

(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
2023 年 2 月 2 日 (02.02.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/006113 A1

(51) 国际专利分类号:
A61L 27/18 (2006.01) *A61L 27/50* (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/109458

(22) 国际申请日: 2022 年 8 月 1 日 (01.08.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110875054.2 2021 年 7 月 30 日 (30.07.2021) CN

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTE 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: 李健 (LI, Jian); 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)。 张鹏 (ZHANG, Peng); 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: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路 99 号楼 2 单元 905, Beijing 100123 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: BIOENERGETIC-ACTIVE MATERIAL AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种生物能量活性材料及其应用

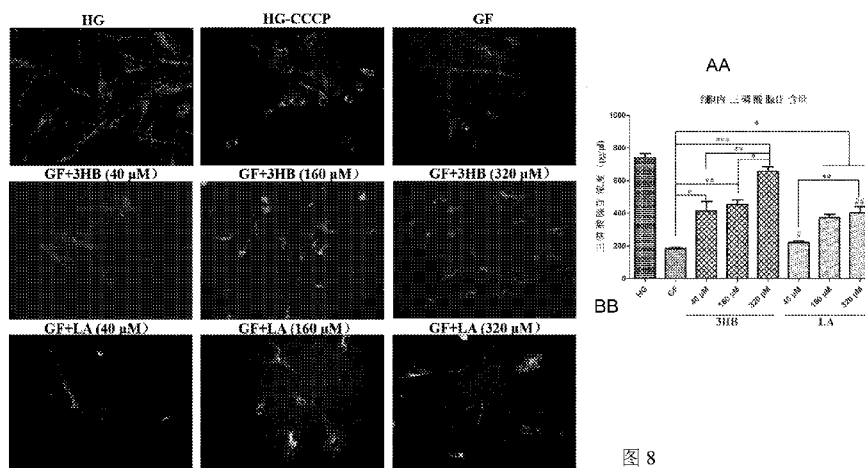


图 8

AA Content of intracellular adenosine triphosphate
BB Concentration of adenosine triphosphate (pg/μl)

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a bioenergetic-active material and the use thereof. Specifically, disclosed is a bioenergetic-active material, which is a biodegradable polymer. A degradation product of the bioenergetic-active material is a metabolic intermediate product in a tricarboxylic acid cycle and/or a glycolysis pathway, or a polymer monomer which can be converted into a metabolic intermediate product in a tricarboxylic acid cycle and/or a glycolysis pathway, or a polymer monomer which can be converted into an acetyl coenzyme A. The degradation product of the bioenergetic-active material provides the biological energy for tissue cells

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, 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))。

by means of the tricarboxylic acid metabolic cycle or the glycolysis pathway. The bioenergetic-active material solves the problem that the traditional biodegradable material cannot continuously improve the stability of ATP in cells and the activity of related biomass, and exhibits broad application prospects in the field of bone tissue regeneration, especially in the field of the repair of large segmental bone defects.

(57) 摘要: 本发明公开了一种生物能量活性材料及其应用, 具体公开一种生物能量活性材料, 其为生物可降解聚合物; 所述生物能量活性材料的降解产物为三羧酸循环和/或糖酵解途径中的代谢中间产物, 或者为能够转换生成三羧酸循环和/或糖酵解途径中代谢中间产物的聚合物单体, 或者为能够转换生成乙酰辅酶A的聚合物单体。该生物能量活性材料的降解产物经过三羧酸代谢循环或者糖酵解途径为组织细胞提供生物能量, 解决传统生物可降解材料无法持续提高细胞中ATP的稳定性和相关生物活性的问题, 在骨组织再生领域尤其是在大段骨缺损修复方面表现出广阔的应用前景。

一种生物能量活性材料及其应用

技术领域

本发明属于生物医学组织工程，具体涉及一种生物能量活性材料及其应用。

背景技术

在临床上，因创伤、感染、骨肿瘤切除等原因造成的各种类型骨缺损十分常见。全世界范围内每年进行骨移植患者的数量达到 220 万【J. Van der Stok, E.M. Van Lieshout, Y. El-Massoudi, G.H. Van Kralingen, P. Patka, Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review, *Acta Biomater* 7(2) (2011) 739-50.】。据美国骨科医师协会（AAOS）统计，在美国每年有 630 万人发生骨折，其中需要接受骨移植物的患者就有 50 万之多，每年仅在骨折治疗方面的费用支出高达 2000 亿美元【D.C. Lobb, B.R. DeGeorge, Jr., A.B. Chhabra, Bone Graft Substitutes: Current Concepts and Future Expectations, *J Hand Surg Am* 44(6) (2019) 497-505 e2.】。我国每年骨损伤患者超过 350 万，每年新增病例达到数十万之多，创伤住院年增长率达 7.2%，高居住院人数的第二位，骨缺损的高发生率使得骨移植物成为仅次于输血之后需求量最大的医疗耗材【G.H. Brundtland, A WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium met in Geneva from 13 to 15 January 2000., *Who Tech Rep Ser* 919 (2003) 1-218.】，给社会带来沉重的医疗负担。

自体骨的移植可以较好的进行骨修复，但是“供体有限”限制了其更好的应用。生物可降解高分子材料因具有良好的生物相容性和降解性而广泛用于骨组织工程研究。生物可降解高分子材料包括天然可生物降解聚合物（如胶原、壳聚糖）和合成生物可降解聚合物（如 PLA、PLGA、PCL），因具有良好的生物相容性和降解性，是目前常用的骨组织工程支架材料【F. Asghari, M. Samiei, K. Adibkia, A. Akbarzadeh, S. Davaran, Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review, *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 45(2) (2017) 185-192.】。虽然可生物降解聚合物具有一定的骨缺损修复功能，但仍然存在降解速率不可控、力学性能较差、酸性降解产物引起炎症反应等系列自身难以克服的缺点【Y.X. Lai, Y. Li, H.J. Cao, J. Long, X.L. Wang, L. Li, C.R. Li, Q.Y. Jia, B. Teng, T.T. Tang, J. Peng, D. Eglin, M. Alini, D.W. Grijpma, G. Richards, L. Qin, Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect, *Biomaterials* 197 (2019) 207-219.】，阻碍了其在临床上的广泛应用。

骨再生过程是一个能量消耗的过程，细胞能量代谢对组织修复和再生起着至关重要的作

用。三磷酸腺苷(ATP)是细胞能量的主要来源,在许多生物过程中发挥作用,包括细胞的增殖、迁移及分化【I. Gadjanski, S. Yodmuang, K. Spiller, S. Bhumiratana, G. Vunjak-Novakovic, Supplementation of Exogenous Adenosine 5-Triphosphate Enhances Mechanical Properties of 3D Cell-Agarose Constructs for Cartilage Tissue Engineering, Tissue Eng Pt A 19(19-20) (2013) 2188-2200.】。研究表明,生物能量作为一种潜在的治疗方法,已在体外模型或相对薄的浅表组织(如皮肤)再生方面取得了成功。到目前为止,用于复杂骨组织缺损修复的具有长期生物能量释放效应的3D支架鲜有报道。这在很大程度上是由于使用现有的生物支架材料无法持续提高细胞中ATP的稳定性和相关生物活性,阻碍了生物能量活性材料在骨组织工程中的应用和发展。

发明内容

本发明为了解决现有技术中的不足和缺点,提出一种生物能量活性材料及其应用。具体方案如下:

本发明第一方面提供一种生物能量活性材料,所述生物能量活性材料为生物可降解聚合物;所述生物能量活性材料的降解产物为三羧酸循环和/或糖酵解途径中的代谢中间产物;

或者所述生物能量活性材料的降解产物为能够转换生成三羧酸循环和/或糖酵解途径中代谢中间产物的聚合物单体;

或者所述生物能量活性材料的降解产物为能够转换生成乙酰辅酶A的聚合物单体。

进一步地,本发明的上述技术方案中,所述三羧酸循环的代谢中间产物包括柠檬酸、顺乌头酸、异柠檬酸、草酰琥珀酸、 α -酮戊二酸、琥珀酰辅酶A、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸和三磷酸腺苷中的一种以上;

所述糖酵解途径的代谢中间产物包括葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸、果糖-1,6-二磷酸、3-磷酸甘油醛、磷酸二羟丙酮、1,3-二磷酸甘油酸、3-磷酸甘油酸、2-磷酸甘油酸、磷酸烯醇式丙酮酸PEP和丙酮酸中的一种以上;

所述能够转换生成乙酰辅酶A的聚合物单体为3-羟基丁酸。3-羟基丁酸会在3-羟基丁酸脱氢酶(3-hydroxybutyrate dehydrogenase)的作用下生成乙酰乙酸,再和琥珀酰辅酶A(succinyl-CoA)在3-琥珀酰辅酶A转移酶(3-oxoacid CoA-transferase)酶的作用下合成乙酰乙酰辅酶A(Acetoacetyl-CoA),乙酰乙酰辅酶A与一个辅酶A(CoA)反应,在乙酰辅酶A-酰基转移酶(acetyl-CoA C-acetyltransferases)生成两个乙酰辅酶A(acetyl-CoA),从而进入三羧酸循环,为组织细胞提供生物能量。

优选地，本发明的上述技术方案中，所述生物能量活性材料为降解产物为 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯。

进一步地，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯（P34HB）、聚-3-羟基丁酸酯（PHB）、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯（PHBV）和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯（PHBHHx）中的一种以上。

本发明第二方面提供所述的生物能量活性材料在骨组织再生及修复领域中的应用。

本发明第三方面提供所述的生物能量活性材料在制备骨组织修复多孔支架中的应用。

本发明第四方面提供一种骨组织修复多孔支架，由所述的生物能量活性材料制备得到。进一步地，骨组织修复多孔支架可以通过传统制备方法，也可以通过 3D 打印技术制备。

本发明第五方面提供一种骨组织修复 3D 多孔支架的制备方法，包括如下步骤：

- （1）合成所述的生物能量活性材料；
- （2）结合 3D 打印技术制备骨组织修复 3D 多孔支架。

进一步地，本发明的上述制备方法中，所述生物能量活性材料通过微生物法或化学合成法合成，也可以通过其他方式合成。例如，可以通过微生物嗜盐单胞菌发酵生产 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯。

本发明第五方面提供上述制备方法制备的骨组织修复 3D 多孔支架。

本发明第六方面提供降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯作为兼具骨组织再生及血管生成功能的生物能量活性材料的应用，所述 3-羟基丁酸通过三羧酸代谢循环并以柠檬酸形式参与骨形成，所述 3-羟基丁酸诱导血管生成。

进一步地，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

本发明第七方面提供降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯在制备血管化骨再生材料中的应用。

进一步地，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

本发明第八方面提供降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯在制备大段骨缺损修复材料或临界型骨缺损修复材料中的应用。

进一步地，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

本发明第九方面提供一种血管化骨再生材料、大段骨缺损修复材料或临界型骨缺损修复材料，其特征在于，由降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯制备得到。

进一步地，所述材料为由降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯制备得到的多孔支架。

进一步地，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

本发明的有益效果：

1、本发明提供的生物能量活性材料的降解产物为三羧酸循环和/或糖酵解途径中的代谢中间产物，或者为能够转换生成三羧酸循环和/或糖酵解途径中代谢中间产物的聚合物单体，或者为能够转换生成乙酰辅酶 A 的聚合物单体，该生物能量活性材料的降解产物经过三羧酸代谢循环或者糖酵解途径为组织细胞提供生物能量，解决传统生物可降解材料无法持续提高细胞中 ATP 的稳定性和相关生物活性活性的问题，在骨组织再生领域尤其是在大段骨缺损修复方面表现出广阔的应用前景。

2、本发明提供的生物能量活性材料 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯（P34HB）是一类可降解高分子聚酯，具有独特的生物能量活性、机械力学特性、生物可降解性和生物相容性，其降解产生的主要产物 3-羟基丁酸（3HB）是哺乳动物体内酮体的主要组成之一，不仅对机体无毒性作用，而且可作为一种能量物质促进细胞的黏附、增殖以及分化。此外，与聚乳酸相比，在相同条件下，3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯材料可以维持较长的降解时间，根据组织修复的要求调整材料中 3-羟基丁酸的比例可以实现 6-12 月较长时间的降解。3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯材料能够解决传统生物可降解材料无法持续提高细胞中 ATP 的稳定性和相关生物活性，以及酸性降解产物引起炎症反应的问题，是一种性能优异的具有生物能量活性兼具骨形成促进功能的骨修复支架活性材料。

