

(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2015-527428

(P2015-527428A)

(43) 公表日 平成27年9月17日(2015.9.17)

(51) Int. Cl.		F I			テーマコード (参考)	
C 0 8 J	7/18	(2006.01)	C 0 8 J	7/18	C E S	4 B 0 2 9
C 1 2 M	1/22	(2006.01)	C 1 2 M	1/22		4 F 0 7 3
C 1 2 M	3/00	(2006.01)	C 1 2 M	3/00	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2015-518730 (P2015-518730)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月28日 (2013.6.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月17日 (2015.2.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2013/000710
 (87) 国際公開番号 WO2014/000052
 (87) 国際公開日 平成26年1月3日 (2014.1.3)
 (31) 優先権主張番号 2012902793
 (32) 優先日 平成24年6月29日 (2012.6.29)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 508095474
 ポリマーズ シーアールシー リミテッド
 Polymers CRC Ltd.
 オーストラリア国, ビクトリア 3168
 , ノッチングヒル, レッドウッド ドライ
 ブ 8
 8 Redwood Drive, No
 tting Hill, Victori
 a 3168, Australia
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100162352
 弁理士 酒巻 順一郎
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリマー表面を改質する方法

(57) 【要約】

ポリマー表面を改質する方法であって、
 ポリマー表面を、少なくとも1つのエチレン性不飽和モノマーを含む溶液に接触させるステップ；及び溶液と接触しているポリマー表面を紫外線光で露光して、ポリマー表面にコーティングされた、モノマーのグラフトポリマーを得るステップを含む方法。

【選択図】 図 1 0

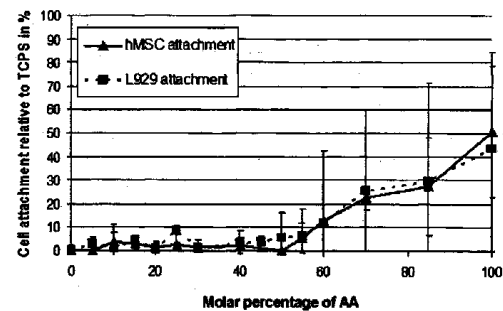


FIG 10

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ポリマー表面を改質する方法であって、
ポリマー表面を、少なくとも 1 つのエチレン性不飽和モノマーを含む溶液に接触させる
ステップ、及び

前記溶液と接触している前記ポリマー表面を紫外線光で露光して、前記ポリマー表面に
コーティングされた、前記モノマーのグラフトポリマーを得るステップ
を含む、方法。

【請求項 2】

前記ポリマー表面を露光する前記ステップが、前記ポリマー表面を紫外線光で間欠的に
露光することを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

間欠的に前記表面を露光することが、少なくとも 3 回の、0.5 秒～3 分の範囲の UV
露光期間を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

間欠的に前記表面を露光することが、少なくとも 3 回の、1 秒～60 秒の範囲の UV 露
光期間を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

間欠的に前記表面を露光することが、5 秒～60 分の範囲の露光の間隔を含む、請求項
2 又は 3 に記載の方法。

20

【請求項 6】

間欠的に前記表面を露光することが、10 秒～5 分の範囲の露光の間隔を含む、請求項
2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 7】

間欠的に前記表面を露光することが、少なくとも 3 回の、1 秒～15 秒の範囲の UV 露
光期間と、1 秒～60 秒の範囲の露光の間隔とを含む、請求項 2～6 のいずれか一項に記
載の方法。

【請求項 8】

前記ポリマー表面及び前記溶液がそれぞれ、開始剤を実質的に含まない、請求項 1～7
のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記溶液が水性である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記溶液が、水混和性溶媒をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

不活性ガス雰囲気下で実施される、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記ポリマー表面が、ヘテロ原子を含まない飽和ポリマーで形成されている、請求項 1
～11 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記ポリマー表面が、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、エチレン -
オレフィンコポリマー、ポリスチレン、スチレンコポリマー、ポリイソプレン、ポリブ
タジエン、ポリクロロブレンゴム、ポリイソブチレンゴム、エチレン - プロピレンジエン
ゴム及びイソブチレン - イソプレンコポリマーからなる群から選択される、少なくとも 1
つのポリマーから形成される、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記ポリマー表面がポリスチレンで形成され、
1 秒～60 秒の範囲の間隔をおきながら 1 秒～15 秒の範囲の期間の紫外線光で少なく
とも 3 回露光することを含んで、前記表面を露光する、
請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 15】

少なくとも1つの前記エチレン性不飽和モノマーが、カルボン酸官能基を含有する第1のモノマー、及び生物付着性が低い第2のモノマーを含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記第1のモノマーが、アクリル酸、メタクリル酸及びアクリル酸2-カルボキシエチルからなる群から選択される少なくとも1つを含み、

前記第2のモノマーが、アクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)(メタ)アクリレート、メトキシポリ(エチレングリコール)(メタ)アクリレート、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド及び2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンからなる群から選択される少なくとも1つを含む、

請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

第1のモノマーとしてのアクリル酸と、第2のモノマーとしてのアクリルアミドとを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 18】

前記溶液中での前記第1のモノマー対前記第2のモノマーのモル比が、20:80～90:10の範囲である、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法

【請求項 19】

ポリマーコーティングが、細胞培養に使用される、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

請求項1～19のいずれか一項に記載の方法に従って改質したポリマー表面を含む、細胞培養プレート。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[分野]

本発明は、ポリマー表面を改質して、グラフトしたポリマーコーティングを提供する方法に関する。

【0002】

[背景]

ポリマーコーティングを塗布することによる基材表面の改質は、界面の性質、例えば表面エネルギー(例えばぬれ挙動)、透過性、生物活性、及び化学反応性を制御する、多目的及び効率的な手段である。ポリマーコーティングを塗布した結果、基材に与えられ得る利益は、化学物質検知能力、耐摩耗性、気体遮断性の向上、タンパク質耐性、生体適合性、細胞増殖及び分化の助長、並びに生体分子に選択的に結合する能力を含むが、それらに限定されない。したがって、そのようなポリマーコーティングを形成する方法は、大きな実益となる。

【0003】

例えばポリマー材料、例としてポリスチレンは、優れた成形性、透明度を有し、コストが低く、細胞培養基材、例えばマルチウェルプレート、フラスコ及びマイクロ担体粒子の形成に理想的である。しかし、官能基がない疎水性表面は、細胞及びタンパク質の相互作用を制御する能力が限定される。

【0004】

表面の改質は、生体適合性を向上させ、細胞結合又は選択を支援する官能基を付着させるために使用される。親水性ポリマーブラシをグラフトすることで改質した基材材料により、細胞培養用途の性質を著しく向上させることができる。いくつかの表面グラフト技術、例えば 線、電子ビーム及びUVにより開始するグラフトが研究されているが、コーティング性、最終的に生物学的応答を申し分なく制御する、経済的な処理方法を得る必要が

10

20

30

40

50

ある。

【0005】

ポリマー表面でポリマーコーティングを形成する一手法は、物理的又は化学的な吸着技術を使用することによる。物理的な吸着技術は、きわめて一般的に使用されており、ディップコーティング、ドロップキャストリング、スピンコーティング、ドクターブレード法による膜の塗布、及びロールツーロールコーティングを含む。しかし、そのようなコーティングは、ある化学的及び/又は物理的な環境（例えば有機溶媒、温度変化及び/又は機械的摩擦）に曝露した際に層間剥離を起しがちである。

【0006】

ポリマーコーティングを形成する代替手法は、ポリマー鎖の基材表面への共有結合に関与する。前述の吸着技術とは異なり、ポリマー鎖の基材への共有結合は、化学的又は物理的な手段によりコーティングに層間剥離を起こさせにくくする。ポリマー鎖を基材へと共有結合させる特定の一方法は、基材にポリマーコーティングを形成するために、いわゆる「対象へとグラフトする」技術を利用する。この技術により予備成形されたポリマー鎖は、基材表面に共有結合する。しかし、基材表面の結合部位における拡散限界及び立体制限のため、この技術は、相対的に乏しいグラフト密度しか得られなくなりがちである。さらに、この技術により達成できるコーティングの厚さは限定される。

【0007】

ポリマー鎖は、いわゆる「対象からグラフトする」技術を使用して、基材表面にもグラフトできる。「対象へとグラフトする」技術とは異なり、「対象からグラフトする」技術は、基材表面でのモノマーの重合に関与して、表面「から」ポリマー鎖を作り出す。この技術は、「対象へとグラフトする」技術の拡散限界及び立体制限を起こしにくく、それによって、グラフト密度を、より容易に、相対的に高くできる。しかし、「対象からグラフトする」技術は、複雑になり、複数のステップを必要とすることに度々悩まされている。特に、グラフトポリマーを用いてコーティングした基材表面を、何らかの方法で改質、又は活性化して、例えば、フリーラジカル重合を進展可能とすることが一般的に必要なであろう。したがって、基材表面に、成長又はコロナ放電前処理を施して、必要とされるラジカル部位を得ることができる表面における官能基の形成を促進する必要がある。或いは、フリーラジカル開始剤化合物は、グラフトされる基材表面に固定化され得る。「対象からグラフトする」技術の多くも、三次元表面に均一なポリマーコーティングを効果的に、及び効率的に形成することができない。さらに、コーティングの厚さは、比較的狭い範囲内でしか制御できないことが多く、コーティングの厚さは、典型的には、多数の要因により測定される場合、制御を達成することは困難になり得る。したがって、基材にグラフトポリマーのコーティングを形成するために、従来技術を改善する、すなわち最低限でも、そのようなグラフトポリマーのコーティングを調製する有用な代替方法を提供する余地が残っている。

【0008】

本明細書に含まれる文書、作用、材料、装置、物品などの考察は、本発明の背景を示す目的のためにすぎない。これらの、いくつか又はすべての事柄は、部分的に従来技術の根拠で形成されたこと、又は、本出願の各請求項の優先日より前に存在する、本発明に関連した分野の一般知識であったことは示唆されない、又は表されない。

【発明の概要】

【0009】

本発明者らは、ポリマー表面を改質する方法を提供し、この方法は；
ポリマー表面を、少なくとも1つのエチレン性不飽和モノマーを含む溶液に接触させるステップ；及び
溶液と接触しているポリマー表面を紫外線光で露光して、ポリマー表面のコーティングとしてモノマーのグラフトポリマーを得るステップ
を含む。

【0010】

10

20

30

40

50

ポリマー表面及び溶液は、開始剤を含まないことが好ましい。

【0011】

一組の実施形態において、エチレン性不飽和モノマー溶液は、1つ又は複数の水混和性溶媒を場合により含む水溶液である。したがって、一般的に、この実施形態では、エチレン性不飽和モノマーは少なくとも難水溶性であること、より好ましくは水溶性であることが好ましい。

【0012】

表面の紫外線光での露光は、一般的に、UV照射へのパルス又は間欠露光であろう。ポリマー表面を、エチレン性不飽和モノマー溶液に接触させながら、紫外線光で間欠的に露光する場合、UVグラフトを使用するとエチレン性不飽和モノマー、特にポリマー表面上の水溶性エチレン性不飽和モノマーによるグラフト構造は著しく改善したことを本発明者らは見出した。

10

【0013】

本発明は、ポリマー表面を紫外線光でパルス又は間欠的に露光するステップを含み得る。ポリマー表面を紫外線光で間欠的に露光するステップは、特に好ましく、エチレン性不飽和モノマーから形成されるグラフトポリマーの構造に著しい利点を示すことが見出されている。ポリマー表面を間欠的に露光することによって示される構造は、水性環境におけるコーティングの膨張を改善させる（連続露光により調製される、対応するグラフトポリマーコーティングと比較した場合）。

【0014】

20

理論に束縛されることを望むものではないが、ポリマー表面を紫外線光で間欠的に露光することにより、紫外線光での露光期間中に形成されるポリマー層と紫外線光への非露光期間中に形成されるポリマー層との間の構造に差が生じると本発明者らは考える。

【0015】

本明細書で使用されている間欠露光という用語は、少なくとも約0.5秒、より好ましくは少なくとも約1秒、より好ましくは少なくとも約2秒のUV光露光の持続期間（オン期間）を指す。露光の持続時間（オン期間）は約3分まで、より好ましくは約60秒まで、及びさらにより好ましくは約45秒までであってよい。露光の間隔（オフ期間）は、約60分まで、より好ましくは約30分まで、さらにより好ましくは約10分まで、例えば5分まで、2分まで及び1分までの持続時間であってよい。露光の間隔（オフ期間）は、少なくとも約5秒、好ましくは少なくとも約10秒、より好ましくは少なくとも約15秒、より好ましくは少なくとも約20秒、より好ましくはさらに少なくとも約25秒の持続時間であってよい。

30

【0016】

この方法の一組の実施形態において、ポリマー表面を紫外線光で間欠的に露光するプロセスは、0.5秒～3分の範囲のUV露光期間を含み、露光時間は5秒～60分の範囲である。紫外線光での露光回数は、一般的に少なくとも3回の露光である。実施形態のさらなる一組において、このプロセスは、ポリマー表面の間欠露光を含み、表面を、水溶液と接触させつつ、0.5秒～5分、例えば0.5秒～3分の範囲で持続させた、5～100回の範囲の紫外線光での露光を施すサブステップを含み、露光間の時間的なずれは、1秒～60分の範囲、例えば5秒～60分又は10秒～5分である。

40

【0017】

パルス露光という用語は、0.05秒未満の露光期間（オン期間）を指し、0.05秒未満の露光間隔を伴う。10 μ 秒～300 μ 秒のパルス幅（オン期間に加えてオフ期間）は、産業用のフラッシュランプシステムを使用して得ることができる。

【0018】

「グラフト」ポリマーとは、ポリマー表面の少なくとも表面に共有結合するポリマー鎖を意味する。グラフトしたポリマー鎖は、ホモポリマー鎖又はコポリマー鎖であってよい。「コーティング」であるグラフトポリマーとは、ポリマー表面の表面に共有結合して、まとめてグラフトポリマーの層を形成する複数のポリマー鎖を意味する。グラフトポリ

50

マー鎖は、架橋結合していてもよい。コーティングは、一般的に、ポリマー表面のグラフトした領域の表面性質を改質するものである。

【0019】

本明細書の説明及び請求項を通して、「含む」及びこの文言の変化形、例えば「含むこと (comprising)」及び「含む (comprises)」は、他の添加物、成分、整数又はステップを排除することを意図していない。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明の方法によってポリマーコーティングがグラフトできるポリマー表面が提供される。適切なポリマー表面の例は、ポリオレフィン、例えばポリエチレン及びポリプロピレン、ポリイソブチレン及びエチレン - オレフィンコポリマー、シリコンポリマー、例えばポリジメチルシロキサン；アクリルホモポリマー及びコポリマー、例えばポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリル酸エチル；ハロゲン化ビニルホモポリマー及びコポリマー、例えばポリ塩化ビニル；フルオロポリマー例えばフッ化エチレン - プロピレン；ポリビニルエーテル、例えばポリビニルメチルエーテル；ポリハロゲン化ビニリデン、例えばポリフッ化ビニリデン及びポリ塩化ビニリデン；ポリアクリロニトリル、ポリビニルケトン；ポリビニル芳香族、例えばポリスチレン、ポリビニルエステル、例として酢酸ビニル；互いのビニルモノマー及びオレフィンのコポリマー、例えば、エチレン - メタクリル酸メチルコポリマー、アクリロニトリル - スチレンコポリマー、ABS樹脂、及びエチレン - 酢酸ビニルコポリマー；ブタジエンスチレンコポリマー、ポリイソブレン、ポリブタジエン、ブタジエン - アクリロニトリルコポリマー、ポリクロロブレンゴム、ポリイソブチレンゴム、エチレンプロピレンジエンゴム、イソブチレン - イソブレンコポリマー及びポリウレタンゴムを含む、天然及び合成ゴム；ポリアミド、例えばナイロン66及びポリカプロラクタム；ポリエステル、例えばポリエチレンテレフタレート、アルキド樹脂；フェノール - ホルムアルデヒド樹脂；尿素 - ホルムアルデヒド樹脂、メラミン - ホルムアルデヒド樹脂；ポリカーボネート；ポリオキシアルキレン、例えばポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン及びそれらのブロックコポリマー；ポリイミド；ポリエーテル；エポキシ樹脂、ポリウレタン；羊毛；綿；絹；レーヨン；レーヨントリアセテート；セルロース、酢酸セルロース、酪酸セルロース；酢酸酪酸セルロース；セロハン；硝酸セルロース；プロピオン酸セルロース；セルロースエーテル；カルボキシメチルセルロース；タンパク質、ポリペプチド；並びにポリサッカリドからなる群から選択される、1つ又は複数のポリマーを含む表面を含むが、それらに限定されない。

【0021】

いくつかの実施形態において、ポリマー表面は、飽和炭素 - 炭素結合のみからなるポリマー表面であり、二重又は三重炭素 - 炭素結合を含まない。そのようなポリマー表面において、存在する最小の結合エネルギーは、典型的には、不飽和炭素 - 炭素結合を含むポリマー表面より大きい。そのようなポリマー表面の例は、ポリオレフィン、例えばポリエチレン及びポリプロピレン、ポリイソブチレン及びエチレン - オレフィンコポリマー、並びにポリビニル芳香族、例えばポリスチレン、スチレンコポリマー、ポリイソブレン、合成ポリイソブレン、ポリブタジエン、ポリクロロブレンゴム、ポリイソブチレンゴム、エチレン - プロピレンジエンゴム並びにイソブチレン - イソブレンコポリマーを含む基から選択できる。

【0022】

本発明の方法による、ポリマー表面及びエチレン性不飽和モノマーの溶液は、ラジカル開始剤を実質的に含まない。「ラジカル開始剤を実質的に含まない」ということは、ラジカル開始剤自体がポリマー表面又はエチレン性不飽和モノマー溶液に含まれない、又は導入されないことを意味する。例えば、重合はラジカル開始剤なしで行うことができる。

【0023】

当業者は、一部のモノマーをUV照射で露光した場合、分解されてラジカル種が得られることを理解するであろう。あらゆる疑念を回避するために、重合されてグラフトポリマ

10

20

30

40

50

ーコーティングを形成するモノマーは、ラジカル開始剤の定義内に入れられることを意図するものではない。「ラジカル開始剤」という表現は、フリーラジカルを作り出す目的のために主に使用され、光開始剤、例えばベンゾフェノン及びアセトフェノン誘導体、例えばジエトキシアセトフェノン並びに他のラジカル開始剤、例えばアゾ開始剤及び過酸化物を含む化合物を意味するように意図されている。

【0024】

表面は、あるプロセス、例えばコロナ放電によって処理できた。そのような処理プロセスは、本方法を使用して改質できるポリマー物品、例えば膜又は細胞培養プレートの製造に使用されることが多い。一般的に、コロナ放電の効果の継続は比較的短いので、保存してから表面が不活化される。

【0025】

改質されるポリマー表面は、本発明の方法が加えられる物品の全体又は一部のみを構成できる。例えば、グラフトポリマーコーティングは、ポリマー表面の少なくとも一部に形成できる。物品がポリマーで形成される場合、ポリマーの大部分は、物品の機械的性質が維持されるように改質されないままであってよい。或いは、改質されるポリマー表面は、それ自体が基材にコーティングとして存在してもよい。基材は、ポリマー、或いは非ポリマー基材、例えばガラス、セラミック又は金属基材であってよい。

【0026】

いくつかの実施形態において、ポリマー表面は、細胞の培養に使用される物品に、又は物品の一部に存在する。細胞培養装置は、当業界で公知の構造的形態の範囲であってよい。そのような構造的形態は、多様なウェル、例えば6、12、24、48、96、1536又はそれより多いウェルを含む培養プレート、例えばマイクロタイター又はマイクロウェルプレート及び細胞培養フラスコを含む。基材は、担体粒子、例えばマイクロ担体粒子の形態であってもよい。これらの実施形態において、改質される基材表面は透明であることが好ましい。

