(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 11 月 17 日 (17.11.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/237002 A1

(51) 国际专利分类号:
A61L 27/38 (2006.01) *B33Y 70/10* (2020.01)
A61L 27/22 (2006.01) *B33Y 80/00* (2015.01)
A61L 27/24 (2006.01) *B33Y 10/00* (2015.01)
A61L 27/50 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/113652

(22) 国际申请日: 2021 年 8 月 20 日 (20.08.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110526911.8 2021年5月14日 (14.05.2021) CN

(71) 申请人: 清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市100084信箱82分箱清华大学专利办公室, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 方永聪 (FANG, Yongcong); 中国北京市海淀区清华大学李兆基科技大楼A610, Beijing 100084 (CN)。 熊卓 (XIONG, Zhuo); 中国北京市海淀区清华大学李兆基科技大楼A610, Beijing 100084 (CN)。 张婷 (ZHANG, Ting); 中国北京市海淀区清华大学李兆基科技大楼A610, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI&PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。

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

(54) **Title:** GEL MICROSPHERE-BASED 3D PRINTING BIO-INK AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种基于凝胶微球的3D打印生物墨水及其应用

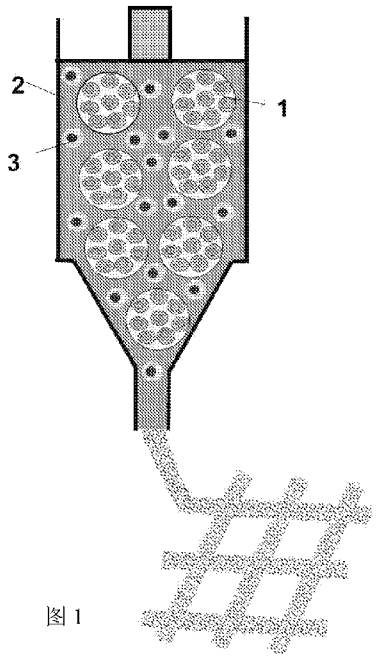


图 1

(57) **Abstract:** Disclosed are a gel microsphere-based 3D printing bio-ink and an application thereof. The 3D printing bio-ink is formed from cross-linked, cell-loaded gel microspheres, or is obtained by mixing cross-linked, cell-loaded gel microspheres with one or more non-crosslinked gel materials. The volume content of the cell-loaded gel microspheres in the 3D printing bio-ink is 40%-100%. The gel microsphere-based 3D printing bio-ink in the present invention has shear thinning and self-healing characteristics. Direct 3D printing of low-concentration or low-viscosity gel materials can be achieved without the addition of a rheology modifier. Therefore, the three-dimensional printing of a conventional gel material under ultra-low concentrations is achieved. Furthermore, hydrogel materials that are difficult to print can have excellent printability. By means of using gel microspheres as cell carriers, a customized microenvironment can be provided for activities such as cell growth, proliferation, and differentiation. Furthermore, cells can be protected from shear stress damage during the 3D printing process. The application of 3D bioprinting technology in complex tissue/organ construction is greatly facilitated.

WO 2022/237002 A1

[见续页]

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:

一 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 本发明公开了一种基于凝胶微球的3D打印生物墨水及其应用。所述3D打印生物墨水由已交联的载细胞的凝胶微球形成，或由已交联的载细胞的凝胶微球与一种或多种未交联的凝胶材料混合得到；载细胞的凝胶微球在3D打印生物墨水中的体积含量为40%～100%。本发明基于凝胶微球的3D打印生物墨水具有剪切变稀和自愈合特性，可以在不添加流变改性剂的条件下直接3D打印低浓度或低粘度凝胶材料，从而实现常规凝胶材料在超低浓度下的三维打印，并赋予难打印水凝胶材料优异的打印性；凝胶微球作为细胞载体，可以为细胞生长、增殖和分化等活动提供定制微环境，同时可以保护细胞免受3D打印工艺中剪切应力的损伤，极大促进生物3D打印技术在复杂组织/器官构建方面的应用。

一种基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水及其应用

技术领域

本发明涉及一种基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水及其应用，属于组织工程和生物制造技术领域。

背景技术

生物3D打印技术通过将含细胞的生物墨水按照预定义路径，层层堆积形成具有复杂结构的3D组织与器官，在复杂组织和器官的构建方面具有巨大的优势。生物3D打印技术按照构筑单元的维度，通常可以分为三种：基于微滴（零维）的打印方法，基于微丝（一维）的微挤出打印方法，和基于面成形（二维）的光固化打印方法。其中，微挤出式生物3D打印技术具有成形制造复杂组织结构的潜力，成为目前主流的打印工艺。这种工艺将粘性生物墨水通过微型喷嘴时，在机械力或气压的驱动下受到挤压从而形成载细胞的微纤维。

