

(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
2017 年 12 月 28 日 (28.12.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/219232 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/0735 (2010.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/086536

(22) 国际申请日: 2016 年 6 月 21 日 (21.06.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(72) 发明人: 徐希明 (XU, Ximing); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 邓纹纹 (DENG, Wenwen); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 余青桐 (YU, Qingtong); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 余江南 (YU, Jiangnan); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 曹霞 (CAO, Xia); 中国江苏省镇江市京口区学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(74) 代理人: 南京知识律师事务所 (NANJING ZHISHI LAW FIRM OF INTELLECTUAL PROPERTY); 中国江苏省南京市新模范马路 5 号南京科技广场 B 座 9 楼, Jiangsu 210009 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格 (细则 4.17 (iv))

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))。

(54) Title: CELL REPROGRAMMING METHOD BASED ON THREE-DIMENSIONAL SYSTEM

(54) 发明名称: 一种基于三维体系的细胞重编程方法

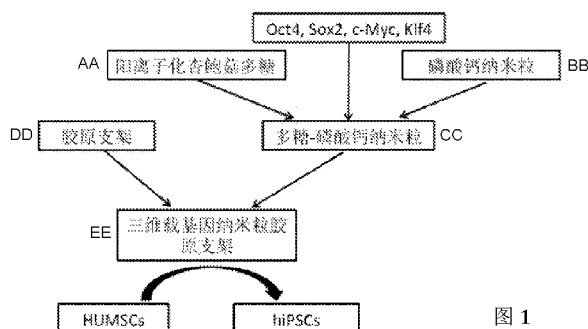


图 1

AA Cationic *Pleurotus eryngii* polysaccharide
BB Calcium phosphate nanoparticle
CC Polysaccharide-calcium phosphate nanoparticle
DD Collagen scaffold
EE Three-dimensional gene-loaded nanoparticle-collagen scaffold

(57) Abstract: Provided is a cell reprogramming method based on a three-dimensional system. Cationic *Pleurotus eryngii* polysaccharide D-Sp, calcium phosphate and four plasmids encoding the Yamanaka factors are used as raw materials. Polysaccharide-calcium phosphate hybrid nanoparticles are prepared by using a reverse microemulsion method and are adsorbed to the inner surface of an empty collagen scaffold so as to obtain a three-dimensional gene-loaded nanoparticle-collagen scaffold. Human umbilical cord mesenchymal stem cells are inoculated to the three-dimensional gene-loaded nanoparticle-collagen scaffold for reprogramming so as to form induced pluripotent stem cell spheres.

(57) 摘要: 一种基于三维体系的细胞重编程方法, 以阳离子杏鲍菇多糖 D-Sp、磷酸钙以及编码 Yamanaka 因子的 4 种质粒为原料, 采用反相微乳法制备了多糖-磷酸钙混杂纳米粒并吸附到空白胶原支架内表面, 得到三维载基因纳米粒-胶原支架; 将人脐带间充质干细胞接种于三维载基因纳米粒-胶原支架进行重编程, 形成诱导多能干细胞细胞球。

WO 2017/219232 A1

一种基于三维体系的细胞重编程方法

技术领域

本发明涉及生物技术和组织工程领域，涉及基因传递系统，具体涉及一种基于三维体系的细胞重编程方法的建立。

发明背景

通常，科学家们在二维（2D）体系中进行多能性干细胞的自我更新以及多向分化潜能的研究。但科学研究发现，与 2D 环境相比，三维（3D）体系更能够模拟体内组织器官天然的微环境。在体内胚胎发育的过程中，细胞不仅有细胞之间的相互作用，还有细胞与细胞外基质（ECM）之间的作用[参考：Zheng, W., Zhang, W., Jiang, X. Biomimetic collagen nanofibrous materials for bone tissue engineering[J]. *Advanced Engineering Materials*, 2010, 12(9): B451-B466; Han, J., Chen, L., Luo, G., Dai, B., Wang, X., Dai, J. Three-dimensional culture may promote cell reprogramming[J]. *Organogenesis*, 2013, 9(2): 118-120.]。细胞外基质通常包括胶原蛋白以及与硫酸类肝素蛋白多糖相交错的层粘连蛋白。例如，在小鼠胚胎中，在两个细胞的阶段，层粘连蛋白与硫酸类肝素蛋白多糖分布于细胞表面；而在胚泡内细胞团阶段，能够检测到 IV 型胶原和纤维连接蛋白的表达。这些 ECM 对于细胞生长、分化以及组织形态的保持具有多重功能。细胞通过表面受体（如整合素）与 ECM 进行接触，起到对细胞机械锚定和细胞膜信号传导的作用。越来越多的学者将兴趣转移到了模拟体内 3D 环境的生物材料的开发以及对 ECM 在调节干细胞行为等方面的研究[参考：Wang, K., Kievit, F. M., Florczyk, S. J., Stephen, Z. R., Zhang, M. 3d porous chitosan–alginate scaffolds as an in vitro model for evaluating nanoparticle-mediated tumor targeting and gene delivery to prostate cancer[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(10): 3362-3372.]。目前，已经有许多研究集中于 3D 环境中多能性干细胞的扩增、定向分化以及体内移植[参见：Leisten, I., Kramann, R., Ventura Ferreira, M. S., Bovi, M., Neuss, S., Ziegler, P., Wagner, W., Knüchel, R., Schneider, R. K. 3d co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(6): 1736-1747; Wang, X., Liu, S., Zhao, Q., Li, N., Zhang, H., Zhang, X., Lei, X., Zhao, H., Deng, Z., Qiao, J. Three-dimensional hydrogel scaffolds facilitate in vitro self-renewal of human skin-derived precursors[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(7): 3177–3187; Elangovan,

S., D'Mello, S. R., Hong, L., Ross, R. D., Allamargot, C., Dawson, D. V., Stanford, C. M., Johnson, G. K., Sumner, D. R., Salem, A. K. The enhancement of bone regeneration by gene activated matrix encoding for platelet derived growth factor[J]. Biomaterials, 2014, 35(2): 737-747.]. 但是, 迄今还没有文献进行报道在 3D 环境中进行多能性干细胞的诱导生成。本发明建立了一种全新的、高效的非病毒三维基因传递系统, 并首次应用于三维环境下 iPSCs 的诱导。