3、本发明提供的骨组织修复多孔支架基于生物能量活性材料和 3D 打印技术，该多孔支架结构可控，且具有良好的生物相容性、生物可降解性和机械力学特性，支架植入体内后随着自身不断的降解，其降解产生的生物能量活性物质可以促进骨髓间充质干细胞（hBMSCs）细胞的增殖、分化及矿化，具有骨形成促进功能，是传统高分子支架材料所不具备的。

4、本发明进一步提供的骨组织修复 3D 多孔支架基于生物能量活性材料 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯（P34HB）和 3D 打印技术制备，该多孔支架结构可控，且具有良好的生物

相容性、生物可降解性和机械力学特性，植入体内后随着自身不断的降解，降解产生的生物能量活性物质 3-羟基丁酸（3HB），经过三羧酸代谢循环不仅为组织细胞提供生物能量，促进骨髓间充质干细胞（hBMSCs）细胞的增殖、分化及矿化，而且产生的中间代谢物以柠檬酸盐的形式参与骨形成，有利骨修复过程中成骨和成血管功能，缩短了骨缺损修复时间，在骨组织再生及修复领域尤其是在大段骨缺损修复方面表现出巨大的应用前景。

5、本发明生物能量活性材料降解产生的生物能量活性物质 3-羟基丁酸（3HB），3HB 不仅通过三羧酸代谢循环并以柠檬酸形式参与骨形成，而且能诱导血管形成，在制备血管化骨再生材料、大段骨缺损修复材料或临界型骨缺损修复材料领域，具备重要的应用前景。

附图说明

图 1 为 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯的凝胶渗透色谱图；其中，A：标准曲线，B：3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯；

图 2 为 3D 打印制备的多孔支架（A）及多孔支架横截面电镜扫描图（B）；

图 3 为支架降解产物 3-羟基丁酸对人源骨髓间充质干细胞（hBMSCs）增值的影响结果；

图 4 为支架降解产物 3-羟基丁酸对 hBMSCs 碱性磷酸酶表达活性的影响结果；

图 5 为支架降解产物 3-羟基丁酸对 hBMSCs 胞外钙结节形成的影响结果；

图 6 为激光共聚焦拉曼光谱分析 hBMSCs 胞外磷灰石的形成情况；

图 7 为支架降解产物 3-羟基丁酸对 hBMSCs 成骨分化相关基因表达的影响结果；

图 8 为支架降解产物 3-羟基丁酸对细胞线粒体膜势能的影响结果；

图 9 为 LC-MS/MS 代谢流分析 ^{13}C 标记 3HB 参与 TCA 循环中间代谢物形成；

图 10 为 LC-MS/MS 定量分析 TCA 循环中间代谢物；

图 11 为细胞上清柠檬酸含量分析；

图 12 为骨质疏松模型大鼠体重及子宫变化；

图 13 为 Micro-CT 分析 3HB 对骨质疏松模型骨量的影响；

图 14 为硝酸银染色（a）及双荧光标记分析骨形成（c-e）；

图 15 为体内分析 3HB 参与骨形成的方式（a-c）及血清中柠檬酸（d）和钙（e）的含量测定；

图 16 为建立大鼠颅骨临界性骨缺损模型；

图 17 为划痕实验分析 3HB 对 EA.hy926 细胞迁移的影响；

图 18 为体外分析 3HB 对 EA.hy926 细胞微血管网络形成的影响；

图 19 为高分辨双光子活体显微成像分析骨缺损部位血管生成 (a, b)；

图 20 为术后 12 周 micro-CT 评估骨缺损部位新生骨组织再生情况。

具体实施方式

为了更清楚地理解本发明，现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，或按照仪器制造商所建议的条件。

实施例 1

(1) 将能合成 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯的微生物嗜盐单胞菌在 60MMG 培养基中，37℃，400-800rpm 条件下发酵培养 72 小时，72 小时后收集菌体，置于 70℃对菌体进行通风干燥，得到含有 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯的干菌体粉末。

60MMG 培养基组成为：葡萄糖 30g/L，酵母提取物 1g/L，硫酸铵 0.25 g/L，硫酸镁 0.2 g/L，磷酸氢二钠 9.65 g/L，磷酸二氢钾 1.5 g/L，微量元素 I 10ml/L，微量元素 II 1ml/L。

(2) 用氯仿对干菌体粉末中的 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯进行提取（1g 干菌体粉末加入 20 ml 氯仿），搅拌均匀后装入高压反应釜中，在 100℃条件下反应 4 小时。

(3) 待高压反应釜冷却后，采用过滤或者抽滤的方法去掉细胞碎片，得到澄清氯仿溶液。

(4) 在 60℃条件下将氯仿溶液浓缩（按照 100ml 氯仿溶液浓缩到 60ml 的比例进行），然后加入到 15 倍体积的预冷无水乙醇中，然后置于 4℃冰箱中过夜，进行沉淀析出。

(5) 过滤收集步骤 (4) 中的沉淀析出物，并将收集到的沉淀析出物置于 40℃真空干燥箱中 24h，待溶剂挥发完全后，即可得 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯。

称取 50mg 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯溶解于氯仿中，静置 1 小时形成均匀的溶液，然后取 10ul 进行凝胶渗透色谱，测试分子量。结果如图 1 所示。

分子量计算结果如下：

GPC Calculation Results

峰#: 1 (检测器 A Ch1)

[峰信息]

	Time(min)	Volume(mL)	Molecular Weight	Height
Start	5.925	5.925	1362905	459
Top	6.958	6.958	65994	8418
End	8.083	8.083	2435	565

Area : 383862

Area% : 100.0000

[平均分子量]

Number Average Molecular Weight(Mn)	40265
Weight Average Molecular Weight(Mw)	89532
Z Average Molecular Weight(Mz)	179321
Z+1 Average Molecular Weight(Mz1)	312585
Mw/Mn	2.22354
Mz/Mn	0.00000
Mz/Mw	2.00287

检测器 A Ch1

[平均分子量(总计)]

Number Average Molecular Weight(Mn)	40265
Weight Average Molecular Weight(Mw)	89532
Z Average Molecular Weight(Mz)	179321
Z+1 Average Molecular Weight(Mz1)	312585
Mw/Mn	2.22354
Mz/Mn	0.00000
Mz/Mw	2.00287

实施例 2

将实施例 1 中合成得到的 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯材料装入熔融 3D 打印机 (180℃)，进行骨组织修复多孔支架制备。

结果如图 2 所示，其中，图 2-A 为 3D 打印制备的多孔支架，图 2-B 为支架横截面电镜扫描图，多孔支架的孔径大约在 350-400 μm。

实验例 1

将实施例 2 中 3D 多孔支架浸泡于磷酸盐缓冲液 8 周，收集降解产物。在磷酸盐缓冲液中，3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯的降解产物主要是 3-羟基丁酸 (3HB)。对收集到的降解产物进行浓度测定，然后进行体外实验。

磷酸盐缓冲液的组成为：氯化钠 7.9g/L，氯化钾 0.2 g/L，磷酸二氢钾 0.24g/L。

(1) 取生长状态良好的人源骨髓间充质干细胞 (hBMSCs)，按照 2×10^4 细胞密度接种于 48 孔板，4 小时后向上述细胞中加入不同浓度的 3-羟基丁酸 (0 μM, 10 μM, 40 μM, 80 μM, 160 μM, 320 μM)，在第 1, 5, 7 天用 CCK-8 分别测定细胞增殖情况。同时以乳酸(LA)作为对照组。

结果如图 3 所示。图 3 为支架降解产物 3-羟基丁酸对人源骨髓间充质干细胞 (hBMSCs) 增值的影响结果, 与对照组 (LA) 相比, 在第 5 天, 第 7 天 3HB 刺激后显著促进了骨髓间充质干细胞的增殖, 表明支架降解产物能够促进 hBMSCs 增值。

(2) 将人源骨髓间充质干细胞 (hBMSCs), 按照 1×10^5 细胞密度接种于 6 孔板, 培养 12 小时后, 向上述细胞中加入含有不同浓度的 3-羟基丁酸 ($0 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$, $320 \mu\text{M}$) 的成骨诱导分化液, 在第 7, 14 天分别检测碱性磷酸酶的表达情况。根据碱性磷酸酶活性检测试剂盒的使用说明进行碱性磷酸酶表达的检测。

成骨诱导分化液的组成: 低糖 DMEM 培养基+10%胎牛血清+2 mM L-谷氨酰胺+100 U/mL 青霉素+100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素+100 nM 地塞米松+0.2 mM-抗坏血酸+10 mM β -甘油磷酸钠。

结果如图 4 所示。图 4 为支架降解产物 3-羟基丁酸对 hBMSCs 碱性磷酸酶表达活性的影响结果, 结果表明支架降解产物能够促进 hBMSCs 碱性磷酸酶表达。且与对照组 (LA) 相比, 3HB 刺激骨髓间充质干细胞诱导分化 14 天后, 显著增强了碱性磷酸酶的表达, 而对照组则表现出抑制作用。

(3) 将人源骨髓间充质干细胞 (hBMSCs), 按照 1×10^5 细胞密度接种于 6 孔板, 培养 12 小时后, 向上述细胞中加入含有不同浓度的 3-羟基丁酸 ($0 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$, $320 \mu\text{M}$) 的成骨诱导分化液, 在第 10, 14 天分别用茜素红检测胞外钙结节的形成。

结果如图 5 所示。图 5 为支架降解产物 3-羟基丁酸对 hBMSCs 胞外钙结节形成的影响结果, 与对照组 (LA) 相比, 3HB 刺激骨髓间充质干细胞诱导分化 10, 14 天后显著增强了胞外钙结节的沉积, 表明 3-羟基丁酸促进了骨髓间充质干细胞成骨分化标志物钙结节的形成。

(4) 将人源骨髓间充质干细胞 (hBMSCs), 按照 1×10^5 细胞密度接种于 6 孔板, 培养 12 小时后, 向上述细胞中加入含有不同浓度的 3-羟基丁酸的成骨诱导分化液 ($0 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$, $320 \mu\text{M}$), 进行 21 天诱导分化, 诱导 21 天后, 利用激光共聚焦拉曼光谱检测胞外磷灰石的形成。

结果如图 6 所示。图 6 为激光共聚焦拉曼光谱分析 hBMSCs 胞外磷灰石的形成情况, 骨髓间充质干细胞诱导分化 21 天后, 胞外有大量的磷灰石形成且其含量随着 3HB 浓度的变大而增多, 表明 3-羟基丁酸能够促进骨髓间充质干细胞成骨分化磷灰石的形成。

(5) 将人源骨髓间充质干细胞 (hBMSCs), 按照 1×10^5 细胞密度接种于 6 孔板, 培养 12 小时后, 向上述细胞中加入含有不同浓度的 3-羟基丁酸 ($0 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$, $320 \mu\text{M}$)

的成骨诱导分化液，进行 7 天诱导分化，诱导 7 天后，利用实时荧光定量 PCR 技术检测成骨分化相关基因（Runx 相关转录因子 2 基因、骨钙素基因、骨保护素基因）表达情况。

结果如图 7 所示。图 7 为支架降解产物 3-羟基丁酸对 hBMSCs 成骨分化相关基因表达的影响结果，与对照组（LA）相比，3HB 刺激骨髓间充质干细胞诱导分化 7 天后促进了成骨分化相关基因的表达，而对照组则在一定程度上抑制了基因的表达，表明支架降解产物 3-羟基丁酸能够促进 hBMSCs 成骨分化相关基因表达。

(6) 将人源骨髓间充质干细胞（hBMSCs），按照 1×10^4 细胞密度接种于 6 孔板，培养 12 小时后，实验分为阳性对照组，阴性对照组以及实验组，阳性对照组用高糖培养基（HG）处理细胞 6 小时；阴性对照组用含有氧化磷酸化解偶联剂（CCCP）的高糖培养基处理细胞 6 小时；实验组用含有不同浓度（40 μ M，160 μ M，320 μ M）的 3-羟基丁酸和乳酸(LA)的无糖培养基（GF）处理细胞 6 小时。

结果如图 8 所示。图 8 为支架降解产物 3-羟基丁酸对细胞线粒体膜势能的影响结果，结果表明支架降解产物 3-羟基丁酸能够为细胞提供 ATP 及维持线粒体膜势能（ $\Delta\Psi_m$ ），且与 LA 组相比，3HB 能为细胞提供较多的生物能量（ATP）并提高细胞膜势能。

