

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-517462  
(P2021-517462A)

(43) 公表日 令和3年7月26日(2021.7.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 2 9
<b>B 2 9 C 64/106 (2017.01)</b>	B 2 9 C 64/106	4 F 2 1 3
<b>B 2 9 C 64/209 (2017.01)</b>	B 2 9 C 64/209	
<b>B 2 9 C 64/393 (2017.01)</b>	B 2 9 C 64/393	
<b>B 3 3 Y 10/00 (2015.01)</b>	B 3 3 Y 10/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-549633 (P2020-549633)  
 (86) (22) 出願日 平成31年3月12日 (2019. 3. 12)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月27日 (2020. 10. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/021834  
 (87) 国際公開番号 W02019/178086  
 (87) 国際公開日 令和1年9月19日 (2019. 9. 19)  
 (31) 優先権主張番号 62/642, 588  
 (32) 優先日 平成30年3月13日 (2018. 3. 13)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 520350720  
 フロンティア バイオ コーポレーション  
 FRONTIER BIO CORPOR  
 ATION  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 621 オークランド エッジウォーター  
 ドライヴ 8000 스위트 200  
 (74) 代理人 100139723  
 弁理士 樋口 洋  
 (72) 発明者 ベネット, エリック  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 621 オークランド エッジウォーター  
 ドライヴ 8000 스위트 200  
 Fターム(参考) 4B029 AA21 AA27 BB11 CC02 CC09  
 CC10 GB09

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気流体力学的バイオプリンターシステムおよび方法

(57) 【要約】

本開示の実施形態によれば、従来のバイオプリンティングおよび電気流体力学印刷 (EHDP) の両方を実行する能力を有する装置が提供される。本開示はまた、上記の装置を使用する方法、印刷パラメーターを最適化する方法、位置校正の方法、電圧波形を選択または作成する方法、および作製装置に関する他の方法を提供する。

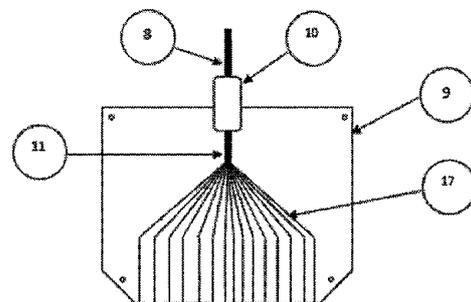


FIG. 3

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

有機合成および/または固化が可能な1つまたは複数の液状媒体から、三次元有機構造物または生物学的物体を作製する装置であって、前記物体のデジタル表現により堆積が支持され、前記装置が、

内部に構築材料の連続的な層を受容するための平らな構築プレート、

前記平らな構築プレートの上に配置された少なくとも1つのプリントヘッドのアレイを含み、

少なくとも1つのプリントヘッドが、構築面または構築材料の前の層の上に材料を堆積する電気流体力学および別のバイオプリンティング機構の組合せを用いて選択的に材料を分配し、二次元インターフェースにおいて前記物体の連続的な断面薄層を形成することにより三次元物体が実質的に二次元の平らな表面から展開される、よう構成される、装置。

10

**【請求項 2】**

前記平らな構築プレートが、内部に構築材料の連続的な層を受容するための三次元構築表面および前記三次元構築表面の上に配置される少なくとも1つのプリントヘッドのアレイにより置換され、

少なくとも1つのプリントヘッドが、材料を前記構築材料上に堆積する電気流体力学および/または空気圧機構の組合せを用いて材料を選択的に分配し、二次元インターフェースにおいて前記物体の連続的な断面薄層を形成することにより三次元物体が三次元の表面から展開される、よう構成される、ことを特徴とする、請求項1に記載の装置。

20

**【請求項 3】**

前記平らな構築プレートが、積層プロセスおよび内部で構築材料の連続的な層を受容する間に前記構築材料を支持するのに役立つ粘性および/または電気粘性流体を含む液体充填タンクおよび前記液体充填タンクの上に配置される少なくとも1つのプリントヘッドのアレイにより置換され、

少なくとも1つのプリントヘッドが、材料を前記構築材料上に堆積する電気流体力学および/または空気圧機構の組合せを用いて材料を選択的に分配し、二次元インターフェースにおいて前記物体の連続的な断面薄層を形成することにより三次元物体が液体充填タンクから展開される、よう構成される、ことを特徴とする、請求項1に記載の装置。

30

**【請求項 4】**

前記三次元物体が、非生物学的材料から作製されることを特徴とする、請求項1、2または3に記載の装置。

**【請求項 5】**

前記プリントヘッドが、前記構築表面または構築材料の上に導かれ、第2の精密位置決め接触が、前記構築表面の下に配置され、それにより、静電的に帯電した材料が、前記プリントヘッドから、前記構築表面の下のXおよびY平面で移動できる前記精密位置決め接触の反対または異なる電荷との親和性からの正確な位置へ導かれる、または、

40

前記精密な位置決めが、前記構築表面が複数の方向で移動する際に静止したままである、ことを特徴とする、請求項1、2または3に記載の装置。

**【請求項 6】**

前記流動化された材料が、分配された材料が前記構築材料に接触する前、直前、または直後に、所定の相乗的刺激を受けうることを特徴とする、請求項1、2または3に記載の改良された装置。

**【請求項 7】**

前記装置が、別の3D印刷装置、バイオリアクター、後処理デバイス、またはインキュベーターなどの別の装置に隣接して接続されて、1つのシステムまたは装置から別のシス

50

テムまたは装置への前記構築材料の搬送中に無菌環境を維持することを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の改良された装置。

【請求項 8】

洗浄ステーション、校正ステーション、またはその両方が前記印刷面に接続され、前記印刷面およびステーションの両方を 1 つまたは複数の次元に平行移動させてすべての前記 3 D 印刷押出機を前記ステーションに到達させる、または、反対方向に平行移動させてすべての 3 D 印刷押出機を前記印刷面に到達させる、ことを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の改良された装置。

【請求項 9】

前記材料を帯電させるために使用されうる高圧電源が、すべてのプリントヘッドについて唯一の高圧電源でありうるか、または、それぞれが専用のプリントヘッドを有する複数の高圧電源でありうることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

10

【請求項 10】

前記システムが、従来の X、Y、および Z 軸とは別に、堆積される構築材料のための追加の関節軸を有してもよく、これらの追加の軸は、前記システムの X、Y、および Z 軸に対して 1 つまたは複数の軸で前記構築表面を回転させる、前記システムに近接または接続された追加の装置の形態にすることができることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 11】

前記堆積の機構が、前記プリントヘッド内のおよび / または外部圧電ポンプと組み合わせた圧電膜によって補助されることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

20

【請求項 12】

前記プリントヘッドが、一連の逆止弁によって制御される 1 つまたは複数の流体入口を有してもよく、その動作が外部コントローラによって独立して制御されてもされなくてもよいことを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 13】

前記プリントヘッドに入る流体が、前記流体材料を前記プリントヘッドに流し込む正圧を有しうることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 14】

前記流体構築材料が、微粉末材料でありうることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の改良された装置。

30

【請求項 15】

前記装置が、印加された高電圧の閉ループ制御を有し、センサーが、電界の相対強度を検出するために前記印刷面の下にまたは近接して配置されうることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 16】

前記装置が、印加された高電圧の閉ループ制御を有し、前記電圧が、前記構築表面またはその周りに接続された 1 つまたは複数のアース線または他の線を介した電流の速的に基づいて自動的に調節されることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 17】

堆積されるときに前記構築材料の焦点を合わせるのを補助するために、手動または自動のいずれかで追加の電極が所定の位置に向けられうることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

40

【請求項 18】

前記平らな構築表面が、前記構築プロセスを通して、輪郭物体を構築するためまたは電界を操作するために、平面から輪郭表面に変化することができるように関節運動されうることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載のデバイス。

【請求項 19】

前記システムが、1 つまたは複数の次元における前記堆積装置の押出オリフィスの正確な位置の位置決めを支援する目的で、超音波ベースのオフセット校正を提供され、オフセ

50

ット校正はまた、参照により本明細書に組み込まれる光ベースの方法などの追加の方法を使用して実行されることが当業者によって認識されることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 20】

1 つまたは複数の静電容量センサーが、前記ビルド表面内またはその周囲に配置され、移動される際にプリントヘッド位置または押出オリフィスの位置を検出し、かつ、プリントヘッド位置の検出を増強するために使用され、その検出をさらに支援するために前記プリントヘッドに電圧が印加されうることとを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 21】

単一の関節式センサーを使用して、複数の次元で前記プリントヘッドの位置を測定するために、前記検出センサーをその前の位置に対して移動および/または回転させることによって、複数の次元で前記プリントヘッドを検出しうることとを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 22】

前記構築表面が、それぞれの電圧が互いに独立して制御されうる複数の電極から構成されるかまたはその近傍にある、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 23】