发明内容

本发明涉及阳离子化杏鲍菇多糖, 磷酸钙纳米粒以及三维胶原支架三部分, 通过反向微乳法以阳离子化杏鲍菇多糖修饰磷酸钙纳米粒, 进一步提高其作为非病毒载体的基因携载能力; 将多糖-磷酸钙载基因纳米粒与三维胶原支架融合, 形成了 iPSCs 的三维诱导体系。本发明将该三维体系应用于人源脐带干细胞的重编程研究, 对细胞转染效率、细胞重编程效果进行评价, 同时设置相同条件下的二维基因传递系统作为阳性对照, 实验结果表明该三维基因传递系统在基因转染效率方面显著优于二维基因传递系统; 此外, 通过三维体系诱导生成的人来源 iPSCs 自细胞接种后第 4 天开始出现 iPSCs 细胞球, 此后逐渐形成拟胚体状细胞球。经 HE 染色, 激光共聚焦, 免疫组化, 染色体核型分析, 体内畸胎瘤等手段鉴定, 表明经三维体系诱导生成的人源 iPSCs 具有类似于胚胎干细胞的全胚层分化潜能。

本发明采用了化学修饰的方法, 提供了一种将人源脐带干细胞 (HUMSCs) 定向重编程为人源诱导多能干细胞 (hiPSCs) 的高效无毒的三维基因传递系统。本发明的技术方案如下:

一种基于三维体系的细胞重编程方法, 具体包括如下步骤:

步骤 1. 胶原支架的制备:

取适量 2~5% 胶原溶液于支架制备的聚四氟乙烯模具中 ($68 \times 38 \times 5 \text{ mm}^3$), 先在 4°C 放置 0.5~1 h, 再迅速放在 -80°C 冰箱预冻 3 h 以上, 然后冻干; 于烘箱内热固化 8~10 h 之后, 用无水乙醇浸泡 24 h, 再以 10~100% 浓度梯度的乙醇溶液洗涤, 双蒸水洗至无醇味; 再次冻干, 切成大小为 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的小块, 于超净台进行紫外灭菌备用;

步骤 2. 多糖磷酸钙纳米粒的制备:

配制体积分数为 20~30% 的 Igelpal CO-520/环己烷混合液并以此为溶剂, 以 0.01

~0.05M 氯化钙溶液和 0.8~1.5 mg 阳离子多糖 D-Sp, 0.03~0.08 M 磷酸氢二钠和质粒混合溶液 10 μ L (含 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 各 2.5 μ g) 为原料, 通过反相微乳法, 得到多糖-磷酸钙混杂纳米粒微乳; 再经柱层析, 旋转蒸发及透析等步骤, 得到多糖-磷酸钙混杂纳米粒溶液;

步骤 3. 三维载基因纳米粒-胶原支架的制备:

取 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的支架样品放入 24 孔板的板孔中以无血清 DMEM 培养基使支架充分润湿; 吸除多余的培养基; 调整多糖-磷酸钙混杂纳米粒的浓度, 使每 100 μ L 纳米粒溶液中含 0.8 ~1.5 μ g 总质粒; 向每一块润湿之后 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的支架上滴加 100 μ L 多糖-磷酸钙混杂纳米粒溶液后冷冻干燥, 得到三维载基因纳米粒-胶原支架;

步骤 4. Yamanaka 因子在三维体系中的表达:

取 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 三维载基因纳米粒-胶原支架并以无血清 DMED 浸润; 将 200 μ L HUMSCs 细胞悬液($5 \sim 8 \times 10^4$ 个细胞/支架)加入浸润后的支架, 37 $^{\circ}$ C 放置 0.5~2h; 取出支架, 以 10%FBS 的 DMEM 培养基继续培养 2~6h, 通过 RT-PCR 对四种外源基因的表达量进行评价, 设置多糖-磷酸钙基因纳米粒转染组为阳性对照, 未经处理的 HUMSCs 为阴性对照;

步骤 5. 三维体系中的 iPSCs 诱导和扩增:

取 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 三维载基因纳米粒-胶原支架并以无血清 DMED 浸润; 将 200 μ L HUMSCs 细胞悬液 ($5 \sim 8 \times 10^4$ 个细胞/支架) 加入浸润后的支架, 在完全培养基中培养 3~5 天后, 换成人胚胎干细胞培养基, 每 2~3 天换液一次, 以使多能性干细胞扩增。

有益效果

以天然 I 胶原为原料制备的胶原支架为 HUMSCs 提供了安全稳定的三维培养环境, 多糖-磷酸钙载基因纳米粒具有良好的基因携载能力, 且均匀分布于三维支架中, 为 HUMSCs 向 iPSCs 的定向重编程提供了充足的外源基因来源并能够长效释放。经 RT-PCR 评价, 三维体系中外源基因的表达量显著高于二维体系; 经 iPSCs 相关鉴定, 结果表明, 三维体系中形成的人源 iPSCs 具有类似于胚胎干细胞的全胚层分化能力, 且能够于体外稳定扩增、传代至 20 代以上, 并能保持正常的染色体核型。该方法为 iPSCs 的诱导提供了全新的三维环境, 为 iPSCs 的应用由细胞水平向组织水平过渡提供了理论依据。

附图说明

图 1 为三维体系中细胞重编程的流程图。

图 2 为三维载基因纳米粒-胶原支架的扫描电镜图。

图 3 为光学显微镜下 HUMSCs 在三维载基因纳米粒-胶原支架中的形态变化。

图 4 为三维载基因纳米粒-胶原支架及其中 iPSCs 的 HE 染色。

图 5 为 iPSCs 免疫组化。

图 6 为细胞染色体核型图

图 7 为免疫荧光染色鉴定 iPSCs 的多能性。

图 8 为 Oct4 和 Nanog 启动子的甲基化程度，其中 hESCs 为人胚胎干细胞。

图 9 为 iPSCs 细胞球在体内的三胚层分化，其中：g 代表纤维组织，为内胚层特征，b 和 c 分别代表骨组织和软骨组织，为中胚层分化特征，n 代表神经管，为外胚层标记。