实验例 2

本实验例以 ^{13}C 标记 3HB 示踪实验，解析 3HB 的代谢流向及参与骨形成的方式，以未用 ^{13}C 标记 3HB 处理为对照组。将人源骨髓间充质干细胞（hBMSCs）接种于培养板中，向上述细胞中加入含有 1 mM 的 ^{13}C -3HB 的成骨诱导分化液，在第 14 天进行代谢组学分析（LC-MS/MS）。

当用 1 mM 的 ^{13}C -3HB 刺激诱导 hBMSCs 成骨分化 14 天后，代谢组学分析（LC-MS/MS）发现，在 TCA 循环中检测到多个中间代谢物（Citrate-柠檬酸、succinate-琥珀酸、fumarate-延胡索酸、malate-苹果酸）含有来源于 ^{13}C 标记 3HB 的碳原子，而在对照组（未用 ^{13}C 标记 3HB 处理）并未发现含有来源于 ^{13}C 标记 3HB 的碳原子（图 9），由此证明 P34HB 支架降解产生的生物能量活性物质 3HB 能够通过 TCA 循环参与代谢。

进一步，通过对胞内 TCA 循环代谢物总含量相对定量，结果显示，与对照组相比，经过 1 mM ^{13}C 标记 3HB 处理后，胞内的 Citrate、isocitrate、fumarate、malate 等多种中间代谢物含量显著低于未处理组（图 10）这一结果似乎与 ^{13}C 标记 3HB 参与 TCA 代谢循环提高中间代谢物含量相矛盾；也与上述 3HB 能够上调氧化磷酸化功能，促进 hBMSCs 成骨分化，增强胞外钙沉积形成相矛盾。

进一步, 分析细胞成骨诱导分化上清, 与对照组相比, 发现 ^{13}C 标记 3HB 处理组在上清中检测到更多柠檬酸的存在 (图 11) 这一结果解释了生物能量活性物质 3HB 虽然参与 TCA 循环, 却并没有在胞内提高中间代谢物含量。原因是因为 ^{13}C 标记 3HB 处理后, 通过 TCA 形成的柠檬酸从胞内转移到胞外参与钙基质沉积, 从而引起胞内柠檬酸含量的降低。然而, 柠檬酸是 TCA 循环中的关键中间体, 为了维持基本的细胞代谢活动, 必须要有 TCA 循环中的其他物质例如琥珀酸、延胡索酸等转化而来, 从而降低了整个 TCA 循环中间代谢物含量积累。

以上研究结果证明, 生物能量活性物质 3HB 通过 TCA 循环以中间代谢物柠檬酸的形式参与体外生物矿化形成。

实验例 3

本实验例以 3HB 为媒介, 以去势大鼠骨质疏松模型为研究对象, 阐述 3HB 在体内促进骨再生的机理。

结果显示, 去势大鼠体重增加快于 sham 组, 而在 E2 组其体重增加与 sham 组体重增加相当 (图 12 a), 这是因为去势后引起体内雌激素失衡不能发挥有效的调控功能, 而引起脂肪组织增加所致。在连续灌胃 3 个月后, 对每组实验大鼠的子宫进行了取材。发现 OVX 组和 3HB 灌胃组大鼠的子宫呈现出明显的萎缩状态, 给予 E2 组的子宫萎缩有所改善, 而 sham 组大鼠子宫则呈现出正常形态 (图 12 b)。此外, OVX 组和 3HB 灌胃组大鼠的子宫重量也显著低于 sham 组和 E2 组 (图 12 c)。以上实验数据说明去势大鼠骨质疏松模型建立成功, 为后续研究 3HB 调控骨再生奠定了基础。

小动物 micro-CT 扫描发现, 在给予去势大鼠连续 3 个月 3HB 灌胃后, 不同剂量的 3HB 在一定程度上表现出减缓去势大鼠骨量的丢失 (图 13 a)。与 OVX 组相比, 当给予去势大鼠低剂量 (30 mg/kg/d) 和中剂量 (150 mg/kg/d) 3HB 时, 则显著提高了骨密度 (BMD), 骨体积分数线 (BV/TV) 以及骨体积 (BV) (图 13 b-d)。然而在中剂量 3HB 灌胃组中骨小梁数量 (Tb.N) 表现最多, 显著多于 OVX 组 (图 13 f)。虽然组织体积 (TV) 在各组之间没有表现出统计学差异, 但与 OVX 组相比, 也有不同程度增加 (图 13 e)。此外, 骨小梁间距 (Tb.Sp) 在给予不同剂量的 3HB 后也发生不同程度降低 (图 13 g)。

胫骨组织切片硝酸银染色发现, 骨小梁数量在给予不同剂量 3HB 后多于 OVX 组, 而不同剂量 3HB 组之间骨小梁数量并没有明显差异性 (图 14 a), 而给予 E2 治疗后, 其骨小梁数量得到很大程度的恢复, 但是其骨小梁数量还是低于假手术组, 这一现象也可以从 micro-CT

定量分析结果看出（图 14 f）。随后在体内进行了钙黄绿素/二甲酚橙双荧光标记来分析骨组织再生速率和矿化能力（图 14 b）。研究发现，在给予不同剂量 3HB 组，钙黄绿素/二甲酚橙双荧光标记周长百分数均高于 OVX 组，且中剂量和高剂量 3HB 的钙黄绿素/二甲酚橙双荧光标记周长百分数与 OVX 组相比具有统计学差异；然而不同剂量 3HB 组、sham 组和 E2 之间钙黄绿素/二甲酚橙双荧光标记周长百分数并无差异性（图 14 c）。另外，在骨矿化沉积率（MAR）和骨形成率（BFR/BS）也表现出类似的结果。与 OVX 组相比，低剂量和中剂量 3HB 处理组则表现出显著的 MAR 和 BFR/BS（图 14 d, e）。然而，E2 治疗组则表现出最高的 MAR 和 BFR/BS，sham 组的 MAR 和 BFR/BS 则维持在一个正常的水平。

^{13}C 标记 3HB 示踪实验结果表明，在低剂量 ^{13}C 标记 3HB 灌胃组，LC-MS/MS 检测到了骨组织中存在 ^{13}C 标记的柠檬酸和 α -酮戊二酸（图 15 a, b）。同时，测定了骨组织中的柠檬酸含量，发现 3HB 提高了骨组织中柠檬酸的含量（图 15 c）。此外，血清学检测发现生物能量活性物质 3HB 能够提高血清中柠檬酸的含量（图 15 d）；然而并没有发现血清中钙含量发生显著改变（图 15 e）。因此，去势大鼠骨量减少有可能并不是血清中的钙含量降低引起的，而有可能是骨中柠檬酸含量的减少而不能有效结合钙磷而造成的。

以上实验结果表明，P34HB 降解产生的生物能量活性物质 3HB 能够提高体内骨矿化率和骨形成率，降低骨质疏松大鼠骨量的丢失，并柠檬酸的形式参与骨形成，改善骨质疏松症状。

实验例 4

上述实验例表明 P34HB 降解产生的生物能量活性物质 3HB 能够促进 hBMSCs 增殖，介导线粒体氧化磷酸化促进成骨分化，并以 TCA 循环中间代谢物柠檬酸的形式参与骨再生。因此，P34HB 是一种优异的骨再生候选材料，在骨组织工程再生领域展现出巨大的应用潜力。骨损伤的修复是由生物能量驱动干/祖细胞、血管内皮细胞等多种细胞发生增殖、迁移及分化的病理和生理过程，其通过复杂的信号调控网络使得骨再生和血管生成得以有序进行。欲使大段骨缺损得以尽快再生和功能重建，必须尽早在移植物与周围组织之间建立起完善的血管网络，为骨再生提供所需要的氧气和营养物质。本实验例以 3D 打印 P34HB 生物能量支架为媒介，体外以人脐静脉融合细胞（EA.hy926）为细胞模型，体内以大鼠颅骨临界性骨缺损为动物模型，探究 P34HB 生物能量支架促进血管化骨再生的作用与功能。

一、实验方法与步骤

（一）P34HB降解产生的生物能量活性物质3HB对EA.hy926细胞迁移的影响

（1）EA.hy926 细胞按照 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 密度接种于 6 孔板中，放入细胞培养箱进行培养；

- (2) 当细胞生长融合度接近 100%，移除培养基并用 PBS 漂洗 3 次；
- (3) 用 200 μ l 枪头沿着板孔中央划线，PBS 漂洗 3 次，洗去划掉的细胞；
- (4) 用含有不同浓度 3HB 的无糖培养基（含 1% FBS）分别处理细胞 10 h 和 20 h；
- (5) 在设定的时间点，显微镜观察细胞的迁移情况，并拍照；
- (6) 用 ImagJ 软件对细胞迁移进行定量分析。

(二) P34HB降解产生的生物能量活性物质3HB对EA.hy926细胞微血管形成的影响

- (1) 事先将基质胶（Matrigel matrix）放在 4℃ 冰箱过夜解冻，并准备预冷的枪头和血管生成小室；
- (2) 向血管生成小室中加入解冻的基质胶，按照每孔 10 μ l 体积，放入细胞培养箱 30 min；
- (3) 制备密度为 3×10^5 /ml 的 EA.hy926 细胞悬液，按照 50 μ l 体积/孔加入到血管生成小室；
- (4) 在设定的时间点内（6 h），用钙黄绿素对形成的微血管网络进行染色，并拍照；
- (5) 用 ImagJ 软件对形成的微血管网络进行定量分析。

(三) 建立大鼠颅骨临界性骨缺损模型

本实验使用雄性 SD 大鼠（10 周龄），购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。所有实验大鼠饲养于中国科学院深圳先进技术研究院动物中心（SPF），本论文动物实验经过中国科学院深圳先进技术研究院伦理审查委员会批准（SIAT-IACUC-201010-KYC-ZP-A1416）。SD 大鼠颅骨临界性骨缺损建立过程（图 16）及步骤如下：手术均在 3.5% 异氟烷-100% 氧气呼吸麻醉下进行，同时有保温及防脱水处理，包括呼吸麻醉管道中加蒸馏水及术前皮下推注生理盐水（500 μ l）。动物麻醉后，用碘酊及 75% 酒精对手术部位皮肤进行消毒处理，沿矢状缝在头顶皮肤作约 10 mm 切口以暴露左侧顶骨，用无菌棉签将骨膜推开，用安装有圆锯的高速牙医钻在生理盐水散热下移除直径 5 mm 的颅骨，移除骨片时不能损伤硬脑膜。给予不同实验处置后，恢复颅骨膜、头部皮肤位置，缝合皮肤。

(四) 动物分组及支架移植

大鼠颅骨临界性骨缺损模型随机分为三组，每组 6 只，A 组：骨缺损处不做任何处理组（Empty）；B 组：PLLA 支架移植组（PLLA）；C 组：P34HB 支架移植组（P34HB）。支架移植后，给予正常的饲料和水。

（五）高分辨双光子活体显微成像检测骨缺损部位血管生成

术后 12 周，利用课题组前期建立的双光子显微成像技术，活体监测和定量在骨缺损修复过程中血管发生、发展的动态变化过程，包括血管生成数目、血管管径、血管密度、血管形态等的变化情况。实验中为了进一步提高颅骨内血管的荧光信号对比度，给大鼠尾静脉注射 300 μ l, 2 mg/ml 的 FITC-Dextran。每张成像图片的像素为 256 $\times$ 256，图片的大小为 512 μ m $\times$ 512 μ m，获取每张图像耗时为 8s。首先对准焦距找到清晰成像部位，先进行 X-Y 平面成像，然后适度调节焦距，沿 Z 轴方向进一步扫描成像，扫描深度为 200 μ m。评价 P34HB 支架在骨再生过程中偶联血管生成的能力。

（六）Micro-CT分析P34HB支架对缺损部位骨再生的影响

术后 12 周，利用 micro-CT 分析骨缺损部位骨再生情况，包括骨密度（BMD）、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 等骨相关指标，评估 P34HB 支架修复骨缺损的效率。

（七）统计学分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件对所测得数据进行统计分析。数据采用单因素方差分析（one-way ANOVA）或者 T 检验进行分析。结果用均数 $\pm$ 标准差(SD)表示。 $*P < 0.05$ 代表在统计学上具有差异性。

二、结果与讨论

（一）P34HB降解产生的生物能量活性物质3HB促进EA.hy926细胞迁移

骨再生是一个涉及多种细胞参与的复杂生理过程，细胞迁移对组织再生具有重要的调控作用。骨再生过程中，血管内皮细胞的迁移将有利于促进骨缺损组织再生与功能重建。细胞划痕实验表明，与对照组相比，不同浓度的 3HB 在处理 EA.hy926 细胞 10 h 后，均在一定程度上表现出细胞迁移的促进作用；当 3HB 处理 EA.hy926 细胞 20 h 后，这种促进迁移的能力进一步提高，其中 1.0 mM 3HB 则表现出显著的促进 EA.hy926 细胞迁移能力（图 17）。以上实验表明，P34HB 降解产生的生物能量活性物质 3HB 能够促进骨再生过程中细胞的迁移，参与组织的再生与修复。

