

(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
2020 年 8 月 6 日 (06.08.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/156387 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 35/12 (2015.01) *C12N 5/00* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

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。

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/073591

(22) 国际申请日: 2020 年 1 月 21 日 (21.01.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910099941.8 2019 年 1 月 31 日 (31.01.2019) CN

(71) 申请人: 华东理工大学(EAST CHINA UNIVERSITY
OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国
上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai
200237 (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: 刘昌胜(LIU, Changsheng); 中国上海市徐
汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。戴
凯(DAI, Kai); 中国上海市徐汇区梅陇路 130
号, Shanghai 200237 (CN)。王靖(WANG, Jing);
中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai
200237 (CN)。张庆昊(ZHANG, Qinghao); 中国
上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237
(CN)。邓顺书(DENG, Shunshu); 中国上海市
徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。
李贵龙(LI, Guilong); 中国上海市徐汇区梅陇
路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司
(XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀
区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106
室, Shanghai 200333 (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: STEM CELL GENERATOR AND CONSTRUCTION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 干细胞发生器及其构建方法

(57) Abstract: Disclosed are a stem cell generator, a construction method therefor and the use thereof. The stem cell generator is formed by implanting a biological material loaded with active substances and/or cells, or a biological material with an osteogenic induction capability into animal or human bodies and producing organoids upon development.

(57) 摘要: 一种干细胞发生器及其构建方法和用途, 该干细胞发生器由负载活性物质和/或细胞的生物材料, 或本身具有成骨诱导能力的生物材料植入动物或人体内经发育后产生类器官而形成。



WO 2020/156387 A1

干细胞发生器及其构建方法

技术领域

本发明属于材料、生命与医学的交叉领域，涉及一种干细胞发生器及其构建方法。

背景技术

人体骨骼系统除承担力学支撑作用外，所含有的骨髓组织为存在于其中的造血干/祖细胞，间充质干细胞等各种多能干细胞提供适宜的微环境，保证干细胞的正常功能，如造血发育，骨组织再生等。骨髓组织中存在两种典型的干细胞，即造血干细胞与间充质干细胞。

造血干细胞是一类具有自我更新，多系分化能力的多能干细胞，是迄今为止临床应用最为广泛的一类干细胞。造血干细胞移植（HSCT）疗法是在针对造血系统损伤患者，如白血病患者、接受放化疗后造血受到障碍患者，为其输入健康的造血干细胞（HSC），重建患者造血和免疫系统的治疗方法。许多临床治疗结果表明造血干细胞移植对于各种恶性血液病、肿瘤、造血功能衰竭、重度放射病、遗传性疾病等疾病的治疗有良好的效果。

间充质干细胞是一类能够贴壁生长的、成纤维细胞样的多能干细胞，体外培养表现出向成骨、成软骨及成脂分化能力。由于其易于分离培养，且可塑性极强，来源广泛，可用于治疗早衰症、脊髓损伤、失眠症、卵巢损伤、老年痴呆症、慢性创面、肝硬化、自体免疫性疾病等疾病，是当今干细胞治疗中最常用的一类干细胞。

现有获得干细胞的方法，通常为体外方法，如胚胎干细胞、脐带血干细胞、成体干细胞在体外转化诱导形成诱导性多能干细胞（iPS），以及体外培养扩增干细胞等，获得量少。骨髓是多种干细胞栖息的场所。但由于骨髓中涉及各类细胞、多种生长因子/细胞因子及复杂的微环境，体外方法无法仿制。

发明内容

本发明的目的在于提供一种干细胞发生器，由负载活性物质的生物材料或本身具有活性的生物材料，植入体内后经发育过程产生功能化的类骨器官，其中含有多种包括造血干/祖细胞、间充质干细胞等在内的多能干细胞。

本发明的第一方面，提供一种干细胞发生器，所述干细胞发生器由负载活性物质和/或细胞的生物材料、或本身具有成骨诱导能力的生物材料植入动物或人体内经发育后产生类器官而形成。

在另一优选例中，所述活性物质为骨形态发生蛋白-2（Bone Morphogenetic Protein-2，BMP-2）、骨形态发生蛋白-7（Bone Morphogenetic Protein-7，BMP-7）、成骨多肽（Osteogenic peptides）或其他具有诱导骨再生、血管生成能力的生长因子如VEGF，PDG、多肽或生长因子/多肽组合。

在另一优选例中，所述骨形态发生蛋白-2为重组骨形态发生蛋白-2。

在另一优选例中，所述骨形态发生蛋白-7为重组骨形态发生蛋白-7。

在另一优选例中，所述细胞为间充质干细胞，所述间充质干细胞为骨髓来源间充质干细胞、脂肪来源间充质干细胞或其他来源间充质干细胞；其他类型具有成骨分化能力的细胞；辅助间充质干细胞成骨分化的细胞，如血管内皮细胞等。

在另一优选例中，所述生物材料选自：胶原、明胶、壳聚糖、海藻酸、透明质酸、细菌纤维素、聚乳酸、聚乙交酯、聚丙交酯、聚羟基脂肪酸酯、聚碳酸酯、聚己内酯、聚乙

二醇、聚富马酸、羟基磷灰石、硫酸钙、磷酸三钙、磷酸四钙、磷酸八钙、偏磷酸钙、磷酸镁、焦磷酸盐、硅酸钙、生物玻璃、脱钙骨基质等中的一种或其共聚/共混组合。

在另一优选例中，所述生物材料为自体骨或同种异体骨。

在另一优选例中，所述动物或人体内是指动物或人的肌袋、肌肉间隙、肌肉内、皮下、或腹腔背侧肌肉。

在另一优选例中，所述干细胞发生器中含有T细胞（CD3⁺），B细胞（B220⁺），髓系细胞（CD11b⁺），红细胞（Ter119⁺）、造血祖细胞（LKS⁻），造血干细胞（LKS⁺）。

本发明中，所述的类器官具有与原位骨相似的结构与功能，包括完整的骨组织、骨髓样组织及各种功能干细胞。

在另一优选例中，所述类器官中包含干细胞，所述干细胞为造血干/祖细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞或其他种类多能干细胞。

本发明中，利用负载活性物质和/或具有成骨诱导能力的生物材料，或本身具有成骨诱导能力的生物材料，植入动物/人的体内，创建一个特殊的局部微环境，经过一定时间的体内发育，形成特定功能的类器官，该类器官具有产生干细胞的功能，在特定时间内在类器官内产生具有功能的干细胞。

以骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)为代表的成骨活性生长因子具有异位诱导成骨的作用，其在体内微环境共同作用下，诱导发育产生特定类器官，其中含有功能完备的骨髓，以及多种多能干细胞，成为干细胞发生器。所形成的细胞包括红系、髓系及巨细胞等完整的造血前体细胞和具有长期重建能力的造血干细胞，能够重建受致死剂量辐照小鼠的造血系统；同时，干细胞发生器中还可产生大量间充质干细胞，其含量高于正常骨髓中的含量。

在另一优选例中，所述活性物质与生物材料的质量比范围为0.0001-1:1。

在另一优选例中，所用细胞的接种数量为每100-150mm³生物材料接种1×10⁵-5×10⁸个细胞。

本发明的第二方面，提供第一方面所述的干细胞发生器的构建方法，包括以下步骤：

- (1) 将生物材料植入动物或人体内；
- (2) 经体内发育后产生类器官从而形成所述干细胞发生器，其中，

所述生物材料为负载活性物质和/或细胞的生物材料、或本身具有成骨诱导能力的生物材料。

在另一优选例中，所述活性物质为骨形态发生蛋白-2 (Bone Morphogenetic Protein-2, BMP-2)、骨形态发生蛋白-7 (Bone Morphogenetic Protein-7, BMP-7)、成骨多肽 (Osteogenic peptides) 或其他具有诱导骨再生、血管生成能力的生长因子如VEGF, PDG、多肽或生长因子/多肽组合。

在另一优选例中，所述骨形态发生蛋白-2为重组骨形态发生蛋白-2。

在另一优选例中，所述骨形态发生蛋白-7为重组骨形态发生蛋白-7。

在另一优选例中，所述细胞为间充质干细胞，所述间充质干细胞为骨髓来源间充质干细胞、脂肪来源间充质干细胞或其他来源间充质干细胞；其他类型具有成骨分化能力的细胞；辅助间充质干细胞成骨分化的细胞，如血管内皮细胞等。

在另一优选例中，所述生物材料选自：胶原、明胶、壳聚糖、海藻酸、透明质酸、细菌纤维素、聚乳酸、聚乙交酯、聚丙交酯、聚羟基脂肪酸酯、聚碳酸酯、聚己内酯、聚乙

二醇、聚富马酸、羟基磷灰石、硫酸钙、磷酸三钙、磷酸四钙、磷酸八钙、偏磷酸钙、磷酸镁、焦磷酸盐、硅酸钙、生物玻璃、脱钙骨基质等中的一种或其共聚/共混组合。

在另一优选例中，所述生物材料为自体骨或同种异体骨。

在另一优选例中，所述动物或人体内是指动物或人的肌袋、肌肉间隙、肌肉内、皮下、或腹腔背侧肌肉。

本发明中，所述的类器官具有与原位骨相似的结构与功能，包括完整的骨组织、骨髓样组织及各种功能干细胞。

在另一优选例中，所述类器官中包含干细胞，所述干细胞为造血干/祖细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞或其他种类多能干细胞。

本发明的第三方面，提供一种富集干细胞的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 将生物材料植入动物或人体内；

(2) 经体内发育后产生类器官并富集所述干细胞，其中，

所述生物材料为负载活性物质和/或细胞的生物材料、或本身具有成骨诱导能力的生物材料。

在另一优选例中，所述活性物质为骨形态发生蛋白-2 (Bone Morphogenetic Protein-2, BMP-2)、骨形态发生蛋白-7 (Bone Morphogenetic Protein-7, BMP-7)、成骨多肽 (Osteogenic peptides) 或其他具有诱导骨再生、血管生成能力的生长因子如VEGF, PDG、多肽或生长因子/多肽组合。

在另一优选例中，所述骨形态发生蛋白-2为重组骨形态发生蛋白-2。

在另一优选例中，所述骨形态发生蛋白-7为重组骨形态发生蛋白-7。

在另一优选例中，所述细胞为间充质干细胞，所述间充质干细胞为骨髓来源间充质干细胞、脂肪来源间充质干细胞或其他来源间充质干细胞；其他类型具有成骨分化能力的细胞；辅助间充质干细胞成骨分化的细胞，如血管内皮细胞等。

在另一优选例中，所述生物材料选自：胶原、明胶、壳聚糖、海藻酸、透明质酸、细菌纤维素、聚乳酸、聚乙交酯、聚丙交酯、聚羟基脂肪酸酯、聚碳酸酯、聚己内酯、聚乙二醇、聚富马酸、羟基磷灰石、硫酸钙、磷酸三钙、磷酸四钙、磷酸八钙、偏磷酸钙、磷酸镁、焦磷酸盐、硅酸钙、生物玻璃、脱钙骨基质等中的一种或其共聚/共混组合。

在另一优选例中，所述生物材料为自体骨或同种异体骨。

在另一优选例中，所述动物或人体内是指动物或人的肌袋、肌肉间隙、肌肉内、皮下、或腹腔背侧肌肉。

本发明中，所述的类器官具有与原位骨相似的结构与功能，包括完整的骨组织、骨髓样组织及各种功能干细胞。

在另一优选例中，所述类器官中包含干细胞，所述干细胞为造血干/祖细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞或其他种类多能干细胞。

本发明的第四方面，提供第一方面所述的干细胞发生器的用途，用于制备预防和/或治疗移植物抗宿主病、造血损伤的材料或制备骨髓移植的材料。

本发明中，干细胞的用途，用于制备治疗造血损伤的药物。

在另一优选例中，所述造血损伤为放、化疗引起的造血损伤。

在另一优选例中，所述治疗是用干细胞发生器中产生的骨髓细胞移植治疗。在另一优

选例中，骨髓细胞是由干细胞发生器中的细胞制成的单细胞悬液。

在另一优选例中，所述骨髓细胞来自于由负载生长因子和/或细胞的生物材料、或具有成骨诱导能力的生物材料植入动物/人肌袋或皮下等部位，经一段时间发育形成的类器官（干细胞发生器）内。

在另一优选例中，所用的细胞为脂肪来源间充质干细胞、骨髓来源间充质干细胞或其他具有成骨分化能力的细胞或其组合。

在另一优选例中，所产生的细胞为造血干/祖细胞（HSC/HPC）、间充质干细胞（MSC）或其他种类多能干细胞。

本发明中，干细胞的用途，还用于制备促进放化疗造成的骨髓衰竭后的血细胞及造血祖/干细胞的恢复的药物。

本发明中，干细胞的用途，还用于制备骨髓移植材料、用于制备治疗造血功能低下的药物、用于制备治疗白细胞减少症的药物、或用于制备治疗急性或慢性白血病的药物。

在另一优选例中，所述干细胞发生器，可用于以下场合或病症治疗：

- （1）用于骨髓移植；
- （2）促进放/化疗后造血系统的恢复；
- （3）治疗白血病等血液系统异常症。

在另一优选例中，骨髓细胞在放疗、化疗的之前、之中、或之后使用。

在另一优选例中，所述造血功能低下为放、化疗损伤药物引起的造血功能低下或骨髓抑制引起的造血功能低下。

在另一优选例中，所述制备包括将所述干细胞发生器在缓冲液中研磨、压碎、过细胞筛后得到单细胞悬液。

本发明产生干细胞的方法，完全不同于现有获得干细胞的方法，如胚胎干细胞、脐带血干细胞、成体干细胞在体外转化诱导形成诱导性多能干细胞（iPS），以及体外培养扩增干细胞等。本发明的干细胞发生器，由负载活性物质的生物材料或本身具有活性的生物材料，在体内诱导产生功能化的类骨器官，其中含有多种包括造血干/祖细胞、间充质干细胞等在内的多能干细胞。

本发明研究结果表明，该干细胞发生器能够对造血祖/干细胞、间充质干细胞等多能干细胞诱导产生或进行高度富集，并且其诱导产生或高度富集的多能干细胞功能完备，可用于需要相关干细胞的科学研究或临床治疗。本发明方法是一个全新的产生/获取干细胞的方法，为干细胞的获取开辟了一条全新的途径，具有重要的科学意义和广阔的应用前景。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。说明书中所揭示的各个特征，可以被任何提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。限于篇幅，在此不再一一赘述。

附图说明

图1显示了1周、3周时，不同剂量rhBMP-2诱导产生的类器官，是干细胞发生器。

图2显示了1周、3周时，30 μg rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器的H&E切片图片。

图3显示了负载人骨髓间充质干细胞的复合胶原海绵植入NCG小鼠皮下8周时产生的干细胞发生器。

图4显示了人骨髓间充质干细胞复合胶原海绵植入NCG小鼠皮下8周时产生的干细胞

发生器H&E切片图。

图5、图6分别显示了3周时由负载30 μg rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器中各系血细胞的流式典型图、比例图。

图7、图8分别显示了3周时由负载30 μg rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器中造血祖/干细胞的流式典型图、比例图。

图9、图10分别显示了3周时由负载10 μg rhBMP-7诱导产生的干细胞发生器中造血祖/干细胞的流式典型图、比例图。

图11显示了利用干细胞发生器中所产生的造血干细胞进行长期竞争性重建时不同时间点的流式典型图。

图12显示了利用干细胞发生器中所产生的造血干细胞进行长期竞争性重建时不同时间点的CD45.1细胞重建比例图。

图13、图14和图15分别显示了利用干细胞发生器中所产生的造血干细胞进行长期竞争性重建时不同时间点的B细胞（B220+细胞）、T细胞（CD3+细胞）、髓系细胞（CD11b+细胞）重建比例图。