【0027】

理論により限定されることを望むものではないが、本発明によるエチレン性不飽和モノマーの重合は、主に、ポリマー表面で発生し、その結果ポリマーがポリマー表面からグラフトされると考えられる。ポリマーが主にポリマー表面からグラフトされることで、同様に、少なくともコーティング効率の制御の改善が実現できると考えられる。

【0028】

複雑さがないため、本発明に従った方法は、比較的低い運用及び資本コストで、有利に行うことができる。さらに、形状及び大きさが変動した基材の表面、特に三次元表面を提示する基材の表面において比較的広い範囲の厚さで、グラフトポリマーコーティングを制御された手段にて形成する際に、本発明の方法は特に有効であることが見出されている。ポリマー表面及びモノマーでは、大幅な変動も起こり得る。

【0029】

本発明の方法は、ポリマー表面と、少なくとも1つのエチレン性不飽和モノマーを含む溶液を接触させるステップを含む。溶液は、水性、部分的に水性、又は非水性であってよい。いくつかの実施形態において、溶液は、少なくとも部分的に水性であり、少なくとも1つの水混和性有機溶媒をさらに含むことが好ましい。他の実施形態において、溶液は水性であることが好ましい。最適な溶液の選択は、ポリマー表面、エチレン性不飽和モノマー、及びポリマーコーティングの意図される用途によって決まるであろう。

【0030】

溶液は、1つ又は複数の溶媒、例えば水、水混和性溶媒又はそれらの2種以上の混合物を含み得る。水混和性溶媒の例は、亜硫酸ジメチル(DMSO)、ジメチルホルムアミド(DMF)、アセトニトリル、アセトン及びアルコール、例えばエタノール及びイソプロパノールを含む。1つ又は複数の水混和性溶媒がエチレン性不飽和モノマー溶液に存在する場合、溶媒は、重合反応、ポリマー表面、又は生じたグラフトポリマーコーティングに悪影響を与えないように選択されるであろう。

10

20

30

40

50

【0031】

本発明の方法は、従来の有機溶媒に基づく重合反応と対照的に、環境に配慮したエチレン性不飽和モノマー水溶液を使用して有利に行われる。さらに、水溶液は、有機溶媒をベースとした反応媒体が使用される際に利用できるものと比較して、より広い範囲のポリマー表面と適合する。水溶液の使用により、生物学的用途、例えば細胞培養、又は生物医学的表面としての使用のために容易に調製される生成物も得られる。

【0032】

好ましい実施形態において、ポリマーコーティングは細胞培養器具として用いられ、溶液は水性である。

【0033】

溶液中に存在するモノマーの濃度は、形成されるポリマーコーティングの性質によって変動するであろう。例えば、1つ又は複数のエチレン性不飽和モノマーの濃度を調整して、ポリマーコーティングの厚さに合わせることができる。当業者は、所定の重合に必要なとされる濃度のエチレン性不飽和モノマーを決定できるであろう。一般的に、溶液中の1つ又は複数のエチレン性不飽和モノマーの濃度は、約0.1% (w/v) ~ 約25% (w/v) の範囲内に収まるであろう。

【0034】

水性反応媒体中に存在できる他の添加剤には、重合阻害剤が含まれる。これらは、市販のモノマー中に存在して、保存可能期間を延長していることが多い。これらの阻害剤が存在してもよいということは、重合前に阻害剤を除去する必要なくモノマーが使用できるので、本発明の有利な特徴である。

【0035】

本発明による重合は、好ましくは、実質的に無酸素環境で実施される。換言すれば、重合は、実質的に無酸素条件下で進展させることになる。これは、当業者に周知の技術を使用して達成できる。例えば、モノマー溶液及び溶液の上のヘッドスペースは、不活性ガス、例えば窒素又はアルゴンでパージされ得る。酸素が存在すると、重合プロセスの効率が落ちる恐れがある。酸素が存在するにもかかわらず、徐々にとはいえ反応が進展することは、重合前に酸素を完全に除去する必要なく使用できるので、本発明の有利な特徴である。

【0036】

さらに、照射前にモノマー溶液を一般的に脱酸素して、ラジカルの捕捉を低下させることができる。適切な脱酸素法は、当業者に公知の方法、例えばモノマー溶液中でも不活性ガスを起泡させること、又は凍結 - 融解 - 送出サイクルを含む。

【0037】

本発明に従って使用できるエチレン性不飽和モノマーの例は、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸エチル-3,3-ジメチル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸イソブチル、(メタ)アクリル酸イソブチル、(メタ)アクリル酸tert-ブチル、(メタ)アクリル酸2-エチルヘキシル、(メタ)アクリル酸イソボルニル、(メタ)アクリル酸、(メタ)アクリル酸ヒドロキシプロピル、(メタ)アクリル酸ヒドロキシブチル、(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリル酸2-ヒドロキシエチル、N-メチル(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリル酸ジメチルアミノエチル、イタコン酸、アクリル酸2-カルボキシエチル、スチレン、p-スチレンカルボン酸、p-スチレンスルホン酸、ビニルスルホン酸、ビニルホスホン酸、エタクリル酸、-クロロアクリル酸、クロトン酸、フマル酸、シトラコン酸、メサコン酸、マレイン酸、(メタ)アクリル酸グリシジル、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレートスクシネート、2-(メタ)アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸、(メタ)アクリル酸2-スルホエチル、(メタ)アクリル酸3-スルホプロピル、モノ-2-[(メタ)アクリロイルオキシ] エチルスクシネート、(メタ)アクリル酸ヒドロキシプロピル、N-エチル(メタ)アクリルアミド、N,N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N,N-ジエチル(メタ)アクリルアミド、N-イソプロピル(メタ)アクリルアミド

10

20

30

40

50

、N - (ヒドロキシメチル) (メタ) アクリルアミド、N - (2 - ヒドロキシエチル) (メタ) アクリルアミド、N - (2 - ヒドロキシプロピル) (メタ) アクリルアミド、N - メチロール (メタ) アクリルアミド、N - ビニルホルムアミド、N - ビニルアセトアミド、N - ビニル - N - メチルアセトアミド、N - (n - プロピル) アクリルアミド、N - (n - ブチル) (メタ) アクリルアミド、N - tert - ブチル (メタ) アクリルアミド、シクロヘキシル (メタ) アクリルアミド、N - (3 - アミノプロピル) (メタ) アクリルアミド、(メタ) アクリル酸 2 - アミノエチル、N - [3 - (ジメチルアミノ) プロピル] (メタ) アクリルアミド、N - (メタ) アクリロイルトリス (ヒドロキシメチル) アミノエタン、N - (メタ) アクリロイルトリス (ヒドロキシメチル) アミノエタン、ジアセトン (メタ) アクリルアミド、アセト酢酸 2 - (メタ) アクリロイルオキシエチル、[3 - (メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリド、[3 - (メタクリロイルオキシ) エチル] - トリメチルアンモニウムクロリド、[2 - メタクリロイルオキシ) エチル] ジメチル - (3 - スルホプロピル) アンモニウムヒドロキシド、[3 - (メタクリロイルアミノ) プロピル] ジメチル (3 - スルホプロピル) アンモニウムヒドロキシド、ポリ (エチレングリコール) (メタ) アクリレート、(エチレングリコール) メチルエーテル (メタ) アクリレート、ポリ (プロピレングリコール) (メタ) アクリレート、(ポリ (プロピレングリコール) メチルエーテル (メタ) アクリレート、(メタ) アクリル酸プロパルギル、4 - (メタ) アクリロイルモルホリン、N - ビニル - 2 - ピロリドン、モノ (メタ) アクリル酸グリセロール、(メタ) アクリル酸グリコシルオキシエチル、ビニルメチルスルホン、酢酸ビニル、2 - (メタ) アクリロキシエチルグルコシド、エチレングリコール (メタ) アクリレートホスフェート、サッカリド部分が正味の中性であるエチレン性不飽和モノ、ジ、トリ及びポリサッカリド (複数可)、双性イオンモノマー、例えば 3 - ((2 - (メタ) アクリロイルオキシ) エチル) ジメチルアンモニオ) プロパン - 1 - スルホネート、2 - ((メタ) アクリロイルオキシ) エチル 2 - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルクロリン及びそれらの組み合わせを含むが、それらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0038】

本発明に従って使用できるエチレン性不飽和モノマーの例には、1つ又は複数のエチレン性不飽和基を含む「リガンド」も含むことができる。本明細書で使用される「リガンド」という用語は、当技術分野内で一般的な意味をもつように意図されており、多数の他の生体分子の存在下で、特定の生体分子、例えば細胞の表面に発現した生体分子に結合できる部分である。

【0039】

ポリマー表面にグラフトさせるポリマーは、ホモポリマー又はコポリマーであってよく、用いられるエチレン性不飽和モノマーによって決まる。ポリマーは、さらに荷電していても、又は中性であってもよく、カルボン酸ポリマー、スルホン酸ポリマー、アミノポリマー、両性イオンポリマー、中性の親水性ポリマー及び疎水性ポリマーからなる群から選択されるポリマーの類に属してよい。

【0040】

いくつかの実施形態において、溶液は、単一種類のエチレン性不飽和モノマーを含む。エチレン性不飽和モノマーは、本明細書に記載されているもののいずれか1つから選択できる。

【0041】

いくつかの実施形態において、溶液は、少なくとも2種のエチレン性不飽和モノマーを含む。

【0042】

要因、例えば温度、pH及び/又は水混和性共溶媒 (複数可) の有無により、所定の水性モノマー溶液中での所定のモノマーの溶解度が変わり得ることを当業者は理解するであろう。したがって、そのような要因は、好都合に使用して、水溶液におけるモノマーの溶解度を促進できる。

【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態において、エチレン性不飽和モノマーは、水に少なくともやや溶けにくく、より好ましくは水に溶けやすい。やや溶けにくいという用語は、溶媒 1 0 0 m l に対してモノマー 1 グラムの溶解度を指し、溶けやすいとは、2 0 の水 1 0 m l に対して少なくともモノマー 1 グラムの溶解度を指す。

【 0 0 4 4 】

水溶性である好ましいエチレン性不飽和モノマーの例は、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸 2 - カルボキシエチル、コハク酸ヒドロキシエチル (メタ) アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、N - アルキル (メタ) アクリルアミド (例えば N - イソプロピルアクリルアミド)、N, N - ジメチル (メタ) アクリルアミド、N - (3 - アミノプロピル) (メタ) アクリルアミド、(メタ) アクリル酸 2 - アミノエチル、(メタ) アクリル酸ジメチルアミノエチル、N - ビニル - 2 - ピロリドン、(メタ) アクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、N - (2 - ヒドロキシプロピル) (メタ) アクリルアミド、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、(メタ) アクリル酸 3 - スルホプロピル、[3 - (メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリド、[3 - (メタクリロイルオキシ) エチル] - トリメチルアンモニウムクロリド、ポリ (エチレングリコール) (メタ) アクリレート及びメトキシポリ (エチレングリコール) (メタ) アクリレートを含む。特に好ましい水溶性モノマーは、アクリル酸、アクリル酸 2 - カルボキシエチル、アクリルアミド、N - イソプロピルアクリルアミド、N - (2 - ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ポリ (エチレングリコール) (メタ) アクリレート及びメトキシポリ (エチレングリコール) (メタ) アクリレートを含む。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態において、溶液は 2 種のモノマーを含む。第 1 のモノマーは、好ましくは、カルボン酸官能基を含み、そのとき、ポリマー表面に固定された得られるポリマーコーティングはカルボン酸基を含む。第 1 のモノマーは、アクリル酸、メタクリル酸又はアクリル酸 2 - カルボキシエチルであることが好ましい。第 2 のモノマーは、好ましくは、低い生物付着性を示すので、本発明の方法を使用して形成されるポリマーコーティングは、血清含有培地中の哺乳類細胞に非付着性である。第 2 のモノマーは、アクリルアミド、ポリ (エチレングリコール) (メタ) アクリレート、メトキシポリ (エチレングリコール) (メタ) アクリレート、N - (2 - ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン又は当業界で公知と考えられる同種のものであることが好ましい。特に好ましい実施形態において、第 1 のモノマーはアクリル酸であり、第 2 のモノマーはアクリルアミドである。これらの実施形態において、溶液中の第 1 のモノマー対第 2 のモノマーのモル比は、少なくとも 1 : 9 9、例えば少なくとも 5 : 9 5、少なくとも 1 0 : 9 0 又は少なくとも 2 0 : 8 0 にでき、9 0 : 1 0 までのモル比、例えば、生物付着の低さを保ちながら 8 0 : 2 0 までにできる。比は、4 0 : 6 0 ~ 8 0 : 2 0、例えば 8 0 : 2 0、7 0 : 3 0、6 0 : 4 0、5 0 : 5 0 又は 4 0 : 6 0 であることがより好ましい。特に好ましい実施形態において、モル比は、4 0 : 6 0 である。

【 0 0 4 6 】

ポリマー表面とエチレン性不飽和モノマー溶液を接触させ、次いで、その表面を UV 照射で露光して表面上にラジカル種を作り出す。UV 照射は、典型的には、可視光より短いが X 線より長い波長を有する電磁放射と定義され、したがって約 1 0 n m ~ 約 4 0 0 n m の範囲内の波長を有することを当業者は理解するであろう。本発明に従って使用できる UV 照射の波長に関わる詳細な限定はないが、ポリマー表面でフリーラジカルを作り出せることが条件である。一般的に、使用される UV 照射の波長は、約 2 0 0 n m ~ 約 4 0 0 n m の範囲内に収まるであろう。このプロセスに使用される紫外線光は、好ましくは 4 0 0 n m までの波長である。このプロセスに使用される紫外線光は、より好ましくは、3 0 0 n m までの波長である。使用され得る、ある範囲の適切な紫外線光源を使用することができ、高強度マイクロ波無電極パルス光源が特に好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

使用できるUV照射の強度に関しても詳細な限定はないが、フリーラジカルをポリマー表面で作り出せ、表面は悪影響を受けないことが条件である。一般的に、出力が少なくとも約 200 W/cm^2 までのUV光源が使用できる。

【 0 0 4 8 】

好ましい実施形態において、露光の後、水溶液はに水で表面から洗浄される。

【 0 0 4 9 】

溶液と接触するポリマー表面は、一定期間の照射で露光する。照射1回の期間は、ポリマー表面を露光するオン期間とすることができ、ポリマー表面を露光しないオフ期間が続く。連続露光に関しては、1回の期間があり、オン期間は長さが決まっており、オフ期間は長さが決まっていない。本発明は、パルス又は間欠照射に関し、その両方が少なくとも2回の露光期間を有する。

【 0 0 5 0 】

パルス照射に関して、露光期間（オン期間）は、一般的に、0.05秒未満であり、露光間隔（オフ期間）は0.05秒未満である。

【 0 0 5 1 】

好ましい実施形態において、溶液と接触するポリマー表面は、間欠露光される。定義によれば、間欠露光は、少なくとも2回の露光期間を含む。露光期間全体の数は、ポリマーコーティングの望ましい性質に基づいて選択できる。例えば、より厚いポリマーコーティングが必要な塗布の際に、又はUV劣化に対して、より感受性があるポリマー表面のために、露光期間の回数を増加できる。好ましい実施形態において、厚いコーティングは、下層のポリマー表面を、ポリマーコーティング上で培養した哺乳類細胞に対して「見えなく」するために必要とされる。これらの実施形態において、露光期間を100回まで用いてよい。

【 0 0 5 2 】

照射期間の最適な持続時間も、グラフトが発生するポリマー表面の特徴及び照射強度によって決められる。いくつかの例において、照射期間の延長により、ポリマー表面の変質及び/又は変形が生じることがある。例えば、ポリスチレンで形成された表面の場合、約45秒を超えない露光時間が好ましく、約30秒未満がより好ましい。当業者は、表面及びグラフトモノマー組成の特徴、並びに本明細書の指導を考慮して、UV強度及び露光期間の適切な組み合わせを決定できるであろう。

【 0 0 5 3 】

絶対的及び相対的持続時間、並びに紫外線光での露光（オン期間）、及び紫外線光での露光の間（オフ期間）の強度は、ポリマー表面に適するように選択して、望ましい性質のポリマーコーティングを得るべきである。いくつかの実施形態において特に重要な性質は、ポリマーコーティングの厚さ及び弾性係数である。例えば、相対的に大規模なオン期間の露光により、密度が高く薄いポリマーコーティングが生じる一方で、相対的に大規模なオフ期間の露光により柔軟で厚い、膨潤性に富むポリマーコーティングが生じるであろうことが仮定される。

【 0 0 5 4 】

間欠照射に関しては、オン期間は、物品、ポリマー表面、及び/又は展開するポリマーコーティングの構造的な完全性が維持されるようにすべきである。オン期間中、露光されることにより結合切断が引き起こされ、比較的高度に架橋結合したポリマーが成長し、実質的な発熱を生じると仮定される。このプロセスに関与する成分の化学的性質によって、オン期間により有害作用が生じる恐れがある。そのような場合、これらの有害作用を回避するように、又は少なくとも適切なレベルまで軽減されるように、オン期間中の持続時間及び強度が選択されるべきである。オン期間は、重合を開始するために十分になるようにも選択されるべきである。

【 0 0 5 5 】

例えば、オン期間は、少なくとも約0.5秒、より好ましくは少なくとも約1秒、さら

により好ましくは少なくとも約 2 秒の持続時間であってよい。オン期間は、60 秒まで、より好ましくは約 45 秒まで、さらにより好ましくは約 30 秒までの持続時間であってよい。好ましい実施形態において、ポリマー表面がポリスチレンを含む場合、オン期間は、約 1 秒～約 45 秒、例えば約 5 秒～約 45 秒の持続時間であってよい。

【0056】

好ましい一組の実施形態において、間欠照射は、1 秒～15 秒の範囲のオン期間、及び 1 秒～60 秒の範囲のオフ期間を含む。

【0057】

出力約 200 W / cm² までの UV 光源が使用されている。

【0058】

間欠照射に関しては、オフ期間は、最終ポリマーコーティングが十分な性質になるようにすべきである。オフ期間中には、露光なしでさえ、非架橋結合様式「からの成長」でポリマーが成長し続け、オン期間中に作り出されたいかなる熱も、ある程度まで消散できると仮定される。オフ期間の持続時間は、これらの要因を考慮して選択されるべきである。ある時点で、このオフ期間におけるポリマー鎖の成長は中断するので、これより長いオフ期間から見込まれる利益はないが、この期間は少なくとも、ポリマー表面、モノマー溶媒及びモノマーによって決まるであろう。

【0059】

例えば、オフ期間は、約 5 分未満、より好ましくは約 3 分未満、さらにより好ましくは約 2 分未満の持続時間であってよい。オフ期間は、約 10 秒超、より好ましくは約 20 秒超、さらにより好ましくは約 30 秒超、さらにより好ましくは約 45 秒超の持続時間であってよい。好ましい実施形態において、ポリマー表面がポリスチレンを含む場合、オフ期間は、約 20 秒～約 60 秒、例えば 20 秒～約 50 秒の持続時間であってよい。

【0060】

理論により限定されることを望むものではないが、ポリマー表面を UV で露光すると、ポリマー表面の分子構造を構成する結合が引き起こされて開裂を受け、ラジカル種が作り出されると考えられる。次いで、作り出されたラジカル種は、モノマー溶液に存在する 1 つ又は複数のエチレン性不飽和モノマーのフリーラジカル重合を促進できる。この方法でのモノマーの重合により、ポリマー表面からグラフトされるポリマー鎖が得られると考えられる。

【0061】

理論により限定されることを望むものではないが、ポリマー表面を UV で露光すると、モノマーのエチレン性不飽和結合を引き起こす可能性もあり、或いは引き起こして、開裂を受けてラジカル種を作り出すと考えられる。次いで、ポリマー表面からの水素引き抜きにより作り出されたラジカル種は、モノマー溶液内に存在する 1 つ又は複数のエチレン性不飽和モノマーのフリーラジカル重合を促進できる。この方法でのモノマーの重合により、ポリマー表面からグラフトされるポリマー鎖が得られると考えられる。