前記印刷プロセスが、ペイロードを備えたナノファイバーおよび/またはナノポーラス容器を作成することによって改良され、印刷面が最初にマイクロウェルを有し、電気流体力学および/または他の手段を使用してナノファイバーが堆積される担体として機能するように作成され、

前記ナノファイバーが、以前に堆積された構築材料の上に堆積され、最終的に、前記 3D 印刷された構築材料は、レーザーカッターを用いてまたは他の機械的除去手段により機械加工された担体から分離される

ことを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 24】

前記印刷プロセスが、電気流体力学的に生成された繊維の直径をリアルタイムで制御することによって改良され、溶液の 1 つの入力チャンネルが、低濃度の溶質を含み、溶液の第 2 の入力チャンネルが、著しく高い濃度の溶質を含み、どちらも独立して流量を制御し、両方とも押出し前に混合して、相対流量を調整することにより出力オリフィスでの溶質濃度を正確に制御することを効果的に可能とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

【請求項 25】

前記繊維の直径を変更する必要があるときに、第 3 のチャンネルを使用して溶液を迅速に回収することを特徴とする、請求項 24 に記載の装置。

【請求項 26】

前記入力チャンネル間の差が前記溶質の分子量であることを特徴とする、請求項 24 または 25 に記載の装置。

【請求項 27】

前記入力チャンネルが異なる分子量および異なる濃度を有することを特徴とする、請求項 24 または 25 に記載の装置。

【請求項 28】

前記入力チャンネルが異なる分子量、濃度、または化学組成を有することを特徴とする、請求項 24 または 25 に記載の装置。

【請求項 29】

任意の数の入力チャンネルを任意の所望の比率で組み合わせ/混合し、任意の数の出力チャンネルに出力することができることを特徴とする、請求項 24 または 25 に記載の装置。

【請求項 30】

前記印刷面が、ナノポーラスまたはマイクロポーラスであることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 1】

電気流体力学のおよび 1 つまたは複数のバイオプリンティング堆積システムの組み合わせを使用して構築材料を選択的に分配し、それによって構築物の連続する断面薄層を選択的に分配し、前記構築表面から前記構築物を展開する、三次元有機構築物を製造するための請求項 1、2 または 3 の装置。

## 【請求項 3 2】

前記構築物の電気流体力学的印刷が、前記構築物の堆積を誘導するために電圧レベルが独立して制御される複数の電極から構成されるかまたはその近傍にある構築表面上に電気流体力学的押出しを使用して構築材料を分配する工程からなることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 に記載の装置。

10

## 【請求項 3 3】

有機合成および / または固化が可能であり、その堆積が物体のデジタル表現によって指示される、1 つまたは複数の流体媒体から三次元有機構築物または生物学的物体を製造するための方法であって、

電気流体力学および 1 つまたは複数のバイオプリンティング堆積システムの組合せを利用して材料を選択的に分配する工程；

前記選択的に分配する工程から、二次元インターフェースにおいて前記物体の連続的な断面薄層を形成する工程；および

表面から前記三次元物体を展開する工程を含む、方法。

20

## 【請求項 3 4】

前記選択的に分配された材料が、平らな構築プレート上に配置され、前記三次元物体が、実質的に二次元の平面から展開される、ことを特徴とする、請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 5】

前記選択的に分配された材料が、三次元構築表面中に印刷され、前記三次元物体が、前記三次元表面から展開される、ことを特徴とする、請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 6】

前記選択的に分配された材料が、積層プロセス中に前記構築材料を支持するのに役立つ粘性および / または電気粘性流体を含む液体充填タンク中に印刷され、前記三次元物体が、前記液体充填タンクから展開される、ことを特徴とする、請求項 3 3 に記載の方法。

30

## 【請求項 3 7】

前記三次元物体が、非生物学的材料から作製されることを特徴とする、請求項 3 3、3 4、3 5、または 3 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

前記プリントヘッドが、前記構築表面または構築材料の上に導かれ、第 2 の精密位置決め接触が、前記構築表面の下に配置され、それにより、静電的に帯電した材料が、前記プリントヘッドから、前記構築表面の下の X および Y 平面で移動できる前記精密位置決め接触の反対または異なる電荷との親和性からの正確な位置へ導かれる、または、

40

前記精密な位置決めが、前記構築表面が複数の方向で移動する際に静止したままである、ことを特徴とする、請求項 3 3、3 4、3 5、または 3 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

前記流動化された材料が、分配された材料が前記構築材料に接触する前、直前、または直後に、所定の相乗的刺激を受けうることを特徴とする、請求項 3 3、3 4、3 5、または 3 6 に記載の方法。

## 【請求項 4 0】

1 つのシステムまたは装置から別のシステムまたは装置への前記構築材料の搬送中に無

50

菌環境を維持することを特徴とする、請求項 33、34、35、または 36 に記載の方法。

【請求項 41】

前記材料を帯電させるために使用されうる高圧電源が、すべてのプリントヘッドについて唯一の高圧電源でありうるか、または、それぞれが専用のプリントヘッドを有する複数の高圧電源でありうることを特徴とする、請求項 33、34、35、または 36 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオプリンティングおよび電気流体力学技術を 1 つの機械に組み合わせて使用する 2 D または 3 D 構造の印刷に有用な付加製造装置に関する。より詳細には、本開示は、電気流体力学的バイオプリンターシステムおよび方法に関する。

【関連出願】

【0002】

本出願は、本出願においてここに参照することにより引用される、米国仮特許出願第 62 / 642 , 588 号 (2018 年 3 月 13 日出願) に関する。本出願は、米国仮特許出願第 62 / 642 , 588 号に優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

組織工学および再生医療は、世界の臓器不足の問題に対処し、動物実験に代わり、人間がより長くより健康な生活を送ることを可能にする潜在性を有する。バイオプリンティングは、細胞やその他の材料を正確に配置して組織構造を作成するための有用なツールに近年なっている。サーマルインクジェット印刷、圧電ベースのインクジェット印刷、空気圧押し出し、容積式押し出し、レーザー支援バイオプリンティング、および溶融フィラメント製造 (溶融堆積モデリングまたは FDM としても知られる) などの従来のバイオプリンティング技術が存在する。

【0004】

ほとんどのバイオプリンティングマシンは、例えば空気圧押し出しなど、単一のバイオプリンティング技術に限定される。しかしながら、複数のバイオプリンティング技術を 1 つのマシンに組み込み、複雑な組織構造に必要となりうる複数のバイオプリンティング方法から単一のプリントセッションが恩恵を受けることが有用である。

【0005】

強電場を使用して材料を堆積させる他の高度な製造技術が存在し、これらの技術は電気流体力学印刷 (EHDP) 技術と称されうる。これらの EHDP 技術は通常、細胞の堆積を伴わない用途に使用されるが、EHDP 技術は細胞と共に使用されており、一種のバイオプリンティングと考えられる。EHDP 技術には、エレクトロスピンニング、エレクトロスプレー、および EHDP 液滴噴射 (エレクトロ液滴噴射または EDJ とも称される) が含まれ、細胞を用いてまたは用いずに実行できる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

EHDP はより高度であるが、従来のバイオプリンティング技術が依然として有用である。EHDP のみで、50 ナノメートル未満の非常に正確な構造を作成できることが示されてきた。EHDP だけでも、多くの場合、細胞に損傷を与えずに細胞を印刷できることが示されてきた。EHDP は特定の面で従来の技術を上回るが、従来の技術は依然としてバイオプリンティングに有用である。EHDP 技術を従来のバイオプリンティング組み合わせる機械が関連分野で必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

10

20

30

40

50

本開示の1つの実施形態によれば、従来のバイオプリンティングおよび電気流体力学印刷（EHDP）の両方の能力を併せ持つ装置もまた提供される。この装置は、材料の空気圧押し出しをサポートする空気圧システムを含み、EHDPをサポートする高電圧電源も含む。この装置はまた、統合型容積式ポンプを有してもよい。高電圧電源は、経時で安定であるか、または、オン/オフパルス、正弦波状波、または任意の波形のような非常に特有の波形を有する高電圧を提供するように制御できる電圧を供給しうる。印刷中の各EHDP押し出し機のパラメータは、例えば、電圧、流量、圧力、波形、温度を含み、独立して制御しうる。印刷力学を視覚化するモニタリングシステムも装置に含めることができる。このシステムを使用する印刷および校正の方法、例えば、押し出し機オフセット校正、印刷パラメータの最適化、併合バイオプリンティングモダリティ印刷などについても説明される。この機械によって実行される印刷技術は、細胞の有無にかかわらず行うことができる。