具体实施方式

一下实施例所采用的材料和仪器：

- 1 材料和试剂：阳离子多糖 D-Sp、LB 培养基（自制）；I 型-胶原、IV 型胶原酶、琼脂糖、溴化乙锭、L-谷氨酰胺、MINI26-1KT、生物素化 IgG（美国 sigma）；胰蛋白酶、Tris 碱、氨苄青霉素、链霉素、DAB 显示试剂盒（碧云天生物技术研究所以）；碱性成纤维生长因子（bFGF）（美国 PeproTech）；质粒抽提试剂盒（美国 Promega）；氯化钙（国药集团化学试剂有限公司）；MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四唑溴盐)、PicoGreen dsDNA 定量试剂盒（美国 Invitrogen）；基础培养基 DMEM、基础培养基 DMEM/F12、knockout DME、胎牛血清（FBS）、knockout 血清替代品（美国 GIBCO）；Oligo（诺百设计，美国 Invitrogen 合成）；T 载体试剂盒（D101B，TAKARA）；DH5 α 感受态细胞（CD201-02，全式金）；抗生素平板（诺百生物自配）；双蒸水（诺百生物自配）；动植物基因组 DNA 提取试剂盒（AP-MN-MS-GDNA-250，Axygen）；全血基因组 DNA 提取试剂盒（AP-MN-BL-GDNA-250，Axygen）；甲基化试剂盒（D5005，ZYMO）；Platinum Taq DNA Polymerase（10966034，美国 invitrogen）；PCR 产物纯化试剂盒（AP-GX-250，Axygen）；100mM dNTPs（18427013，美国 invitrogen）
- 2 菌株、细胞株和小鼠：DH5 α 甘油菌（南京基天生物）；人脐带间充质干细胞（江苏省北科生物科技有限公司）；小鼠胚胎成纤维细胞（上海中科院干细胞库）；非 PEI 胖糖尿病/重度联合免疫缺陷小鼠（NOD-SCID）（扬州大学比较医学中心）
- 3 质粒：非病毒质粒 OCT4、SOX2、KLF4 和 CMYC（广州复能基因有限公司）

4 抗体: Anti-OCT4、anti-SSEA-3、anti-SSEA-4、anti-TRA-1-81、anti-NANOG、羊抗兔 IgG-Cy3 (以上抗体由美国 Abcam 公司提供。)

5 引物:

甲基化测定引物序列:

OCT4 上游引物: TGGAGGTGAT GGGTTAGG 18

OCT4 下游引物: CATCAAATA CCCTATCATA ACC 23

NANOG 上游引物: GTGAATGAAA GAGGAAAATG GAG 23

NANOG 下游引物: AATAACCCAC CCCTATAATC C 21

(以上引物由上海生物工程有限公司提供)

6 溶液配制:

(1) 2% 胶原溶液: 称取 2.00 g I 胶原蛋白, 加入 100 mL 1% 醋酸溶液, 于 60 °C 水浴加热, 使其完全溶解, 得到半透明的溶液, 经 0.22 μm 滤膜的滤器过滤, 4 °C 保存, 备用。

(2) PBS 溶液: 取 NaCl 8.00g, KCl 0.20g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.5g, KH₂PO₄ 0.2g, 加入 800mL 双蒸水, 调 pH 至 7.4, 定容至 1000mL, 分装, 高压灭菌, 4°C 保存。

(3) 完全培养基: 低糖 DMEM, 加入 10%FBS 和 100U/mL 青-链霉素溶液

(4) 人胚胎干细胞培养基: Knockout DMEM 培养基中依次加入 20%血清代替物 (Knockout SR), 2 mmol/L 左旋谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β-巯基乙醇, 1% 非必须氨基酸, 100U/mL 青-链霉素溶液, 4 ng/mL 人类重组碱性成纤维细胞生长因子, 混匀, 放置 4°C 冰箱备用。

7 仪器: 发射扫描电镜 (JSM-7001F, 日本电子); CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo); 超净工作台 (SW-CJ-2F, 苏州净化设备公司); 普通离心机 (美国 Eppendorf); 超速低温离心机 (德国 Heraeus); 定轨摇床 (上海第一医学院仪器厂); 共焦激光扫描显微镜 (德国 Leica); 垂直净化工作台 (SW-CJ-2D, 汇金净化), 高速台式离心机 (Neofuge13, Heal Force), 震荡恒温培养箱 (THZ-98, 华美生化), PCR 仪 (T100TM, Bio-Rad), 电泳以及成像系统 (Tanon1600, 天能), 序列分析仪 (3730xl, Applied Biosystems®)

实施例 1: 三维胶原支架的制备:

(1) 取适量 2% 胶原溶液于支架制备的聚四氟乙烯模具中 (68×38×5 mm³), 先在 4 °C 放置 0.5 h, 再迅速放在 -80 °C 冰箱预冻 3 h 以上, 然后冻干;

(2) 于 120 °C 烘箱内热固化 10 h;

(3) 之后, 用无水乙醇浸泡 24 h, 再以 95%, 85%, 75%, 65%, 55%, 30%, 15% 浓度梯度的乙醇溶液洗涤, 最后用大量双蒸水洗涤, 直至无醇味;

(4) 再次冻干, 切成大小为 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的小块, 于超净台进行紫外灭菌 3 h, 备用。热固化之后的过程均保证无菌操作。

实施例 2: 多糖-磷酸钙混杂纳米粒的制备

(1) 将 Igepal CO-520 溶解于环己烷中制备 Igepal CO-520 体积分数为 29% 的 Igepal CO-520/环己烷混合液;

(2) 微乳 A 的制备: 取一干净锥形瓶, 加入 25 mL Igepal CO-520/环己烷混合液, 然后将 650 μL 0.01 M 氯化钙溶液和 0.8 mg 阳离子多糖 D-Sp, 在磁力搅拌的条件下, 一起加入到净锥形瓶, 继续搅拌 2 min, 形成微乳 A;

(3) 微乳 B 的制备: 另取一干净锥形瓶, 加入 25 mL Igepal CO-520/环己烷混合液, 然后将 650 μL 0.06 M 磷酸氢二钠和质粒混合溶液 10 μL (含 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 各 2.5 μg) 一起加入到净锥形瓶, 继续搅拌 2 min, 形成微乳 B;

(4) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 将微乳 A 逐滴加入到微乳 B, 边加边搅拌, 直至整个体系透明澄清, 得到多糖-磷酸钙混杂纳米粒微乳;

(5) 加 5 mL pH=7.0 的无水乙醇对多糖-磷酸钙混杂纳米粒微乳进行稀释;

(6) 然后上硅胶色谱柱, 先用无水乙醇洗脱环己烷及游离的 DNA, 然后用含有 $5 \times 10^{-4} \text{ mM}$ NaCl 的 70% 乙醇溶液洗脱多糖-磷酸钙混杂纳米粒, 分别收集不同时间点的洗脱液, HPLC 法测定其 DNA 含量;

(7) 将含有多糖-磷酸钙混杂纳米粒的乙醇溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发 6h 除去乙醇, 浓缩液置于 12 kDa 的透析袋中, pH7.4 的 PBS 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 即得到多糖-磷酸钙混杂纳米粒溶液。

