

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5196684号

(P5196684)

(45) 発行日 平成25年5月15日 (2013. 5. 15)

(24) 登録日 平成25年2月15日 (2013. 2. 15)

(51) Int. Cl.

C 1 2 M 3/00 (2006. 01)

F 1

C 1 2 M 3/00

A

請求項の数 11 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2010-513453 (P2010-513453)	(73) 特許権者	509351650
(86) (22) 出願日	平成20年6月20日 (2008. 6. 20)		イノベティブ サーフェイス テクノロ
(65) 公表番号	特表2010-530931 (P2010-530931A)		ジーズ, インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成22年9月16日 (2010. 9. 16)		アメリカ合衆国 ミネソタ 55114,
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/067708		セント ポール, ウェストゲート ド
(87) 国際公開番号	W02009/002858		ライブ 1000, ナンバー 115
(87) 国際公開日	平成20年12月31日 (2008. 12. 31)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成23年6月10日 (2011. 6. 10)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/945, 801	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成19年6月22日 (2007. 6. 22)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 刺激応答性ナノ繊維

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面および熱応答性ポリマーを含む細胞培養物品であって、該熱応答性ポリマーは、少なくとも2個の潜在反応性基を有する架橋剤を介して該表面に結合している、物品。

【請求項 2】

前記潜在反応性基のうちの少なくとも1つが、光化学反応基を含む、請求項1に記載の物品。

【請求項 3】

前記潜在反応性基のうちの少なくとも1つが、熱反応性基を含む、請求項1に記載の物品。

【請求項 4】

前記架橋剤がモノマー物質である、請求項1に記載の物品。

【請求項 5】

前記架橋剤が、(a) ~ (g)

(a) $L - (D - T - C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4)_m$

(式中、Lは連結基であり、

Dは、 CR^6R^7 であり、

Tは、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であるか、あるいは結合を形成しており、

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

Xは、O、Sまたは NR^8R^9 であり、

Pは、水素原子または保護基であるが、但し、Xが NR^8R^9 であるときは、Pは存在せず、

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

Gは、O、S、SO、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または必要に応じて、 R^3 および R^4 は、
 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に結び合わされ得、

10

R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

R^6 および R^7 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアリールアルキル基であり、

R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、

Rは、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、

20

qは、1から約7までの整数であり、

rは、0から約3までの整数であり、

sは、0から約3までの整数であり、

mは、2から約10までの整数であり、

tは、1から約10までの整数であり、

xは、1から約500までの整数である）、

(b) $L-(T-C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4)_m$

(式中、Lは連結基であり、

Tは、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であるか、あるいは結合を形成しており、

30

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

Xは、O、Sまたは NR^8R^9 であり、

Pは、水素原子または保護基であるが、但し、Xが NR^8R^9 であるときは、Pは存在せず、

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

Gは、O、S、SO、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または必要に応じて、 R^3 および R^4 は、
 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に結び合わされ得、

40

R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、

Rは、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、

qは、1から約7までの整数であり、

50

r は、0 から約 3 までの整数であり、
 s は、0 から約 3 までの整数であり、
 m は、2 から約 10 までの整数であり、
 t は、1 から約 10 までの整数であり、
 x は、1 から約 500 までの整数である)、

(c) $L - \underline{(GTZR^3C(=O)R^4)}_m$

(式中、L は連結基であり、

T は、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であるか、または結合を形成しており、

G は、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、 $(CH_2)_t-O-$ または C=O であり、

Z は、C=O、COO、または T が $(-CH_2-)_x$ である場合、CONH であり、

R³ および R⁴ は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または必要に応じて、R³ および R⁴ は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に結び合わされ得、

R¹⁰ は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

R は、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、

q は、1 から約 7 までの整数であり、

r は、0 から約 3 までの整数であり、

s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

t は、1 から約 10 までの整数であり、

x は、1 から約 500 までの整数である)、

(d) $L - \underline{(TGQR^3C(=O)R^4)}_m$

(式中、L は連結基であり、

T は、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であり、または結合を形成しており、

G は、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、 $(CH_2)_t-O-$ または C=O であり、

Q は、 $(-CH_2-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ であり、

R³ および R⁴ は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または必要に応じて、R³ および R⁴ は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に結び合わされ得、