10

**【0008】**

以下の詳細な説明に着手する前に、この特許文書全体で使用される特定の単語や語句の定義を説明することが都合がよいかもかもしれない。

**【0009】**

付加製造 - 物体を作成するために材料が堆積または形成（通常は層ごとに）される方法。

**【0010】**

バイオプリンティング - 印刷された材料に生体材料が含まれるか、または印刷された材料が生体システムで使用される付加製造のカテゴリを指すために使用される用語。例として、幹細胞を含むヒドロゲルの印刷、印刷後に細胞が播種されるゲルまたは骨格の印刷、器官の印刷、およびヒトまたは他の動物で使用できる人工装具の印刷が挙げられる。

20

**【0011】**

電気流体力学印刷 - EHDPと略される - 堆積される材料が電場を促進して輸送される付加製造の方法。

**【0012】**

EDJ - エレクトロ液滴噴射の略語 - この特許では、短い電界パルスが液滴をオリフィスまたは表面から放出させるEHDP技術を称する。

**【0013】**

押し出し機 - 印刷面に材料を堆積させるために使用されるツール。多くの場合、これは取り付けられた針から材料を押し出すことができるシリンジバレルであるが、他のタイプの装置も押し出し機と称されうる。別の例は、プラスチックフィラメントを溶かし、それをノズルから押し出す装置である。

30

**【0014】**

FDM - 溶融堆積モデリング。FFF（溶融フィラメント製造）または熱可塑性印刷としても知られる。溶融した熱可塑性樹脂を層ごとに堆積させて3次元物体を作成する付加製造技術である。

**【0015】**

プリントヘッド - 1つまたは複数の製造ツールを取り付けて、ツールの動きを少なくとも1次元で移動させるガントリーに取り付けられた物体である。プリントヘッドは、押し出しツール自体を指す場合もある。

40

**【0016】**

プリンター - この用語は、製造およびラピッドプロトタイピングに使用されるシステムおよび装置全体を表すために使用される。

**【0017】**

印刷面 - 通常は、プリントヘッドから押し出された材料がその上に堆積される表面である。表面は平面または曲面でもよい。表面は有機性または無機性でもよい。表面は静止していても静止していなくてもよい。印刷面は、例えば、平らなステンレス鋼シートであってもよいし、移動する手であってもよい。

本開示の一実施形態では、印刷面は生きた組織であってもよい。本開示の別の実施形態で

50

は、印刷面は、ナノポーラスまたはマイクロポーラスであってもよい。

【0018】

「含む」および「備える」なる用語、並びにそれらの派生語は、限定なしの包含を意味する；「または」という用語は包括的であり、および/またはを意味する；「関連する」および「それと関連する」という語句、並びにそれらの派生語は、含む、その中に含まれる、関連する、含有する、その中に含有される、接続される、結合する、伝達できる、協力する、交互配置する、並置する、近接する、結合される、有する、特性を持つなどを意味する。項目のリストで使用される場合、「少なくとも1つ」という語句は、リストされた項目の1つ以上の異なる組み合わせを使用でき、リスト内の1つの項目のみが必要とされうることを意味する。例えば、「A、B、およびCの少なくとも1つ」には、次の組み合わせのいずれかが含まれる：A；B；C；AおよびB；AおよびC；BおよびC；およびAおよびBおよびC。特定の単語および語句の定義は、この特許文書全体にわたって提供されており、当業者は、ほとんどではないにしても多くの場合において、そのような定義がそのように定義された単語および語句の以前の並びに将来の使用に適用されることを理解する。

10

【0019】

本開示およびその特徴のより完全な理解のために、添付の図面と共に以下の説明が参照される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

20

【図1】本開示の実施形態に従った、3Dプリンターシステムの概略図

【図2】本開示の実施形態に従った、プリントヘッドの内部混合バージョンの概略図

【図3】本開示の実施形態に従った、プリントヘッドのマニホールドバージョンの概略図

【図4】本開示の実施形態に従った、別のタイプの圧電プリントヘッドの断面図

【図5】所定の方法でさまざまな構築材料を受け取るためのウェルを備えた別の印刷面の断面図

【図6】本開示の実施形態に従った、複合押出技術を収容するバイオプリンティングプラットフォーム

【図7】本開示の実施形態に従った、FDM押出機を用いて印刷された多孔性埋込型耳骨格を示す図

30

【図8】本開示の実施形態に従った、3つの空気圧押出機を用いた3重の同心円プリントを示す図

【図9】本開示の実施形態に従った、ヒドロゲル材料を用いた鼻形状のプリントを示す図

【図10】本開示の実施形態に従った、PDMSをFDM印刷されたABSモールド中に成型することにより形成された柔軟な耳形状のPDMS構築物を示す図

【図11】本開示の実施形態に従った、柔軟な薄い環状PDMS構築物を示す図

【図12】本開示の実施形態に従った、金属ロッドを外されているナノファイバーの血管骨格を示す図

【図13】本開示の実施形態に従った、電気流体力学プリントヘッドで印刷された互いに垂直に配置されたナノファイバーを示す図

40

【図14】本開示の実施形態に従った、血餅のシミュレーションを補助するために印刷された血管モデルを示す図

【図15】本開示の実施形態に従った、バイオプリンティングシステムにより作成された分岐血管モデルを示す図

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下に説明する図面、およびこの特許文書で本開示の原理を説明するために使用されるさまざまな実施形態は、例示のみを目的としており、開示の範囲を限定するものとしては決して解釈されるべきではない。当業者は、本開示の発明の原理が、任意のタイプの適切に配置されたデバイスまたはシステムで実装されうることを理解するであろう。さらに、

50

図面は必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではない。

【 0 0 2 2 】

周知のプロセスおよび構成要素は詳細に説明されておらず、簡潔にするために省略されていることが理解されよう。特定のステップ、構造、および材料が説明されているが、本開示はこれらの詳細に限定されず、当業者によってよく理解されているように他のものに置き換えられてもよく、さまざまなステップが必ずしも示される順序で実行されなくてもよい。

【 0 0 2 3 】

本開示は、再生医療および組織工学における用途のための改良された装置に関する。本明細書では、特定の実施形態において、骨格、組織、および器官を作製するための装置、システム、および方法が開示される。記載された装置および方法は、バイオプリンティング用途に限定されないが、該して付加製造に含まれる。

10

【 0 0 2 4 】

従来のバイオプリンティング技術には、空気圧ベースの押し出し、溶融堆積モデリング押し出し、容積式押し出し、マイクロバルブジェットリング、圧電ベースのインクジェット押し出し、およびサーマルインクジェット押し出しが含まれる。バイオプリンティングのほとんどの商用システムは、空気圧式または容積式ベースである。

【 0 0 2 5 】

電気流体力学印刷 ( E H D P ) 技術は、堆積されている材料の移動が主に電界によって引き起こされる方法である。 E H D P には、エレクトロスピンニング、エレクトロスプレー、およびエレクトロジェットを含むがこれらに限定されない多数の技術が含まれる。エレクトロスピンニングは一般に、印刷される材料の非常に細かい糸が生じる。エレクトロスプレーは一般に、細かく帯電した液滴のスプレーを生じる。電気液滴噴射 ( E D J ) は一般に、表面またはオリフィスから 1 つずつ放出される材料の液滴または短い流れを生じる。 E H D P 法は、押し出される材料と混合される細胞の有無にかかわらず実行できる。細胞を用いて E H D P を使用すると、特定の場合に、細胞生存率が高く、細胞損傷がほとんどまたはまったくないことが以前に示されている。

20

【 0 0 2 6 】

好ましい実施形態において、製造装置は、当該装置が従来のバイオプリンティング技術を実行し、かつ、同じ印刷セッション内で E H D P 技術を実行することを可能にする設備を備える。この装置は、 A C または D C 電圧で動作する高電圧 D C 電源を、ハウジングの内部または外部に備えうる。電源装置からの最大電圧は、 1 0 0 ボルトから最大 1 0 万ボルトまでの範囲内でありうる。通常は、 1 0 0 0 ボルトから 3 0 0 0 0 ボルトの範囲内である。

30

【 0 0 2 7 】

高電圧電源は、手動で制御される出力電圧を持つことができる。手動で制御される電源は、ユーザーが所望の電圧を選択することを可能にするノブまたはユーザーインターフェースを有してもよい。高電圧電源のためのユーザーインターフェースは、周波数、負荷サイクル、強度、立上がり時間、立下がり時間などのパルスパラメーターや、電源出力機能に関連するその他のパラメーターを含むさまざまな波形を選択することを可能にする。インターフェースによって、ボタンを押すだけで設定のグループを保存および取得して適用できるように、さまざまな設定を保存できる。

40

【 0 0 2 8 】

必要に応じて、ユーザーによって端末に入力される、またはボタンを押すことによって起動される g コードコマンドで電圧を制御できる。必要に応じて、電圧制御 g コードコマンドは、スライスソフトウェアまたは後処理スクリプトによって生成できる。必要に応じて、ファームウェアが電圧を直接制御する。必要に応じて、 g コードがファームウェアによって解釈され、特定の波形または電源出力の予想される動作を起動できる。 G コードコマンドはまた、必要に応じて、印加電圧のさまざまな他の特性や、この特許で前述または後述する任意の他のパラメーターおよび設定を制御できる。

