



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115943076 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202080082748.4

(22) 申请日 2020.11.20

(30) 优先权数据

102019132214.6 2019.11.27 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/DE2020/100986 2020.11.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/104571 DE 2021.06.03

(71) 申请人 细胞积木有限公司

地址 德国柏林市古斯塔夫-迈耶尔大道25号

(72) 发明人 亚历山大·托马斯

托比亚斯·拉姆 路茨·克洛克

(74) 专利代理机构 北京之于行知识产权代理有限公司 11767

专利代理师 何志欣

(51) Int.Cl.

B33Y 70/00 (2006.01)

B33Y 80/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/26 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B81C 1/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

B33Y 10/00 (2006.01)

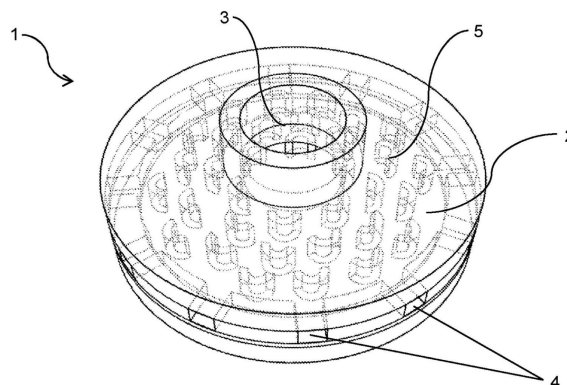
权利要求书1页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

由生物相容性聚合物构成的定植有生物细胞的3D支架及其制造

(57) 摘要

本发明涉及一种由生物相容性聚合物构成的定植有生物细胞的3D支架,在其中,生物细胞能够被培养成很接近生理结构的3D细胞培养结构体。此外,本发明也涉及一种用于制造定植有生物细胞的3D支架的方法。



1. 一种用于由生物相容性聚合物制造定植有生物细胞的3D支架(1)的方法,其中,该3D支架(1)具有至少部分被覆盖的空腔(2),该方法包括以下步骤:

(a) 通过光刻3D打印法由生物相容性聚合物构建3D支架(1);并且

(b) 将含有生物细胞的悬浮液填充到所述至少部分被覆盖的空腔(2)中,用于给所述3D支架(1)定植以生物细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述3D支架(1)的构建是通过立体光刻3D打印法进行的。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(a)中的所述3D支架(1)的构建通过以下步骤进行:(i) 通过将电磁辐射聚焦在存在可光聚合物质或可光交联物质的焦平面中来固化可光聚合物质或可光交联物质。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,通过将另一电磁辐射聚焦在另一焦平面来重复该步骤(i)。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,在重复该步骤(i)时使用另一种可光聚合或可光交联的物质。

6. 根据权利要求1至5之一所述的方法,其中,通过所述3D支架(1)上的填充口(3)执行含生物细胞的悬浮液的填充。

7. 根据权利要求1至6之一所述的方法,其中,所述3D支架(1)在步骤(a)和步骤(b)之间被干燥。

8. 根据权利要求1至7之一所述的方法,其中,在步骤(b)之后,所述生物细胞被培养成3D细胞培养结构体。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述3D细胞培养结构体被其它细胞、病毒、细菌、酶或活性物质渗透。

10. 一种定植有生物细胞的3D支架(1),其能通过根据权利要求1至9之一所述的方法获得。

11. 根据权利要求10所述的定植有生物细胞的3D支架,其具有一个或多个出口孔(4)。

12. 根据权利要求10或11所述的定植有生物细胞的3D支架,其在所述被覆盖的空腔中具有多个柱(5)、网格或横撑条。

由生物相容性聚合物构成的定植有生物细胞的3D支架及其制造

[0001] 本发明涉及一种由生物相容性聚合物构成的定植有生物细胞的3D支架,在该支架中可将生物细胞培养成很接近生理结构的3D细胞培养结构。此外,本发明还涉及一种用于制造定植有生物细胞的3D支架的方法。

[0002] 迄今只有几种以定向方式制造3D细胞培养物的可能方式。迄今为止,少量的可行方式是制造球体或微流平台,或者将悬浮有细胞的凝胶进行浇注。而借助本发明方法第一次可以在显著更接近生理结构的特殊三维架构中培养生物细胞。

[0003] 球体是排列紧密的圆形细胞团。它们不具备任何生理形态。如果使用者还想在一个对象中并行采用多种细胞类型,那么除由所需细胞类型形成一个球体外别无他法。然而在这里,球体形状是无定向的并且导致细胞在球体内随机分布。因此,细胞通过此过程无法彼此独立地定位。当例如要用病毒、细菌或药物等物质对其进行试验时,随机分布降低模型的有效性。由于没有获得生理结构,故例如也几乎无法直接推断出体内行为。此外,人体细胞外基质(ECM)也缺失。ECM和细胞之间的相互作用也对细胞生理性有重大影响。对于细胞来说,找到与其常见生理生态位对应的环境是重要的。如果不是这种情况,则可能快速出现细胞的去分化、死亡或直接出现细胞停滞。此外,ECM的物理参数如刚度或孔隙率必须近似于体内条件。最后,形状本身是一个关键因素。生理环境的形状也影响功能。故例如如果应保证较大组织的供应,则必须确保血管形成。如果组织因缺乏血管形成而不能得到充分供应,它就面临死亡或失去其功能。

[0004] 利用迄今的可行方式无法充分再现或根本不可再现上述条件。与之不同,本发明的方法提供一种可提供复杂生物细胞结构的可能方式。此处所述的方法尤其假定用于无法采用光刻3D打印或生物打印的使用者。

[0005] EP 3 018 531 A1描述一种3D打印法,其允许在一个打印过程中并行采用多种生物墨水或细胞类型。在这里使用该技术以便在第一步中生成本文所述的对象,然后使用者可在第二步中对其进行生物细胞定植。换言之,EP 3 018 531 A1所描述的方法形成制造细胞骨架的基础。

[0006] 因为现有技术中已知的用于制造细胞培养结构体的方法的缺点,本发明的任务是制造定植有生物细胞的3D骨架,借此能获得与生理结构的高度相似,以便可以对该组织进行例如用细菌、病毒或活性物质的试验。也应该提供一种用于制造定植有生物细胞的3D骨架的方法。

[0007] 本发明的任务利用一种根据独立权利要求1的用于由生物相容性聚合物制造定植有生物细胞的3D骨架的方法和一种根据独立权利要求10的定植有生物细胞的3D骨架来完成。在从属权利要求2-9、11和12中说明优选实施方式。

[0008] 因此在一个设计中,本发明涉及一种由生物相容性聚合物制造定植有生物细胞的3D骨架的方法,其中,该3D骨架具有至少部分顶部被覆盖的空腔。根据本发明的方法在此被分为以下两个步骤:

[0009] (a) 通过光刻3D打印法由生物相容性聚合物构建3D骨架;并且

[0010] (b) 将含有生物细胞的悬浮液填充到至少部分顶部被覆盖的空腔中以用生物细胞定植3D骨架。

[0011] 通过光刻3D打印工艺由生物相容性聚合物构建3D骨架提供如下可能,即,可将生物相容性聚合物打印成生理形状,使得材料和结构类似于要在人体中仿制的结构。因为根据本发明该生物细胞能够随后才被加入3D骨架中用于定植,故可以构建任何细胞类型的3D细胞培养结构体。

[0012] 表述“由生物相容性聚合物构成”优选是指3D骨架通过由一种或多种生物相容性聚合物组成的基质构成。虽然不能排除3D骨架具有除生物相容性聚合物之外的其它成分,但3D骨架也可能仅由生物相容性聚合物构成。

[0013] 在本发明方法的一个设计中优选的是,通过立体光刻3D打印法进行3D骨架的构建。立体光刻3D打印法是指一种通过逐层固化来逐步产生3D骨架结构的工艺。

[0014] 在本发明方法的一个设计中优选的是,3D骨架的构建最好在步骤(a)中通过以下步骤进行:(i)通过将电磁辐射聚焦在其中存在可光聚合物质或可光交联物质的焦平面内来固化可光聚合物质或可光交联物质。