微挤出式3D打印工艺要求生物墨水材料具备合适的粘度和流变性能，因而极大限制了可供打印的材料来源和浓度范围。一方面，生物墨水粘度范围要求在0.03~5×10^4Pa·s区间。具体而言，生物墨水的粘度过高，会使得生物墨水挤出经过喷嘴时承受的剪切力越大，对细胞造成的损伤也越大；粘度过低，虽然可以顺利挤出，然而挤出后难以维持基本的形态结构。另一方面，微挤出式3D打印工艺要求生物墨水材料具备剪切变稀性能，即当生物墨水经过喷嘴时承受高剪切速率时，生物墨水粘度变低，从而有利于其顺利挤出；当挤出后，生物墨水又恢复到原来的较高粘度，有利于维持打印后的形态结构。另外，微挤出式3D打印工艺所使用生物墨水为水凝胶，通常力学性能较差，限制了其在复杂组织器官构建上的应用。

因此，针对微挤出式3D打印工艺中现有生物墨水的材料、粘度限制和力学性能较差等不足，提供一种新型生物墨水开发策略以拓展现有技术不足甚为必要。

发明内容

本发明的目的是提供一种新型基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水，其具有剪切变稀和自愈合特性，能够提高 3D 打印结构的力学强度和稳定性，从而极大拓展生物墨水的材料来源和打印能力，克服了现有 3D 打印生物墨水面临材料粘度限制和力学性能较差等不足。

本发明提供的基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水，由已交联的载细胞的凝胶微球形成，或由已交联的载细胞的凝胶微球与一种或多种未交联的凝胶材料混合得到；

当包括两种材料时，所述载细胞的凝胶微球作为分散相，所述凝胶材料作为连续相。

所述生物墨水经 3D 打印完成后，通过作为所述连续相的凝胶材料的二次交联，以提高打印结构的力学强度和稳定性；

可采用下述方式对所述凝胶材料进行二次交联：光照交联、温度交联、离子交联、酶交联和共价交联方式中至少一种。

其中，所述载细胞的凝胶微球可按照下述方法制备：

悬滴法培养、超低附着性培养板、磁力悬浮培养、动态旋转培养和微流控技术中至少一种。

上述的 3D 打印生物墨水中，所述凝胶微球内细胞密度可为 10^6 个/mL~10^8 个/mL；

所述载细胞的凝胶微球中凝胶材料的质量-体积浓度可为 10~100mg/mL，如 20~50mg/mL。

上述的 3D 打印生物墨水中，所述载细胞的凝胶微球的直径可为 50μm~1000μm，如可为 200μm~250μm、250μm~300μm 或 350μm~400μm；

所述载细胞的凝胶微球在所述 3D 打印生物墨水中的体积含量可为 40%~100%，如 60%~80%、60%、80%或 100%，当为 100%时即仅由所述载细胞的凝胶微球形成所述 3D 打印生物墨水；

上述的 3D 打印生物墨水中，作为所述连续相的所述凝胶材料的质量-体积浓度可为 1~100mg/mL，如 4~25mg/mL；

作为所述连续相的所述凝胶材料可载有细胞；

所述凝胶材料内细胞密度可为 10^6 个/mL~5×10^7 个/mL。

上述的 3D 打印生物墨水中，所述载细胞的凝胶微球采用的凝胶材料与作为所述连续相的所述凝胶材料均为天然高分子水凝胶和/或合成高分子水凝胶；

具体地，所述天然高分子水凝胶材料可为海藻酸钠、明胶、胶原、Matrigel、壳聚糖、丝素蛋白、透明质酸、纤维蛋白原、硫酸软骨素、白蛋白以及它们的甲基丙烯酰化产物（如甲基丙烯酰化明胶（GelMA）、甲基丙烯酰化海藻酸钠（AlgMA）等）中的至少一种；

所述合成高分子水凝胶材料可为聚乙二醇（PEG）、聚丙烯醇（PVA）、聚乙二醇二丙烯酸酯（PEGDA）、聚环氧乙烷（PEO）、聚丙烯酰胺（PAM）、聚丙烯酸（PAA）、聚磷腈（PAMPS）、聚 N-异丙基丙烯酰胺类水凝胶（PNIPAAm）以及它们的甲基丙烯酰化产物（如凹臂聚乙二醇丙烯酸酯（4-arm-PEG-AC）、甲基丙烯酰化聚乙烯醇（PVAMA）等）至少一种。

本发明 3D 打印生物墨水中，所述载细胞的凝胶微球内的细胞、所述凝胶材料内的细胞均为实质细胞、肿瘤细胞、基质细胞和内皮细胞中至少一种；

所述实质细胞来源于如下组织/器官：心脏、肝脏、肾脏、胰腺和脑结构中至少一种。

本发明 3D 打印生物墨水（包括连续相时）能够多级悬浮 3D 打印具有复杂血管通道和/或异质细胞结构的组织/器官模型，可用于病损组织器官修复、药物开发与筛选和病理研究等；