50

## 【0029】

特定の化学物質、分子、またはイオンの濃度は、gコードコマンドまたはその他のインターフェースを使用して調整することができ、その結果、特定の化学物質、分子、またはイオンがリザーバーに混合される。これは、印刷の途中、印刷前、または印刷パラメータおよび設定の校正中に行うことができる。磁石および/または電磁石を使用することにより、混合を容易にすることができる。例えば、磁石をシリンジの内側に配置し、電磁石をシリンジの外側に配置して、混合コマンドを受け取ったときに磁石の回転を制御することができる。他の混合方法を使用してもよい。混合方法を用いて、例えば沈降を防止するまたは熱分布に役立つために、材料中に存在しうる細胞を混合してもよい。

## 【0030】

高電圧電源はまた、印刷中に協調して自動的に制御される出力電圧を有しうる。例えば、ユーザーは、製造装置に組み込まれるまたは製造装置の外部に存在するコンピューター上で、印刷のパラメータおよびオプションを事前に準備することができる。ユーザーは、印刷される各材料について所望の印刷および電圧パラメータを選択できる。例えば、ユーザーは、3つの材料のそれぞれについて3つの異なる流量を選択してEHD Pを受けさせ、次いで、それぞれについて異なる電圧、異なる周波数、負荷サイクル、その他のパラメータを選択してもよい。印刷中、押出機がアクティブになると、ユーザーが以前にコンピューター上での印刷設定中に選択した設定が、1つまたは複数のアクティブな押出機に対してアクティブになる。一度に1つの押出機のみを押出す場合、1つの押出機がアクティブになると、他の押出機は非アクティブになり、各押出機が順番に印刷の一部を行う。

## 【0031】

1つの実施形態において、ただ1つの高電圧源が使用され、技術が使用されて、独立して印刷されるそれぞれの別個の材料に所望の電圧を印加する。各押出機が異なる電圧を必要とする場合、単一の高電圧電源は、アクティブな押出機が必要とする電圧に出力電圧を自動的に変更し、任意の押出機がアクティブになるように出力電圧特性を変更しうる。必要に応じて、複数の出力端子を持つ電源を使用できる。例えば、電源は、製造装置で使用できるすべての押出機に対して1つの出力を持つことができる、あるいは、後に説明される1つ以上の偏向プレートまたは1つ以上のフォーカスリングのようなプリンターの他の態様に対してより多くの出力を有してもよい。あるいは、複数の電源を使用してもよい。

## 【0032】

ユーザーは、製造装置で使用するためのカスタム電圧または電流波形を作成することもできる。ユーザーは、以下の1つ以上の非限定的なオプションを使用することにより、波形を作成または特定できる：タッチスクリーンの使用、数式の入力、または特定可能なパラメータを有するさまざまなテンプレート波形からの選択。ユーザーは、必要に応じて、液滴サイズおよび糸幅を含むがこれらに限定されない印刷された材料の所望の特性を何らかの方法で説明または選択することにより、波形を間接的に特定することができる。この場合、ソフトウェアプログラムは、所望の特性および必要に応じて他の印刷パラメータ（押出機のオリフィスから印刷面までの距離、空気の温度、湿度、材料の温度、および他のパラメータなど）を取得し、1つまたは複数の望ましい印刷設定（例えば、電圧強度、周波数、負荷サイクル、波形など）の近似値を特定する。必要に応じて、校正シーケンスは、自動的にまたは半自動的にまたは手動で実行でき、校正シーケンスの反復ごとに、または校正プロセス全体で継続的に印刷設定が最適化される。

## 【0033】

ユーザーが選択または作成できる電圧波形の例は、以下である：方形波、正弦波、指数関数、シーソー、電圧のゆっくりした上昇（数秒または数分に亘って）、速い上昇（反復サイクルに亘って）、三角波、複素波、または非線形。与えられた波形の例は、DCまたはAC波形でありうる。与えられた例は限定的なものではなく、ユーザーは与えられた例の任意の組み合わせを使用することができる。

## 【0034】

10

20

30

40

50

校正プロセスでは、必要に応じて、画像をキャプチャする1つまたは複数のカメラまたはビデオを使用し、リアルタイムで処理する、または、後で処理するために保存することができる。例えば、カメラは、エレクトロスピンニング中に針から引っ張られている材料の系の画像をキャプチャし、かつ、必要に応じて蛍光イメージングの使用を伴うことによりエレクトロスピンニングされている溶液中に存在する場合に細胞の画像をキャプチャすることができる。アルゴリズムは、系の幅を特定し、針または溶液に印加されている電圧を自動的に調整することができる、または、流量を調整することができる、あるいは、印刷面に対する針の高さを調整することもでき、特に、例えばユーザーが所望の幅として入力したものとより近く一致するように系の幅を調整するために設定を最適化する。ユーザーは、必要に応じて、アルゴリズムのフィードバックに基づいてどの印刷設定が調整されるべきかを選択できる。

10

**【0035】**

印刷面自体を接地してもよく、表面やその他の物体を印刷面の下に接地してもよい。電源からの高電圧は、押出機またはリザーバーの針、またはリザーバー自体、または溶液自体に向けられてもよい。必要に応じて、リザーバー自体またはアタッチメントは、1つまたは複数のオリフィスを備えた表面を有してもよい。必要に応じて、リザーバーまたはそれへのアタッチメントは、1000または10000以上のオリフィスのような多数のオリフィスを有し、材料が多数のオリフィスから出て、印刷される材料の系または液滴の複数の流れを作成することを可能にできる。必要に応じて、高電圧をすべてまたは一部の押出機に同時に印加してもよい。必要に応じて、高電圧を、偏向プレート、リング、または他の物体に印加してもよい。必要に応じて、偏向プレート、リング、または他の物体への電圧の値は、分圧器、電圧レギュレータ、またはより少ない電圧源を使用して1つの電源から異なる値の電圧を作成できるその他の手段を用いることにより制御される。

20

**【0036】**

押出機は、印刷面の上に配置することができ、針が使用される場合は、それらを印刷面に向けてもよい。あるいは、押出機を印刷面に直接向けないで、例えば、それらを印刷面に対して直角に向けてもよい。必要に応じて、印刷面は押出機の上または横に配置してもよい。印刷面は、平坦な表面、波状の表面、円筒形のコレクタ、スピニングマンドレル、一連の静止したコレクタ、または任意の形状または一連の形状にしてもよい。印刷面は静止していてもよく、押出機とは独立して、または押出機と連携して動いてもよい。印刷面は必ずしも直接接地する必要はない。印刷面は、表面と接地面との間に配置された抵抗材料または誘電材料を有してもよい。

30

**【0037】**

接地された針または薄い物体を印刷面の下に配置して、印刷された材料の方向を集中させるのを助けるために、局所的な接地点として機能させることができる。この接地された針または薄い物体は、静止しているか、または、印刷面の反対側にある押出機と同期してXY次元で移動しうる。アクティブな押出機とXY次元で同期して移動する1つの目的は、印刷される材料の集中を増やすことである。あるいは、印刷面は、その内部またはその下またはその上に、物体（例えば電極）のアレイを含んでもよく、物体は、互いに独立して接地されてもよい、または、その電圧が電場の形状を制御し押し出された材料の堆積を誘導するために互いに独立して制御され手もよい。これを利用して、材料の堆積の制御に役立ちうる。この場合の印刷面は、誘電性、低コンダクタンス、またはある程度の抵抗を有してもよく、必要に応じて接地されてもよい。

40

**【0038】**

上記の実施形態のいずれかにおいて接地を適用することの代替として、代わりに負の電圧を適用してもよい。さらに、正、負、0、DC、またはACの電圧波形を適用してもよい。

**【0039】**

高電圧は、針の近くの他の電極に印加することができる。1つまたは複数の電極は、例えば、リング、シリンダー、コーン、またはプレートの形状であり得る。これらの電極は

50

、プリントヘッドまたはプリンターフレームまたは他の場所に取り付けることができ、固定されてもよい。それらは、必要に応じて、押出機の動きに対して動かないようにすることができる。必要に応じて、電極は押出機と一緒に移動してもよいが、次いで、自動または手動で別の押出機の近くに移動されうる。これは、異なる電極ごとに同じ電極を使用する場合に有用でありうる。必要に応じて、異なる電極またはプレートに異なる電圧を印可してもよい。電極から押出機出口オリフィスまでの距離は、自動または手動で任意の寸法で必要に応じて増減できる。例えば、押出機の針からの電極の距離は、校正プロセス中に調整できる。別の例として、押出機の針からの電極の距離は、ステッパーモーターおよびねじロッドを使用して、印刷の途中で調整できる。電極は、押し出された材料の焦点を制御するために使用できる。電極はまた、必要に応じて整流子の助けを借りて、所望の速度で押出機の周りを回転させることもできる。必要に応じて、各電極は、アクチュエーターの使用によって、または印刷の前、後、または印刷中のいつでも手動操作によって、独立して移動させてもよい。