（二）P34HB降解产生的生物能量活性物质3HB促进EA.hy926细胞微血管网络形成

骨组织再生是一种基于成骨和血管生成相互作用的复杂过程。血管形成是骨形成、骨骼发育和骨整合过程中必不可少的一部分，是细胞存活和发挥功能的前提。由于缺损部位正常血管网络功能受到破坏，无法为组织再生提供必需的生长因子和营养物质，从而阻碍了组织再生与功能修复。具有血管化功能的生物支架将有利于骨缺损组织再生与功能重建。血管的

发生与发展过程同样是一个能量消耗的事件。生物能量（ATP）的产生有利于生物支架发生血管化。体外微血管形成实验表明，与对照组相比，P34HB 降解产生的生物能量活性物质 3HB 处理 EA.hy926 细胞 6 h 后，观察到较多的微血管网络形成（图 18 a）。ImageJ 进一步定量分析发现，EA.hy926 细胞经过生物能量活性物质 3HB 处理后，显著提高了微血管分支点形成数量（Branch points）和微血管形成连接程度（Junctions）（图 18 b, d）。虽然在微血管网孔形成数量（Number of meshes）方面，0.5 mM 3HB 处理后，并未表现出显著性差异，但是在一定程度上提高了网孔形成数量（图 18 c）。以上实验结果表明，34HB 降解产生的生物能量活性物质 3HB 能够促进血管内皮细胞的迁移和微血管网络形成，初步表明 P34HB 支架材料具有血管化潜能。

（三）P34HB 生物能量支架促进血管化骨形成修复大鼠颅骨临界性骨缺损

理想的骨修复材料不仅需要具备骨诱导再生能力，而且还需要满足能够早期血管化要求。没有血管化能力的骨移植材料，会导致移植物因缺血而发生坏死。上述研究表明，P34HB 生物能量支架具有血管化功能。为了探究 P34HB 生物能量支架的血管化潜能，以大鼠颅骨临界性骨缺损为模型，利用高分辨双光子活体显微镜观察骨再生过程中偶联血管生成情况。术后 12 周，双光子活体显微成像观察发现，支架移植组都表现出较多的血管生成，然而 P34HB 支架移植组血管密度明显多于 PLLA 支架移植组；Empty 组几乎没有血管生成（图 19 a）。ImageJ 定量分析进一步支持了上述所观察到的现象（图 19 b），表明 P34HB 能够促进骨再生过程中血管再生。

双光子活体显微成像表明，P34HB 生物能量支架能够促进骨缺损部位血管生成。随后，利用小动物 micro-CT 分析支架移植后骨再生情况。Micro-CT 观察发现，移植 P34HB 支架的大鼠颅骨骨缺损部位被大量新生骨组织所填充，而空白对照组(Empty)和 PLLA 支架移植组的骨缺损部位仅观察到少量的新生骨组织出现。Micro-CT 定量分析发现，P34HB 支架移植组其骨缺损部位的 BMD、BV/TV、TV、BV、Tb.Th 值显著高于空白对照组和 PLLA 支架移植组，而空白对照组和 PLLA 支架移植组两者之间并无显著性差异。然而，Tb.N 在空白对照组、PLLA 支架移植组以及 P34HB 支架移植组均无显著差异。（图 20）

以上实验结果表明，P34HB 生物能量支架能够在骨再生过程中偶联血管生成，促进血管化骨形成修复临界性骨缺损并实现功能重建。

权 利 要 求 书

1、一种生物能量活性材料，其特征在于，所述生物能量活性材料为生物可降解聚合物；所述生物能量活性材料的降解产物为三羧酸循环和/或糖酵解途径中的代谢中间产物；

或者所述生物能量活性材料的降解产物为能够转换生成三羧酸循环和/或糖酵解途径中代谢中间产物的聚合物单体；

或者所述生物能量活性材料的降解产物为能够转换生成乙酰辅酶 A 的聚合物单体。

2、根据权利要求 1 所述的生物能量活性材料，其特征在于，所述三羧酸循环的代谢中间产物包括柠檬酸、顺乌头酸、异柠檬酸、草酰琥珀酸、 α -酮戊二酸、琥珀酰辅酶 A、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸和三磷酸腺苷中的一种以上；

所述糖酵解途径的代谢中间产物包括葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸、果糖-1,6-二磷酸、3-磷酸甘油醛、磷酸二羟丙酮、1,3-二磷酸甘油酸、3-磷酸甘油酸、2-磷酸甘油酸、磷酸烯醇式丙酮酸 PEP 和丙酮酸中的一种以上；

所述能够转换生成乙酰辅酶 A 的聚合物单体为 3-羟基丁酸。

3、根据权利要求 1 所述的生物能量活性材料，其特征在于，所述生物能量活性材料为降解产物为 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯。

4、根据权利要求 3 所述的生物能量活性材料，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

5、权利要求 1-4 任一项所述的生物能量活性材料在骨组织再生及修复领域中的应用。

6、权利要求 1-4 任一项所述的生物能量活性材料在制备骨组织修复多孔支架中的应用。

7、一种骨组织修复多孔支架，由权利要求 1-4 任一项所述的生物能量活性材料制备得到。

8、一种骨组织修复 3D 多孔支架的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 合成权利要求 1-4 任一项所述的生物能量活性材料；

(2) 结合 3D 打印技术制备骨组织修复 3D 多孔支架。

9、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述生物能量活性材料通过微生物法或化学合成法合成。

10、权利要求 8 或 9 所述制备方法制备的骨组织修复 3D 多孔支架。

11、降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯作为兼具骨组织再生及血管生成功能的生物能量活性材料的应用，其特征在于，所述 3-羟基丁酸通过三羧酸代谢循环并以柠檬酸形式参与骨形成，所述 3-羟基丁酸诱导血管生成。

12、根据权利要求 11 所述的应用，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-

羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

13、降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯在制备血管化骨再生材料中的应用。

14、根据权利要求 13 所述的应用，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

15、降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯在制备大段骨缺损修复材料或临界型骨缺损修复材料中的应用。

16、根据权利要求 15 所述的应用，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

17、一种血管化骨再生材料、大段骨缺损修复材料或临界型骨缺损修复材料，其特征在于，由降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯制备得到。

18、根据权利要求 17 所述的材料，其特征在于，所述材料为由降解产物包括 3-羟基丁酸的聚羟基脂肪酸酯制备得到的多孔支架。

19、根据权利要求 17 所述的材料，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯包括 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯、聚-3-羟基丁酸酯、3-羟基丁酸-3-羟基戊酸共聚酯和 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯中的一种以上。