所述组织/器官模型包括心脏、肝脏、肾脏、胰腺和脑结构中至少一种；

所述组织/器官模型的尺寸为 500μm~100mm。

附图说明

图 1 为本发明基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水的示意图，图中，1 表示载细胞的凝胶微球，2 表示凝胶微球周围的连续相凝胶材料，3 表示作为连续相的凝胶材料内细胞。

图 2 为本发明实施例 1 制备的微球墨水打印的圆环结构和显微观察结

果。

图 3 为本发明实施例 1 制备的基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水的流变学性能表征，图中，图 3a 为粘度随剪切速率的变化曲线，图 3b 为剪切应力、储存模量和损耗模量随剪切应变的变化曲线，图 3c 为在交替高低应变下的储能模量变化曲线。

图 4 为本发明实施例 2 制备的微球墨水打印的支气管结构和显微观察结果。

图 5 为本发明实施例 3 制备的微球墨水打印的网格和双环结构和显微观察结果。

具体实施方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1、制备载心肌细胞的 GelMA 凝胶微球生物墨水

从刚出生乳鼠心脏提取心肌细胞，采用可光交联的甲基丙烯酸酯明胶（GelMA）作为微球载体材料，配制质量体积分数为 5.0%的 GelMA 溶液，其中含有心肌细胞的密度为 1×10^7 个/mL。分别将载心肌细胞的 GelMA 溶液通入 T 型微流控芯片的分散相入口，流速为 0.5mL/h，将含 10%司盘 80 的矿物油通入连续相入口，流速为 4.0mL/h，在芯片出口处进行光照交联，得到直径为 200μm~250μm 的载心肌细胞凝胶微球。在室温下将载心肌细胞的凝胶微球依次通过清洗、离心等步骤去除凝胶微球中的矿物油，同时与载内皮细胞的 GelMA 溶液按按 3：2 的体积比混合得到生物墨水，结构示意图如图 1 所示。其中，生物墨水中载细胞 GelMA 凝胶微球的体积含量为 60%，该 GelMA 凝胶微球内 GelMA 凝胶材料的质量-体积浓度为 50mg/mL，作为连续相的 GelMA 凝胶材料的质量-体积浓度为 25mg/mL，内皮细胞密度为 10^6 个/mL。

采用本实施例制备的 GelMA 凝胶微球墨水在室温下打印直径为

10mm、高度为 5mm 的圆环结构（图 2a），打印速度为 5mm/s，挤出速度为 0.24mm^3/s，打印后采用紫外照射交联，光强参数为 100mW/cm^2，时间为 50s。交联后圆环结构具有良好的力学性能，可以进行反复拉伸（图 2b）。在荧光显微镜下观察，可以看出绿色标记的连续相和红色标记的凝胶微球分散相，两者均匀混合（图 2c）。

进一步，通过流变学测试，可以发现本实施例制备的 GelMA 凝胶微球墨水除了表现出剪切变稀（图 3a，图 3b），还具有自愈合的特性（图 3c）。其中，自愈合特性是常规 GelMA 凝胶生物墨水所不具备的。需要说明的是，已有研究通常能实现的 GelMA 打印最低浓度一般为 75mg/mL，本发明提供的基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水，能够实现浓度在 50mg/mL 及更低浓度，可以满足特殊细胞对超软基质环境的要求。

实施例 2、制备载成肌细胞的纤维蛋白原/Matrigel/胶原凝胶微球墨水

采用商业购买的成肌细胞系 C2C12 细胞进行体外培养，配制质量分数为 2.0%的纤维蛋白原溶液与体积分数为 40%的 Matrigel 溶液，并混合 C2C12 细胞，最终细胞密度为 5×10^6 个/mL。将载 C2C12 细胞的纤维蛋白原/Matrigel 溶液通入同轴聚焦型微流控芯片的分散相入口，流速为 0.3mL/h，将含 5%司盘 80 的矿物油通入同轴聚焦型微流控芯片的连续相入口，流速为 3.0mL/h，在芯片出口处流经长达十米的、放置在温度为 37℃的水浴中的硅胶管，使纤维蛋白原/Matrigel 凝胶微球发生温度交联，得到直径为 250μm~300μm 的纤维蛋白原/Matrigel 凝胶微球，该载细胞凝胶微球内纤维蛋白原的质量-体积浓度为 20mg/mL，Matrigel 的体积分数为 40%。

在室温下将载 C2C12 细胞的纤维蛋白原/Matrigel 凝胶微球通过离心（1000 转每分钟，5 分钟）去油，通过用 50U/mL 的凝血酶溶液对微球进行再次交联，然后在用 PBS 缓冲溶液进行清洗，按 1：1 的体积比混合 I 型鼠尾胶原得到纤维蛋白原/Matrigel/胶原凝胶微球墨水，其中，凝胶微球墨水中凝胶微球的体积含量为 50%，作为连续相的胶原的质量-体积浓度为 4mg/mL。