【0062】

理論により限定されることを望むものではないが、炭素系ラジカルは、ポリマー表面で作り出されると考えられ、1 つ又は複数のエチレン性不飽和モノマーの重合を促進することに反応するのはこれらのラジカルである。ポリマー表面が炭素系ポリマーを含む場合、そのような炭素系ラジカルの形成は、炭素-炭素ポリマー骨格を含む炭素系ポリマーが使用されるときに促されると考えられている。

【0063】

ポリマー表面に形成されるグラフトポリマーコーティングの特徴は、有利に変動させて、生じた生成物の意図した用途に合わせることができる。

【0064】

本方法の利点の 1 つは、実質的に均一であり連続したグラフトポリマーコーティングをポリマー表面に得られることであり、二次元又は三次元表面とすることである。グラフトポリマーコーティングが「実質的に均一であり連続した」とは、そのコーティングがポリ

10

20

30

40

50

マー表面の望ましい領域上に存在し、比較的一定した厚さを有する統合されたコーティングを有することを意味する。そうはいても、グラフトポリマーコーティングが、ポリマー表面のごく一部のみ又は各部に形成され得る場合、不連続コーティングとしてポリマー表面に存在することももちろんある。そのような場合、グラフトポリマーは、それでも実質的に均一な連続したコーティングをポリマー表面の各部に形成するであろう。例えば、ポリマー表面のグラフトポリマーコーティングにおける特定のパターン又は配列を形成することは望ましいことがある。これは、例えば、UVで露光するポリマー表面の領域を限定する適切なマスク越しにUV照射を通過させることで達成できる。

【0065】

ポリマー表面に加えられるグラフトポリマーコーティングの厚さは、当業者に周知の方法のパラメータを調整することにより変更できる。例えば、UVで露光する時間及び/又は強度を増加させて、溶液内に存在するエチレン性不飽和モノマーの濃度を上昇させることにより、グラフトポリマーコーティングの厚さを増加させることができる。傾斜した厚みを有するコーティングも、UV光源及びポリマー表面の間で傾斜したマスクを有することによって生成できる。

【0066】

本明細書で使用されている、「生体分子」という用語は、生物、組織又は細胞によって生成される分子を意味するように意図されている。生体分子は、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ヌクレオチド、炭水化物及び脂質を含むが、それらに限定されない。

【0067】

生体分子吸着及び/又は生物付着に耐えるグラフトポリマーコーティングを形成するステップの代わりとして、又は、それと組み合わせて、特定の生体分子、例えば溶液における特定の生体分子、又は細胞の表面において発現される特定の生体分子と結合するリガンドをグラフトポリマーコーティングの一部として含むことが望ましいことがある。

【0068】

この手法により、特定の生体分子自体又は細胞を、例えばアッセイ及び細胞培養の用途で、グラフトポリマーコーティングへと付着させる標的とすることができる。

【0069】

グラフトポリマーコーティングは、あらゆる適切な手段でそのようなリガンドを備えていてよい。例えばリガンドは、重合されて、グラフトポリマーコーティングを形成する1つ又は複数のエチレン性不飽和モノマーを共有結合する、又は含むことができる。

【0070】

或いは、グラフトポリマーコーティングは、リガンドをグラフトポリマーコーティングの表面に共有結合するように形成された後で改質できる。その場合、重合されて、グラフトポリマーコーティングを形成する1つ又は複数のエチレン性不飽和モノマーは、グラフトポリマーコーティングの形成後に使用して、リガンドのグラフトポリマーコーティングへの共有結合を促す官能基を備えていてよい。

【0071】

本明細書で使用されている、「細胞」という用語は、生きている、若しくは死んでいる細胞、多細胞、組織若しくは細胞断片、細胞膜、リボソーム製剤又はサブオルガネラ、例えばミトコンドリア、リボソーム又は核を指す。「細胞」という用語も、接着及び非接着細胞型を含むように意図されている。

【0072】

細胞は、真核又は原核細胞であってよい。

真核細胞は、動物/ヒト、植物、真菌及び原生生物に由来する細胞を含む。

原核細胞は、単細胞微生物、例えば細菌及び古細菌に由来する細胞を含む。

「細胞」という用語は、幹細胞も含むように意図されている。動物/ヒトにおいて、大半の成体の幹細胞は、系統限定(多能性)であり、一般的にその組織起源に言及される。例えば、胚の幹細胞、間葉幹細胞、脂肪由来幹細胞、内皮幹細胞、ヘマトポイエテ

10

20

30

40

50

胞、神経幹細胞、上皮幹細胞及び皮膚幹細胞。

【0073】

連続UV照射を使用して作られたコーティングは、間欠UV照射当量を使用した条件で調製したコーティングよりも有意に薄くなることを、本発明者らは見出した。さらに、間欠照射を使用し、照射イベント間を遅延させて作られたコーティングは、間欠UV照射を用いて作られたコーティングよりも有意に厚いことを本発明者らは見出した。

【0074】

3種のコーティング(表12を参照されたい)の膨張率を分析することにより、間欠UV照射により作られたコーティングは、PBS溶液を用いて水和した場合、連続UV照射を使用して作られたコーティングよりはるかに膨張できることが示された。理論に束縛されることを望むものではないが、この差は、コーティング内の架橋結合度による可能性がきわめて高いと本発明者らは考える。連続UV照射により、4つのプロセス;(i)フリーラジカル形成、(ii)鎖の切断、(iii)架橋結合反応及び(iv)ポリマー鎖の成長が生じるであろう。これらの4つのプロセスは、間欠UV照射を使用して調製されるグラフトポリマーコーティングに対しても発生することになるが、4つのプロセスの相対的なバランスは異なる可能性がきわめて高いであろう。フリーラジカル形成が両方の場合で等しいとすると、試料がUVを用いて照射されていないときの間欠UV照射は、連続照射の場合より多くのポリマー成長を生じるはずであり、コーティング内の架橋結合は少なくなる。この仮説は、乾燥及び水和させた厚さの両方で裏付けられ、いずれの厚さも、間欠UV照射を用いて調製した試料の例より厚い。連続UV照射を使用して調製された試料で得られた膨張率の低下により、コーティング内の架橋結合度がより高くなったことが示唆される。より厚いコーティング、例えば間欠UV照射を使用して調製されたコーティングは、同程度の架橋結合を有し、きわめて類似した膨張率を有するであろう。UV照射(間欠+遅延)なしで、時間を延長することによる影響は、ポリマーグラフト層の厚さを増加させることになり、試料が照射されなかった場合に、非照射時間が短い(間欠性)場合より多くのポリマーの成長が発生し、連続UV照射条件よりもはるかに多くポリマー鎖の成長が発生することがやはり示唆された。

【0075】

本発明は、ここで、以下の実施例に関して記載される。実施例は、本発明の例示の目的で示されており、本発明の範囲を決して限定しないことを理解されたい。

[実施例]

【図面の簡単な説明】

【0076】

実施例は、添付図に関して記載されている。

【0077】

【図1】実施例1に記載されているAAMのUVグラフト重合の前(FIG 1A)及び後(FIG 1B)に、組織培養ポリスチレンプレート(Nunc lon(商標)、Nunc)で得られた、高解像度XPSの代表的なC1sスペクトルを示す図である。

【図2】PS(Nunc lon(商標))基材に対するAAMのUVグラフトの20時間後におけるヒラー細胞の付着(FIG 2A)と、実施例3に記載されているPS(Nunc lon(商標))対照表面への細胞付着(FIG 2B)を比較した位相差画像を示す図である。

【図3】AA及びAAMモノマー溶液の混合物から得られたUVグラフトポリマーで得られた、高解像度XPSの代表的なC1sスペクトルを示す図である。数(挿入されているもの)は、実施例4に記載されているモノマー混合物におけるAAの百分率を指す。

【図4】実施例6のパートBに記載されているように、37(FIG 4A)、及びインキュベーションの30分後に20(FIG 4B)で、NIPAM UVグラフトポリマーによりコーティングした基材に付着させたL929マウス線維芽細胞の位相差画像(10×対物)を示す図である。

【図5】実施例6のパートCに記載されているように、37(FIG 5A)、及びイン

キュベーションの30分後に20 (FIG 5 B)で、NIPAM UVグラフトポリマーによりコーティングした基材に付着させたヒトMSCの位相差画像(10×対物)を示す図である。

【図6】実施例7のパートBに記載されているように、37 (FIG 6 A)、及びインキュベーションの30分後に20 (FIG 6 B)で、NIPAMグラフトポリマーによるコーティングを用いてコーティングした、MicroHex (商標)というマイクロ担体粒子に付着させたL929細胞の代表的な位相差画像(10×対物)を示す図である。

【図7】実施例9のパートCに記載されているc(RGDfK)ペプチドの共有結合固定化の後で、10%AAのUVグラフトコポリマー(FIG 7 A)を用いてコーティングした96ウェル基材に、L929細胞を付着させた代表的な画像、及び同表面の画像(FIG 7 B)を示す図である。

10

【図8】実施例10のパートCに記載されているc(RGDfK)ペプチドの共有結合固定化の後で、10%AAのUVグラフトコポリマー(FIG 8 A)を用いてコーティングしたMicroHex (商標)という基材に、L929細胞を付着させた代表的な画像、及び同表面の画像(FIG 8 B)を示す図である。

【図9】実施例12のパートCの記載に従って、ポリマーコーティングの組成に応じた2つの異なるUV方法を使用して調製されたコーティングに反応する細胞の付着を示すグラフである。

【図10】実施例12のパートCに記載されている、間欠的にUVを使用する、開始剤を伴わないUVに基づくコーティング方法によって生成された、アクリル酸(AA)及びアクリルアミド(AAM)をベースとしたコポリマーコーティングに反応する異なる細胞型を比較するグラフである。

20

【図11】実施例14のパートBに説明されている、UV通過回数に応じた、XPS分析から得られるグラフトポリマーコーティングの元素組成比を示すグラフである。

【図12】UV通過回数に応じた、40%AA-co-AAAM層の厚さについて、ナノメートル単位での変化を示すグラフである。

【図13】A、B及びCが、実施例15のパートBに記載されている様々な百分率のUV A、UV B及びUV Cに応じた高解像度のC1sスペクトルである図である。

【0078】

実施例1

30

組織培養ポリスチレン基材からのUVグラフト重合

96ウェルの組織培養ポリスチレン(TCPS)プレート(Nunc lon (商標)、Nunc)を受け取ったまま使用し、グローブボックス内に配置した。グローブボックスにおいて(<0.2%の酸素を含有する窒素雰囲気下)、250mgのアクリルアミド(AAM)、ポリ(エチレングリコール)メタクリレート(PEGMA-OH)、メトキシポリ(エチレングリコール)メタクリレート(PEGMA-OMe)又はN-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)を、5cm³のMilli-Q (商標)水に溶解させ、窒素を用いて溶液を10分間バージして、残留酸素を除去した。次いで、96ウェルプレートの各ウェルを0.15cm³のモノマー溶液で満たした。グローブボックスにおいて、プレートをポリ袋(Sunbeam Food Saver)中に真空密閉した後で、UVランプ(約200~450nm、最大強度360~390nm、ランプの長さ15cm、出力1.8kW、FUSION Systems)の下を走行するコンベヤーベルトにプレートを配置した。平均ベルト速度を1.8m分⁻¹で保持して、通過のつど約4秒の照射時間を設けた。UVランプ下を30回通過させる間に、真空密閉したプレートをUVで露光した。NIPAMグラフトポリマーコーティングの場合、UVランプ下を20回通過させる間に、プレートを露光させた。各通過の後で、プレートの方角を90度まで回転させた。次いで、Milli-Q (商標)水を用い、プレートウォッシャー(Thermo Wellwash 4 MK 2)を使用して、ウェルを徹底的に洗浄し、最後に空気乾燥させた。XPS分析のために、刃具を使用して対象のウェルの底部を除去した。

40

50

【 0 0 7 9 】

表 1 で提示されているのは、組織培養ポリスチレンプレートにおける UV グラフト重合の前後で、XPS 分析によって得られる元素組成比である。各モノマーに対して観察された O/C 比の有意な変化、並びに、AAM 及び NIPAM モノマー溶液を用いたグラフト重合後の N/C 比に対して観察された変化は、TCPS の基材であるポリマーに対して得られたものと比較して、各モノマーに対してのグラフト重合が成功したことを示す。さらに、図 1 A 及び図 1 B で提示されているのは、AAM を UV グラフト重合する前後で、組織培養ポリスチレンプレートから得られる XPS 高解像度の C 1 s スペクトルである。これらのスペクトル間の有意差により、AAM モノマーのグラフトが成功したことがやはり実証される。図 1 A A で提示される高解像度 XPS スペクトルは、中性の炭素種 C 1 及び C 2 (C - C / C - H) に対応する 285.0 ~ 285.5 eV の第一ピークを含有し、表面処理プロセスから生じる酸化種による C 5 成分 (O - C = O) に対応する、より高い結合エネルギーでの 2 つの小さいピークを含有し、及び約 292.0 eV でシェイクアップピークの芳香族炭素に対応する C 6 成分を含有する。比較すると、図 1 B のスペクトルは、脂肪族炭素種である C 1 及び C 2 (C - C / C - H) に対応する 285.0 ~ 285.5 eV でのピークを含有し、アミド種 C 4 (O = C - N) に対応するより高い結合エネルギーのピークを含有する。図 1 B における芳香族のシェイクアップピークの完全な減衰により、厚さ 10 nm 以上 (XPS の試料深さ) のコーティングも示唆される。

【 0 0 8 0 】

【表 1】

表1:UVグラフト重合の前後で、組織培養ポリスチレンプレート(Nunclon(商標)Δ、Nunc)で得られるXPSサーベイススペクトルから計算した元素組成比。

試料	O/C	N/C
PS(Nunclon(商標)Δ)	0.079	0.000
PS-AAM	0.258	0.273
PS-PEGMA-OH	0.464	0.000
PS-PEGMA-OMe	0.416	0.000
PS-NIPAM	0.131	0.095

【 0 0 8 1 】

実施例 2

低いタンパク質結合性を示すコーティングの UV グラフト重合

パート A : ヒト血清アルブミン (HSA) のユウロピウム標識

以下の方法を使用して、ユウロピウム標識したヒト血清アルブミン (Eu - HSA) を調製した。Delfia ユウロピウムラベル化試薬 (Perkin Elmer) (pH 9.3) を 4 で一晩使用して、HSA (Sigma、99%、本質的に脂肪酸を含まない) をラベル化した。過剰なラベル化試薬から Eu ラベル化した HSA を分離した後、Superdex 75 (30/10) というサイズ排除カラム (GE Healthcare) による高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) (Akta Purifier、GE Healthcare) を使用し、アミノ酸分析 (Waters Alliance HPLC) により Eu - HSA 溶液濃度を測定した。以下の手段で、Eu : HSA のラベル化比を測定した。まず、100 nm の Eu 標準液及び Delfia Enhancement Solution (Perkin Elmer) の様々な希釈物を使用して、いくつかの Eu 標準液を調製した。100 μl ずつのこれらの溶液を時間分解蛍光法により測定して、次いで、PHERASTAR マルチウェルプレートリーダーを使用して得られた (BMG Technologies、 $\tau_x = 337 \text{ nm}$ 、 $\tau_m = 620 \text{ nm}$ 、測定遅延 60 μ秒、測定時間 400 μ秒)。公知の濃度が Eu - HSA 溶液及び Eu 標準液から得られた、時間分解蛍光法による測定の比較を使用して、4.2 の Eu

：H S Aラベル化比を計算した。

【 0 0 8 2 】

パートB：プレート調製

96ウェルの組織培養ポリスチレンプレート（Nunc lon（商標）、Nunc）を、実施例1に記載されている実験手順に従って、AAM及びPEGMA-OMeグラフトポリマーを用いて、コーティングした。次いで、Milli-Q（商標）水を用い、プレートウォッシャー（Thermo Wellwash 4 MK 2）を使用して、ウェルを徹底的に洗浄し、最後に空気乾燥させた。続いて、Eu-HSAに基づくアッセイを使用してタンパク質吸着量についてプレートを分析した。

パートC：タンパク質吸着アッセイ

【 0 0 8 3 】

UVグラフト重合（パートB）後、リン酸塩緩衝生理食塩水（PBS）中のEu-HSA及びHSA（1：1500のモル比）両方の溶液を含有する0.1 cm³の溶液で各ウェルを満たした。使用されるすべてのHSA濃度は100、10及び1 mg/cm³であった。ウェルを室温で16時間インキュベーションし、PBS緩衝溶液を用いて6回洗浄し、次いで、Delfia Enhancement Solution（Perkin Elmer）を用いて処理して、吸着されたEu-HSAからEu原子を放出させた。次いで、この方法で得られた溶液を、PHERASTARマルチウェルプレートリーダー（BMG Technologies、 λ_{ex} = 337 nm、 λ_{em} = 620 nm、測定遅延60 μ 秒、測定時間400 μ 秒）を使用して時間分解蛍光法により分析した。吸着されたタンパク質の量を、これらの溶液から得られた測定値と、公知のEu濃度の溶液を用いて得られた標準曲線の比較により定量した。

【 0 0 8 4 】

3種の異なるHSA濃度を使用して実行されたタンパク質吸着アッセイの結果を、表2に示す。市販の96ウェル組織培養ポリスチレンプレート[PS（Nunc lon（商標））]で検出された吸着量は、未処理のポリスチレンプレート（PS、Nunc）、並びに、AAM[PS（Nunc lon（商標））-AAM]及びPEGMA-OMe[PS（Nunc lon（商標））-PEGMA-OMe]を用いた、UVグラフト重合により改質した96ウェル組織培養ポリスチレンプレートで検出された量をすべてのタンパク質濃度ではるかに超えた。AAM、特にPEGMA-OMeで改質したプレートで検出された少量のタンパク質により、UVグラフト重合方法を使用して、タンパク質結合が少ない表面コーティングを生成できることが実証された。

【 0 0 8 5 】

【表2】

表2:ユウロピウムでラベル化したHSAを使用したUVグラフト重合の前後での、表面におけるタンパク質吸着量の定量

溶液中のタンパク質濃度 ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	100	10	1
	吸着量($\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$)		
PS(Nunc lon(商標)Δ)	1101.0	153.5	18.0
PS	149.5	16.5	3.2
PS(Nunc lon(商標)Δ)-AAM	76.0	8.8	2.5
PS(Nunc lon(商標)Δ)-PEGMA-OMe	23.7	3.9	1.5

【 0 0 8 6 】

実施例3

細胞付着性が低いコーティングのUVグラフト重合

パート A : プレート調製 :

実施例 1 に記載されている方法通りに、A A M、P E G M A - O H 及び P E G M A - O M e モノマー溶液を使用した U V グラフトポリマーを用いて、24 ウェルの組織培養ポリスチレンプレート (N u n c l o n (商標)、N u n c) をコーティングした。P E G M A - O H 及び P E G M A - O M e の場合、溶液をグローブボックスへと移す前に、阻害剤除去用ビーズ (S i g m a) で満たしたカラムを使用してモノマー溶液から阻害剤を除去した。実施例 1 のように、U V グラフトの後、続いて、M i l l i - Q (商標) 水を用いたすすぎ、プレートを大量の M i l l i - Q (商標) 水で少なくとも 72 時間抽出し、その後空気で乾燥させた。