图16、图17分别显示了由负载30 μg rhBMP-2的生物材料诱导产生的干细胞发生器中1周、3周时间充质干细胞的流式典型图、比例图。

图18、图19、图20和图21分别示出材料植入后产生的干细胞发生器的宏观图、H&E切片图、流式典型图、流式统计图。

图22、图23和图24分别显示了6.0 Gy、7.0 Gy、8.0 Gy辐照剂量时尾静脉注射细胞后小鼠体重数变化。

图25、图26和图27分别显示了6.0 Gy、7.0 Gy、8.0 Gy辐照剂量时尾静脉注射细胞后小鼠白细胞数变化。

图28、图29和图30分别显示了6.0 Gy、7.0 Gy、8.0 Gy辐照剂量时尾静脉注射细胞后小鼠红细胞数变化。

图31、图32和图33分别显示了6.0 Gy、7.0 Gy、8.0 Gy显示了6.0 Gy辐照剂量时尾静脉注射细胞后小鼠血小板数变化。

图34、35、36和图37分别显示了实施例10材料植入8周后产生的干细胞发生器的宏观图、H&E切片图、流式典型图和流式统计图。

具体实施方式

本发明人基于长期而深入的研究，发现本身具有成骨诱导能力的生物材料（如自体骨、同种异体骨等）或负载活性物质和/或细胞（如BMP-2、BMP-7或间充质干细胞）的生物材料植入体内后，经发育后产生类器官可形成干细胞发生器，其中含有各系造血细胞及造血祖/干细胞，以及高比例的间充质干细胞。这些干细胞功能完备，可进一步用于干细胞的科学研究及临床应用。可基于干细胞发生器中的造血干/祖细胞或间充质干细胞等多种多能干细胞开发出相应的干细胞疗法。在此基础上，完成了本发明。

术语

“干细胞发生器”为负载活性物质和/或细胞的生物材料，或本身具有成骨诱导能力的生物材料，植入动物/人的体内，形成一个特殊的局部微环境，经过一定时间的体内发育，形成特定功能的类器官，在该类器官内可产生富含各种功能化的干细胞。

本发明中，所述的类器官具有与原位骨相似的结构与功能，包括完整的骨组织、骨髓

样组织及各种功能干细胞。

类器官通常是采用体外方法构建的。骨髓是多种干细胞栖息的场所。但由于骨髓中涉及各类细胞、多种生长因子/细胞因子及复杂的微环境，体外方法无法仿制。本发明采用体内构建的方法，利用材料和活性分子形成类器官，研究其中的成分，并提出本发明富集干细胞的方法。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

实施例1 植入材料的制备

用真核或原核表达系统合成重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) (Optimized DNA sequences encoding recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), preparation method and the uses thereof. Patent Authorization No. US 7947821 B2; 刘昌胜等, ZL 200610118006.4; ZL200910045832.4;)。

按不同剂量 (10 μ g, 30 μ g, 80 μ g, 200 μ g) 将重组人骨形态发生蛋白-2加入5×5×5mm明胶海绵(质量为10mg)，经冻干后形成含有生长因子的活性材料。

将10 μ g 真核或原核表达系统合成重组人骨形态发生蛋白-7(rhBMP-7)加入5×5×5mm明胶海绵(质量为10mg)，经冻干后形成含有生长因子的活性材料。

将含 1×10^6 个第三代人间充质干细胞 (hMSCs) 的浓缩液接种在5×5×5mm胶原海绵材料(质量为10mg)上，放置于37℃培养箱中孵育2h，形成含细胞的活性材料。

实施例2

使用实施例1的含rhBMP-2活性材料植入体内，发育形成干细胞发生器。将不同剂量 (10 μ g, 30 μ g, 80 μ g, 200 μ g) 的rhBMP-2负载于明胶海绵材料中，植入至C57BL/6雄性小鼠大腿肌肉间隙内，饲养3周后取出形成的类器官，即为干细胞发生器，一部分用于拍摄宏观照片及组织学评价 (图1和图2)，另一部分去除表面附着的肌肉后，在研钵中加入少许PBS缓冲液，再使用研杵将该类器官 (干细胞发生器) 压碎，过细胞筛后得到单细胞悬液。所得到的单细胞悬液可用于后续实验。

图1为不同剂量 rhBMP-2植入1周或3周时产生的干细胞发生器。大体观察可见外观为类骨样组织。

图2为30 μ g rhBMP-2诱导生成的干细胞发生器1周及3周时H&E切片图，从中可以看出1周时，类器官 (干细胞发生器) 中出现软骨细胞，3周时，类器官 (干细胞发生器) 中出现明显的骨髓样组织。

实施例3

使用实施例1的含rhBMP-7活性材料体内产生干细胞发生器。

将10 μ g rhBMP-7负载于明胶海绵材料中，植入至C57BL/6雄性小鼠大腿肌肉内，饲养3周后取出干细胞发生器，去除表面附着的肌肉后，在研钵中加入少许Hank's平衡盐溶液

(HBSS)，再使用研杵将干细胞发生器压碎，过细胞筛后得到单细胞悬液。所得到的单细胞悬液可用于后续实验。

实施例4

使用实施例1的负载人骨髓间充质干细胞的胶原海绵，将材料植入至雄性NCG免疫缺陷小鼠大腿肌肉内。饲养3周后取出干细胞发生器，一部分用于拍摄宏观照片及组织学评价（图3和图4），另一部分去除表面附着的肌肉后，在研钵中加入少许缓冲液，再使用研杵将干细胞发生器压碎，过细胞筛后得到单细胞悬液。所得到的单细胞悬液可用于后续实验。

实施例5

rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器所含各血系细胞及造血祖/干细胞含量检测。

该实施例的目的是检测干细胞发生器中各血系细胞及造血祖/干细胞比例，并与正常骨髓的相应细胞进行含量比较，证明干细胞发生器中具有功能完备的造血系统，含有各血系细胞及造血祖/干细胞，可提供用于造血功能异常的治疗。

含rhBMP-2活性材料为实施例1中制得的负载30 μg rhBMP-2的明胶海绵支架；

单细胞悬液为按照实施例2方法制得的单细胞悬液

方法：采用SPF级C57BL/6小鼠，雄性，8周龄，随机分组，随后于大腿肌肉中植入实施例1中所制得的含30 μg rhBMP-2的材料。饲养3周后取出形成的类器官，即为干细胞发生器。将得到的干细胞发生器去除表面附着的肌肉后，在研钵中加入少许PBS缓冲液，再使用研杵将该类器官（干细胞发生器）压碎，过细胞筛后得到单细胞悬液。所得到的单细胞悬液可用于后续流式检测试验。实验分组（列表）如下：

组别	原位骨髓组	干细胞发生器组
数量	5	5

图5和图6为rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器中各血系细胞流式检测典型图及对应各血系细胞比例图。

图5所示流式典型图显示干细胞发生器中有完整的血系细胞，表现为含有T细胞（CD3⁺），B细胞（B220⁺），髓系细胞（CD11b⁺），红细胞（Ter119⁺）。

图6显示干细胞发生器中B细胞、红细胞、T细胞比例显著高于原位骨髓组中相应细胞比例，而髓系细胞比例则明显低于原位骨髓组比例，表明干细胞发生器具有完整的血系细胞，但与原位骨髓组比例不完全一致。

图7和图8为rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器中造血祖/干细胞流式检测典型图及造血祖/干细胞比例图。图7所示流式典型图显示干细胞发生器中有完整的造血祖/干细胞，表现为含有造血祖细胞（LKS⁻），造血干细胞（LKS⁺）。图8显示干细胞发生器中造血祖/干细胞相较于原位骨髓组无显著性差异。表明干细胞发生器具有完整的造血祖/干细胞，可为治疗放、化疗后骨髓损伤造血功能低下的治疗提供细胞。

实施例6

含10 μg rhBMP-7活性材料诱导产生的干细胞发生器中所含造血祖/干细胞含量检测。

该实施例的目的是检测干细胞发生器中造血祖/干细胞比例，并与正常骨髓的相应细胞进行含量比较，证明干细胞发生器骨髓中具有功能完备的造血系统，含有造血祖/干细胞，可用于造血功能异常的治疗。

含rhBMP-7活性材料为实施例1方法制得的负载10 μg rhBMP-7的明胶海绵支架；

单细胞悬液为按照实施例3方法制得的单细胞悬液

方法：采用SPF级C57BL/6小鼠，雄性，8周龄，随机分组，随后于大腿肌肉中植入所制得的含10 μg rhBMP-7的材料。饲养3周后取出形成的类器官，即为干细胞发生器。将得到的干细胞发生器去除表面附着的肌肉后，在研钵中加入少许PBS缓冲液，再使用研杵将该类器官（干细胞发生器）压碎，过细胞筛后得到单细胞悬液。所得到的单细胞悬液可用于后续流式检测试验。实验分组（列表）如下：

组别	原位骨髓组	干细胞发生器组
数量	5	5

图9和图10为rhBMP-7诱导产生的干细胞发生器中造血祖/干细胞流式检测典型图及造血祖/干细胞比例图。图9所示流式典型图显示干细胞发生器中有完整的造血祖/干细胞，表现为含有造血祖细胞（LKS-），造血干细胞（LKS+）。图10显示干细胞发生器中造血祖/干细胞含量显著高于原位骨髓组，表明干细胞发生器具有丰富的造血祖/干细胞，可为造血功能异常的治疗提供细胞。

实施例7 含rhBMP-2活性材料诱导产生的干细胞发生器中造血干/祖细胞多能性评价。

该实施例的目的是评价rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器中造血干/祖细胞的多能性，利用干细胞发生器中的细胞（CD45.1）与原位骨髓细胞（CD45.2）共混后，长期竞争性重建经10 Gy X射线辐照摧毁的小鼠（CD45.2）造血系统，其中若来自干细胞发生器的细胞占血细胞比例超过0.1%，即视为干细胞发生器中的造血干/祖细胞具有多能性，为造血功能异常的治疗提供现实依据。

含rhBMP-2活性材料为实施例1方法制得的负载30 μg rhBMP-2的明胶海绵支架；

方法：采用SPF级C57BL/6的CD45.1雄性小鼠，8周龄，随机分组，随后于大腿肌肉中植入实施例1中所制得的含30 μg rhBMP-2的材料。饲养3周后取出形成的类器官，即为干细胞发生器。将得到的干细胞发生器及股骨或髌骨分别去除表面附着的肌肉后，在研钵中加入少许PBS缓冲液，再使用研杵将该类器官（干细胞发生器）及股骨或髌骨压碎，过细胞筛后得到干细胞发生器CD45.1单细胞悬液和原位骨髓CD45.1单细胞悬液。另采用同等周龄的SPF级C57BL/6 CD45.2小鼠，取其股骨及髌骨骨髓制CD45.2单细胞悬液。将 1×10^6 个干细胞发生器或原位骨髓CD45.1细胞与 2×10^5 个CD45.2细胞分别混合制成两组200 μL 单细胞悬液后移植到经过10 Gy X射线照射的CD45.2受体小鼠体内。得所得到的单细胞悬液用于后续的干细胞移植试验。之后在6周、12周和20周取各组受体小鼠外周血做流式检测评价干细胞发生器中所含造血干细胞的多能性。实验分组（列表）如下：

组别	原位骨髓组	干细胞发生器组
数量	5	8

图11-图15是长期竞争性造血重建实验，在不同时间点rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器中各血系细胞流式检测典型图及对应各血系细胞比例图。图12是不同时间点CD45.1细胞比例变化图，可见所有时间点干细胞发生器来源细胞比例皆大于0.1%，即干细胞发生器来源的造血干/祖细胞具有长期造血重建能力。图13-14与图12趋势相同，仅图15的干细胞发生器来源髓系细胞在12周与20周有部分细胞重建比例低于0.1%。总体来说，干细胞发生器中的造血干/祖细胞具有长期造血重建能力，亦即为多能干细胞。

实施例8 rhBMP-2诱导产生的干细胞发生器中骨髓间充质干细胞含量检测。

该实施例的目的是检测含rhBMP-2生物材料诱导产生的干细胞发生器中骨髓中间充

质干细胞的比例,以期利用间充质干细胞治疗骨、软骨缺损修复,移植物抗宿主病(GVHD)等疾病。

含rhBMP-2活性材料为实施例1中制得的含30 μg rhBMP-2的明胶海绵支架;

单细胞悬液为实施例2由含30 μg rhBMP-2的支架体内诱导产生的干细胞发生器制得的单细胞悬液。

方法:采用SPF级C57BL/6雄性小鼠,8周龄,随机分组,随后于大腿肌肉中植入实施例1中所制得的含30 μg rhBMP-2的材料。饲养3周后取出形成的类器官,即为干细胞发生器。将得到的干细胞发生器去除表面附着的肌肉后,在研钵中加入少许PBS缓冲液,再使用研杵将该类器官(干细胞发生器)压碎,过细胞筛后得到单细胞悬液。所得到的单细胞悬液可用于后续流式检测试验。实验分组(列表)如下:

组别	原位骨髓组	干细胞发生器组
数量	5	5

图16和图17为含rhBMP-2活性材料诱导产生的干细胞发生器中,骨髓间充质干细胞流式检测典型图及间充质干细胞比例图。由图17可知,1周时,干细胞发生器中间充质干细胞含量显著高于原位骨髓中的含量。3周时,干细胞发生器中间充质细胞含量趋近原位骨髓中的含量。可见干细胞发生器中富集了大量的间充质干细胞,利用富集的间充质干细胞对治疗骨、软骨缺损修复,移植物抗宿主病(GVHD)等疾病具有重大的潜在利用价值。

实施例9

考察干细胞发生器中骨髓细胞在促进辐照损伤小鼠的造血恢复中的作用。

方法:将30 μg 真核或原核表达系统合成的重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)加入明胶海绵(10mg),经冻干后形成含有生长因子的活性材料。将制好的材料植入8周龄C57BL/6雄性小鼠大腿肌袋内,饲养3周后取出干细胞发生器及原位骨,去除一部分干细胞发生器或原位骨表面附着的肌肉后,在研钵中加入少许PBS缓冲液,再使用研杵将干细胞发生器或原位骨压碎,过细胞筛后得到单细胞悬液,一部分制成200 μL 单细胞悬液,用于骨髓移植;另一部分干细胞发生器及原位骨用于拍摄宏观照片并做H&E切片。

骨髓移植部分:采用SPF级C57BL/6小鼠,雌性,8周龄,随机分组。进一步将上一步制得的单细胞悬液经尾静脉移植入不同分组小鼠体内

实验分组如下:

组别		注射物质	数量
正常对照+PBS 溶液移植组		PBS 溶液	10
6 Gy 辐照	辐照+PBS 溶液移植组	PBS 溶液	5
	辐照+原位骨髓细胞移植组	原位骨髓悬液	5
	辐照+发生器细胞移植组	发生器骨髓悬液	5
7 Gy 辐照	辐照+PBS 溶液移植组	PBS 溶液	5
	辐照+原位骨髓细胞移植组	原位骨髓悬液	5
	辐照+发生器细胞移植组	发生器骨髓悬液	5
8 Gy 辐照	辐照+PBS 溶液移植组	PBS 溶液	5
	辐照+原位骨髓细胞移植组	原位骨髓悬液	5
	辐照+发生器细胞移植组	发生器骨髓悬液	5

小鼠放疗损伤模型:对小鼠按照分组表给定的辐照剂量分别给予一次性钴-60 辐照,即 0 Gy 辐照,6 Gy 辐照,7 Gy 辐照,8 Gy 辐照。

干预治疗：辐照 24 小时后对相应组别辐照小鼠分别给予干预治疗，即尾静脉注射 200 μL PBS 溶液，200 μL 原位骨髓细胞悬液，200 μL 干细胞发生器细胞悬液，其中所注射的原位骨髓细胞悬液或干细胞发生器细胞悬液为实施例 4 所介绍的方法制得的单细胞悬液。之后按设定采样点利用眼眶取血方式采集各组小鼠外周血进行血相检测以观察治疗效果。血相检测指标如下：