将本实施例制备的凝胶微球墨水载入 3D 打印设备的喷头内，直接进行打印支气管结构，打印温度为 22℃，打印速度为 2mm/s，挤出速度为 0.5mm^3/s。打印完成后放入培养箱（37℃和 5%CO_2）中孵育 30min，使得整个打印结构进行整体的温度交联。如图 4a-图 4b 所示，可以看出打印支气管结构两端具有均匀的圆形横截面，同时具有稳定的力学性能。在荧光显微镜下观察，可以看出绿色标记的连续相和红色标记的凝胶微球分散相，微球处于压实状态，同时周围混合着连续相（图 4c）。

实施例 3、制备载成肌细胞的纯 GelMA 凝胶微球墨水

采用商业购买的成肌细胞系 C2C12 细胞进行体外培养，采用可光交联的甲基丙烯酸酯明胶（GelMA）作为微球载体材料，配制质量体积分数为 7.5%的 GelMA 溶液，并混合 C2C12 细胞，最终细胞密度为 7.5×10^6 个/mL。将载 C2C12 细胞的 GelMA 溶液通入同轴聚焦型微流控芯片的分散相入口，流速为 1.0 mL/h，将含 20%司盘 80 的矿物油通入同轴聚焦型微流控芯片的连续相入口，流速为 10.0mL/h，在芯片出口处进行光照交联，得到直径为 350μm~400μm 的载细胞凝胶微球。在室温下将载细胞的凝胶微球依次通过清洗、离心等步骤得到生物墨水。其中，生物墨水中载细胞 GelMA 凝胶微球的体积含量为 100%，即不含有作为连续相的凝胶材料，该 GelMA 凝胶微球内 GelMA 凝胶材料的质量-体积浓度为 75mg/mL。

将本实施例制备的凝胶微球墨水载入 3D 打印设备的喷头内直接进行打印网格结构（图 5a），打印温度为 27℃，打印速度为 4mm/s，挤出速度为 2.5mm^3/s。打印后采用紫外照射交联，光强参数为 150mW/cm^2，时间为 60s。在光学显微镜下观察，可以看出本实施例生物墨水完全由凝胶微球分散相组成（图 5b）。

进一步，打印径为 15mm、高度为 2mm 的双环结构（图 5c），打印速度为 2.5mm/s，挤出速度为 0.20mm^3/s，打印后采用紫外照射交联，光强参数为 100mW/cm^2，时间为 30s。在荧光显微镜下观察，可以看出本实施例生物墨水完全由绿色标记的凝胶微球分散相组成，不含有作为连续相的凝胶材料（图 5d）。

工业应用

本发明提供的含载细胞凝胶微球或以含载细胞凝胶微球作为分散相和凝胶材料作为连续相的 3D 打印生物墨水，相比于现有的生物墨水，具有以下优点及突出性效果，体现如下：

（1）本发明新型基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水，具有剪切变稀和自愈合特性，可以在不添加流变改性剂的条件下直接 3D 打印低浓度或低粘度凝胶材料，从而实现常规凝胶材料在超低浓度下的三维打印，并赋予难打印水凝胶材料优异的打印性，极大地扩充了生物墨水库；

（2）凝胶微球作为细胞载体，可以为细胞生长、增殖和分化等活动提供定制微环境，同时可以保护细胞免受 3D 打印工艺中剪切应力的损伤，有助 3D 打印组织器官的功能成熟，极大促进生物 3D 打印技术在复杂组织/器官构建方面的应用。

权利要求

1、一种基于凝胶微球的 3D 打印生物墨水，由已交联的载细胞的凝胶微球形成，或由已交联的载细胞的凝胶微球与一种或多种未交联的凝胶材料混合得到；

当包括所述载细胞的凝胶微球和所述凝胶材料时，所述载细胞的凝胶微球作为分散相，所述凝胶材料作为连续相。

2、根据权利要求 1 所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：所述载细胞的凝胶微球按照下述方法制备：

悬滴法培养、超低附着性培养板、磁力悬浮培养、动态旋转培养和微流控技术中至少一种。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：所述已交联的载细胞的凝胶微球内细胞密度为 10^6 个/mL~10^8 个/mL；

所述已交联的载细胞的凝胶微球中凝胶材料的质量-体积浓度为 10~100mg/mL。

4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：所述已交联的载细胞的凝胶微球的直径为 50μm~1000μm；

所述已交联的载细胞的凝胶微球在所述 3D 打印生物墨水中的体积含量为 40%~100%。

5、根据权利要求 1-4 中任一项所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：作为所述连续相的所述凝胶材料的质量-体积浓度为 5~100mg/mL；

6、根据权利要求 1-5 中任一项所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：作为所述连续相的所述凝胶材料载有细胞；

所述凝胶材料内细胞密度为 10^6 个/mL~5×10^7 个/mL。

7、根据权利要求 1-6 中任一项所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：所述载细胞的凝胶微球采用的凝胶材料与作为所述连续相的所述凝胶材料均为天然高分子水凝胶和/或合成高分子水凝胶。