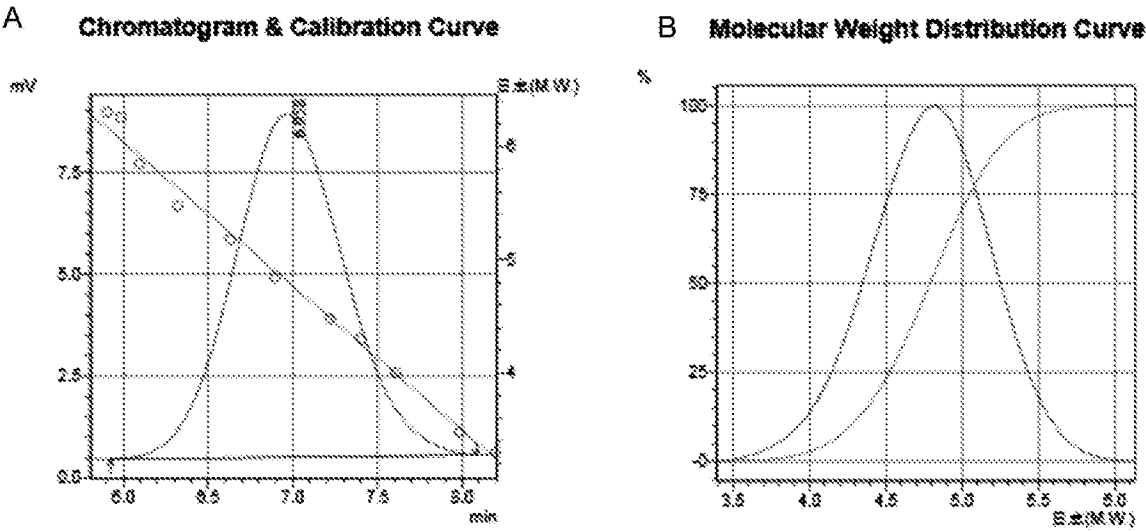


图 1

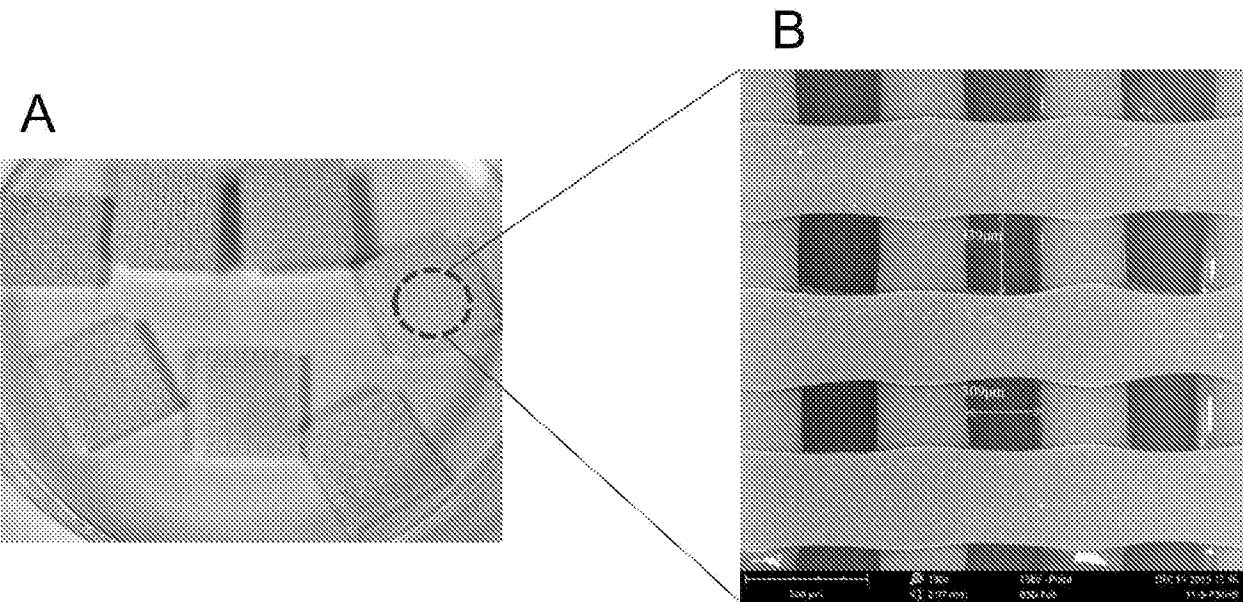


图 2

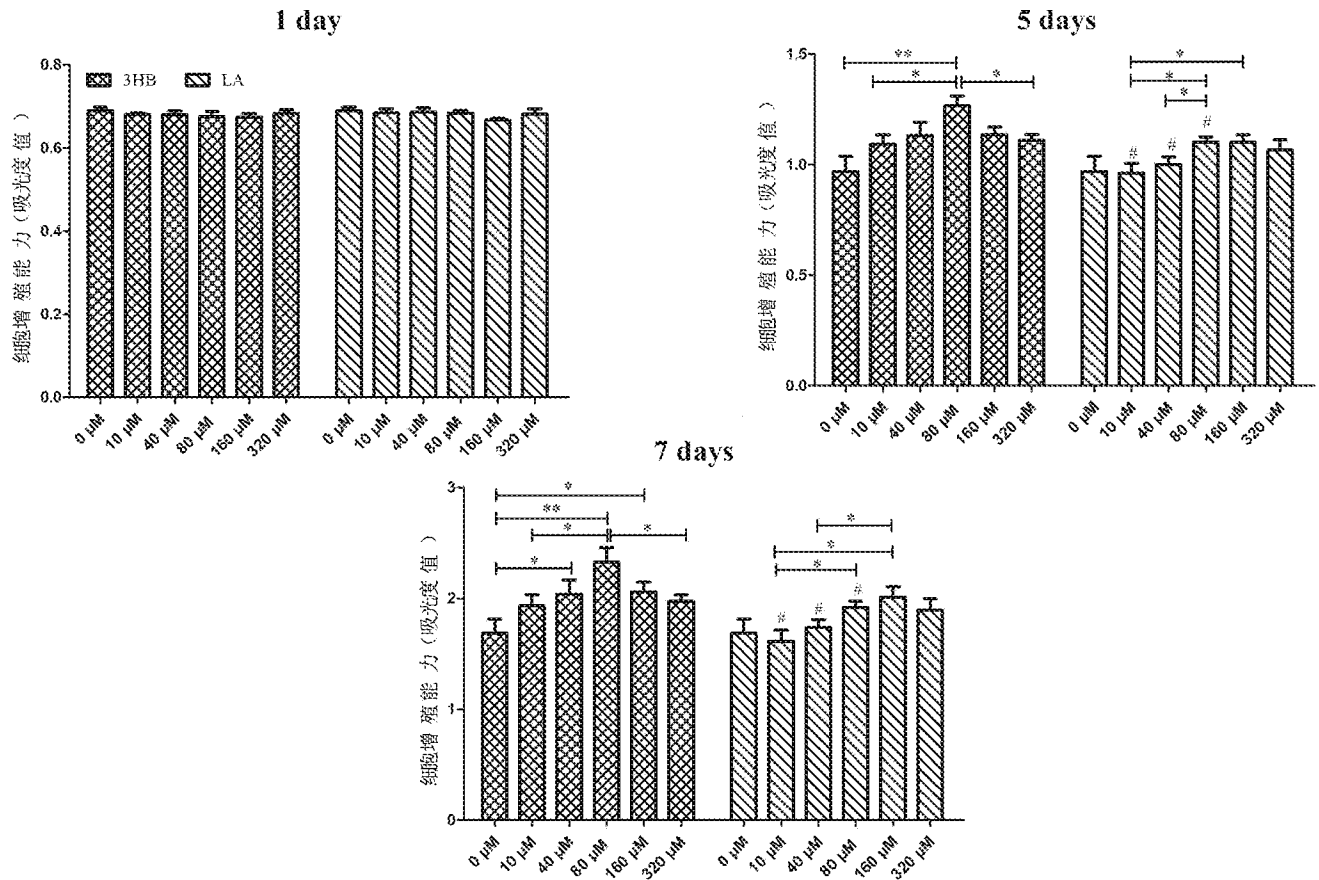


图 3

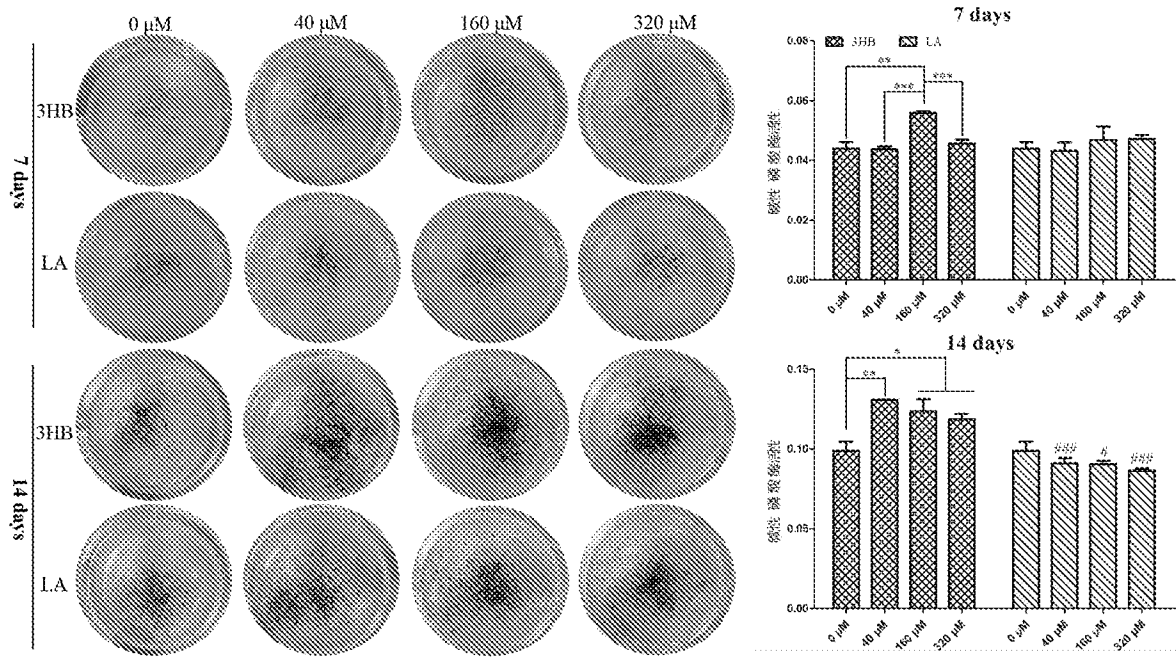


图 4

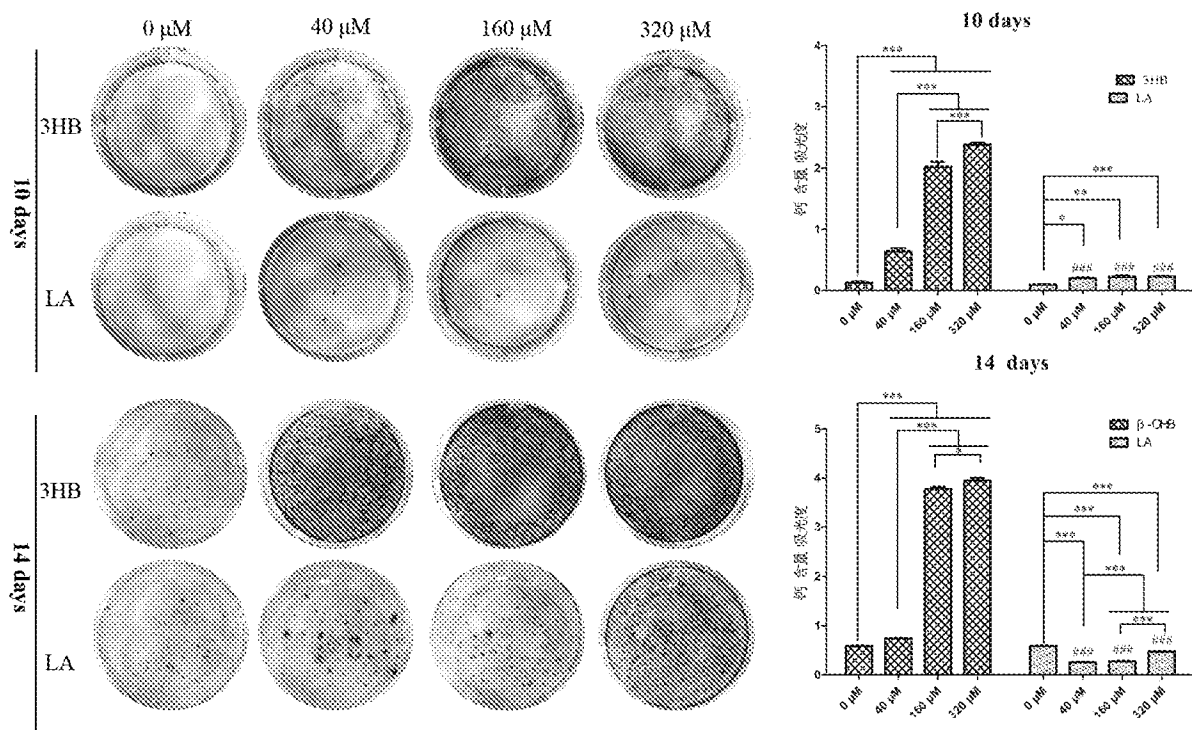


图 5

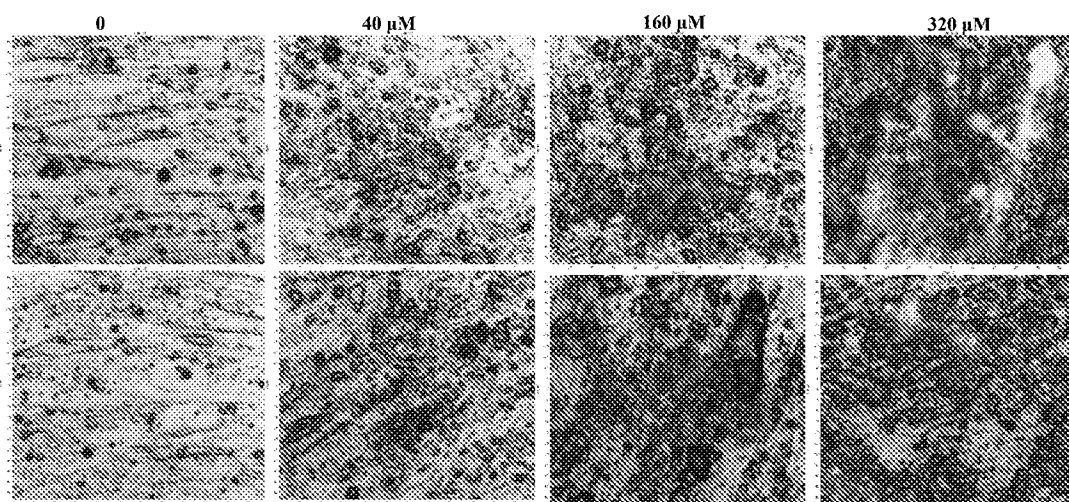


图 6

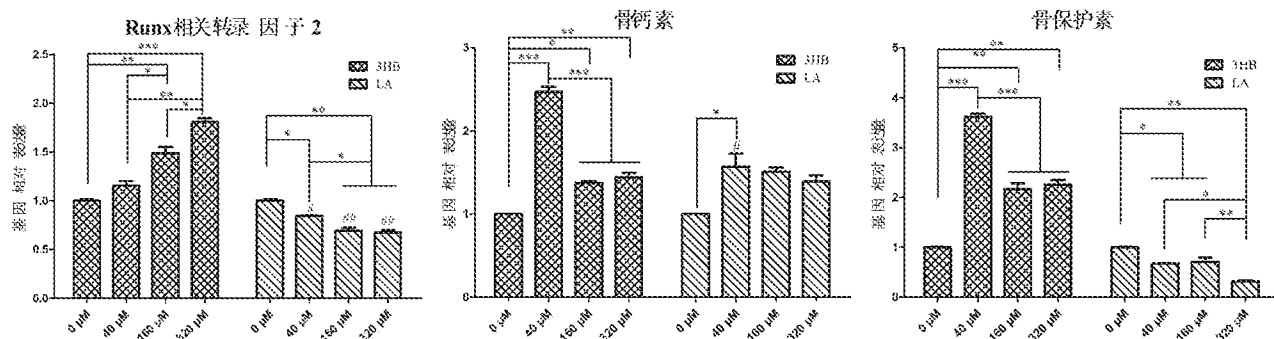


图 7

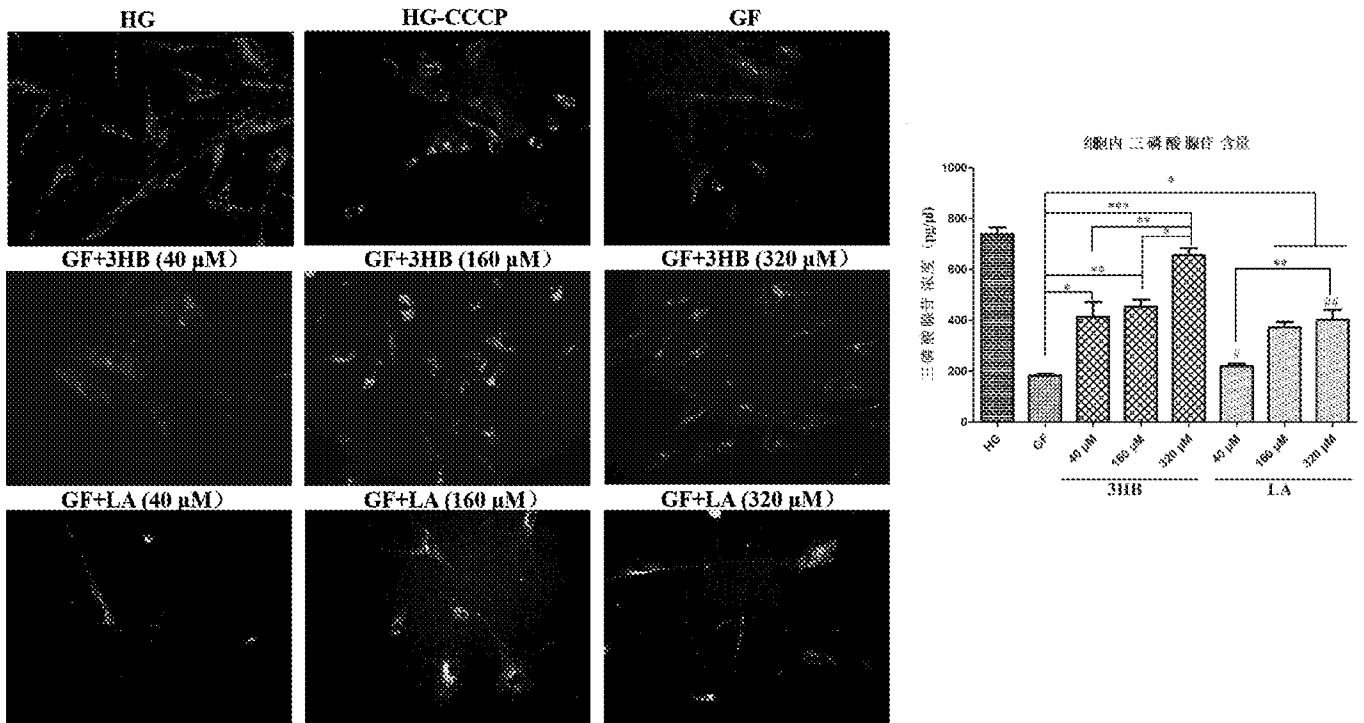


图 8

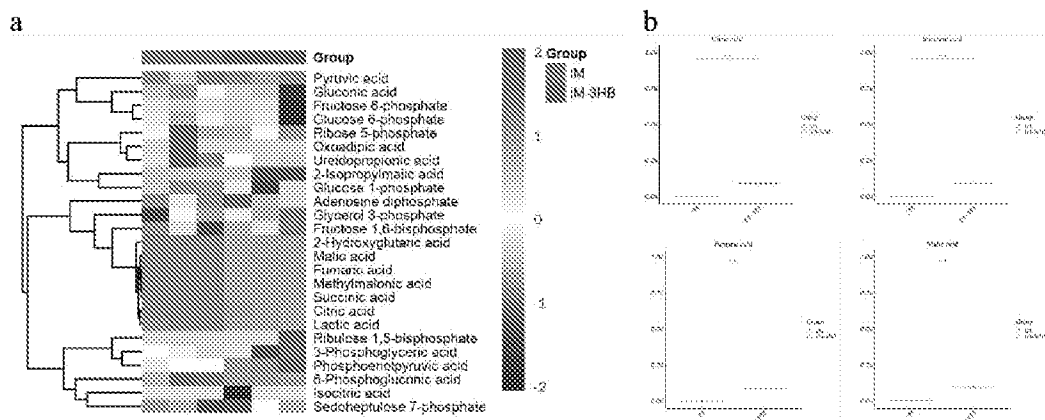


图 9

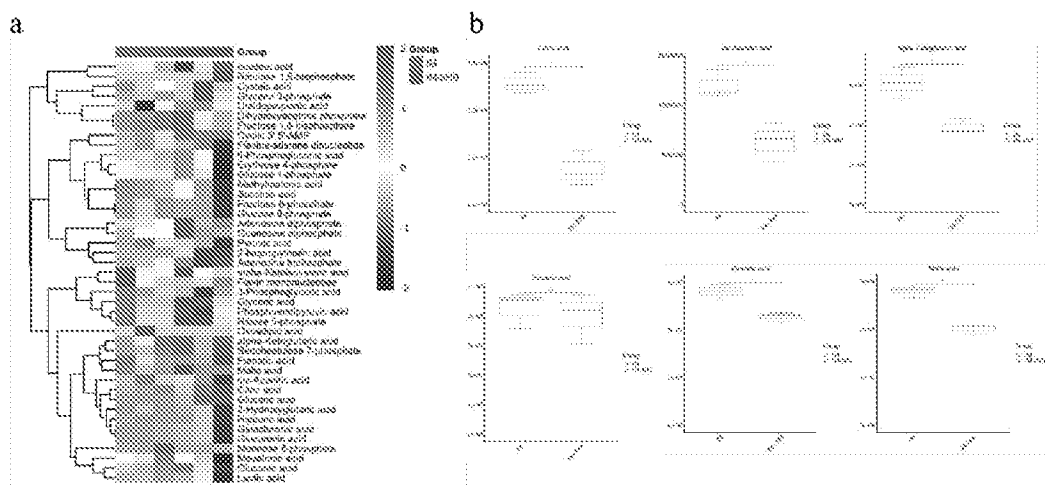


图 10

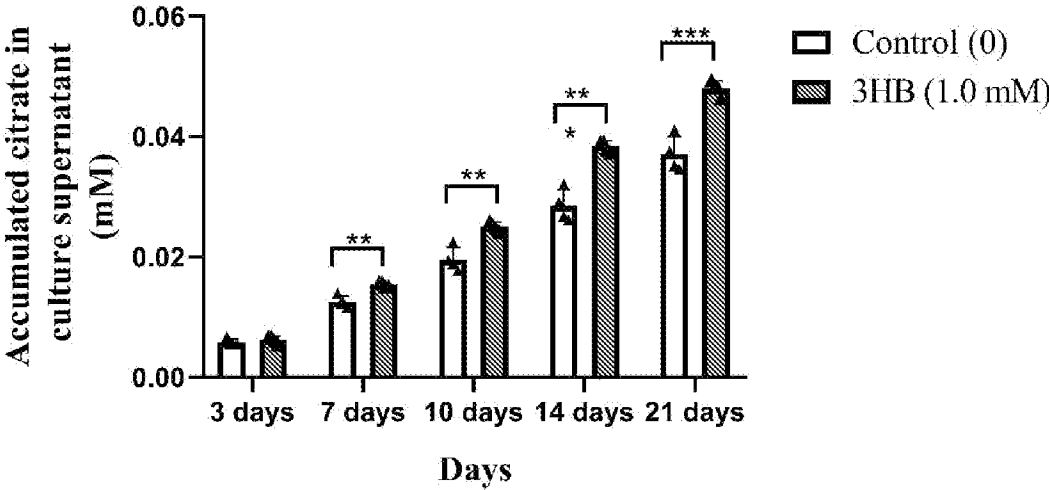


图 11

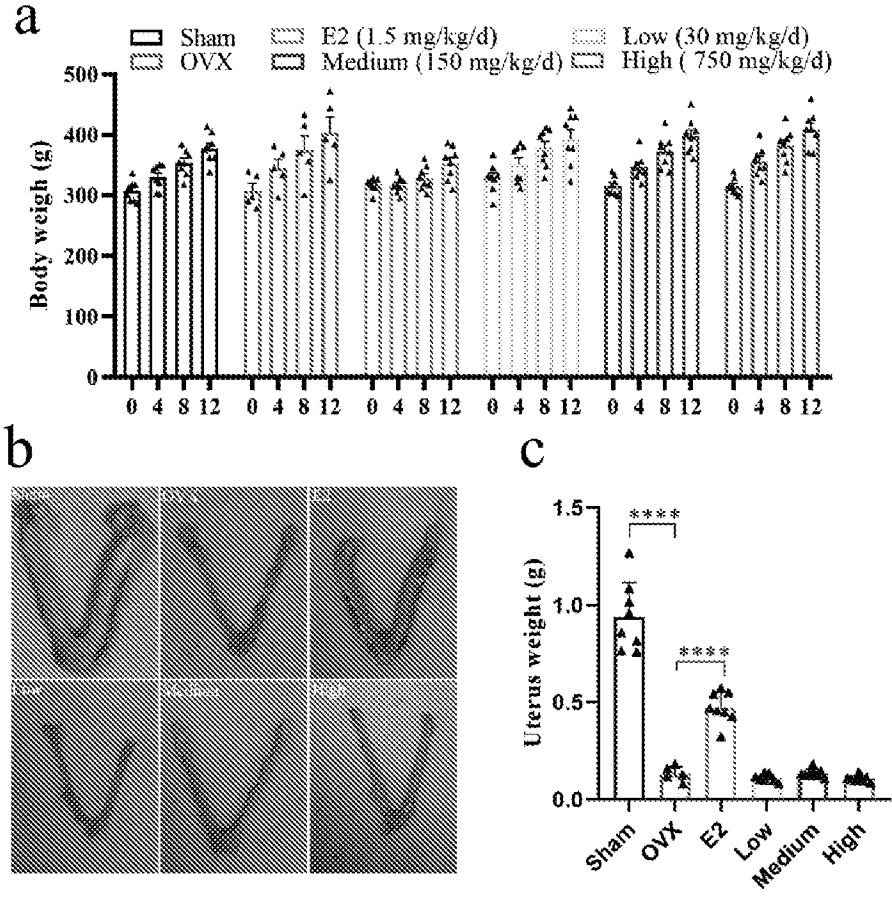


图 12

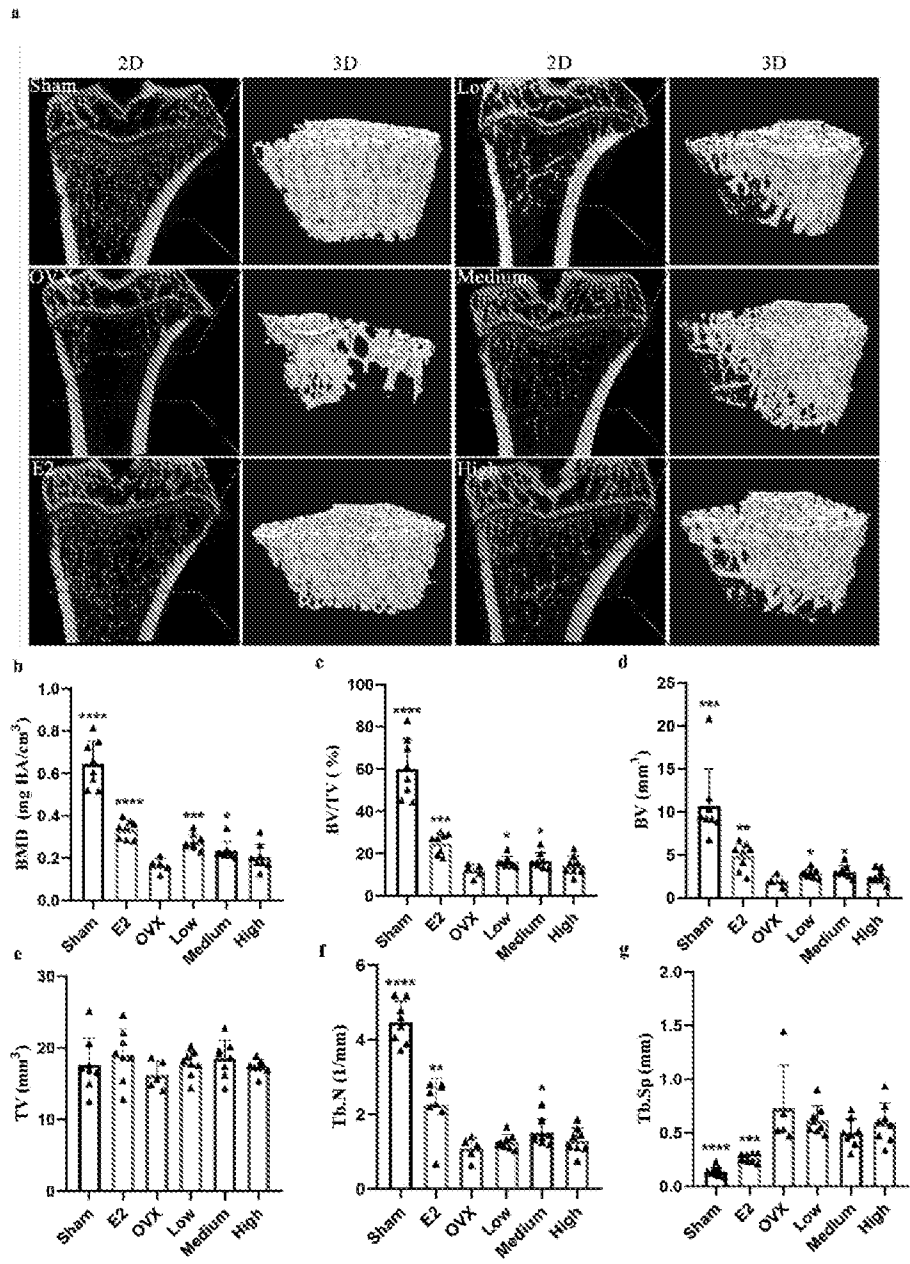


图 13

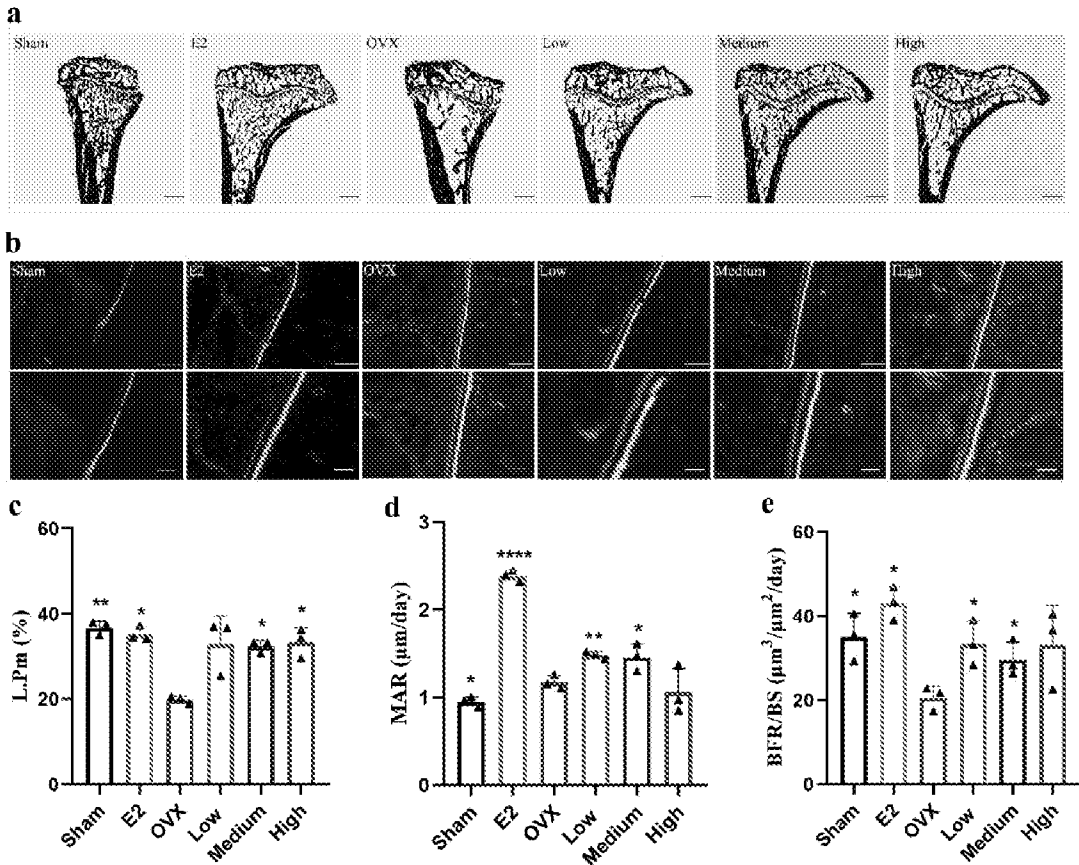


图 14

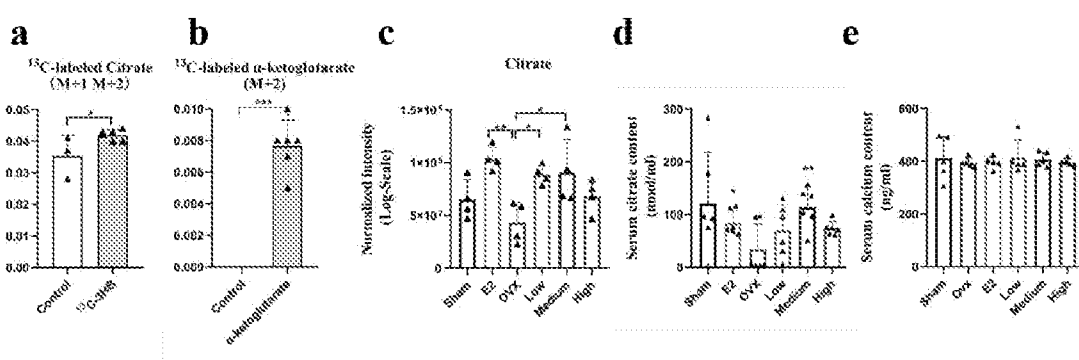


图 15

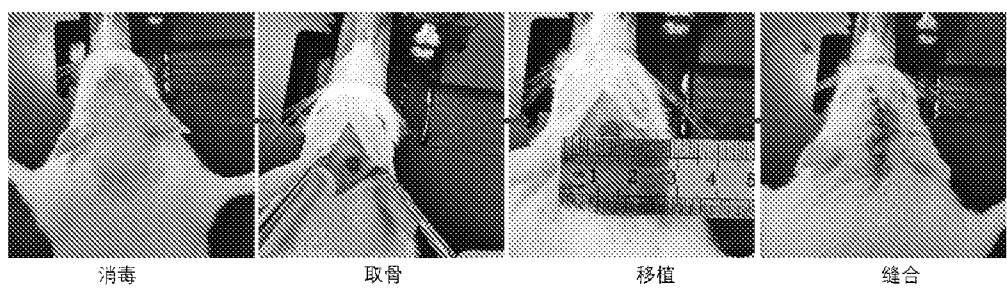


图 16

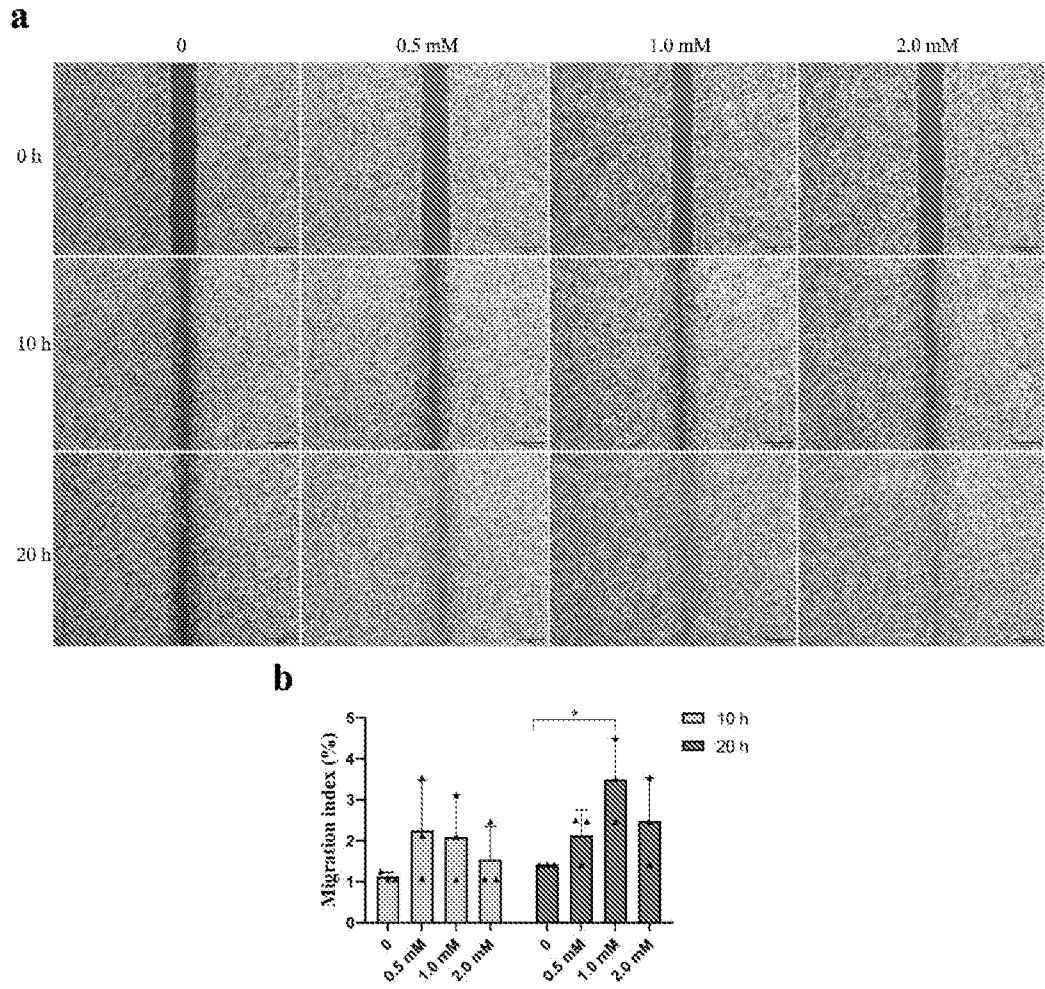


图 17

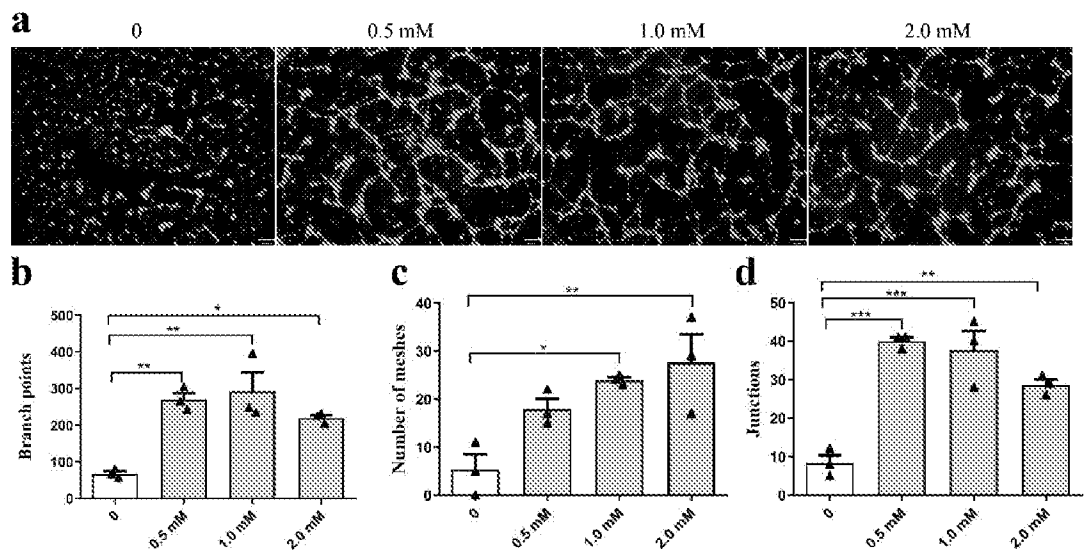


图 18

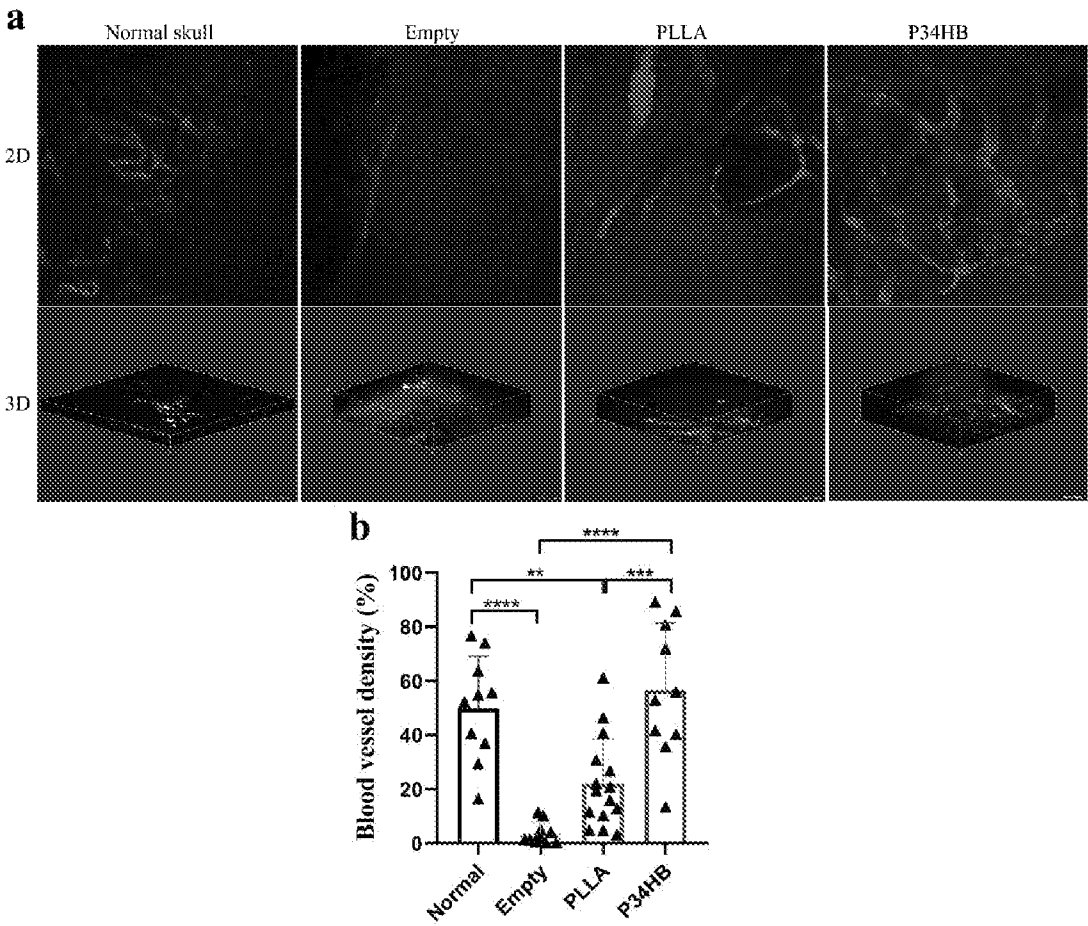


图 19

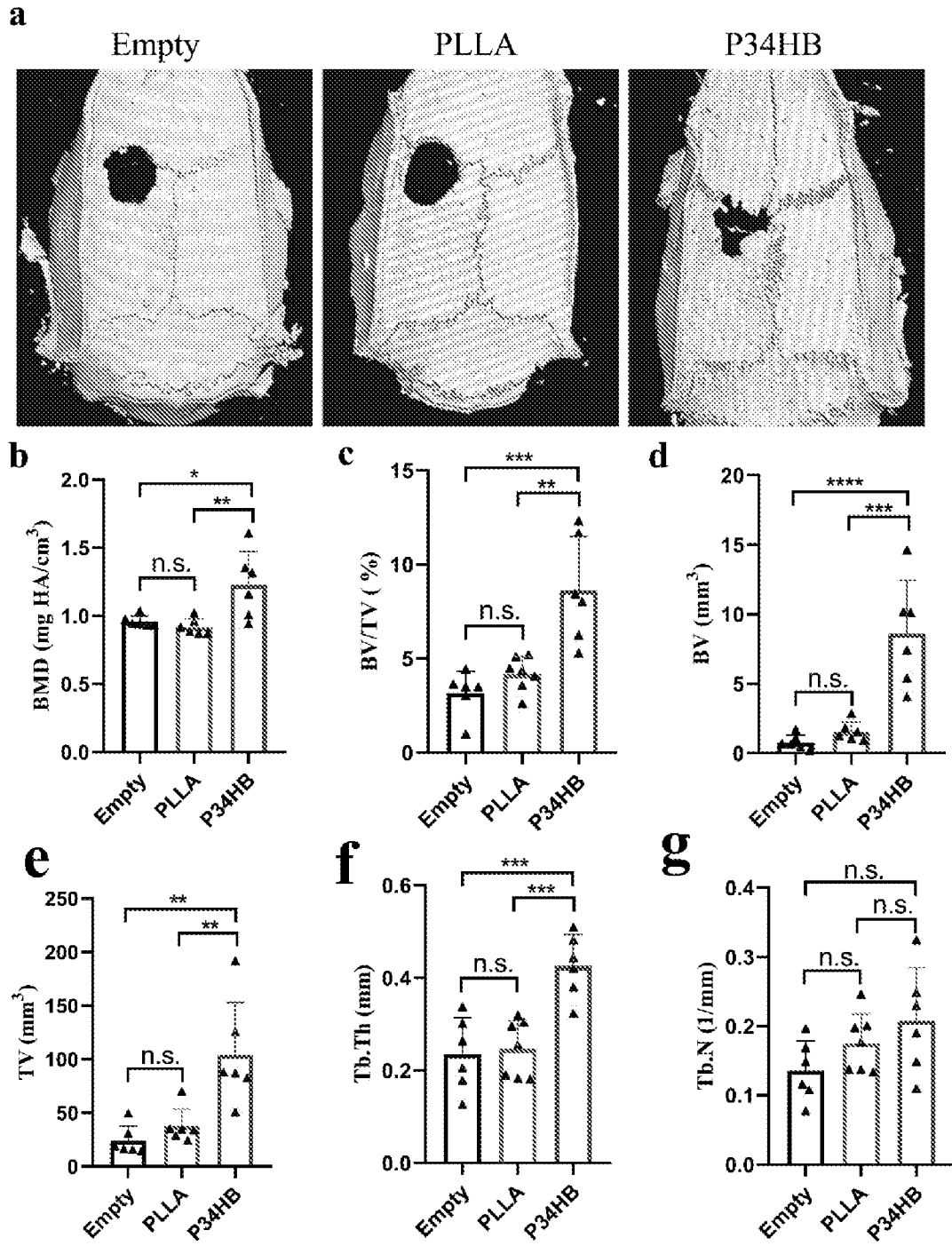


图 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/109458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/18(2006.01)i; A61L 27/56(2006.01)i; A61L 27/50(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)

A61L

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)

CNTEXT, WPABSC, WPABS, DWPI, ENTXT, CNKI: 生物可降解, 聚合物, 共聚物, 三羧酸循环, 糖醇解, 柠檬酸, 顺乌头酸, 异柠檬酸, 草酰琥珀酸, 酮戊二酸, 琥珀酰辅酶, 琥珀酸, 延胡索酸, 苹果酸, 三磷酸腺苷, 葡萄糖, 磷酸, 果糖, 磷酸甘油醛, 磷酸二羟丙酮, 二磷酸甘油酸, 磷酸甘油酸, 磷酸烯醇式丙酮酸, 丙酮酸, 羟基丁酸, 聚羟基脂肪酸酯, 3D打印, 骨, 血管, biodegradable, polymer, biopolymer, tricarboxylic acid cycle, glycolysis, citric acid, aconitate, isocitric acid, oxalosuccinic acid, oxoglutarate, succinyl coa, succinic acid, fumaric acid, malic acid, triphosadenine, glucose, phosphoric acid, fructose, phosphogl yceraldehyde, dihydroxyacetone phosphate, diphosphoglycerate, phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvic acid, pyruvic acid, hydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoate, 3D-printing, bone, blood vessel