R¹⁰ は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

R は、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、

q は、1 から約 7 までの整数であり、

r は、0 から約 3 までの整数であり、

s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

p は、1 から約 10 までの整数であり、

t は、1 から約 10 までの整数であり、

x は、1 から約 500 までの整数である)、

(e) $L - \underline{(-CH_2-)_x}_x C(R^1)((G)R^3C(=O)R^4)_2)_m$

(式中、L は連結基であり、

R¹ は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアル

10

20

30

40

50

キルまたはアリーールオキシアリーール基であり、
各Gは、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、(CH₂)_t-O-またはC=Oであり、
各R³およびR⁴は、独立にアルキル、アリーール、アリーールアルキル、ヘテロアリーールもしくはヘテロアリーールアルキル基であり、または必要に応じて、R³およびR⁴は、(—CH₂)_q、(—CH₂)_rC=O(—CH₂)_s、(—CH₂)_rS(—CH₂)_s、(—CH₂)_rS=O(—CH₂)_sもしくは(—CH₂)_rS(O)₂(—CH₂)_s、(—CH₂)_rNR(—CH₂)_sを介して一緒に結び合わされ得、

各R¹⁰は、水素原子、またはアルキル、アリーールもしくはアリーールアルキル基であり、
各Rは、水素原子、またはアルキル基もしくはアリーール基であり、

10

各qは、1から約7までの整数であり、

各rは、0から約3までの整数であり、

各sは、0から約3までの整数であり、

mは、2から約10までの整数であり、

各tは、1から約10までの整数であり、

xxは、1から約10までの整数である)、ならびに

(f) L—(—C(R¹)(XP)CHR²GR³C(=O)R⁴)_m

(式中、Lは連結基であり、

R¹は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリーール、アリーールオキシアルキルまたはアリーールオキシアリーール基であり、

20

Xは、O、SまたはNR⁸R⁹であり、

Pは、水素原子または保護基であるが、但し、XがNR⁸R⁹であるときは、Pは存在せず、

R²は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリーール、アリーールオキシアルキルまたはアリーールオキシアリーール基であり、

Gは、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、(CH₂)_t-O-またはC=Oであり、

R³およびR⁴は、各々独立にアルキル、アリーール、アリーールアルキル、ヘテロアリーールもしくはヘテロアリーールアルキル基であり、または必要に応じて、R³およびR⁴は、(—CH₂)_q、(—CH₂)_rC=O(—CH₂)_s、(—CH₂)_rS(—CH₂)_s、(—CH₂)_rS=O(—CH₂)_sもしくは(—CH₂)_rS(O)₂(—CH₂)_s、(—CH₂)_rNR(—CH₂)_sを介して一緒に結び合わされ得、

30

R⁸およびR⁹は、各々独立に水素原子、アルキル、アリーールまたはアリーールアルキル基であり、

R¹⁰は、水素原子、またはアルキル、アリーールもしくはアリーールアルキル基であり、

Rは、水素原子、アルキル基またはアリーール基であり、

qは、1から約7までの整数であり、

rは、0から約3までの整数であり、

sは、0から約3までの整数であり、

mは、2から約10までの整数であり、

40

tは、1から約10までの整数である) ; ならびに

(g) L—(GR³C(=O)R⁴)_m

(式中Lは連結基であり、

Gは、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、(CH₂)_t-O-またはC=Oであり、

R³およびR⁴は、各々独立にアルキル、アリーール、アリーールアルキル、ヘテロアリーールもしくはヘテロアリーールアルキル基であり、または必要に応じて、R³およびR⁴は、(—CH₂)_q、(—CH₂)_rC=O(—CH₂)_s、(—CH₂)_rS(—CH₂)_s、(—CH₂)_rS=O(—CH₂)_sもしくは(—CH₂)_rS(O)₂(—CH₂)_s、(—CH₂)_rNR(—CH₂)_sを介して一緒に結び合わされ得、

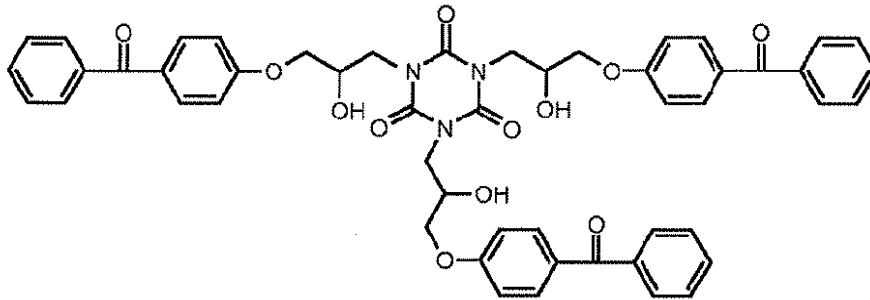
50

R¹⁰は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、
Rは、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、
qは、1から約7までの整数であり、
rは、0から約3までの整数であり、
sは、0から約3までの整数であり、
mは、2から約10までの整数であり、
tは、1から約10までの整数である）
 から選択される式を有する化合物である、請求項1に記載の物品。

