

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 6 月 30 日 (30.06.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/134031 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/30* (2015.01)
C12N 5/0793 (2010.01) *A61P 17/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/139521

(22) 国际申请日: 2020 年 12 月 25 日 (25.12.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 武汉睿健医药科技有限公司
(IREGENE THERAPEUTICS LTD) [CN/CN]; 中国
湖北省武汉市高新大道 666 光谷生物城
C6-522, Hubei 430075 (CN)。

(72) 发明人: 魏君(WEI, Jun); 中国湖北省武汉市高新
大道 666 光谷生物城 C6-522, Hubei 430075 (CN)。
蔡萌(CAI, Meng); 中国湖北省武汉市高新大道
666 光谷生物城 C6-522, Hubei 430075 (CN)。 牛

璐萌(NIU, Lumeng); 中国湖北省武汉市高新大道
666 光谷生物城 C6-522, Hubei 430075 (CN)。 周
佳(ZHOU, Jia); 中国湖北省武汉市高新大道 666
光谷生物城 C6-522, Hubei 430075 (CN)。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任
公司 (CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK
AGENT LTD.); 中国北京市海淀区西三环北路
87 号 4-1105 室, Beijing 100089 (CN)。

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

(54) Title: CHEMICAL INDUCTION METHOD FOR PHOTORECEPTOR NEURON CELLS

(54) 发明名称: 一种光感受器神经元细胞的化学诱导方法

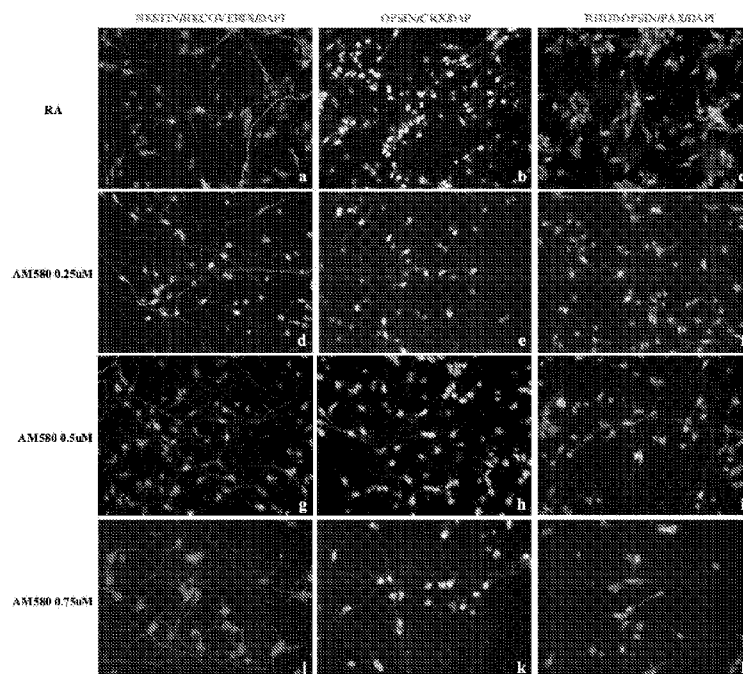


图 5

(57) Abstract: Provided is a pure chemical induction method for photoreceptor neuron cells. A group of small molecule inhibitors are added into a serum-free basic culture medium, and pluripotent stem cells are quickly converted into photoreceptor neuron cells. In the present invention, serum is not used, and chemical small molecules are used to replace retinol, eliminating the adverse factors of serum while ensuring the operation of visual circulation required by the development of photoreceptor neurons.

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

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
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))。
 - 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。
-

(57) 摘要: 提供了一种光感受器神经元细胞纯化学诱导方法, 通过将一组小分子抑制剂添加至无血清基础培养基中, 将多能干细胞快速转化为光感受器神经元细胞, 本发明不使用血清, 使用化学小分子替代视黄醇, 保证了光感受器神经元发育所需要的视觉循环的运行的同时也排除了血清的不利因素。

一种光感受器神经元细胞的化学诱导方法

技术领域

本发明属于生物领域。具体涉及光感受器神经元细胞的化学诱导及培养方法、培养基及其在多种疾病中的应用。

背景技术

外胚层是胚胎发育过程中形成的最外层，随着器官发生的开始，外胚层细胞逐渐分化为大脑、脊髓、感觉器官等重要的系统。其中神经系统是负责思维、情感、感知、运动等功能的重要系统。相比于肿瘤等疾病，目前神经系统疾病的药物数量较少，且研发周期漫长，其中最为重要的一个原因是外胚层谱系中多种原代细胞的特殊性，例如原代神经元的不可再生性导致了神经系统药物体外药物筛选平台的稀缺。外胚层细胞的体外再生能解决多种退行性疾病，例如神经退行性疾病是目前常见的老龄化疾病，治疗及护理费用极其昂贵，而且市面上无特效药物可以进行有效的治疗。神经退行性疾病包括肌萎缩侧索硬化症（ALS）、帕金森病（PD）、阿尔茨海默症（AD）等疾病。世界卫生组织统计，2050 年我国神经退行性疾病患者将超过 3000 万，预期医疗费用将超过 1 万亿。此类疾病的治疗难点在于中枢神经系统的神经细胞具有不可再生性，而这类疾病是由于中枢神经的不可逆损伤造成。目前，神经细胞的移植是最为有效的一种治疗方式。

视觉神经的退行性疾病也是其中的一大类疾病。以与年龄相关的黄斑变性（AMD）为例，它是 50 岁以上人群视力受损的主要原因，其特征是视网膜退化，可导致中央视力丧失。此外，色素变性这种罕见遗传性疾病，其特征是视网膜中的光感受器逐渐退化，无法将光信号转换成向大脑的电信号。视网膜是高等动物体中能够感受“影像”的重要组织，由光敏细胞和光感受器组成。光感受器能将影像的光信号转变为神经信号，是能让大脑“看见”影像的重要细胞。这其中，锥形受体细胞即视锥细胞负责我们的日间视觉及颜色的感知，视杆细胞，则更为敏感，即使在低光照条件也可以感知到微弱的光。感光细胞的受损，是视网膜退行性疾病的重要成因，导致眼球无法将“影像”转化的神经信号传递到大脑，从而严重影响人的视力，甚至导致失明。更为严峻的是，光感受器神经细胞的受损是一种不可逆的过程，无法自我修复，因此此类疾病没有良好的治疗方法。部分患者采取视网膜移植方法，但视网膜资源有限，多来自于遗体捐赠，远不能满足临床需要；人工视网膜的原理是替换这些光感受器。该装置由固定在视网膜和电极化合物下的植入物组成，这些植入物可刺激视网膜神经元向大脑传递信息，但目前人工视网膜价格昂贵，且不能精细恢复视觉功能；除此之外，还有基于病毒载体的基因疗法，通过修正遗传突变让遗传性光感受器恢复功能，同样，基因疗法除了价格昂贵之外，并不能解决由年龄造成的视觉神经的退行性疾病。

2006 年，山中伸弥的团队发明了一种由 OCT4、SOX2、KLF4 和 c-Myc 四种转录因子构成的“鸡尾酒”法，能够成功将终端分化的皮肤成纤维细胞重编程成为具有分化多能性的干细胞，这种干细胞被称为诱导多能干细胞（Induced Pluripotent Cells）（Cell, 2006, 124(4)pp.663-676; Cell, 2007, 131(5)pp.861-872）。这些干细胞具有和胚胎干细胞（Embryonic Stem Cells）类似的分化潜能，能够形成人体发育最基本的三个胚层：外胚层、中胚层及内胚层，并最终形成多种成体细胞。这一发明突破了在医学上使用人胚胎干细胞的伦理限制，可以解决细胞移植治疗中的免疫排斥问题，大大拓展了干细胞技术在临床医学上的应用潜力。

使用包括胚胎干细胞及 iPSC 在内的全能干细胞或者多能干细胞作为原材料进行外胚层细胞诱导分化可以作为临床治疗的新思路，大大拓展了外胚层细胞在临床医学上的应用潜力。

以神经系统为例，目前在再生医学领域，神经干细胞及神经元的诱导多采取 SMAD 途径双重抑制法（Dual SMAD inhibition）（Nat Biotechnol, 2009, 05; 27(5): 485），该方法得到的神经干细胞能够分化为其它类型的神经元细胞，其原理是通过抑制 BMP 和 TGFβ 途径来模拟胚胎发育早期的信号途径，从而诱导神经干细胞的产生。其中 LDN-193189 和 SB431542 是广为使用的两种化学小分子抑制剂，分别通过作用于 BMP4 途径中的 ALK2 和 ALK3，以及 TGFβ 途径中的 ALK5 来实现移植内胚层及中胚层形成，从而起到神经发生的作用。通过这种方法，可以在血清类成分（Knockout Serum Replacement）胎牛血清（FBS）和视黄酸的存在下得到光感受器神经元，且生产周期至少需要 70 天以上（STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE, 2018; 7:210-219; Sci Transl Med, 2019.1 16; 11(475)）。但是血清提取物，动物源性提取物的存在，对细胞治疗领域，特别是细胞制药来说，是一种不利于药物安全性的潜在危险，例如动物源性病毒的混入，以及致敏性蛋白的存在，都可能会导致治疗效果的失败。此外，视黄酸是视觉循环的重要参与组成成分，涉及通过视网膜色素上皮（RPE）将维生素 A（称为全反式视黄醇或全反式 ROL）转化为 11-顺式视黄醛（11-顺式-RAL），转运 11-顺式-RAL 转化为感光体，产生光色素，将 11-顺式-RAL 异构化并还原成全反式 ROL，并将全反式 ROL 转运回 RPE 参与另一个循环（Nature. 1960; 168: 114-118; Nat. Genet. 1997; 15: 236-246; J. Biol. Chem. 1997; 272: 10303-10310）。细胞培养体系中的类维生素 A，例如视黄酸（RA），非常容易受到氧化而失去活性。因此，为了稳定视黄酸不被快速氧化损伤，血清被大量用来稳定细胞培养体系中的视黄酸（Int J Dev Biol. 2012;56(4):273-8）。因此，一种既不依赖于血清，又能在细胞培养条件下稳定存在的类维生素 A 化学分子，对光感受器神经元的体外稳定安全诱导极为重要。