[0015] 可光聚合物质或可光交联物质优选以液体的形式存在,例如溶解在溶剂中。在这里,以下将提到可光聚合液体或可光交联液体。

[0016] 在此,优选通过将另一电磁辐射聚焦在另一个焦平面中来重复步骤(i)。当重复步骤(i)时优选使用另一种可光聚合物质或可光交联物质。

[0017] “可光聚合”在此是指相应的物质可以通过电磁辐射作用以及或许在光引发剂的参与下聚合。同样,“可光交联”应该是指低聚物或聚合物可以通过电磁辐射作用以及或许在光引发剂的参与下交联。

[0018] 在本发明方法的一个设计中优选的是,步骤(a)分为以下方法步骤:

[0019] (I) 将可光聚合液体或可光交联液体加入反应容器中,

[0020] (II) 将电磁辐射聚焦到位于充满液体的反应容器区域内的焦平面上,

[0021] (III) 通过电磁辐射在反应容器内的焦平面层中产生聚合结构或交联结构,

[0022] (IV) 将另一种可光聚合液体或可光交联液体加入反应容器中,使得先前产生的聚合结构或交联结构至少部分用所述另一种可光聚合液体或可光交联液体覆盖,

[0023] (V) 将另一电磁辐射聚焦到位于反应容器的填充有另一种液体的区域内的另一焦平面上,

[0024] (VI) 通过另一电磁辐射在反应容器内在另一层中产生另一聚合结构或交联结构,其中,另一聚合结构或交联结构直接安置在先前产生的聚合结构或交联结构上并与之连接,

[0025] (VII) 分别用另一可光聚合液体或可光交联液体重复步骤(IV)至(VI),直到产生3D骨架。

[0026] 步骤(V)中的另一个焦平面优选与第一焦平面至少在已产生的聚合结构或交联结构方面或在该聚合结构或交联结构的层方面彼此不同。

[0027] 在步骤(VI)中产生的聚合结构或交联结构的连接优选是通过共价键的连接。然而,非共价键连接也是可能的,例如基于物理相互作用的连接。

[0028] 因此,通过发生可光聚合液体或可光交联液体的聚合或交联的不同的若干焦平

面,获得3D骨架的层状结构。在此可行的是3D骨架中形成至少部分被覆盖顶部的空腔。此外也可以形成凹部和悬空结构,因为当下面没有已经聚合或交联的材料而只有未聚合或未交联的液体时,可光聚合液体或可光交联液体的聚合或交联也可以在特定焦平面或层中发生。存在于焦平面外的可光聚合液体或可光交联液体没有聚合或交联;相反,只有位于焦平面内的可光聚合液体或可光交联液体被聚合或交联。然而,存在于焦平面外的液体用于临时支撑存在于焦平面内的液体、而为此不需要固定的支撑结构。

[0029] 所使用的一种或多种可光聚合液体或可光交联液体可以含有生物细胞。当由于暴露于电磁辐射下而发生聚合或交联时,液体所含的细胞也嵌入相应的聚合物中。然而本发明优选的是在光刻3D打印法中不使用生物细胞。

[0030] 利用本发明方法,可以作为模型生成复杂的生物3D细胞培养结构体,以表示和检查例如细胞-细胞相互作用、器官生成、疾病或器官功能。与经典的二维细胞培养相比,这种3D细胞培养结构体有明显的优势,尤其当模拟多种细胞类型相互作用时。因为细胞间相互作用的复杂性,天然屏障的功能以及疾病或器官的模拟无法用经典的二维细胞培养物充分描绘。

[0031] 此外,根据本发明的方法允许以特别简单的方式创建小型化模型。这种小型化模型原先有时是手工制作的。为此需要付出很大的努力;此外还需要多年经验。

[0032] 最后,通过本发明方法可以确保相同3D细胞培养结构体的不同样本的高度再现性。此外,3D骨架的使用允许定向构建3D细胞培养物。因此,与现有技术已知的其它方法相比,本发明方法不仅加速制造,所生成的3D细胞培养结构体也总是具有恒定质量。这样高的再现性在生物技术中极其有利。因为在分析和开发新药品时对始终保持恒定的三维细胞培养物的试验可显著降低开发成本。但如果这种复杂的三维结构是手工构建的,则个体差异无法避免。然而由此造成实际上无法获得可重复的试验结果。相比之下,本发明方法所提供的3D细胞培养结构体出色地适于产生可再现的试验结果。

[0033] 在本发明方法中,作为反应容器可以采用市售的多孔微滴定板(例如具有6、12、24、48、96、384或1536个孔的微滴定板)、细胞培养瓶或培养皿。

[0034] 借助本发明方法所制造的3D骨架可由均质材料构建,故仅包含唯一类型的聚合物。然而在一个变型中,一种可光聚合液体或可光交联液体和至少另一种可光聚合液体或可光交联液体是不同的液体。由此可以由不同的聚合物产生异质构造的3D骨架。通过这种方式,可以在3D骨架内实现不同的聚合物结构。因此,例如至少部分覆顶的空腔可被与3D骨架的外骨架的聚合物结构彼此不同的聚合物结构包围,以便实现例如具有更大孔隙率,其允许生物细胞进入3D骨架基质中。此外,至少部分覆顶的空腔还可以具有柱、网格或横撑条,以便一方面支撑空腔的顶,另一方面允许生物细胞粘附在空腔内的表面上。3D骨架内的聚合物结构或不同的若干聚合物结构的性能可以因在可光聚合液体或可光交联液体中的待聚合单体或待交联聚合物的选择而受到影响。通常,可聚合单元或可交联单元的分子量越小,所得到的3D骨架基质中的空隙或孔越小。然而在后一种情况下,它也主要取决于在聚合物上的可交联单元的数量,因此也取决于交联度。通常,交联度越高,所得到的3D骨架基质中的间隙或孔越小。原则上可能的是,通过光刻3D打印法在每一层中使用不同的聚合物溶液或单体溶液,以获得具有高度复杂性或多样性的3D骨架。

[0035] 生物相容性聚合物是指生物聚合物或具有生物相容性的聚合物。“生物相容”在此

应该是指其不影响生物细胞寿命,即,特别是对生物细胞无毒性作用。

[0036] 在本发明方法的另一设计中,该3D骨架是至少在可见光范围内透明的骨架。通过这种方式,可以光学跟踪和确定生物细胞的定植。

[0037] 可光聚合液体或可光交联液体中的可光聚物质或可光交联物质优选为具有能与其它光反应性基团形成共价键的光反应性基团的物质。

[0038] 在一个变型中,光反应性基团是丙烯酸基团,借此完成聚合或交联。即,可光聚物质或可光交联物质优选为丙烯酸类化合物,例如选自以下组中的一种:甲基丙烯酸酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、三羟甲基丙烷丙烯酸酯、三丙烯酸酯丙烯酸酯和聚丙烯酸酯(PA)。

[0039] 待聚物质或待交联物质可以是聚合物、低聚物或单体。它在此优选是碳基物质。在单体情况下发生光聚合。在聚合物或低聚物情况下优选光交联。

[0040] 以下物质例如可用作待聚合单体:丙烯酰胺、氯乙烯、乙烯、丙烯、异戊二烯、己内酰胺、所有氨基酸、(脱)氧核糖核苷酸、葡萄糖或所有单糖和上述丙烯酸酯。

[0041] 以下物质可被用作低聚物或聚合物:聚乙二醇(PEG)、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚酮(PK)、聚氯乙烯(PVC)、聚苯乙烯(PS)、聚四氟乙烯(PTFE)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)和聚氨酯(PU)。合成聚合物如硅氧烷、聚二甲基硅氧烷(PDMS)或树脂如三聚氰胺或三聚氰胺-甲醛树脂也适合作为起始材料。此外,生物聚合物如蛋白质、DNA、RNA、碳水化合物和碳水化合物衍生物、胶原蛋白、纤维蛋白、藻酸盐、明胶、透明质酸或聚丙烯交酯适合作为起始物质。代替上述聚合物,也可以分别使用这些聚合物的各自单体前体或低聚物前体作为起始物质,前提是它们可以以固态或液态的聚集态稳定提供。通过将光反应性基团例如丙烯酸基团加入到起始物质中,使其可光聚合或可光交联。聚合基质或交联基质是通过在起始物质的不同分子之间对丙烯酸残基进行辐射诱导偶联来产生的。

