

(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
2018 年 5 月 24 日 (24.05.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/090189 A1

(51) 国际专利分类号:

A61L 27/38 (2006.01) *B29C 64/106* (2017.01)
A61L 27/24 (2006.01) *B33Y 10/00* (2015.01)
A61L 27/20 (2006.01) *B33Y 70/00* (2015.01)
A61L 27/22 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/105921

(22) 国际申请日: 2016 年 11 月 15 日 (15.11.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳先进研究院 (SHENZHEN
INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/

CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 阮长顺 (RUAN, Changshun); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 翟欣昀 (ZHAI, Xinyun); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 吕维加 (LV, Weijia); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 潘浩波 (PAN, Haobo); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 广州三环专利商标代理有限公司 (SCIHEAD IP LAW FIRM); 中国广东省广州市

(54) Title: CELL-BIOMATERIAL COMPOSITE STENT AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 细胞-生物材料复合支架及其制备方法和应用

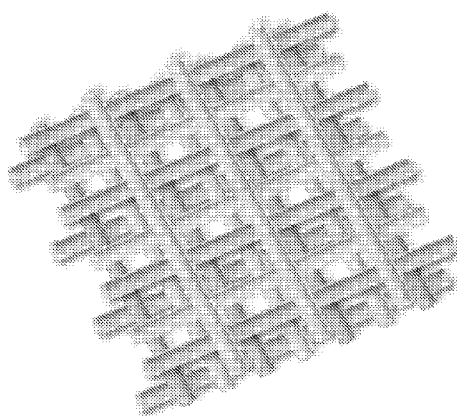


图 2

(57) Abstract: Disclosed is a cell-biomaterial composite stent, comprising a stent matrix and a viscous cell suspension capable of slowly releasing cells. The composite stent has a configuration of AC_nB from the bottom up, wherein A is a stent matrix layer, B is a viscous cell suspension layer, C is a mixed layer formed by the viscous cell suspension distributed crosswise in voids of the stent matrix, and n is a positive integer from 3 to 20. The viscous cell suspension comprises cells, a carrier carrying the cells, and water, the carrier being a biocompatible viscous material. Cells on the composite stent have a controllable distribution density and good adherence rate and survival rate, thereby solving the problem that cells on a three-dimensional composite stent grow slowly, have poor proliferation and differentiation, and are not good at promoting tissue regeneration. Further disclosed are a preparation method and the use of the composite stent.

(57) 摘要: 本发明提供了一种细胞-生物材料复合支架, 所述复合支架包括支架基体和可缓慢释放细胞的粘性细胞悬液, 所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形成, 其中, A 为支架基体层, B 为粘性细胞悬液层, C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体空隙间形成的混合层, n 为 3-20 的正整数; 所述粘性细胞悬液包括细胞、负载细胞的载体和水, 所述载体为生物相容性粘性材料。细胞在该复合支架上的分布密度可控、粘附率和细胞存活率均较好, 可解决细胞在三维复合支架上生长缓慢、增殖和分化弱、促进组织再生能力弱的问题。本发明还提供了该复合支架的制备方法及应用。

越秀区先烈中路80号汇华商贸大厦1508室, Guangdong 510070 (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, JP, KE, KG, 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, 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)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

细胞-生物材料复合支架及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及生物材料技术领域，具体涉及一种细胞-生物材料复合支架及其制备方法和应用。

背景技术

组织工程是应用生命科学与工程学的原理与技术，研究开发用于修复、维护、促进人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的生物替代物的一门新兴学科。其中，以生物材料为基础的支架材料的选择和构建是关键环节，将正常人体细胞种植到具有生物相容性的支架材料，待其在支架上增殖、分化至一定程度后，可以将粘附细胞的支架植入组织缺损或损失部位，达到组织修复的目的。理想的组织工程支架材料除了应具备优良的生物相容性、生物活性、可降解性以及良好的孔隙结构和力学性能外，还应该具备进一步促进细胞的黏附、增殖和分化，促进组织的再生等的能力。

目前，制备组织工程支架的方法有很多，其中主流的三维打印技术虽然已经实现了按需制造任意形状的支架，但是构建出来的支架孔隙尺寸较大，无法获得微观尺寸的微孔，不能提供利于细胞生长的三维支撑环境，细胞在三维支架上的粘附率较低，大部分细胞在接种时落在培养皿中。因此，如何增强细胞在三维支架上的粘附程度，并精确控制不同种类细胞的在三维尺寸上的分布，通过体外培养获得与动物甚至人体组织或器官相似的三维构造体是目前三维打印技术应用于组织工程中所面临的一大难题。

发明内容

有鉴于此，本发明提供了一种细胞-生物材料复合支架及其制备方法，所述复合支架包括具有可设计性的三维支架基体，以及打印在三维支架基体上的可缓慢释放细胞的粘性细胞悬液，所述复合支架可以提高细胞在其上的粘附率、活性等。所述复合支架的制备方法中，首次将细胞与支架基体一起打印，其可控度高，细胞在复合支架上的粘附率和细胞存活率均较好。

第一方面，本发明提供了一种细胞-生物材料复合支架，所述复合支架包括支架基体和可缓慢释放细胞的粘性细胞悬液，所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形式，其中，

A 为由支架基体形成的支架基体层, B 为粘性细胞悬液层, C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体空隙间形成的混合层, n 为 3-20 的正整数; 所述粘性细胞悬液包括细胞、负载细胞的载体和水, 所述载体为生物相容性粘性材料。

本申请第一方面提供的所述复合支架包括支架基体, 以及在所述支架基体上特定分布的粘性细胞悬液, 该复合支架可以精确控制细胞在其上的分布状况等, 增强细胞在其上的分布密度、粘附程度等, 在所述复合支架用于组织工程支架中时, 被负载的细胞可被缓慢释放出来, 并粘附于所述支架基体的表面, 生长、分化等, 可解决细胞在三维复合支架上生长缓慢、增殖和分化弱、促进组织再生能力弱的问题。

优选地, 所述 n 为 3-8 的正整数。

所述混合层中, 粘性细胞悬液交叉分布在支架基体的空隙处, 这样不致于影响支架基体结构。此时, 由于细胞被负载在所述粘性细胞悬液中, 未与所述复合支架相粘附, 待后期对所述复合支架加入培养基进行培养后, 细胞被缓慢释放出来, 并粘附于所述复合支架的表面。

所述细胞-生物材料复合支架的形状与三维打印时的程序设计有关, 可根据不同需求设计程序, 打印出不同形貌的三维复合支架。

优选地, 所述复合支架为规则的几何体(如长方体、正方体、圆柱体等, 但不限于此)以及其他不规则的三维多孔结构。

优选地, 所述复合支架为立方体, 其底面边长为 10-30mm, 高度为 3-20mm, 行间距为 0.2-0.5mm。

在本发明一实施例中, 所述复合支架的大小为 15mm × 15mm 的立方体, 层数为 5-10 层。

优选地, 所述粘性细胞悬液的粘度为 80-200Pa·s。所述粘性细胞悬液的粘度若太低, 仍具有流动性, 无法达到逐步释放细胞的目的; 若其粘度过高, 在进行三维打印时所采用的打印压力较大, 对细胞损伤过大, 影响细胞的存活率、生物活性等。

优选地, 所述复合支架中, 所述细胞的分布密度为 $(4-10) \times 10^5$ 个/支架。该分布密度与支架大小有关, 可根据支架的形状参数(如长度、高度、宽度或直径等)来进行相应调整。