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113546213 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) 26 October 2021 (2021-10-26) claims 1-10	1-19
X	CN 102936407 A (HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 20 February 2013 (2013-02-20) description, paragraphs [0010]-[0011] and [0020]-[0022]	1-10
X	RU 2708396 C1 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BYUDZHETNOE UCHREZHDENIE NAUKI INST VYSOKOMOLEKULYARNYKH SOEDINENIJ ROSSI) 06 December 2019 (2019-12-06) claim 1, and description, page 6, lines 39-40	1-19
Y	CN 112773940 A (SHENZHEN CREALITY 3D TECHNOLOGY CO., LTD.) 11 May 2021 (2021-05-11) description, paragraphs 9, 17 and 99	1-19



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

21 October 2022

Date of mailing of the international search report

27 October 2022

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/109458

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	冯静等 (FENG, Jing et al.). "几种高分子材料的生物降解研究进展 (Research Progress on Biodegradation of Several Polymer Materials)" <i>塑料科技 (Plastics Science and Technology)</i> , 28 February 2011 (2011-02-28), page 96, left-hand column, paragraph 2	1-19
A	CN 109676915 A (FUDAN UNIVERSITY) 26 April 2019 (2019-04-26) entire document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/109458

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	113546213	A	26 October 2021	None	
CN	102936407	A	20 February 2013	None	
RU	2708396	C1	06 December 2019	None	
CN	112773940	A	11 May 2021	None	
CN	109676915	A	26 April 2019	None	