10

20

30

40

50

#### 【0040】

1つの実施形態において、押出機の近くの電極は、押し出された材料を協調して堆積させることができるように配置および充電することができる。1つの実施例では、3つの独立した高電源を使用して、押出機の針を囲む3つの電極を充電し、1つの電源を使用して、押出機から材料を断続的に噴射し、各電極の電圧を放出された滴々のそれぞれについて調整して、各液滴を制御された方法で堆積して堆積された液滴のアレイを形成する。3つ以上の電極を使用して、印刷面の特定の場所に材料を誘導することができる。

#### 【0041】

1つの実施形態において、異なる材料を保持する複数のリザーバーは、材料を互いに近接させるための管または針を有する。これは、各材料についてすべての出口オリフィスを、1つの電極または電極グループの中心近くの領域に持つのに有用である。

#### 【0042】

ソフトウェアプログラムを使用して、所望の効果を得るために、さまざまな印刷モダリティを組み合わせる最善の方法を提案または決定できる。ソフトウェアを使用して、所望の結果を得るために、印刷中に電圧波形が時間の経過とともにどのように変化するかを自動的に決定することもできる。例えば、印刷された材料が高さを増すにつれて、印刷中にエレクトロスピングまたはエレクトロスプレー電圧を増加させることが時に望まれる。ソフトウェアプログラムは、必要に応じて、所望の結果を得るために電圧がどのように変更されるかを予測できる。印刷された材料は、高電圧で発生する電界を妨害または減少させる可能性があるため、層が蓄積されるにつれて電圧をどのように増加させるかをソフトウェアプログラムに決定させることが有用である。

#### 【0043】

組織骨格のような構造を印刷する方法は、材料の押出機の出口オリフィスの周囲またはその付近で高電圧の1つ以上の電極を回転させ、同時に、電極に印可される電圧を調整するまたはオリフィスまでの距離のような他のパラメーターを調整することにより実行できる。例えば、押出機の針を高電圧に充電し、銅電極プレートを別の高電圧に設定して針の左側に配置することができる。次いで、材料が押し出されている間、電極を針の周りで高速で回転させることができる。これにより、材料が電極からはじかれ、液滴の糸または流れが印刷面上に円形パターンで堆積される。しかしながら、この方法において押し出し中に電極への電圧が徐々に低下した場合、液滴の糸または流れは徐々に小さな円形パターンで堆積される。流量、電極の回転、および電極の電圧の調整が適切に設定されていれば、電圧を2つのレベルに制御する必要があるだけで、1つの層の印刷を非常に高速で実行できる。

#### 【0044】

印刷の代替方法は、針の周りに静止電極を配置し、調整された電圧をそれらに印加して、材料の流れを印刷面の特定の場所に導くものである。これは、帯電した電子の動きを画面上の正確なスポットに方向づけるときに、ブラウン管テレビが機能する方法に類似する

。

## 【0045】

1つの実施形態では、印刷面は、押出機が並んでいるのと同じ寸法で動くように作動できる平らな薄いシートであり、他の物体のためのスペースを収容する、または、製造装置をより小さく製造することを可能にする。例えば、押出機が左右方向に並行して並んでいる場合（プリンターに面しているユーザーから見て）、印刷面を作動させて同じ左右方向に動かすことができる。印刷中、表面を右端まで移動させて、押出機を印刷面の左半分だけに到達させてもよい。次いで、印刷面の右半分が必要になると、アクチュエーターがステージを左端まで移動させ、押出機が印刷面の右半分にアクセスできる。この方法を使用すると、印刷面の半分を印刷に使用し、残りの半分をEHPD押出機のいずれかまたは任意の他の押出機の校正用の領域として使用できる。あるいは、印刷面の半分を、印刷の前、後、または印刷の途中で、印刷のために押出機を洗浄または準備するさまざまなメカニズムおよび方法を含む洗浄ステーションとして使用してもよい。

10

## 【0046】

印刷面またはそれが取り付けまたは置かれているものは、モジュラー機能を有してもよい。例えば、ユーザーは、1つ以上の蝶ネジを緩めて、印刷面を取り外し、別の面と交換することができる。これは、異なるサイズのペトリ皿や他の種類の容器または表面に異なるステージが必要な場合に有用である。特別な温度制御機能または電気端子または内蔵カメラまたは内蔵電極アレイなどの内臓式機能を持つ印刷面の使用にも有用である。

20

## 【0047】

さらに、装置は、そのハウジングの内部または外部に、シリンジポンプなどの1つまたは複数の容積式ポンプを備えることができる。あるいは、容積式ポンプをプリントヘッド上に配置することもできる。容積式ポンプの目的は、各リザーバーから押し出される材料の流量を制御することである。ポンプは、プリントヘッド上に配置されてもよく、プリンターの内部または外部の任意の場所に配置されてもよい。プリントヘッドから離れて配置される場合、管またはチャネルが材料の流れをプリントヘッドの領域に導き、プリントヘッドと共に取り付けられて移動する。

## 【0048】

1つの実施形態において、分配された材料が、印刷プロセス中に印刷された材料を支持する電気粘性媒体を含むパットに印刷される印刷方法が実行される。パット内の表面間に印加される電圧は、電気粘性媒体の粘度または剪断降伏応力を制御できる。印刷中、電圧を一定のレベルに設定して、印刷された物体を支持する所望の特性を得ることができる。印刷が完了した後、電圧を下げるまたは除去して、印刷された物体を簡単に復元できる。前述の実施形態と同様に、磁気粘性媒体を代わりに使用することができ、粘度または剪断降伏応力は、電場の代わりに磁場によって制御される。磁場の発生源は、磁石または電磁石からのものであり得る。前述の実施形態の代わりに、三次元支持材料は細胞を含んでもよい。支持材料は、流体、ゲル、顆粒状固体、または顆粒状ゲルであり得る。

30

## 【0049】

製造装置はまた、装置が空気圧押出の目的で、または他の従来のバイオプリンティング技術の実行のために、加圧ガスを取り込むことを可能にする設備を備えてもよい。装置はまた、圧力を供給するためのコンプレッサーまたは圧縮ガスチャンバーを備えてもよい。加圧ガスはまた、容積式ポンプを使用する代わりに、EHPDに使用されているリザーバーから材料の流れを作成するためにも使用できる。

40

## 【0050】

リザーバーおよび材料の温度を制御することができる。印刷面の温度も制御することができる。1つの実施形態では、装置は、開閉することができ、閉じたときに気密またはほぼ気密の密閉を作成するドアを有し、その結果、空気がメインチャンバ中へまたはメインチャンバから漏れることはほとんどまたは全くない。清浄な空気をチャンバーに流入させて、チャンバー内を正圧にし、空気が常に出るチャンバーから出て、チャンバーに入らないようにすることを確実にできる（意図的に流入される清浄な空気は除く）。周囲温度

50

、湿度、および周囲空気中のガス濃度は、チャンバードアが閉じているときにも制御でき、gコード、グラフィカルユーザーインターフェイス、またはその他の方法で制御できる。さらに、オプションの機能は、装置外の圧力よりも高いまたは低い圧力内で実験を実行できるように、装置内の圧力を制御することである。例えば、エレクトロスピンニングは、装置内の圧力を真空に近い値に設定しながら行うことができ、エレクトロスピンニング中の溶媒の蒸発速度に影響を与え、最終的には、繊維の直径、多孔度、および印刷物のその他の特性のようなさまざまなことを調整する。

#### 【0051】

製造装置は、ユニットのフレームまたはドアに組み込まれた滅菌可能なグローブを備えてもよく、装置の内部の無菌性を損なうことなく、製造された構造の取り扱いまたは機械の内部との相互作用を可能にする。装置は、そのフレームの一部を、装置と適合するように特別に作製された他の装置のフレームと適合させることができる。これは、ユーザーが印刷された物体を無菌環境を離れることなく別の装置に移動させたい場合に有用でありうる。例えば、装置が各装置のフレームに組み込まれたインターフェイスを介して接続されるので、任意の装置のドアを開く必要なく、ユーザーにより製造装置がバイオリクター、インキュベーター、または他の装置と適合されうる。