所述细胞的种类根据所述复合支架的应用场所来决定。当所述复合支架用作骨组织工程支架中, 所述细胞包括骨髓干细胞、成骨细胞、软骨细胞、血管内皮细胞和骨肉瘤细胞

中的一种或多种，但不限于此。

优选地，所述粘性细胞悬液中，所述细胞被负载在所述载体中，未接触到支架基体。

优选地，所述载体包括透明质酸、明胶、胶原、壳聚糖的一种或多种。所述载体为生物相容性较好的材料，具有一定的粘度，并能溶解在水中，从而实现打印后的复合支架在细胞培养过程中，将细胞缓慢释放于支架上的目的。

在本发明一实施例中，所述可缓慢释放细胞的载体为透明质酸。

优选地，所述粘性细胞悬液中，载体的质量分数为 10-50%。

优选地，所述粘性细胞悬液中，细胞的密度为 $(0.5-10) \times 10^6$ 个/mL。进一步优选为 $(2-8) \times 10^6$ 个/mL。更优选为 4×10^6 个/mL。

在本发明一实施方式中，所述支架基体的原料包括天然高分子、合成高分子、生物陶瓷的一种或多种，其中，所述天然高分子包括血纤蛋白、明胶、胶原、壳聚糖、透明质酸、透明质酸钠和海藻酸盐中的至少一种；所述合成高分子包括聚乳酸(PLA)、聚氨基酸、聚羟基乙酸(PGA)、聚乙烯醇(PVA)、乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和聚己内酯中的至少一种；所述生物陶瓷包括羟基磷灰石、磷酸八钙、磷酸钙、偏磷酸钙、磷酸三钙和生物活性玻璃中的至少一种。所述生物活性玻璃含有 Sr、B、Cu、P、Mg 等元素。

进一步优选地，所述支架基体的原料为所述天然高分子和/或合成高分子与所述生物陶瓷的混匀物。即，所述天然高分子和合成高分子中的一种或两种与所述生物陶瓷的混匀物。

在本发明另一实施方式中，所述支架基体为凝胶支架。优选地，所述三维凝胶支架由无机黏土、交联剂（含碳碳双键的生物相容大分子）、紫外光引发剂通过紫外光聚合而成。

优选地，所述支架基体的原料为黏土基水凝胶基质，包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂：10-50%；

无机粘土：3-20%；

紫外光引发剂：0.05-0.1%；

水：30-86%；

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%；其中，所述交联剂为含碳碳双键的生物相容大分子，所述生物相容大分子为聚乙二醇、聚乙烯醇、壳聚糖、明胶、透明质酸中的一种或多种。

本发明通过上述特定质量配比的各种原料的协同作用，获得的所述黏土基水凝胶基质

(即粘土基水凝胶打印浆料)具有适宜的打印粘度和强度,在紫外光交联前具有一定的预形状。在常温下可以将所述粘土基水凝胶基质打印成力学强度、拉伸性能较好的稳定凝胶支架前驱体,便于后期对凝胶复合支架前驱体进行统一的紫外光固化,得到三维凝胶复合支架。所述粘土基水凝胶基质适用于批量打印制得三维打印凝胶支架,大大提高了三维打印效率,非常适合工业化生产。

在紫外光的作用下,本申请的所述粘土基水凝胶基质中,所述交联剂的碳碳双键之间发生交联,形成的聚合物长链穿插在无机黏土的有序片层结构中,形成三维网络结构的水凝胶,使得凝胶形状得以保持,同时无机粘土也充当物理交联的作用,其与含碳碳双键的生物相容大分子之间形成的氢键作用、范德华力等,也使得打印出的三维凝胶支架的强度进一步提高,充分发挥物理交联与化学交联的协同效应。提高凝胶支架的稳定性。

所述无机粘土可以选自高岭土、膨润土、蒙脱土、锂皂石(laponite, 锂藻土)、锂蒙脱石(hectorite)、贝得石、皂石、硅镁石、硅酸镁铝、其它硅酸铝和各种其它天然和/或合成的粘土,以及它们的组合。

优选地,所述无机粘土的粒径不超过 500nm。进一步优选为 50-200nm。

在本发明的一优选实施方式中,所述无机粘土为锂皂石粘土。该锂皂石粘土可以在水中快速剥离分散成单片层,形成无色透明的胶体分散液,稳定性好。该黏土可以为购买自 Rockwood 公司的 Laponite XLG。Laponite XLG 是合成的层状粘土(layered clay),与天然蒙脱石类似。

本申请中,无机黏土的加入,可有效提高水凝胶支架的强度,无机黏土相当于充当了物理交联剂的作用。此外,控制所述无机黏土的含量可以调控所述粘土基水凝胶基质的粘度,使所述粘土基水凝胶基质具有一定的预形状,可以实现先打印后固化。

优选地,所述粘土基水凝胶基质的粘度为 30-350Pa·s。待打印的所述粘土基水凝胶基质应该具有一定的粘度,粘度过高,流动性较差,打印时需要的压力过大,且材料不容易混匀;溶液黏度过低,流动性太高,打印时塑形困难,支架会发生塌陷,无法保持预形状。本申请中,将无机粘土的含量控制在 3%-20%之间,可以使所述粘土基水凝胶基质的粘度控制在 30-350Pa·s。

进一步优选地,所述无机黏土的质量百分含量为 5-15%。更优选为 8-15%。当所述无机黏土的质量百分含量提高至 8%以上,所述粘土基水凝胶基质达到较高的黏度,其打印成的凝胶支架前驱体经固化后,凝胶支架的拉伸率可以达到 5000%左右,力学强度有了明显

提高。

优选地，所述粘土基水凝胶基质包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂：10-50%；

无机粘土：5-15%；

紫外光引发剂：0.05-0.1%；

水：35-84%；

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%。

进一步优选地，所述粘土基水凝胶基质的粘度为 50-250 Pa·s。更优选为 100-200 Pa·s。

本申请中，含碳碳双键的生物相容大分子成胶效果较好，在所述无机粘土与水形成的分散液中，不需要额外添加化学交联剂，经紫外光聚合，即可得到强度较高的凝胶结构。形成的三维凝胶支架基体的毒性低，细胞相容性好。在提供细胞生长所需的三维环境的同时，对细胞起到促进其黏附、生长与增殖的作用。

在本发明一实施方式中，所述交联剂的分子链的至少一端带有碳碳双键。所述交联剂可以为甲基丙烯酸、丙烯酸或聚乙二醇二丙烯酸酯（PEGDA）修饰的明胶、透明质酸、聚乙烯醇、聚乙醇等。例如可以是甲基丙烯酸修饰的明胶，丙烯酸修饰的透明质酸、甲基丙烯酸修饰的聚乙烯醇、低分子量（分子量小于 1000 道尔顿）的 PEGDA 修饰的壳聚糖等。

在本发明另一实施方式中，所述交联剂的分子链的至少一端带有碳碳双键，所述交联剂的分子链中间为聚乙二醇的主链结构。

进一步优选地，所述交联剂为聚乙二醇二丙烯酸酯。

所述交联剂除了可促进凝胶形成、提高凝胶力学强度外，还可以通过控制其分子量和固含量，以达到控制细胞在制得的支架上黏附、生长、增殖甚至分化等目的。例如，聚乙二醇分子量为 4000，固含量为 20% 时，细胞能够在支架上黏附及伸展情况良好；但当聚乙二醇的分子量为 10000 以上时，细胞在支架上成球形，不能很好地展开，细胞增殖行为相对较弱。

优选地，所述交联剂中，聚乙二醇的主链结构的分子量为 1000-10000。例如可以为 2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000 或 9000。进一步优选为 2000-8000。