[0042] 如果将可光聚合的PDMS用作基质或用作壳物质,则在嵌入该基质中的细胞之间可以进行气体交换。如已经描述地,可以使用不同的壳物质或基质。因此,例如除了PDMS或其它具有良好生物相容性的基质外,也可以将稳定的塑料用于基质余部,以由此生成对外稳定的目标物,在该目标物内存在一种允许细胞生长但稳定性较差的基质。

[0043] 添加光反应性基团的起始物质以液态形式被使用,在这里,可能有不同的粘度。即,现在所述的方法不局限于具有一定粘度的可光聚合液体或可光交联液体,而是也可使用低粘度液体。可以使用牛顿液体和非牛顿液体。

[0044] 所述液体可以是溶液或胶弥散混合物如悬浮液。该液体在此可具有水状到油状的特性。这尤其由起始物质及其粒度的选择来决定。

[0045] 为了能获得载有光反应基团的起始物质的光聚合或光交联,还使用自由基产生剂(所谓的光引发剂),它在该方法所用的电磁辐射的选定波长下形成自由基。

[0046] 合适的自由基形成剂例如是蒽酮衍生物如紫蒽酮或异紫蒽酮、荧光素、红荧烯、蒽噁衍生物、四氮烯衍生物、苯并蒽酮、苯并蒽醌、曙红、左旋酸衍生物、磷衍生物、单酰基磷和双酰基磷、茂金属、苯乙酮、二苯甲酮、咕吨酮、醌、酮衍生物、羟基酮、氨基酮、过氧化苯甲酰、吡啶盐、苯乙醛酸和/或碘鎓盐。

[0047] 除了自由基形成剂之外,还优选使用乙烯基大分子单体和胺基共引发剂,以允许

光聚合或光交联以特别合适的方式达成。合适的共引发剂例如是抗坏血酸和叔胺衍生物例如甲基二乙醇胺或四乙胺。

[0048] 在一个变型中,可光聚合液体或可光交联液体具有硫醇衍生物。合适的硫醇衍生物是二硫苏糖醇、单功能半胱氨酸、双功能肽和类似化合物。

[0049] 此外,可以将防止更深的液体层的光聚合或光交联的物质添加到可光聚合液体或可光交联液体中。因此,液态溶液在焦平面外保持液态,即使它位于在其上方的焦平面的照射区域内。这通过在发生聚合的波长(聚合波长)下吸收物质来起作用。拦截发生在焦平面中,因此聚合波长不能穿透更深的层。这适用于所有在期望波长下吸收的物质例如染料。

[0050] 此外在一个变型中可行的是,一种可光聚合液体或可光交联液体和/或其中另一种可光聚合液体或可光交联液体和/或不一定是可光聚合的另一液体可以具有温敏凝胶剂。尤其规定逆温敏(也称为反向温敏)凝胶剂的使用。随着温度升高,这种凝胶剂变得更坚硬。通过加热反应容器,反应液体固化并形成最初仅亚稳的凝胶。如果液体没有同时被光聚合或光交联,则亚稳态凝胶可以通过随后对3D骨架进行冷却而被再次液化并被泵出。对于常见的温敏凝胶剂,待用的温度条件正好相反。因此如果需要,例如可以创建一种支撑结构,从而可以产生悬空结构。另一方面,如果亚稳态凝胶至少部分用波长合适的电磁辐射照射,则发生光聚合,从而亚稳态凝胶在这些区域被转化为稳定的凝胶或聚合物。

[0051] 换言之,温敏、特别是逆温敏的凝胶剂和反应空间的温度控制机构可允许更容易地加工出悬空部和倒凹或空腔。在此变型中,仍还可以利用液体结构作为支撑来加工。

[0052] 还可能的是规定温度梯度,使得亚稳态凝胶不会在已添加温敏的、特别是逆温敏的凝胶剂的液体的所有区域中出现。借助这种梯度能产生更复杂的结构。

[0053] 上述单独的组分可以作为单独物质包含在可光聚合液体或可光交联液体中。或者也可能的是,通过相应合成而在唯一的聚合物中实现优选用于形成凝胶的物质或基团。代替由单独组分所构成的混合物,这样的聚合物于是将具有不同的官能基团,它们将对于光聚合或光交联所需的或优选要采用的所有功能集于一体。还可以想到,在一种聚合物中仅规定其中几种优选被用于光聚合或光交联的官能团或基团,并将优选待添加的用于光聚合或光交联的其它官能团或基团混合在可光聚合液体或可光交联液体的单独的单个组分中。

[0054] 作为用凝胶剂形成空隙的替代或补充,酶也可被用于消化聚合物。原理如下:通过在打印时用牺牲材料填充所有空腔,将具有空腔/内凹的3D骨架(例如腔管系统)作为实体来打印,牺牲材料稍后(即打印结束后)通过添加右酶可被溶解。牺牲材料例如是通过添加消化酶而被消化的可消化聚合物。这是使用立体光刻印刷法提供空腔的一种巧妙策略。例如,透明质酸酶(消化酶)可以消化透明质酸(牺牲材料),以便在3D骨架中的加入透明质酸酶的地方形成空腔。该原理已在官方受理号DE 10 2019 200 792.9的专利申请中有所描述。或者,也可以将在可光聚合液体或可光交联液体中的光阻断剂用来产生空腔/内凹,其中,该光阻断剂限制可光聚合液体或可光交联液体的硬化深度。

[0055] 在一个变型中,仅当先前位于反应容器中的可光聚合液体或可光交联液体(它可以是例如一种可光聚合液体或可光交联液体或另一种可光聚合液体或可光交联液体)从反应容器被取出时,才将其余的可光聚合液体或可光交联液体加入反应容器中。为此例如可以设置一个泵,该泵将已用过的可光聚合液体或可光交联液体从反应容器泵出并将新的其它可光聚合液体或可光交联液体泵入反应容器中。代替单个泵,两个或更多的彼此不同的

泵也可被用于这种过程。

[0056] 在一个变型中,可以在本发明方法的步骤(a)中在其制造过程期间或结束时用低波长(例如在UV范围内,即,低于380nm)电磁辐射照射3D骨架,以通过这种方式达成杀菌消毒。这种UV杀菌原则上是已知的。

[0057] 在一个变型中,在反应容器中布置有载板或支撑结构,其与第一聚合或交联结构结合。如果生成的3D骨架随后不应在反应容器本身中被检查、而是要从反应容器中被取出,则建议使用这种载板。例如螺纹接口(例如DIN螺纹接口)可存在于该载板中,以便能够随后向产生的3D骨架供应液体和气体。也可以在制造方法的范围内将这种螺纹接口加入3D骨架的基质中,即,在那里在基质中产生螺纹接口。无论是否使用载板,都能在基质中产生这种螺纹接口。

[0058] 在一个变型中,在产生第一聚合结构或交联结构的步骤之前,载板通过将电磁辐射照射到焦平面中来产生,该焦平面位于填充有可光聚合液体或可光交联液体(特别是第一或其它可光聚合液体或可光交联液体之一)的反应容器区域内,所述产生按下述方式达成,即,形成了具有或构成该载板的聚合支撑结构或交联支撑结构。即,在该变型中真正的聚合结构或交联结构以及该支撑结构二者都是通过聚合反应或交联反应产生的。