本发明使用的 Galunisertib（LY2157299），标准化学命名：4-(2-(6-methylpyridin-2-yl)-5,6-dihydro-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazol-3-yl) quinoline-6-carboxamide 或 4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)喹啉-6-甲酰胺；为 TGF-β 受体 I（TGF-βRI, ALK5）小分子抑制剂。LY2157299 目前正处于 II 期临床评估，针对肝癌和胶质母细胞瘤的抗癌活性（Giannelli G1, Villa E, Lahn M. Transforming Growth Factor-β as a Therapeutic Target in Hepatocellular Carcinoma. Cancer Res. 2014.4.1; 74(7):1890-4），通过阻断 TGF-β 信号通路抑制肿瘤的生长、侵袭和转移过程；此外，多项研究表明 LY2157299 阻断了 CTGF 的产生并抑制了新血管生成，从而抑制了癌细胞的生长。目前，该分子的发展方向主要是基于肺癌、肝癌和胶质母细胞瘤的药物开发以及治疗（Pharmaceutics. 2020.5.18; 12(5):459），并没有公开任何在神经再生领域的应用。

本发明使用了一种无血清小分子化学诱导体系，将多能干细胞快速转化为光感受器神经细胞，与目前国际通行的血清加视黄醇的诱导方法相比，本发明不使用血清，使用化学小分子替代视黄醇，保证了光感受器神经元发育所需要的视觉循环的运行的同时也排除了血清的不利因素。因此，本发明不仅完全免除了在细胞培养过程中动物源性成分带来的潜在危险，而且全新的化学小分子的组合展现出极大的纯度及产率优势。所以，本发明大大拓展了光感受器神经细胞移植的临床前景。同时解决了同类细胞产品生产过程中纯度低，周期长的问题，因此具有巨大的经济效益和社会效应。

发明内容

本发明涉及光感受器神经元细胞的化学诱导及培养方法、培养基及其在多种疾病中的应用。

具体地，本发明涉及如下几个方面：

一方面，本发明提供 LY2157299 在（例如人源）多能干细胞分化为外胚层中的应用。

另一方面，本发明提供了一种从（例如人源）多能干细胞分化为（例如人源）外胚层的培养基。

进一步地，所述从（例如人源）多能干细胞分化为（例如人源）外胚层的培养基，其特征在于，在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 LY2157299，所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基（DMEM/F12 培养基）、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸（Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids，最佳浓度为 1%）、0.1-0.8 g/L 氯化钠（Sodium Chloride，最佳浓度为 0.5g/L）、0.1-80mg/L 维生素 C（L-ascorbic acid，最佳浓度为 64mg/L）、0.1-1.8uM 维生素 B12（最佳浓度为 1.2uM）、0.1-9.8ng/ml 黄体酮（Progesterone，最佳浓度 6.3ng/ml）、10-35ug/ml 腐胺（Putrescine，最佳浓度为 23ug/ml）、1ug/L-25ug/L 亚硒酸钠（最佳浓度为 13.6ug/L）、0.1-44ug/ml 胰岛素（最佳浓度为 22ug/ml）、0.5-20umol/L Optiferrin（最佳浓度为 10μmol/L）、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子（OsrβFGF，最佳浓度为 50ng/mL）。

进一步地，LY2157299 的用量为 55nM-25uM，优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM。

进一步地，所述 LY2157299 的用量为 7.5uM。

另一方面，本发明提供一种（例如人源）多能干细胞分化为（例如人源）外胚层的方法，其特征在于，将多能干细胞在添加 55nM-25uM LY2157299（优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM）的 NouvNeu-basal 基础培养基中培养，获得外胚层细胞，所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基（DMEM/F12 培养基）、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸（Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids，最佳浓度为 1%）、0.1-0.8 g/L 氯化钠（Sodium Chloride，最佳浓度为 0.5g/L）、0.1-80mg/L 维生素 C（L-ascorbic acid，最佳浓度为 64mg/L）、0.1-1.8uM 维生素 B12（最佳浓度为 1.2uM）、0.1-9.8ng/ml 黄体酮（Progesterone，最佳浓度 6.3ng/ml）、10-35ug/ml 腐胺（Putrescine，最佳浓度为 23ug/ml）、1ug/L-25ug/L 亚硒酸钠（最佳浓度为 13.6ug/L）、0.1-44ug/ml 胰岛素（最佳浓度为 22ug/ml）、0.5-20umol/L Optiferrin（最佳浓度为 10μmol/L）、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子（OsrβFGF，最佳浓度为 50ng/mL）。

另一方面，本发明提供 LY2157299 和 JW55 在（例如人源）多能干细胞分化为神经干细胞中的应用。

另一方面，本发明提供将（例如人源）多能干细胞分化为神经干细胞的培养基，其特征在于，在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 LY2157299 和 JW55，所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基（DMEM/F12 培养基）、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸（Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids，最佳浓度为 1%）、0.1-0.8 g/L 氯化钠（Sodium Chloride，最佳浓度为 0.5g/L）、0.1-80mg/L 维生素 C（L-ascorbic acid，最佳浓度为 64mg/L）、0.1-1.8uM 维生素 B12（最佳浓度为 1.2uM）、0.1-9.8ng/ml 黄体酮（Progesterone，最佳浓度 6.3ng/ml）、10-35ug/ml 腐胺（Putrescine，最佳浓度为 23ug/ml）、

1 μ g/L-25 μ g/L 亚硒酸钠（最佳浓度为 13.6 μ g/L）、0.1-44 μ g/ml 胰岛素（最佳浓度为 22 μ g/ml）、0.5-20 μ mol/L Optiferrin（最佳浓度为 10 μ mol/L）、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子（OsrFGF，最佳浓度为 50ng/mL）；任选地，所述 JW55 的浓度为 0.5-20 μ M，最佳浓度为 5 μ M；任选地，所述 LY2157299 的用量为 55nM-25 μ M，优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M、12.5 μ M、15 μ M、17.5 μ M、20 μ M 或 22 μ M。

另一方面，本发明提供将（例如人源）外胚层分化为神经干细胞的培养基，其特征在于，在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 LY2157299 和 JW55，所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基（DMEM/F12 培养基）、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸（Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids，最佳浓度为 1%）、0.1-0.8 g/L 氯化钠（Sodium Chloride，最佳浓度为 0.5g/L）、0.1-80mg/L 维生素 C（L-ascorbic acid，最佳浓度为 64mg/L）、0.1-1.8 μ M 维生素 B12（最佳浓度为 1.2 μ M）、0.1-9.8ng/ml 黄体酮（Progesterone，最佳浓度 6.3ng/ml）、10-35 μ g/ml 腐胺（Putrescine，最佳浓度为 23 μ g/ml）、1 μ g/L-25 μ g/L 亚硒酸钠（最佳浓度为 13.6 μ g/L）、0.1-44 μ g/ml 胰岛素（最佳浓度为 22 μ g/ml）、0.5-20 μ mol/L Optiferrin（最佳浓度为 10 μ mol/L）、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子（OsrFGF，最佳浓度为 50ng/mL）；任选地，所述 JW55 的浓度为 0.5-20 μ M JW55，最佳浓度为 5 μ M；任选地，所述 LY2157299 的用量为 55nM-25 μ M，优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M、12.5 μ M、15 μ M、17.5 μ M、20 μ M 或 22 μ M。

另一方面，本发明提供（例如人源）多能干细胞分化为神经干细胞的方法，其特征在于，利用前述将（例如人源）多能干细胞分化为神经干细胞的培养基培养。

另一方面，本发明提供（例如人源）外胚层细胞分化为神经干细胞的方法，其特征在于，利用前述将（例如人源）外胚层分化为神经干细胞的培养基培养。

另一方面，本发明提供 LY2157299 和 AM580 在（例如人源）多能干细胞分化为光感受器神经元细胞中的应用。

进一步地，LY2157299 的用量为 55nM-25 μ M，优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M、12.5 μ M、15 μ M、17.5 μ M、20 μ M 或 22 μ M。

进一步地，AM580 的用量为 0.05-0.95 μ M，优选为 0.08 μ M，0.09 μ M，0.1 μ M，0.2 μ M，0.3 μ M，0.5 μ M，0.6 μ M，0.7 μ M，0.8 μ M，0.9 μ M。

另一方面，本发明提供一种从（例如人源）外胚层分化到光感受器神经元细胞的诱导培养基，其特征在于：在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 LY2157299 以及 AM580，所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基（DMEM/F12 培养基）、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸（Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids，最佳浓度为 1%）、0.1-0.8 g/L 氯化钠（Sodium Chloride，最佳浓度为 0.5g/L）、0.1-80mg/L 维生素 C（L-ascorbic acid，最佳浓度为 64mg/L）、0.1-1.8 μ M 维生素 B12（最佳浓度为 1.2 μ M）、0.1-9.8ng/ml 黄体酮（Progesterone，最佳浓度 6.3ng/ml）、10-35 μ g/ml 腐胺（Putrescine，最佳浓度为 23 μ g/ml）、1 μ g/L-25 μ g/L 亚硒酸钠（最佳浓度为 13.6 μ g/L）、0.1-44 μ g/ml 胰岛素（最佳浓度为 22 μ g/ml）、0.5-20 μ mol/L Optiferrin（最佳浓度为 10 μ mol/L）、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子（OsrFGF，最佳浓度为 50ng/mL）。

进一步地，所述 LY2157299 的用量为 55nM-25 μ M，优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M、12.5 μ M、15 μ M、17.5 μ M、20 μ M 或 22 μ M。

进一步地,所述 AM580 的用量为 0.05-0.95uM,优选为 0.08uM, 0.09uM, 0.1uM, 0.2uM, 0.3uM, 0.5uM, 0.6uM, 0.7uM, 0.8uM, 0.9uM。

进一步地,所述 LY2157299 的用量为 7.5uM,所述 AM580 的用量为 0.5uM。

另一方面,本发明提供一种多能干细胞分化为光感受器神经元细胞的方法,其特征在于,将多能干细胞在添加 55nM-25uM LY2157299 (优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM)的 NouvNeu-basal 基础培养基中培养,获得外胚层细胞,然后将外胚层细胞在上述的光感受器神经元细胞诱导培养基中培养,获得光感受器神经元细胞,优选地,所述培养是在有基底膜的情况下进行的,更优选地,所述基底膜为基底胶(Matrigel)(STEMCELL Technologies),层粘蛋白(Laminin)和玻连蛋白的一种或多种的组合,所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基(DMEM/F12 培养基)、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸(Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids, 最佳浓度为 1%)、0.1-0.8 g/L 氯化钠(Sodium Chloride, 最佳浓度为 0.5g/L)、0.1-80mg/L 维生素 C (L-ascorbic acid, 最佳浓度为 64mg/L)、0.1-1.8uM 维生素 B12 (最佳浓度为 1.2uM)、0.1-9.8ng/ml 黄体酮(Progesterone, 最佳浓度 6.3ng/ml)、10-35ug/ml 腐胺(Putrescine, 最佳浓度为 23ug/ml)、1ug/L-25ug/L 亚硒酸钠(最佳浓度为 13.6ug/L)、0.1-44ug/ml 胰岛素(最佳浓度为 22ug/ml)、0.5-20umol/L Optiferrin (最佳浓度为 10umol/L)、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子(OsrbFGF, 最佳浓度为 50ng/mL)。