本申请中，所述交联剂的质量百分含量为 10-50%。例如可以为 15%、20%、25%、30%、35%、40% 或 45%。进一步优选为 20-40%。

优选地，所述粘土基水凝胶基质包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂：20-40%；

无机粘土：3-20%；

紫外光引发剂：0.05-0.1%；

水：40-76%；

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%。

进一步优选地，所述粘土基水凝胶基质包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂：20-40%；

无机粘土：5-15%；

紫外光引发剂：0.05-0.1%；

水：45-74%；

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%。

本申请中所选用的紫外光引发剂为生物相容性良好的引发剂，其用量极少，且几乎不会对后期复合支架的细胞实验产生影响。

在本发明一实施方式中，所述紫外光引发剂为 2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮、2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮。紫外光引发剂还可以为 1-[4-(2-羟乙氧基)-亚苯基]-2-羟基-2',2'-二甲基乙酮 (Irgacure2959)、1-羟基环己基苯基酮、 α,α' -二甲氧基- α -苯基苯乙酮和 2-甲基-1-(4-甲硫基苯基)-2-吗啉-1-丙酮中的一种或多种。并不限于本申请所列举的这几种。

第二方面，本发明提供了一种细胞-生物材料复合支架的制备方法，包括以下步骤：

(1) 将支架基体的原料配制成支架基体前驱体浆料；提供粘性细胞悬液，所述粘性细胞悬液包括细胞、可缓慢释放细胞的载体和水，所述载体为生物相容性粘性材料；

(2) 采用多通道三维打印法进行打印，其中，一个通道用于控制所述粘性细胞悬液的打印，其余至少一个通道用于控制所述支架基体前驱体浆料的打印；

先打印所述支架基体前驱体浆料形成所述复合支架前驱体的底层，从第二层开始，交叉打印所述支架基体前驱体浆料与粘性细胞悬液，使所述粘性细胞悬液交叉排布在所述支架基体前驱体的空隙之间，形成一混合层，重复所述混合层的打印 n 次；最后打印所述粘性细胞悬液形成所述复合支架前驱体的顶层，得到细胞-生物材料复合支架前驱体，所述复合支架前驱体自底部自上形成 $A'C'_nB$ 的排布形式，其中， A' 为支架基体前驱体层， B 为粘性细胞悬液层， C' 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体前驱体的空隙间形成的混合层， n

为 3-20 的正整数;

(3) 将打印完的所述复合支架前驱体进行固化, 得到细胞-生物材料复合支架, 所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形式, 其中, A 为支架基体层, B 为粘性细胞悬液层, C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体的空隙之间形成的混合层, n 为 3-20 的正整数。

优选地, 步骤(3)中, 所述固化方式为紫外光固化、热固化、离子交联或冷冻干燥。所述固化方式根据所述支架基体的原料来定。可以根据支架基体的原料对光、热、离子等是否敏感来选择固化方式。例如, 对于凝胶支架的原料体系来说, 可以采用紫外光固化或热固化; 对于含海藻酸盐的支架基体的原料体系来说, 采用二价离子交联法进行固化; 对于生物陶瓷来说, 可以采用冷冻干燥法来固化。

进一步优选地, 所述固化方式为紫外光固化。该固化方式较温和, 对细胞的损伤相对较少。

优选地, 在所述步骤(3)之后, 还包括:

(4) 取所述复合支架, 加入细胞培养基, 使其浸没于所述细胞培养基中, 在 25-37℃ 下进行培养, 使负载于所述载体中的细胞缓慢释放出来, 并扩增、粘附于所述复合支架上, 得到粘附细胞的细胞-生物材料复合支架。浸没于培养基中培养时, 最终得到的粘附细胞的细胞-生物材料复合支架上是没有粘性细胞悬液的, 粘性细胞悬液已经逐渐溶解在培养基中, 只剩下支架以及粘附在支架上的细胞。

优选地, 步骤(4)中, 所述细胞培养基为 α -MEM 培养基。可以根据所述细胞的种类再添加其他营养物质。

优选地, 所述培养的时间为 1-30 天。进一步优选为 5-10 天或 18-25 天。一般而言, 细胞会在七天左右基本长满支架; 对于观察细胞在支架上的分化来说, 一般是需要培养 21 天左右。

优选地, 所述三维打印机的各通道均设置有材料补给腔体。用于补给各通道中的打印原料。

优选地, 所述三维打印开始前, 校正打印中所用到的各通道的位置, 以最先出料的所述支架基体前驱体浆料的枪头为基准, 使与所用到的各通道相连的所有枪头的底部均在同一水平线上。这样可以便于后期支架基体前驱体浆料与细胞悬液的交叉打印。

优选地, 所述与各个通道连接的枪头能够相对上下左右移动, 并不会受到相互的限制。

优选地, 所述三维打印过程中的驱动介质为气压或者电压驱动。这样可以对支架基体

浆料以及粘性细胞悬液中的细胞均能产生作用力，同时又不会对它们造成伤害。

优选地，所述三维打印过程中，使相邻层的孔交错排列且相互对应连通。

优选地，所述三维打印是在生物安全柜中进行。这样可以确保整体操作环境无菌。

优选地，所述三维打印过程中，每完成一层所述复合支架前驱体的打印，使与各个通道连接的所有枪头位置上移，所述枪头的上移距离与各通道连接的枪头直径和材料特性有关。

进一步优选地，所述枪头的上移距离为所述枪头直径的(0.6-1)倍。

例如，采用枪头直径为150 μ m的枪头打印时，打印出材料的线条粗细为150 μ m左右，每打印一层，枪头应上移150 μ m再打印接下来的一层，防止距离移动过小或者过大造成的支架线条间的挤压等；若打印材料的粘度较低（例如对于凝胶基体的浆料来说，若浆料粘度低于30Pa·s时），支架线条打印出来后容易发生塌陷，高度会低于枪头直径，此时，一层打印结束后，枪头的上移距离应小于枪头直径，从而使得支架的线条间接触良好，不会发生线条脱离现象。

本申请中，所述至少一个通道用于控制所述支架基体前驱体浆料的打印，可以是一个通道用于打印某一固定组成的基体前驱体浆料，也可以是由多个通道（2个以上）来打印相同组成不同配比的基体前驱体浆料，还可以是由多个通道来打印不同材料组成的基体前驱体浆料，从而形成不同基体的细胞-生物材料三维复合支架。

本申请中，步骤（2）中，所述复合支架前驱体的最下面一层（底层）为单独的支架基体前驱体，自底部向上的第二层开始，所述支架基体前驱体浆料与粘性细胞悬液交叉分布（并排交错分布），可以先将支架基体前驱体浆料打印成多孔结构，再打印粘性细胞悬液，使粘性细胞悬液交错分布在所述支架基体中形成混合层，这样才完成第二层的打印，重复n次第二层的打印方式，形成所述复合支架前驱体的中间层；在打印所述复合支架前驱体的最上层（顶层）时，单独打印粘性细胞悬液。这样可以提高所述复合支架对细胞的接种密度。

优选地，所述n为3-8的正整数。

优选地，所述粘性细胞悬液的粘度为80-200Pa·s。

优选地，所述载体包括透明质酸、明胶、胶原、壳聚糖的一种或多种。

优选地，所述粘性细胞悬液中，载体的质量分数为10-50%。

优选地，所述粘性细胞悬液中，细胞的密度为(0.5-10) $\times 10^6$ 个/mL。

优选地，所述支架基体前驱体浆料为黏土基水凝胶基质，包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂：10-50%；