(1) 各组分别于第3天，第6天，……（每间隔3天，连续30天）连续检测外周血白细胞（WBC）数；

(2) 各组分别于第3天，第6天，……（每间隔3天，连续30天）连续检测外周血红细胞（RBC）数；

(3) 各组分别于第3天，第6天，……（每间隔3天，连续30天）连续检测外周血血小板（PLT）数；

(4) 各组分别于第3天，第6天，……（每间隔3天，连续30天）连续检测体重数。

图18所示为肌袋植入8周后产生的干细胞发生器数码照片，由图可见干细胞发生器与原位骨颜色相近，暗示其中含有大量红细胞，同时具有类骨形态，但体积相较原位骨更大。图19干细胞发生器的H&E切片图进一步证实干细胞发生器与原位骨的微结构类似，骨髓腔中充满骨髓细胞及血管。

图20、21为干细胞发生器流式检测相关分析，由图可见干细胞发生器与原位骨具有相似的细胞组成，且干细胞发生器中所含的LKS⁺细胞，LSK⁺细胞及造血干细胞（HSCs）比例与原位骨髓中相应细胞比例没有显著性差异。

实施例说明，所构建的干细胞发生器具有与原位骨髓类似的结构与功能，其中所含的造血干/祖细胞具有治疗造血功能异常的潜能。

为了进一步验证干细胞发生器中所含的造血干细胞对于放疗所致造血损伤的治疗效果，对小鼠按照分组表给定的辐照剂量分别给予一次性钴-60辐照（0 Gy，6 Gy，7 Gy，8 Gy）。图22-24是不同辐照剂量下小鼠模型经过治疗后体重的变化情况。由图22可以看出，小鼠经钴60辐照（6.0 Gy）后，立即一次性尾静脉注射200 μL 由干细胞发生器产生的同物种骨髓单细胞悬液后，辐照对照组相比于正常对照组，体重在0至9天内变化不大，而在9天后急剧降低，直至死亡。反之辐照治疗组体重变化与正常对照组保持大致相同的变化趋势。图23、24体重（钴60辐照剂量7.0 Gy和8.0 Gy）的变化趋势与图26、27大抵相同。图24特别需要指出的是，由于辐照剂量过重，辐照对照组在9天内死亡率已达到100%，而治疗组虽稳步上升，但与正常对照组仍有差距。

图25-27是不同辐照剂量下损伤小鼠经过治疗后白细胞数的变化情况。由图25可以看出，辐照后辐照对照组和治疗组白细胞数急剧将至0，但治疗组随时间而白细胞数稳步上升，30天后与正常对照组相平，而辐照对照组仍旧为0。表明辐照小鼠体内经过治疗后，恢复了造血功能，促使白细胞数稳步上升。图26、27白细胞数（钴60辐照剂量7.0 Gy和8.0 Gy）的变化趋势与图23、24体重变化趋势大抵相同。

图28-30是不同辐照剂量下小鼠模型经过治疗后红细胞数的变化情况。由图28可以看出，辐照后经过尾静脉注射治疗，治疗组和正常对照组的红细胞数保持着相同的变化态势，数值差距不大。而辐照对照组在9天内红细胞数快速降至最低值，直至死亡。这说明，辐照组通过注射的骨类器官（干细胞反应器）内骨髓细胞悬液，促进了体内造血分化，恢复了造血功能，促使红细胞数与正常组大抵持平。图29、30红细胞数（钴60辐照剂量7.0 Gy和

8.0 Gy)的变化趋势与图1体重变化趋势大抵相同。

图31-33是不同辐照剂量下小鼠模型经过治疗后血小板数的变化情况。由图31可以看出,辐照后治疗组和辐照对照组都随着时间而急剧降低,9天时降至最低点,之后辐照组保持不变直至死亡,而治疗组逆向上升,随时间逐渐上升至与正常对照组相平,恢复至正常水平。而图32和图33明显不同的是辐照治疗组中使用干细胞发生器内骨髓细胞治疗的恢复幅度和速度虽然低于原位骨组,但总体趋势与正常对照组相同。这与体重变化趋势相吻合。

由此可见,负载rhBMP-2生物材料产生的干细胞发生器中的骨髓细胞对放、化疗引起的造血损伤有有效的治疗作用。其促造血作用,主要是骨髓细胞进入造血系统,改善造血微环境,且其中所含的各类祖/干细胞能够正常分化为各类功能细胞,从而重建造血系统。

实施例10

体内制造的干细胞发生器中含有的造血干细胞含量评价

方法:将5 μ g真核或原核表达系统合成的重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 与 1×10^6 个小鼠间充质干细胞 (mMSCs) 加入含有磷酸三钙 (TCP) 的胶原凝胶 (20mg), 经冻干后形成含有生长因子的活性材料。将制好的活性材料植入8周龄SPF级C57BL/6雄性小鼠背部皮下, 饲养8周后取出干细胞发生器, 去除一部分干细胞发生器表面附着的肌肉后, 在研钵中加入少许PBS缓冲液, 再使用研杵将其压碎, 过细胞筛后得到单细胞悬液。所得到的单细胞悬液可用于流式细胞术检测; 另一部分干细胞发生器用于拍摄宏观照片并做H&E切片。实验分组如下。

组别	原位骨	干细胞发生器
数量	6	6

图34所示为背部皮下植入8周后产生的干细胞发生器数码照片, 由图可见干细胞发生器与原位骨颜色相近, 暗示其中含有大量红细胞, 同时具有类骨形态。图35干细胞发生器的H&E切片图进一步证实干细胞发生器与原位骨的微结构类似, 具有相同的松质骨及皮质骨结构, 骨髓腔中充满骨髓细胞及血管。

图36、37为干细胞发生器流式检测相关分析, 由图可见干细胞发生器与原位骨具有相似的细胞组成, 且干细胞发生器中所含的LKS-细胞, LSK+细胞及造血干细胞 (HSCs) 比例与原位骨髓中相应细胞比例没有显著性差异。

本实施例说明所构建的干细胞发生器具有与原位骨髓类似的结构与功能, 其中所含的造血干/祖细胞具有治疗造血功能异常的潜能。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权利要求书

1、一种干细胞发生器，其特征在于，所述干细胞发生器由负载活性物质和/或细胞的生物材料、或本身具有成骨诱导能力的生物材料植入动物或人体内发育后产生类器官而形成。

2、如权利要求1所述的干细胞发生器的构建方法，其特征在于，所述构建方法包括以下步骤：

(1) 将生物材料植入动物或人体内；

(2) 经体内发育后产生类器官从而形成所述干细胞发生器，其中，

所述生物材料为负载活性物质和/或细胞的生物材料、或本身具有成骨诱导能力的生物材料。

3、一种富集干细胞的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

(1) 将生物材料植入动物或人体内；

(2) 经体内发育后产生类器官并富集所述干细胞，其中，

所述生物材料为负载活性物质和/或细胞的生物材料、或本身具有成骨诱导能力的生物材料。

4、如权利要求1所述的干细胞发生器或权利要求2或3所述的方法，其特征在于，所述活性物质为骨形态发生蛋白-2（Bone Morphogenetic Protein-2，BMP-2）、骨形态发生蛋白-7（Bone Morphogenetic Protein-7，BMP-7）、成骨多肽（Osteogenic peptides）或其他具有诱导骨再生、血管生成能力的生长因子如VEGF，PDG、多肽或生长因子/多肽组合。

5、如权利要求1所述的干细胞发生器或权利要求2或3所述的方法，其特征在于，所述细胞为间充质干细胞，所述间充质干细胞为骨髓来源间充质干细胞、脂肪来源间充质干细胞或其他来源间充质干细胞；其他类型具有成骨分化能力的细胞；辅助间充质干细胞成骨分化的细胞，如血管内皮细胞等。

6、如权利要求1所述的干细胞发生器或权利要求2或3所述的方法，其特征在于，所述生物材料选自：胶原、明胶、壳聚糖、海藻酸、透明质酸、细菌纤维素、聚乳酸、聚乙交酯、聚丙交酯、聚羟基脂肪酸酯、聚碳酸酯、聚己内酯、聚乙二醇、聚富马酸、羟基磷灰石、硫酸钙、磷酸三钙、磷酸四钙、磷酸八钙、偏磷酸钙、磷酸镁、焦磷酸盐、硅酸钙、生物玻璃、脱钙骨基质等中的一种或其共聚/共混组合。

7、如权利要求1所述的干细胞发生器或权利要求2或3所述的方法，其特征在于，所述生物材料为自体骨或同种异体骨。

8、如权利要求1所述的干细胞发生器或权利要求2或3所述的方法，其特征在于，所述动物或人体内是指动物或人的肌袋、肌肉间隙、肌肉内、皮下、或腹腔背侧肌肉。

9、如权利要求1所述的干细胞发生器或权利要求2或3所述的方法，其特征在于，所述类器官中包含干细胞，所述干细胞为造血干/祖细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞或其他种类多能干细胞。

10、如权利要求1所述的干细胞发生器的用途，其特征在于，用于制备预防和/或治疗移植物抗宿主病、造血损伤的材料或制备骨髓移植的材料。

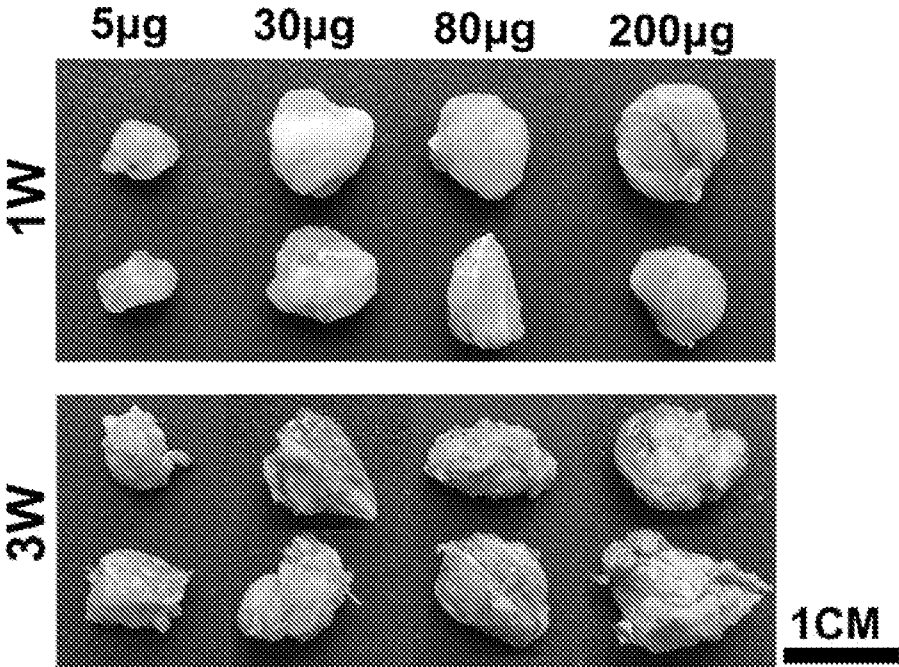


图1

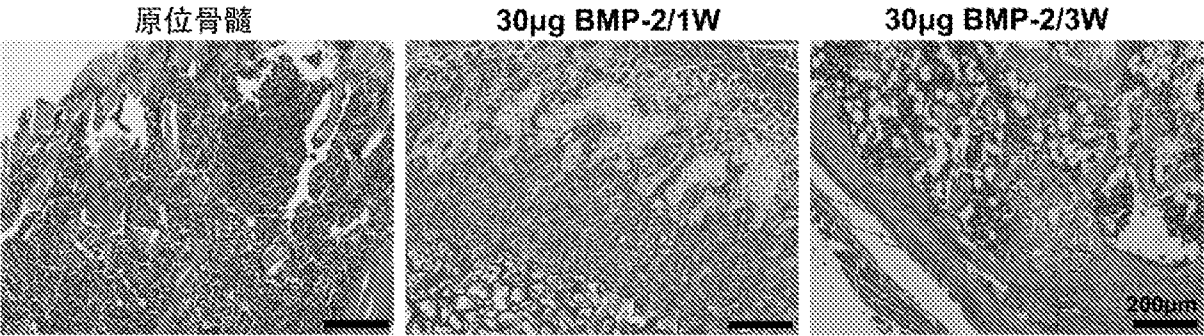


图2

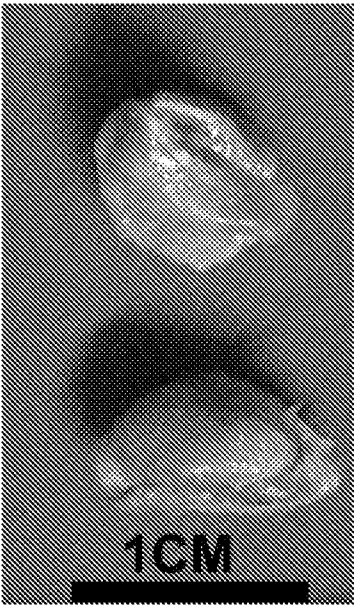


图3

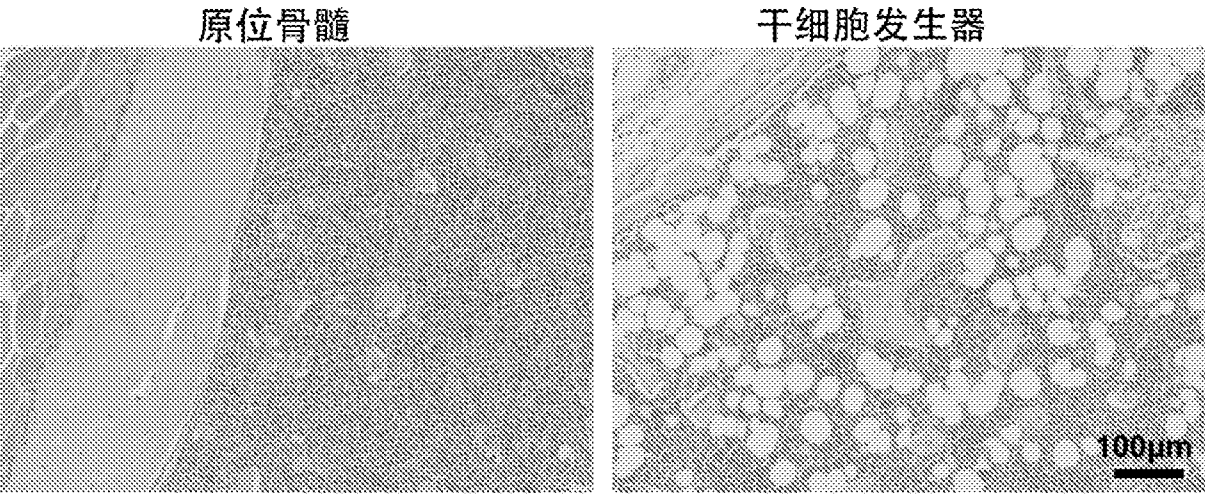
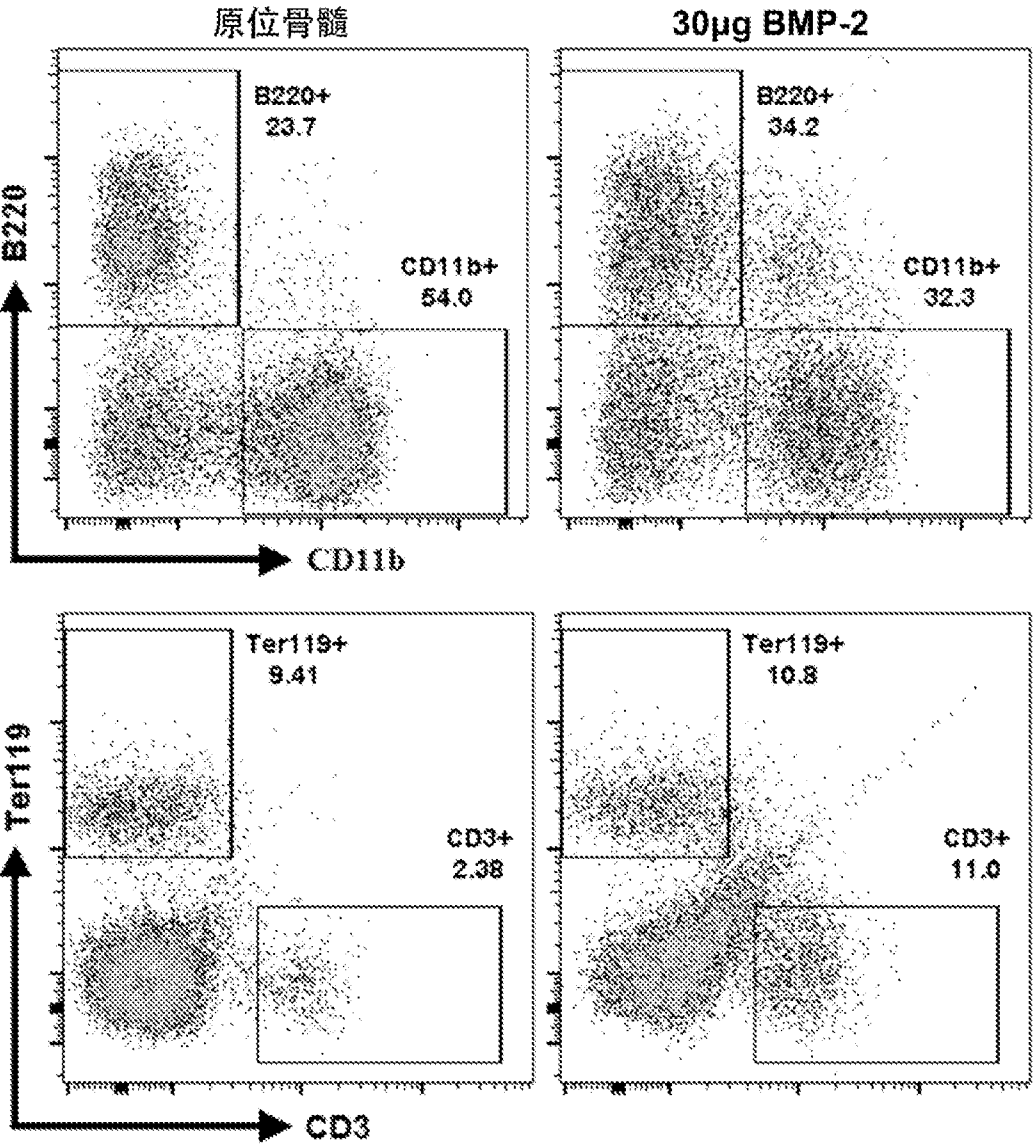
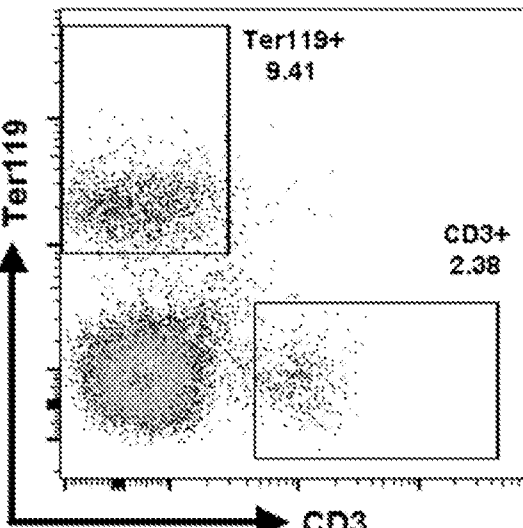