另一方面,本发明提供一种光感受器神经元细胞,其特征在于利用前面所述的从(例如人源)外胚层分化到光感受器神经元细胞的诱导培养基培养。

另一方面,本发明提供一种光感受器神经元细胞,其特征在于利用前面所述的(例如人源)多能干细胞分化为光感受器神经元细胞的方法制备。

另一方面,本发明提供一种神经干细胞,其特征在于利用前面所述的从(例如人源)外胚层分化到神经干细胞的诱导培养基培养。

另一方面,本发明提供一种神经干细胞,其特征在于利用前面所述的(例如人源)外胚层分化为神经干细胞的方法制备。

另一方面,本发明提供一种外胚层细胞,其特征在于利用前面所述的(例如人源)多能干细胞分化为(例如人源)外胚层的培养基培养。

另一方面,本发明提供一种外胚层细胞,其特征在于利用前面所述的(例如人源)多能干细胞分化为(例如人源)外胚层的方法制备。

另一方面,本发明涉及前面所述的光感受器神经元细胞在视觉神经的退行性疾病的治疗中的用途,所述视觉神经的退行性疾病是例如与年龄相关的黄斑变性、色素变性。

另一方面,本发明涉及前面所述的光感受器神经元细胞在光感受器神经细胞移植中的用途。

另一方面,本发明涉及外胚层细胞在制备光感受器神经元细胞中的用途。

本发明涉及化合物 LY2157299 和/或 JW55 在神经系统体外发育中的应用,涉及到该化合物与基础培养基的组合,以及这一组合在外胚层细胞或神经干细胞中的培养及其临床应用。

本发明涉及化合物(例如 LY2157299, 和/或 AM580)在神经系统体外发育中的应用,涉及到该化合物与基础培养基的组合,以及这一组合在光感受器神经细胞中的培养及其临床应用。

本发明涉及一种试剂盒,其包含 NouvNeu-basal 基础培养基, LY2157299, 和/或 AM580,

优选地,所述 LY2157299 的用量为 55nM-25uM 优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM,所述 AM580 的用量为 0.05-0.95uM,优选为 0.08uM, 0.09uM, 0.1uM, 0.2uM, 0.3uM, 0.5uM, 0.6uM, 0.7uM, 0.8uM, 0.9uM。

本发明人诱导光感受器神经元细胞制备步骤:

在无血清外胚层诱导培养基中对多能干细胞进行单层贴壁培养,所述无血清培养基中含有本发明使用的化学小分子、氨基酸、无机盐等成分,而不含有血清、BMP 或者 TGF 信号转导途径的物质等成分,使用这一无血清神经诱导培养基贴壁培养 15 天,得到贴壁神经干细胞。进一步使用维生素途径激活剂处理细胞,从而获得光感受器细胞。

在具体的实施方案中,所述作用于 BMP 信号转导途径的物质包括一个或者多个由下列各项自由排列组合的蛋白质: BMP2, BMP4, BMP4, Smad1, Smad5, Smad8; 其中所述作用于 TGF 信号转导途径的物质包括一个或者多个由下列各项自由排列组合的蛋白质: Activin, TGF-beta, Nodal, Smad2, Smad3。维生素包括一个或者多个由下列各项排列组合的维生素: 维生素 C, 维生素 E, 维生素 B12, 维生素 A。

在具体的实施方案中,所述贴壁培养是在有基底膜制剂的情况下进行的。本发明所述基底膜制剂,可以在培养器皿的表面形成一层由胞外基质分子构成的薄膜,可以为细胞的形态、生长分化以及运动等参数提供与体内环境类似的支持。在具体的实施方案中,所述基底膜为基底胶 (Matrigel) (STEMCELL Technologies), 层粘蛋白 (Laminin) 和玻连蛋白的一种或多种的组合。

本发明中的无血清培养基表示不含有直接从血液中分离的血清。血清为血浆的透明液体部分,其不含纤维蛋白原或血细胞,并且在血液凝固后保持为液体。无血清培养基可以含有血清替代物,血清替代物的实例包括血清白蛋白,转铁蛋白,脂肪酸等纯化物质。

在本发明中,表述“光感受器神经元细胞”、“光感受器神经细胞”和“光感受器细胞”可以互换。

附图说明

1. 图1示出:使用LY2157299获得的外胚层细胞,所获细胞向神经干细胞分化及其分子鉴定结果。图1a表示使用对照方法获得的神经干细胞,经过体外传代后重建神经花环的结构;图1b表示使用LY2157299获得的神经干细胞,经过体外传代后重建神经花环的结构;图1c表示使用对照方法获得的神经干细胞,经过体外重建神经花环,能够表达神经干细胞的标志物 Pax6和Nestin;图1d表示使用LY2157299获得的神经干细胞,经过体外重建神经花环,能够表达神经干细胞的标志物 Pax6和Nestin;图1e-1f表示使用Q-PCR比较本发明的小分子抑制剂,与对比诱导方法 (CK) 相比在神经干细胞形成过程中神经干细胞标志物的表达差异。以上结果显示,LY2157299不仅能够形成神经干细胞,且与对照方法相比,在神经干细胞标志物的表达上比对照方法略有增加。

2. 图2示出:使用不同浓度LY2157299进行外胚层细胞诱导,对最佳浓度进行筛选。图2a显示,使用LSB对照形成外胚层细胞形态;图2b显示,没有LY2157299时,细胞不形成外胚层形态;图2c显示,低浓度LY2157299产生包括外胚层细胞在内的混合细胞分化;图2d显示,适当浓度LY2157299产生均匀分化的外胚层细胞;图2e显示,过高浓度LY2157299促进外胚层细胞向神经细胞分化;图2f显示外胚层标志物与LY2157299浓度呈正相关;图2g显示凋亡标志物与LY2157299浓度呈正相关。因此,本发明使用的LY2157299最佳浓度为7.5uM。

3. 图3示出：使用不同浓度AM580进行光感受器细胞诱导，对最佳浓度进行筛选。图3a显示，使用LSB对照形成外胚层细胞形态；图3b显示，没有AM580时，细胞形成具有长轴突的皮质神经元形态；图3c显示，低浓度AM580产生包括皮质神经元在内的混合细胞分化；图3d显示，适当浓度AM580产生均匀分化的具有短轴突的光感受器细胞类型；图3e显示，过高浓度AM580使分化细胞产生胁迫；图3f显示外胚层及光感受器标志物PAX6与AM580浓度呈正相关；图3g显示凋亡标志物与AM580浓度呈正相关。因此，本发明中AM580最佳浓度为0.5 μ M。

4. 图4示出：使用不同浓度AM580进行光感受器细胞诱导，所获细胞的形态及光感受器标志物的Q-PCR鉴定。图4a-4d显示，使用RA对照和不同浓度AM580形成的光感受器细胞；图4e显示，4a-4d中所使用的细胞的神经细胞标志物Nestin的表达比较；图4f显示，4a-4d中所使用的细胞的光感受器细胞标志物Recoverin的表达比较；图4g显示，4a-4d中所使用的细胞的光感受器细胞标志物Rhodopsin的表达比较；图4h显示，4a-4d中所使用的细胞的光感受器细胞标志物CRX的表达比较；图4i显示4a-4d中所使用的细胞的光感受器细胞标志物Opsin1 (OPN1LW)的表达比较。

图5：使用不同浓度AM580进行光感受器细胞诱导，所获细胞的形态及光受体标志物的荧光免疫鉴定。结果表明，RA对照组获得的光感受器细胞表达Nestin蛋白和Recoverin蛋白（5a）、成熟光感受器的标志蛋白CRX和Opsin蛋白（5b）、Rhodopsin和PAX6蛋白（5c）；AM580不同浓度组也表达和RA对照组一致的蛋白表达模式（5d-5l）。

图6：基础培养体系中关键成分的浓度鉴定示意图。6a：不同浓度氯化钠对培养体系渗透压的影响示意图；6b：使用不同浓度维生素B12得到的光感受器神经元细胞的表达差异示意图；6c：胰岛素在细胞长期培养过程中对细胞生理状态的影响示意图；6d：维生素C在细胞长期培养过程中对细胞生理状态的影响示意图；6e：不同浓度黄体酮在光感受器细胞诱导过程中对细胞生理状态的影响示意图；6f：不同浓度腐胺在光感受器细胞诱导过程中对细胞生理状态的影响示意图；6g：不同浓度Optiferrin在光感受器细胞诱导过程中对细胞生理状态的影响示意图。

有益效果

本发明建立了无血清无动物源性物质的光感受器神经元的诱导培养体系。因此，使用多种来源的成体细胞（例如人源）经过重编程及定向分化的方法得到了光感受器神经元，且具有各项完备的生物学功能，多个批次之间状态稳定，纯度高，解决了细胞类药物生产过程中纯度低，周期长的问题；而且本发明同时解决了长久以来动物源性培养方法和滋养细胞污染的问题，能够用于多种视觉障碍疾病的移植治疗，因此具有巨大的经济效应和社会效应。

具体实施方式

以下通过具体实施例详细说明本发明的实施过程和产生的有益效果，旨在帮助阅读者更好地理解本发明的实质和特点，不作为对本案可实施范围的限定。

实施例 1.外胚层细胞诱导培养基的制备

诱导培养基的配方，以下简称 NouvNeu-basal：

杜氏改良伊格尔/F12 培养基（DMEM/F12 培养基，SIGMA），0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸（Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids，货号：11140076，Thermo Fisher），0.1-0.8 g/L 氯化钠（Sodium Chloride，0.5g/L，SIGMA），0.1-80mg/L 维生素 C（L-ascorbic acid，64mg/L，SIGMA），0.1-1.8 μ M 维生素 B12（1.2 μ M，SIGMA），0.1-9.8ng/ml 黄体酮（Progesterone，6.3ng/ml，SIGMA），10-35ug/ml 腐胺（Putrescine，23ug/ml，SIGMA），

1ug/L-25ug/L 亚硒酸钠（最佳浓度为 13.6ug/L, SIGMA），0.1-44ug/ml 胰岛素（22ug/ml, Solarbio），0.5-20umol/L Optiferrin（10umol/L, SIGMA），2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子（OsrβFGF, 最佳浓度为 50ng/mL, 禾元生物）。