实施例 3: 三维载基因纳米粒-胶原支架的制备

(1) 取 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的支架样品放入 24 孔板的板孔中, 每孔加入 0.5 mL 无血清 DMEM 培养基, 让支架充分润湿;

(2) 0.5 h 之后, 吸除多余的培养基;

(3) 调整多糖-磷酸钙混杂纳米粒的浓度, 使每 100 μL 纳米粒溶液中含 0.8 μg 总质粒;

(4) 向每一块润湿之后 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的支架上滴加 100 μL 多糖-磷酸钙混杂纳米

粒溶液，必须缓慢、少量多次的滴加，使纳米粒溶液与支架充分接触、吸附；

(5) 然后，冷冻干燥，得到三维载基因纳米粒-胶原支架。

(6) 于扫描电镜下观察三维载基因纳米粒-胶原支架的形态。由图 2 可以看出，三维载基因纳米粒-胶原支架仍然呈现疏松多孔的内部结构，孔径在 200~400 μm 范围内。而且，从右边的放大图可以明显看出多糖-磷酸钙混杂纳米粒吸附到了胶原支架的内表面（如箭头所指示的位置）。

实施例 4：HE 染色

(1) 每一块 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的三维载基因纳米粒-胶原支架用 200 μL 无血清 DMEM 培养基润湿；

(2) 制备人脐带间充质干细胞的细胞悬液，将 200 μL 细胞悬液（ 5×10^4 个细胞/支架）少量多次滴加到润湿的支架上；

(3) 接种细胞的支架于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中放置 0.5 h；

(4) 然后，每个放有接种细胞支架的孔中加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 4 h；

(5) 将种植细胞后第 4、8、12 天的支架经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后，用低浓度到高浓度梯度的乙醇脱水，逐渐脱去支架中的水份；

(6) 再将支架置于既溶于酒精，又溶于石蜡的透明剂二甲苯中透明，以二甲苯替换出支架的中乙醇；

(7) 将已透明的支架置于已溶化的石蜡中，放入溶蜡箱保温；

(8) 待石蜡完全浸入支架后进行包埋：先制备好容器（如折叠一小纸盒），倒入已融化的石蜡，迅速夹取已浸透的石蜡组织块放入其中，冷却凝固成块即可；

(9) 将包埋好的蜡块固定于切片机上，切成薄片，一般为 5~8 μm 厚。切下的薄片往往皱褶，要放到加热的水中烫平，再贴到载玻片上，放 45 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烘干。

(10) 用二甲苯脱去切片中的石蜡，再经由高浓度到低浓度酒精脱蜡，最后放入蒸馏水中进行水化；

(11) 苏木素染色 5 min，水洗；之后，于盐酸及氨水中分色各 30 s，流水冲洗 1 h 后入蒸馏水片刻；

(12) 放入 70% 和 90% 酒精中脱水各 10 min；

(13) 再入酒精伊红染色 2~3 min，水洗；

(14) 染色后的切片经纯酒精脱水，再经二甲苯使切片透明；

(15) 将已透明的切片滴上加拿大树胶，盖上盖玻片封固，镜下观察支架及细胞

形态。图 3 显示：支架中的细胞球呈规整的球形或椭球形；图 4 显示：细胞质被伊红（eosin）染成红色，而细胞核被苏木素（hematoxylin）染色成蓝色，显示出类似于人胚胎干的细胞核/质比

实施例 5 免疫组化：

- (1) 参照实施例 4 中（5~9）制备石蜡包埋切片；
- (2) 切片进行常规脱蜡、水合，一部分切片用于碱性磷酸酶（AP）染色；
- (3) 另一部分水合之后的切片，加入 3% H_2O_2 ，室温 5~10min 灭活内源性酶，再用蒸馏水洗 3 次
- (4) 热修复抗原：将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液（pH=6.0），电炉加热至沸腾后断电，间隔 5~10min 后，重复 1~2 次，冷却后，用 PBS（pH=7.4）洗涤 1~2 次；
- (5) 将 5%BSA 封闭液滴加于切片上，室温放置 20min，甩去多余液体，不洗；
- (6) 在切片上滴加适当稀释的一抗（SSEA3, Tra-1-81, Oct4 和 Nanog），4℃过夜，后用 PBS 洗涤三次，2min/次；
- (7) 加生物素化 IgG 溶液，于 27℃反应 20min，后用 PBS 洗涤 3 次，2min/次；
- (8) 使用 DAB 显示试剂盒进行显色：取 1mL 蒸馏水，加试剂盒中 A，B，C 试剂各一滴，混匀后加至切片。室温显色，镜下控制反应时间，蒸馏水洗涤；脱水，透明，封片；显微镜观察并拍照；由图 5 可以明显看出：三维载基因纳米粒-胶原支架中的细胞球呈现碱性磷酸酶（AP）阳性表达。而且，随着时间推移，人胚胎干细胞标记因子 SEA3、TRA-1-81、OCT4 和 NANOG 逐渐呈现强阳性表达。在第 8 天的时候，所有的检测的多能性因子都呈现阳性表达，表示细胞向多能性状态的转变。相比之下，空白胶原支架中的细胞没有任何免疫染色反应。上述结果证明了三载基因纳米粒-胶原支架中的细胞球是多能性细胞重编程的产物：iPSCs；而且，与二维体系相比（病毒诱导体细胞重编程所需的平均时间为 3 周），本发明中三维非病毒体系中的重编程所需的时间缩短为 8 天左右，大大加速了细胞重编程的进程。

实施例 6：核型分析

操作过程：

- (1) 秋水仙素处理：在终止细胞培养前 3 h 向细胞培养瓶中分别加入 24 μ L

秋水仙素，使得最终浓度达 0.8 $\mu\text{g/mL}$ ，再将其放回培养箱内培养满 72 h；

(2) 收集细胞：取出细胞，用吸管充分吹打瓶壁，使贴壁的细胞冲散均匀，转入离心管内做好标记，1500 rpm 离心 5 min，去上清；

(3) 低渗处理：向离心管中加入 1 mL 0.075 mol/L KCl 低渗溶液，用吸管轻轻吹打，使细胞均匀悬浮于低渗溶液中，补加 6 mL 0.075 mol/L KCl 低渗溶液，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中，静置 20 min，使细胞膨胀、染色体分散；