[0059] 该支撑结构可以具有允许在载板和反应容器底部之间形成间距的形状。由此,真正的聚合反应或交联反应的焦平面距反应容器底部较远。特别是,所形成的第一聚合结构或交联结构随后距反应容器底部较远。于是,可以很容易地将不再需要的可聚合液体或可交联液体从反应容器中吸出。

[0060] 在一个变型中,光学系统布置在用于产生一种和/或另一种电磁辐射的电磁辐射源(辐射源)和反应容器之间,该光学系统用于将电磁辐射聚焦到该反应容器内的各自焦平面。在此,在一个变型中规定,可以实现该光学系统的再聚焦,以改变反应容器内的焦平面。例如可以通过改变光学系统和辐射源之间距离来达成这种再聚焦。在此可以规定计算机控制的步进电机,以促成光学系统的相应运动。光学系统可以例如是光学透镜系统,或者在设计特别简单的安装情况下是单独的聚焦透镜。

[0061] 在一个变型中也可能的是执行在反应容器或布置在反应容器内的载板与用于产生一种和/或另一种光辐射的辐射源之间的相对运动。因为例如可通过反应容器的运动、布置在反应容器中的载板的运动或辐射源的运动来造成这种相对运动,也可改变在该反应容器内的焦平面。故在此变型中不需要一个可选择性地采用的光学系统的再聚焦。由此可降低光学失调风险。

[0062] 在该方法的另一变型中,一种和/或另一种电磁辐射被引导至在一种可光聚合液体或可光交联液体和/或另一种可光聚合液体或可光交联液体内的相应焦平面中的规定的可预定区域。这意味着,可以设定特定辐射模式,其会照中可光聚合液体或可光交联液体并用于在这些位点使液体聚合或交联以形成聚合物或凝胶(基质)。例如,可以通过使用掩模或遮光板、但也可以通过使用脉冲辐射或辐射信号数字调制来产生这样的辐射模式。聚合或交联出现在可光聚合液体或可光交联液体的被辐射照中的区域。然而,在未被辐射照中的其它区域,可光聚合液体或可光交联液体保持其非聚合或非交联状态。由此该辐射限定出打印聚合结构或交联结构的区域。与从现有技术已知的方法中的情况相比,这种光辅助打印可以实现显著更高的分辨率。分辨率取决于所用辐射的波长。即使在常用的大波长情

况下,它也比现有技术中已知的传统方法所能实现的分辨率更高。辐射源聚焦得越精确,所得到的分辨率越高。例如可以使用激光得到很高的分辨率。

[0063] 如果需要,可以使用反射镜将电磁辐射转向到各自焦平面。

[0064] 例如可以由计算机程序提供各自所选的辐照模式。因此可以想到使用者借助CAD程序创建要制造的3D骨架。然后,由合适的计算机程序将如此创建的数字对象以剖面细分为单独的照射平面。此外,为每一层或每一层的不同位点分配特定的可光聚合液体或可光交联液体。基于该信息,创建用于执行所述方法的打印机的控制信息。此控制信息指定何时应该将何种可光聚合液体或可光交联液体送入反应容器。此外,该控制信息指定何时应将一个照射平面的哪个图像投影到反应容器内的各自焦平面上。通过这种方式,之前在计算机上创建的3D骨架于是可以转换成真正的3D骨架。

[0065] 在一个变型中,在同一层中(即在同一焦平面中)产生超过一个的聚合结构或交联结构。为此,首先进行第一可光聚合液体或可光交联液体的聚合或交联。然后将第一可光聚合液体或可光交联液体从反应容器取出,并将第二可光聚合液体或可光交联液体送入反应容器中。现在只有反应容器中的焦平面内的、在先未被照射且因而还不存在聚合结构或交联结构的那些区域被照射。由此可以在同一层中产生不同的基质。因此在同一层中形成多个聚合结构或交联结构,从而形成一个异质层。然后,可将第二可光聚合液体或可光交联液体从反应容器中取出,并将另一种可光聚合液体或可光交联液体送入反应容器中。所述另一种可光聚合液体或可光交联液体的液位现在可以达到使先前形成的层被完全覆盖的水平。然后可以移动焦平面并且可以通过相应的聚合或结构交联结构来构建要产生3D骨架的另一层。原则上可能的是,所生成的3D骨架的一些层以均质形式存在(包括单一类型的聚合结构或交联结构),其它层以异质形式存在(包括不同类型的聚合结构或交联结构),在这里,每层的单独结构的数量不受限制。在实践中被证明有意义的是,除了每层唯一的聚合结构或交联结构外,具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个聚合结构或交联结构的异质组成层。

[0066] 在一个变型中,至少第一层的第一结构、但特别是第一层的每个结构从两个不同方向用第一辐射被照射。在此,这两个不同的方向优选彼此相反。通过这种来自两个不同方向的照射,使得第一层在反应容器的内表面上或安置在反应容器中的载板上达成特别牢固的锚定。由此使得产生的整个3D骨架在反应容器上或在反应容器内的载板上随后可靠保持就位,由此能简化随后对3D骨架的检查。在反应容器向上开口的情况下通常从上方进行辐照。于是在该变型中优选从下方穿过反应容器底部地附加照射第一层。为此,该反应容器应该由允许选定波长的辐射透过的材料制造。随后,优选又仅从一个方向(优选从上方)依次照射布置在第一层之上的后续多层,使得已形成的聚合结构或交联结构不位于辐射的焦平面和被用来发射辐射的辐射源之间,进而不会在其焦平面之前被该辐射再次照射。

[0067] 在一个变型中,第一电磁辐射和/或另一电磁辐射所具有的波长在200nm到1000nm的范围内(即位于UV范围和红外范围之间的波长),该波长更优选在350nm到800nm之间的范围内。优选用作自由基产生剂的物质可以利用这样的波长被很好地激发,从而形成自由基,以使带有丙烯酸残基的起始物质能聚合或交联。

[0068] 所用的电磁辐射的其它合适波长在250nm至950nm、特别是250nm至850nm、特别是300nm至800nm、特别是300nm至750nm、特别是300nm至700nm、特别是350nm至650nm和特别是350nm到400nm的范围内。

[0069] 被用于聚合或交联的辐射可以具有来自上述波长范围的彼此相同的波长或彼此不同的波长,以允许适当地将不同的可光聚合液体或可光交联液体进行聚合。在此,单独的辐射可通过不同的辐射源或通过同一个辐射源产生。也可能的是,当要形成由不同的聚合结构或交联结构构成的一个异质层时,在一层内(进而在一个聚焦平面内)依次采用不同的波长,以便在同一层中对不同的可光聚合液体或可光交联液体进行聚合或交联。

[0070] 在一个变型中如此执行该方法,即,在产生3D骨架期间将至少一个功能元件加入3D骨架。功能元件在此选自由膜、通道、孔、传感器、柱、网格、横撑条或导电载体和趋化制剂组成的组。通道和孔例如可被整合到目标物中,做法是使所形成的聚合结构或交联结构的某些区域在多层中重叠留空。可以通过将脂质分子加入可光聚合液体或可光交联液体中来形成膜。

[0071] 此外,也能借助光聚合或光交联在3D骨架内加入盐桥。如果可光聚合液体或可光交联液体包含有盐、即含盐,则这可特别容易地实现。通过这种方式,随后可以对打印的3D骨架进行电导和去活化。

[0072] 借助于在制造过程中已加入3D骨架中的传感器,无需对生成的3D骨架进行事后操作,而是可以直接通过已加入的传感器来读取。这显著简化了对定植有生物细胞的3D骨架的后续分析。例如,通过加入诸如电极之类的导电载体,在随后检查所形成的3D骨架时以很简单的方式分析定植的3D骨架的电势或电性能。