本发明外胚层细胞诱导培养基的制备为在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 55nM-25uM LY2157299（Selleck）（最佳浓度为 7.5uM）（优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM）。以下简称 LY 诱导方法。

对照实验为，NouvNeu basal 基础培养基中添加 100 nM LDN-193189（Selleck）和 10uM SB431542（Selleck），以下简称 LSB 诱导方法。

实施例 2. 外胚层的诱导与鉴定

2.1 外胚层的化学诱导

外胚层细胞来源于人多能干细胞，包括胚性多能干细胞，如 H9 细胞系和人诱导多能干细胞。其中人诱导多能干细胞按照“重编程培养基及重编程诱导多能干细胞的培养方法”（ZL 201910050800.7）进行从 CD34+细胞重编程获得。在本发明中，“诱导多能干细胞”和“多能干细胞”可以互换使用。

人多能干细胞使用 Matrigel（STEMCELL Technologies）包被 T25 细胞培养瓶，铺板后置于 37℃恒温箱中孵育一个小时以上。按照 1×10^6 细胞接种于 T25 培养瓶中进行扩增和传代。

进行外胚层细胞诱导时，使用 50ug/ml 多聚赖氨酸（SIGMA, P6407）包被 6 孔培养板，铺板后置于 37℃恒温箱中孵育 3 小时以上；然后使用 5ug/ml 层粘连蛋白（Laminin, I2020, SIGMA ALDRICH）进一步包被，铺板后置于 37℃恒温箱中孵育 3 小时以上。当多能干细胞达到 70%的覆盖率时，用 EDTA 在 37℃消化 5 分钟，使用 DMEM 终止细胞消化。细胞洗涤离心后按照 2×10^5 每瓶的比例重新接种于 T25 培养板中。使用本发明神经干细胞诱导培养基进行诱导，每天更换培养基直至形成片层状外胚层细胞。

外胚层用 EDTA 在 37℃消化 5 分钟，使用 DMEM 终止细胞消化。细胞洗涤离心后按照 2×10^5 每瓶的比例重新接种于 50ug/ml 多聚赖氨酸及 5ug/ml 层粘连蛋白包被的 T25 培养板中，进行扩增培养。培养条件为 37℃，5%的 CO₂（Panasonic, MCO-18AC）。

2.2 外胚层细胞的鉴定

外胚层细胞可以进一步形成神经干细胞，为了鉴定外胚层细胞的这一能力，在体外使用 NouvNeu-basal 基础培养基，添加 7.5uM LY2157299 和 0.5-20uM JW55（最佳浓度为 5uM），进一步培养实施例 2.1 中得到的外胚层细胞，直至形成神经花环状结构。使用 LSB 诱导方法作为对照。

分别取 LY 诱导方法和 LSB 诱导方法得到的外胚层分化得到的神经干细胞进行免疫荧光染色鉴定：采用 4%多聚甲醛室温固定细胞 40 分钟，用 DPBS 缓冲液清洗两遍；然后用 0.1%Triton X-100 透化处理 5 分钟，用 DPBS 缓冲液清洗两遍；然后用含 10%马血清和 0.1%Triton X-100 的 DPBS 缓冲液将细胞 4℃孵育过夜；然后加入用 DPBS 缓冲液稀释的抗体，37℃孵育 2 小时，用 DPBS 缓冲液清洗三遍后拍照，拍照使用 Leica DMi8 进行。抗体使用细节如表 1 所示。结果如图 1a-1d 所示，显示 LY 诱导方法和对照 LSB 诱导方法均能诱导具有神经花环结构的神经干细胞产生，且得到的神经干细胞表达 Pax6 和 Nestin。

表 1.细胞免疫荧光染色所用抗体

一抗抗体	一抗使用浓度	二抗抗体	二抗使用浓度
Anti-PAX6-antibody (ThermoFisher)	1:200	驴抗鼠 IgG(H+L), Alexa Fluor 568 (Invitrogen A11008)	1:1000
Anti-Nestin antibody (CST)	1:400	羊抗兔 IgG(H+L), Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11008)	1:1000

使用 Q-PCR 检测从外胚层细胞向神经干细胞诱导过程中的不同标志物基因的转录变化。实施例 2 中使用的外胚层细胞，使用 LY 诱导方法和 LSB 诱导对照方法得到的神经干细胞，分别使用 RNeasy Mini or Micro Kit (QIAGEN) 进行总 RNA 抽提，1 mg RNA 用 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) 合成 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 和 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) 来进行 Quantitative PCR 的标记和反应，beta-Actin 用来作为内参。所有数据用 delta-Ct method 进行分析。每组试验使用三组重复进行试验，并进行方差统计。用于鉴定不同细胞标志物的编码基因的引物序列如表 2 所示。结果如图 1e-1g 所示。结果显示 LY 诱导方法和对照 LSB 诱导方法诱导得到的神经干细胞在转录水平表达多种神经干细胞标志物 SOX2、PAX6 和 Nestin。因此，本发明获得的外胚层具有进一步分化为神经干细胞的能力。

2.3 不同浓度 LY2157299 对外胚层细胞的转录水平的影响

使用 Q-PCR 检测不同浓度 LY2157299 对外胚层细胞形成过程中的影响。实施例 2 中使用的诱导多能干细胞，使用 LY 诱导方法中不同浓度 LY2157299 和 LSB 诱导方法得到的外胚层细胞，分别使用 RNeasy Mini or Micro Kit (QIAGEN) 进行总 RNA 抽提，1 mg RNA 用 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) 合成 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 和 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) 来进行 Quantitative PCR 的标记和反应，beta-Actin 用来作为内参。所有数据用 delta-Ct method 进行分析。每组试验使用三组重复进行试验，并进行方差统计。用于鉴定不同细胞标志物的编码基因的引物序列如表 2 所示。如图 2 所示，结果显示无 LY2157299 或者低浓度情况下，外胚层不能充分形成，高浓度则引发细胞凋亡，因此本发明使用的浓度为 LY2157299 最佳浓度范围。

表 2. 外胚层及神经干细胞检测引物

SOX2-F	CATGCAGGTTGACACCGTTGG (SEQ ID NO:1)
SOX2-R	ATGGATTCTCGGCAGACTGATTCA (SEQ ID NO:2)
PAX6-F	TCTTTGCTTGGGAAATCCG (SEQ ID NO:3)
PAX6-R	CTGCCCCGTTCAACATCCTTAG (SEQ ID NO:4)
Nestin-F	TCAAGATGTCCCTCAGCCTGGA (SEQ ID NO:9)
Nestin-R	TGGCACAGGTGTCTCAAGGGTAG (SEQ ID NO:10)
CASP3-F	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG (SEQ ID NO:5)

CASP3-R	GCATCGACATCTGTACCAGACC (SEQ ID NO:6)
ACTIN-F	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA (SEQ ID NO:7)
ACTIN-R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG (SEQ ID NO:8)

实施例 3.外胚层细胞分化为光感受器神经元细胞

将实施例 2 中 NouvNeu 系统获得的外胚层细胞在 NouvNeu 培养基中进行定向分化。进行分化时,使用 50ug/ml 多聚赖氨酸 (SIGMA, P6407) 包被 6 孔培养板,铺板后置于 37℃ 恒温箱中孵育 3 小时以上,直至细胞接种。

本发明光感受器神经元细胞诱导培养基的制备为在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 55nM-25uM LY2157299 (最佳浓度为 7.5uM) (优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM) 以及 0.05-0.95uM AM580 (Selleck) (最佳浓度为 0.5uM) (优选为 0.08uM, 0.09uM, 0.1uM, 0.2uM, 0.3uM, 0.5uM, 0.6uM, 0.7uM, 0.8uM, 0.9uM)。直至细胞形成光感受器神经元细胞。在 NouvNeu 培养基中添加 0.5uM 视黄酸 (Retinoic acid) 形成对照实验,以下简称 RA。

AM580 浓度筛选试验参照实施例 2.3 进行,比较使用 AM580 诱导方法中不同浓度 AM580 和 LSB 诱导方法得到的光感受器神经元细胞的表达差异。引物使用列表见表 2 及表 4。如图 3 所示,结果表明 AM580 浓度与光感受器非特异性标志物 PAX6 呈正相关,但当 AM580 浓度过高时,会引起细胞凋亡。结合图 4 中 AM580 对光感受器神经元特异性基因的表达,因此,本发明使用的 AM580 浓度为最佳使用浓度。

每隔 3 天更换新鲜培养基,直至第 21 天。培养条件为 37℃, 5%的 CO₂ (Panasonic, MCO-18AC)。诱导完成后,分别取每组对照两种材料进行免疫荧光染色鉴定:采用 4%多聚甲醛室温固定细胞 40 分钟,用 DPBS 缓冲液清洗两遍;然后用 0.1% Triton X-100 透化处理 5 分钟,用 DPBS 缓冲液清洗两遍;然后用含 10%马血清和 0.1%Triton X-100 的 DPBS 缓冲液将细胞 4℃孵育过夜;然后加入 2%马血清和 0.1%Triton X-100 的 DPBS 缓冲液稀释的一抗,37℃孵育 2 小时,用 DPBS 缓冲液清洗三遍后,加入 2%马血清和 0.1%Triton X-100 的 DPBS 缓冲液稀释的二抗拍照。抗体使用细节如表 3 所示。实验结果表明实施例 3 中得到的光感受器神经元和 RA 对照一样,具有轴突结构且表达光感受器神经元标志物 OPSIN、CRX、RECOVERIN、RHODOPSIN 和 PAX6,以及神经谱系标志物 Nestin (图 5)。

表 3.定向分化免疫荧光染色所用抗体

一抗抗体	一抗使用浓度	二抗抗体	二抗使用浓度
Anti-PAX6-antibody (Abcam)	1:200	羊抗兔 IgG(H+L), Alexa Fluor 488 (Invitrogen A10037)	1:1000
Anti-NESTIN antibody (MAB5326)	1:200	驴抗鼠 IgG(H+L), Alexa Fluor 568 (Invitrogen A11008)	1:1000
Anti-Recoverin antibody (AB5585)	1:50	羊抗兔 IgG(H+L), Alexa Fluor 488 (Invitrogen A10037)	1:1000
Anti-Opsin antibody (AB5405)	1:1000	羊抗兔 IgG(H+L), Alexa Fluor 568 (Abcam175713)	1:1000
Anti-Rhodopsin antibody (MAB5316)	1:200	山羊抗大鼠 IgG(H+L), Alexa Fluor 568 (Abcam175476)	1:1000
Anti-CRX antibody (4G11)	1:100	驴抗鼠 IgG(H+L),Alexa Fluor 488 (Abcam181289)	1:1000