【請求項6】

前記架橋剤が、式：

【化18】



の化合物である、請求項5に記載の物品。

【請求項7】

前記細胞培養物品がナノ繊維またはナノ繊維メッシュを備える、請求項1に記載の物品。

【請求項8】

前記細胞培養物品が、スライド、マルチウェルプレート、ペトリ皿、組織培養プレート、組織培養フラスコ、またはカバーガラスから選択される、請求項1に記載の物品。

【請求項9】

前記熱応答性ポリマーが、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）、ポリエチレングリコールおよびポリ（イソプロピルアクリルアミド）のコポリマー、またはそれらの混合物を含む、請求項1に記載の物品。

【請求項10】

表面および刺激応答性ポリマーを含む細胞培養物品であって、該刺激応答性ポリマーは、外部刺激に曝されると物理変化または化学変化を起こし、該刺激応答性ポリマーは、少なくとも2個の潜在反応性基を有する架橋剤を介して該表面に結合している、物品。

【請求項11】

細胞培養物品を調製するためのキットであって、該キットは、

細胞培養に適した刺激応答性ポリマーであって、該刺激応答性ポリマーは、外部刺激に曝されると物理変化または化学変化を起こす、刺激応答性ポリマー；および

少なくとも2個の潜在反応性基を有する架橋剤であって、該架橋剤は、該刺激応答性ポリマーを細胞培養物品の表面に結合させるために適合されている、架橋剤、を備える、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、刺激応答性ナノ繊維および刺激応答性ナノ繊維改質表面に関する。より特定すれば、本発明は、熱応答性ポリマー、多官能架橋剤、および場合により、生物活性物質、または生物活性物質と反応性のある官能性ポリマーを含むナノ繊維を対象とする。刺激応答性ナノ繊維は、細胞培養器具などの基材の表面を改質するために使用することができる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

ナノ繊維は、高い表面積、小さい繊維径、層の薄さ、高い透過性および低い基礎重量を含む独特な性質のために、多様な用途について検討されている。とりわけ、創傷包帯、バイオセンサーおよび組織工学用足場などの生物医学用途において、活性化学物質を組み入れる能力を有する機能化ナノ繊維に対して、より多くの関心が集まってきた。

【0003】

ナノ繊維は、静電紡糸（電気紡糸とも称する）により作製し得る。繊維を形成できる液体および／または溶液の電気紡糸技法は、よく知られており、例えば、特許文献1および特許文献2などの多くの特許に記載されている。電気紡糸法は、溶液または液体に繊維を生成させるために、電場中への溶液または液体の導入を一般に伴う。こうした繊維は、一般に、収集用の引力電位で導体に引き寄せられる。溶液または液体が繊維に変換される間に、繊維は硬化および／または乾燥する。この硬化および／または乾燥は、液体の冷却、即ち液体が室温では通常固体になることにより、溶媒の蒸発、例えば脱水（物理的誘発硬化）により、または硬化機構（化学的誘発硬化）により起こし得る。

【0004】

静電紡糸法は、例えば、特許文献1に開示されているように、マットまたは他の不織材料を創製するための繊維の使用を通常対象としてきた。直径範囲が50nm～5μmのナノ繊維は、不織布またはナノ繊維配列メッシュに電気紡糸することができる。小さい繊維径のために、電気紡糸テキスタイルは、非常に高い表面積および小さい孔径を元来有する。こうした性質のために、電気紡糸布地は、膜、組織足場および他の生物医学用途を含む多くの用途に対して、有力な候補となる。