无机粘土：3-20%；

紫外光引发剂：0.05-0.1%；

水：30-86%；

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%；其中，所述交联剂为含碳碳双键的生物相容大分子，所述生物相容大分子为聚乙二醇、聚乙烯醇、壳聚糖、明胶、透明质酸中的一种或多种。

采用上述特定配比的无机粘土、交联剂、紫外光引发剂、水构成的所述粘土基水凝胶基质，所述粘土基水凝胶基质的粘度合适，具有一定的预形状，适合连续、批量打印，固化后得到三维凝胶支架，大大提高了三维打印效率。所述三维凝胶支架的制备方法，工艺简单，可控性强，能耗较低，无需改变打印过程中的压力，制造成本低廉，实用性较强。

优选地，当所述支架基体前驱体浆料为黏土基水凝胶基质时，所述固化方式为紫外光固化。

优选地，所述交联固化的时间为 20-50min。

优选地，所用紫外光的波长为 230-400nm。进一步优选为 250-350nm。更优选为 254nm。

本发明第二方面提供的所述细胞-生物材料复合支架的制备方法，步骤简单、制备条件温和，在复合支架的制备中，首次将细胞悬液与支架基体的原料一起打印，可以构建多种不同细胞和不同支架基体的复合支架体系，精确控制细胞在复合支架上的分布状况，增强细胞在复合支架上的粘附率和细胞存活率。

现有技术中通常是先将支架基体原料与细胞悬液混合后形成混合浆料再打印，能满足与细胞混合后再打印的支架基体原料较少，而且混合后会影响到细胞在打印成的支架上的活性；混合浆料打印成型后的支架力学强度通常会较低。本申请提供的制备方法的应用范围更多，适用于各种基体材料，易于细胞在支架上的活性保持，最终得到的细胞-生物材料复合支架的力学强度也较高，能很好地满足复合组织工程对材料力学强度的要求。

第三方面，本发明还提供了一种如本发明第一方面所述的细胞-生物材料复合支架或如本发明第三方面所述的粘附细胞-生物材料复合支架在制备组织修复材料中的应用。优选为在骨组织工程支架材料中的应用。

优选地，所述应用包括以下步骤：

取所述细胞-生物材料复合支架，加入细胞培养基，使其浸没于所述细胞培养基中，在 25-37℃ 下进行培养，使负载于所述载体中的细胞缓慢释放出来，并扩增、粘附于所述复合支架上，得到粘附细胞的细胞-生物材料复合支架。所述粘附细胞的细胞-生物材料复合支架可以植入哺乳动物的组织缺损或损失部位。

进一步优选地，所述细胞培养基为 α -MEM 培养基。可以根据所述细胞的种类再添加其他营养物质。

进一步优选地，所述培养的时间为 1-30 天。进一步优选为 5-10 天或 18-25 天。一般而言，细胞会在七天左右基本长满支架；对于观察细胞在支架上的分化来说，一般是需要培养 21 天左右。

第四方面，本发明还提供了一种粘附细胞的细胞-生物材料复合支架。最终得到的粘附细胞的细胞-生物材料复合支架上是没有粘性细胞悬液的，粘性细胞悬液已经逐渐溶解在培养基中，只剩下支架基体以及粘附在支架基体上的细胞，但原本细胞-生物材料复合支架中的支架基体结构被保留下来。

优选地，所述粘附细胞的细胞-生物材料复合支架包括支架基体和粘附在支架基体表面的细胞（增殖和/或分化的细胞）。

所述粘附细胞的细胞-生物材料复合支架为立方体，其底面边长为 10-30mm，高度为 3-20mm，行间距为 0.2-0.5mm。

本发明实施例的优点将会在下面的说明书中部分阐明，一部分根据说明书是显而易见的，或者可以通过本发明实施例的实施而获知。

附图说明

图 1 是分子量分别为 4000 和 10000 的聚乙二醇（B，D）以及双键修饰后的分子量为 4000 和 10000 的聚乙二醇（A，C）的核磁图谱；

图 2 为细胞-生物材料复合支架前驱体的结构示意图；

图 3 为成骨细胞在固化后的细胞-生物材料复合支架中的分布图；

图 4 为成骨细胞在培养后的细胞-生物材料复合支架中的分布图。

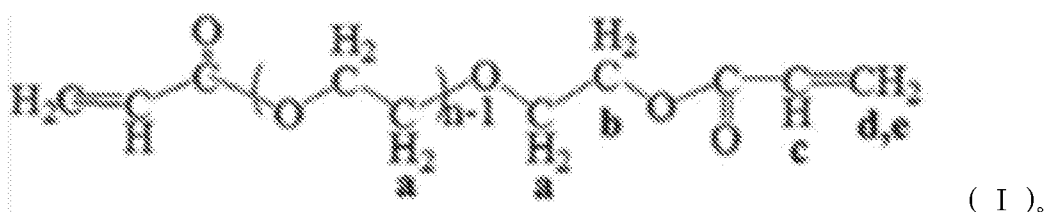
具体实施方式

以下所述是本发明实施例的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明实施例原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也视为本发明实施例的保护范围。

下面分多个实施例对本发明实施例进行进一步的说明。其中，本发明实施例不限于于以下的具体实施例。在不变主权利的范围，可以适当的进行变更实施。

本发明一实施例中，采用双键修饰的聚乙二醇作为交联剂，其制备方法如下：将 1.2 ml 的丙烯酰氯溶于 10 ml 二氯甲烷中，配制成丙烯酰氯溶液。随后将 10 g 的聚乙二醇(Mn=4000)置于 50 ml 的三口烧瓶中，加入 20 ml 的二氯甲烷溶解，室温下搅拌均匀。在冰水浴条件下，缓慢加入 2.1ml 的三乙胺溶液。随后，在冰水浴条件下，逐滴加入提前配置好的丙烯酰氯溶液。控制体系温度为零度，直至丙烯酰氯全部滴加完毕，氮气保护状态下，室温反应 24 h。反应结束后，滤去体系中形成的三乙胺盐酸盐，并用无水乙醚沉淀出合成出的双键修饰的聚乙二醇 (Mn=4000)，得到的粗产物经过真空干燥 1 d、透析 7 d、过滤、冻干 2 d 后得到纯度较高的双键修饰的聚乙二醇大分子交联剂，即为聚乙二醇二丙烯酸酯，其分子式为 $\text{CH}_2=\text{CHCO}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCOCH}=\text{CH}_2$ (聚乙二醇分子量为 4000 时，n=88，分子量为 10000 时，n=224)。

图 1 为分子量分别为 4000 和 10000 的聚乙二醇 (B, D) 以及双键修饰后的分子量为 4000 和 10000 的聚乙二醇 (A, C) (即聚乙二醇双丙烯酸酯) 的核磁图谱。即(A)为 PEGDA4000, (B) 为 PEG 4000, (C)为 PEGDA 10000, (D) PEG 10000。其中聚乙二醇双丙烯酸酯的结构式如下式 (I) 所示：



从图 1 可以看出，c,d,e 为聚乙二醇双丙烯酸酯上修饰的双键上氢元素的特征峰，说明双键被成功地修饰到聚乙二醇上。

实施例 1:

一种细胞-生物材料复合支架的制备方法，包括以下步骤：

1、制备支架基体前驱体浆料：

以无机纳米粘土基水凝胶作为细胞-生物材料复合三维支架的支架基体的前驱体浆料，该支架基体前驱体浆料的制备如下：

取上述双键修饰的聚乙二醇大分子交联剂、Laponite XLG 锂皂石粘土、紫外光引发剂 2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮与水在室温下混合，得到该支架基体前驱体浆料，其粘度为 160Pa·s，其中，上述各原料按如下质量百分含量混合：