[0073] 通过加入趋化制剂(它们在一个变型中能以不同浓度被加入到不同的层中以产生梯度),在其制成之后可以实现在3D骨架内生物细胞的靶向生长/定植。如果趋化制剂是引诱剂,则它会发挥正趋化作用,使3D骨架中的生物细胞朝向引诱剂浓度较高区域来取向。但如果趋化制剂是抑制剂,它会发挥负趋化性,使得3D骨架中的生物细胞朝向冷硬物质浓度较低区域或完全不存在冷硬物质的区域来取向。由此达成在3D骨架内的细胞靶向生长/定植。

[0074] 优选使用至少一个液位传感器,以便始终精确地检测反应容器内的液位。基于液位信息,于是可以确定应在其中进行下一聚合或交联步骤的焦平面。这种液位传感器所提供的数据也可用于自动调整焦平面。泵也可以通过由液位传感器提供的数据而被控制,该泵促成可光聚合液体或可光交联液体流入反应容器。通过这种方式,总是可以精确地将形成期望层所需量的可光聚合液体或可光交联液体加入反应容器中。由此保持低的废料量。此外,由此允许整个方法的低成本实现方式。

[0075] 如从前面对本发明方法的步骤(a)的说明中可看出地,3D骨架的3D打印步骤能全自动进行,故不需要使用者干预。这还使方法应用变得容易。

[0076] 电磁辐射被照射到相应焦平面的时间段可以适配于所用的可光聚合液体或可光交联液体的各自要求。这意味着,每种材料的相应的固化用时间对于所期望的聚合或交联是必要和合理的。

[0077] 当将载体放置在反应容器内时,如果相对于反应容器提升该载体,在周围流化床与在载体上已聚合或交联的结构之间会出现负压。然而,通过吸出仍位于反应容器中的用于在先聚合或交联步骤的可光聚合液体或可光交联液体的残余物并加入新的可光聚合液体或可光交联液体,可以卸除潜在出现的负压。由此该载体能相对于反应容器移动,而不必担心3D骨架的已聚合或交联结构从载体上撕脱。

[0078] 如果在载板上产生3D骨架,则载板在制造过程结束后可以完全从反应容器中的剩余液体中被提出。然后使用者可从载板上取下生成的3D骨架。

[0079] 为了在本发明方法的步骤(a)中制造3D骨架,可以例如如EP 3 018 531 A1所述地使用3D打印机。

[0080] 通过添加温敏物质、特别是逆温敏物质,可以附加改善3D骨架内的悬空体和空腔的产生。在此情况下,例如可以按如下浓度混入诸如泊洛沙姆(Poloxamer)之类的物质,即,即便没有照射,仍在期望温度范围内将可光聚合液体或可光交联液体或不可光聚合液体或不可光交联液体凝胶化。

[0081] 例如,该方法可以如下进行:当在约20℃温度(例如称为“凝胶温度”)下实现凝胶化时,将泊洛沙姆(Poloxamer)以如下的浓度添加到可光聚合液体或可光交联液体中,使得液体在这个区域内形成凝胶。多种泊洛沙姆(Poloxamer)的混合物也是可能的。如果可能,可以先将液体冷却到低于凝胶点的温度。如果目标物内需要悬空结构,则可以将含有温敏凝胶剂的液体加热到高于凝胶温度的温度。然后液体凝胶化。同时,液体也可以被光聚合或光交联。如果温敏液体的一个区域不应被光聚合或光交联,则它在升高温度下虽是固体,但在温度降低到低于凝胶化温度时,它可以随时再次液化。因此,温敏凝胶部分可以作为支撑结构,直到打印过程结束。在打印结束后,温度可又降至低于上述示例性的20℃胶凝温度。结果,液体的未聚合或未交联的温敏部分再次液化并可以被泵抽出。当凝胶液化时,该支撑结构被去除,打印对象的先前支撑部分现在被光聚合或光交联,因而悬空。

[0082] 还优选的是3D骨架具有填充口,至少部分顶部被覆盖的空腔可以通过该填充口来接近。填充口优选设置在3D骨架的上表面处,使得空腔可以从上方被填充含有生物细胞的悬浮液(也称为细胞悬浮液)。因此,根据本发明方法的步骤(b)中优选的是,通过3D骨架上的填充口填充细胞悬浮液。填充口例如可以呈填充接管形式,其例如允许精确装接移液管以填充细胞悬浮液。

[0083] 还优选的是3D骨架具有一个或多个出口孔,其也在空间上连通至3D骨架内部空腔。例如如果空腔在步骤(b)之前填充有溶液,则它在填充细胞悬浮液时可以经出口孔逸出。为此,一个或多个出口孔优选在空间上布置在填充口下方,优选作为3D骨架上的侧向口。但被部分覆顶的空腔也能以血管形式布置,例如以便给要布置在另一空腔内的生物细胞组织供应营养液如血液。

[0084] 在本发明方法的一种设计中优选的是,3D骨架在步骤(a)和步骤(b)之间被干燥。3D骨架获得更耐用且更易于运输的形式。在干燥/玻璃化结束后,3D骨架能够避光防潮地在冰箱中存放至少六周。在此情况下,3D骨架略微缩小并变得更硬。湿式存储会使3D骨架面临更快速变质的风险。干燥/玻璃化优选在无菌环境中进行。合适的干燥温度在4℃至50℃范围内,更优选在15℃至25℃的范围内。干燥可以例如在干燥箱、空调室等中进行。

[0085] 所有天然存在的真核和原核细胞都可作为用来构建定植有生物细胞的3D骨架的生物细胞而被纳入考量。所用的细胞优选是真核细胞。存在于哺乳动物、特别是啮齿类动物和更特别是人的身体内或构成该身体的所有细胞和细胞类型都是特别合适的。在一个变型中,所使用的生物细胞是全能细胞或多能细胞。在此,在一个变型中,本发明仅使用可在不破坏人类胚胎情况下获得的细胞。除了天然存在的细胞外,非天然存在的细胞系的细胞也可被用作生物细胞。这种人工生成的细胞系允许待制造的3D细胞培养结构体的定制结构。

粘附性细胞和悬浮细胞都可被用作生物细胞。使用先前的系统,迄今无法由悬浮细胞生成3D细胞培养结构体,因为这些细胞不会自行生长。但如果在3D骨架的空腔中存在支撑结构如柱或网格,则可以利用3D骨架提供由悬浮细胞组成的细胞培养结构体例如淋巴结,随后可对其进行试验。

[0086] 因为本发明方法允许将不同的细胞类型组合成3D细胞培养结构体,故它特别适用于人造器官的制造。这样的人造器官可以是例如天然器官、特别是人类或动物如哺乳动物或啮齿动物的天然器官的微型化模型对象。由于可以使用不同的可光聚合液体或可光交联液体,故嵌入有生物细胞的不同凝胶类型也是可能的。还可行的是将塑料聚合物和生物聚合物结合,从而可以产生很稳定的嵌入有生物细胞的结构。在一次单独打印过程中可以同时产生多个甚至有着彼此不同的形状的3D骨架。

[0087] 为了使用者可将在本发明方法的步骤(a)中制造的3D骨架用于步骤(b),3D骨架如果已被在先干燥则被再水合。为此,3D骨架优选被置入水、盐溶液、缓冲液、细胞培养基或类似生理可耐受液体中达60秒至60分钟的时间。理想地,所述操作在无菌条件下在培养皿或类似物中进行。由此该骨架又恢复其初始尺寸、强度和质地。

[0088] 为了用生物细胞定植该骨架,优选将生物细胞与所需溶剂混合成悬浮液(本文也称为细胞悬浮液)。所有与细胞兼容的溶液都可被用作溶剂。这包括确保细胞存活的所有水溶液。物质通常被用于出现中性pH值(pH7.4)和等渗环境,以使溶液与人体内液体(如血液)接近。溶剂内生物细胞的浓度优选在100000至300000000个细胞/毫升的范围内。对于3D骨架定植,细胞悬浮液优选通过填充口被加入到骨架中。此时优选的是,待填充的细胞悬液的总体积至多与3D骨架的空腔体积一样大。当出现期望的细胞浓度时,使用者就可以例如使用移液器将该悬液量注入骨架中。优选的是,当细胞悬浮液被注入时,3D骨架已经充满液体,该液体于是可以通过可选的出口孔流出。然而在理想情况下,骨架从用于再水合的培养基中被取出以填充细胞悬浮液。