パート B : ヒーラー細胞を使用した細胞付着性アッセイ

【0087】

ペニシリン及びストレプトマイシン (G i b c o) を、それぞれ 120 及び $200 \mu\text{g cm}^{-3}$ の濃度で含有する無菌 P B S (1 cm^3 / ウェル、p H 7.4) を、表面を改質した 24 ウェルプレートに加えることにより、細胞の播種前に室温で 4 時間殺菌した。次いで、ヒーラー細胞を、 2×10^5 個細胞 / ウェルの濃度で各試験ウェルに播種し、5 % の CO_2 を含有する加湿空気中にて 37 で 24 時間インキュベーションした。使用される培地は 10 % ウシ胎仔血清 (F B S) を含有する D M E M / ハム F 12 (G i b c o) であった。インキュベーションの 20 時間後、4 回にわたる試料の反復を、それぞれ培地中 $500 \mu\text{g cm}^{-3}$ で (3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロミド) (M T T) で処理し、さらに 4 時間インキュベーションして、24 ウェル組織培養ポリスチレン (N u n c l o n (商標)、N u n c) の対照表面と比較した細胞付着性の定量的な値を得た。対照表面における細胞付着性を 100 % とし、他のすべての表面における付着性を、対照表面における付着性の百分率として表現した。インキュベーションステップの 4 時間後に、M T T を含有する溶液をウェルから除去した。次いで、無菌 P B S を用いてウェルを 3 回洗浄し、その後 1 cm^3 / ウェルの D M S O を使用して M T T ホルマザン結晶を細胞から放出させた。プレートを、プレートシェイカーに配置し、結晶の溶解及び溶液の十分な混合を確保するように 15 分間静かに揺り動かした。次いで、各ウェルから $100 \mu\text{l}$ の試料を、 $\lambda = 595 \text{ nm}$ の試験波長、及び $\lambda = 655 \text{ nm}$ の参照波長での光学密度測定用に、96 ウェルプレートのウェルに移した。20 時間の時点で、M T T を加える直前に、細胞を位相差顕微鏡法によっても検討し (O l y m p u s I M T - 2、10 × 対物レンズ)、細胞付着の代表的な画像をデジタル処理で記録した。

【0088】

表 3 で提示されているのは、M T T アッセイから得られた結果である。この結果から、A A M、P E G M A - O H 及び P E G M A - O M e を用いて表面を改質した U V グラフトポリマーにおけるヒーラー細胞の付着性は、P S (N u n c l o n (商標)) 対照表面における細胞付着性と比較して、きわめて低いレベルに低下することが明らかに示される。この結果は、図 2 A 及び図 2 B で示されている位相差画像によりさらに支持された。この場合、A A M、P E G M A - O H 及び P E G M A - O M e の U V グラフトポリマーコーティングから 20 時間後に観察されたヒーラー細胞の外観は同様であり、表面に付着しなかった、又は弱く付着した凝集細胞、振とう又はすすぐことにより表面から容易に除去される円形細胞を示した。例として、図 2 A で提示されているのは、A A M で改質した表面におけるヒーラー細胞の代表的な画像である。比較すると、ヒーラー細胞は、確実に付着性とみられ、この P S (N u n c l o n (商標)) 対照表面 (図 2 B) における培養期間後に十分に広がった。

【0089】

10

20

30

40

【表 3】

表3:様々な表面で24時間にわたって培養した後で、MTTアッセイにより得られたヒール細胞の付着。グラフトしたポリマーの表面における細胞付着を、PS(Nunclon(商標)Δ)対照表面で得られる細胞付着に標準化した。

試料	%細胞付着	標準偏差
PS(Nunclon(商標)Δ)-AAM	2.30	0.30
PS(Nunclon(商標)Δ)-PEGMA-OH	0.82	0.71
PS(Nunclon(商標)Δ)-PEGMA-OMe	0.52	0.08
PS(Nunclon(商標)Δ)	100.00	3.28

10

【0090】

実施例 4

アクリル酸 (AA) 及びアクリルアミド (AAM) に由来するコーティングのUVグラフト重合、並びにそれに続くアミンの活性化及び共有結合

パート A : AA 及び AAM に由来するコーティングのUVグラフト

実施例 1 に記載されているように、グローブボックス中で窒素を用いて15分間以上バージすることにより、アクリル酸 (AA) 及びアクリルアミド (AAM) の5% (w/v) 水溶液を脱気した。次いで、溶液を混合して、5%、10%、20%及び50% (v/v) のAAモノマー溶液を含有するAAMモノマー溶液を得た。次いで、96ウェルプレート (ウェル当たり0.15 cm³) のウェルに、この方法で作られた溶液を移した。

20

【0091】

次いで、まだグローブボックスにあるうちに、上記の溶液を含有するプレートを、ポリ袋 (Sunbeam Food Saver) 中に真空密閉し、グローブボックスから除去した。次いで、実施例 1 に記載されているように、UVランプ (FUSION Systems) 下を、約1.8 m/分の速度のコンベヤーベルトでプレートに30回通過させた。各通過の後で、プレートを90度回転させてより均一なUV照射を可能とした。次いで、Milli-Q (商標) 水を用い、プレートウォッシャー (Thermo Wellwash 4 MK 2) を使用して、プレートのウェルを徹底的に洗浄し、空気乾燥させた。XPS分析のために、刃具を使用して対象のウェルの底部を除去した。

30

【0092】

図3及び表4に提示されているデータの分析により、モノマー混合物のUVグラフト重合は、コーティングに成功したことが明らかに示された。さらに、これらの結果から、UVグラフトポリマーコーティングの組成は、適当なモノマー混合物を選択することにより制御できることが実証された。モノマー供給のAA比を増加させて調製されたコーティングのXPSスペクトル (図3を参照されたい) は、コーティング中のカルボン酸官能基 (AAモノマー由来) から生じ、寄与が増加したC5成分を含有していた。AAが5%のモノマー組成では、アミド結合 (AAMモノマー由来) から生じるC4信号が優勢であり、AAが50%のモノマー組成では、C4及びC5信号はほぼ同等の強度であった。

40

【0093】

【表 4】

表4:図3に提示されているXPSC1s高解像度スペクトルの曲線当てはめにより得られた成分。モノマー組成は、モノマー混合物中のAAの百分率として表現され、残りはAAMモノマーを含む。

モノマー組成	C1+C2	C3	C4	C5
AAが5%	77.7	0.8	20.8	0.6
AAが10%	73.0	0.2	25.2	1.6
AAが20%	71.1	1.0	17.7	7.0
AAが50%	73.5	0.42	11.6	14.5

10

【0094】

表5で提示されている元素組成比から、これらの結果が確認される。モノマー供給におけるAA含有量が増加するにつれて、コポリマーコーティングに存在する酸素の量は増加したが、窒素含有量は低下した。

20

【0095】

【表 5】

表5:AA及びAAMモノマー溶液の混合物から調製される、UVグラフトポリマーコーティングから得られるXPSサーベイスpekトルから計算した元素組成比。モノマー組成は、モノマー混合物中のAAの百分率によって表現される。

モノマー組成	O/C	N/C
AAが5%	0.288	0.228
AAが10%	0.317	0.233
AAが20%	0.329	0.182
AAが50%	0.425	0.109

30

【0096】

パートB：表面のカルボン酸官能基のNHS活性化

Milli-Q（商標）水中に0.125Mの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及び0.125MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含有する溶液を調製し、パートAに記載されているように、調製したプレートの各ウェルに0.05cm³を配置した。この溶液を、調製した直後にウェルに加えた。インキュベーションの20分後、Milli-Q（商標）水を用い、プレートウォッシャー(Thermo Wellwash 4 MK 2)を使用して、ウェルを3回洗浄し、窒素流を使用して乾燥させた。次いで、NHSで活性化させたプレートを、その後反応させるために直ちに使用した。

40

【0097】

パートC：NHSで活性化させたグラフトポリマーコーティングにおけるアミンの共有結合固定化

Milli-Q（商標）水を使用して、0.1MのTFEA溶液を調製し、次いで、パートBに記載されているように新しく調製したプレートの各ウェルに0.05cm³ずつの溶液を移した。次いで、24時間にわたってインキュベーションした後、Milli-Q（商標）水を用いてウェルを徹底的に洗浄し、空気乾燥させ、XPSにより分析した。

50

【 0 0 9 8 】

AA含有量（表6）を増加させて得られたF/C比の上昇は、NHSを用いたアクリル酸の活性化が成功したこと、及び、この方法によって調製したNHSにより活性化された表面が、アミンを含有する分子に高度に反応性であったことにより実証された。

【 0 0 9 9 】

【表6】

表6:後続のNHS活性化及びTFEAを用いた反応の後で、AA及びAAMモノマー溶液の混合物から作られたUVグラフトポリマーコーティングで得られるXPSサーベイスpekトルから計算した元素組成比。モノマー組成は、モノマー混合物中のAAの百分率によって表現される。

モノマー組成	O/C	N/C	F/C
AAが5%	0.286	0.249	0.008
AAが10%	0.260	0.221	0.035
AAが20%	0.285	0.216	0.058
AAが50%	0.366	0.175	0.243

【 0 1 0 0 】

実施例 5

PEGMA-OHに由来するコーティングのUVグラフト重合並びに後続のアミンの活性化及び共有結合

実施例1に記載されているように、1cm×1cmの大きさのSi-ALAPP試料を調製した。実施例1の通りに、PEGMA-OH5%（w/v）溶液をMilli-Q（商標）中で調製し、グローブボックスにて窒素を用いて30分間パージすることにより脱気した。グローブボックスにおいて、24ウェル組織培養ポリスチレンプレート（Nunc lon（商標）、Nunc）の各ウェルに、Si-ALAPPウェーハ並びに0.6cm³のPEGMA-OH溶液を加えた。

【 0 1 0 1 】

まだグローブボックスにあるうちに、Si-ALAPP試料及びPEGMA-OHモノマー溶液を含有する24ウェルプレートを、ポリ袋（Sunbeam Food Saver）中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。実施例1に記載されているように、UVランプ（FUSION Systems）下で、約1.8m/分の速度のコンベヤーベルトでプレートを20回通過させた。各通過の後で、プレートを90度回転させて、より均一なUV照射を可能とした。続いて、試料をプレートから除去し、Milli-Q（商標）水を用いて徹底的に洗浄し、空気乾燥させた。次いで、試料を、乾燥DMSC中0.5Mのカルボニルジイミダゾール（CDI）溶液に2時間にわたって浸す。次いで、Milli-Q（商標）水を用いて試料をすすぎ、続いて、PBS緩衝液（pH7.4）中0.1MのTFEA溶液に7日間浸す。最後に、Milli-Q（商標）水を用いて試料を洗浄し、空気乾燥させ、XPSにより分析した。

【 0 1 0 2 】

表7に提示されているデータから観察できるように、ALAPPコーティングの窒素信号の完全な減衰は、PEGMA-OHのUVグラフト重合後に、厚さ10nm超（XPSの試料深さ）のコーティングに成功したを示した。PEGMA-OH基のOH基とCDIの反応後に、N/C比の増加が観察され（表7）、表面の活性化反応に成功したことが実証された。最終的に、TFEAとCDIにより活性化された表面（表7）との反応後におけるフッ素の存在から、この方法によって調製された表面のアミン含有分子に対する反応性が実証された。

【 0 1 0 3 】

【表 7】

表7:後続のCDI活性化及びTFEAを用いた反応の前後で、PEGMA-OH UVグラフトポリマーコーティングで得られるXPSサーベイスペクトルから計算した元素組成比。

試料	O/C	N/C	F/C
Si-ALAPP-PEGMA-OH	0.468	0.000	0.000
Si-ALAPP-PEGMA-OH-CDI	0.453	0.032	0.000
Si-ALAPP-PEGMA-OH-CDI-TFEA	0.458	0.018	0.018

10

【0104】

実施例 6

熱応答性コーティングのためのNIPAMに由来するコーティングのUVグラフト重合
 パートA：NIPAMに由来するコーティングのUVグラフト

組織培養ポリスチレンプレート（4ウェル、Nunc（商標）、Nunc）を、受け取ったまま使用した。実施例1の通りに、N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAM）モノマーを使用して、これらの基材にUVグラフトポリマーコーティングを実行した。窒素雰囲気下のグローブボックスにおいて、Milli-Q（商標）水中でNIPAMの5%（w/v）溶液を調製し、窒素を用いて30分間バージした。次いで、このモノマー溶液を（0.6 cm³）ずつ4ウェルプレートの各ウェルに移した。まだグローブボックスにあるうちに、プレートをポリ袋（Sunbeam Food Saver）中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。実施例1の通りに、UVランプ（FUSION Systems）下で、約1.8 m/分の速度のコンベヤーベルトでプレートを20回通過させた。各通過の後に、プレートを90度回転させてより均一なUV照射を可能とした。続いて、プレートをMilli-Q（商標）水を用いて5回洗浄し、続いてプレートを大量のMilli-Q（商標）水に72時間浸した。最後に、表面を改質したプレートを空気乾燥させた。

20

【0105】

パートB：NIPAMグラフトポリマーで改質した細胞培養基材におけるL929細胞の付着

30

10%ウシ胎仔血清（FBS）及び1%非必須アミノ酸を含有する、改変イーグル培地（MEM）で、マウス線維芽細胞（L929）を培養した。2%（v/v）の抗生物質-抗真菌剤溶液（抗-抗、Gibco）を含有した無菌PBS（0.8 cm³/ウェル、pH 7.4）を、それぞれ、細胞の播種前に室温で2～4時間加えることにより、プレートのウェルを殺菌する。NIPAM UVグラフトポリマーにより改質した4ウェルプレートに、2×10⁵個細胞/ウェルの播種密度でパートAに記載されているようにL929細胞を播種した。24時間のインキュベーション期間後、加熱した顕微鏡ステージでプレートを温度37℃で維持しながら、代表的な試料で細胞付着の位相差画像を撮影した。続いて加熱したステージを取り外し、プレートを20℃に冷却した。加熱したステージを取り外してから30分後、別の画像を記録した。37℃及び20℃で撮影した位相差画像は、それぞれ図4A及び図4Bで示されている。20℃で撮影した画像の細胞（図4B）は、円形形態で、表面から容易に洗い落せるが、37℃で撮影した画像の細胞（図4A）は、付着性であり、十分に広がる形態である一方、20℃で撮影した画像の細胞（図4B）は、円形形態であり、表面から容易に洗い落とすことができた。これらの細胞培養の結果から、NIPAM UVグラフトポリマーコーティングの熱応答性は、生理学的な温度（37℃）で細胞付着性を生じ、室温（20℃）では細胞非付着性を生じることが実証される。

40

【0106】

パートC：NIPAMグラフトポリマーにより改質した細胞培養基材におけるMSC付着
 間葉幹細胞（MSC）は、標準的な方法論を使用してヒト骨髓穿刺液から単離される。

50

つまり、骨髓は、最初に密度勾配 ($1.077 \text{ gms} / 100 \text{ cm}^3$) 超で分離され、軽い密度分画を収集し、PBSで洗浄し、次いで、20% FBS (事前選択されたバッチ) を補充した - MEM培地で細胞を再懸濁した。次いで、細胞を約 5×10^5 個細胞 / cm^3 の密度でT-フラスコに加え、37 で2~3日間インキュベーションした。この後、非付着性分画を除去し、続いて新しい培地、次いでPBSを用いて静かに洗浄し、付着性MSCが残る。新しい - MEM及びFBSを加え、細胞を7日間培養した。次いで、EDTA及びCa並びにMgを含まないPBSを使用することにより細胞を分割 (約1:3、密集度により決まる) し、新しい培地及び血清に再播種した。

【0107】

20% FBS及び $5 \text{ ng} / \text{cm}^3$ のヒト組み換えFGF-2 (Prospect) を補充した - MEM培地にヒトMSCを移し、NIPAM UVグラフトポリマーで改質した4ウェルプレート (パートAに記載されている) に、 1×10^5 個細胞 / ウェルの播種密度で播種した。細胞の播種前に、2% (v/v) の抗生物質 - 抗真菌剤溶液 (Gibco) を含有した無菌PBS (0.3 cm^3 / ウェル、pH 7.4) を、それぞれ、室温で2~4時間加えることにより、プレートのウェルを殺菌した。37 及び5% CO_2 の加湿インキュベータで24時間のインキュベーション期間後、温度を制御した顕微鏡のステージにて温度37 でプレートを維持しつつ、細胞付着の位相差画像を、ウェルの代表的な領域で撮影したものである。続いて、温度を制御したステージを取り外し、プレートを20 に冷却した。加熱したステージを取り外してから30分後、別の画像を記録した。37 及び20 でそれぞれ撮影した位相差画像は、図5A及び図5Bで示される。37 で撮影した細胞 (figure 5A) は付着性であり、十分に広がり、それらがほぼ同時に生じる一方、20 で撮影した画像 (図5B) では、細胞が凝集され、一部領域で表面から浮き上がった。これらのヒトMSCの培養結果により、NIPAM UVグラフトポリマーコーティングの熱応答性は、生理学的な温度で (37) 細胞付着性を生じ、室温で (20) 細胞非付着性を生じることがやはり実証される。

【0108】

実施例7

微小粒子における熱応答性コーティングのためのNIPAMに由来するコーティングのUVグラフト重合

パートA: マイクロ担体粒子におけるNIPAMに由来するコーティングのUVグラフト重合
組織培養ポリスチレンプレート (24ウェル、Nunc lon (商標) 、Nunc) を受け取ったまま使用した。50mgのMicroHex (商標) マイクロ担体粒子 (Nunc lon (商標) 、Nunc) をこれらのプレートの各ウェルに加えた。実施例1の通りに、N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) モノマーを使用して、マイクロ担体粒子におけるUVグラフトポリマーコーティングを調製した。簡潔には、窒素雰囲気下のグローブボックスにおいて、Milli-Q (商標) 水で5% (w/v) のNIPAM溶液を調製し、窒素を用いて30分間パージした。このモノマー溶液を (0.6 cm^3) ずつ、微小粒子を含有する24ウェルプレートの各ウェルに移した。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、プレートをポリ袋 (Sunbeam FoodSaver) 中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。実施例1のように、UVランプ (FUSION Systems) 下で、約 $1.8 \text{ m} / \text{分}$ の速度のコンベヤーベルトでこのプレートを20回通過させた。各通過の後で、プレートを静かに揺り動かし、90度回転させてより均一なUV照射を可能とした。続いて、Milli-Q (商標) 水を用いて微小粒子を10回洗浄して、各洗浄ステップの後で、微小粒子を遠心分離及び再懸濁した。最後に表面を改質した微小粒子を、大量のMilli-Q (商標) 水で72時間にわたりインキュベーションし、その後真空中で乾燥させた。

【0109】

MicroHex (商標) マイクロ担体粒子をあらかじめXPSにより、及びNIPAM UVグラフト重合により分析した。表8に提示されている分析の結果により、表面をコーティングする手順は成功だったことが実証された。特に、N/C比の増加が計算され

たことから、マイクロ担体粒子の表面にグラフトポリマー層が存在すると示された。

【 0 1 1 0 】

【 表 8 】

表8:NIPAM UVグラフトポリマーを用いたコーティングの前後で、MicroHex(商標)マイクロ担体粒子(Nunc(商標)Δ、Nunc)で得られるXPSサーベイスpekトルから計算した元素組成比。