聚乙二醇二丙烯酸酯（聚乙烯的分子量 $M_n=4000$ ） 20%

Laponite XLG 粘土： 5%

紫外光引发剂： 0.05%

水： 74.95%。

2、配制粘性细胞悬液：

将透明质酸溶于水中，得到透明质酸溶液，以透明质酸溶液重悬人成骨细胞，得到粘度为 150Pa·s 的粘性细胞悬液，在粘性细胞悬液中，透明质酸的质量分数为 20%，细胞的密度为 4×10^6 个/mL。

3、打印复合支架前驱体：

采用双通道三维打印法进行打印，其中，一个通道用于控制上述粘性细胞悬液的打印，控制细胞在三维支架中的分布；另一个通道用于控制所述支架基体前驱体浆料的打印；

先打印所述支架基体前驱体浆料形成所述复合支架前驱体的最底层，从此层往上，即从第二层开始，交叉打印所述支架基体前驱体浆料与粘性细胞悬液，使所述粘性细胞悬液交叉排布在所述支架基体前驱体的空隙之间，形成一混合层，重复所述混合层的打印 n 次，形成所述复合支架前驱体的中间层；最后打印所述粘性细胞悬液形成所述复合支架前驱体的顶层，得到细胞-生物材料复合支架前驱体，所述复合支架前驱体自底部自上形成 $A'C'_nB$ 的排布形式，其中， A' 为支架基体前驱体层， B 为粘性细胞悬液层， C' 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体前驱体间的混合层， n 为 3，细胞密度控制在 6×10^5 /支架，支架大小为长宽为 15mm × 15mm 的立方体，层数为 5 层。

4、复合支架前驱体的固化：

将打印完的所述复合支架前驱体放置于紫外交联仪中进行光固化 2000s，使凝胶塑性，得到细胞-生物材料复合支架，所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形式，其中， A 为支架基体层， B 为粘性细胞悬液层， C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体空隙间形成的混合层， n 为 3；支架基体为聚乙二醇二丙烯酸酯、无机黏土、紫外光引发剂经固化后形

成的凝胶支架基体。

5、将上述三维复合支架取出，并浸没于 α -MEM 培养基，放置于 37℃培养箱中培养，使负载于透明质酸中的成骨细胞缓慢释放出来，并黏附于凝胶支架基体上，得到粘附细胞的细胞-生物材料三维复合支架。

图 2 为本发明中合成的细胞-生物材料复合支架前驱体的结构示意图，图 2 中，灰度较浅为支架基体前驱体，灰度较深处为粘性细胞悬液。其中，最底层为支架基体前驱体，中间的每一层为粘性细胞悬液交错分布在支架基体前驱体间的混合层，最上层为粘性细胞悬液层。

图 3 为成骨细胞在固化后的细胞-生物材料复合支架中的分布图（图 3 中标尺为 200 μ m）。图 3 中色度较浅的柱状部分为粘性细胞悬液；色度较深的柱状部分为支架基体，从图 3 中可以看出，粘性细胞悬液与支架基体交错排布，成骨细胞仍然包裹在细胞悬液层的内部（图 3 中色度较浅的柱状部分中的白色点状物为细胞），还未被释放出来。

图 4 为成骨细胞在培养基中培养 7 天后的细胞-生物材料复合支架（即粘附细胞的细胞-生物材料三维复合支架）中的生长情况图；图 4 中标尺为 200 μ m。从图 4 中可以看出，支架基体的空隙处不再存在交错排布的细胞悬液，成骨细胞被释放出来，粘附在支架基体表面。

实施例 2

一种细胞-生物材料复合支架的制备方法，包括以下步骤：

1、制备支架基体前驱体浆料：

以无机纳米粘土基水凝胶作为细胞-生物材料复合三维支架的支架基体的前驱体浆料，该前驱体浆料的粘度为 150Pa·s，包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂（甲基丙烯酸修饰的明胶）：20%；

Laponite XLG 粘土：7%；

紫外光引发剂：0.05%；

水：72.95%；

其中，所述紫外光引发剂为 1-[4-(2-羟乙氧基)-亚苯基]-2-羟基-2', 2'-二甲基乙酮（Irgacure2959）。

2、配制粘性细胞悬液：

将透明质酸溶于水中，得到透明质酸溶液，以透明质酸溶液重悬人成骨细胞，得到粘度为 $80\text{Pa}\cdot\text{s}$ 的粘性细胞悬液，在粘性细胞悬液中，透明质酸的质量分数为 10%，细胞的密度为 8×10^6 个/mL。

3、打印复合支架前驱体：

采用双通道三维打印法进行打印，其中，一个通道用于控制上述粘性细胞悬液的打印，控制细胞在三维支架中的分布；另一个通道用于控制所述支架基体前驱体浆料的打印；

先打印所述支架基体前驱体浆料形成所述复合支架前驱体的最底层，从此层往上，即从第二层开始，交叉打印所述支架基体前驱体浆料与粘性细胞悬液，使所述粘性细胞悬液交叉排布在所述支架基体前驱体的空隙之间，形成一混合层，重复所述混合层的打印 n 次，形成所述复合支架前驱体的中间层；最后打印所述粘性细胞悬液形成所述复合支架前驱体的顶层，得到细胞-生物材料复合支架前驱体，所述复合支架前驱体自底部自上形成 $A'C'_nB$ 的排布形式，其中， A' 为支架基体前驱体层， B 为粘性细胞悬液层， C' 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体前驱体间的混合层， n 为 5，细胞密度控制在 4×10^5 /支架，支架大小为长宽为 $20\text{mm} \times 25\text{mm}$ 的立方体，层数为 7 层。

4、复合支架前驱体的固化：

将打印完的所述复合支架前驱体放置于紫外交联仪中进行光固化 45min，使凝胶塑性，得到细胞-生物材料复合支架，所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形式，其中， A 为支架基体层， B 为粘性细胞悬液层， C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体空隙之间形成的混合层， n 为 5；支架基体为聚乙二醇二丙烯酸酯、无机黏土、紫外光引发剂经固化后形成的凝胶支架基体。

5、将上述三维复合支架取出，并浸没于 α -MEM 培养基，放置于 37°C 培养箱中培养，使负载于透明质酸中的成骨细胞缓慢释放出来，并黏附于凝胶支架基体上，得到粘附细胞的细胞-生物材料三维复合支架。

实施例 3：

一种细胞-生物材料复合支架的制备方法，包括以下步骤：

1、制备支架基体前驱体浆料：

以海藻酸钠基水凝胶作为细胞-生物材料复合三维支架的支架基体的前驱体浆料，该前驱体浆料的粘度为 $130\text{Pa}\cdot\text{s}$ ，包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂（甲基丙烯酸修饰修饰的聚乙烯醇）：20%；

海藻酸钠：10%；

水：70%。

2、配制粘性细胞悬液：

将透明质酸溶于水中，得到透明质酸溶液，以透明质酸溶液重悬人骨髓干细胞，得到粘度为 $200\text{Pa}\cdot\text{s}$ 的粘性细胞悬液，在粘性细胞悬液中，透明质酸的质量分数为 30%，细胞的密度为 2×10^6 个/mL。