【0005】

ナノ繊維は、基材の表面を改質して所望の表面特性を実現するために、使用することができる。大部分のナノ繊維表面は、生体分子を固定化する能力を得るために、処理されなければならない。生体適合性の改良を意図した合成生体用材料の表面改質は、広範に研究されてきており、多くの汎用技法が、ポリマーナノ繊維の改質に対して検討されてきた。例えば、S a n d e r sらは、非特許文献1において、電気紡糸ポリウレタン（PU）繊維表面上に、負荷電または正荷電モノマーのプラズマ誘発表面重合により異なる表面電荷を導入した。表面荷電PU繊維メッシュを5週間ラット皮下背面に埋め込み、組織適合性を評価したところ、負荷電表面は、繊維多孔性メッシュの生体用材料中に血管の内方成長を促進し得ることが判明した。M aらは、非特許文献2において、グラフト化ポリメタクリル酸スプレーを介して、ホルムアルデヒド前処理されたポリエチレンテレフタレート（PET）ナノ繊維上にゼラチンをコンジュゲートしたところ、ゼラチン改質は、PETナノ繊維上における内皮細胞（EC）の伸展および増殖を改善し、ECの表現型を保持することも判明した。C h u aらは、非特許文献3において、繊維表面上にUVグラフト化したポリ（アクリル酸）スプレーに対する共役結合性のコンジュゲーションにより、ポリ（ε-カプロラクトン-ε-エチルエチレンホスフェート）（PCL-EEP）のナノ繊維足場上にガラクトースリガンドを導入した。ガラクトシル化PCL-EEPナノ繊維の3D足場、ならびに機能性2D膜基材上で、肝細胞の付着、アンモニアの代謝、アルブミンの分泌、およびシトクロームP450の酵素活性を調べた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第4043331号明細書

【特許文献2】米国特許第5522879号明細書

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】「F i b r o - P o r o u s M e s h e s M a d e f r o m P o l y u r e t h a n e M i c r o - F i b e r s : E f f e c t s o f S u r

10

20

30

40

50

face Charge on Tissue Response」、Biomaterials 26巻、813～818頁（2005年）

【非特許文献2】「Surface Enginerring of Electospun Polyethylene Terephthalate (PET) Nanofibers Towards Development of a New Material for Blood Vessel Engineering」、Biomaterials 26巻、2527～2536頁（2005年）

【非特許文献3】「Stable Immobilization of Rat Hepatocyte Spheroids on Galactosylated Nanofiber Scaffold」、Biomaterials 26巻、2537～2547頁（2005年）

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記にまとめた方法および技法は、コストがかかり、複雑で、または材料特異的である。したがって、より一般的で使い易く、温和な条件下で幅広い種類のナノ繊維に応用できる、表面改質手法に対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、例えば、以下を提供する：

20

（項目1）

刺激応答性ポリマー、少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤、および場合により生物活性物質を含む、ナノ繊維または被覆表面。

（項目2）

約1nm～100ミクロンの範囲の直径を有する、項目1に記載のナノ繊維。

（項目3）

少なくとも10から少なくとも約100の範囲のアスペクト比を有する、項目1に記載のナノ繊維。

（項目4）

上記刺激応答性ポリマーが、応力、温度、水分、pH、印加電場もしくは磁場、イオン強度、または生体分子に応答するポリマーを含む、項目1に記載のナノ繊維。

30

（項目5）

上記刺激応答性ポリマーが、熱応答性ポリマーである、項目1に記載のナノ繊維。

（項目6）

上記熱応答性ポリマーが、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）、ポリエチレングリコールおよびポリ（イソプロピルアクリルアミド）のグラフトコポリマー、またはそれらの混合物を含む、項目5に記載のナノ繊維。

（項目7）

上記熱応答性ポリマーが、第1の所定温度範囲で第1の物理的性質、および第2の所定温度範囲で第2の物理的性質を有する、項目5に記載のナノ繊維。

40

（項目8）

少なくとも1個の潜在反応性・活性化可能基を活性化したときに、基材の表面と共有結合するように適合されている、項目1に記載のナノ繊維。

（項目9）

刺激応答性ポリマーを、少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤、および場合により生物活性物質と組み合わせて、組合せを形成するステップ、ならびに該組合せから少なくとも1本のナノ繊維を形成するステップを含む、潜在反応性材料を生成する方法であって、該ナノ繊維が、1nm～100ミクロンの範囲の直径、および少なくとも約10から少なくとも約100の範囲のアスペクト比を有する、方法。

（項目10）

50

上記刺激応答性ポリマーが、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）、ポリエチレングリコールおよびポリ（イソプロピルアクリルアミド）のグラフトコポリマー、またはそれらの混合物を含む、項目 9 に記載の方法。

（項目 1 1）

基材の表面を処理する方法であって、

（a）刺激応答性ポリマー、および少なくとも 2 個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤、および場合により生物活性物質と組み合わせて、組合せを形成するステップ、

（b）該組合せから少なくとも 1 本のナノ繊維を形成するステップであって、該ナノ繊維が、約 1 nm～100 ミクロンの範囲の直径、および少なくとも約 10 から少なくとも 100 の範囲のアスペクト比を有するステップ、