8、根据权利要求 7 所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：所述天然高分子水凝胶材料为海藻酸钠、明胶、胶原、Matrigel、壳聚糖、丝素蛋白、透明质酸、纤维蛋白原、硫酸软骨素、白蛋白以及它们的甲基丙烯酰

化产物中的至少一种；

所述合成高分子水凝胶材料为聚乙二醇、聚丙烯醇、聚乙二醇二丙烯酸酯、聚环氧乙烷、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸、聚磷腈、聚 N-异丙基丙烯酰胺类水凝胶以及它们的甲基丙烯酰化产物中的至少一种。

9、根据权利要求 5-8 中任一项所述的 3D 打印生物墨水，其特征在于：所述载细胞的凝胶微球内的细胞、所述凝胶材料内的细胞均为实质细胞、肿瘤细胞、基质细胞和内皮细胞中至少一种；

所述实质细胞来源于如下组织/器官：心脏、肝脏、肾脏、胰腺和脑结构中至少一种。

10、权利要求 1-9 中任一项所述 3D 打印生物墨水在构建具有复杂血管通道和/或异质细胞结构的组织/器官模型中的应用；

所述组织/器官模型包括心脏、肝脏、肾脏、胰腺和脑结构中至少一种；

所述组织/器官模型的尺寸为 500μm~100mm。

11、根据权利要求 10 所述的应用，其特征在于：所述 3D 打印生物墨水打印完成后，对作为所述连续相的凝胶材料进行二次交联；

采用下述方式对所述凝胶材料进行二次交联：光照交联、温度交联、离子交联、酶交联和共价交联方式中至少一种。

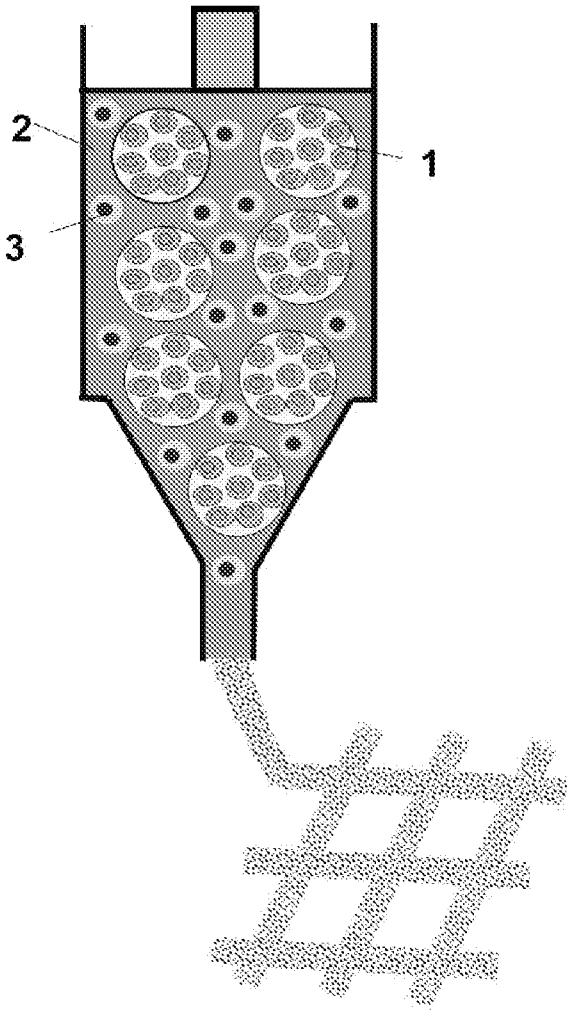


图 1

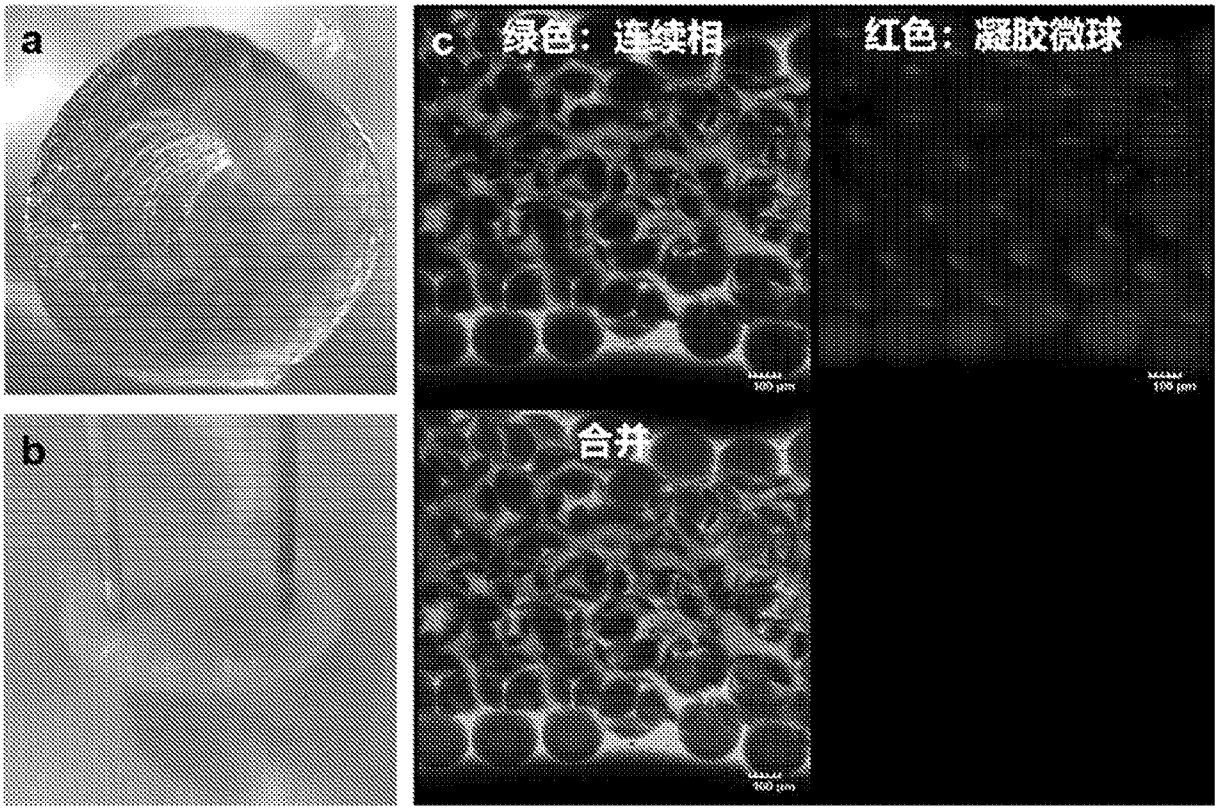

a
b
c 绿色：连续相
红色：凝胶微球
合并

图 2

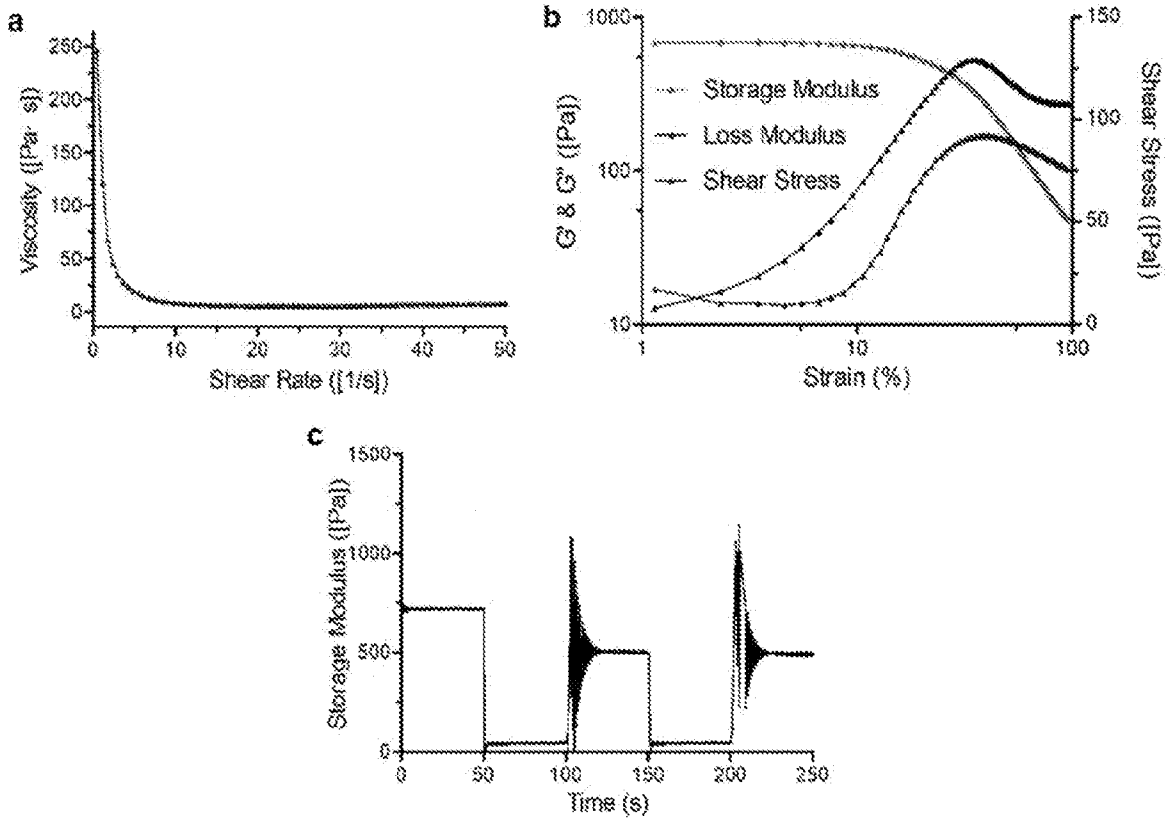

a
Viscosity ([Pa· s])
Shear Rate ([1/s])
b
G' & G" ([Pa])
Storage Modulus
Loss Modulus
Shear Stress
Strain (%)
Shear Stress ([Pa])
c
Storage Modulus ([Pa])
Time (s)