10

#### 【0052】

製造装置は、製造装置の機能を充実させるためのいくつかのサブシステムを備える。LEDや複数の光源などの光源をプリントヘッドに取り付けて、硬化性（架橋可能）材料を硬化させるツールとして使用できる。ステッピングモーターなどのアクチュエーターが各押出機またはツールごとに存在し、他の押出機またはツールとは独立して上下に移動させてもよい。1つまたは複数のデジタル顕微鏡を押出機の近くのプリントヘッドに取り付け、押出機に対して固定して、ユーザーがリアルタイムで押出を監視するまたは印刷を監視することを可能にできる。この装置はまた、ソフトウェアベースの自動整準または機械的に作動する自動整準を実行するために、センサー、アクチュエーター、またはその両方を備えてもよい。装置はまた、各押出機オリフィスのXYおよび必要に応じてZ校正を実行するために、センサー、アクチュエーター、またはその両方を備えてもよい。

20

#### 【0053】

オフセット校正の方法は、機械で実行できる。この方法は、1つ以上の超音波トランスミッターおよびレシーバーを使用することで構成される。押出機の針は、Y次元で互いに整列しているトランスミッターおよびレシーバーの近くに移動できる。次に、位置およびセンサーのデータを記録または分析しながら、針をトランスミッターとレシーバーとの間で前後に動かすことができる。データを使用して、Y次元で針の中心を見いだすことができる。これは、X次元について繰り返すことができる。超音波を遮断する材料中の小さいピンホール開口部を、レシーバーの前に配置してもよい。針を動かしてピンホールをふさいでもよく、ピンホールがふさがれなくなるまで針を上方に動かしてもよい。この手順では、位置データが保存または分析され、このデータまたは分析からZオフセットを取得できる。このプロセスを繰り返して、より多くの読み取り値を取得し、結果を平均化してもよい。複数の押出機についてプロセス全体を繰り返すことができる。オフセット校正プロセスおよびその他の校正プロセスは、印刷前、印刷中、または印刷後に行うことができ、ユーザーがいつでも、または印刷中に定期的な間隔で起動できる。トランスミッターとレシーバーとの間の距離は、細かい針の校正から大きいFDMノズルの校正に切り替えるときに有用であるより大きいまたはより小さいツールに適應するように、手動または自動で調整できる。記載されたオフセット校正は、トランスミッターとしてのレーザーまたはLEDおよびレシーバーとしての感光性センサーなどであるがこれらに限定されない、代替のトランスミッターおよびレシーバーを使用して実行することができる。

30

40

#### 【0054】

オフセット校正の代替方法を装置で実行してもよい。ノズルまたは針あるいは他の出口オリフィス（この実施形態において針が使用される）が、2対のセンサー間で自動または手動で動かされうる。センサーは互いに向き合うことができ、XまたはYまたはZ次元に

50

並べられてもよい。各センサーがデータをキャプチャしている間、針はX、Y、またはZ次元でセンサー間を前後に移動されてもよい。データを使用して、針の相対または絶対オフセットを特定しうる。例えば、針はXおよびY次元で前後に移動してもよく、各センサーの出力がほぼ等しくなるまでさまざまなXY座標に移動してもよい。次いで、その座標は、他の針と比較した針の相対オフセットを特定するのに役立つ。使用できるセンサータイプの例には、容量型、静電型、または誘導型が含まれるがこれらに限定されない。針、ノズル、または他の出口構造には、適切なセンサーを使用するときの針、ノズル、または他の出口構造の検出可能性を高めるために、電圧の直接的または間接的な印加によって電荷を与えることができる。

#### 【0055】

上記のオフセットセンシング方法において、およびその他のオフセット校正方法について、1つの次元でオフセットを特定するために使用される同じセンサーを使用して、アクチュエーターでセンサーを90度回転させるだけで、別の次元でオフセットを特定することもできる。例えば、フォトインタラプタを使用して針のYオフセットを検出する場合、フォトインタラプタを90度回転させて、Xオフセットを検出するために使用することができる。別の実施例では、マシンビジョン付きのカメラを使用して針の位置を検出し、90度回転して他の次元における位置を検出する。場合によっては、センサーを180度回転させることが有用でありうる。別の方法では、カメラまたは他の光ベースのセンサーがミラーと組み合わせて使用され、ミラーは、センサーが静止したままになるように入射光または出射光を方向付けるが、複数の次元でのオフセットの特定にも役立つ。上記の方法と同様の別の方法では、検流計を使用して、針または他の構造を異なる方向または角度から感知するのに役立つように入射光または出射光を方向付け、複数の次元でオフセットを特定する。

#### 【0056】

1つの実施形態では、印刷面は、ナノ、マイクロ、またはマクロの特徴を有するように予め機械加工またはパターン化されている。次に、電気流体力学的印刷を使用して、パターン化または機械加工された印刷面上に材料を堆積する。この場合、機械加工またはパターン化された表面はモールドとして機能し、印刷された材料はさまざまな目的に使用できる印刷面の形状をとる。1つの実施例において、印刷面は、マイクロウェルのアレイを有するように機械加工される。エレクトロスピンングが印刷面上に実行され、それ自体がマイクロウェル形状を含むナノファイバーシートを得る。これに続いて、材料をナノファイバーマイクロウェルに印刷できる。材料は、例えば、細胞、ナノ粒子、マイクロ粒子、ヒドロゲル、または液体であり得る。材料は、従来の印刷技術を使用して堆積させることができる、または、堆積は、マイクロウェルの下の電極によってガイドすることができる。次いで、ナノファイバーの別の層を堆積させて、前述の印刷された材料をマイクロウェル中に吸着することができる。次いで、ガントリー上に取り付けられたレーザーが、マイクロウェルをレーザー切断できる。レーザーの代わりに、機械加工された部品を使用して容器を打ち抜くことができる。その結果、例えば、薬物送達、癌検出、または治療における用途のための、ナノ粒子または細胞であり得るペイロードを含む多数のナノファイバー容器が得られる。あるいは、マイクロウェルは機械加工されておらず、代わりに、1つのシートがエレクトロスピンングされ、ペイロードが加えられ、別のシートがエレクトロスピンングされて2つのシート間にペイロードを吸着し、次いで、レーザー切断またはパンチング方法を使用して、エレクトロスピンングされたナノファイバー中に封入されたペイロードを抽出する。必要に応じて、抽出前に、架橋のような後処理ステップが使用される。

#### 【0057】

以下の図（および対応する議論）はまた、本開示の実施形態に追加の文脈を与えるために提供される。

#### 【0058】

図1は、印刷面プラットフォーム1、印刷面2、X、Y、Z可動ガントリー3、およびプリントヘッド4を収容する本発明の実施形態の概略図を示す。機械の外側には、高圧電

10

20

30

40

50

源 # 5、1つまたは複数の容積型ポンプ 6 があり、それぞれが材料フローチューブ # 8 に接続されたシリンジ 7 を収容している。プリントヘッド 4 は、本体 9、1つ以上の入力接続 10、単一のリザーバー 12 中にまとめられる 1つ以上のチャンネル 11、電気コネクタ 13、および、高電圧を液体または液体と接触している導電表面に導く導電基板 14 からなる。

#### 【0059】

各シリンジの流量を調整することにより、特定の比率の各液体を出力オリフィスの近くで混合できる。1つの実施形態において、各シリンジポンプは、各溶液の正の流れを引き起こす。別の実施形態では、1つ以上のシリンジポンプが、溶液の負の流れを引き起こす。1つの実施例では、一方のシリンジは非常に高い濃度のポリマーを有しうののに対し、他方のシリンジは非常に低い濃度を有するかまたは溶媒のみを含みポリマーを含まない。各液体の流量を個別に調整することにより、広範なポリマー濃度を出力で作成できる。これを用いて、印刷されるファイバーのサイズを連続的に調整する、または、ある形態の押出から別の形態（エレクトロスピンニングからエレクトロスプレーなど）に切り替えることができる。あるいは別の例として、3つのタイプの細胞の比率を、バイオ-エレクトロスプレー中に異なる細胞タイプを含むシリンジの流量を変えることによって、変えることができる。これは、細胞タイプの濃度の勾配を持つ細胞の層を印刷するのに有用でありうる。当業者は、プリントヘッド # 4 が複数の材料入力を有してもよく、多数の入力からの出力が、材料が構築表面に堆積される前にプリントヘッドの内部または外部で任意に混合してもよいことを認識するであろう。

10

20

#### 【0060】

図 2 は、プリントヘッド 4 の内部混合バージョンを示し、ここで 3 つのチャンネルが合流した後に混合チャンネル 15 が追加され、入力液体がより良好に混合される。また、チャンネルの開閉を制御できるバルブ 16 も示されている。必要に応じて、バルブは、液体の流れが空気圧で駆動される場合に流量制御バルブとして機能することにより流量を制御できる。

#### 【0061】

図 3 は、プリントヘッド # 4 のマニホールスタイルバージョンを示し、ここで 1 つの入力チャンネル 11 がプリントヘッド 4 内の複数のチャンネルアレイ 17 に分割され、各チャンネルアレイ 17 は、多くの構築材料が出る開口部へ構築材料を導く。この実施形態の目的は、繊維の高速大量生成を含む理由のためおよび / または繊維性構築物のより均一な作製のため、単一のチャンネル 11 から複数のナノ繊維またはナノ粒子を生成することである。