(4) 预固定：向离心管中加入新配制的卡诺固定液 1 mL，轻轻吹打均匀，室温放置 20 min，1500 rpm 离心 5 min，去上清；

(5) 固定：沿离心管壁加入新配制的卡诺固定液 6 mL，吹打均匀，室温放置 20 min，1500 rpm 离心 5 min，去上清；

(6) 滴片：向沉淀物中加入新配制的适量固定液 1 mL 左右，用吸管轻轻吹打悬浮细胞，吸取细胞悬液，在一定高度垂直滴 2~3 滴于冰水预浸泡的干净载玻片上，立即用口朝一个方向吹散，在酒精上过几次，干燥，并将每张片子做好标记；

(7) 染色：将滴有细胞悬液的载玻片放于染缸，使片与片之间有一定的缝隙，将稀释的 Giemsa 染液倒在染缸中，染色 20 min，取出后用自来水冲洗，烘干；

(8) 镜检：在低倍镜找到处于中期分裂相的细胞，然后转至高倍镜下观察，并把分散度好的细胞拍下来。由图 6 可以看出，三维支架中释放的细胞球在二维环境中扩增的第 1 代和第 15 代细胞染色体核型正常，与对照人脐带干细胞的染色体核型一致，说明三维支架中诱导生成的 iPSCs 核型正常，没有发生染色体突变，证明了所述方法的安全性良好。

实施例 7：免疫荧光

对在二维环境中扩增到不同代数（第 2、10、20 以及 25 代）的 iPSCs 进行免疫荧光染色，一抗为 anti-SSEA3、anti-TRA-1-81、anti-OCT4 和 anti-NANOG，二抗为 FITC-IgG 和 Cy3-IgG。由图 7 可以看出：载基因纳米粒-胶原支架中诱导生成的 iPSCs 在二维环境扩增的过程中，不同代数（第 2、10、20 以及 25 代）的细胞仍然保持各多能性因子的阳性表达，证明了本实验诱导生成的 iPSCs 能够稳定传代。

实施例 8：启动子甲基化检测

(1) 基因组 DNA 提取和质检：利用专门 gDNA 提取试剂盒，3 个细胞样本（人脐带间充质干细胞、本实验诱导的 iPSCs 以及人胚胎干细胞株 HN4）进行基因组 DNA 的提取，并进行 OD 浓度和琼脂糖凝胶电泳测定。

(2) 合格 DNA 的甲基化处理：利用专门甲基化试剂盒，严格按说明书操作，将 500 ng-2 μ g 的 gDNA 进行甲基化处理，获得 10 μ L 的甲基化后的 DNA。具体的甲基化程序：添加 20 μ L gDNA (500 ng~2 μ g) 到 130 μ L 的 CT 溶液（试剂盒中的一种试剂）中，轻微混匀，按照如下程序进行操作：98 $^{\circ}$ C，10 min；64 $^{\circ}$ C，2.5 h；4 $^{\circ}$ C，保持。

(3) 将上述反应产物在纯化柱上进行一系列的纯化和富集，10 μ L 双蒸水洗脱收集获得甲基化的DNA；

(4) PCR 扩增以及回收纯化：以甲基化后的 DNA 为模板，进行 PCR 扩增。

第一轮PCR体系（总体积 25 μ L）：

溶液	体积
双蒸水	Up to 25 μ L
10 $\times$ PCR Buffer	2.5 μ L
Mg ²⁺ (50mM)	0.75 μ L
dNTPs(10mM)	0.5 μ L
Primer F (10 μ M)	1.5 μ L
Primer R (10 μ M)	1.5 μ L
Taq enzyme (5u/ μ l)	0.2 μ L
Template (甲基化gDNA)	2.0 μ L
Total volume	25 μ L

第一轮PCR扩增程序：95 $^{\circ}$ C 3 min；95 $^{\circ}$ C 30 sec，53 $^{\circ}$ C 30 sec，72 $^{\circ}$ C 30 sec，进行40个循环；接着 72 $^{\circ}$ C 5 min，结束。

第二轮PCR体系（总体积 50 μ L）：

溶液	体积
双蒸水	Up to 50 μ L
10 $\times$ PCR	5 μ L
Buffer	35.1 μ L
Mg ²⁺ (50mM)	1.5 μ L
dNTPs(10mM)	1 μ L
Primer F (10 μ M)	3 μ L
Primer R (10 μ M)	3 μ L
Taq enzyme (5u/ μ l)	0.4 μ L

Template (稀释 PCR 产物)	1.0 μ L
Total volume	50 μ L

第二轮PCR扩增程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 sec, 53 °C 30 sec, 72 °C 30 sec, 进行40个循环; 接着 72 °C 5 min, 结束。

PCR产物回收纯化: 将上述第二轮PCR产物进行凝胶回收纯化, OD测定浓度。

(5) TA 克隆: 利用 T 载体试剂盒, 将 PCR 纯化产物克隆至 T 载体中, 用 DH5 α 感受态细胞转化, 涂板, 于 37 °C、过夜倒置培养 (具体流程见 T 载体试剂盒说明书)

(6) 单克隆菌液测序: 挑取有效单克隆 (避开卫星菌落), 进行摇菌培养, 并进行 PCR 菌液检定, 阳性单克隆送测。

(7) 测序结果比对分析: 首先利用序列比对软件进行测序分析, 然后用甲基化分析软件对正确测序结果进行甲基化分析, 并统计 CpG 岛的甲基化数量等信息。由图 8 可以看出, iPSCs 的 *OCT4* 和 *NANOG* 启动子区域明显出现了去甲基化, 其甲基化程度和阳性对照人胚胎干细胞相似, 而与初始的人脐带间充质干细胞具有明显差异。该结果进一步证明了人脐带间充质干细胞在三维载基因纳米粒-胶原支架中重编程成功。

实施例 9: 体内畸胎瘤实验

iPSCs 消化离心后, 制成 5×10^6 个/mL 的细胞悬液, 接种到 5 周龄的雄性 NOD-SCID 裸鼠的腹部皮下, 之后观察是否有肿瘤生长。5~8 周后, 处死小鼠, 摘除肿瘤进行 HE 染色分析。从图 9 可以看出, iPSCs 细胞球在免疫缺陷的 NOD-SCID 裸鼠体内能够成功形成畸胎瘤, 而且畸胎瘤显示出明显的三胚层分化, 分别以内胚层的腺体组织, 中胚层的骨和软骨组织以及外胚层的神经管等组织为代表。该结果充分证明了三维载基因纳米粒-胶原支架能够成功应用于细胞重编程。