	O/C	N/C
MicroHex(商標)	0.166	0.001
MicroHex(商標)-NIPAM	0.157	0.123

10

【 0 1 1 1 】

パートB：NIPAMグラフトポリマーにより改質したマイクロ担体粒子におけるL929の細胞付着性

10%ウシ胎仔血清及び1%非必須アミノ酸を含有する改変イーグル培地(MEM)において、マウス線維芽細胞(L929)を培養した。実施例3の通りに、細胞非付着性のPEGMA-OH UVグラフトポリマーコーティングを用いて改質した、4ウェル組織培養ポリスチレンプレート(Nunc(商標)、Nunc)のウェルに含有させた、NIPAM UVグラフトポリマーにより改質した微小粒子に(パートAに記載されているように) L929細胞を播種した。各ウェルは、 0.1 cm^3 の表面を改質した粒子を含有させて満たした。細胞の播種前に、2%(v/v)の抗生物質-抗真菌剤溶液(Gibco)を含有した無菌PBS(0.6 cm^3 /ウェル、pH7.4)を、それぞれ、室温で2~4時間加えることにより、表面を改質したマイクロキャリア(microcarrier)粒子を殺菌した。細胞を播種する密度は、 2×10^4 個細胞/ウェルであった。24時間の細胞培養期間の後、加熱した顕微鏡のステージにて温度37℃でプレートを維持しつつ、代表的な試料で細胞付着の位相差画像を撮影した。続いて、加熱したステージを取り外し、プレートを20℃に冷却した。加熱ステージを取り外してから30分後、別の画像を記録した。37℃及び20℃で撮影した位相差画像は、それぞれ図6A及び図6Bで示される。37℃で撮影した画像の細胞(図6A)は付着性であり、部分的に十分に広がった形態の細胞である一方、20℃で撮影した画像の細胞(図6B)は、表面から容易に洗い流すことができる円形形態の細胞であった。これらの細胞培養の結果から、生理学的な温度(37℃)で細胞付着性を生じ、室温で(20℃)細胞非付着性を生じる、微小粒子における熱応答性NIPAM UVグラフトポリマーコーティングの有効性が実証される。

20

30

【 0 1 1 2 】

実施例8

三次元基材におけるコーティングの均一性

組織培養ポリスチレンプレート(96ウェル、Nunc(商標)、Nunc)を受け取ったまま使用した。実施例1の通りにAAMモノマーを使用して、これらのプレートにおけるUVグラフトポリマーコーティングを得た。簡潔には、グローブボックス(<0.2%酸素を含有する窒素雰囲気下)において、 5 cm^3 のMilli-Q(商標)水に250mgのAAMを溶解し、窒素を用いて溶液を10分間パージして残留酸素を除去した。次いで、96ウェルプレートの各ウェルを 0.15 cm^3 のモノマー溶液で満たした。グローブボックスにおいて、ポリ袋(Sunbeam Food Saver)中にプレートを真空密閉した後、プレートをUVランプ(約200~450nm、最大強度360~390nm、ランプの長さ15cm、出力1.8kW、FUSION Systems)の下を走行するコンベヤーベルトに配置する。平均ベルト速度を $1.8\text{ m} \cdot \text{分}^{-1}$ で保持して、通過のつど、約4秒の照射時間を与えた。通過30回の間、真空密閉したプレートをUVで露光した。各通過の後で、プレートの方向を90度回転させた。次いで、Milli-Q(商標)水を用い、プレートウォッシャー(Thermo Wellw

40

50

a s h 4 M K 2) を使用して、ウェルを徹底的に洗浄し、最後に空気乾燥させた。X P S 分析のために、刃具を使用して、9 6 ウェルプレートにおいて選択したウェルの底部並びに壁を除去した。

【 0 1 1 3 】

表 9 で提示されているのは、U V グラフト重合の後に、X P S 分析により、代表的なウェルの様々な領域で得られた元素組成比である。U V グラフト重合中に、ウェルが 0.15 cm^3 のモノマー溶液で満たされているという事実から、壁の上部を除くウェルのすべての領域にコーティングが予想される。この予想を、表 9 で示されている結果により確認した。壁の上部（最上部から約 2 mm）で得られる O / C 及び N / C 比は、他の 9 6 ウェル組織培養ポリスチレン試料（N u n c l o n（商標）、N u n c）で得られたものと同様であり（表 1 を参照されたい）、プレートのこの部分は、U V グラフト重合方法による影響を受けないことが示唆された。しかし、改質されていない壁の上部と比較して、他の各領域で観察された O / C 及び N / C 比の有意な変化により、各場合において A A M グラフトポリマーのコーティングが成功したことが示唆された。さらに、ウェルの底部、壁の下部（底部から約 2 mm）及びウェルの中央部（壁の中間）から得られる元素組成比により、理論的予想値に近い、類似した O / C 及び N / C 値が示され、ウェルの表面の改質された領域を通して、厚さ 1 0 nm 以上（X P S の試料深さ）の均一なコーティングが示唆される。

【 0 1 1 4 】

【 表 9 】

表9:部分的にAAM UVグラフトポリマーにより改質した96ウェルプレートの、単一のウェルで得られるXPSサーベイスpekトルから計算した元素組成比。ウェルに存在する異なる領域でspekトルを記録した。これらはウェルの底部であり、壁の下部(底部から約2mm)、ウェルの中央部(壁の中間)及び壁の上部(最上部の約2mm)である。

領域	O/C	N/C
ウェルの底部	0.259	0.259
壁(下部)	0.259	0.248
壁(中部)	0.259	0.255
壁(上部)	0.085	0.010

【 0 1 1 5 】

実施例 9

9 6 ウェル基材における A A 及び A A M に由来するコーティングの U V グラフト共重合、ペプチドの共有結合固定化並びに細胞応答の効果

パート A : A A 及び A A M に由来するコポリマーコーティングの U V グラフト

実施例 1 の通りに、5 % (w / v) のアクリル酸 (A A) 及びアクリルアミド (A A M) の水溶液を、グローブボックスにて、窒素を用いて 1 5 分間超バージすることにより脱気した。ここから、1 0 % (v / v) の A A 及び 9 0 % (v / v) の A A M モノマー溶液 (1 0 % A A) を混合することにより溶液を作った。次いで、この方法によって調製された溶液を、9 6 ウェルプレート (ウェル当たり 0.15 cm^3) のウェルに移した。

【 0 1 1 6 】

まだグローブボックスにあるうちに、次いで、上記の溶液を含有するプレートをポリ袋 (S u n b e a m F o o d S a v e r) 中に真空密閉し、グローブボックスから除去した。次いで、実施例 1 に記載されているように、U V ランプ (F U S I O N S y s t e m s) 下で約 1 . 8 m / 分の速度のコンベヤーベルトでプレートを 3 0 回通過させた。各通過の後でプレートを 9 0 度回転させて、より均一な U V 照射を可能とした。次いで、M i l l i - Q (商標) 水を用い、プレートウォッシャー (T h e r m o W e l l w a s h h 4 M K 2) を使用して、プレートのウェルを徹底的に洗浄し、空気乾燥させた。

パートB：表面のカルボン酸官能基のNH₂活性化及びcRGDの共有結合固定化

【0117】

Millicell-Q（商標）水中に0.125Mの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及び0.125MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含有する溶液を調製し、10%のAAで改質した96ウェルプレートの各ウェルに0.05cm³を、パートAに記載されているように配置した。溶液を、調製直後にウェルに加えた。インキュベーションの20分後、プレートウォッシャー(Thermo Wellwash 4 MK 2)中のMillicell-Q（商標）水を用いて、ウェルを3回洗浄した。次いで、NHSで活性化させたプレートを、後続の反応のために直ちに使用した。

10

【0118】

以下の方法を使用して、トリ-アミノ酸モチーフ、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(c(RGDfK)、Peptides International)を含有するN-C末端環化分子を、ポリマーコーティングに共有結合させた。PBS中の200µg/mLのc(RGDfK)を含有する溶液を(0.1cm³)ずつ、上記の新しく調製したNHSで活性化させたプレートの各ウェルに加えた。溶液を除去し、PBSを用いてウェルを10回洗浄した後で、ウェル中にて溶液を4°Cで一晩(15h)インキュベーションした。

【0119】

パートC：表面を改質した96ウェルプレートのL929細胞の付着

20

10%ウシ胎仔血清(FBS)及び1%非必須アミノ酸を含有する改変イーグル培地(MEM)において、マウス線維芽細胞(L929)を培養した。2%(v/v)の抗生物質-抗真菌剤溶液(Gibco)を含有した無菌PBS(0.3cm³/ウェル、pH7.4)を、それぞれ、細胞の播種前に室温で2~4時間加えることにより、プレートのウェルを殺菌した。共有結合固定化したc(RGDfK)と共にL929細胞を、パートBに記載されているように新しく調製したプレートのウェルに、2×10⁴個細胞/ウェルの播種密度で播種した。さらに、NHSで活性化されておらず、c(RGDfK)が共有結合固定化されていない新しく調製したプレートのウェルにも細胞を播種した。20~22時間のインキュベーション期間後、細胞付着の位相差画像の代表的な領域を撮影した。撮影した位相差画像を図7A及び図7Bに示す。共有結合固定化されるc(RGDfK)を含有していなかった試料に対する画像(図7A)の細胞は、非付着性であり円形形態である一方、共有結合固定化されるc(RGDfK)を含有していた試料に対して撮影された画像(図7B)の細胞は付着性であり、十分に広がった形態であった。細胞付着性のUVグラフトポリマーコーティングは、10%AA及び90%AAのモノマー供給で形成され、c(RGDfK)を共有結合固定化させ、細胞非付着性のUVグラフトコーティングにはc(RGDfK)が共有結合固定化しなかったことが、これらの細胞培養の結果から実証される。

30

【0120】

実施例10

MicroHex（商標）基材におけるAA及びAAMに由来するコーティングのUVグラフト共重合、ペプチドの共有結合固定化並びに細胞応答の効果

40

パートA：マイクロ担体粒子における、AA及びAAMに由来するコポリマーコーティングのUVグラフト

組織培養ポリスチレンプレート(24ウェル、Nunc lon（商標）、Nunc)を受け取ったまま使用した。これらのプレートの各ウェルに、50mgのMicroHex（商標）マイクロ担体粒子(Nunc lon（商標）、Nunc)を加えた。実施例7の通りに、マイクロ担体粒子におけるUVグラフトポリマーコーティングを調製した。簡潔には、窒素雰囲気下のグローブボックスにおいて、5%(w/v)のアクリル酸(AA)及びアクリルアミド(AAM)水溶液を、グローブボックス中の窒素を用いて15分間超パージすることにより脱気した。10%(v/v)AA及び90%(v/v)AA

50

Mモノマー溶液（10% AA）を混合することにより、溶液を作った。微小粒子を含有する24ウェルプレートの各ウェルに、この10% AAモノマーの混合物を（0.6 cm³）ずつ移した。まだグローブボックスにあるうちに、プレートをポリ袋（Sunbeam Food Saver）中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。実施例1のように、UVランプ（FUSION Systems）下で約1.8 m/分の速度のコンベヤーベルトでプレートを30回通過させた。各通過の後で、プレートを静かに揺り動かし、90度回転させてより均一なUV照射を可能とした。続いて、Milli-Q（商標）水を用いて微小粒子を10回洗浄し、各洗浄ステップの後で、微小粒子を遠心分離し、再懸濁した。最後に表面を改質した微小粒子を、大量のMilli-Q（商標）水で72時間にわたりインキュベーションし、その後、XPS分析の前に真空下で乾燥させた。

10

【0121】

表10で提示されているXPS分析の結果から、マイクロ担体粒子におけるグラフト重合は成功したことが明らかに実証される。グラフト重合反応後には、O/C及びN/C両方の原子比率が増加したことが観察された。相対的なO/C及びN/C比の比較により、コーティングは、AAM及びAAモノマーの両方を含有していたことが示された。これは、高解像度C1sスペクトル分析（示されていない）により確認された。

【0122】

【表10】

表10:10%(v/v)のAA及び90%(v/v)のAAMモノマー溶液の混合物から作られたUVグラフトポリマーによるコーティングの前後で、MicroHex(商標)マイクロ担体粒子(Nunclon(商標) Δ、Nunc)で得られるXPSサーベイスペクトルから計算した元素組成比。

20

	O/C	N/C
MicroHex(商標)	0.166	0.001
MicroHex(商標)-10 % AA	0.258	0.149

【0123】

パートB：表面のカルボン酸官能基のNHS活性化及びc(RGDfK)の共有結合固定化

30

Milli-Q（商標）水に0.125 Mの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及び0.125 MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含有する溶液を調製し、10%のAAで改質したMicroHex（商標）マイクロ担体粒子を用いて、粒子を過量の溶液で覆うような方法でインキュベーションした。溶液を、調製直後に改質した微小粒子に加えた。時折振とうさせながらインキュベーションしてから20分後に、微小粒子を遠心分離し、Milli-Q（商標）水に再懸濁することにより、Milli-Q（商標）水を用いて3回洗浄した。次いでNHSで活性化させた微小粒子は、後続の反応のために直ちに使用した。

【0124】

以下の方法を使用して、トリ-アミノ酸モチーフ、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（c(RGDfK)、Peptides International）を含有するN-C末端環化分子をポリマーコーティングに共有結合させた。上に記載されているように調製された、新しく調製されたNHSで活性化させたMicroHex（商標）マイクロ担体粒子を含有する各ウェルに、PBS中の200 mg/mLのc(RGDfK)を含有する溶液を（0.6 cm³）ずつ加えた。続いて、Milli-Q（商標）水を用いて微小粒子を10回洗浄し、各洗浄ステップの後で微小粒子を遠心分離し、再懸濁した。最後に表面を改質した微小粒子を、大量のMilli-Q（商標）水を用いて72時間にわたりインキュベーションし、その後細胞培養実験を行った。

40

パートC：表面を改質したマイクロ担体粒子におけるL929の細胞付着性

【0125】

50

10 % ウシ胎仔血清及び 1 % 非必須アミノ酸を含有する改変イーグル培地 (MEM) に
おいてマウス線維芽細胞 (L929) を培養した。10 % AA により改質した微小粒子 (
パート A で記載) 及び c (RGDFK) により改質した微小粒子 (パート B で記載) を、
実施例 3 のように細胞非付着性の PEGMA-OH UV グラフトポリマーコーティング
を用いて改質した 4 ウェル組織培養ポリスチレンプレート (Nunc lon (商標)、
Nunc) のウェルにそれぞれ含有させて、L929 細胞を播種した。細胞の播種前に、
1 % (v/v) の抗生物質 - 抗菌剤溶液 (Gibco) を含有した無菌 PBS (0.3 c
m³ / ウェル、pH 7.4) を、それぞれ、室温で 2 ~ 4 時間加えることにより、ミコ担
体粒子を殺菌した。各ウェルは、充填した 0.1 c m³ の表面を改質した粒子を含有して
いた。細胞の播種密度は 2 × 10⁴ 個細胞 / ウェルであった。20 ~ 22 時間の細胞培養
期間の後で、細胞付着の位相差画像は、各試料に対して代表的な領域で撮影した。撮影し
た位相差画像は、図 8 A 及び図 8 B で示されている。共有結合固定化された c (RGDFK)
を含有していなかった試料に対する画像 (図 8 A) の細胞は非付着性であり、円形形
態である一方、c (RGDFK) が共有結合固定化された試料に対して撮影した画像 (図
8 B) の細胞は付着性であり、十分広がった形態であった。10 % AA 及び 90 % AAM
のモノマー供給で形成された UV グラフトポリマーコーティングの細胞付着性により、c
(RGDFK) が共有結合固定化し、UV グラフトコーティングの細胞非付着性により c
(RGDFK) が共有結合固定化せず、熱応答性 - 熱応答性 - 熱応答性であったことが、
これらの細胞培養の結果から実証される。

10

20

30

40

50

【0126】

実施例 11

ポリマーグラフト：連続対間欠 UV 照射

パート A：コーティングの調製

シリコンウェーハ (Si) を約 7 × 7 mm の寸法の正方形に切り、2 % (v/v) RB
S-35 (登録商標) 界面活性剤溶液中で超音波清掃し、エタノールを用いてすすぎ、M
illi-Q (商標) 水を用いて徹底的にすすぎ、精製した窒素下で乾燥させた。使用する
直前に、ProCleaner (商標) という機器 (Bioforce Nanosc
ience、USA) で UV / オゾン処理により Si ウェーハ片をさらに 60 分間清掃し
た。アリルアミンモノマーに由来するアミン官能基を有する架橋結合ポリマー薄膜を、ラ
ジオ周波数グロー放電 (RF GD) 技術を使用して Si ウェーハ片に蒸着させた。次いで
、反応チャンバを < 0.003 mbar の圧力まで完全に真空排気し、アリルアミンの蒸
気で満たして徐々に 0.200 mbar の圧力まで上昇させた。このとき、25 秒間にわ
たり 200 kHz の周波数及び 20 W の負荷電力で電圧を電極に加えた。次いで、M
illi-Q (商標) 水を用いて、生じたアリルアミンコーティング (Si-ALAPP) を
すすぎ、その後さらに使用した。

【0127】

N₂ グローブボックスにて、濃度 10 % (w/v) の H₂O 中の AAM 溶液を調製し、
N₂ で 60 分間パージした。次いで、Si-ALAPP 試料に AAM 溶液を加えて、A
AM 溶液を深さ 3 mm とし、家庭用掃除機の食品保存システム (Sunbeam) を使用し
て、ポリプロピレンバッグの内側を酸素侵入から密閉した。次いで、N₂ グローブボッ
クスから密閉した試料を除去し、高出力 UV ランプ (9 mm の D バルブを有する FUSIO
N Systems FS300s) により作り出された UV で露光した。通常の操作で
は、試料は、ランプ下をコンベヤー (Fusion UV Systems, Inc. L
C6B Benchtop Conveyor) で通過し、各通過は、2849 (UVA)
)、822 (UVB)、81.5 (UVC) 及び 2922 (UVV) mJ / cm² になる
(携帯型 UV 測定器 (EIT UV Power Puck II) を用いて計測した)
。これらの値を知ることにより、様々な加工プロトコルを挟んだ UV 照射量を等しくする
ことが可能となった。試験されたプロトコルは 1) 間欠 (ベルトで 22 回通過させる)、
2) 間欠 + 遅延 (22 回通過させ、各回の間で 30 秒遅延させる) 及び 3) 連続 (ランプ
下の適所に一定時間試料を固定し、22 回通過当量の UV 照射量が与えられる)。望まし

いUV露光の後で、試料を多量の水で洗浄し、次いで、濾過精製した窒素流下で乾燥させてから分析した。

【0128】

パートB：コーティングの特性決定

調製されたコーティングのXPS分析を実行し、得られた結果を表11で示した。RF GD薄膜(Si-ALAPP)を蒸着させた後で、この種のコーティングで予想されるように、この試料の組成は、C及びNが豊富であった。AAMモノマー溶液中の試料を連続照射した後で、O及びN両方の原子百分率が増加し、主にポリアクリルアミドを含むグラフトポリマーコーティングと一致する(PAAMの理論的組成と比較)。AAMモノマー溶液の存在下で、間欠方法及び間欠+遅延方法で試料を照射しても、グラフトポリアクリルアミドコーティングの理論的予想に一致したコーティングが生成された。高解像度C1sスペクトル(示されていない)により、3例すべてでポリアクリルアミドコーティングの存在を確認した。一般的に、厚さがXPS技術の分析深さ(5~10nm)未満でない限り、XPS技術を用いてでは、コーティングの厚さを推定することはできない。

【0129】

【表11】

表11:連続、間欠又は間欠+遅延条件を使用して形成されるグラフトポリマーコーティングのXPS分析から得られる原子百分率及び元素組成比。比較のために、Si-ALAPP試料及びポリアクリルアミド(PAAM)の理論的組成に対して得られる分析結果も含まれている。

試料	C (%で)	O (%で)	N (%で)	O/C	N/C
PAAM(理論的)	60.7	19.7	19.7	0.33	0.33
Si-ALAPP	76.8	12.6	10.4	0.16	0.14
連続	64.6	18.3	17.1	0.28	0.27
間欠	62.3	18.8	16.8	0.30	0.27
間欠+遅延	60.4	19.6	16.9	0.32	0.28

【0130】

調査中に、3つの条件を使用して形成されるグラフトポリマーコーティングの厚さを推定するために、形状測定を使用した。この例では、コーティングした試料を注射針の先端で傷付けてSiウェーハの真下を露光させた。次いで、様々な傷/箇所に対して、側面計(VeecoのDektak)を用いて、傷の深さを計測し、Si-ALAPP基材表面に言及した。反復形状測定実験の結果は、表12で提示されている。Si-ALAPP試料の厚さに関するデータは、含まれていない(典型的には25~30nm厚)。グラフトポリマーコーティングに関する厚さのデータは、Si-ALAPP基材の表面に言及している。