使用 Q-PCR 检测从外胚层细胞向光感受器神经细胞诱导过程中的不同标志物基因的转录变化。使用本发明及不同浓度 AM580 获得的光感受器细胞, 以及 RA 对照诱导方法得到的光感受器细胞, 分别使用 RNeasy Mini or Micro Kit (QIAGEN) 进行总 RNA 抽提, 1 mg RNA 用 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) 合成 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 和 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) 来进行 Quantitative PCR 的标记和反应, beta-Actin 用来作为内参。所有数据用 delta-Ct method 进行分析。每组试验使用三组重复进行试验, 并进行方差统计。用于鉴定不同细胞标志物的编码基因的引物序列如表 4 所示。结果显示, 使用 AM580 可以诱导细胞表达多种光感受器细胞特异标志基因, 且不显著低于 RA 对照 (图 4)。

表 4. 光感受器细胞诱导过程中的不同标志物基因引物

CRX-F	CTTG TAGAGGACGCAGTCTCCATCT (SEQ ID NO:11)
CRX-R	CAATCGTGCCAGACGGTGT TAGG (SEQ ID NO:12)
OPN1LW-F	TCATCGCCAGCACTATCAGCATTG (SEQ ID NO:13)
OPN1LW-R	ACAGCAGACCAGATCCAGGAGAAG (SEQ ID NO:14)
Recoverin-F	CAGTTCCAGAGCATCTACGCCAAG (SEQ ID NO:15)
Recoverin-R	GCCATGACGATCTCCAGCACTTC (SEQ ID NO:16)
Rhodopsin-F	CAGCGTGGCATTCTACATCTTCAC (SEQ ID NO:17)

Rhodopsin-R	ACCTGGCTCGTCTCCGTCTT (SEQ ID NO:18)
PAX6-F	TCTTTGCTTGGGAAATCCG (SEQ ID NO:19)
PAX6-R	CTGCCCCGTTCAACATCCTTAG (SEQ ID NO:20)
β Actin-F	GGCCGAGGACTTTGATTGCACA (SEQ ID NO:21)
β Actin-R	GGGCACGAAGGCTCATCATCAA (SEQ ID NO:22)

实施例 4. 基础培养体系中关键成分的浓度鉴定:

本发明实施例中示出的 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基 (DMEM/F12 培养基)、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸 (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids, 最佳浓度为 1%)、0.1-0.8 g/L 氯化钠 (Sodium Chloride, 最佳浓度为 0.5g/L)、0.1-80mg/L 维生素 C (L-ascorbic acid, 最佳浓度为 64mg/L)、0.1-1.8uM 维生素 B12 (最佳浓度为 1.2uM)、0.1-9.8ng/ml 黄体酮 (Progesterone, 最佳浓度 6.3ng/ml)、10-35ug/ml 腐胺 (Putrescine, 最佳浓度为 23ug/ml)、1ug/L-25ug/L 亚硒酸钠 (最佳浓度为 13.6ug/L)、0.1-44ug/ml 胰岛素 (最佳浓度为 22ug/ml)、0.5-20umol/L Optiferrin (最佳浓度为 10 μ mol/L)、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子 (OsrFGF, 最佳浓度为 50ng/mL)。

在保持其他成分最佳浓度的情况话, 取氯化钠的不同浓度梯度配制筛选培养体系。使用全自动冰点渗透压计 (FM-8P, 上海医大仪器有限公司)来检测不同浓度氯化钠对培养体系渗透压的影响, 具体操作参加产品说明书 (FM-8P, 上海医大仪器有限公司)。试验结果详见图 6a, 结果说明氯化钠浓度与培养体系渗透压呈线性增加。但当浓度达到 1g/ml 时, 培养体系的渗透压已经超过细胞培养极限渗透压 320mOsm/kg。说明本发明使用的氯化钠浓度为最适于细胞培养的浓度。

维生素 B12 浓度筛选试验参照实施例 2.3 进行, 比较使用不同浓度维生素 B12 得到的光感受器神经元细胞的表达差异。引物使用列表见表 2 及表 4。如图 6b 所示, 结果表明维生素 B12 浓度与光感受器非特异性标志物 PAX6 呈正相关, 但当维生素 B12 浓度过高时, 引起细胞非特异性分化, 从而导致 PAX6 相对表达量降低。因此, 本发明使用的维生素 B12 浓度为最佳使用浓度。

在保持其他成分最佳浓度的情况话, 分别取胰岛素或者维生素 C 的不同浓度梯度配制筛选培养体系。按照实施例 2.1 的方法进行外胚层诱导。使用 Cyquant 试验来进行细胞活力定量检测, 从而研究胰岛素或者维生素 C 在细胞长期培养过程中对细胞生理状态的影响。包被 96 孔不透光细胞培养板, 包被完成后将细胞按照 5×10^4 每孔的细胞数量分别接种, 并设置三组平行重复 (三组的平均值作为数据进行计算), 重复实施例 2.1 的过程, 培养条件为 37°C, 5% 二氧化碳。分别在 1 天、5 天、10 天以及 20 天取样, 细胞活力检测使用 CyQuant Kit (Invitrogen, 货号: X12223) 进行, 按照使用说明书操作, 使用 SpectraMax i3 Multi-Mode Microplate Reader (VWR, 型号 ID3-STD) 进行数据读取。结果如图 6c-6d 所示, Cyquant 实验显示, 诱导得到的细胞数量与胰岛素或者维生素 C 均称正相关, 但是在高浓度下, 细胞数量与本发明中的最佳浓度相比, 差异不显著; 此外, 高浓度维生素 C 在诱导后期导致了细胞成片脱落, 不能继续进行诱导。因此, 结合成本因素, 本发明基础培养基中的胰岛素或者维生素 C 为最佳浓度。

同样使用 Cyquant 试验来进行黄体酮, 腐胺和 Optiferrin 对细胞活力的检测, 从而研究不

同浓度黄体酮，腐胺和 Optiferrin 在光感受器细胞诱导过程中对细胞生理状态的影响，结果如图 6e, 6f, 和图 6g 所示，黄体酮，腐胺和 Optiferrin 浓度均与细胞增殖速度呈正相关，结合成本因素，本发明使用的黄体酮，腐胺和 Optiferrin 范围属于最佳使用范围。

需要说明的是，上述实施例仅为本发明较佳的具体实施方式，并不以任何形式限制本发明，凡根据本发明的技术方案等同替换或改变获得的技术方案，均涵盖在本发明的保护范围内。

权 利 要 求

1. LY2157299 在多能干细胞分化为外胚层中的应用, 优选地, 所述 LY2157299 的用量为 55nM-25uM, 更优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM。

2. 培养基, 其特征在于, 在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 LY2157299, 所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基 (DMEM/F12 培养基)、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸 (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids, 最佳浓度为 1%)、0.1-0.8 g/L 氯化钠 (Sodium Chloride, 最佳浓度为 0.5g/L)、0.1-80mg/L 维生素 C (L-ascorbic acid, 最佳浓度为 64mg/L)、0.1-1.8uM 维生素 B12 (最佳浓度为 1.2uM)、0.1-9.8ng/ml 黄体酮 (Progesterone, 最佳浓度 6.3ng/ml)、10-35ug/ml 腐胺 (Putrescine, 最佳浓度为 23ug/ml)、1ug/L-25ug/L 亚硒酸钠 (最佳浓度为 13.6ug/L)、0.1-44ug/ml 胰岛素 (最佳浓度为 22ug/ml)、0.5-20umol/L Optiferrin (最佳浓度为 10umol/L)、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子 (Osr bFGF, 最佳浓度为 50ng/mL)。

3. 根据权利要求 2 所述的培养基, 其特征在于, 所述 LY2157299 的用量为 55nM-25uM, 优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM。

4. 根据权利要求 3 所述的培养基, 其特征在于, 所述 LY2157299 的用量为 7.5uM。

5. 将多能干细胞 (优选人源多能干细胞) 分化为外胚层的方法, 其特征在于, 将多能干细胞在根据权利要求 2-4 任一项所述的培养基中培养, 获得外胚层细胞。

6. 培养基, 其特征在于, 在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 LY2157299 和 JW55, 所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基 (DMEM/F12 培养基)、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸 (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids, 最佳浓度为 1%)、0.1-0.8 g/L 氯化钠 (Sodium Chloride, 最佳浓度为 0.5g/L)、0.1-80mg/L 维生素 C (L-ascorbic acid, 最佳浓度为 64mg/L)、0.1-1.8uM 维生素 B12 (最佳浓度为 1.2uM)、0.1-9.8ng/ml 黄体酮 (Progesterone, 最佳浓度 6.3ng/ml)、10-35ug/ml 腐胺 (Putrescine, 最佳浓度为 23ug/ml)、1ug/L-25ug/L 亚硒酸钠 (最佳浓度为 13.6ug/L)、0.1-44ug/ml 胰岛素 (最佳浓度为 22ug/ml)、0.5-20umol/L Optiferrin (最佳浓度为 10umol/L)、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子 (Osr bFGF, 最佳浓度为 50ng/mL); 任选地, 所述 JW55 的浓度为 0.5-20uM, 最佳浓度为 5uM; 任选地, 所述 LY2157299 的用量为 55nM-25uM, 优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1uM、2.5uM、5uM、7.5uM、10uM、12.5uM、15uM、17.5uM、20uM 或 22uM。

7. 将多能干细胞 (优选人源多能干细胞) 分化为神经干细胞的方法, 其特征在于, 将多能干细胞在根据权利要求 6 所述的培养基中培养。

8. AM580 在多能干细胞 (优选人源多能干细胞) 分化为光感受器神经元细胞中的应用, 优选地, 所述 AM580 的用量为 0.05-0.95uM, 更优选为 0.08uM, 0.09uM, 0.1uM, 0.2uM, 0.3uM, 0.5uM, 0.6uM, 0.7uM, 0.8uM, 0.9uM。

9. AM580 在外胚层细胞分化为光感受器神经元细胞中的应用, 优选地, 所述 AM580 的用量为 0.05-0.95uM, 更优选为 0.08uM, 0.09uM, 0.1uM, 0.2uM, 0.3uM, 0.5uM, 0.6uM, 0.7uM, 0.8uM, 0.9uM。

10. LY2157299 和 AM580 在多能干细胞（优选人源多能干细胞）分化为光感受器神经元细胞中的应用，优选地，所述 AM580 的用量为 0.05-0.95 μ M，优选为 0.08 μ M，0.09 μ M，0.1 μ M，0.2 μ M，0.3 μ M，0.5 μ M，0.6 μ M，0.7 μ M，0.8 μ M，0.9 μ M。