图4





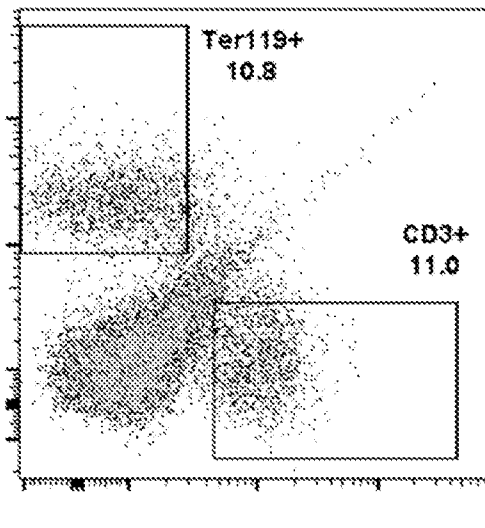


图5

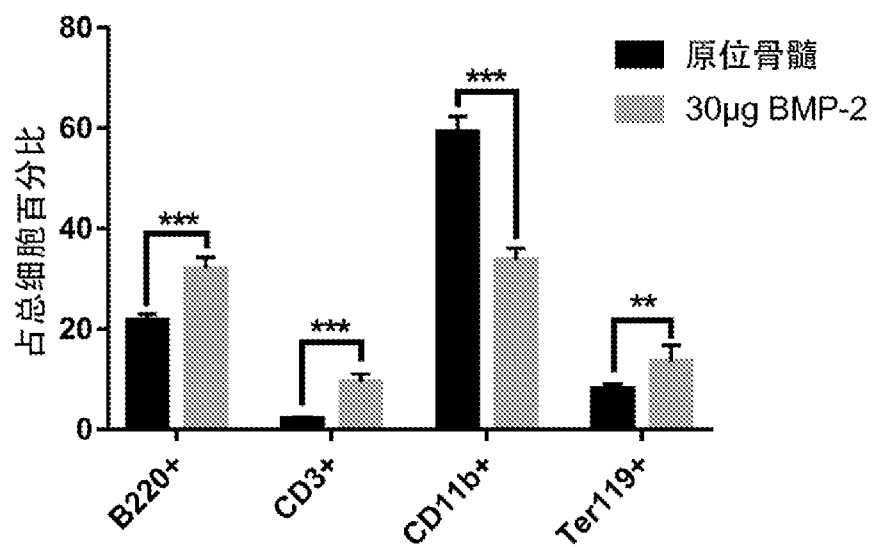


图6

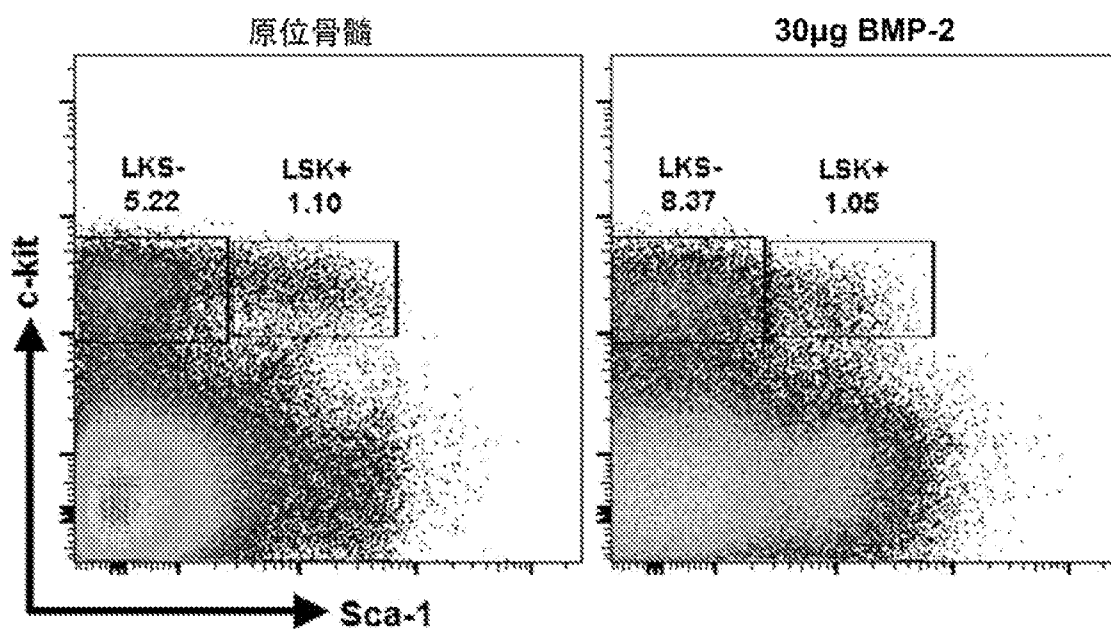


图7

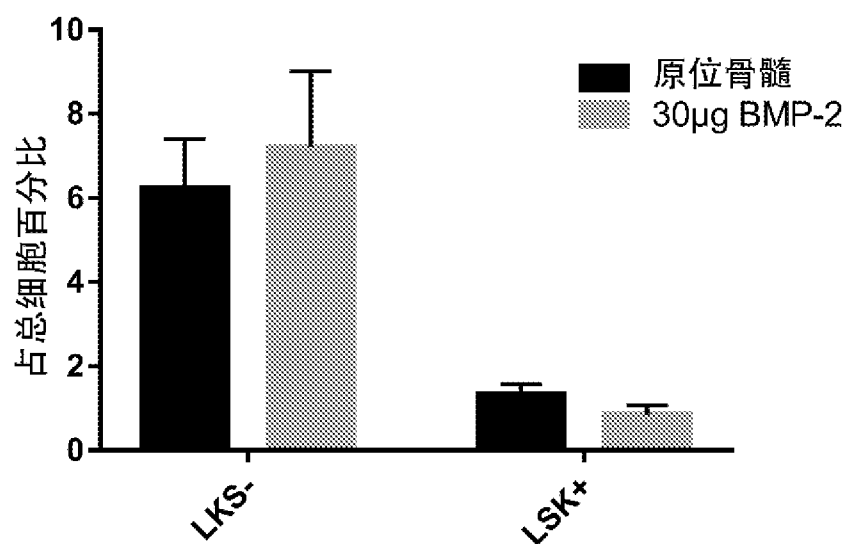


图8

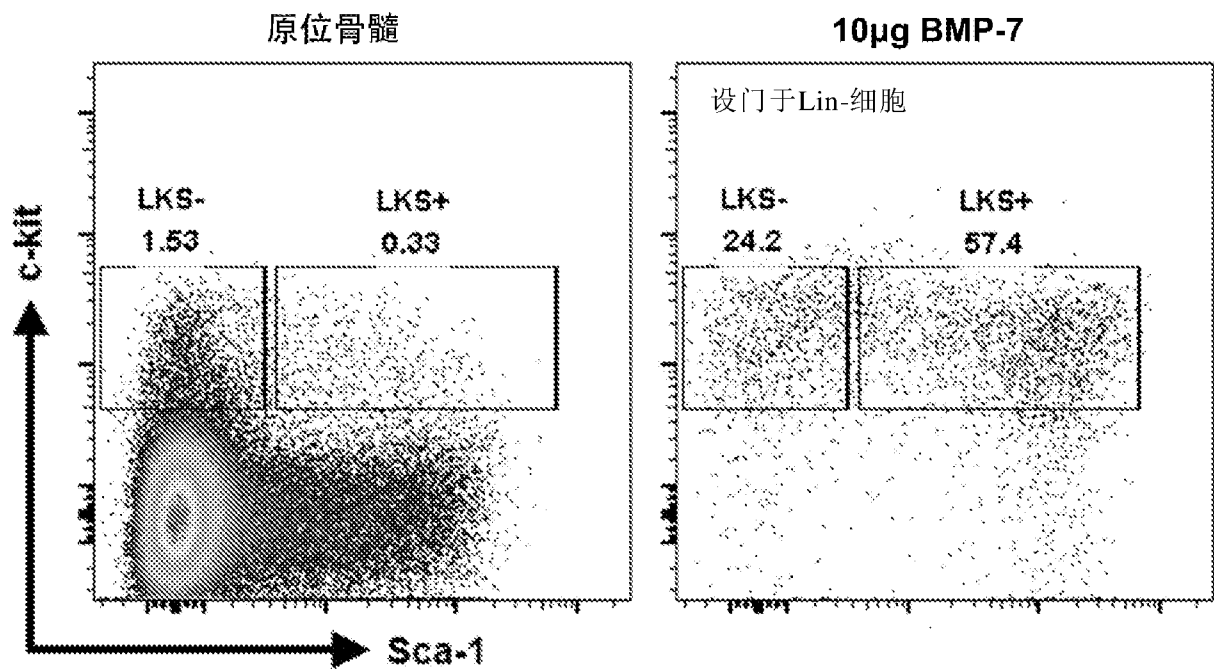


图9

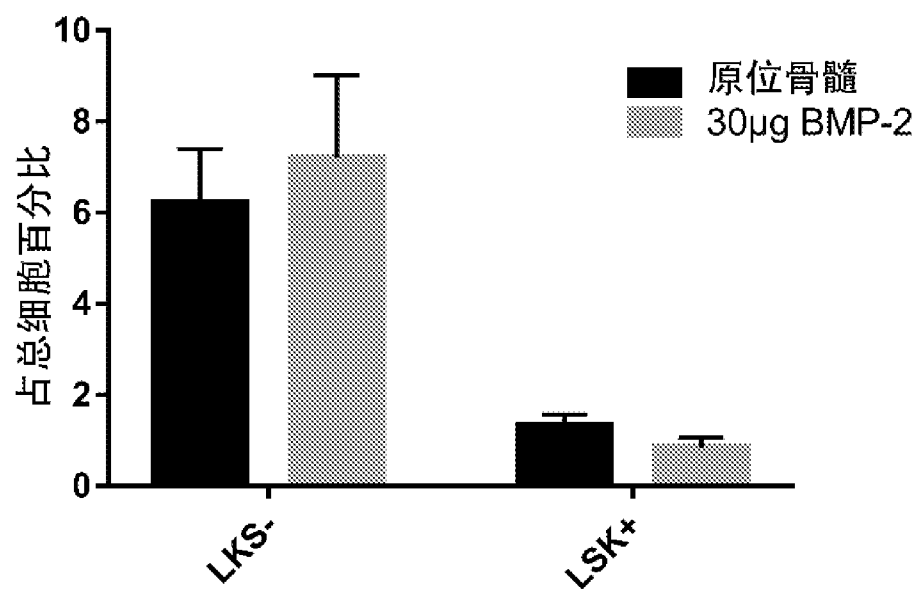


图10

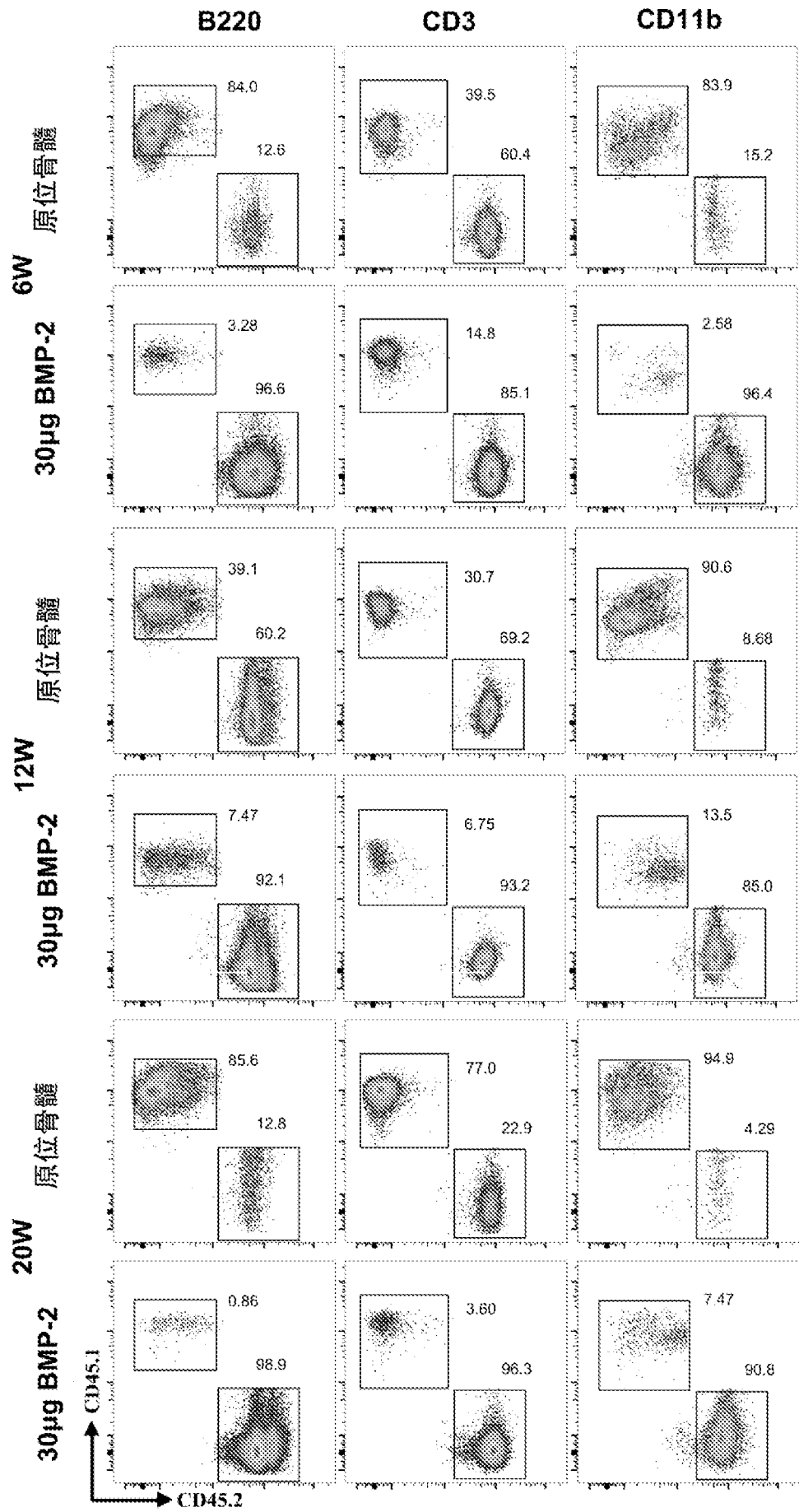


图11

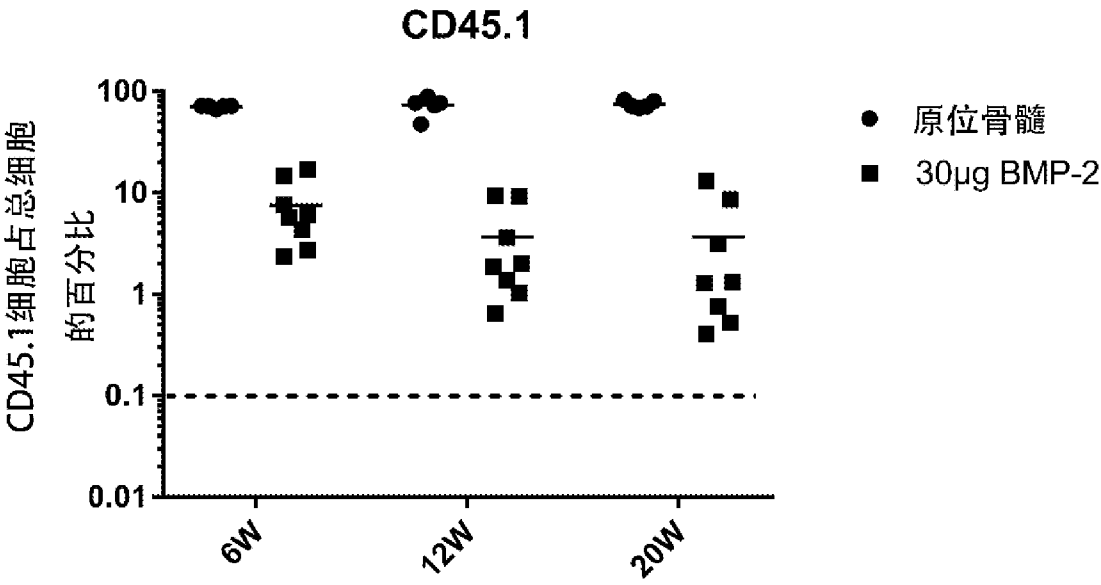


图12

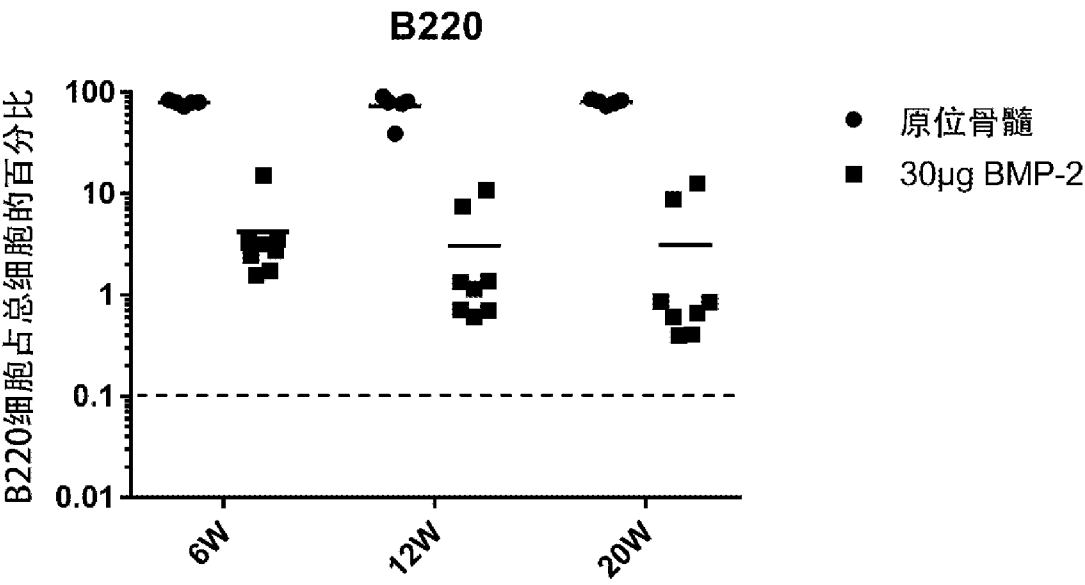


图13

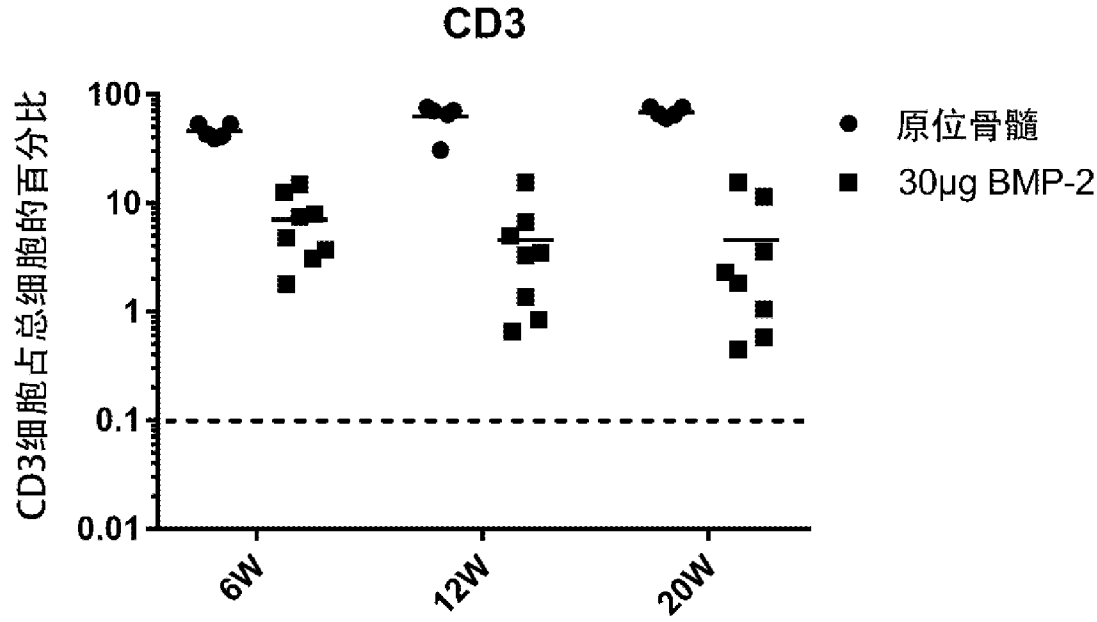


图14

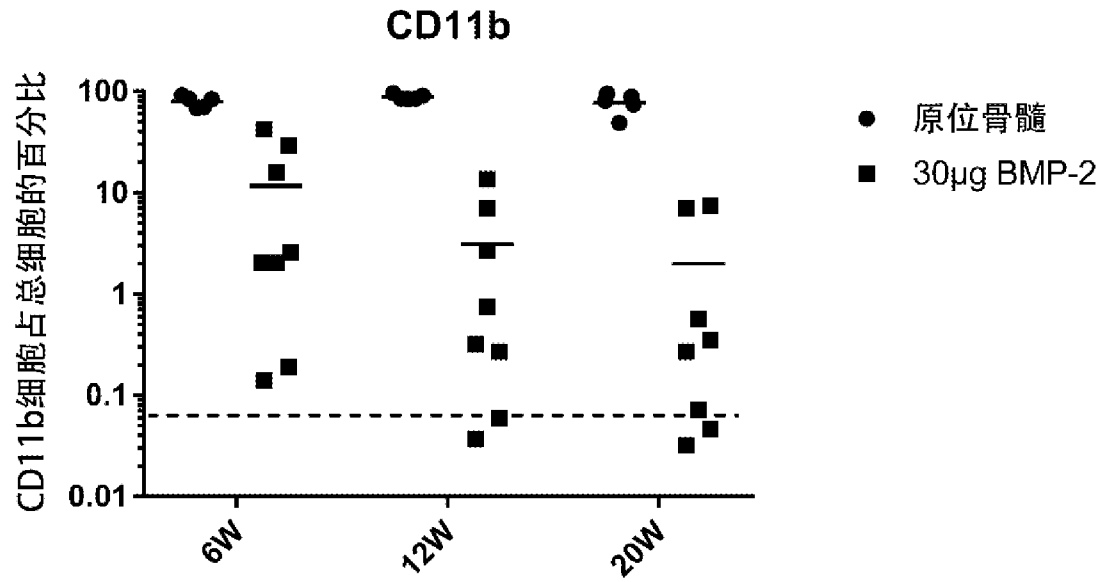


图15

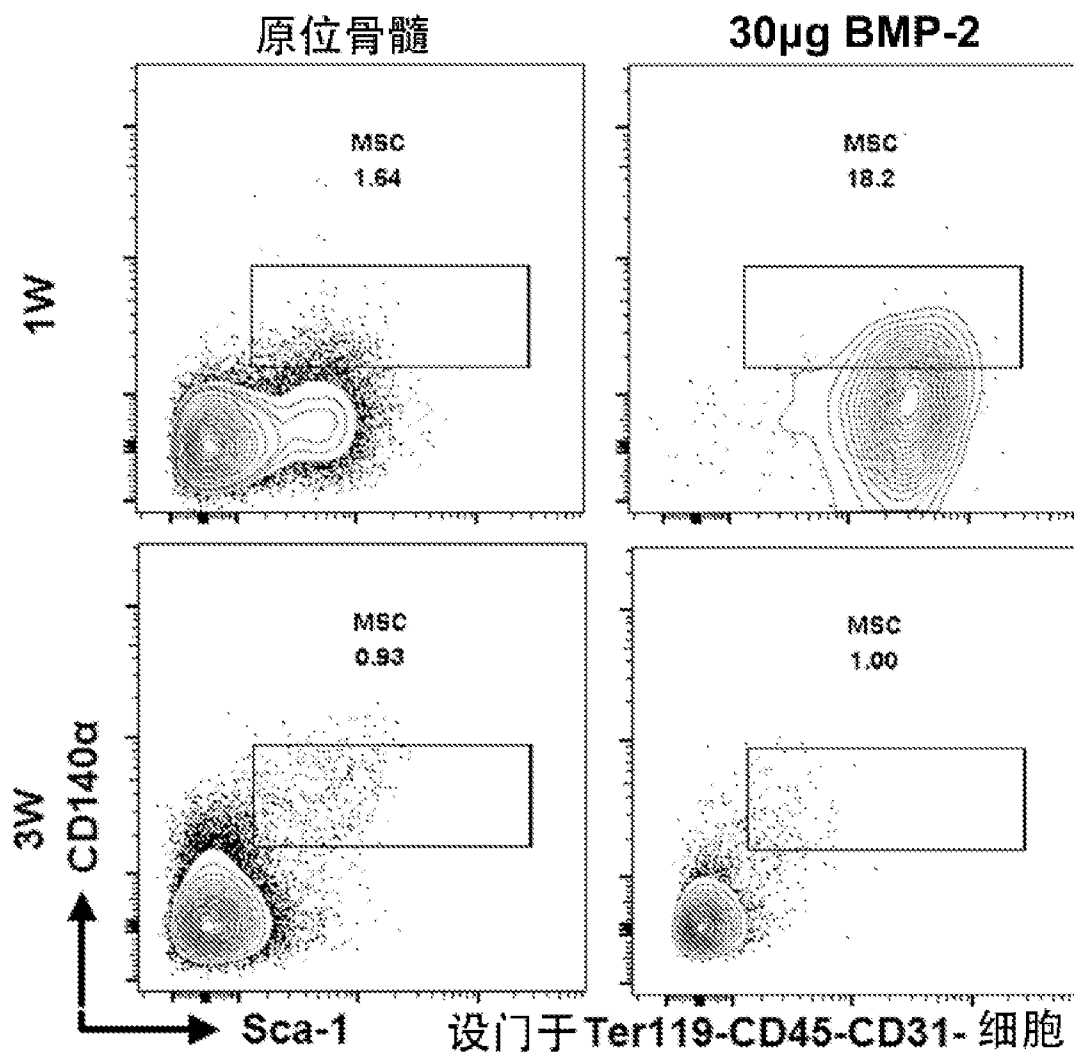


图16

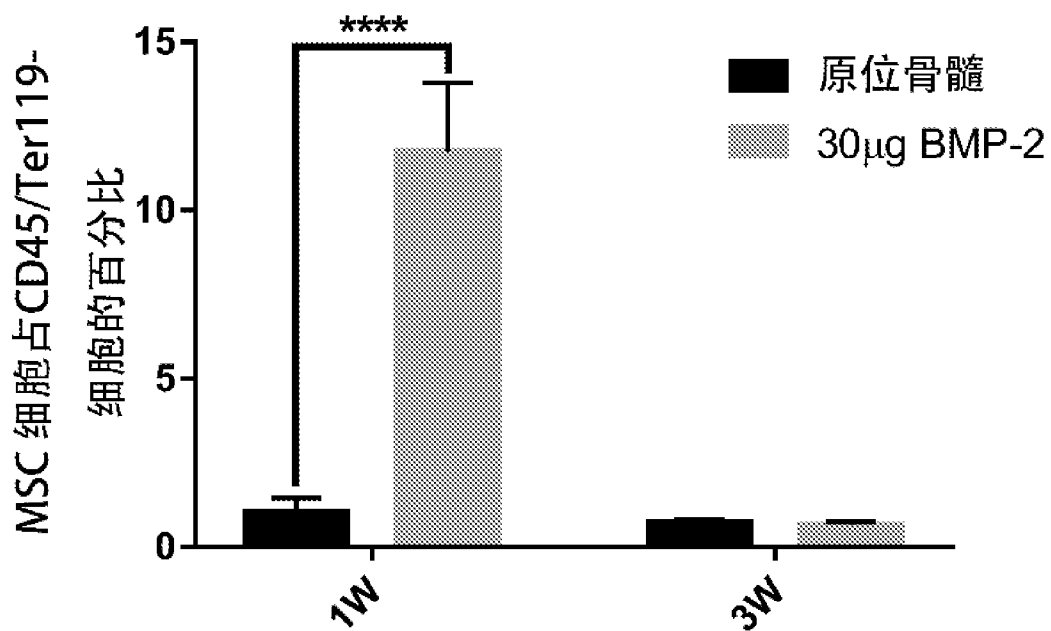


图17

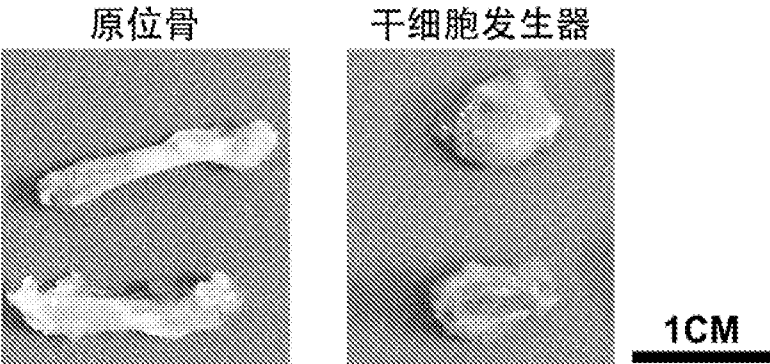


图18

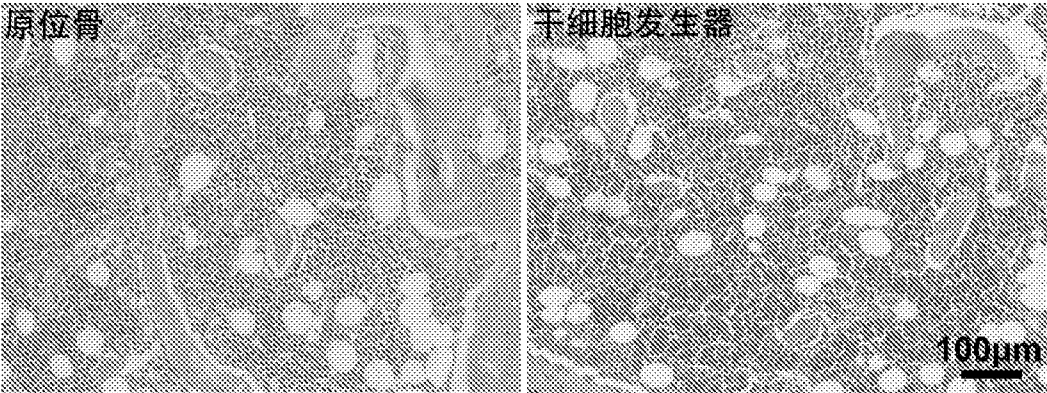


图19

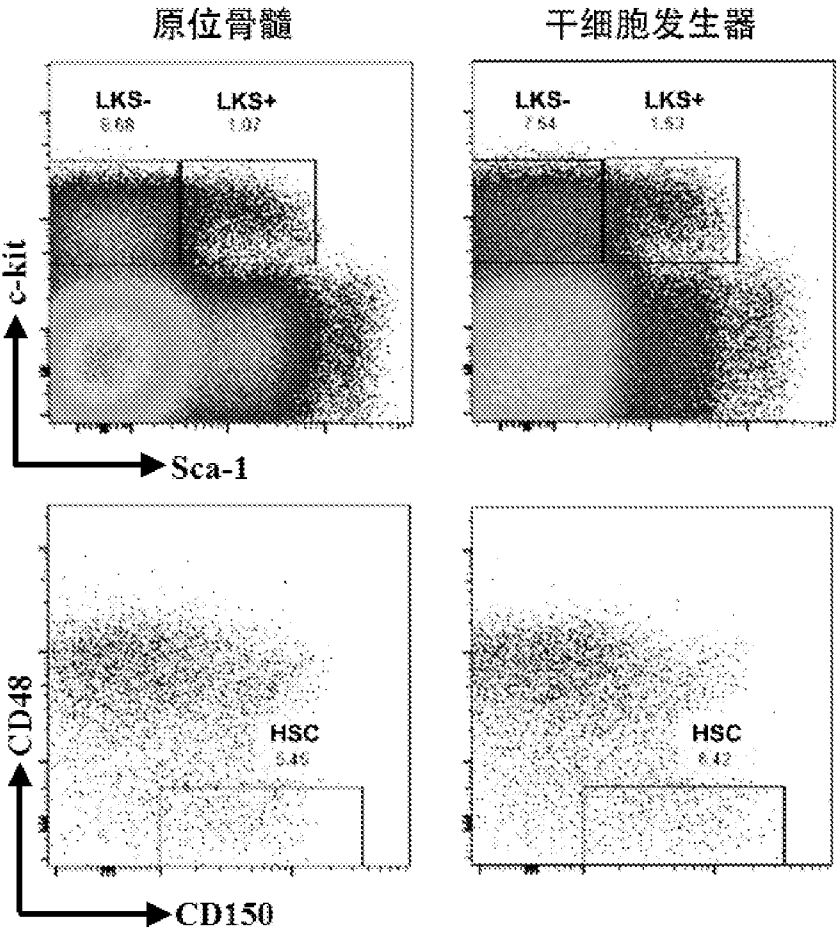


图20

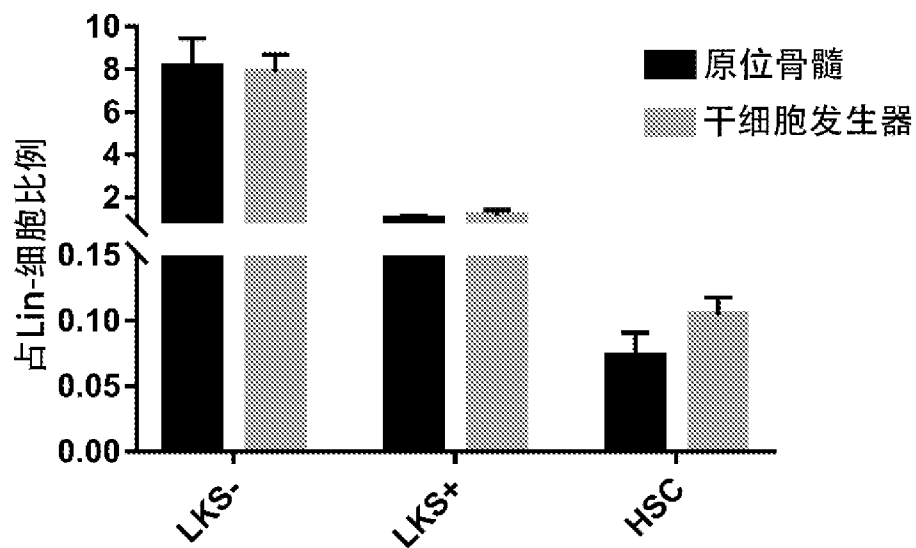


图21

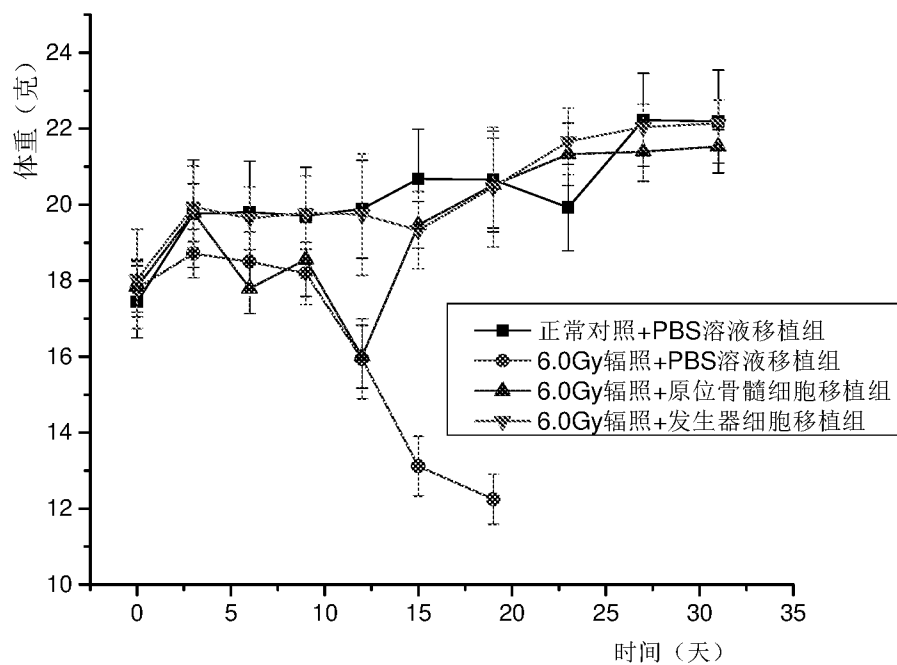


图22

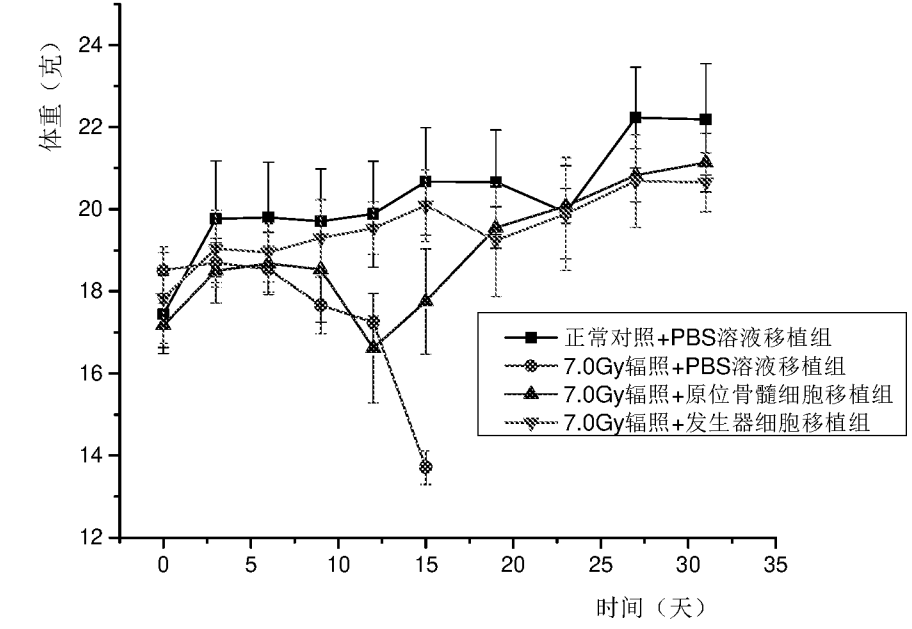


图23

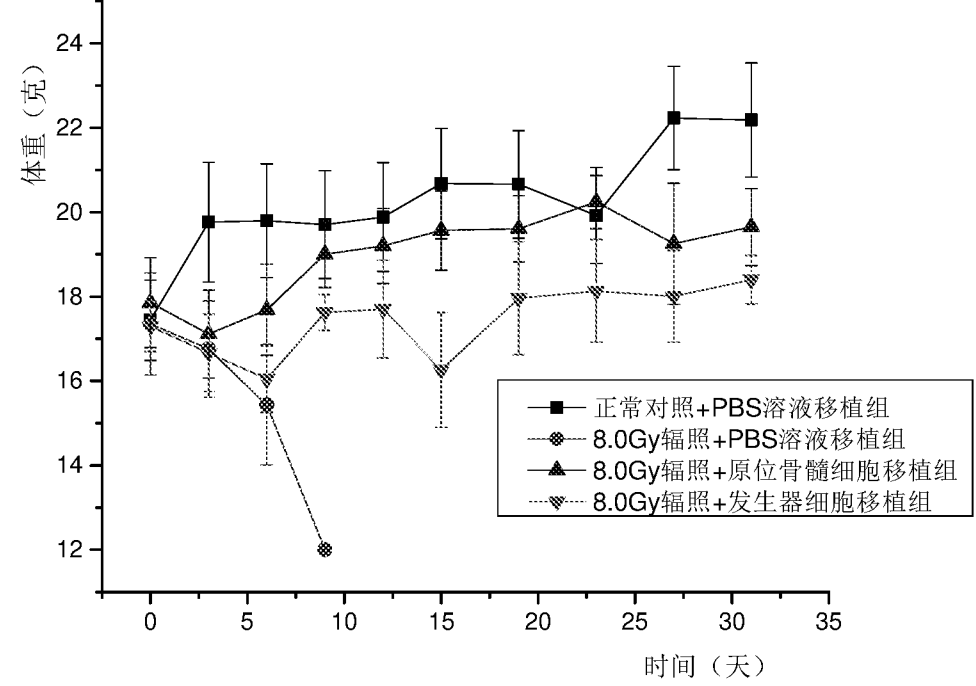


图24

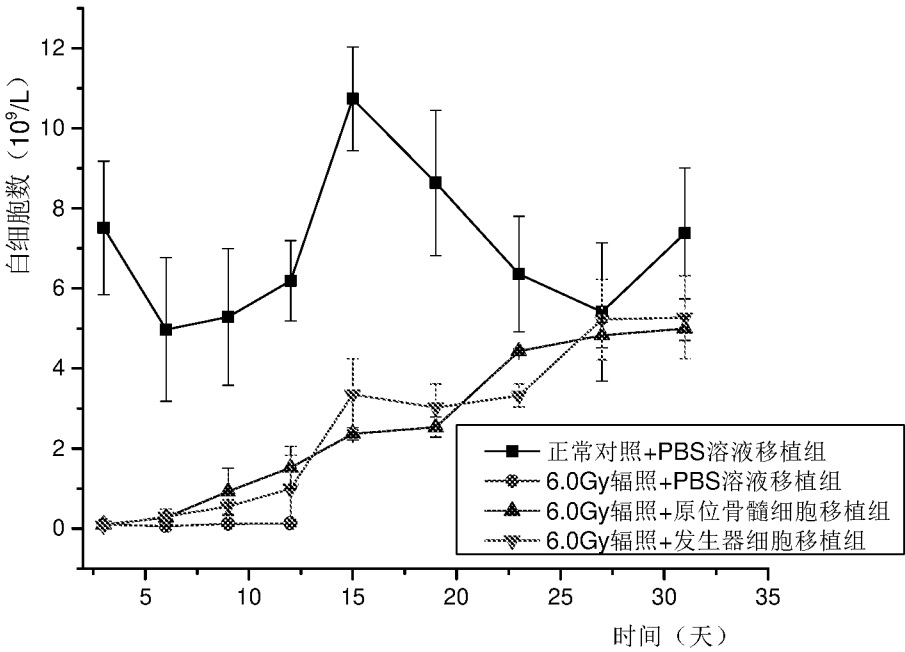


图25

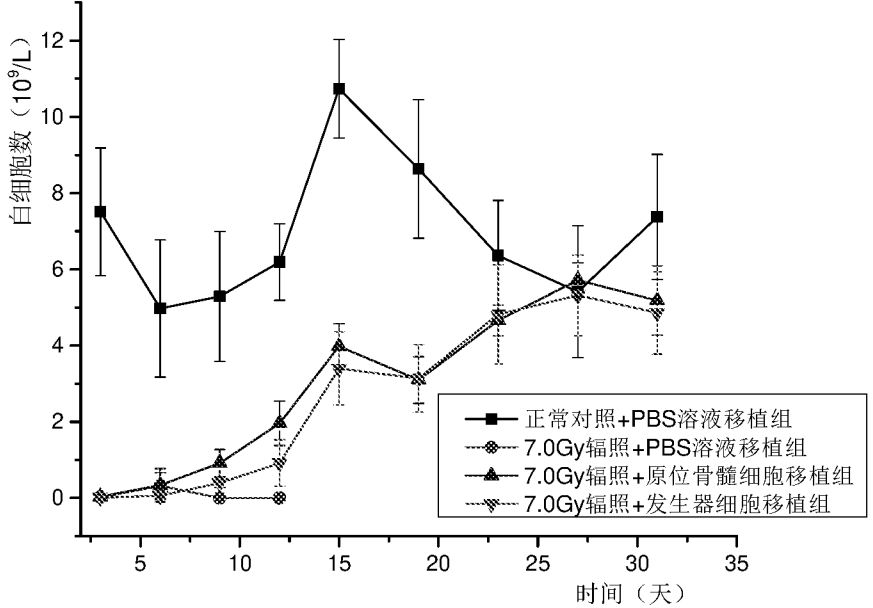


图26

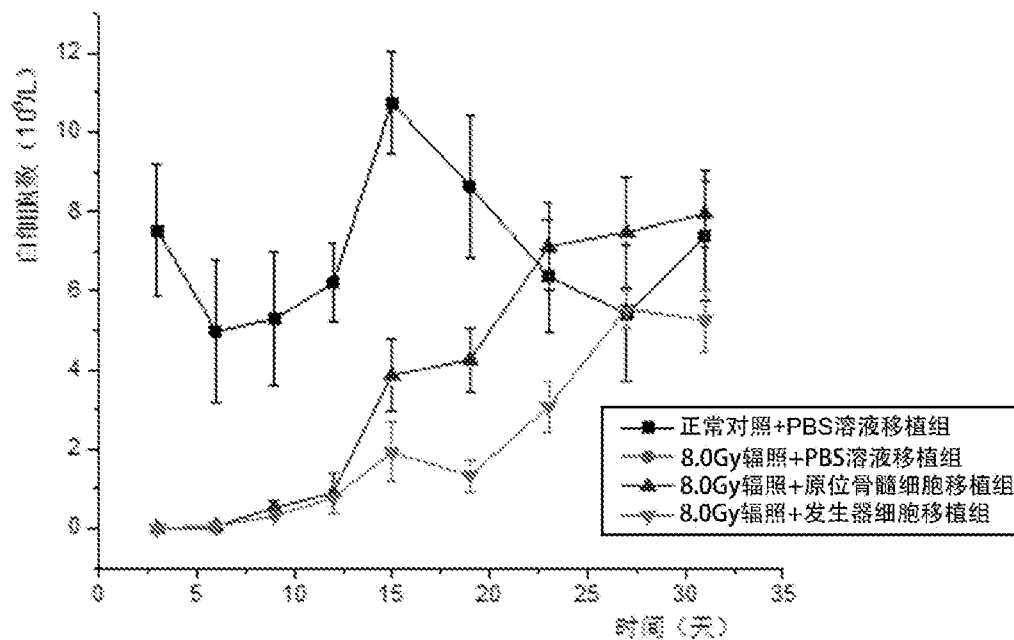


图27

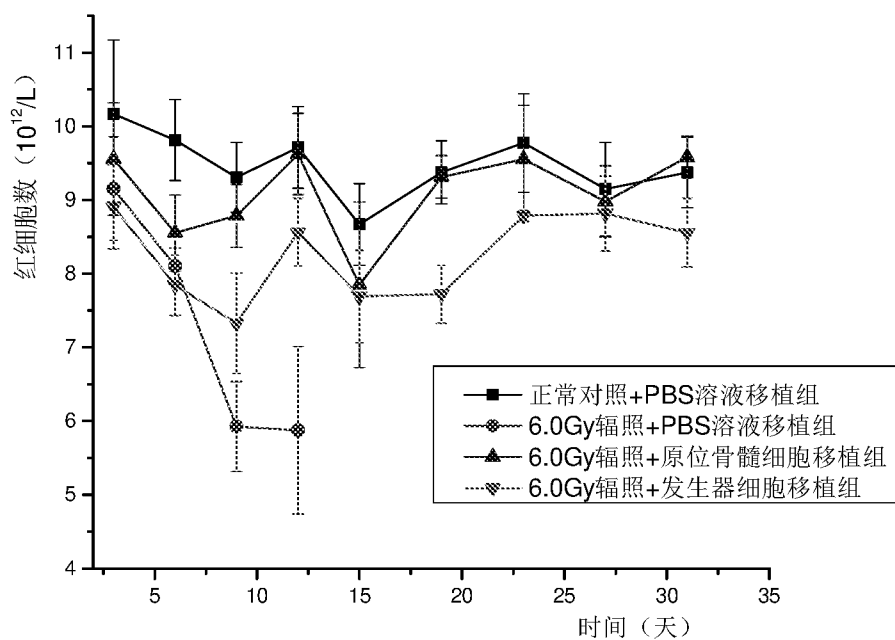


图28

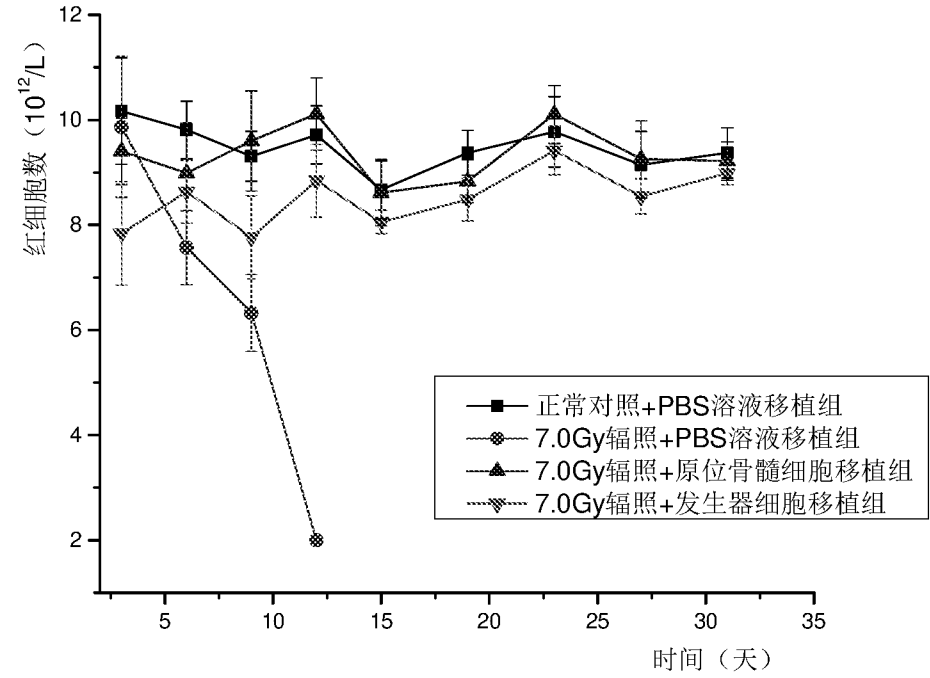


图29

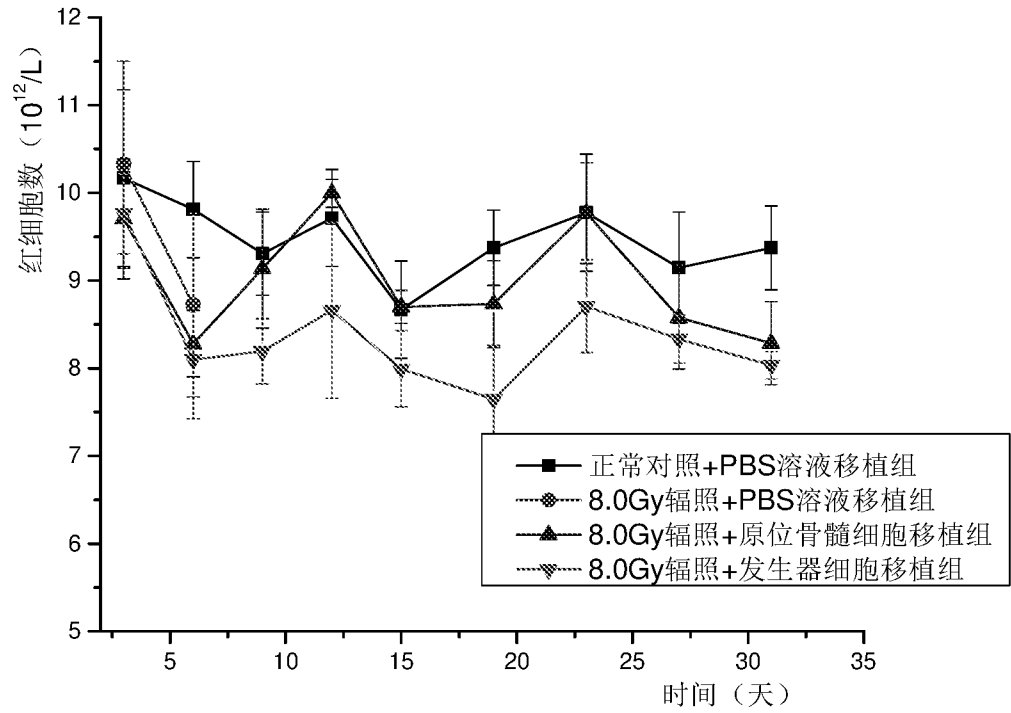


图30

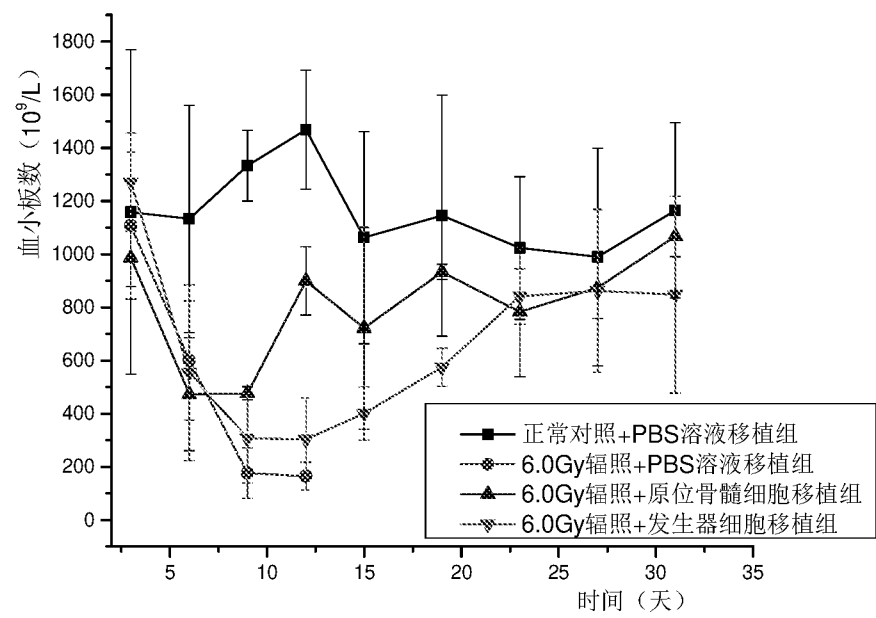


图31

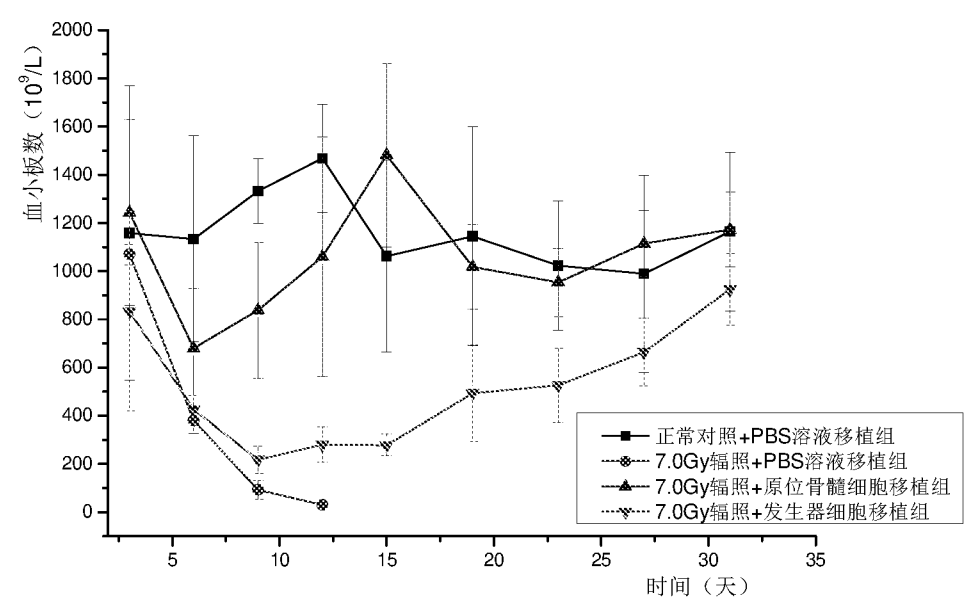


图32

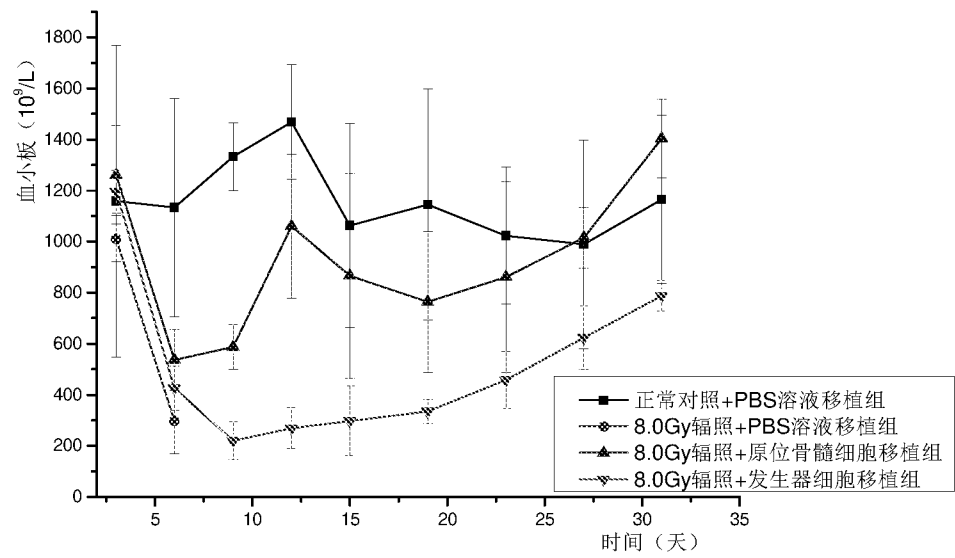


图33

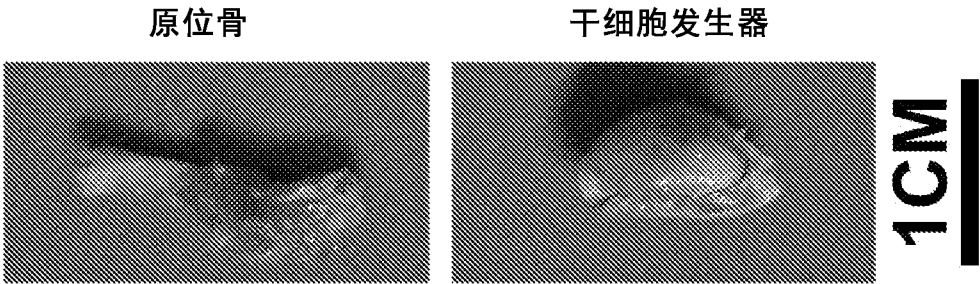


图34

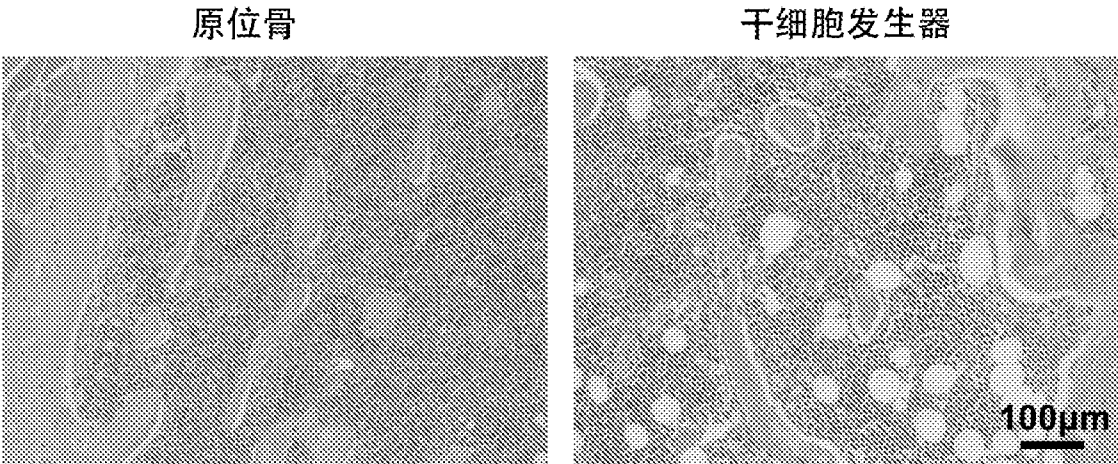


图35

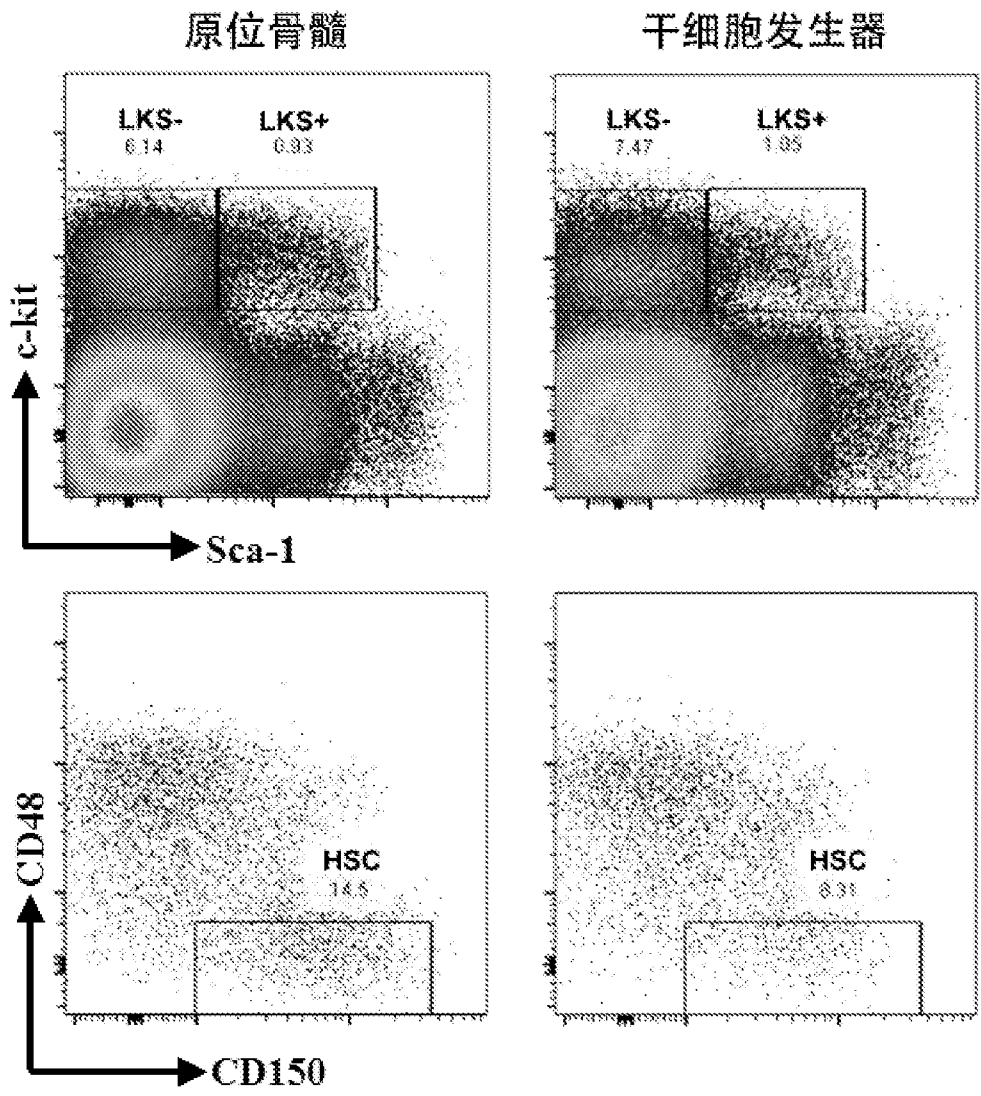


图36

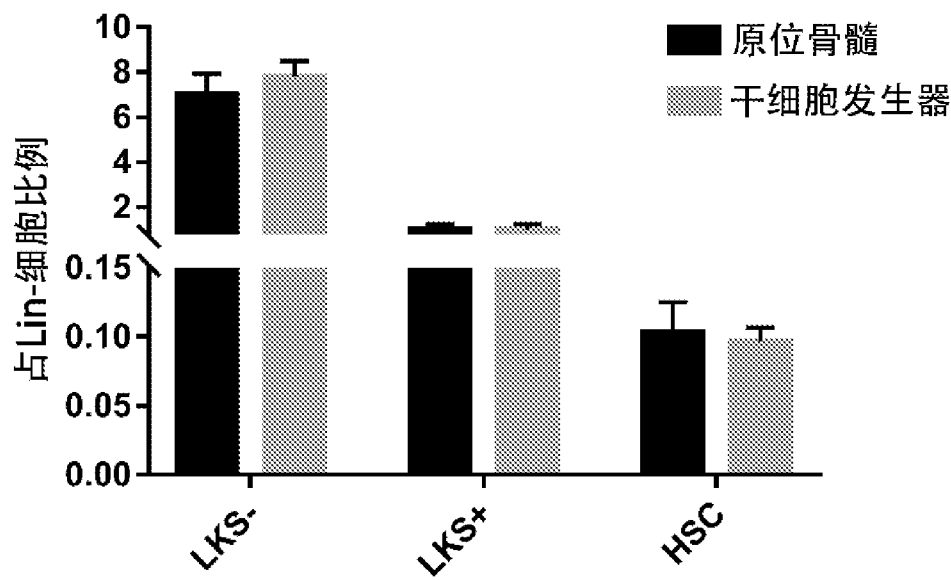


图37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/073591

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/12(2015.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P; 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)

DWPI; CPRSABS; SIPOABS; CNABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库, WANFANG DATABASE; ISI WEB OF SCIENCE; PUBMED; 干细胞, 多肽, 类器官, 骨, 移植物抗宿主病, STEM CELL, POLYPEPTIDE, ORGANOID, BONE, GVHD, GRAFT VERSUS HOST DISEASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104411318 A (ANTHROGENESIS CORPORATION) 11 March 2015 (2015-03-11) see claims 1-30, 34-36 and 150-194, and description, paragraph 3	4-6, 8, 9 (all in part), 1, 10