权利要求书

1、一种基于三维体系的细胞重编程方法，其特征是具体包括如下步骤：

步骤 1. 胶原支架的制备：取 2~5% 胶原溶液于支架制备的聚四氟乙烯模具中（ $68 \times 38 \times 5 \text{ mm}^3$ ），先在 4 °C 放置 0.5~1 h，再迅速放在 -80 °C 冰箱预冻 3 h 以上，然后冻干；于烘箱内热固化 8~10 h 之后，用无水乙醇浸泡 24 h，再以 10~100% 浓度梯度的乙醇溶液洗涤，双蒸水洗至无醇味；再次冻干，切成大小为 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的小块，于超净台进行紫外灭菌备用；

步骤 2. 多糖磷酸钙纳米粒的制备：

配制体积分数为 20~30% 的 Igepal CO-520/环己烷混合液并以此为溶剂，以 0.01~0.05M 氯化钙溶液和 0.8~1.5 mg 阳离子多糖 D-Sp，0.03~0.08 M 磷酸氢二钠和含 Oct4、Sox2、Klf4 与 c-Myc 各 2.5 μg 质粒的质粒混合溶液 10 μL 为原料，通过反相微乳法，得到多糖-磷酸钙混杂纳米粒微乳；再经柱层析，旋转蒸发及透析，得到多糖-磷酸钙混杂纳米粒溶液；

步骤 3. 三维载基因纳米粒-胶原支架的制备：

取 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的支架样品放入 24 孔板的板孔中以无血清 DMEM 培养基使支架充分润湿；吸除多余的培养基；调整多糖-磷酸钙混杂纳米粒的浓度，使每 100 μL 纳米粒溶液中含 0.8~1.5 μg 总质粒；向每一块润湿之后 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 的支架上滴加 100 μL 多糖-磷酸钙混杂纳米粒溶液后冷冻干燥，得到三维载基因纳米粒-胶原支架；

步骤 4. Yamanaka 因子在三维体系中的表达：

取 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 三维载基因纳米粒-胶原支架并以无血清 DMED 浸润；将 200 μL HUMSCs 细胞悬液（ $5 \sim 8 \times 10^4$ 个细胞/支架）加入浸润后的支架，37°C 放置 0.5~2h；取出支架，以 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 2~6h，通过 RT-PCR 对四种外源基因的表达量进行评价，设置多糖-磷酸钙基因纳米粒转染组为阳性对照，未经处理的 HUMSCs 为阴性对照；

步骤 5. 三维体系中的 iPSCs 诱导和扩增：

取 $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ 三维载基因纳米粒-胶原支架并以无血清 DMED 浸润；将 200 μL HUMSCs 细胞悬液（ $5 \sim 8 \times 10^4$ 个细胞/支架）加入浸润后的支架，在完全培养基中培养 3~5 天后，换成人胚胎干细胞培养基，每 2~3 天换液一次，以使多能性干细胞扩增。