11. 根据权利要求 10 所述的应用，其中所述 LY2157299 的用量为 55nM-25 μ M，优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M、12.5 μ M、15 μ M、17.5 μ M、20 μ M 或 22 μ M。

12. 光感受器神经元细胞的诱导培养基，其特征在于：在 NouvNeu-basal 基础培养基中加入 55nM-25 μ M LY2157299（优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M、12.5 μ M、15 μ M、17.5 μ M、20 μ M 或 22 μ M）以及 0.05-0.95 μ M AM580（优选为 0.08 μ M，0.09 μ M，0.1 μ M，0.2 μ M，0.3 μ M，0.5 μ M，0.6 μ M，0.7 μ M，0.8 μ M，0.9 μ M），所述 NouvNeu-basal 基础培养基的配方为杜氏改良伊格尔/F12 培养基（DMEM/F12 培养基）、0.1%-2%最低必须培养基非必需氨基酸（Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids，最佳浓度为 1%）、0.1-0.8 g/L 氯化钠（Sodium Chloride，最佳浓度为 0.5g/L）、0.1-80mg/L 维生素 C（L-ascorbic acid，最佳浓度为 64mg/L）、0.1-1.8 μ M 维生素 B12（最佳浓度为 1.2 μ M）、0.1-9.8ng/ml 黄体酮（Progesterone，最佳浓度 6.3ng/ml）、10-35 μ g/ml 腐胺（Putrescine，最佳浓度为 23 μ g/ml）、1 μ g/L-25 μ g/L 亚硒酸钠（最佳浓度为 13.6 μ g/L）、0.1-44 μ g/ml 胰岛素（最佳浓度为 22 μ g/ml）、0.5-20 μ mol/L Optiferrin（最佳浓度为 10 μ mol/L）、2.5-100ng/ml 植物源重组人碱性生长因子（OsrBFGF，最佳浓度为 50ng/mL）。。

13. 根据权利要求 12 所述的光感受器神经元细胞诱导培养基，其特征在于：所述 LY2157299 的用量为 7.5 μ M，所述 AM580 的用量为 0.5 μ M。

14. 多能干细胞（优选人源多能干细胞）分化为光感受器神经元细胞的方法，其特征在于，将多能干细胞在根据权利要求2-4任一项所述的培养基中培养，获得外胚层细胞，然后将外胚层细胞在根据权利要求10-11任一项所述的光感受器神经元细胞诱导培养基中培养，获得光感受器神经元细胞，优选地，所述培养是在有基底膜的情况下进行的，更优选地，所述基底膜为基底胶（Matrigel）、层粘蛋白（Laminin）和玻连蛋白的一种或多种的组合。

15. 根据权利要求14所述的多能干细胞分化为光感受器神经元细胞的方法，其特征在于，所述LY2157299的用量为7.5 μ M。

16. 外胚层细胞，其特征在于利用权利要求 2-4 任一项所述的培养基培养或利用权利要求 5 所述的方法制备。

17. 光感受器神经元细胞，其特征在于利用权利要求 12-13 任一项所述的诱导培养基培养或利用权利要求 14 所述的方法制备或利用权利要求 14 所述的外胚层细胞制备。

18. 权利要求 17 所述的光感受器神经元细胞在视觉神经的退行性疾病的治疗中的用途，所述视觉神经的退行性疾病例如是与年龄相关的黄斑变性、色素变性。

19. 权利要求 17 所述的光感受器神经元细胞在光感受器神经细胞移植中的用途。

20. 一种试剂盒，其包含 NouvNeu-basal 基础培养基，LY2157299，和/或 AM580，优选地，所述 LY2157299 的用量为 55nM-25 μ M 优选为 100nM、300nM、500nM、700nM、900nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M、12.5 μ M、15 μ M、17.5 μ M、20 μ M 或 22 μ M，所述 AM580 的用量为 0.05-0.95 μ M，优选为 0.08 μ M，0.09 μ M，0.1 μ M，0.2 μ M，0.3 μ M，0.5 μ M，0.6 μ M，0.7 μ M，0.8 μ M，0.9 μ M。