Y	CN 104411318 A (ANTHROGENESIS CORP.) 11 March 2015 (2015-03-11) see claims 1-30, 34-36 and 150-194, and description, paragraph 3	7 (in part)
Y	CN 103476440 A (SYNTHES GMBH) 25 December 2013 (2013-12-25) see claims, description, paragraph 40 and example 7	7 (in part)
A	CN 109072179 A (KEIO UNIVERSITY; OSAKA UNIVERSITY) 21 December 2018 (2018-12-21) see entire document	4-9 (all in part), 1, 10
A	CN 107427537 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 01 December 2017 (2017-12-01) see entire document	4-9 (all in part), 1, 10
A	CN 102089426 A (UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY 1) 08 June 2011 (2011-06-08) see entire document	4-9 (all in part), 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

10 April 2020

Date of mailing of the international search report

23 April 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/073591**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106456669 A (ANTHROGENESIS CORPORATION) 22 February 2017 (2017-02-22) see entire document	4-9 (all in part), 1, 10
A	李飞 等 (LI, Fei et al.). "类器官及其在肿瘤研究中的应用 (Organoid and Its Application in Cancer Research)" <i>中国细胞生物学学报 (Chinese Journal of Cell Biology)</i> , Vol. 39, No. (4), 30 April 2017 (2017-04-30), pages 394-400, and see entire document	4-9 (all in part), 1, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/073591

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.: **4-9** (均为部分)、**2**和**3**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] A method for treatment of a living human body or animal body through a surgical operation.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/073591

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104411318	A	11 March 2015	WO	2013096741	A2	27 June 2013
				CA	2859714	A1	27 June 2013
				US	2015017140	A1	15 January 2015
				HK	1203380	A1	30 October 2015
				US	2017128625	A1	11 May 2017