【0131】

表12に提示されているデータにより、調製されたコーティングを乾燥させた厚さは：連続<間欠<間欠+遅延の順で増加していたことが明らかに示された。連続UV照射を使用して生成した、コーティングを乾燥させた厚さは、間欠UV照射条件下で生成したコーティング2種の厚さより有意に薄かったことが明らかとなった。さらに、間欠+遅延UV照射を使用して作られたコーティングは、間欠UV照射により作られたコーティングよりも有意に厚くなった。

【0132】

生成されたコーティングを水和させた厚さは、乾燥させた厚さよりも細胞培養用途に適切である。コーティングを水和させた厚さを推定するために、原子間力顕微鏡(AFM)技術を実施した。この場合、シリカコロイド粒子(直径約4μm)(Epon 1004、Shell)をカンチレバースプリングに貼り付けて、公知の形状(すなわち球面)のプローブを得た。次いで、リン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.4)溶液中でシ

リカコロイド及びグラフトポリマーコーティングの間の相互作用を、分離距離に応じて計測した。シリカコロイドがコーティングと接触すると、反発力が作り出され、その範囲によって、コーティングを水和させた厚さが推定される。流体セル内に取り付けられた試料のいくつかの箇所で、MFP-3D AFM (Asylum Research, Santa Barbara, CA) を使用して相互作用力を計測した。Cleveland (Cleveland, J. ら、(1993年)、Rev. Sci. Instrum., 64、403~5) の共鳴方法を使用して、カンチレバーのスプリング定数を測定し、光学顕微鏡法を使用してシリカ粒子の半径を測定した。MFP-3Dというソフトウェアを使用して、移動した圧電素子の距離に応じたカンチレバーのたわみを分離距離に応じた力で測った。非圧縮面、例えばSiウェーハ片を使用して、基準測定を行い、激しく接触する際のたわみによる逆傾斜を使用して、光検出器を校正した。

10

【0133】

【表12】

表12:連続、間欠又は間欠+遅延条件により調製されたグラフトポリマーコーティングに対して得られた結果。形状測定を使用して乾燥させた厚さに関するデータを得た。PBS溶液におけるAFMの直接力測定を使用して、水和させた厚さに関するデータを得た。乾燥及び水和させた厚さの値から膨張率を計算した。ヘルツ理論(ヘルツ理論及び使用される手法の参考文献:Dimitriadis, E.K. ら(2002年)、Biophysical J., 82、2798~2810頁を参照)を使用して計算される、相互作用力のデータ及び理論的予測との比較の分析から、試料の係数を得た。報告されている結果は、反復試料における3箇所の分析から得られる平均である。

20

試料	乾燥させた厚さ (nm)	水和させた厚さ (nm)	膨張率	係数 (Pa)
連続	136 ± 38	708 ± 20	5.2	200
間欠	231 ± 11	4056 ± 155	17.5	90
間欠+遅延	302 ± 10	5549 ± 288	18.3	90

30

【0134】

連続、間欠及び間欠+遅延UV照射条件を使用して調製されたグラフトポリマーコーティングに関して、水和させた厚さを分析した、表12で提示されているデータから、連続UV照射を使用して作られたコーティングは、間欠UV照射条件を使用して調製した2種のコーティングよりも有意に薄かったことが明らかに示された。さらに、間欠+遅延UV照射を使用して作られたコーティングが、間欠UV照射により作られたコーティングよりも有意に厚かった。

【0135】

間欠UV照射により作られたコーティングは、PBS溶液を用いて水和した場合、連続UV照射を使用して作られたコーティングよりはるかに膨張できることが、3種のコーティング(表13を参照されたい)の膨張率の分析により示された。これは、コーティング内の架橋結合の程度による可能性がきわめて高い。連続UV照射により4つのプロセス;(i)フリーラジカル形成、(ii)鎖切断、(iii)架橋結合反応及び(iv)ポリマー鎖成長が生じるであろう。これらの4つのプロセスは、間欠UV照射を使用して調製したグラフトポリマーコーティングに対しても発生するが、4つのプロセスの相対的なバランスが異なる可能性がきわめて高いであろう。フリーラジカル形成が、両方の場合で同等であるとする、試料がUVを用いて照射されていないとき、間欠UV照射は、連続照射及びコーティング内の架橋結合が少ない場合より、より多くのポリマー成長を生じるはずである。この仮説は、乾燥及び水和させた厚さの両方で裏付けられ、それらの厚さはいずれも、間欠UV照射で調製した試料の場合よりも厚かった。連続UV照射を使用して調

40

50

製した試料に対して得られた膨張率の低下により、コーティング内により高度な架橋結合が生じたことが示唆される。より厚いコーティング、例えば、間欠UV照射を使用して調製された同等の架橋結合度を有するものは、きわめて類似した膨張率を有するであろう。UV照射（間欠＋遅延）を伴わずに時間を延長させる影響により、ポリマーコーティンググラフト層の厚さが増加することになり、試料が照射されない場合、非照射時間が短い（間欠）なものよりも多くのポリマー成長が発生し、連続UV照射条件よりはるかに多くのポリマー鎖成長が発生することがやはり示唆された。

【0136】

AFMの直接相互作用力に関するデータ分析から、及びヘルツ理論を使用して作り出されたモデルデータを用いて力曲線を当てはめることにより得られたコーティング条件3種の係数値も、表12で報告されている。この場合、2つの間欠条件を使用して生成されたコーティングは、連続照射を使用して調製したものよりわずかに柔軟であることが明らかである。このデータは、間欠UV照射を使用して作られたコーティング内に架橋結合は少ないという仮説を支持している。

10

【0137】

実施例12

異なるコーティング構造への細胞応答

パートA：UV照射の間欠露光を使用した開始剤を伴わないUVグラフトコポリマーコーティングの形成

実施例1の通りに、グローブボックス（酸素濃度<0.1%）にて、窒素を用いて15分間超パージすることにより、様々なモル比の（0～100%）アクリル酸（AA）及びアクリルアミド（AAM）モノマーの10%（w/v）水溶液を脱気した。次いで、この方法によって調製した溶液を96ウェル組織培養ポリスチレン（TCPS）プレート（Nunc lon（商標）、Nunc）のウェルに移した。各ウェルに加えられるモノマー溶液の体積は、0.07cm³であった。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、上記のモノマー溶液を含有するプレートをポリ袋（Sunbeam Food Saver）中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。次いで、UVランプ（FUSION Systems FS300s、9mmのDバルブ）下で、約1.8m/分の速度のコンベヤーベルト（FUSION Systems LC6B Benchtop Conveyor）でプレートを35回通過させた。各通過の後、プレートを180度回転させて、より均一なUV照射を可能とした。次いで、Milli-Q（商標）水を流しながら用いてプレートを徹底的に洗浄し、続いて、大量のMilli-Q（商標）水で、室温で72時間インキュベーションし、毎日水を変え、残留したモノマー又は非共有結合ポリマーはいずれも除去した。最後に、マルチウェルプレート試料を空気乾燥させた。

20

30

【0138】

パートB：マクロ開始剤をベースとしたUVグラフトコポリマーコーティングの形成

他に[Griesser HJ.、Vacuum 39（1989年）485頁]に記載されているラジオ周波数グロー放電プラズマ反応器に、96ウェル組織培養ポリスチレンプレート（Nunc lon（商標）、Nunc）を導入した。ベースのマルチウェルプレートと同一の寸法を有する長方形の銅電極にプレートを配置した。次いで、アリルアミンプラズマポリマー（ALAPP）薄膜の蒸着を20Wの出力、200kHzの周波数及び0.33mbarの初期のモノマー圧力で25秒間実行した。

40

【0139】

続いて、他に[L. Meagher、H. Thissen、P. Pasic、R. A. Evans、G. Johnson、WO2008019450-A1]に記載されている、自家合成したマクロ開始剤ポリ（アクリル酸-co-ジエチル-ジチオカルバミン酸4-ビニル-ベンジルエステル）（PI）を、90%（v/v）DMF（Merck）及び3.8mg/mLのN-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDC）（Sigma）を含有する10%（v/v）のMilli-Q（商標）水の混合物と共に、室温で2時間にわたり1%（w/v）のPI濃度で、インキュベシ

50

ョンすることにより、アミン官能基化マルチウエルプレートの表面に共有結合固定化した。次いで、90% (v/v) DMF (Merck) 及び10% (v/v) Milli-Q (商標) 水の混合物を用いてプレートを3回洗浄し、Milli-Q (商標) を用いて3回洗浄し、その後空気で乾燥させた。

【0140】

グローブボックス (酸素濃度 < 0.1%) にて、様々なモル比 (0 ~ 100%) のアクリル酸 (AA) 及びアクリルアミド (AAM) モノマーを含有する10% (w/v) の水溶液を、窒素を用いて15分間超パージすることにより脱気した。次いで、この方法によって調製された溶液をPIで改質したALAPPにより処理した96ウェル組織培養ポリスチレンプレートのウェルに移した。各ウェルに加えられるモノマー溶液の体積は0.20 cm³であった。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、上記のモノマー溶液を含有するプレートは、ポリ袋 (Sunbeam Food Saver) 中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。次いで、UVランプ下 (Spectrol ine、モデルXX-15A) にプレートを配置し、特注のボックス中で6時間10 mW/cm²の強度で継続的に照射して、重合を達成した。次いで、Milli-Q (商標) 水を用いて、プレートを少なくとも3回徹底的に洗浄し、続いて大量のMilli-Q (商標) 水で72時間にわたり室温でインキュベーションを行って、残留したあらゆるモノマー又は非共有結合ポリマーを除去した。最後に、マルチウエルプレートの試料を空気乾燥させた。

パートC：コーティング組成の特性決定及び細胞応答

【0141】

TCPS (パートA) 又はTCPS-ALAPP-PI (パートB) 基材にて、AA及びAAM溶液を使用して調製されたホモ及びコポリマーコーティングにおいて、それぞれ2つの異なるUVをベースとしたコーティング方法を使用してX線光電子分光法 (XPS) 分析を実行した。得られた結果を、表13及び14に提示する。結果の分析から、すべての事例において、コーティングが基材からうまく成長したことが実証された。開始剤なしの間欠UVコーティング方法 (パートA) で生成されたコーティングで観察されたO/C及びN/Cの元素組成比は、特定のモノマー溶液に由来するホモポリマー又はコポリマーコーティングの理論的予想値に近い、コーティング中のAA及びAAMのモル比は、モノマー供給溶液中のモル比と類似しているという証拠を示す。O/C及びN/C比の両方で、明確な傾向も観察された。同一の傾向は、マクロ開始剤をベースとしたUV方法 (パートB) により調製されたコーティングで観察された。しかし、後者の場合では、この方法により達成されるコーティングの厚さが減少したため、観察された元素組成比は、理論的予想値とはやや異なり、乾燥させた厚さがXPS技術のプロブ深さ未満のコーティング (すなわち、データの一部は、コーティング及び基材の両方からの寄与を含有していた) となった。

【0142】

10

20

30

【表 1 3】

表13:組成を変化させたAA及びAAM溶液を使用して、TCPS基材において調製したグラフトホモ及びコポリマーコーティングのXPS分析から得られた平均元素組成比。コーティングは、開始剤なしの間欠UVグラフト重合(パートA)を使用して形成される。

Mol % AA	O/C	N/C
0	0.299	0.281
5	0.301	0.256
10	0.339	0.230
15	0.341	0.224
20	0.366	0.212
25	0.396	0.201
30	0.399	0.187
40	0.414	0.170
50	0.505	0.131
55	0.455	0.134
60	0.453	0.140
70	0.510	0.076
85	0.562	0.045
100	0.566	0.033

10

20

【 0 1 4 3】

【表 1 4】

表14:組成を変化させたAA及びAAM供給溶液を使用して、TCPS-ALAPP-PI基材において調製したグラフトホモ及びコポリマーコーティングのXPS分析から得られた平均元素組成比。マクロ開始剤をベースとしたUVグラフト重合を使用して、コーティングが形成される(パートB)。

30

試料	O/C	N/C
ALAPP	0.152	0.112
ALAPP-PI	0.157	0.099
0 mol % AA	0.240	0.241
5 mol % AA	0.278	0.241
10 mol % AA	0.291	0.224
20 mol % AA	0.333	0.203
50 mol % AA	0.302	0.092
100 mol % AA	0.332	0.058

40

【 0 1 4 4】

ヒラー細胞、ヒト間葉幹細胞(hMSC)又はL929マウス線維芽細胞を使用して、細胞のコーティングへの付着を判断した。表面を改質した96ウェル組織培養ポリスチレンプレート、並びに96ウェル組織培養ポリスチレン対照プレート(Nunc1on(

50

商標)、Nunc)を使用して、細胞培養実験を実行した。開始剤なしの間欠UVコーティング方法を使用して調製した試料を、15 kGy (Steritech)の照射量を使用した照射により殺菌した。マクロ開始剤をベースとしたUVコーティング方法を使用して調製した試料は、細胞培養の直前に、ペニシリン及びストレプトマイシンを含有するリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)の溶液をそれぞれ120及び200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の濃度で用い、室温で4時間にわたりインキュベーションすることにより殺菌した。

【0145】

10%ウシ胎仔血清(FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシン及びグルタミンを補充した新しいダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)/ハムF12培地にて、 2×10^4 個細胞/ウェルの播種密度でヒラー細胞の付着を評価した。

10

【0146】

Mesencult (商標登録) - XF培地 (Stemcell (商標) Technologies) にて、7875個細胞/ウェルの播種密度で、ヒト間葉幹細胞(hMSC)の付着を評価した。

【0147】

10%FBS、1% v/v 非必須アミノ酸、及び1% v/vの抗-抗を補充したMEM + GlutaMAX (商標) - I培地 (Gibco) にて、7875個細胞/ウェルの播種密度で、L929細胞の付着を評価した。

【0148】

各細胞型に対して、5%のCO₂を含有する加湿空気中にて、37℃で24時間プレートをインキュベーションした。

20

【0149】

ヒラー細胞の場合、200 μL の培地を用いてウェルを洗浄することにより、細胞付着の定量化を実行して、懸濁し、弱く結合した細胞を、インキュベーションの24時間後に除去した。次いで、DMEM/ハムF12溶液中の(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド)(MTT)を各ウェル及びプレートに加えて、37℃で4時間インキュベーションした。各ウェルから培地を除去し、DMSO(100 μL /ウェル)に取り換えた。プレートシェイカーで15分間プレートを静かに揺り動かして、染色剤を溶解させ、その後、595 nmの波長で細胞生存能力の測色測定を行った。試験試料から計測した吸光度値は、組織培養ポリスチレン(TCPS)の対照ウェルで計測されたものの百分率として表現される。

30

【0150】

hMSC細胞の場合、200 μL の培地を用いてウェルを洗浄することにより、細胞付着の定量化を実行して、懸濁し、弱く結合した細胞を、インキュベーションの24時間後に除去した。次いで、培地中の、100 μL の[3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(MTS)]を各ウェルに加え、プレートを37℃及び5%のCO₂で3時間インキュベーションした。490及び655 nmの波長にて、マイクロプレートリーダー(Biotek)を用いて結果を読み取った。両波長の測定値間の差を得て、平均化した。次いで、TCPS表面から得られた測定値と比較することによりデータを標準化した。

40

【0151】

L929細胞の場合、200 μL の培地を用いてウェルを洗浄することにより細胞付着の定量化を実行して、懸濁し、弱く結合した細胞をインキュベーションしてから24時間後に除去した。次いで、10%FBS及び最小必須アミノ酸を含有するMEM培地(Gibco)中の、100 μL の[3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(MTS)]を、各ウェルに加え、37℃及び5%のCO₂でプレートを3時間インキュベーションした。490及び655 nmの波長にて、マイクロプレートリーダー(Biotek)を用いて結果を読み取った。両波長の測定値間の差を得て、平均化した。次いで

50

、T C P S 表面から得られた測定値と比較することにより、データを標準化した。

【0152】

図9は、ポリマーコーティングの組成に応じて、2つの異なるUV方法を使用して調製したコーティングに回答した細胞付着の結果を示す。コーティングは、アクリル酸(AA)又はアクリルアミド(AAM)の定義したモル比から形成されるホモポリマー又はコポリマーであった。間欠UV露光(パートA)により生成される、開始剤なしのUVをベースとしたコーティングに関して、hMSCの付着により、モル百分率でAAが最大55%のT C P Sで得られる細胞付着性の10%未満のレベルまで事実上低下した。比較すると、マクロ開始剤をベースとしたUV手法(パートB)を使用して調製したコーティングに関しては、ヒラー細胞の付着性は、モル百分率でAAが10%未満のT C P Sで得られた値の10%未満のレベルにしか事実上低下しなかった。見やすくするために線を引いた(n=3)。

10

【0153】

ポリスチレン基材の表面に存在するコポリマーコーティング中における同一モル比のAA及びAAMに関しては、コーティング方法に応じて、様々な細胞付着応答が観察されることが、図9で提示されているデータの分析により明らかに示唆される。間欠UV照射により生成される、開始剤なしのUVをベースとしたコーティング(パートAに記載されている)に関して、モル百分率でAAが最大55%のT C P S値において、細胞付着性を10%未満のレベルに事実上低下させることができる。比較すると、マクロ開始剤をベースとしたUV手法を使用して調製したコーティングに関し、細胞付着性は、AAが10%未満のモル百分率に対するT C P S値において10%未満のレベルにしか事実上低下しなかった。これらの結果は、ヒト間葉幹細胞(hMSC)及びヒラー細胞を使用して、それぞれ得られた。さらに、図10に提示されているデータの分析から、同一のコーティングで異なる細胞型を用いて(hMSC及びL929細胞を用いて)、類似した細胞付着の結果を得たことが明らかに示されている。この結果は、間欠的にUVを使用した、開始剤なしのUVをベースとしたコーティング方法によって生成されたコーティングに対する、AA/AAMモル組成の全範囲にわたって得られた。結果から、類似した細胞付着を達成できたことが明らかに実証される。いずれの細胞型に関しても、細胞付着性は、モル百分率でAAが最大55%のT C P Sの10%未満のレベルに事実上低下した。見やすくするために線を引いた。

20

30

【0154】

比較すると、連続照射を使用して調製した40mol%のAA-co-AAAM表面では、L929接着性は同じく低いことが観察されることが、実施例13に提示されているデータの分析により明らかに示される。

【0155】

アクリル酸(AA)及びアクリルアミド(AAM)をベースとしたコポリマーコーティングに対する、異なる細胞型の応答を図10に示す。コーティングを、間欠UVを使用して、開始剤なしのUVをベースとしたコーティング方法により生成した。hMSC及びL929細胞を使用して、類似した細胞付着の結果が得られた。いずれの細胞型に関しても、細胞付着性は、モル百分率でAAが最大55%のT C P Sの10%未満のレベルに事実上低下した。見やすくするために線を引いた(n=3)。

40

【0156】

図9及び10のデータ全体から、まったく異なる、UVをベースとした2種の重合方法により、様々なコーティング構造が生成される仮説が支持され、この差は、細胞応答において観察される差に回答(すなわち細胞付着)していた。さらに、データから、開始剤なしでUVをベースとしたコーティング方法によって生成されたコーティングは、AA及びAAM組成のモル比よりはるかに広い範囲にわたり、様々な細胞型による細胞付着を予防する際に、より有効なことが明らかに実証される。細胞付着性は、血清タンパク質の非特異的吸着によって使用可能となることから、開始剤なしのUVをベースとしたコーティング方法は、AA及びAAMのモル比よりはるかに広い範囲にわたり、非特異的血清タンバ

