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 04 August 2016 (04.08.2016), claim 16, and description, paragraph [0045]                                                                                   | 1-10                  |
| Y         | CN 104769101 A (ANTHROGENESIS CORPORATION) 08 July 2015 (08.07.2015), claims 1-3, and description, paragraphs [0009]-[0012], [0040], [0060], [0065], [0079], [0082], [0098], [0118]-[0121] and [0189] | 1-10                  |
| Y         | CN 105039245 A (ZHEJIANG UNIVERSITY et al.) 11 November 2015 (11.11.2015), the abstract, claims 1 and 5, and description, figure 2                                                                    | 1-10                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "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                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "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                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "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 |
| "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) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "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                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                               |                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>17 July 2018                                                                                                                                     | Date of mailing of the international search report<br>27 July 2018  |
| Name and mailing address of the ISA<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No. (86-10) 62019451 | Authorized officer<br>PANG, Limin<br>Telephone No. (86-10) 62084751 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2017/116620

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages    | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | CN 105916977 A (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 31 August 2016 (31.08.2016), entire document | 1-10                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2017/116620

### 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.: 9  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[See extra sheet]
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).

### Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

#### Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/116620

Continuation of Box No. II

[1] Claim 9 relates to the use of an artificial ovary as an artificial ovary in the treatment of follicular developmental disorders. The use relates to a method of treatment of the human or animal body by therapy and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). 'The use of the artificial ovary as an artificial ovary in the treatment of the treatment of follicular developmental disorders' in claim 9 is reasonably expected as 'the use of the artificial ovary in the preparation of a product for the treatment of follicular developmental disorders', and the search is made on the subject matter modified upon the reasonable expectation.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2017/116620

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family    | Publication Date  |
|--------------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| CN 1962858 A                               | 16 May 2007      | WO 03043675 A1   | 30 May 2003       |
|                                            |                  | DE 60239217 D1   | 31 March 2011     |
|                                            |                  | EP 1448247 B1    | 16 February 2011  |
|                                            |                  | US 2003096407 A1 | 22 May 2003       |
|                                            |                  | KR 20050044498 A | 12 May 2005       |
|                                            |                  | US 2003096406 A1 | 22 May 2003       |
|                                            |                  | CA 2467558 C     | 14 July 2009      |
|                                            |                  | US 7806937 B2    | 05 October 2010   |
|                                            |                  | CN 1294996 C     | 17 January 2007   |
|                                            |                  | US 7429490 B2    | 30 September 2008 |
|                                            |                  | CN 1615161 A     | 11 May 2005       |
|                                            |                  | AU 2002343749 A1 | 10 June 2003      |
|                                            |                  | US 7049057 B2    | 23 May 2006       |
|                                            |                  | EP 1448247 A1    | 25 August 2004    |
|                                            |                  | US 2005208026 A1 | 22 September 2005 |
|                                            |                  | BR 0214212 A     | 26 October 2004   |
|                                            |                  | JP 4065846 B2    | 26 March 2008     |
|                                            |                  | AU 2002343749 B2 | 12 July 2007      |
|                                            |                  | JP 2005514971 A  | 26 May 2005       |
| WO 2016123362 A1                           | 04 August 2016   | US 2017369851 A1 | 28 December 2017  |
|                                            |                  | WO 2016123362 A8 | 22 September 2016 |
| CN 104769101 A                             | 08 July 2015     | KR 20150059754 A | 02 June 2015      |
|                                            |                  | CA 2883392 A1    | 13 March 2014     |
|                                            |                  | RU 2015112292 A  | 27 October 2016   |
|                                            |                  | AU 2013312924 A1 | 19 March 2015     |
|                                            |                  | MX 2015002710 A  | 23 July 2015      |
|                                            |                  | EP 2892998 A1    | 15 July 2015      |
|                                            |                  | JP 2015529523 A  | 08 October 2015   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2017/116620