[0089] 在另一实施方式中,被用于定植空腔的液体优选包含细胞球体。在另一个实施方式中,所用液体优选包含凝胶剂,该凝胶剂在填充后形成稳定的水凝胶,由此,所加入的细胞或细胞球体被固定。酶交联凝胶(例如纤维蛋白)、物理交联凝胶(例如胶原蛋白)或可光聚合液体或可光交联液体可用作凝胶剂基质。

[0090] 在另一个实施方式中,优选通过加入切除组织或活检组织(所谓的离体培养)进行空腔定植。在另一个实施方式中,切除组织/活检组织可以用形成凝胶的液体来粘住。

[0091] 3D骨架空腔内的可能的柱、网格或横撑条可以在生物细胞定植时用作生物细胞的锚点或支架,因此它们可以在粘附性细胞情况下附着到3D骨架上,或在悬浮细胞情况下可以在3D骨架中自由浮动培养。

[0092] 在将细胞悬浮液填充到3D骨架中后,现在可进一步培养含细胞的结构体。根据空腔的内部结构,现在可以形成新的3D细胞培养模型。在粘附性细胞的情况下,生物细胞粘附到所有可用的结构及其自身上,从而出现呈3D骨架空腔形式的3D结构。通过这种方式,可控地出现3D细胞培养模型/结构体。例如,如果3D骨架用肿瘤细胞来定植,则出现3D肿瘤模型。如果模型中用T细胞或B淋巴细胞等悬浮细胞定植,则出现淋巴结样模型或弥漫性B细胞淋巴瘤。如果3D骨架基质的空腔或孔积被完全定植,则细胞可以例如通过可选的侧通道离开3D骨架。这样一来,例如能够掐掉小细胞球体。

[0093] 换言之,在本发明方法中可以在步骤(b)之后发生培养生物细胞以形成3D细胞培养结构体的步骤。培养条件取决于所用细胞的类型。各种生物细胞的理想培养条件通常被生物学领域技术人员所知。要根据细胞类型确定的培养条件是温度、各自营养液的组成和培养容器的准备。在这里可以例举出用于人体脐带血管细胞的条件:37℃和5%的CO₂,含葡萄糖、所有必需氨基酸、维生素和矿物质的基本培养基。培养物优选位于覆有组织培养涂层(所谓的经过组织培养处理的表面)的培养皿或细胞培养瓶上。所提到的这些培养条件有利于适用于许多人类细胞。在腔管细胞情况下还需要使用生长因子,其被添加到基本培养基中。

[0094] 然后,可以用其它细胞、病毒、细菌、酶或活性物质渗透3D细胞培养结构体,以便对结构体完成测试。为此,一方面可使用该填充口或侧通道,但一些物质或细胞也可穿透3D骨架材料。通过这种方式,例如可以利用Car-T细胞攻击肿瘤细胞。

[0095] 在一个设计方案中,本发明还涉及一种用生物细胞定植的3D骨架,其可根据本发明的方法来获得。与本发明方法相关地在此提到的所有特征和设计也适用于(如有可能)根据本发明的用生物细胞定植的3D骨架,反之亦然。

[0096] 本发明具有以下优点:迄今未能提供可由使用者自己定植的具有内凹或复杂架构的骨架。3D骨架本身用作空心体,这在未采用多材料立体光刻的情况下迄今都被认为是不可能的。因而无法描绘影响细胞行为的复杂架构。通过本发明的制造方法,可以保证高度的可再现性和并行性。尽管架构复杂,但3D骨架可以以毫米精度再现。此外,该系统首次允许在3D结构体中培养悬浮细胞或允许制造血管结构。在此,该系统不必像此外在经典的晃振培养中那样被主动晃振。细胞在骨架中仍存活。通过系统影响,可以获得明显更长的培养时间。因此,例如可以在长达几周的时间内培养该定植系统,以便将其用作动物实验用替代品。迄今为止,对于某些细胞类型来说无法实现几周的培养期。此外,可以在线监测细胞行为,因为该系统优选对可见光是透明的。保证了借助光学方法的连续测量。总之,该骨架在其形状、架构、使用方法、物理参数方面被视作一种创新。

[0097] 根据本发明可使用的3D骨架优选具有扁平形状,即,其水平尺寸优选大于其竖向尺寸。3D骨架可以有任何底面,例如像圆形、椭圆形、矩形或正方形,矩形或正方形底面也带有圆角。3D骨架优选呈棱柱状竖向延伸,即,底面在竖向上没有明显变化。该直径优选在500 μm至10cm的范围内,但尤其是该直径以阱板尺寸为准,即,其具体说优选为6.8mm(96阱)、10.4mm(48阱)、16.2mm(24阱)和34.6mm(6阱)。高度优选在从500 μm到10cm的范围内。如果空心体是居中布置的空心体,则其体积优选在10 μL至50mL的范围内。如果空心体设计为血管(腔道)形式,则腔道直径优选在1 μm至5cm的范围内。

[0098] 现在将结合如以下的图所示的具体实施方式来说明本发明:

[0099] 图1示出CAD文件的未定植3D骨架的视图,该骨架具有中央覆顶空心体、在顶侧的填充口和多个侧出口孔。

[0100] 图2示出根据图1的CAD文件的通过光刻3D打印制造的3D骨架的俯视拍摄照片。

[0101] 图3示出根据图2定植有来自神经母细胞瘤的肿瘤细胞的3D骨架的俯视拍摄照片。

[0102] 图4示出一个CAD文件的未定植3D骨架的视图,其具有向上敞开的中心凹口和呈血管形式的若干覆顶空腔,空腔在顶侧有两个用于血管的填充口和两个血管用侧出口孔。

[0103] 图5示出根据图4的CAD文件的打印模型的从下方拍摄的显微照片。

[0104] 图1示出可根据本发明所使用的以CAD文件创建的3D骨架1的模型。3D骨架1优选具

有大部分顶部被覆盖的中心空腔2。空腔2优选可通过设计为填充接管的填充口3来接近。空腔2上方的区域优选利用空腔2内的柱5来支撑。3D骨架1优选具有多个呈出口通道形式的侧出口孔4。

[0105] 图2示出基于根据图1的CAD文件借助光刻3D打印法所制造的3D骨架1的拍摄照片。可以清楚看到上填充接管3、侧通道4以及空腔2内的柱5。图2所示的3D骨架通过以下方法步骤制造：

[0106] 1.) 创建CAD文件并且计算打印模板；

[0107] 2.) 为打印机配备待使用的可光聚合液体或可光交联液体；

[0108] 3.) 校准打印机、轴和打印头；

[0109] 4.) 执行打印，打印平台下降到用于第一可光聚合液体或可光交联液体的第一打印平面；

[0110] 5.) 针对待打印的结构体的第一层高度，打印由第一可光聚合液体或可光交联液体构成的第一聚合物，用于构建由第一聚合物组成的架构；此时，针对该结构体的第一层高度所计算的第一聚合物结构图被投影到打印头所在的打印平面上；在此情况下，根据使用者意愿和计划可以同时制作一个或多个结构体；在此，限制性因素是打印平台的或结构空间的尺寸；