30

#### 【0062】

図 4 は、複数の入力 20 および 1 つの出力を備えた圧電アクチュエーター（ポンプ）を含むプリントヘッド 4 の代替実施形態の断面図である。プリントヘッドは、圧電アクチュエーター 19 を備えた本体 18 を有する。プリントヘッド 4 はまた、精密針堆積チップ 24 を備えた導電性の取り外し可能な出口 23 を有する。各入力にはチェックバルブ 21 を有し、出力は必要に応じてチェックバルブ 22 を有する。導電性の取り外し可能な出口 23 は、図示されていないらせん状混合インサートを含むことができる。

40

#### 【0063】

図 5 は、3D印刷面 2 の別の実施形態の断面図であり、ライナー材料 26、ペイロード 27 およびキャッピング材料 28 を受容するためのウェルを備えた精密輪郭表面 25 を特徴とし、これらは次に 3D印刷後にダイ 29 でダイカットされる、あるいは、レーザーまたはウォータージェットでカットされてもよい。ライナー材料 26 およびキャッピング材料 28 は、生分解性ポリマーと共にエレクトロスピンニングまたはエレクトロスプレーされてもよく、ペイロード 27 は、エレクトロスプレーされたナノ粒子から構成されてもよい。

#### 【0064】

図 6 ~ 15 は、本開示についてのさらなる文脈を提供するためのさらに追加の態様を示している。これらの図には特定の実施例が示されているが、本開示はこれらの例だけに限

50

定されない。

【0065】

図6は、本開示の実施形態による、複数の押出技術を収容するバイオプリンティングプラットフォームを示す。印刷プロセスの前または最中に、バイオプリンターおよびバイオプリンティングプロセス自体のさまざまな機能およびパラメーターを制御するために、タッチスクリーンが備えられる。

【0066】

図7は、本開示の実施形態による、FDM押出機を使用して印刷された多孔性の移植可能な耳の骨格を示す。これは、生分解性および生体吸収性のポリマーから印刷され、ミクロティア病の治療に応用される。

10

【0067】

図8は、本開示の実施形態による、3つの空気圧押出機を使用した三重同心円形プリントを示す。

【0068】

図9は、本開示の実施形態による、ヒドロゲル材料を有する鼻形状のプリントを示す。

【0069】

図10は、本開示の実施形態による、PDMSをFDM印刷されたABSモールドに鋳造することによって形成された柔軟な耳形状のPDMS構造を示す。

【0070】

図11は、本開示の実施形態による、可撓性の薄い管状のPDMS構成物を示す。

20

【0071】

図12は、本開示の実施形態による、金属ロッドから引っ張られているナノファイバー血管骨格を示す。

【0072】

図13は、本開示の実施形態による、電気流体力学的プリントヘッドで印刷された、互いに垂直に整列したナノファイバーを示す。これらの整列されたファイバーは、印刷面またはガントリーの移動なしで印刷されたが、代わりにいくつかの電極を使用してリアルタイムで電界を制御することにより自己組織化された。

【0073】

図14は、本開示の実施形態による、血管直径が実質的に血管の中央に向かって減少する血餅をシミュレートするために印刷された血管モデルを示す。

30

【0074】

図15は、本開示の実施形態による、分岐血管モデルを示す。

【0075】

本開示は、特定の実施形態および概して関連する方法を説明してきたが、これらの実施形態および方法の変更および置換は、当業者には明らかであろう。したがって、例示的な実施形態の上記の説明は、本開示を定義または制約しない。非限定的な例として、当業者は、他の材料の分配および構築手段が、正の材料変位、インクジェット変位、圧電変位、レーザー硬化、マイクロバルブ変位、紫外線硬化、および溶着手段を含むがこれらに限定されない主要な電気流体力学的手段と組み合わせてもよいことを認識するであろう。別の非限定的な例として、本開示の特定の実施形態は、電界の強さ（例えば構築表面上に蓄積する過剰な材料）の低下を検出し、それに比例して電圧を増加させる。以下の特許請求の範囲によって定められるように、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、他の変更、置換、および代替も可能である。

40

【 図 1 】

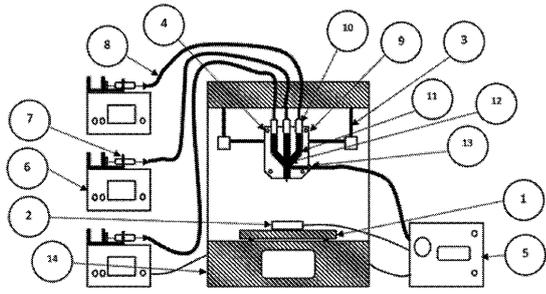


FIG. 1

【 図 3 】

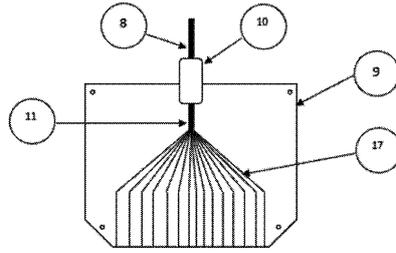


FIG. 3

【 図 2 】

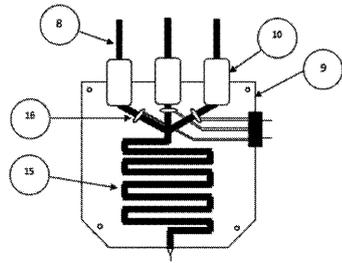


FIG. 2

【 図 4 】

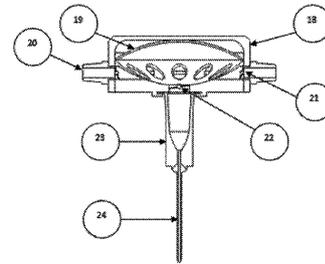


FIG. 4

【 図 5 】

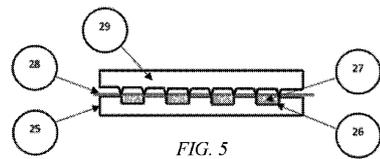


FIG. 5

【 図 7 】



FIG. 7

【 図 6 】

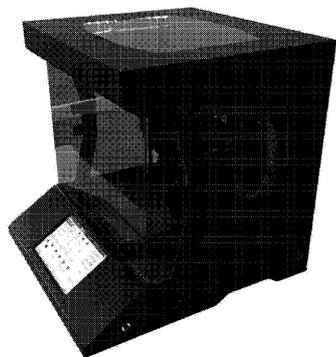


FIG. 6

【 図 8 】

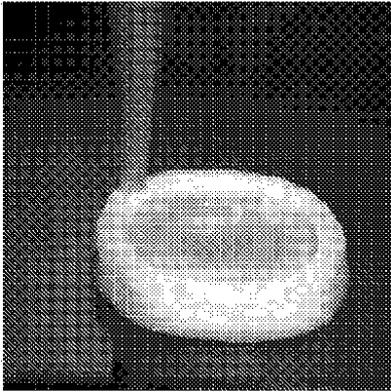


FIG. 8

【 図 9 】



FIG. 9

【 図 1 0 】

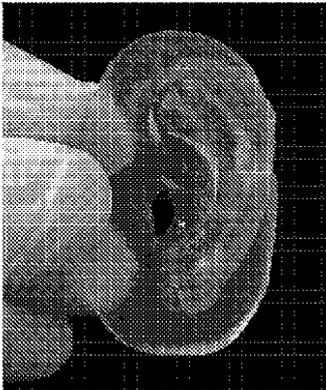


FIG. 10

【 図 1 1 】

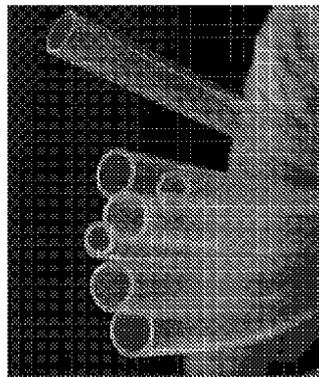
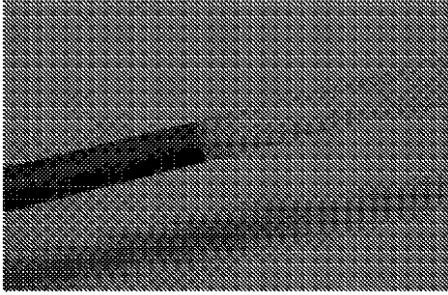