3、打印复合支架前驱体：

采用双通道三维打印法进行打印，其中，一个通道用于控制上述粘性细胞悬液的打印，控制细胞在三维支架中的分布；另一个通道用于控制所述支架基体前驱体浆料的打印；

先打印所述支架基体前驱体浆料形成所述复合支架前驱体的最底层，从此层往上，即从第二层开始，交叉打印所述支架基体前驱体浆料与粘性细胞悬液，使所述粘性细胞悬液交叉排布在所述支架基体前驱体的空隙之间，形成一混合层，重复所述混合层的打印 n 次，形成所述复合支架前驱体的中间层；最后打印所述粘性细胞悬液形成所述复合支架前驱体的顶层，得到细胞-生物材料复合支架前驱体，所述复合支架前驱体自底部自上形成 $A'C'_nB$ 的排布形式，其中， A' 为支架基体前驱体层， B 为粘性细胞悬液层， C' 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体前驱体的空隙之间形成的混合层， n 为 8，细胞密度控制在 4×10^5 /支架，支架大小为长宽为 $15\text{mm} \times 20\text{mm}$ 的立方体，层数为 10 层。

4、复合支架前驱体的固化：

将打印完的所述复合支架前驱体放置于浓度为 0.3mol/ml 的氯化钙溶液中 15 min，固化成型，得到细胞-生物材料复合支架，所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形式，其中， A 为支架基体层， B 为粘性细胞悬液层， C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体空隙间形成的混合层， n 为 8；支架基体为聚乙二醇二丙烯酸酯、无机黏土、紫外光引发剂经固化后形成的凝胶支架基体。

5、将上述三维复合支架取出，并浸没于 α -MEM 培养基，放置于 37°C 培养箱中培养，使负载于透明质酸中的骨髓干细胞缓慢释放出来，并黏附于凝胶支架基体上，得到粘附细胞的细胞-生物材料三维复合支架。

实施例 4：

一种细胞-生物材料复合支架的制备方法，包括以下步骤：

1、制备支架基体前驱体浆料：

以无机纳米粘土基水凝胶作为细胞-生物材料复合三维支架的支架基体的前驱体浆料，该支架基体前驱体浆料的制备如下：

取上述双键修饰的聚乙二醇大分子交联剂、Laponite XLG 锂皂石粘土、紫外光引发剂 2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮与水在室温下混合，得到该支架基体前驱体浆料，其粘度为 170Pa·s，其中，上述各原料按如下质量百分含量混合：

聚乙二醇二丙烯酸酯（聚乙烯的分子量 $M_n=4000$ ） 30%

Laponite XLG 粘土： 8%

紫外光引发剂： 0.05%

水： 61.95%。

步骤 2-5 与实施例 1 相同。

实施例 5：

一种细胞-生物材料复合支架的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1、制备支架基体前驱体浆料：

以无机纳米粘土基水凝胶作为细胞-生物材料复合三维支架的支架基体的前驱体浆料，该支架基体前驱体浆料的制备如下：

取上述双键修饰的聚乙二醇大分子交联剂、Laponite XLG 锂皂石粘土、紫外光引发剂 2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮与水在室温下混合，得到该支架基体前驱体浆料，其粘度为 150Pa·s，其中，上述各原料按如下质量百分含量混合：

聚乙二醇二丙烯酸酯（聚乙烯的分子量 $M_n=10000$ ） 20%；

Laponite XLG 粘土： 7% ；

紫外光引发剂： 0.05%；

水： 72.95%。

剩余步骤 2-5 与实施例 1 相同。

实施例 6：

一种细胞-生物材料复合支架的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1、制备支架基体前驱体浆料:

以无机纳米粘土基水凝胶作为细胞-生物材料复合三维支架的支架基体的前驱体浆料, 该支架基体前驱体浆料的制备如下:

取上述双键修饰的聚乙二醇大分子作交联剂、膨润土作为无机黏土、Irgacure2959 作紫外光引发剂与水在室温下混合, 得到该支架基体前驱体浆料, 其粘度为 200Pa·s, 其中, 上述各原料按如下质量百分含量混合:

聚乙二醇二丙烯酸酯 (聚乙烯的分子量 $M_n=4000$) 25%;

无机粘土: 10%;

紫外光引发剂: 0.1%;

水: 64.9 %;

剩余步骤 2-5 与实施例 1 相同。

实施例 7

一种细胞-生物材料复合支架的制备方法, 包括以下步骤:

步骤 1、制备支架基体前驱体浆料:

以无机纳米粘土基水凝胶作为细胞-生物材料复合三维支架的支架基体的前驱体浆料, 该支架基体前驱体浆料包括如下质量百分含量的原料组分:

交联剂: 40%;

无机粘土: 15%;

紫外光引发剂: 0.05%;

水: 44.95%;

其中, 所述交联剂为丙烯酸修饰的透明质酸; 所述无机黏土为高岭土, 所述紫外光引发剂为 2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮。

剩余步骤 2-5 与实施例 1 相同。

以上所揭露的仅为本发明较佳实施例而已, 当然不能以此来限定本发明之权利范围, 本领域普通技术人员可以理解实现上述实施例的全部或部分流程, 并依本发明权利要求所作的等同变化, 仍属于发明所涵盖的范围。

权利要求

1、一种细胞-生物材料复合支架，其特征在于，所述复合支架包括支架基体和可缓慢释放细胞的粘性细胞悬液，所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形式，其中，A 为由支架基体形成的支架基体层，B 为粘性细胞悬液层，C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体空隙间形成的混合层，n 为 3-20 的正整数；所述粘性细胞悬液包括细胞、负载细胞的载体和水，所述载体为生物相容性粘性材料。

2、如权利要求 1 所述的复合支架，其特征在于，所述复合支架中，所述细胞的分布密度为 $(4-10) \times 10^5$ 个/支架；所述细胞包括骨髓干细胞、成骨细胞、软骨细胞、血管内皮细胞和骨肉瘤细胞中的一种或多种。

3、如权利要求 1 所述的复合支架，其特征在于，所述粘性细胞悬液的粘度为 80-200Pa·s。

4、如权利要求 1 所述的复合支架，其特征在于，所述粘性细胞悬液中，载体的质量分数为 10-50%；所述载体包括透明质酸、明胶、胶原、壳聚糖的一种或多种。

5、如权利要求 1 所述的复合支架，其特征在于，所述粘性细胞悬液中，细胞的密度为 $(0.5-10) \times 10^6$ 个/mL。

6、如权利要求 1 所述的复合支架，其特征在于，所述支架基体的原料为黏土基水凝胶基质，所述黏土基水凝胶基质包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂：10-50%；

无机黏土：3-20%；

紫外光引发剂：0.05-0.1%；

水：30-86%；

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%；其中，所述交联剂为含碳碳双键的生物相容大分子，所述生物相容大分子为聚乙二醇、聚乙烯醇、壳聚糖、明胶和透明质酸中的一种或多种。

7、如权利要求 6 所述的复合支架，其特征在于，所述交联剂的分子链的至少一端带有碳碳双键，所述交联剂的分子链中间为聚乙二醇的主链结构；所述聚乙二醇的主链结构的分子量为 1000-10000。

8、如权利要求 7 所述的复合支架，其特征在于，所述交联剂为聚乙二醇二丙烯酸酯。

9、如权利要求 6 所述的复合支架，其特征在于，所述无机黏土的质量百分含量为 5-15%。

10、如权利要求 6 所述的复合支架,其特征在于,所述交联剂的质量百分含量为 20-40%。

11、如权利要求 6 所述的复合支架,其特征在于,所述粘土基水凝胶基质包括如下质量百分含量的原料组分:

交联剂: 20-40%;

无机粘土: 5-15%;