50

ク質の吸着を予防する際に、より有効であると結論付けることができる。

【0157】

実施例13

ポリマーグラフト：連続対間欠UV照射

パートA：コーティングの調製

シリコンウェーハ(Si)を7×7mm寸法の正方形に切り、2%(v/v)RBS-35(登録商標)界面活性剤、2%(v/v)エタノール溶液中で超音波清掃し、Milli-Q(商標)水を用いて徹底的にすすぎ、濾過した精製窒素ガス流で高速乾燥させた。使用直前に、ProCleaner(商標)という機器(Bioforce Nanoscience、USA)で、UV/オゾン処理によりSiウェーハ片をさらに60分間清掃する。次いで、次いで、他に[Griesser HJ.、Vacuum 39(1989年)485頁]に記載されているラジオ周波数グロー放電プラズマ反応器に、シリコンウェーハ試料を導入した。上部の電極と同一の寸法を有する下部の円形銅電極に試料を配置した。次いで、アリルアミンプラズマポリマー(ALAPP)薄膜の蒸着を、出力20W、200kHzの周波数及び0.20mbarの初期モノマー圧力で25秒間実行した。生じたアリルアミンコーティング(Si-ALAPP)をさらに使用するまで空气中に放置した。

10

【0158】

窒素グローブボックスにおいて、40mol%アクリル酸(AA)及び60mol%アクリルアミド(AAM)を含有する7.5%(w/v)水溶液を調製し、Si-ALAPP試料を含有するPTFE容器にも移した。各容器に加えたモノマー溶液の体積は、4mlであった。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、モノマー溶液を含有する容器を、ポリ袋(Sunbeam FoodSaver)中に真空密閉しつつ、グローブボックスから除去した。次いで、密閉した試料を高出力UVランプ(9mmのDバルブを有するFusion UV Systems LH6)により作り出されたUVで露光した。通常の操作では、ランプ下の固定したステージに試料を位置させ、照射した。「オン」を露光期間として定義し、「オフ」を非露光期間として定義できるように、空気シャッターを開閉するプログラムを設定した。携帯型UV測定器(EIT UV Power Puck II))を使用して、あらゆる所定の設定の下で試料に達する、全エネルギー及び放射照度を測定した。次いで、これらの値を知ることにより、様々な加工プロトコルと同等なUV照射投与を決定することができる。

20

30

【0159】

試験された様々な加工プロトコルは、表15で示されている。

【0160】

【表 1 5】

表15

試料	オン ^{&} (秒)	オフ ^{&} (秒)	サイクル	UVC (J/cm ²)
連続1秒	15	n/a	1	0.58
連続2秒	30	n/a	1	0.99
連続3秒	45	n/a	1	1.41
連続4秒	60	n/a	1	1.83
連続5秒	75	n/a	1	2.25
連続6秒	90	n/a	1	2.67
連続7秒	120	n/a	1	3.51
間欠(連続6秒)-オフ20秒～1秒	1	20	53	2.67*
間欠(連続6秒)-オフ20秒～2秒	1.9	20	35	2.67*
間欠(連続2秒)-オフ20秒～1秒	1	20	19	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ20秒～2秒	2.9	20	9	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ20秒～3秒	4.7	20	6	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ20秒～4秒	10	20	3	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ20秒～5秒	15	20	2	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ1秒～1秒	1	1	19	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ10秒～1秒	1	10	19	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ30秒～1秒	1	30	19	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ60秒～1秒	1	60	19	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ1秒～3秒	4.7	1	6	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ40秒～3秒	4.7	40	6	0.99*
間欠(連続2秒)-オフ60秒～3秒	4.7	60	6	0.99*

- ・ *標的値。
- ・ 設備に使用される設定を表す[&]値。

【 0 1 6 1 】

望ましいUV露光の後で、多量の水を用いて試料を洗浄し、次いで、濾過し精製した窒素流下で乾燥させた後で分析した。

【 0 1 6 2 】

パートB：コーティングの特性決定

調製したコーティングのXPS分析を実行し、得られた結果を表16に提示した。

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

【表 16】

表16:連続及び間欠加工条件を使用して形成された、グラフトポリマーコーティングのXP S分析から得られた原子百分率及び元素組成比。

試料	O (%で)	N (%で)	C (%で)	O/C	N/C
Si-ALAPP(シリーズ1)	17.5	8.5	73.4	0.24	0.12
連続1秒	26.2	9.1	63.5	0.41	0.14
連続2秒	26.4	9.2	63.5	0.42	0.14
連続3秒	27.4	9.1	62.4	0.44	0.15
連続4秒	27.3	9.1	62.2	0.44	0.15
連続5秒	27.4	9.0	62.3	0.44	0.14
連続6秒	27.2	9.0	62.7	0.43	0.14
連続7秒	25.0	10.9	63.1	0.40	0.17
Si-ALAPP(シリーズ2)	17.6	8.5	73.0	0.24	0.12
間欠(連続6秒)-オフ20秒～1秒	27.2	9.3	62.3	0.44	0.15
間欠(連続6秒)-オフ20秒～2秒	27.6	9.3	61.8	0.45	0.15
間欠(連続2秒)-オフ20秒～1秒	27.6	9.2	61.9	0.45	0.15
間欠(連続2秒)-オフ20秒～2秒	27.7	9.1	61.9	0.45	0.15
間欠(連続2秒)-オフ20秒～3秒	27.5	9.2	61.9	0.44	0.15
間欠(連続2秒)-オフ20秒～4秒	27.8	9.2	61.7	0.45	0.15
間欠(連続2秒)-オフ20秒～5秒	27.3	9.1	62.3	0.44	0.15
Si-ALAPP(シリーズ3)	16.0	12.4	71.3	0.22	0.17
間欠(連続2秒)-オフ1秒～1秒	27.6	9.9	62.2	0.44	0.16
間欠(連続2秒)-オフ10秒～1秒	27.3	9.8	62.7	0.43	0.16
間欠(連続2秒)-オフ30秒～1秒	27.3	9.5	62.9	0.43	0.15
間欠(連続2秒)-オフ60秒～1秒	27.5	9.6	62.6	0.44	0.15
間欠(連続2秒)-オフ1秒～3秒	27.6	9.8	62.4	0.44	0.16
間欠(連続2秒)-オフ40秒～3秒	26.6	9.9	63.3	0.42	0.16
間欠(連続2秒)-オフ60秒～3秒	27.1	9.7	62.9	0.43	0.15

【0164】

アリルアミンプラズマポリマー薄膜(Si-ALAPP)を蒸着させた後の組成は、予想通りであった。モノマー溶液における試料を連続照射した後で、O及びN原子両方の百分率が上昇し、アクリルアミド及びアクリル酸からなるグラフトコポリマーコーティングと一致した。

【0165】

偏光解析法を使用して、形成されたグラフトポリマーコーティングの厚さを推定した(JA Woolam Co、M2000)。相データを4通りの角度(60、65、70

10

20

30

40

50

、及び75度)で、各角度において20秒間にわたり収集した。一般的なTauc-Lorentz振動子モデルを使用してデータを当てはめた。偏光解析法実験の結果を表17に提示する。

【0166】

【表17】

表17:連続及び間欠条件を使用して形成された、グラフトポリマーコーティングの偏光解析に由来する厚さのデータ。

試料	厚さ*(nm)
Si-ALAPP(シリーズ1)	29.04
連続1秒	15.2
連続2秒	33.81
連続3秒	63.21
連続4秒	95.64
連続5秒	115.93
連続6秒	151.98
連続7秒	NM
Si-ALAPP(シリーズ2)	29.52
間欠(連続6秒)-オフ20秒～1秒	212.8
間欠(連続6秒)-オフ20秒～2秒	196.44
間欠(連続2秒)-オフ20秒～1秒	28.68
間欠(連続2秒)-オフ20秒～2秒	22.61
間欠(連続2秒)-オフ20秒～3秒	37.17
間欠(連続2秒)-オフ20秒～4秒	38.33
間欠(連続2秒)-オフ20秒～5秒	37.59
Si-ALAPP(シリーズ3)	32.9
間欠(連続2秒)-オフ1秒～1秒	122.09
間欠(連続2秒)-オフ10秒～1秒	66.66
間欠(連続2秒)-オフ30秒～1秒	96.97
間欠(連続2秒)-オフ60秒～1秒	115.53
間欠(連続2秒)-オフ1秒～3秒	108.95
間欠(連続2秒)-オフ40秒～3秒	134.79
間欠(連続2秒)-オフ60秒～3秒	127.83

- ・ nm=コーティング性状が不十分なため測定されていない
- ・ *層の厚さ(すなわち、下のALAPP層を含まない)

【0167】

10

20

30

40

50

「連続 7 秒」の試料は測定できなかった。反復試料の一部では、A L A P P は、長時間にわたる連続露光により温度が上昇し、劣化したことにより、S i 基材から剥離した。他の反復試験試料では、形成されたコーティングは、きわめて非均一であった。

【0168】

「連続 6 秒」の試料は、剥離が発生した反復試料の一部において、いくつかの場所で剥離寸前であるように見えた。しかし、コーティングの厚さは計測できた。「連続 6 秒」の試料、並びに「間欠（連続 6 秒） - オフ 20 秒 ~ 1 秒」の試料及び「間欠（連続 6 秒） - オフ 20 秒 ~ 2 秒」の試料を比較して、3 つの試料すべてが、 0.99 J/cm^2 の同一の U V C 照射量を受けており、連続露光方式から間欠露光方式への移行が、a) S i から A L A P P の剥離を伴わないコーティング、並びに b) 厚いコーティングを調製する能力の両方を生じたことは確かである。連続露光に対して、間欠露光を変化させて、この一連の試料で得られた厚さの増加は、実施例 11 で提示されているデータセットと一致する。実施例 11 において、間欠 U V 露光によりコーティングは厚くなり、P B S においてより高度に膨張し、より低い係数を有した。同一の傾向が、ここで提示されているデータセットに存在し得るとすることは理にかなっている。

10

【0169】

データセットにはっきり表れている明確な傾向の 1 つは、「オン」の時間は変動するが、U V C は一定に保持される場合、得られるコーティングの厚さは類似する（及び、一般的に連続照射で得られる厚さより厚くなる）ことである。このデータの分析により、コーティングの厚さを測定する際に全体の U V C 量はきわめて重要であるという結論が得られる。

20

【0170】

試料調製中に、「オフ」の時間による影響を考慮する場合に観察できる明確な傾向もある。照射後の遅延により、コーティングが厚くなることが実施例 11 で実証された。これは、試料が U V ランプから除去された後で継続する重合のためであり、再度 U V ランプ下に配置される前に遅延させることでさらに重合させ、コーティングを厚くできると本発明者らは結論付けた。この場合、本発明者らは、「オフ」の時間を増加させると（遅延時間を増加させることに相当）、さらに厚くなったコーティングが得られることを理解できる。例えば、「オフ」の時間を、10 秒 ~ 60 秒増加させると（試料に対して：間欠（連続 2 秒） - オフ 10 秒 ~ 1 秒、間欠（連続 2 秒 - オフ 30 秒 ~ 1 秒、及び間欠（連続 2 秒） - オフ 60 秒 ~ 1 秒）、厚さが 67 ~ 116 nm に増加した。したがって、「オン」時間では、全体の U V C 露光が厚さの増加に寄与すると考えられる。「オフ」時間の場合、「オフ」時間の長さが厚さの増加に寄与する。

30

【0171】

共有結合固定化し、細胞付着性の環状 R G D f K ペプチドを用いた L 9 2 9 線維芽細胞の培養も、以前の実施例と類似したプロトコルを使用して実行し、対照（付着性のペプチドなし）と比較した。すべての事例において、細胞は付着し、コーティングは十分に広がった。細胞数、細胞円形又は細胞によって占められている場所で注目される有意差はなかった。連続照射により調製した対照表面も細胞の接着に耐えた。

40

【0172】

実施例 14

ポリマーグラフト：サイクルを増加させた間欠 U V 照射

パート A：コーティングの調製

窒素グローブボックスにて、実施例 13 の通りに、40 mol % アクリル酸 (A A) 及び 60 mol % アクリルアミド (A A M) を含有する 7.5 % (w/v) 水溶液を調製し、S i - A L A P P 試料を含有する 48 ウェル組織培養ポリスチレンプレートのウェルにも移した。各ウェルに加えられたモノマー溶液の体積は、227 μL であった。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、モノマー溶液を含有するプレートをポリ袋 (S u n b e a m F o o d S a v e r) 中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。次いで、U V ランプ (F u s i o n U V S y s t e m s L H 6、9 mm の D バルブ)

50

下でコンベヤーベルト (Fusion UV Systems DRS 10/12 Conveyor) でプレートを5、15、25、35、又は45回通過させた。次いで、モノマー溶液からウェーハを除去し、Milli-Q (商標) 水を用いて少なくとも3回徹底的に洗浄し、続いて、大量のMilli-Q (商標) 水で、室温で72時間にわたりインキュベーションして、あらゆる残留モノマー又は非共有結合ポリマーを除去した。最後に試料を空気乾燥させた。

【0173】

パートB：コーティングの特性決定

調製したコーティングのXPS分析を実行し、得られた結果を図11に提示する。通過数が増加すると、測定された組成は、理論的組成である40mol%のポリ(AA-co-AA-M) コポリマーに対するALAPPの組成から変化し、約10nmであるXPSの試料深さを超えるコーティングの厚さの増加を示した。より多くのUV通過で理論的組成から観察された偏差は、共重合の反応速度論による可能性がある。

10

【0174】

偏光解析法を使用して、形成されるグラフトポリマーコーティングの厚さを推定した(JA Woolam Co、M2000)。相データを4通りの角度(60、65、70及び75度)で、各角度において20秒間にわたり収集した。一般的なTauc-Lorentz振動子モデルを使用してデータを当てはめた。偏光解析法実験の結果を図12に提示する。

20

【0175】

共有結合固定化し、細胞付着性の環状RGDFKペプチドを用いたL929線維芽細胞の培養も、以前の実施例と類似したプロトコルを使用し、対照(付着ペプチドなし)と比較して実行した。すべての事例において、細胞は付着し、コーティングに十分に広がった。細胞数、細胞円形又は細胞によって占められている場所で注目される有意差はなかった。試料に関する例外の1つは、5回のUV通過で調製されたもので、下のALAPPを細胞が検知したため細胞付着性が観察されたと考えられる。

30

【0176】

実施例15

ポリマーグラフト：UVB及び/又はUVCをブロックする効果

パートA：コーティングの調製

シリコンウェーハ(Si)を、7×7mmの寸法の正方形に切り、2%(v/v)RBS-35(登録商標)界面活性剤、2%(v/v)エタノール溶液で超音波清掃し、Milli-Q(商標)水を用いて徹底的にすすぎ、精製窒素下で乾燥させた。ProCleaner(商標)という機器(Bioforce Nanoscience、USA)で、Siウェーハ片をUV/オゾン処理により、使用する直前にさらに60分間清掃した。次いで、次いで他に[Griesser HJ.、Vacuum 39(1989年)485頁]に記載されているラジオ周波数グロー放電プラズマ反応器にシリコンウェーハ試料を導入した。上部の電極と同一の寸法を有する下部の円形銅電極に試料を配置した。次いで、アリルアミンプラズマポリマー(ALAPP)薄膜の蒸着を出力20W、200kHzの周波数及び0.20mbarの初期モノマー圧力で25秒間実行した。次いで、生じたアリルアミンコーティング(Si-ALAPP)を、Milli-Q(商標)水ですらに使用する前にすすいだ。

40

【0177】

窒素グローブボックスにて、40mol%アクリル酸(AA)及び60mol%アクリルアミド(AAM)を含有する7.5%(w/v)水溶液を調製し、Si-ALAPP試料を含有するPTFE容器にも移した。各容器に加えられたモノマー溶液の体積は4mlであった。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、モノマー溶液を含有する容器をポリ袋(Sunbeam FoodSaver)中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。さらに、一部の例では、試料表面におけるUVA、UVB及びUVCの強度を減衰させるために、フィルターをポリ袋の内側に配置した。特に使用される条件は：1

50

00%のUVA、100%のUVB及び100%のUVC；100%のUVA、30%のUVB及び0%のUVC；並びに最後に90%のUVA、0%のUVB及び0%のUVCであった。Power Puckという強度測定装置及び様々なフィルターを使用して、これらの値を測定した。次いで、密閉した試料をN₂グローブボックスから除去し、高出力UVランプ（Fusion UV Systems LH6、9mmのDバルブを有する）により作り出されたUVで露光した。通常の操作では、ランプ下の固定したステージに試料を位置させた。「オン」期間が露光の定義、「オフ」期間が非露光の定義であることが達成されるように、空気シャッターの開閉をプログラムした。携帯型UV測定器（EIT UV Power Puck II）を使用して総エネルギー及び所定のあらゆる設定下で試料に達する照射のタイプを測定した。各場合で、試料に20サイクルのUV露光を施し、UVは2秒間「オン」であり、各サイクルで10秒間「オフ」であった。

【0178】

パートB：コーティングの特性決定

コーティングにおいて得られたXPSの結果を表18に提示し、得られた3種すべてのコーティングの組成は、原子百分率だけではなく、O/C及びN/Cの元素組成比の両方に関してきわめて類似していたことも表から観察できた。図xxxに示されているのは、代表的な高解像度C1sスペクトルである。分析した各試料に対して得られたスペクトル3種の形状も、きわめて類似しており、組成だけではなく炭素系官能基の相対比率も類似していることが示唆される。XPSデータの分析により、調査した3種すべてのUV光、すなわちUVA、UVB及びUVCの存在下で、グラフトが発生し、生成したすべてのコーティングは、約10nmのXPSの分析深さを超える厚さを有していたことが示唆される。

【0179】

【表18】

表18:UVA、UVB及びUVCの百分率を変動させた間欠条件を使用して形成される、グラフトポリマーコーティングのXPS分析から得られた原子百分率及び元素組成比。

試料	O (%)	N (%)	C (%)	O/C	N/C
試料2(100%のUVA、100%のUVB、100%のUVC)	27.7	9.0	60.9	0.45	0.15
試料3(90%のUVA、0%のUVB、0%のUVC)	26.8	9.2	63.4	0.42	0.14
試料4(100%のUVA、30%のUVB、0%のUVC)	27.5	9.4	62.2	0.44	0.15

【0180】

UVA、UVB及びUVCを変動させた百分率で作ったコーティングは組成として類似しているが、100%のUVA、100%のUVB及び100%のUVC、それより薄い100%のUVA、30%のUVB及び0%のUVC、それより薄い90%のUVA、0%のUVB及び0%のUVCの順で厚さを変動させた。

【0181】

実施例16

ポリマーグラフト：アルゴン雰囲気

パートA：コーティングの調製

様々なモル比（0～100%）のアクリル酸（AA）及びアクリルアミド（AAM）モノマーの7.5%（w/v）水溶液を、凍結-送出-融解の3サイクルにより気密容器中で脱気し、次いで、アルゴンで満たしたグローブボックス（酸素濃度<0.03%）に移した。次いで、この方法によって調製した溶液を48ウェル組織培養ポリスチレン（TCPS）プレート（Nunc lon（商標）、Nunc）のウェルに移し、実施例13の

通りに、一部のウェルに Si - ALAPP 試料を含有させた。各ウェルに加えられるモノマー溶液の体積は、172 μ L (ウェーハなし) 及び 227 μ L (ウェーハあり) であった。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、上記のモノマー溶液を含有するプレートを、ポリ袋 (Sunbeam Food Saver) 中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。次いで、UV ランプ (Fusion UV Systems LH6、9 mm の D バルブ) 下でコンベヤーベルト (Fusion UV Systems DRS 10/12 Conveyor) でプレートを 40 回通過させた。次いで、Milli-Q (商標) 水を用いて、プレート及びウェーハを徹底的に洗浄し、続いて大量の Milli-Q (商標) 水で、室温にて 72 時間にわたりインキュベーションし、毎日水を変え、あらゆる残留モノマー又は非共有結合ポリマーを除去した。最後に、マルチウェルプレート試料及びウェーハを空気乾燥させた。