图 3

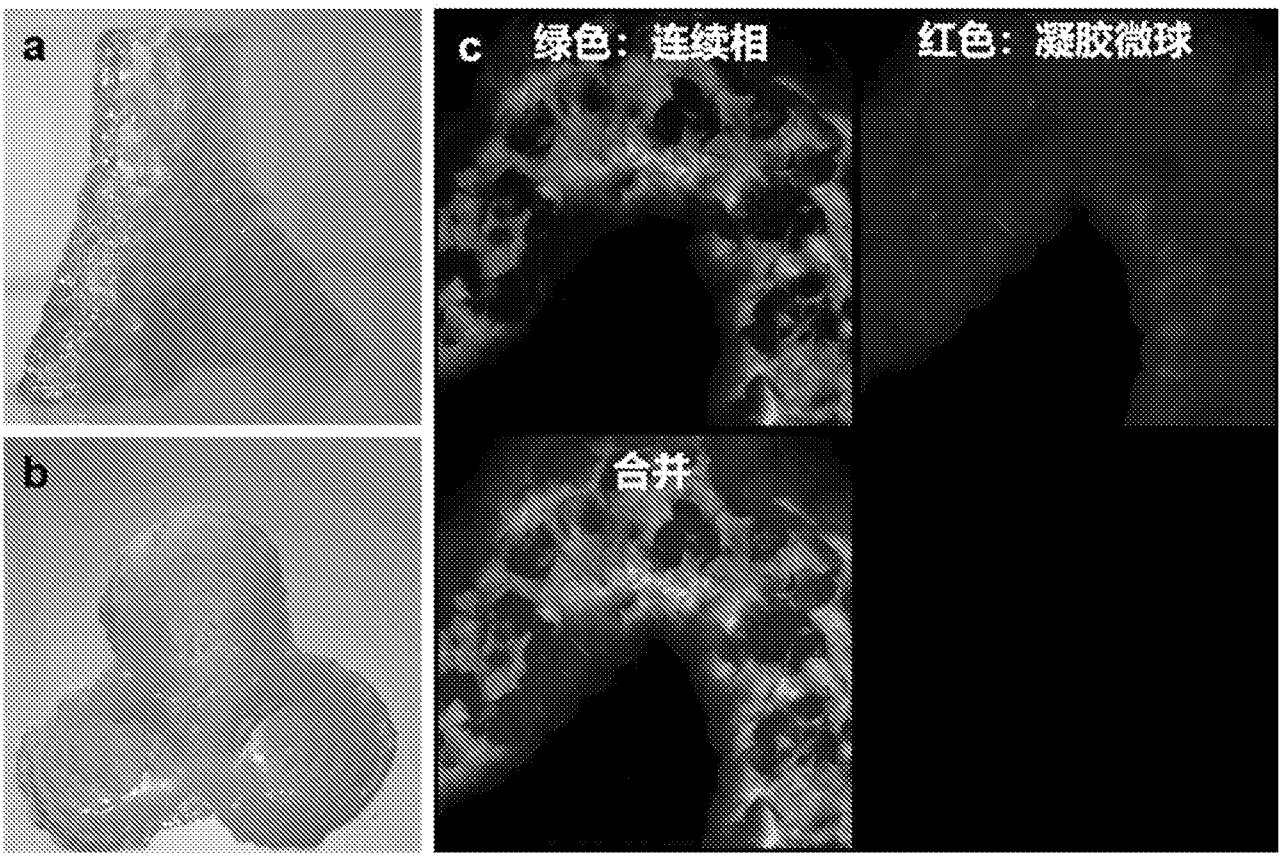


图 4

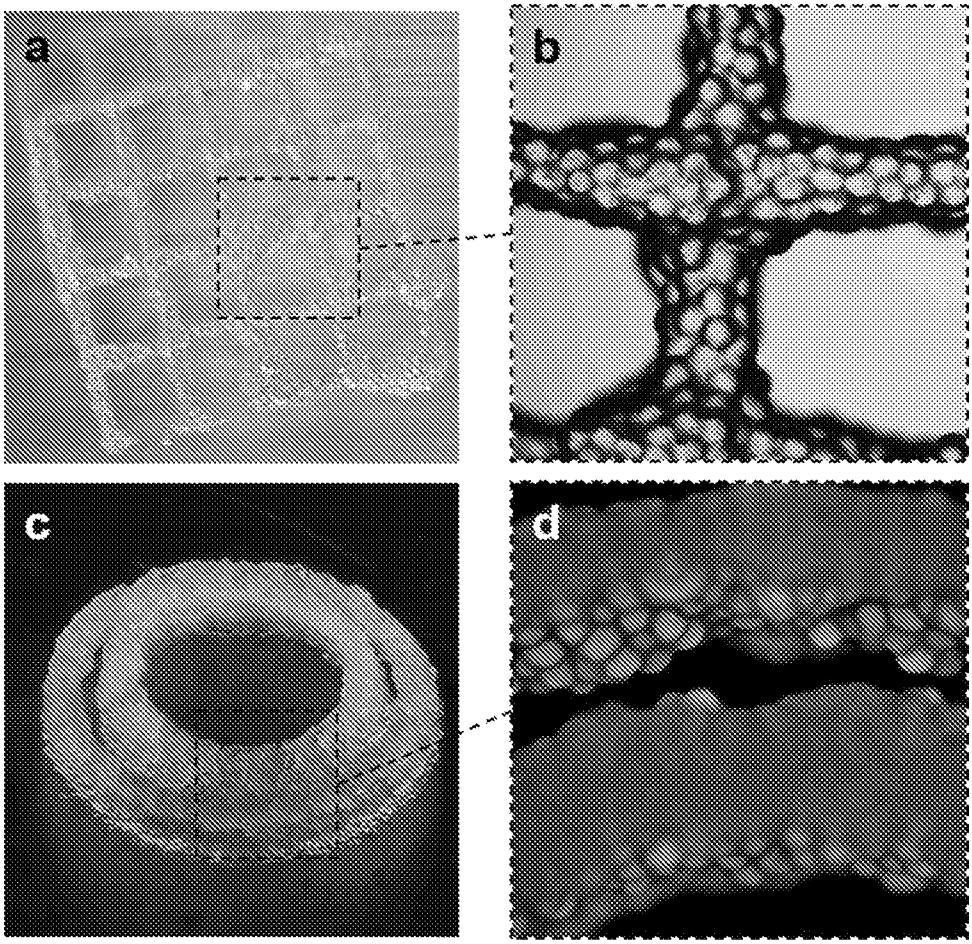


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/113652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; A61L 27/24(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; B33Y 70/10(2020.01)i; B33Y 80/00(2015.01)i; B33Y 10/00(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, 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)

CNKI, CNABS, DWPI, EPODOC, CNKI: 凝胶, 微球, 3D打印, 墨水, 细胞, gel, microsphere, microballons, 3D print+, ink, cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106139251 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 23 November 2016 (2016-11-23) description, paragraphs [0003]-[0069] and figures 1-7	1-11
A	CN 111823569 A (HUASHAN HOSPITAL, FUDAN UNIVERSITY) 27 October 2020 (2020-10-27) entire document	1-11
A	WO 2020182987 A1 (CELLINK AB) 17 September 2020 (2020-09-17) entire document	1-11
A	WO 2020231191 A1 (INNOREGEN INC) 19 November 2020 (2020-11-19) entire document	1-11
A	Shangjing Xin et al. "Clickable PEG hydrogel microspheres as building blocks for 3D bioprinting" *Biomaterials Science,* Vol. 3, 09 January 2019 (2019-01-09), entire document	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 January 2022	**09 February 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
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/113652

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 106139251 A	23 November 2016	None	
CN 111823569 A	27 October 2020	None	