				EP	2793912	A4	18 November 2015
				JP	2019050814	A	04 April 2019
				JP	2015510391	A	09 April 2015
				EP	2793912	A2	29 October 2014
				WO	2013096741	A3	18 December 2014
CN	103476440	A	25 December 2013	KR	101883144	B1	31 July 2018
				TW	1527585	B	01 April 2016
				JP	2014506522	A	17 March 2014
				BR	112013021369	B1	16 April 2019
				AU	2012259434	A1	05 September 2013
				JP	2017056261	A	23 March 2017
				JP	6129751	B2	17 May 2017
				AU	2016200228	A1	18 February 2016
				CN	103476440	B	19 October 2016
				EP	2678051	A1	01 January 2014
				TW	201247210	A	01 December 2012
				US	8642065	B2	04 February 2014
				WO	2012161788	A1	29 November 2012
				AU	2016200228	B2	27 October 2016
				KR	20140009398	A	22 January 2014
				BR	112013021369	A2	18 October 2016
				US	2012219599	A1	30 August 2012
				AU	2012259434	B2	17 December 2015
				JP	6328740	B2	23 May 2018
				CA	2827924	A1	29 November 2012
				CA	2827924	C	02 July 2019
				EP	2678051	B1	09 November 2016
CN	109072179	A	21 December 2018	JP	6376578	B2	22 August 2018
				WO	2017142069	A1	24 August 2017
				EP	3418376	A1	26 December 2018
				US	2019100724	A1	04 April 2019
				EP	3418376	A4	07 August 2019
				JP	WO2017142069	A1	22 February 2018
CN	107427537	A	01 December 2017	EP	3265104	A1	10 January 2018
				JP	2018506988	A	15 March 2018
				WO	2016141137	A1	09 September 2016
				US	2018030409	A1	01 February 2018
				AU	2016226178	A1	21 September 2017
				EP	3265104	A4	07 November 2018
CN	102089426	A	08 June 2011	ZA	201008683	B	25 April 2012
				US	2011177597	A1	21 July 2011
				CA	2729074	A1	30 December 2009
				CN	102089426	B	30 October 2013
				EP	2288691	A1	02 March 2011
				WO	2009156411	A1	30 December 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/073591

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106456669	A	22 February 2017	AU	2015217406	A1	25 August 2016
				KR	20170008723	A	24 January 2017
				EP	3104865	A1	21 December 2016
				EP	3104865	A4	22 November 2017
				MX	2016010293	A	23 February 2017
				EA	201691607	A1	30 January 2017
				JP	2017507935	A	23 March 2017
				WO	2015123183	A1	20 August 2015