10

パート B : コーティングの特性決定

【0182】

調製したコーティングの XPS 分析を実行し、得られた結果を表 19 に提示する。XPS 分析から得られたデータの分析により、コーティング組成は予想通りであったことが示唆された。例えば、AAM モノマーのモル百分率が供給溶液中で減少するにつれて、コーティングにおける窒素の原子百分率は減少した。モノマー供給において AA のモル百分率が増加すると、窒素含有量の低下と並行して、酸素含有量の増加が観察された。

【0183】

【表 19】

20

表19: アルゴン雰囲気の間欠条件を使用して形成されるグラフトポリマーコーティングの XPS 分析から得られた原子百分率及び元素組成比。

試料	O (%で)	N (%で)	C (%で)	O/C	N/C
Si-ALAPP	15.6	12.6	71.8	0.22	0.18
0mol%のAA-co-AAM(すなわちAAM)	16.6	19.3	64.1	0.26	0.30
10mol%のAA-co-AAM	18.8	17.0	64.1	0.29	0.27
20mol%のAA-co-AAM	21.2	14.7	64.1	0.33	0.23
30mol%のAA-co-AAM	23.3	12.4	64.3	0.36	0.19
40mol%のAA-co-AAM	25.9	10.2	63.8	0.41	0.16
50mol%のAA-co-AAM	27.5	8.8	63.8	0.43	0.14
60mol%のAA-co-AAM	27.8	8.2	63.9	0.44	0.13
70mol%のAA-co-AAM	31.1	5.2	63.8	0.49	0.08
80mol%のAA-co-AAM	32.4	3.7	63.8	0.51	0.06
90mol%のAA-co-AAM	34.1	2.0	63.5	0.54	0.03
100mol%のAA-co-AAM(すなわちAA)	35.7	0.5	63.8	0.56	0.01

30

40

【0184】

形成されるグラフトポリマーコーティングの厚さを推定するために、偏光解析法を使用した。相データを 4 通りの角度 (60、65、70 及び 75 度) で、各角度において 20 秒間にわたり収集した。一般的な Tauc - Lorentz 振動子モデルを使用して、データを当てはめた。偏光解析法実験の結果を、表 20 に提示する。得られたデータ分析から、厚さにおけるわずかな差は、モノマー供給の組成 (すなわち AA 及び AAM モノマー

50

のモル百分率)によって決まるとはっきりしたこと、並びに、AAが20mol%を超えるAA及びAAMの組み合わせにより、最も厚いコーティングが得られるが、ホモポリマーコーティングはわずかに薄くなるように思われることが示された。

【0185】

【表20】

表20.アルゴン雰囲気の間欠条件を使用して形成されるグラフトポリマーコーティングの偏光解析に由来する厚さのデータ

試料	厚さ*(nm)
Si-ALAPP	27.5
0mol%のAA-co-AAM(すなわちAAM)	125.2
10mol%のAA-co-AAM	178.9
20mol%のAA-co-AAM	200.0
30mol%のAA-co-AAM	231.4
40mol%のAA-co-AAM	248.0
50mol%のAA-co-AAM	221.3
60mol%のAA-co-AAM	228.4
70mol%のAA-co-AAM	228.2
80mol%のAA-co-AAM	243.5
90mol%のAA-co-AAM	215.2
100mol%のAA-co-AAM(すなわちAA)	206.6

10

20

30

・ *当該する層の厚さ(すなわち、下のALAPP層を含まない)

【0186】

このデータセットから、コーティングはアルゴン並びに窒素ガスの存在下で調製できることが明らかに実証される。

【0187】

実施例17

幅広い化学的分類に由来するモノマーを使用したポリマーグラフト

パートA：コーティングの調製

表21に一覧表示されているモノマーを0.4~1.0Mに及ぶ濃度で使用して調製した、最大50%のDMSO(v/v)を含有する水溶液又は水溶液を、窒素雰囲気下のグローブボックスにて調製した。少量(40~300μL)の溶液を多重壁プレート(96ウェル)のウェルに加えた。モノマー溶液を含有するウェルの列の間に、少なくとも1列の空のウェル列を空けておき、ポリマーコーティングの二次汚染を回避する。次いで、まだグローブボックスにあるうちに、モノマー溶液を含有するプレートを、ポリ袋(Sunbeam Food Saver)中に真空密閉して、グローブボックスから除去した。次いで、UVランプ(Fusion UV Systems LH6、9mmのDバルブ)下で、コンベヤーベルト(Fusion UV Systems DRS 10/12 Conveyor)でプレートを最大60回通過させた。次いで、ポリマーコーティングが形成される溶液を使用して、プレートを少なくとも3回徹底的に洗浄し、続いて、Milli-Q(商標)水を用いて少なくとも3回洗浄し、続いて、大量のMilli-Q(商標)水で、室温で72時間インキュベーションして、あらゆる残留モノマー又は非共有

40

50

結合ポリマーを除去した。さらなる、及び最後の洗浄後に、試料を空気乾燥させ、二重バッグし、15 K G y の投与量で 照射を使用して殺菌し、その後 X 線光電子分光法 (X P S) を使用して特性決定した。

【 0 1 8 8 】

パート B : コーティングの特性決定

調製したコーティングの X P S 分析を実行し、得られた結果を表 2 1 に提示する。比較として、ベースとなった基材の典型的な表面組成である、組織培養処理したポリスチレン (T C P S) も含まれる。表 2 1 で一覧表示されているモノマーから形成されるコーティングの表面組成は、容易に観察できるので、いずれも、T C P S 基材のものと明瞭に異なり、各例でコーティングが形成されたことが示唆される。T C P S 基材の表面は、炭素及び酸素のみを含有する。いくつかの例では、組成は、T C P S 組成及び対象のポリマーコーティングの理論的組成の中間体であった。この例では、形成されるコーティングの厚さは、X P S 試料の深さ未満であり、表面組成は、下の基材からの寄与を含有していた。多くの例では、T C P S 基材の上部に形成されるコーティングの表面組成は、理論的組成にきわめて類似しており、コーティングが、少なくとも X P S の試料深さ (1 0 n m) と同等の厚さであることが示された。

【 0 1 8 9 】

【表 2 1 - 1】

表21:左側の欄に一覧表示されるモノマーを用いて調製したモノマー溶液を使用して調製したUVグラフトポリマーコーティングのXPS分析から得られた元素組成(原子%)。

モノマー/試料名	組成(原子%)								
	C	O	N	S	Ca	Na	Cl	K	Si
TCPS	82.0	18.0							
N-イソプロピルアクリルアミド	75.6	12.2	12.2						
メタクリル酸メチル	71.6	27.6							0.8
アクリル酸2-カルボキシエチル	63.0	37.0							
アクリル酸3-スルホプロピル、カリウム塩	49.2	38.5	0.6	7.4	0.9	3.5			
コハク酸モノ-(2-メタクリロイルオキシ)エチル	64.3	35.7							
N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩	71.2	14.2	13.5	0.6			0.6		
メタクリル酸2-アミノエチル塩酸塩	62.3	27.7	8.7				0.3		0.4
メタクリル酸2-ヒドロキシエチル	67.6	32.4							
ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート[MW475]	68.8	31.2							
アクリル酸メチル	74.8	25.1	0.1						
ポリ(プロピレングリコール)メチルエーテルアクリル酸塩[MW202]	72.2	27.8							
アクリル酸4-ヒドロキシブチル	71.8	26.2	2.0						
アセト酢酸2-メタクリロイルオキシエチル	67.1	32.9							
アクリル酸	62.8	37.2							
メタクリル酸	69.6	30.4							
コハク酸ヒドロキシエチルアクリレート	60.7	35.4				3.9			
2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸	55.7	27.8	6.9	6.1		3.6			
[3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリメチルアンモニウムクロリド	73.3	13.5	10.1	0.7			2.4		
[3-(メタクリロイルオキシ)エチル]-トリメチルアンモニウムクロリド	72.0	19.2	5.8	0.5			2.6		
アクリル酸2-ヒドロキシエチル	64.6	35.4							
ポリ(エチレングリコール)メタクリレート[MW360]	67.5	32.5							
ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート[MW1100]	70.7	29.3							
ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート[MW2080]	70.6	29.4							
ポリ(エチレングリコール)メタクリレート[MW526]	68.3	31.8							
アクリルアミド	64.0	18.6	17.5						
1-ビニル-2-ピロリドン	76.9	12.9	10.2						
N,N'-ジメチルアクリルアミド	72.7	14.1	13.2						

【 0 1 9 0 】

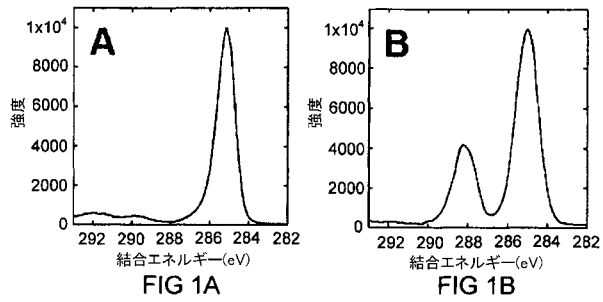
【表 2 1 - 2】

N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]メ タクリルアミド	72.4	16.3	11.0	0.4	
メタクリルアミド	70.5	16.7	12.8		
メタクリル酸(2-ジメチルアミノエ チル)	73.2	19.2	7.3		
N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリ ルアミド	70.3	19.9	9.8		
[2-メタクリロイルオキシ]エチル]ジ メチル-(3-スルホプロピル)アンモニ ウムヒドロキシド	63.9	26.8	4.7	4.6	
[3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]ジメチル(3-スルホプロピル)アンモ ニウムヒドロキシド	65.1	21.9	8.7	4.3	
4-アクリロイルモルホリン	70.2	21.0	8.5		0.5
N-(ヒドロキシメチル)アクリルアミ ド	62.6	24.4	12.8		0.2
N-2-ヒドロキシエチルアクリルアミ ド	64.5	23.6	11.3		0.5
N-メタクリロイルトリス(ヒドロキ シメチル)アミノメタン	64.7	27.1	7.4		0.7
メタクリル酸スルホプロピルカリウ ム塩	54.9	33.4	1.1	6.2	0.9
					3.5
ジアセトン アクリルアミド	75.3	16.5	8.2		
N,N-ジエチラクリルアミド	78.2	11.1	10.7		
N-エチラクリルアミド	70.2	16.6	13.2		
N-(n-プロピル)アクリルアミド	74.8	13.7	11.5		
アクリル酸ヒドロキシプロピル	67.4	31.7	0.9		
N-tert-ブチルメタクリルアミド	75.0	18.8	6.2		
N-tert-ブチラクリルアミド	75.8	15.9	8.3		
N-(n-ブチル)メタクリルアミド	77.9	13.3	8.7		

10

20

【図 1】



【図 2 A】

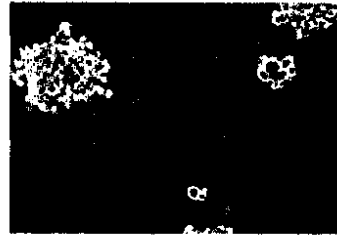


FIG 2A

【図 2 B】

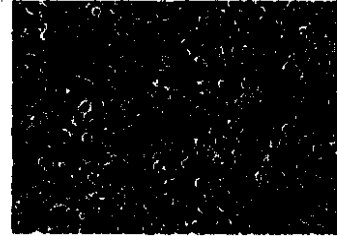


FIG 2B

【図 3】

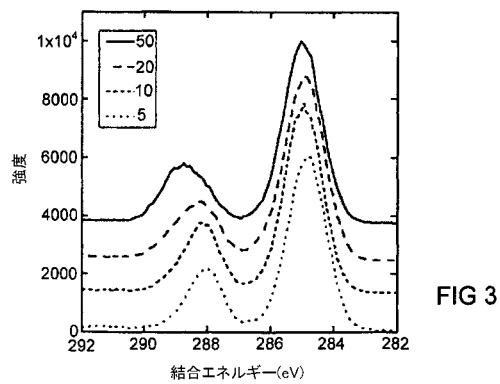


FIG 3

【図 4 A】



FIG 4A

【図 4 B】



FIG 4B

【図 5 A】



FIG 5A

【図 5 B】



FIG 5B

【図 6 A】



FIG 6A

【図 6 B】



FIG 6B

【図 7 A】

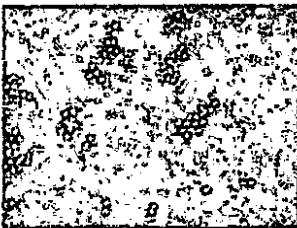


FIG 7A

【図 7 B】

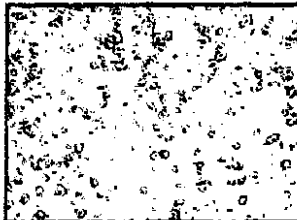


FIG 7B

【図 8 A】



FIG 8A

【図 8 B】



FIG 8B

【図 9】

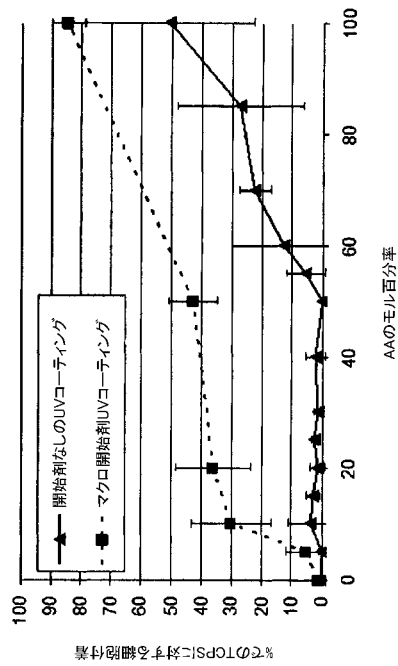


FIG 9

【図 10】

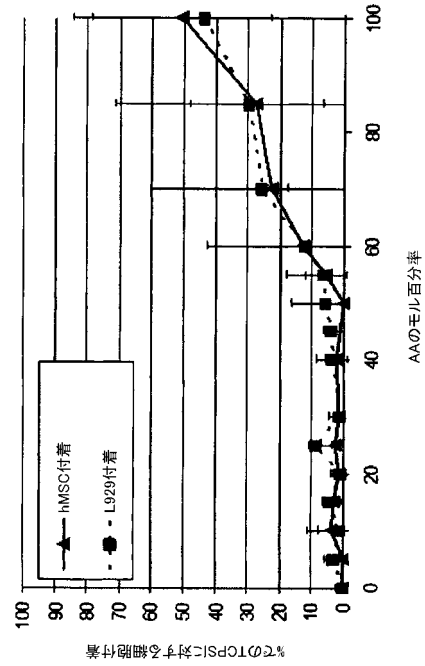


FIG 10

【図 11】

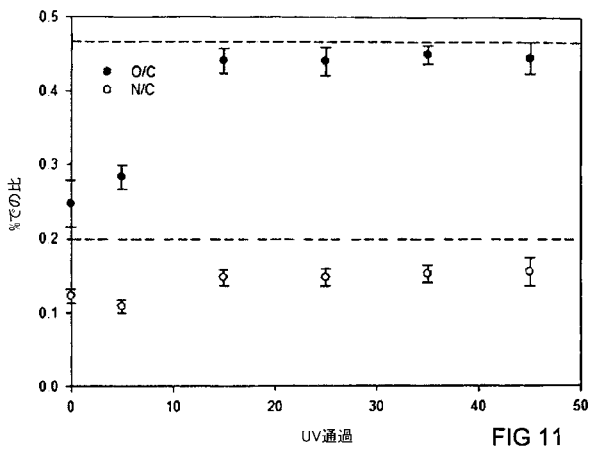


FIG 11

【図 12】

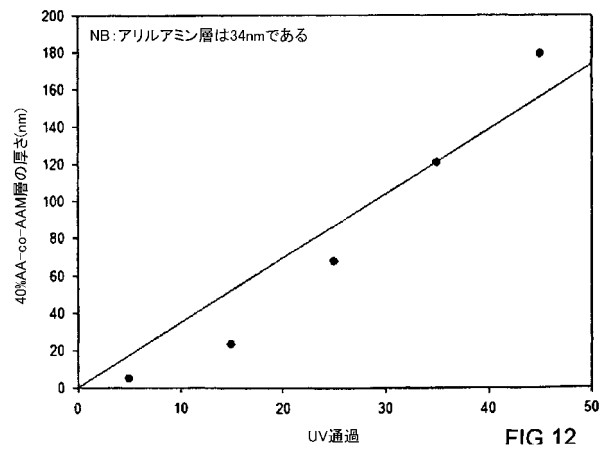


FIG 12

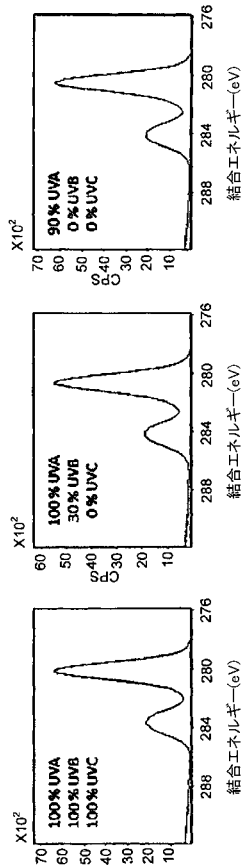


FIG 13C

FIG 13B

FIG 13A

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2013/000710
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C08J 7/18 (2006.01) A61L 27/34 (2006.01)		
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)		
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)		
WPI, EPODOC: keywords: coat, graft, modify, polymer surface, acrylic acid, acrylamide, ultraviolet radiation, intermittent, cell culture and like terms; Esp@cenet, USPTO and Google Patents, ScienceDirect & Google Scholar using similar search terms.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 12 August 2013		Date of mailing of the international search report 12 August 2013
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999		Authorised officer Debashis Roy AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262256125

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2013/000710
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0521605 A2 (IOPTEX RESEARCH INC.) 07 January 1993 page 2, lines 25-28; page 3, lines 34-38, 41-47; page 6, lines 21-30, 36-39; Table VI; claims 7, 13-14	1-14
X	WO 2003/102133 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 11 December 2003 Abstract; paragraphs [0006], [0012], [0020], [0034], [0044], [0052], [0082], [0086]; Figure 1; claims 5, 29	1, 9-10, 12-13, 15-19
X	EP 0382214 B1 (KAO CORPORATION et al.) 03 May 1995 page 3, lines 34-58; claims 1-5	20

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2013/000710	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
EP 0521605 A2	07 Jan 1993	CA 2068748 A1	17 Nov 1992
		EP 0521605 A2	07 Jan 1993
WO 2003/102133 A2	11 Dec 2003	None	
EP 0382214 B1	03 May 1995	EP 0382214 B1	03 May 1995
		JP H02211865 A	23 Aug 1990
		JP H06104061 B2	21 Dec 1994
		US 5284766 A	08 Feb 1994
End of Annex			
<p>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)</p>			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100148596

弁理士 山口 和弘

(72)発明者 アメリンガ - , トーマス

オーストラリア, ビクトリア州 3184, エルウッド, フォーム ストリート 9/66

(72)発明者 マーハー, ローレンス

オーストラリア, ビクトリア州 3056, ブランズウィック, アルバート ストリート 198

(72)発明者 ティッセン, ヘルムート

オーストラリア, ビクトリア州 3178, ロウビル, シルヴァン コート 11

(72)発明者 パシッチ, ポール

オーストラリア, ビクトリア州 3930, マウント エリザ, トゥーレロ ロード 25

(72)発明者 スタイアン, ケイティ

オーストラリア, ビクトリア州 3144, モルバーン, クレッシー ストリート 1/1
エー

F ターム(参考) 4B029 AA08 BB01 BB11 CC02 GA01 GA03

4F073 AA07 AA08 AA11 AA14 AA32 BA06 BA07 BA08 BA09 BA10

BA19 BB01 CA45 FA03 FA04 FA09 FA13