WO 2020182987 A1	17 September 2020	None	
WO 2020231191 A1	19 November 2020	KR 20200132741 A	25 November 2020
		KR 102261908 B1	08 June 2021

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/113652

A. 主题的分类

A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; A61L 27/24(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; B33Y 70/10(2020.01)i; B33Y 80/00(2015.01)i; B33Y 10/00(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, 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）)

CNKI, CNABS, DWPI, EPODOC, CNKI：凝胶，微球，3D打印，墨水，细胞，gel, microsphere, microballons,3D print+, ink, cell

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 106139251 A (清华大学) 2016年11月23日 (2016-11-23) 说明书第[0003]-[0069]段和附图1-7	1-11
A	CN 111823569 A (复旦大学附属华山医院) 2020年10月27日 (2020-10-27) 全文	1-11
A	WO 2020182987 A1 (CELLINK AB) 2020年9月17日 (2020-09-17) 全文	1-11
A	WO 2020231191 A1 (INNOREGEN INC) 2020年11月19日 (2020-11-19) 全文	1-11
A	Shangjing Xin等. "Clickable PEG hydrogel microspheres as building blocks for 3D bioprinting" Biomaterials Science, 第3卷，2019年1月9日 (2019-01-09), 全文	1-11

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年1月24日	2022年2月9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 赵洁 电话号码 62084695

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/113652

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 106139251 A	2016年11月23日	无	
CN 111823569 A	2020年10月27日	无	
WO 2020182987 A1	2020年9月17日	无	
WO 2020231191 A1	2020年11月19日	KR 20200132741 A	2020年11月25日
		KR 102261908 B1	2021年6月8日