				US	2016354408	A1	08 December 2016
				HK	1232140	A1	05 January 2018
				CA	2939339	A1	20 August 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/073591

A. 主题的分类

A61K 35/12(2015.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P; 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))

DWPI; CPRSABS; SIPOABS; CNABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库; ISI WEB OF SCIENCE; PUBMED; 干细胞, 多肽, 类器官, 骨, 移植植物抗宿主病, STEM CELL, POLYPEPTIDE, ORGANOID, BONE, GVHD, GRAFT VERSUS HOST DISEASE

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 104411318 A (人类起源公司) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 参见权利要求1-30、34-36、150-194, 说明书第3段	4-6、8、9 (均为部分)、1、10
Y	CN 104411318 A (人类起源公司) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 参见权利要求1-30、34-36、150-194, 说明书第3段	7 (部分)
Y	CN 103476440 A (新特斯有限责任公司) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 参见权利要求1-23, 说明书第40段、实例7	7 (部分)
A	CN 109072179 A (学校法人庆应义塾, 国立大学法人大阪大学) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 参见全文	4-9 (均为部分)、1、10
A	CN 107427537 A (哈佛学院院长及董事) 2017年 12月 1日 (2017 - 12 - 01) 参见全文	4-9 (均为部分)、1、10
A	CN 102089426 A (亨利庞加莱南锡第一大学) 2011年 6月 8日 (2011 - 06 - 08) 参见全文	4-9 (均为部分)、1、10
A	CN 106456669 A (人类起源公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 参见全文	4-9 (均为部分)、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

2020年 4月 10日

国际检索报告邮寄日期

2020年 4月 23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

吴汀晨

电话号码 86-(010)-62089319

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	李飞 等. “类器官及其在肿瘤研究中的应用” 中国细胞生物学学报, 第39卷, 第4期, 2017年 4月 30日 (2017 - 04 - 30), 第394 - 400页, 参见全文	4-9 (均为部分)、1、10

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： 4-9（均为部分）、2和3
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 通过外科手术对有生命的人体或动物体进行处置的方法。
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/CN2020/073591

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	104411318	A	2015年 3月 11日	WO	2013096741	A2	2013年 6月 27日
				CA	2859714	A1	2013年 6月 27日
				US	2015017140	A1	2015年 1月 15日
				HK	1203380	A1	2015年 10月 30日