[0111] 6.) 如有必要，执行打印机清洗步骤，以防止第一聚合物进入第二种可光聚合液体或可光交联液体中或反之，作为可选择性步骤(如果需要第二聚合物)；

[0112] 7.) 如有必要，打印第二聚合物，用于构建第一层的由第二聚合物组成的架构，作为可选择性步骤(如果使用第二聚合物)；

[0113] 8.) 如果使用第三聚合物，则重复步骤6和7；

[0114] 9.) 改变打印平面以便能够打印第二层高度；

[0115] 10.) 针对待打印结构体的第二层高度，打印第一聚合物，用于构建由第一聚合物构成的架构；

[0116] 11.) 如有必要，执行打印机的清洗步骤，以防止第一聚合物进入到第二可光聚合液体或可光交联液体中或反之，作为可选择性步骤(如果使用第二聚合物)；

[0117] 12.) 如有必要，打印由第二可光聚合液体或可光交联液体构成的第二聚合物，用于构建第二层的由第二聚合物组成的架构，作为可选择性步骤(如果使用第二聚合物)；

[0118] 13.) 如果需要第三聚合物，则重复所述步骤11和12；

[0119] 14.) 改变打印平面以便能打印第三层高度；

[0120] 15.) 重复步骤5到步骤8，直到打印出完整架构；

[0121] 16.) 在打印完成后，将打印平台移动到起始层并取出所得到的3D骨架；

[0122] 17.) 然后可干燥或马上使用3D骨架。

[0123] 18.) 如果对3D骨架进行干燥，则这在无菌环境中发生；此时从3D骨架中去除所有的水，从而出现干燥的聚合物骨架；

[0124] 19.) 干燥后，3D骨架可以在无菌条件下被存放。

[0125] 根据图2的3D骨架制造所用的具体条件和参数：

[0126] 3D骨架外径：6mm

[0127] 3D骨架高度：2mm

- [0128] 空腔体积： 9.9mm^3
- [0129] 填充口的内径：1.6mm
- [0130] 横向通道(带角)
- [0131] 和出口孔的横截面： $0.4\text{mm} \times 0.4\text{mm}$
- [0132] 第一可光交联液的组成：
- [0133] 溶剂：RPMI 1640+25mM HEPES (Biochrom FG 1383)，磷酸盐缓冲液
- [0134] 可光交联物质：甲基丙烯酸明胶，50g/kg；聚乙二醇二丙烯酸酯，50g/L
- [0135] 其它添加剂：2,4,6-三甲基苯甲酰次膦酸苯基锂，5g/kg；柠檬黄，2mM；
- [0136] 整个3D骨架由第一种可光交联液体打印而成。通过将光阻断剂酒石黄添加在可光交联液体中，被用于聚合的光的穿透深度被调整，从而允许制造顶部被覆盖的空腔。或者，为了制造覆顶空腔，牺牲墨水(用作另一种可光交联液体；例如将15g/kg透明质酸溶解在RPMI+5g/kg苯基2,4,6-三甲基苯甲酰次膦酸锂用以打印，接着用透明质酸酶来消化以形成所述空腔)在打印结束后通过水解或酶消化被溶解。
- [0137] 图3示出根据图2的3D骨架1的拍摄照片，3D骨架中定植有来自神经母细胞瘤的肿瘤细胞。为此，将执行以下其它方法步骤：
- [0138] 20.) 具有由用户预先设定的浓度的细胞悬浮液通过填充接管被移液到根据1.)至19.)所制造的3D骨架中；在此使用最多等于3D骨架空腔体积的细胞悬浮液体积；如果3D骨架在步骤18.)中被干燥，则它应该先由用户再水合以便重新使用；对此适用的是水、PBS、细胞培养基等无菌介质；
- [0139] 21.) 通过移液加入，悬浮液分散在3D骨架内，并且细胞可以在3D骨架内被培养；
- [0140] 为了用神经母细胞瘤细胞(SK-N-BE (2))定植该空腔，制造细胞悬浮液(溶剂：DMEM高糖+10%FCS+1%青霉素/链霉素；细胞浓度： 150×10^6 个细胞/L)。通过填充接管将6 μL mm的悬浮液移液到3D骨架的空腔中。然后将在37℃和5%CO₂下培养该结构体。
- [0141] 图4示出一个可根据本发明所使用的按CAD文件创建的3D骨架1的模型。3D骨架1具有向上敞开的中心凹口，作为生物细胞用定植区域6。此外，它具有向上封闭的、即顶部被覆盖的呈血管形式的若干空腔2，其优选在围绕中心定植区的水平面中延伸。
- [0142] 图5在显微镜下仰视示出实际打印的3D骨架1。可以清楚看到填充接管3、呈血管形式的若干空腔2和定植区6。
- [0143] 附图标记列表
- [0144] 1 3D骨架
- [0145] 2 空腔
- [0146] 3 填充口
- [0147] 4 出口孔
- [0148] 5 柱
- [0149] 6 定植区