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family    | Publication Date |
|--------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                            |                  | WO 2014039427 A1 | 13 March 2014    |
|                                            |                  | EP 2892998 A4    | 27 April 2016    |
|                                            |                  | US 2015224226 A1 | 13 August 2015   |
|                                            |                  | CN 107760646 A   | 06 March 2018    |
| CN 105039245 A                             | 11 November 2015 | None             |                  |
| CN 105916977 A                             | 31 August 2016   | EP 3055408 A4    | 14 June 2017     |
|                                            |                  | EP 3055408 A1    | 17 August 2016   |
|                                            |                  | WO 2015054315 A1 | 16 April 2015    |
|                                            |                  | CA 2932581 A1    | 16 April 2015    |
|                                            |                  | US 2016237402 A1 | 18 August 2016   |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/116620

| <b>A. 主题的分类</b><br>A61L 27/40(2006.01)i; A61L 27/54(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/075(2010.01)i<br><br>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>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)<br>A61L; C12N<br><br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br><br>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))<br>USTXT, CNTXT, CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, WANFANG DATA: 深圳先进技术研究, 人造, 卵巢, 卵泡, 支架, 激素, 激活, 促进, 生长因子, FSH, ITS, LH, EGF, 3D, 3-D, 打印, artificial, synthetic, ovarian, ovary, ovarium, germarium, ootheca, follicle, stents, bracket, scaffold, hormone, activator, promote, growth factor, print                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                          |                                      |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| <b>C. 相关文件</b> <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>Y</td> <td>CN 1962858 A (儿童医疗中心有限公司) 2007年 5月 16日 (2007 - 05 - 16)<br/>说明书第5页第2段、13页第3段、19页第1段-25页第5段、35页第4段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016123362 A1 (UNIV NORTHWESTERN) 2016年 8月 4日 (2016 - 08 - 04)<br/>权利要求16, 说明书第45段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104769101 A (人类起源公司) 2015年 7月 8日 (2015 - 07 - 08)<br/>权利要求1-3, 说明书第9-12、40、60、65、79、82、98、118-121、189段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105039245 A (浙江大学等) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11)<br/>摘要, 权利要求1、5, 说明书附图2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105916977 A (东北大学) 2016年 8月 31日 (2016 - 08 - 31)<br/>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 | Y | CN 1962858 A (儿童医疗中心有限公司) 2007年 5月 16日 (2007 - 05 - 16)<br>说明书第5页第2段、13页第3段、19页第1段-25页第5段、35页第4段 | 1-10 | Y | WO 2016123362 A1 (UNIV NORTHWESTERN) 2016年 8月 4日 (2016 - 08 - 04)<br>权利要求16, 说明书第45段 | 1-10 | Y | CN 104769101 A (人类起源公司) 2015年 7月 8日 (2015 - 07 - 08)<br>权利要求1-3, 说明书第9-12、40、60、65、79、82、98、118-121、189段 | 1-10 | Y | CN 105039245 A (浙江大学等) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11)<br>摘要, 权利要求1、5, 说明书附图2 | 1-10 | A | CN 105916977 A (东北大学) 2016年 8月 31日 (2016 - 08 - 31)<br>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                              |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | CN 1962858 A (儿童医疗中心有限公司) 2007年 5月 16日 (2007 - 05 - 16)<br>说明书第5页第2段、13页第3段、19页第1段-25页第5段、35页第4段         | 1-10                                 |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | WO 2016123362 A1 (UNIV NORTHWESTERN) 2016年 8月 4日 (2016 - 08 - 04)<br>权利要求16, 说明书第45段                     | 1-10                                 |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | CN 104769101 A (人类起源公司) 2015年 7月 8日 (2015 - 07 - 08)<br>权利要求1-3, 说明书第9-12、40、60、65、79、82、98、118-121、189段 | 1-10                                 |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | CN 105039245 A (浙江大学等) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11)<br>摘要, 权利要求1、5, 说明书附图2                             | 1-10                                 |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | CN 105916977 A (东北大学) 2016年 8月 31日 (2016 - 08 - 31)<br>全文                                                | 1-10                                 |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| <input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                          |                                      |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| * 引用文件的具体类型:<br>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>“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)<br>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>“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<br>“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<br>“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<br>“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<br>“&” 同族专利的文件                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          |                                      |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| 国际检索实际完成的日期<br><br>2018年 7月 17日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                          | 国际检索报告邮寄日期<br><br>2018年 7月 27日       |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br><br>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                          | 受权官员<br><br>庞立敏<br><br>电话号码 62084751 |      |                   |         |   |                                                                                                  |      |   |                                                                                      |      |   |                                                                                                          |      |   |                                                                              |      |   |                                                           |      |