（c）該表面を該ナノ繊維と接触させるステップ、ならびに

（d）該ナノ繊維と該表面との間に結合を形成するステップを含む方法。

（項目 1 2）

上記ナノ繊維と上記表面との間に上記結合を形成するステップが、上記潜在反応性・活性化可能基の少なくとも 1 個をエネルギー源で活性化して、上記ナノ繊維を上記表面に結合するステップを含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 1 3）

上記潜在反応性・活性化可能基の少なくとも 1 個を活性化して、上記ナノ繊維を生物活性物質に結合するステップを更に含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 1 4）

上記ナノ繊維を上記表面に結合するために、第 1 の潜在反応性・活性化可能基を、そして上記ナノ繊維を生物活性物質に共有結合するために、第 2 の潜在反応性・活性化可能基を、同時に活性化するステップを更に含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 1 5）

上記刺激応答性ポリマーが、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）、ポリエチレングリコールおよびポリ（イソプロピルアクリルアミド）のグラフトコポリマー、またはそれらの混合物を含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 1 6）

生物活性物質を熱応答性ポリマーおよび上記架橋剤と組み合わせるステップを更に含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 1 7）

生物活性物質を上記表面に付着させるステップを更に含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 1 8）

熱を加えることによって、熱応答性ナノ繊維の物理的性質を、第 1 の所定温度範囲での第 1 の物理的性質から、第 2 の所定温度範囲での第 2 の物理的性質へ転移させるステップを更に含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 1 9）

熱を除くことによって、熱応答性ナノ繊維の物理的性質を、第 2 の所定温度範囲での第 2 の物理的性質から、第 1 の所定温度範囲での第 1 の物理的性質へ転移させるステップを更に含む、項目 1 1 に記載の方法。

（項目 2 0）

熱応答性ナノ繊維を含む表面被膜。

（項目 2 1）

上記熱応答性ナノ繊維が、少なくとも 2 個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤、および場合により生物活性物質を更に含む、項目 2 0 に記載の表面被膜。

（項目 2 2）

熱応答性ポリマーが、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）、ポリエチレングリコールおよびポリ（イソプロピルアクリルアミド）のグラフトコポリマー、またはそれらの混合物を含む、項目 2 0 に記載の表面被膜。

10

20

30

40

50

(項目 2 3)熱応答性ナノ繊維を含む表面被膜を有する物品。(項目 2 4)上記熱応答性ナノ繊維が、熱応答性ポリマー、少なくとも 2 個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤、および場合により生物活性物質で被覆されたナノ繊維を含む、項目 2 3 に記載の物品。(項目 2 5)上記表面被膜の物理的性質が、上記物品の温度を変化させることにより変化する、項目 2 3 に記載の物品。(項目 2 6)上記ナノ繊維が、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）、ポリエチレングリコールおよびポリ（イソプロピルアクリルアミド）のグラフトコポリマー、またはそれらの混合物を含む、項目 2 3 に記載の物品。(項目 2 7)上記ナノ繊維が、上記物品の表面に共有結合している、項目 2 3 に記載の物品。(項目 2 8)尿カテーテル、血管カテーテル、創傷排液チューブ、動脈移植片、軟組織用パッチ、手袋、シャント、ステント、気管カテーテル、ペースメーカー、除細動器、人工心臓代替弁、人工心臓または埋込型バイオセンサーである、項目 2 3 に記載の物品。(項目 2 9)スライド、マルチウェルプレート、ペトリ皿、組織培養スライド、組織培養プレート、細胞培養器具、組織培養フラスコ、またはクロマトグラフィーおよびバイオリアクター用マトリックスである、項目 2 3 に記載の物品。(項目 3 0)熱応答性ナノ繊維を含んだ表面被膜を含む細胞培養器具。(項目 3 1)上記ナノ繊維が、熱応答性ポリマーおよび生物活性物質を含む、項目 3 0 に記載の細胞培養器具。(項目 3 2)上記ナノ繊維が、熱応答性ポリマー、少なくとも 2 個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤、および場合により生物活性物質を含む、項目 3 0 に記載の細胞培養器具。(項目 3 3)熱応答性ポリマーが、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）、ポリエチレングリコールおよびポリ（イソプロピルアクリルアミド）のグラフトコポリマー、またはそれらの混合物を含む、項目 3 0 に記載の細胞培養器具。(項目 3 4)上記熱応答性繊維が、第 1 の所定温度範囲で第 1 の物理的性質、および第 2 の所定温度範囲で第 2 の物理的性質を有する、項目 3 0 に記載の細胞培養器具。(項目 3 5)項目 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の架橋剤であって、次式 a ~ f :a) $L - ((D - T - C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4))_m$ (式中、L は連結基であり、D は、O、S、SO、SO₂、NR⁵ または CR⁶R⁷ であり、T は、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であり、R¹ は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、X は、O、S または NR⁸R⁹ であり、P は、水素原子または保護基であるが、但し、X が NR⁸R⁹ であるときは、P は存在せず、