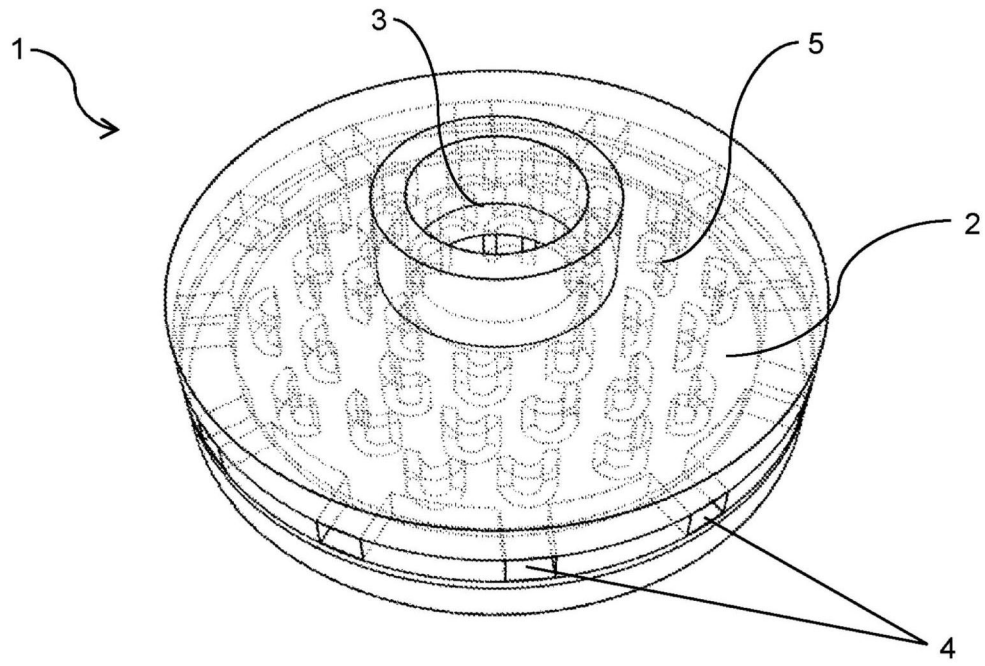


图1

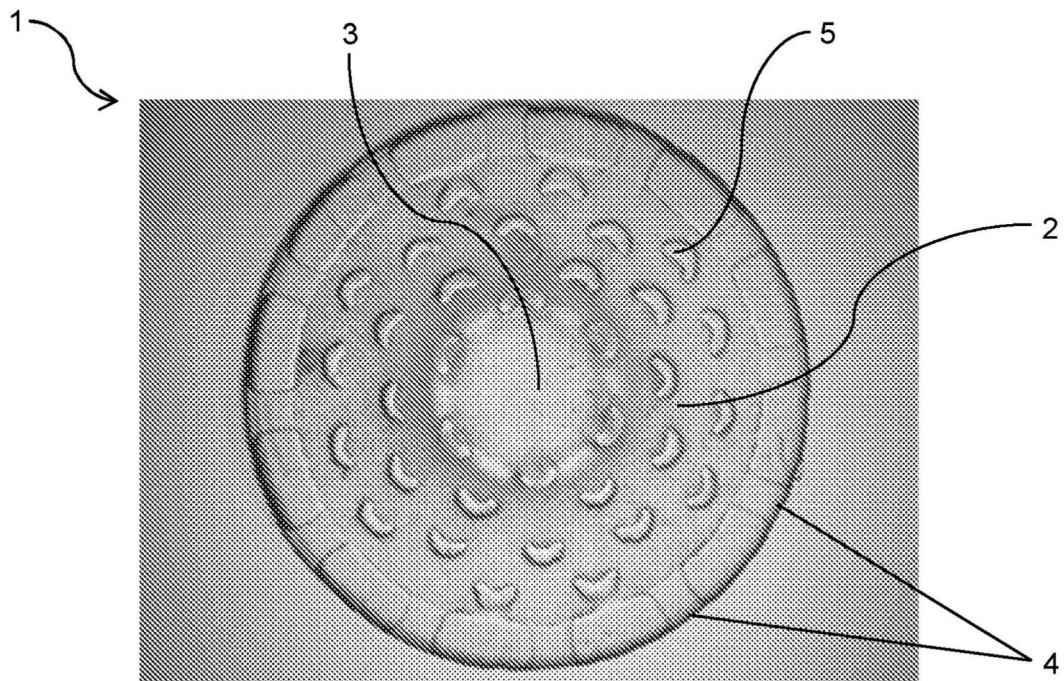


图2

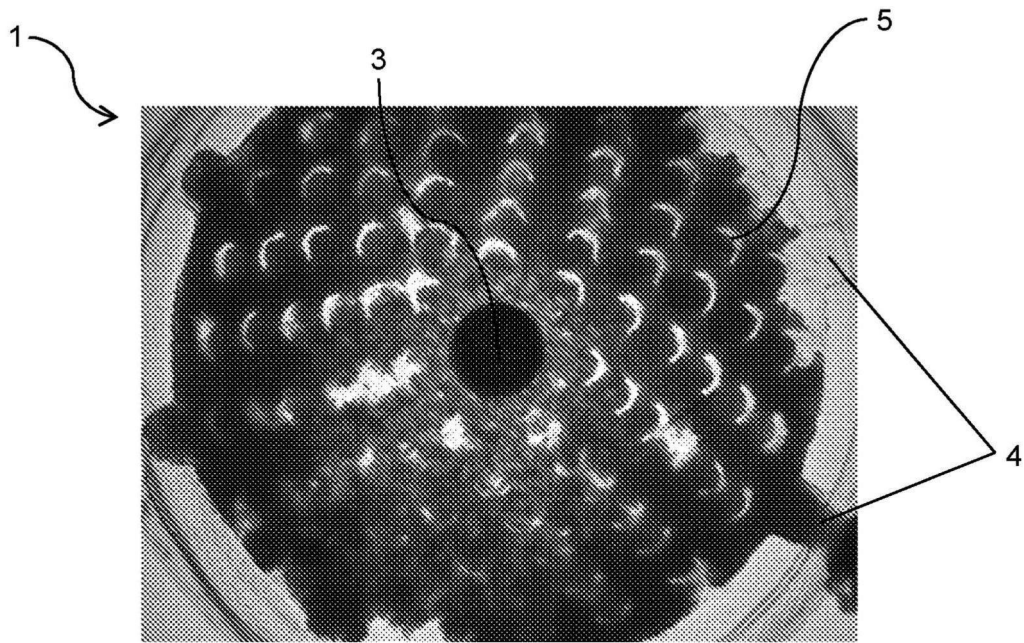


图3

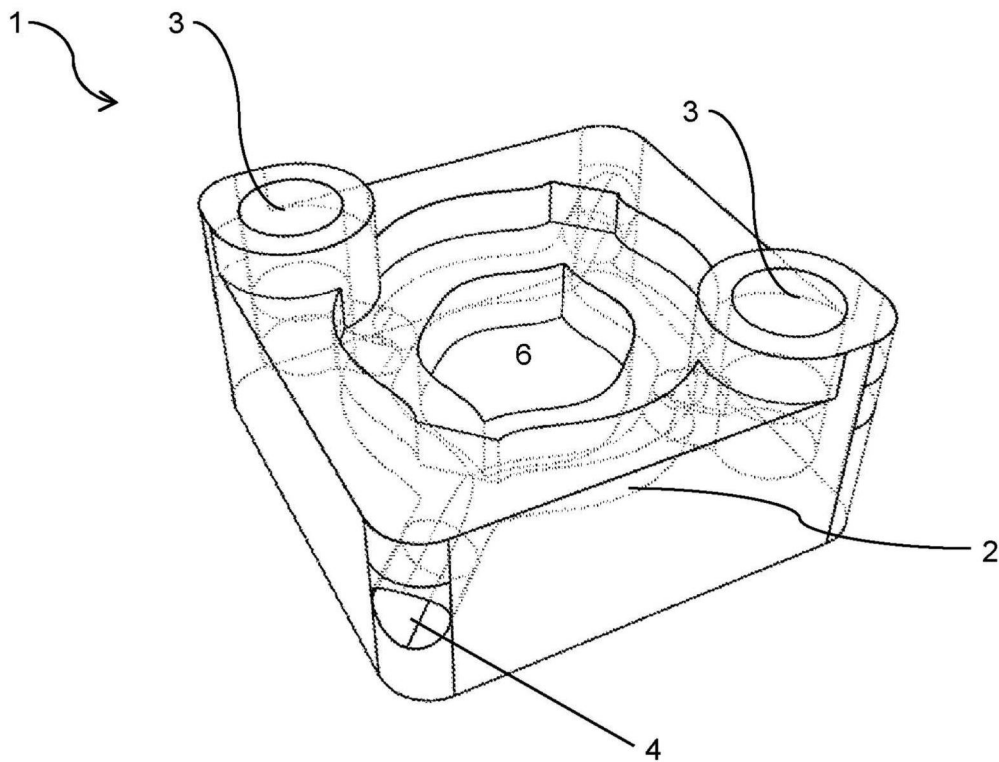


图4

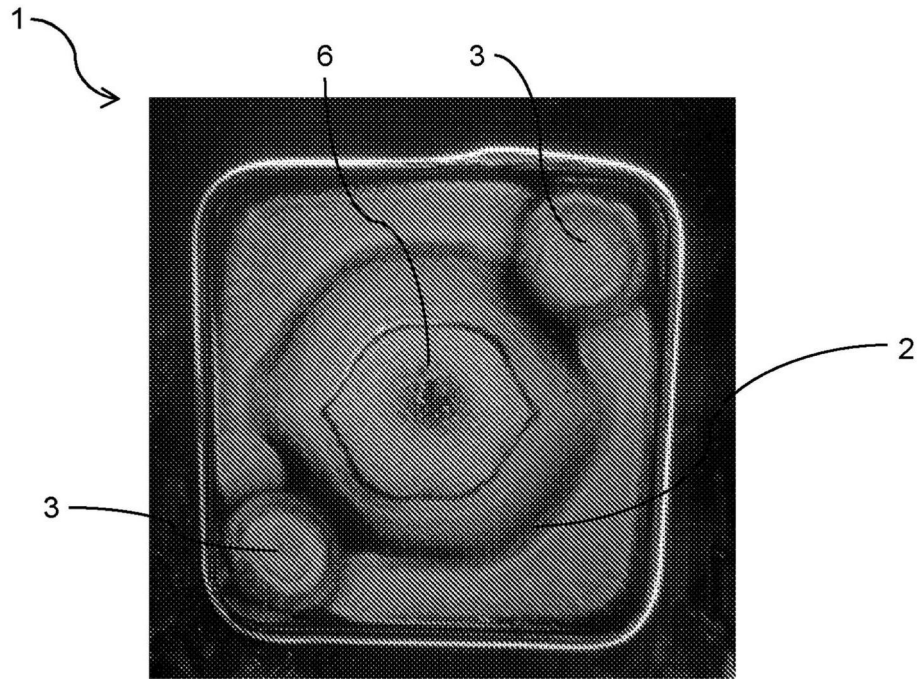


图5