## 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： 9  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求9涉及人造卵巢作为人造卵巢治疗卵泡发育障碍疾病的用途，该用途属于对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1中所列的不要求国际检索单位进行检索的主题。将权利要求9中“所述人造卵巢作为人造卵巢治疗卵泡发育障碍疾病的用途”合理预期为“所述人造卵巢作为制备治疗卵泡发育障碍疾病产品的用途”，检索所针对的是合理预期后修改的主题。
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/CN2017/116620

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |             | 公布日<br>(年/月/日)   |
|-------------|------------|----|----------------|------|-------------|------------------|
| CN          | 1962858    | A  | 2007年 5月 16日   | WO   | 03043675    | A1 2003年 5月 30日  |
|             |            |    |                | DE   | 60239217    | D1 2011年 3月 31日  |
|             |            |    |                | EP   | 1448247     | B1 2011年 2月 16日  |
|             |            |    |                | US   | 2003096407  | A1 2003年 5月 22日  |
|             |            |    |                | KR   | 20050044498 | A 2005年 5月 12日   |
|             |            |    |                | US   | 2003096406  | A1 2003年 5月 22日  |
|             |            |    |                | CA   | 2467558     | C 2009年 7月 14日   |
|             |            |    |                | US   | 7806937     | B2 2010年 10月 5日  |
|             |            |    |                | CN   | 1294996     | C 2007年 1月 17日   |
|             |            |    |                | US   | 7429490     | B2 2008年 9月 30日  |
|             |            |    |                | CN   | 1615161     | A 2005年 5月 11日   |
|             |            |    |                | AU   | 2002343749  | A1 2003年 6月 10日  |
|             |            |    |                | US   | 7049057     | B2 2006年 5月 23日  |
|             |            |    |                | EP   | 1448247     | A1 2004年 8月 25日  |
|             |            |    |                | US   | 2005208026  | A1 2005年 9月 22日  |
|             |            |    |                | BR   | 0214212     | A 2004年 10月 26日  |
|             |            |    |                | JP   | 4065846     | B2 2008年 3月 26日  |
|             |            |    |                | AU   | 2002343749  | B2 2007年 7月 12日  |
|             |            |    |                | JP   | 2005514971  | A 2005年 5月 26日   |
| WO          | 2016123362 | A1 | 2016年 8月 4日    | US   | 2017369851  | A1 2017年 12月 28日 |
|             |            |    |                | WO   | 2016123362  | A8 2016年 9月 22日  |
| CN          | 104769101  | A  | 2015年 7月 8日    | KR   | 20150059754 | A 2015年 6月 2日    |
|             |            |    |                | CA   | 2883392     | A1 2014年 3月 13日  |
|             |            |    |                | RU   | 2015112292  | A 2016年 10月 27日  |
|             |            |    |                | AU   | 2013312924  | A1 2015年 3月 19日  |
|             |            |    |                | MX   | 2015002710  | A 2015年 7月 23日   |
|             |            |    |                | EP   | 2892998     | A1 2015年 7月 15日  |
|             |            |    |                | JP   | 2015529523  | A 2015年 10月 8日   |
|             |            |    |                | WO   | 2014039427  | A1 2014年 3月 13日  |
|             |            |    |                | EP   | 2892998     | A4 2016年 4月 27日  |
|             |            |    |                | US   | 2015224226  | A1 2015年 8月 13日  |
|             |            |    |                | CN   | 107760646   | A 2018年 3月 6日    |
|             |            |    |                | 无    |             |                  |
| CN          | 105039245  | A  | 2015年 11月 11日  | 无    |             |                  |
| CN          | 105916977  | A  | 2016年 8月 31日   | EP   | 3055408     | A4 2017年 6月 14日  |
|             |            |    |                | EP   | 3055408     | A1 2016年 8月 17日  |
|             |            |    |                | WO   | 2015054315  | A1 2015年 4月 16日  |
|             |            |    |                | CA   | 2932581     | A1 2015年 4月 16日  |
|             |            |    |                | US   | 2016237402  | A1 2016年 8月 18日  |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)