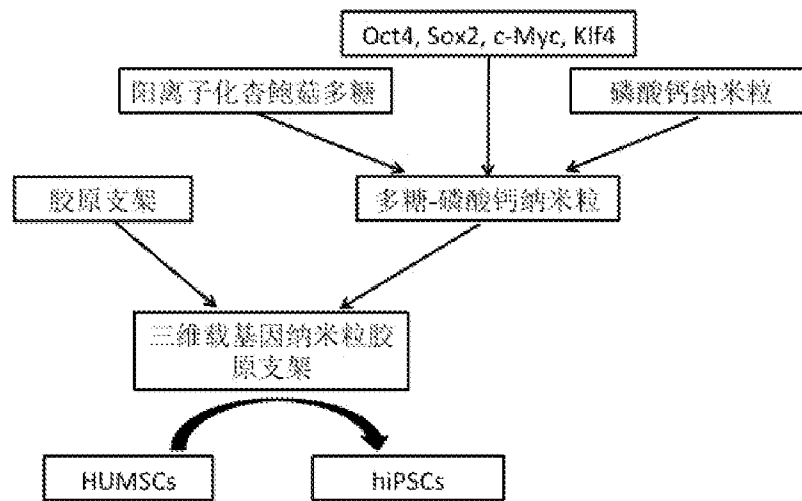


图 1

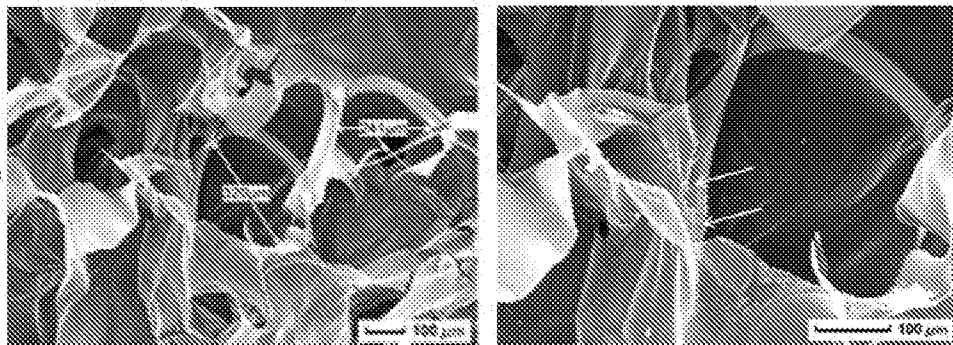


图 2

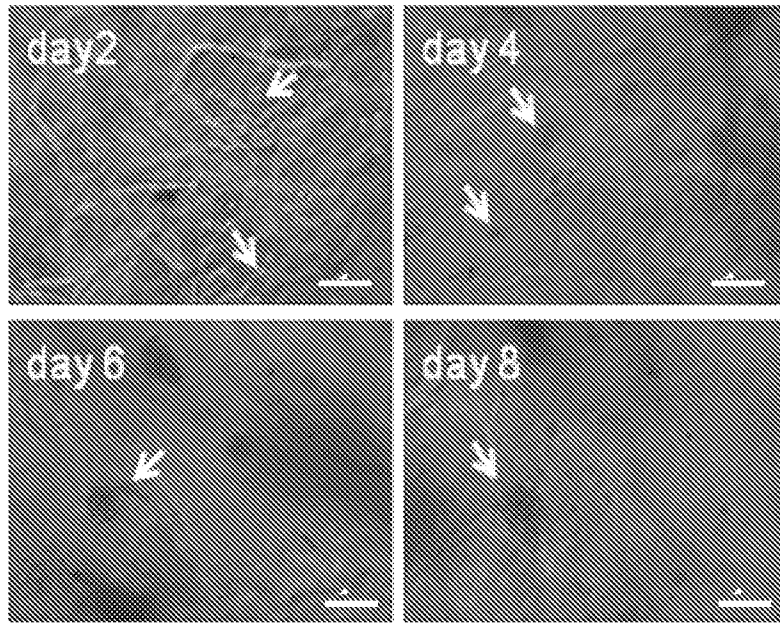


图 3

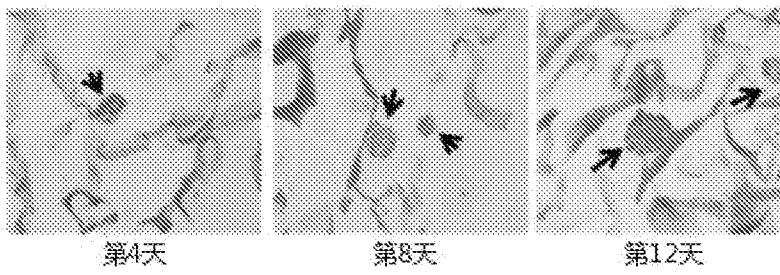


图 4

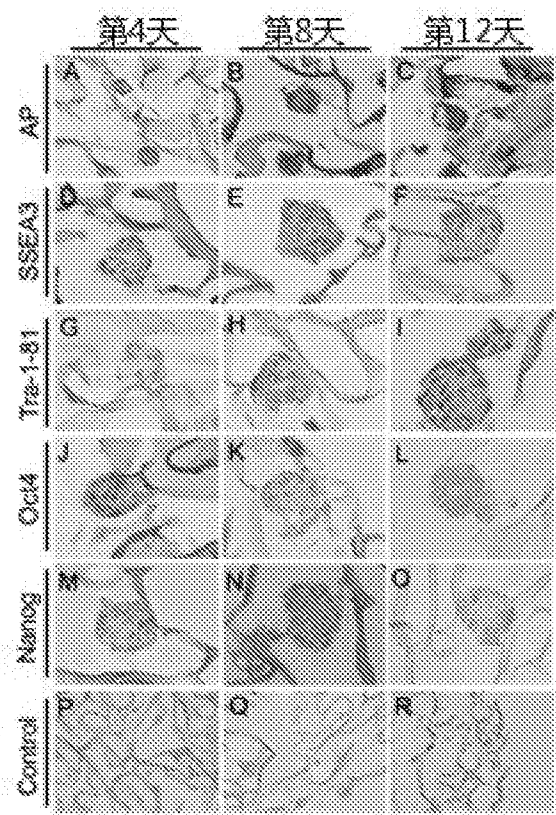


图 5

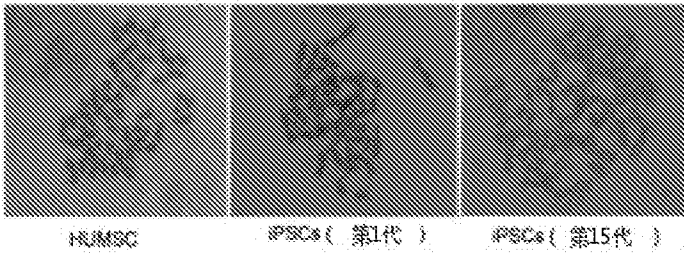


图 6

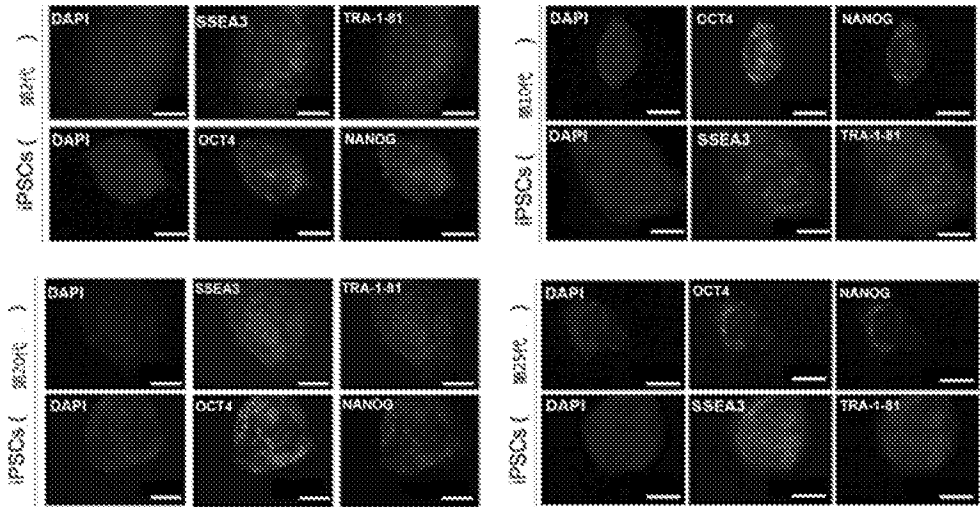


图 7

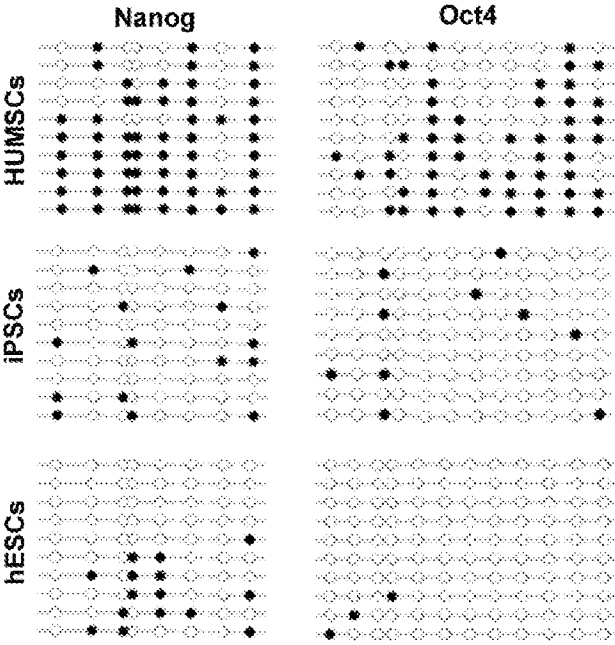


图 8

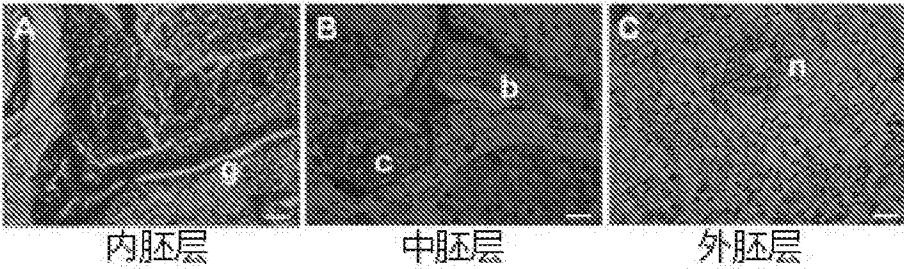


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/086536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0735 (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)