10

20

30

40

50

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

G は、O、S、SO、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_r C=O (-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S (-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S=O (-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_r S(O)_2 (-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r NR (-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、 R^5 および R^{10} は、各々独立に水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

10

R^6 および R^7 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアリールアルキル基であり、

R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、

R は、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、

q は、1 から約 7 までの整数であり、

r は、0 から約 3 までの整数であり、

s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

t は、1 から約 10 までの整数であり、

20

x は、1 から約 500 までの整数である)、

b) $L-(T-C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4))_m$

(式中、L は連結基であり、

T は、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であり、

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

X は、O、S または NR^8R^9 であり、

P は、水素原子または保護基であるが、但し、X が NR^8R^9 であるときは、P は存在せず、

30

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

G は、O、S、SO、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_r C=O (-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S (-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S=O (-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_r S(O)_2 (-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r NR (-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、 R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、

40

R は、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、

q は、1 から約 7 までの整数であり、

r は、0 から約 3 までの整数であり、

s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

t は、1 から約 10 までの整数であり、

x は、1 から約 500 までの整数である)、

c) $L-(GTZR^3C(=O)R^4))_m$

(式中、L は連結基であり、

50

Tは、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であるか、または結合を形成しており、
 Gは、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、 $(CH_2)_t-O-$ またはC=Oであり、
 Zは、C=O、COO、またはTが $(-CH_2-)_x$ である場合、CONHであり、
 R³およびR⁴は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、またはR³およびR⁴は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC(=O)(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(=O)(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、
 R¹⁰は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、
 Rは、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、
 qは、1から約7までの整数であり、
 rは、0から約3までの整数であり、
 sは、0から約3までの整数であり、
 mは、2から約10までの整数であり、
 tは、1から約10までの整数であり、
 xは、1から約500までの整数である)、
 d) $L-(TGQR^3C(=O)R^4))_m$

10

(式中、Lは連結基であり、
 Tは、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であり、または結合を形成しており、
 Gは、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、 $(CH_2)_t-O-$ またはC=Oであり、
 Qは、 $(-CH_2-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ であり、
 R³およびR⁴は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、またはR³およびR⁴は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC(=O)(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(=O)(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、
 R¹⁰は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、
 Rは、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、
 qは、1から約7までの整数であり、
 rは、0から約3までの整数であり、
 sは、0から約3までの整数であり、
 mは、2から約10までの整数であり、
 pは、1から約10までの整数であり、
 tは、1から約10までの整数であり、
 xは、1から約500までの整数である)、
 e) $L-((-CH_2-)_x)_x C(R^1)((G)R^3C(=O)R^4))_2)_m$

20

30

(式中、Lは連結基であり、
 R¹は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、
 各Gは、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、 $(CH_2)_t-O-$ またはC=Oであり、
 各R³およびR⁴は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、またはR³およびR⁴は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC(=O)(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(=O)(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、
 各R¹⁰は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、
 各Rは、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、

40

50

各 q は、1 から約 7 までの整数であり、

各 r は、0 から約 3 までの整数であり、

各 s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

各 t は、1 から約 10 までの整数であり、

x は、1 から約 10 までの整数である)、ならびに

f) $L - ((-C(R^1)(XP)CH_2R^2GR^3C(=O)R^4))_m$

(式中、 L は連結基であり、

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

X は、O、S または NR^8R^9 であり、

P は、水素原子または保護基であるが、但し、 X が NR^8R^9 であるときは、 P は存在せず、

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

G は、O、S、SO、SO₂、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$

、 $(-CH_2-)_rC=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、

R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、

R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

R は、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、

q は、1 から約 7 までの整数であり、

r は、0 から約 3 までの整数であり、

s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

t は、1 から約 10 までの整数である)

の化合物である架橋剤。

(項目 36)

項目 1 から 34 のいずれか一項に記載の架橋剤であって、次式：

$L - ((D-T-C(R^1)(XP)CH_2R^2GR^3C(=O)R^4))_m$

(式中、 L は連結基であり、

D は、O、S、SO、SO₂、 NR^5 または CR^6R^7 であり、

T は、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であり、

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

X は、O、S または NR^8R^9 であり、

P は、水素原子または保護基であるが、但し、 X が NR^8R^9 であるときは、 P は存在せず、

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

G は、O、S、SO、SO₂、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$

、 $(-CH_2-)_rC=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$

$(-CH_2-)_r NR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、
 R^5 および R^{10} は、各々独立に水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリール
 アルキル基であり、