A. 主题的分类 A61L 27/18(2006.01)i; A61L 27/56(2006.01)i; A61L 27/50(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) A61L 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)) CNTXT, WPABSC, WPABS, DWPI, ENTXT, CNKI:生物可降解, 聚合物, 共聚物, 三羧酸循环, 糖酵解, 柠檬酸, 顺乌头酸, 异柠檬酸, 草酰琥珀酸, 酮戊二酸, 琥珀酰辅酶, 琥珀酸, 延胡索酸, 苹果酸, 三磷酸腺苷, 葡萄糖, 磷酸, 果糖, 磷酸甘油醛, 磷酸二羟丙酮, 二磷酸甘油酸, 磷酸甘油酸, 磷酸烯醇式丙酮酸, 丙酮酸, 羟基丁酸, 聚羟基脂肪酸酯, 3D打印, 骨, 血管, biodegradable, polymer, biopolymer, tricarboxylic acid cycle, glycolysis, citric acid, aconitate, isocitric acid, oxalosuccinic acid, oxoglutarate, succinyl coa, succinic acid, fumaric acid, malic acid, triphosadenine, glucose, phosphoric acid, fructose, phosphoglyceraldehyde, dihydroxyacetone phosphate, diphosphoglycerate, phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvic acid, pyruvic acid, hydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoate, 3D-printing, bone, blood vessel																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 113546213 A (深圳先进技术研究院) 2021年10月26日 (2021 - 10 - 26) 权利要求1-10</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102936407 A (华中科技大学) 2013年2月20日 (2013 - 02 - 20) 说明书第[0010]-[0011], [0020]-[0022]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>RU 2708396 C1 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BYUDZHETNOE UCHREZHDENIE NAUKI INST VYSOKOMOLEKULYARNYKH SOEDINENIY ROSSI) 2019年12月6日 (2019 - 12 - 06) 权利要求1, 说明书第6页第39-40行</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112773940 A (深圳市创想三维科技有限公司) 2021年5月11日 (2021 - 05 - 11) 说明书第9、17、99段</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>冯静等. “几种高分子材料的生物降解研究进展” 塑料科技, 2011年2月28日 (2011 - 02 - 28), 第96页左栏第2段</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 113546213 A (深圳先进技术研究院) 2021年10月26日 (2021 - 10 - 26) 权利要求1-10	1-19	X	CN 102936407 A (华中科技大学) 2013年2月20日 (2013 - 02 - 20) 说明书第[0010]-[0011], [0020]-[0022]段	1-10	X	RU 2708396 C1 