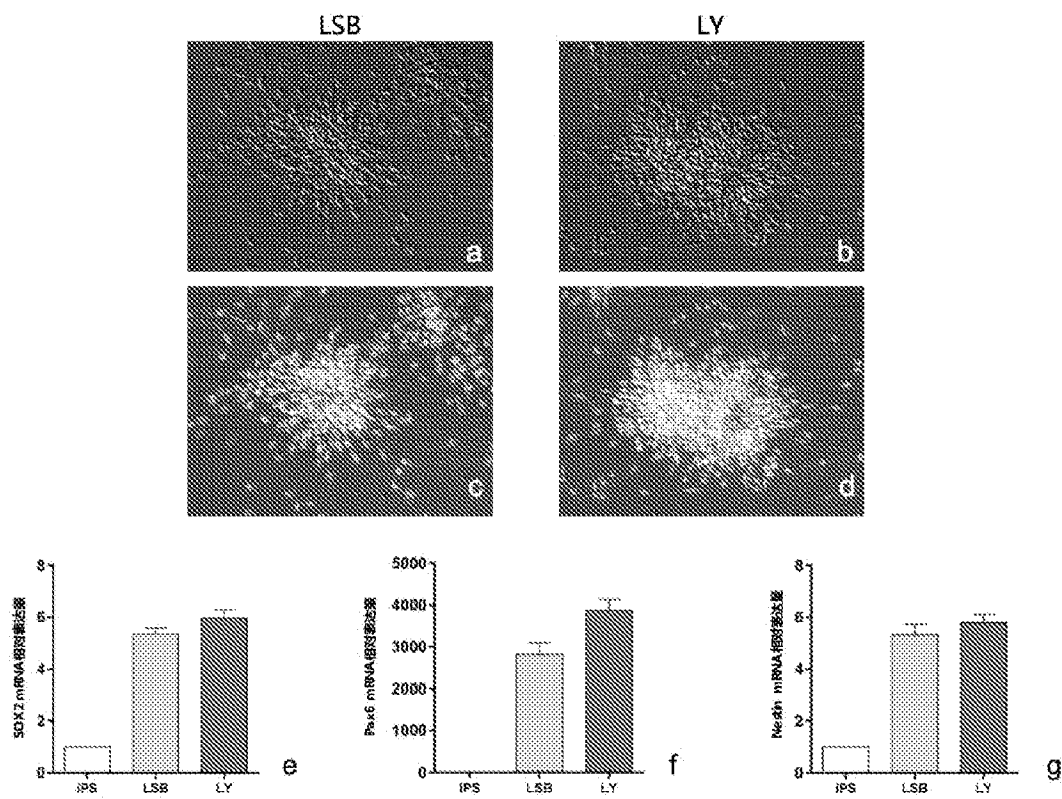


图 1

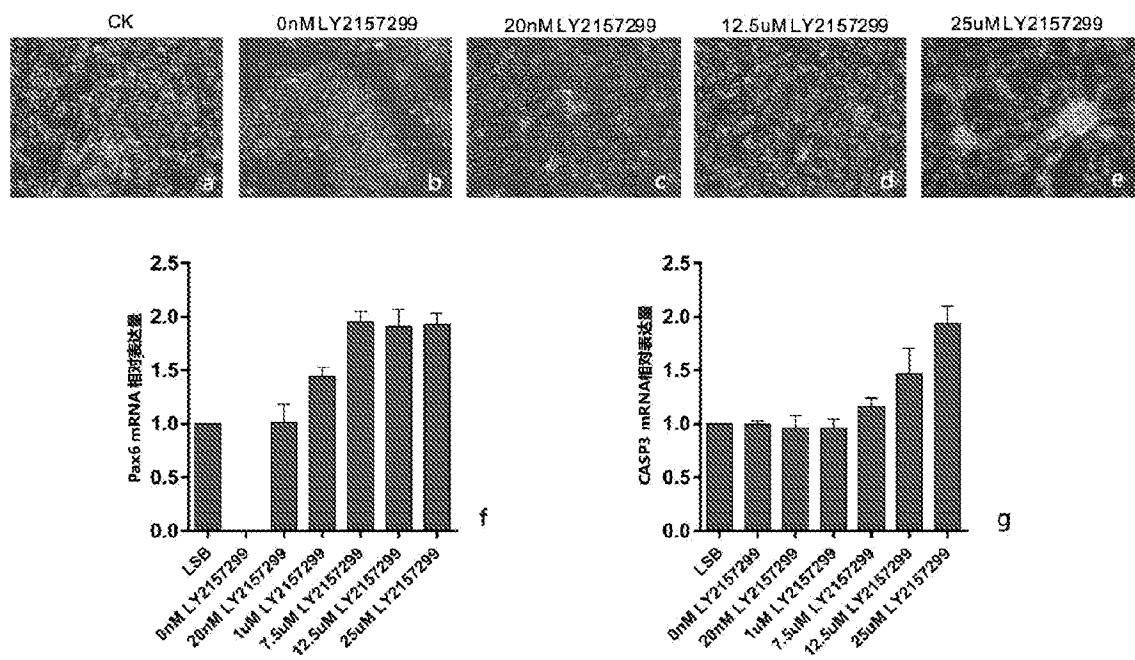


图 2

2/4

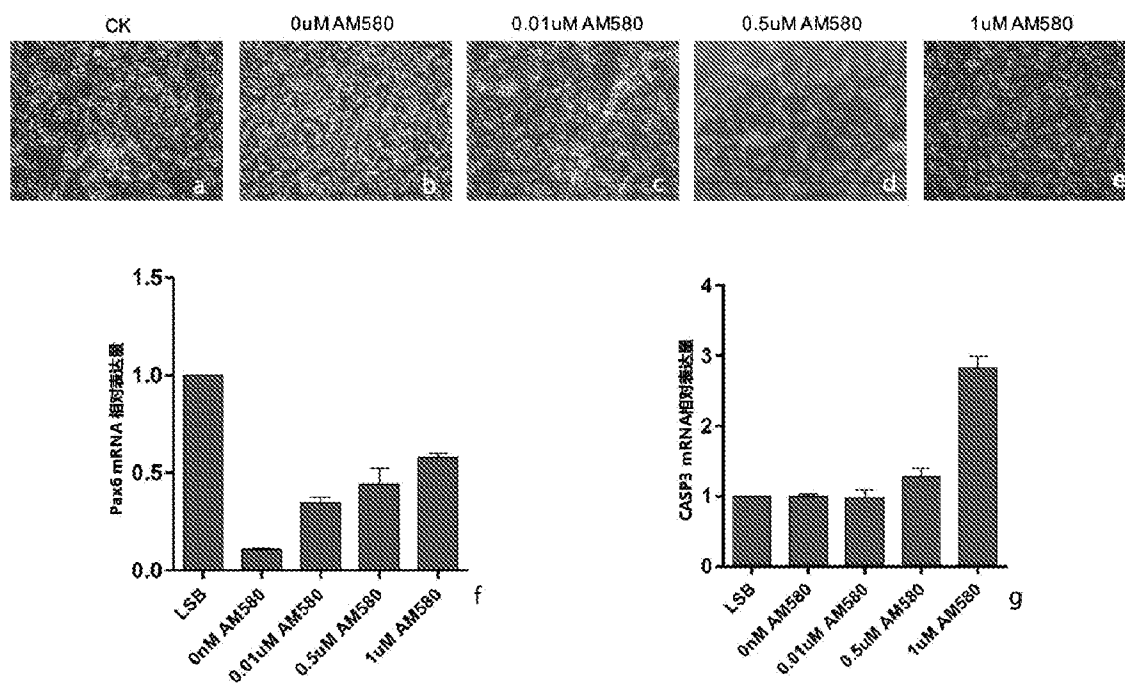


图 3

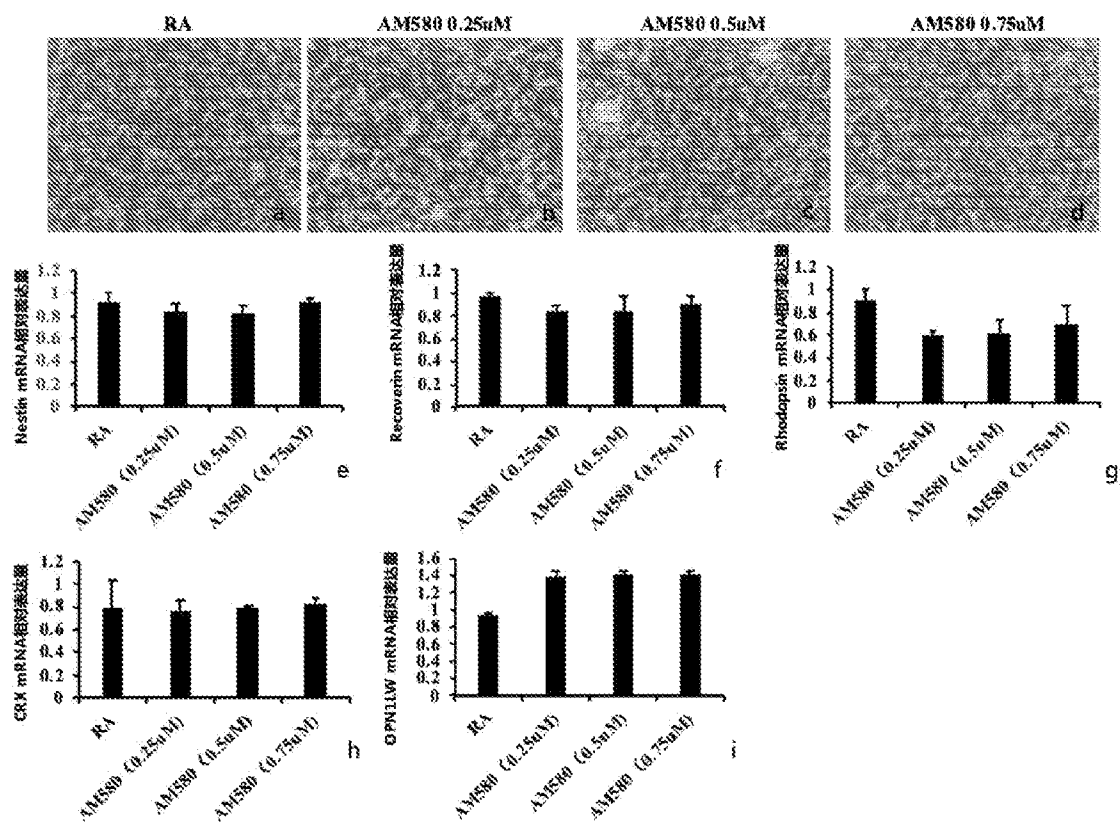


图 4

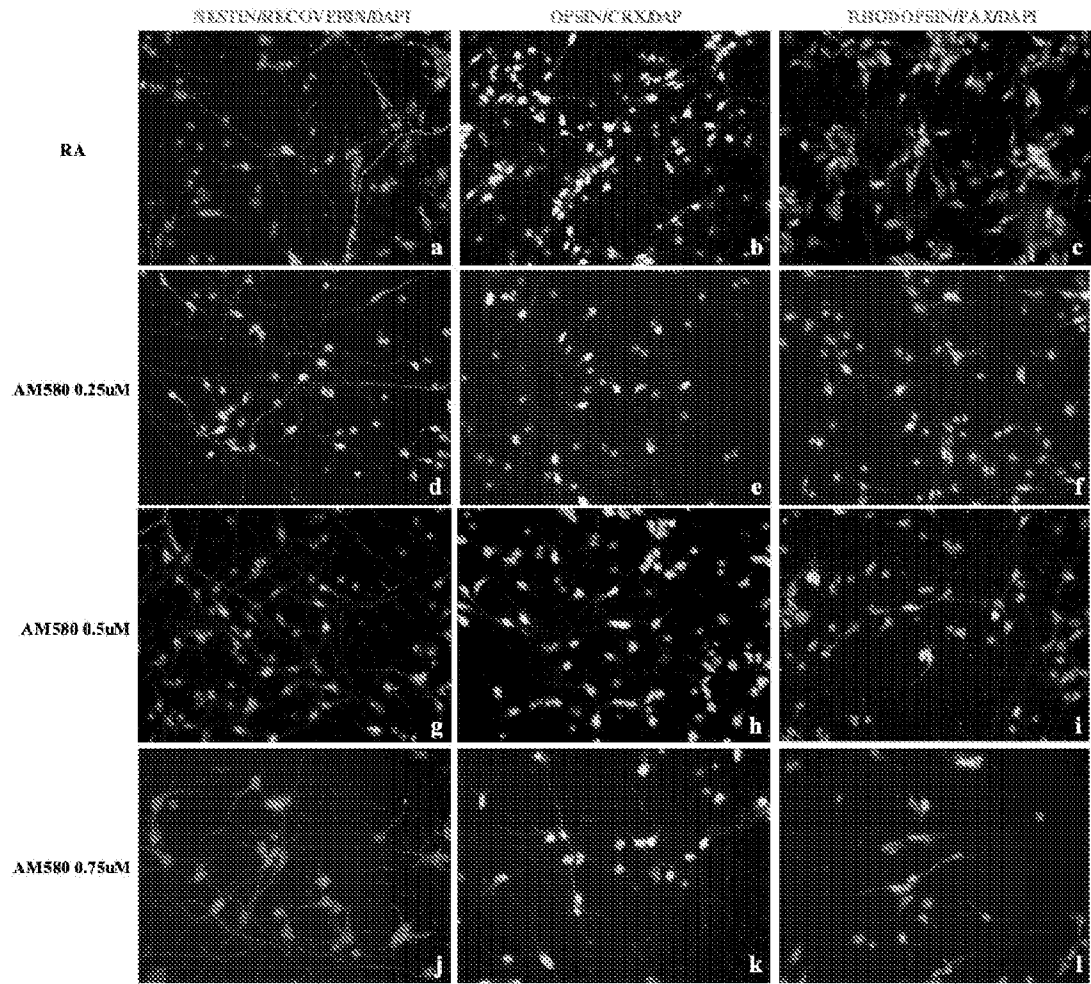


图 5

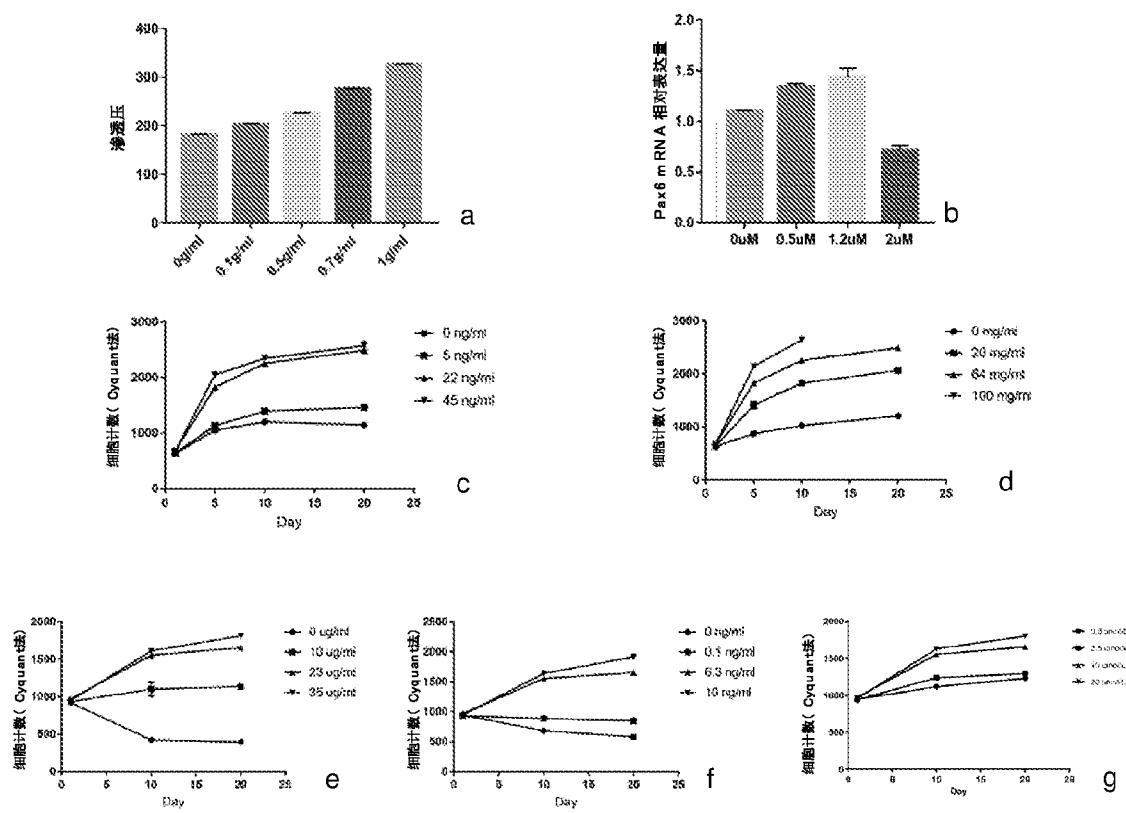


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/139521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/0793(2010.01)i; A61K 35/30(2015.01)i; A61P 17/02(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)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方数据库, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 多能干细胞, 分化, 外胚层, 神经干细胞, 神经元, 光感受器, 视锥细胞, 视杆细胞, 分化, 转化生长因子 β 抑制剂, TGF β 抑制剂, 4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5, 6-二氢-4H-吡咯并[1, 2b]吡唑-3-基), TANK抑制剂, wnt抑制剂, RAR α 激活剂, multipotent stem cell, differentiation, ectoderm, neural stem cell, neuron, photoreceptor?, cone?, rod?, LY2157299, tgfb inhibitor, galunisertib, 4-(2-(6-methylpyridin-2-yl)-5, 6-dihydro-4H-pyrrolo[1, 2-b]pyrazol-3-yl), JW55, TANK inhibitor, wnt inhibitor, AM580, RAR α activator