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)

CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED: matrix, substrate, ptfe, reprogramming, polytetrafluoroethylene, c-myc, oct4, sox2, klf4, cell, d-sp, collagen, plasmid, polysaccharide, ips, ipse, medium, nano, nanoparticle, nanometer, substrate, three-dimensional, cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102154352 A (JIANGSU UNIVERSITY) 17 August 2011 (17.08.2011) see claims 1 and 2, and description, pages 3 and 4	1
A	CN 103097517 A (CELLARTIS AB) 08 May 2013 (08.05.2013) see the whole document	1
A	WO 2015069469 A1 (CLONTECH LAB INC.) 14 May 2015 (14.05.2015) see the whole document	1

☒ 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 11 February 2017	Date of mailing of the international search report 15 March 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer PAN, Junyu Telephone No. (86-10) 62089155

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/086536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAO, Xia et al. "Incorporating pTGF- β 1/calcium phosphate nanoparticles with fibronectin into 3-dimensional collagen/chitosan scaffolds: efficient, sustained gene delivery to stem cells for chondrogenic differentiation" European Cells and Materials, vol. 23, 31 December 2012 (31.12.2012), ISSN: 1473-2262, pp. 81-93, and see the abstract, Materials and Methods	1
Y	CAO, Xia et al. "Non-viral co-delivery of the four yamanaka factors for generation of human induced pluripotent stem cells via calcium phosphate nanocomposite particles" Advanced Functional Materials, vol. 23, no. 43, 20 November 2013 (20.11.2013), ISSN: 1616-301X, pp. 5403-5411, see pp. 5409-5410	1
Y	PARK Hyun-Ji et al. "Nonviral delivery for reprogramming to pluripotency and differentiation" Arch. Pharm. Res., vol. 37, no. 1, 13 November 2013 (13.11.2013), ISSN: 1976-3786, pp. 107-119, see figure 1, and table 1	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/086536

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 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 filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
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 in 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/CN2016/086536

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102154352 A	17 August 2011	CN 102154352 B	07 November 2012
CN 103097517 A	08 May 2013	WO 2011154552 A1	15 December 2011
		JP 2016171820 A	29 September 2016
		US 2013164266 A1	27 June 2013
		JP 2013532966 A	22 August 2013
		AU 2011263652 A1	24 January 2013
		EP 2580319 A1	17 April 2013
		AU 2011263652 B2	20 November 2014
		US 9127255 B2	08 September 2015
		JP 6025715 B2	16 November 2016
		EP 2580319 B1	20 July 2016
		CA 2805165 A1	15 December 2011
		US 2013336933 A9	19 December 2013
WO 2015069469 A1	14 May 2015	EP 3065711 A1	14 September 2016
		JP 2016535602 A	17 November 2016
		CA 2924013 A1	14 May 2015
		US 2016251680 A1	01 September 2016
		CN 105705140 A	22 June 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/086536

A. 主题的分类

C12N 5/0735(2010.01)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

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, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI, WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED: 重编程, 三维, 细胞, 钙, 支架, 立体, 胶原, 质粒, 多糖, 培养基, 纳米, matrix, substrate, ptf, reprogramming, polytetrafluoroethylene, c-myc, oct4, sox2, klf4, cell, d-sp, collagen, plasmid, polysaccharide, ips, ipsc, medium, nano, nanoparticle, nanometre

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 102154352 A (江苏大学) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 参见权利要求1和2, 说明书第3-4页	1
A	CN 103097517 A (塞拉帝思股份公司) 2013年 5月 8日 (2013 - 05 - 08) 参见全文	1
A	WO 2015069469 A1 (CLONTECH LAB INC) 2015年 5月 14日 (2015 - 05 - 14) 参见全文	1
Y	CAO, Xia等. "Incorporating pTGF- β 1/calcium phosphate nanoparticles with fibronectin into 3-dimensional collagen/chitosan scaffolds: efficient, sustained gene delivery to stem cells for chondrogenic differentiation" European Cells and Materials, 第23卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), ISSN: 1473-2262, 第81-93页, 参见摘要, Materials and Methods	1

☒ 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

2017年 2月 11日

国际检索报告邮寄日期

2017年 3月 15日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(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

受权官员

潘俊宇

电话号码 (86-10)62089155

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CAO, Xia等. "Non-viral co-delivery of the four yamanaka factors for generation of human induced pluripotent stem cells via calcium phosphate nanocomposite particles" Advanced Functional Materials, 第23卷, 第43期, 2013年 11月 20日 (2013 - 11 - 20), ISSN: 1616-301X, 第5403-5411页, 参见第5409-5410页	1
Y	PARK Hyun-Ji等. "Nonviral delivery for reprogramming to pluripotency and differentiation" Arch. Pharm. Res., 第37卷, 第1期, 2013年 11月 13日 (2013 - 11 - 13), ISSN: 1976-3786, 第107-119页, 参见图1, 表1	1

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. (提交时间)

☒ 含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，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申请中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/CN2016/086536

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	102154352	A	2011年 8月 17日	CN	102154352	B	2012年 11月 7日
CN	103097517	A	2013年 5月 8日	WO	2011154552	A1	2011年 12月 15日
				JP	2016171820	A	2016年 9月 29日
				US	2013164266	A1	2013年 6月 27日
				JP	2013532966	A	2013年 8月 22日
				AU	2011263652	A1	2013年 1月 24日
				EP	2580319	A1	2013年 4月 17日
				AU	2011263652	B2	2014年 11月 20日
				US	9127255	B2	2015年 9月 8日
				JP	6025715	B2	2016年 11月 16日
				EP	2580319	B1	2016年 7月 20日
				CA	2805165	A1	2011年 12月 15日
				US	2013336933	A9	2013年 12月 19日
WO	2015069469	A1	2015年 5月 14日	EP	3065711	A1	2016年 9月 14日
				JP	2016535602	A	2016年 11月 17日
				CA	2924013	A1	2015年 5月 14日
				US	2016251680	A1	2016年 9月 1日
				CN	105705140	A	2016年 6月 22日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)