紫外光引发剂: 0.05-0.1%;

水: 45-74%;

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%。

12、如权利要求 6 所述的复合支架,其特征在于,所述粘土基水凝胶基质的粘度为 30-350Pa·s。

13、一种细胞-生物材料复合支架的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将支架基体的原料配制成支架基体前驱体浆料;提供粘性细胞悬液,所述粘性细胞悬液包括细胞、可缓慢释放细胞的载体和水,所述载体为生物相容性粘性材料;

(2) 采用多通道三维打印法进行打印,其中,一个通道用于控制所述粘性细胞悬液的打印,其余至少一个通道用于控制所述支架基体浆料的打印;

先打印所述支架基体前驱体浆料形成所述复合支架前驱体的底层,从第二层开始,交叉打印所述支架基体前驱体浆料与粘性细胞悬液,使所述粘性细胞悬液交叉排布在所述支架基体前驱体的空隙之间,形成一混合层,重复所述混合层的打印 n 次;最后打印所述粘性细胞悬液形成所述复合支架前驱体的顶层,得到细胞-生物材料复合支架前驱体,所述复合支架前驱体自底部自上形成 $A'C'_nB$ 的排布形式,其中, A' 为支架基体前驱体层, B 为粘性细胞悬液层, C' 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体前驱体的空隙间形成的混合层, n 为 3-20 的正整数;

(3) 将打印完的所述复合支架前驱体进行固化,得到细胞-生物材料复合支架,所述复合支架自底部自上形成 AC_nB 的排布形式,其中, A 为支架基体层, B 为粘性细胞悬液层, C 为粘性细胞悬液交叉分布在支架基体空隙之间形成的混合层, n 为 3-20 的正整数。

14、如权利要求 13 所述的制备方法,其特征在于,所述固化方式为紫外光固化、热固化、离子交联或冷冻干燥。

15、如权利要求 13 所述的制备方法,其特征在于,所述三维打印开始前,校正打印中所用到的各通道的位置,以最先出料的所述支架基体前驱体浆料的枪头为基准,使与所用

到的各通道相连的所有枪头的底部均在同一水平线上。

16、如权利要求 13 所述的制备方法，其特征在于，所述三维打印过程中的驱动介质为气压或者电压驱动。

17、如权利要求 13 所述的制备方法，其特征在于，所述三维打印过程中，使相邻层的孔交错排列且相互对应连通。

18、如权利要求 13 所述的制备方法，其特征在于，所述支架基体的原料为黏土基水凝胶基质，所述黏土基水凝胶基质包括如下质量百分含量的原料组分：

交联剂：10-50%；

无机粘土：3-20%；

紫外光引发剂：0.05-0.1%；

水：30-86%；

上述各原料组分的总质量百分含量为 100%；其中，所述交联剂为含碳碳双键的生物相容大分子，所述生物相容大分子为聚乙二醇、聚乙烯醇、壳聚糖、明胶和透明质酸中的一种或多种。

19、如权利要求 1-12 任一项所述的细胞-生物材料复合支架或权利要求 13-18 任一项所述的细胞-生物材料复合支架的制备方法在制备组织修复材料中的应用。

20、如权利要求 19 所述的应用，包括以下步骤：

取所述细胞-生物材料复合支架，加入细胞培养基，使其浸没于所述细胞培养基中，在 25-37℃ 下进行培养，使负载于所述载体中的细胞缓慢释放出来，并扩增、粘附于所述复合支架上，得到粘附细胞的细胞-生物材料复合支架。