R^6 および R^7 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテ
 ロアリールまたはヘテロアリールアルキル基であり、

R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基
 であり、

R は、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、

q は、1 から約 7 までの整数であり、

r は、0 から約 3 までの整数であり、

s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

t は、1 から約 10 までの整数であり、

x は、1 から約 500 までの整数である)

の化合物である架橋剤。

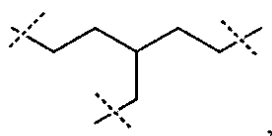
(項目 37)

L が、約 2 ～ 約 10 個の間の炭素原子を有する分岐または非分岐アルキル鎖である、項
 目 36 に記載の架橋剤。

(項目 38)

L が

【化 10】



であり、 D が O であり、 T が $(-CH_2-)_x$ であり、 R^1 が水素原子であり、 X が O で
 あり、 P が水素原子であり、 R^2 が水素原子であり、 G が O であり、 R^3 および R^4 がフ
 ェニル基であり、 m が 3 であり、 x が 1 である、項目 36 に記載の架橋剤。

(項目 39)

L が $(-CH_2-)_y$ であり、 D が O であり、 T が $(-CH_2-)_x$ であり、 R^1 が水
 素原子であり、 X が O であり、 P が水素原子であり、 R^2 が水素原子であり、 G が O であ
 り、 R^3 および R^4 がフェニル基であり、 m が 2 であり、 x が 1 であり、 y が 2 から約 6
 までの整数である、項目 36 に記載の光化学架橋剤。

(項目 40)

項目 1 から 34 のいずれか一項に記載の架橋剤であって、次式：

$L - ((T - C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4))_m$

(式中、 L は連結基であり、

T は、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)$
 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であり、

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアル
 キルまたはアリールオキシアリール基であり、

X は、 O 、 S または NR^8R^9 であり、

P は、水素原子または保護基であるが、但し、 X が NR^8R^9 であるときは、 P は存在せ
 ず、

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアル
 キルまたはアリールオキシアリール基であり、

G は、 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール

10

20

30

40

50

もしくはヘテロアリーールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_r C=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_r S(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r NR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、 R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリーールもしくはアリーールアルキル基であり、 R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリーールまたはアリーールアルキル基であり、

R は、水素原子、アルキル基またはアリーール基であり、

q は、1から約7までの整数であり、

r は、0から約3までの整数であり、

s は、0から約3までの整数であり、

m は、2から約10までの整数であり、

t は、1から約10までの整数であり、

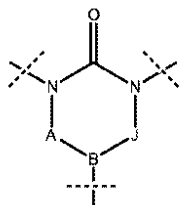
x は、1から約500までの整数である)

の化合物である架橋剤。

(項目41)

項目40に記載の架橋剤であって、 L が、構造(I)：

【化11】



(I)

(式中 A および J が、各々独立に水素原子、アルキル基、アリーール基であるか、または B と共に環式環を形成し、但し、 A および J が、各々独立に水素原子、アルキル基またはアリーール基である場合は、 B は存在しておらず、

B は、 NR^{11} 、 O または $(-CH_2-)_z$ であり、

但し、 A 、 B および J が環を形成する場合は、 A および J が、 $(-CH_2-)_z$ または $C=O$ であり、

R^{11} は、水素原子、アルキル基、アリーール基であるか、または T との結合を表しており、

各 z は、独立に0から3までの整数であり、

但し、 A または J のいずれかが $C=O$ である場合は、 B が、 NR^{11} 、 O または $(-CH_2-)_z$ であって、 z は、少なくとも1でなければならない)

に従った式を有する架橋剤。

(項目42)

項目1から34のいずれか一項に記載の光化学架橋剤であって、次式：

$L - ((GTZR^3C(=O)R^4))_m$

(式中、 L は連結基であり、

T は、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2O-)_x$ であり、または結合を形成しており、

G は、 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_tO$ または $C=O$ であり、

Z は、 $C=O$ 、 COO 、または T が $(-CH_2-)_x$ である場合、 $CONH$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリーール、アリーールアルキル、ヘテロアリーールもしくはヘテロアリーールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_r C=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S(-CH_2-)_s$ 、 $($