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BYUDZHETNOE UCHREZHDENIE NAUKI INST VYSOKOMOLEKULYARNYKH SOEDINENIY ROSSI) 2019年12月6日 (2019 - 12 - 06) 权利要求1, 说明书第6页第39-40行	1-19	Y	CN 112773940 A (深圳市创想三维科技有限公司) 2021年5月11日 (2021 - 05 - 11) 说明书第9、17、99段	1-19	Y	冯静等. “几种高分子材料的生物降解研究进展” 塑料科技, 2011年2月28日 (2011 - 02 - 28), 第96页左栏第2段	1-19
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 113546213 A (深圳先进技术研究院) 2021年10月26日 (2021 - 10 - 26) 权利要求1-10	1-19																		
X	CN 102936407 A (华中科技大学) 2013年2月20日 (2013 - 02 - 20) 说明书第[0010]-[0011], [0020]-[0022]段	1-10																		
X	RU 2708396 C1 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BYUDZHETNOE UCHREZHDENIE NAUKI INST VYSOKOMOLEKULYARNYKH SOEDINENIY ROSSI) 2019年12月6日 (2019 - 12 - 06) 权利要求1, 说明书第6页第39-40行	1-19																		
Y	CN 112773940 A (深圳市创想三维科技有限公司) 2021年5月11日 (2021 - 05 - 11) 说明书第9、17、99段	1-19																		
Y	冯静等. “几种高分子材料的生物降解研究进展” 塑料科技, 2011年2月28日 (2011 - 02 - 28), 第96页左栏第2段	1-19																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> “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 </td> </tr> </table>			* 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																
* 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																		
2022年10月21日		2022年10月27日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员																		
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		赵洁 电话号码 62084695																		

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 109676915 A (复旦大学) 2019年4月26日 (2019 - 04 - 26) 全文	1-19

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/109458

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	113546213	A	2021年10月26日	无	
CN	102936407	A	2013年2月20日	无	
RU	2708396	C1	2019年12月6日	无	
CN	112773940	A	2021年5月11日	无	
CN	109676915	A	2019年4月26日	无	