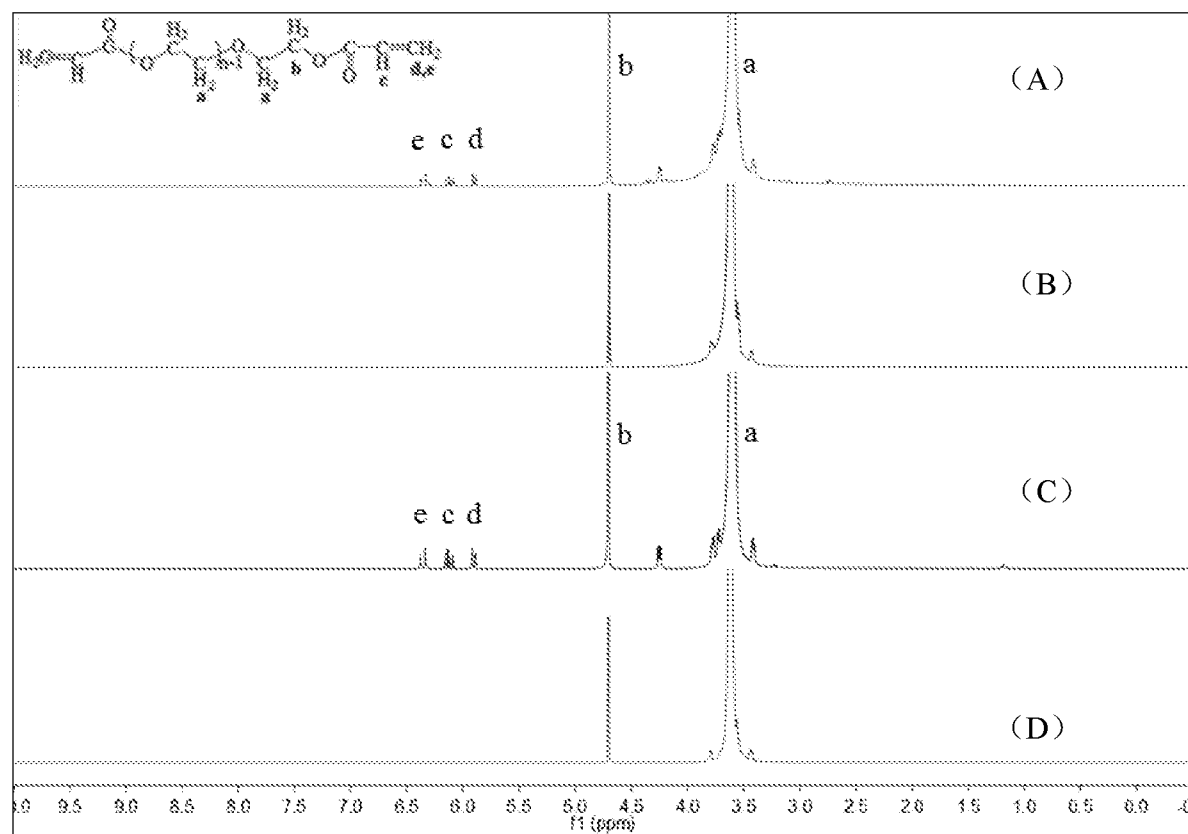


图 1

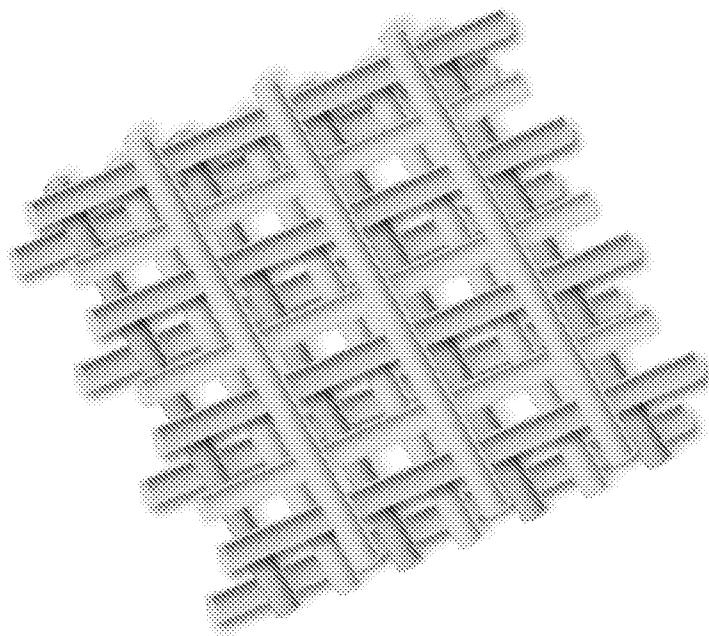


图 2

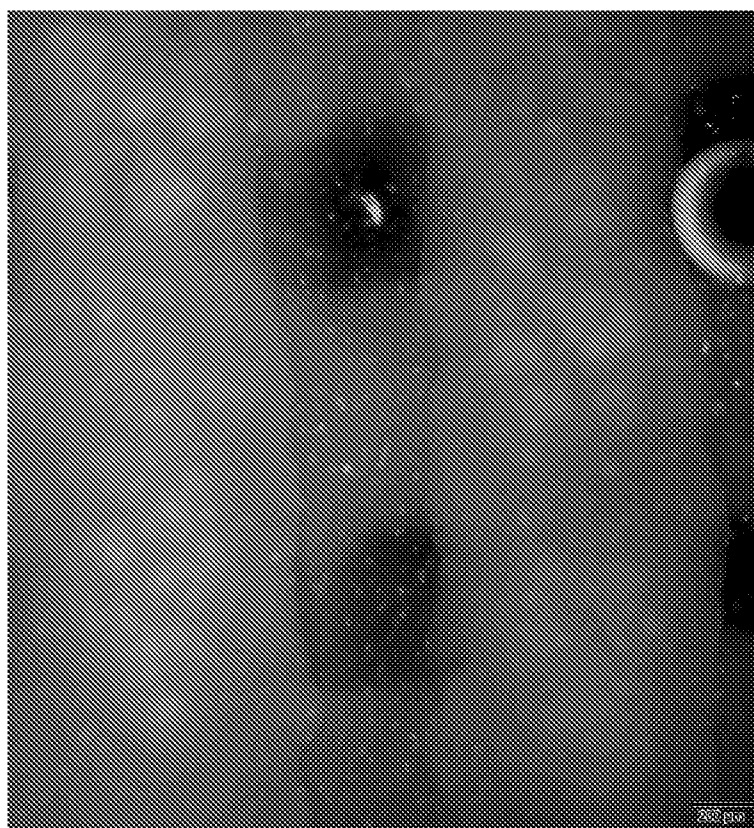


图 3

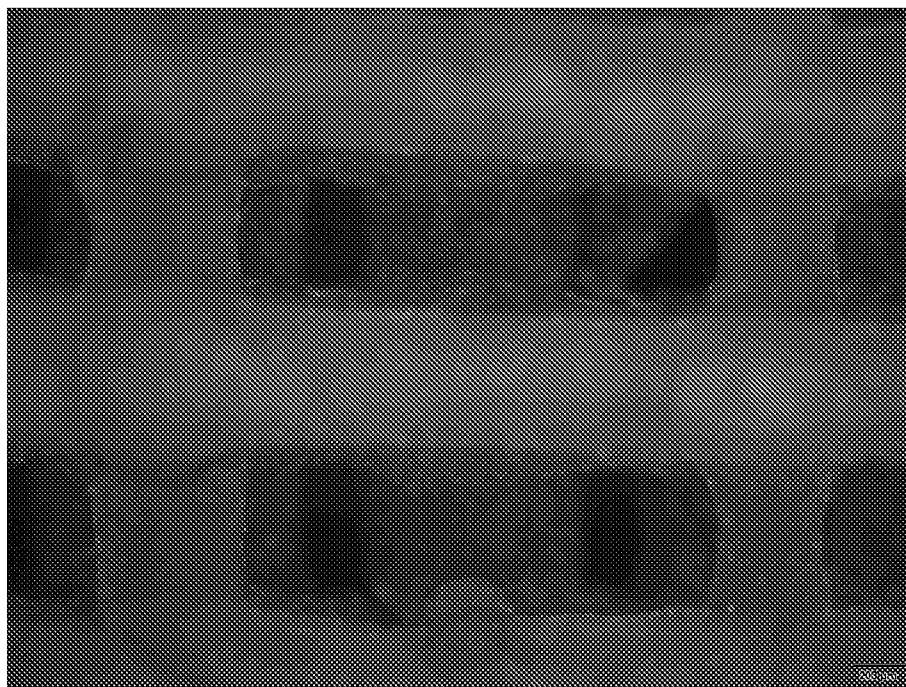


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/105921

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/38 (2006.01) i; A61L 27/24 (2006.01) i; A61L 27/20 (2006.01) i; A61L 27/22 (2006.01) i; B29C 64/106 (2017.01) i; B33Y 10/00 (2015.01) i; B33Y 70/00 (2015.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L; B29C; B33Y

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)

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT 和关键词: 阮长顺, 支架, 细胞, 生物, 复合, 3D 打印, Ruan changshun, scaffold?, cell?, biological, complex, 3-D print+, 3D print+, 等

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103143062 A (SHANGHAI UNIVERSITY), 12 June 2013 (12.06.2013), see embodiments 1-4, and claims 1-6	1-5, 13-17, 19
A	CN 104888277 A (QINGDAO UNIQUE PRODUCTS DEVELOP CO., LTD.), 09 September 2015 (09.09.2015), see entire document	1-20
A	WO 2015026299 A1 (UNIV SINGAPORE NAT), 26 February 2015 (26.02.2015), see entire document	1-20

☐ 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 03 August 2017	Date of mailing of the international search report 18 August 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 WANG, Jinfeng Telephone No. (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/105921

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103143062 A	12 June 2013	None	
CN 104888277 A	09 September 2015	AU 2015101218 A4	08 October 2015
WO 2015026299 A1	26 February 2015	CN 105813602 A	27 July 2016
		US 2016200043 A1	14 July 2016
		SG 11201601106V A	30 March 2016
		GB 201315074 D0	02 October 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/105921

A. 主题的分类

A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/24(2006.01)i; A61L 27/20(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; B29C 64/106(2017.01)i; B33Y 10/00(2015.01)i; B33Y 70/00(2015.01)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)

A61L; B29C; B33Y

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))

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT和关键词: 阮长顺, 支架, 细胞, 生物, 复合, 3D打印, Ruan changshun, scaffold?, cell?, biological, complex, 3-D print+, 3D print+, 等

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 103143062 A (上海大学) 2013年 6月 12日 (2013 - 06 - 12) 见实施例1-4、权利要求1-6	1-5、13-17、19
A	CN 104888277 A (青岛尤尼科技有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 见全文	1-20
A	WO 2015026299 A1 (UNIV SINGAPORE NAT) 2015年 2月 26日 (2015 - 02 - 26) 见全文	1-20

☐ 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 8月 3日

国际检索报告邮寄日期

2017年 8月 18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

王金凤

电话号码 (86-10)62412282

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/105921

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	103143062	A	2013年 6月 12日	无			
CN	104888277	A	2015年 9月 9日	AU	2015101218	A4	2015年 10月 8日
WO	2015026299	A1	2015年 2月 26日	CN	105813602	A	2016年 7月 27日
				US	2016200043	A1	2016年 7月 14日
				SG	11201601106V	A	2016年 3月 30日
				GB	201315074	D0	2013年 10月 2日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)