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112055746 A (WUHAN IREGENE PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 08 December 2020 (2020-12-08) see claims 1, 2, 5 and 9	1-5, 16, 20
X	WO 2020061371 A2 (LINEAGE CELL THERAPEUTICS INC. et al.) 26 March 2020 (2020-03-26) see claims 1-7	1-5, 16, 20
X	WO 2015175783 A1 (INTERNATIONAL STEM CELL CORPORATION) 19 November 2015 (2015-11-19) see claims 1-7	1-5, 16, 20
X	WO 2016090408 A1 (NORTHERN SYDNEY LOCAL HEALTH DISTRICT) 16 June 2016 (2016-06-16) see claims 1-9	1-5, 16, 20
X	CN 105378070 A (OCATA THERAPEUTICS, INC.) 02 March 2016 (2016-03-02) see abstract and claims 31 and 32	17-19



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

Date of mailing of the international search report

15 September 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/139521

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108795864 A (ZHONGSHAN OPHTHALMIC CENTER, SUN YAT-SEN UNIVERSITY; GUANGZHOU HONGCHANG BIO-TECH CO., LTD.) 13 November 2018 (2018-11-13) see abstract	17-19
A	CN 108103021 A (WUHAN IREGENE PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 01 June 2018 (2018-06-01) see claim 1	6-7
A	CN 111979194 A (PEKING UNIVERSITY) 24 November 2020 (2020-11-24) see claims 1 and 2	8-15
A	CN 110832069 A (BEIHAO STEM CELL AND REGENERATIVE MEDICINE RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.; HONG GUAN LTD.) 21 February 2020 (2020-02-21) see entire document	1-20
A	KAYA KD et al. "Transcriptome-based molecular staging of human stem cell-derived retinal organoids uncovers accelerated photoreceptor differentiation by 9-cis retinal" <i>Molecular vision</i> , No. 25, 11 November 2019 (2019-11-11), ISSN: 1090-0535, pp. 663-678, see entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/139521

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/139521

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112055746	A	08 December 2020	None			
WO	2020061371	A2	04 June 2020	US	2020087622	A1	19 March 2020
				CA	3113640	A1	26 March 2020
				WO	2020061371	A2	26 March 2020
				AU	2019342741	A1	15 April 2021
WO	2015175783	A1	19 November 2015	US	10457915	B2	29 October 2019
				US	2020024573	A1	23 January 2020
				US	2016122711	A1	05 May 2016
WO	2016090408	A1	16 June 2016	AU	2015362063	A8	20 July 2017
				US	2018161376	A1	14 June 2018
				EP	3230440	A1	18 October 2017
				EP	3230440	A4	13 June 2018
				AU	2015362063	A1	29 June 2017
				WO	2016090408	A8	20 July 2017
CN	105378070	A	02 March 2016	US	2019290701	A1	26 September 2019
				EP	2970903	A1	20 January 2016
				IL	276173	D0	30 September 2020
				CA	2906815	A1	18 September 2014
				AU	2014233403	B2	01 August 2019
				JP	2020031635	A	05 March 2020
				US	2016030490	A1	04 February 2016
				EP	2970903	A4	16 November 2016
				IL	241177	A	30 June 2019
				HK	1218931	A1	17 March 2017
				JP	2016515382	A	30 May 2016
				IL	241177	D0	30 November 2015
				IL	266775	A	31 August 2020
				US	2014294778	A1	02 October 2014
				AU	2014233403	A1	08 October 2015
				AU	2019253874	A1	14 November 2019
				US	2019321414	A1	24 October 2019
				JP	6581966	B2	25 September 2019
				WO	2014145108	A1	18 September 2014
				KR	20160002779	A	08 January 2016
				HK	1222205	A1	23 June 2017
				IL	266775	D0	31 July 2019
				US	10307444	B2	04 June 2019
CN	108795864	A	13 November 2018	None			
CN	108103021	A	01 June 2018	CN	108103021	B	12 February 2019
CN	111979194	A	24 November 2020	None			
CN	110832069	A	21 February 2020	US	2020277567	A1	03 September 2020
				EP	3630948	A4	30 December 2020
				WO	2018218480	A1	06 December 2018
				EP	3630948	A1	08 April 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/139521

A. 主题的分类

C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/0793(2010.01)i; A61K 35/30(2015.01)i; A61P 17/02(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)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方数据库, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED:多能干细胞, 分化, 外胚层, 神经干细胞, 神经元, 光感受器, 视锥细胞, 视杆细胞, 分化, 转化生长因子b抑制剂, TGFb抑制剂, 4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2b]吡唑-3-基), TANK抑制剂, wnt抑制剂, RAR α 激活剂, multipotent stem cell, differentiation, ectoderm, neural stem cell, neuron, photoreceptor?, cone?, rod?, LV2157299, tgfb inhibitor, galunisertib, 4-(2-(6-methylpyridin-2-yl)-5,6-dihydro-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazol-3-yl), JW55, TANK inhibitor, wnt inhibitor, AM580, RAR α activator

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 112055746 A (武汉睿健医药科技有限公司) 2020年 12月 8日 (2020 - 12 - 08) 参见权利要求1, 2, 5和9	1-5, 16, 20
X	WO 2020061371 A2 (LINEAGE CELL THERAPEUTICS INC等) 2020年 3月 26日 (2020 - 03 - 26) 参见权利要求1-7	1-5, 16, 20
X	WO 2015175783 A1 (INT STEM CELL CORP) 2015年 11月 19日 (2015 - 11 - 19) 参见权利要求1-7	1-5, 16, 20
X	WO 2016090408 A1 (NORTHERN SYDNEY LOCAL HEALTH DISTR) 2016年 6月 16日 (2016 - 06 - 16) 参见权利要求1-9	1-5, 16, 20
X	CN 105378070 A (奥卡塔治疗公司) 2016年 3月 2日 (2016 - 03 - 02) 参见摘要及权利要求31和32	17-19

☒ 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

国际检索报告邮寄日期

2021年 9月 15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

张丹丹

电话号码 62411308

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 108795864 A (中山大学中山眼科中心和广州宏畅生物科技有限公司) 2018年 11月 13日 (2018 - 11 - 13) 参见摘要	17-19
A	CN 108103021 A (武汉睿健医药科技有限公司) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01) 参见权利要求1	6-7
A	CN 111979194 A (北京大学) 2020年 11月 24日 (2020 - 11 - 24) 参见权利要求1和2	8-15
A	CN 110832069 A (北昊干细胞与再生医学研究院有限公司和北京宏冠再生医学科技有限公司) 2020年 2月 21日 (2020 - 02 - 21) 参见全文	1-20
A	KAYA KD等. "Transcriptome-based molecular staging of human stem cell-derived retinal organoids uncovers accelerated photoreceptor differentiation by 9-cis retinal" Molecular vision, 第25期, 2019年 11月 11日 (2019 - 11 - 11), ISSN: 1090-0535, 第663-678页, 参见全文	1-20

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/139521

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	112055746	A	2020年 12月 8日	无			
WO	2020061371	A2	2020年 6月 4日	US	2020087622	A1	2020年 3月 19日
				CA	3113640	A1	2020年 3月 26日
				WO	2020061371	A2	2020年 3月 26日
				AU	2019342741	A1	2021年 4月 15日
WO	2015175783	A1	2015年 11月 19日	US	10457915	B2	2019年 10月 29日
				US	2020024573	A1	2020年 1月 23日
				US	2016122711	A1	2016年 5月 5日
WO	2016090408	A1	2016年 6月 16日	AU	2015362063	A8	2017年 7月 20日
				US	2018161376	A1	2018年 6月 14日
				EP	3230440	A1	2017年 10月 18日
				EP	3230440	A4	2018年 6月 13日
				AU	2015362063	A1	2017年 6月 29日
				WO	2016090408	A8	2017年 7月 20日
CN	105378070	A	2016年 3月 2日	US	2019290701	A1	2019年 9月 26日
				EP	2970903	A1	2016年 1月 20日
				IL	276173	D0	2020年 9月 30日
				CA	2906815	A1	2014年 9月 18日
				AU	2014233403	B2	2019年 8月 1日
				JP	2020031635	A	2020年 3月 5日
				US	2016030490	A1	2016年 2月 4日
				EP	2970903	A4	2016年 11月 16日
				IL	241177	A	2019年 6月 30日
				HK	1218931	A1	2017年 3月 17日
				JP	2016515382	A	2016年 5月 30日
				IL	241177	D0	2015年 11月 30日
				IL	266775	A	2020年 8月 31日
				US	2014294778	A1	2014年 10月 2日
				AU	2014233403	A1	2015年 10月 8日
				AU	2019253874	A1	2019年 11月 14日
				US	2019321414	A1	2019年 10月 24日
				JP	6581966	B2	2019年 9月 25日
				WO	2014145108	A1	2014年 9月 18日
				KR	20160002779	A	2016年 1月 8日
				HK	1222205	A1	2017年 6月 23日
				IL	266775	D0	2019年 7月 31日
				US	10307444	B2	2019年 6月 4日
CN	108795864	A	2018年 11月 13日	无			
CN	108103021	A	2018年 6月 1日	CN	108103021	B	2019年 2月 12日
CN	111979194	A	2020年 11月 24日	无			
CN	110832069	A	2020年 2月 21日	US	2020277567	A1	2020年 9月 3日
				EP	3630948	A4	2020年 12月 30日
				WO	2018218480	A1	2018年 12月 6日
				EP	3630948	A1	2020年 4月 8日