				US	2017128625	A1	2017年 5月 11日
				EP	2793912	A4	2015年 11月 18日
				JP	2019050814	A	2019年 4月 4日
				JP	2015510391	A	2015年 4月 9日
				EP	2793912	A2	2014年 10月 29日
				WO	2013096741	A3	2014年 12月 18日
CN	103476440	A	2013年 12月 25日	KR	101883144	B1	2018年 7月 31日
				TW	1527585	B	2016年 4月 1日
				JP	2014506522	A	2014年 3月 17日
				BR	112013021369	B1	2019年 4月 16日
				AU	2012259434	A1	2013年 9月 5日
				JP	2017056261	A	2017年 3月 23日
				JP	6129751	B2	2017年 5月 17日
				AU	2016200228	A1	2016年 2月 18日
				CN	103476440	B	2016年 10月 19日
				EP	2678051	A1	2014年 1月 1日
				TW	201247210	A	2012年 12月 1日
				US	8642065	B2	2014年 2月 4日
				WO	2012161788	A1	2012年 11月 29日
				AU	2016200228	B2	2016年 10月 27日
				KR	20140009398	A	2014年 1月 22日
				BR	112013021369	A2	2016年 10月 18日
				US	2012219599	A1	2012年 8月 30日
				AU	2012259434	B2	2015年 12月 17日
				JP	6328740	B2	2018年 5月 23日
				CA	2827924	A1	2012年 11月 29日
				CA	2827924	C	2019年 7月 2日
				EP	2678051	B1	2016年 11月 9日
CN	109072179	A	2018年 12月 21日	JP	6376578	B2	2018年 8月 22日
				WO	2017142069	A1	2017年 8月 24日
				EP	3418376	A1	2018年 12月 26日
				US	2019100724	A1	2019年 4月 4日
				EP	3418376	A4	2019年 8月 7日
				JP	WO2017142069	A1	2018年 2月 22日
CN	107427537	A	2017年 12月 1日	EP	3265104	A1	2018年 1月 10日
				JP	2018506988	A	2018年 3月 15日
				WO	2016141137	A1	2016年 9月 9日
				US	2018030409	A1	2018年 2月 1日
				AU	2016226178	A1	2017年 9月 21日
				EP	3265104	A4	2018年 11月 7日
CN	102089426	A	2011年 6月 8日	ZA	201008683	B	2012年 4月 25日
				US	2011177597	A1	2011年 7月 21日
				CA	2729074	A1	2009年 12月 30日
				CN	102089426	B	2013年 10月 30日
				EP	2288691	A1	2011年 3月 2日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/073591

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)
				WO	2009156411	A1	2009年 12月 30日
CN	106456669	A	2017年 2月 22日	AU	2015217406	A1	2016年 8月 25日
				KR	20170008723	A	2017年 1月 24日
				EP	3104865	A1	2016年 12月 21日
				EP	3104865	A4	2017年 11月 22日
				MX	2016010293	A	2017年 2月 23日
				EA	201691607	A1	2017年 1月 30日
				JP	2017507935	A	2017年 3月 23日
				WO	2015123183	A1	2015年 8月 20日
				US	2016354408	A1	2016年 12月 8日
				HK	1232140	A1	2018年 1月 5日
				CA	2939339	A1	2015年 8月 20日