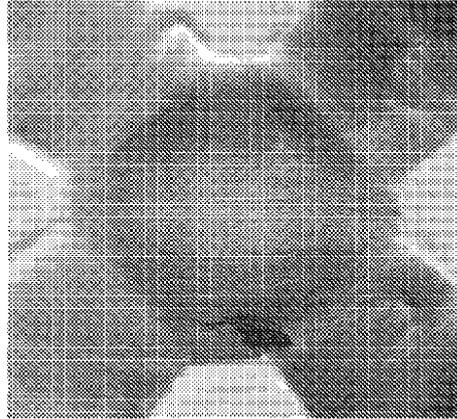
FIG. 11

【 図 1 2 】



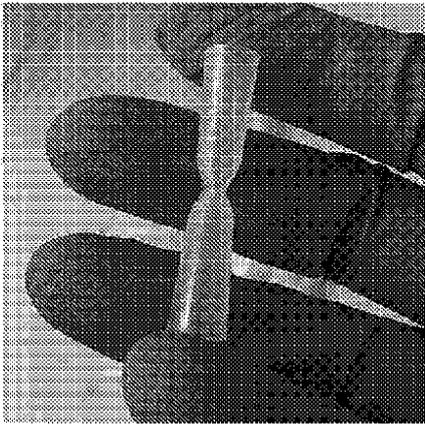
*FIG. 12*

【 図 1 3 】



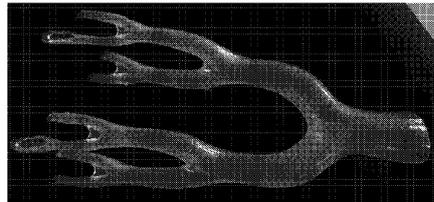
*FIG. 13*

【 図 1 4 】



*FIG. 14*

【 図 1 5 】



*FIG. 15*

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/021834

<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 26-29 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: See extra sheet(s).	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-25, 30-32
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2019/021834

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - B29C 64/20; B29C 64/10; B29C 64/30; B33Y 30/00 (2019.01) CPC - B29C 64/20; B29C 64/10; B29C 64/30; B29C 64/393; B33Y 30/00; B33Y 40/00 (2019.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 264/405; 264/465; 425/174; 425/375 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2016/0095959 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.) 07 April 2016 (07.04.2016) entire document	1-4, 6, 7, 9-14, 17, 18, 21, 30, 31
Y	US 2016/0068793 A1 (SARTORIUS STEDIM BIOTECH GMBH) 10 March 2016 (10.03.2016) entire document	1-4, 6, 7, 9-14, 17, 18, 21, 30, 31
Y	US 2015/0174824 A1 (GIFFORD et al) 25 June 2015 (25.06.2015) entire document	11
Y	US 2016/0200052 A1 (CARBON3D, INC.) 14 July 2016 (14.07.2016) entire document	30
A	CN 106222085 A (XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY) 14 December 2016 (14.12.2016) see machine translation, Fig. 1	1-25, 30-32
A	CN 106012052 A (THE SECOND AFFILIATED HOSPITAL OF SUZHOU UNIVERSITY) 12 October 2016 (12.10.2016) see machine translation, Fig. 1	1-25, 30-32
A	US 2017/0037349 A1 (ORGANOVO INC) 09 February 2017 (09.02.2017) entire document	1-25, 30-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 18 June 2019	Date of mailing of the international search report 10 JUL 2019	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/021834

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: Claims 1-25 and 30-32 are drawn to devices for fabricating three-dimensional organic constructs, or biological objects.

Group II: Claims 33-41 are drawn to methods for fabricating three-dimensional organic constructs, or biological objects.

The inventions listed in Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I, devices for fabricating three-dimensional organic constructs, or biological objects, are not present in Group II; and the special technical features of Group II, methods for fabricating three-dimensional organic constructs, or biological objects, are not present in Group I.

Groups I and II share the technical features of a method for fabricating three-dimensional organic constructs, or biological objects, from one or more fluidic mediums capable of organic synthesis and/or solidification whose deposition is directed by a digital representation of the object, the method comprising: selectively dispensing material utilizing a combination of electro-hydrodynamic and one or more bioprinting depositing systems; forming, from the selective dispensing, successive cross-sectional laminae of said object at a two-dimensional interface; and extracting the three-dimensional object from a surface. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, CN 106012052 A to The Second Affiliated Hospital of Suzhou University teaches a method for fabricating three-dimensional organic constructs, or biological objects, from one or more mediums (Abstract, The invention discloses a device for manufacturing an artificial blood vessel through combination of bio-printing and electro-spinning technologies...the device has the following benefits: during operation, when the material release unit uses a bio-printing nozzle, a first stepping motor controls an extrusion pump to extrude out a cell-containing hydrogel material in a storage tank, and the extrusion pump can realize setting and controlling of the material release speed and quantity by the control unit; the vertical moving platform controls relative displacement of the whole material release unit to the rotary receiving unit, and can conduct vertical up-and-down displacement (such as 0.1 mm, 0.5 mm, 5 mm and continuous displacement), the displacement can be adjusted according to the extrusion requirement, and the distance between the bio-printing nozzle and the rotary receiving unit is adjusted through the displacement; the bio-printing nozzle and electro-spinning nozzles can work simultaneously or alternately, which is adjusted by the control unit according to actual demands; Pg. 4 in 5th and 6th Paras., When the material releasing unit the spray head is an electro-spinning, electrostatic spinning nozzle injection pump is connected to a trace amount, an external high voltage power supply; rotatable receiving unit for receiving the shaft of a metal material is grounded; rotatable receiving unit is driven to rotate a rotating electrical machine, the level of a horizontal movement motor driving a drive shaft, the rotational speed is made to set and control computer...all of the entire apparatus is controlled by the control unit modes of control of the motor, the control unit when the integrated with a corresponding computer control software. Through the adjustment of the receiving unit of rotation compliance material releasing unit and the vertical and horizontal relative movement of the mobile platform and mobile platform, biologic object of manufacture the prosthesis), the method comprising: selectively dispensing material utilizing a combination of electro-hydrodynamic and one or more bioprinting depositing systems (Abstract, ...the bio-printing nozzle and electro-spinning nozzles can work simultaneously or alternately...).

Further, US 2017/0037349 A1 to Organovo, Inc. teaches fluidic mediums capable of organic synthesis and/or solidification whose deposition is directed by a digital representation of the object (Para. [0058]. As used herein, in some embodiments, the term "engineered," when used to refer to tissues and/or organs means that cells, cell solutions, cell suspensions, cell-comprising gels or pastes, cell concentrates, multicellular aggregates, and layers thereof are positioned to form three-dimensional structures by a computer-aided device (e.g., a bioprinter) according to computer code; Para. [0110]. ...a computer module receiving input of a visual representation of a desired tissue construct...; Paras. [0005] and [0006]. In one aspect, disclosed herein are bioprinters comprising: one or more printer heads, wherein a printer head comprises a means for receiving and holding at least one cartridge, and wherein said cartridge comprises contents selected from one or more of: bio-ink and support material; a UV light module for optionally exposing the contents of at least one cartridge to UV light; and a means for dispensing the contents of at least one cartridge...in some embodiments, the bio-ink or support material comprises one or more UV cross-linkable materials...wherein the bio-ink comprises a UV cross-linkable material and has been exposed to UV light to partially or completely cross-link the UV cross-linkable material to form a semi-solid or solid body...; Para. [0028]..."bio-ink" means a liquid...composition comprising a plurality of cells), forming, from dispensing, successive cross-sectional laminae of an object at a two-dimensional interface (Para. [0058]. As used herein, in some embodiments, the term "engineered," when used to refer to tissues and/or organs means that cells, cell solutions, cell suspensions, cell-comprising gels or pastes, cell concentrates, multicellular aggregates, and layers thereof are positioned to form three-dimensional structures by a computer-aided device (e.g., a bioprinter) according to computer code; Para. [0060]. ...a repeating pattern of bioprinted function units comprises a layer and a plurality of layers are bioprinted adjacently (e.g., stacked) to form an engineered tissue or organ), and extracting a three-dimensional object from a surface (Para. [0006]. ...methods of fabricating a tissue construct comprising the steps of: depositing bio-ink onto a support, wherein the bio-ink comprises a UV cross-linkable material and has been exposed to UV light to partially or completely cross-link the UV cross-linkable material to form a semi-solid or solid body; and incubating the bio-ink to allow it to cohere and to form a tissue, wherein said incubation has a duration of about 1 hour to about 10 days; to implant the tissue construct into the body, the tissue construct must be removed from the support surface it is deposited on).

The inventions listed in Groups I and II therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>B 3 3 Y</b>	<b>30/00</b>	<b>(2015.01)</b>	B 3 3 Y	30/00
<b>B 3 3 Y</b>	<b>50/02</b>	<b>(2015.01)</b>	B 3 3 Y	50/02
<b>B 3 3 Y</b>	<b>70/00</b>	<b>(2020.01)</b>	B 3 3 Y	70/00
<b>C 1 2 M</b>	<b>3/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 M	3/04 A

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

Fターム(参考) 4F213 WA25 WB01 WL02 WL22 WL32 WL74 WL85