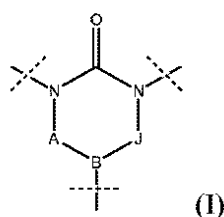
$-\text{CH}_2-$)_r S=O ($-\text{CH}_2-$)_s もしくは ($-\text{CH}_2-$)_r S (O)₂ ($-\text{CH}_2-$)_s、
 ($-\text{CH}_2-$)_r NR ($-\text{CH}_2-$)_s を介して一緒に結び合わされており、
 R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、
 R は、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、
 q は、1 から約 7 までの整数であり、
 r は、0 から約 3 までの整数であり、
 s は、0 から約 3 までの整数であり、
 m は、2 から約 10 までの整数であり、
 t は、1 から約 10 までの整数であり、
 x は、1 から約 500 までの整数である)
 の化合物である光化学架橋剤。

10

(項目 43)

項目 42 に記載の架橋剤であって、L が、構造 (I) :

【化 12】



20

(式中 A および J が、各々独立に水素原子、アルキル基、アリール基であるか、または B
 と共に環式環を形成し、但し、A および J が、各々独立に水素原子、アルキル基またはア
 リール基である場合は、B は存在しておらず、
 B は、 NR^{11} 、O または $(-\text{CH}_2-)_z$ であり、
 但し、A、B および J が環を形成する場合は、A および J が、 $(-\text{CH}_2-)_z$ または $\text{C}=\text{O}$ であり、
 R^{11} は、水素原子、アルキル基、アリール基であるか、または T との結合を表しており、

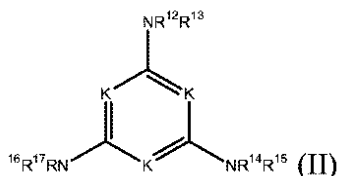
30

各 z は、独立に 0 から 3 までの整数であり、但し、A または J のいずれかが $\text{C}=\text{O}$ であ
 る場合は、B が、 NR^{11} 、O または $(-\text{CH}_2-)_z$ であって、 z は、少なくとも 1 で
 なければならない)
 に従った式を有する架橋剤。

(項目 44)

項目 42 に記載の架橋剤であって、L が、構造 (II) :

【化 13】



40

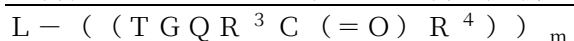
(式中 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} が、各々独立に水素原子、アル
 キルもしくはアリール基であるか、または T との結合を表し、但し、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} の少なくとも 2 つは、T と結合しており、各 K が、独立に
 CH または N である)

に従った式を有する架橋剤。

(項目 45)

50

項目 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の架橋剤であって、次式：



(式中、Lは連結基であり、

Tは、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であり、または結合を形成しており、

Gは、O、S、SO、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

Qは、 $(-CH_2-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$

、 $(-CH_2-)_rC=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に結び合わされており、

R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

Rは、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、

qは、1から約7までの整数であり、

rは、0から約3までの整数であり、

sは、0から約3までの整数であり、

mは、2から約10までの整数であり、

pは、1から約10までの整数であり、

tは、1から約10までの整数であり、

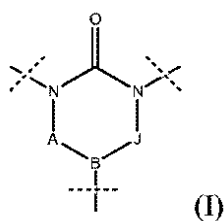
xは、1から約500までの整数である)

の化合物である架橋剤。

(項目 4 6)

項目 4 5 に記載の架橋剤であって、Lが、構造 (I)：

【化 1 4】



(I)

(式中AおよびJが、各々独立に水素原子、アルキル基、アリール基であるか、またはBと共に環式環を形成し、但し、AおよびJが、各々独立に水素原子、アルキル基またはアリール基である場合は、Bは存在しておらず、

Bは、 NR^{11} 、Oまたは $(-CH_2-)_z$ であり、

但し、A、BおよびJが環を形成する場合は、AおよびJが、 $(-CH_2-)_z$ または $C=O$ であり、

R^{11} は、水素原子、アルキル基、アリール基であるか、またはTとの結合を表しており、

各zは、独立に0から3までの整数であり、

但し、AまたはJのいずれかが $C=O$ である場合は、Bが、 NR^{11} 、Oまたは $(-CH_2-)_z$ であって、zは、少なくとも1でなければならない)

に従った式を有する架橋剤。

(項目 4 7)

項目 4 5 に記載の架橋剤であって、Lが、構造 (II)：

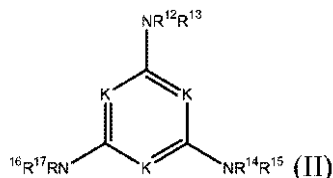
10

20

30

40

【化 1 5】



(式中 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} が、各々独立に水素原子、アルキルもしくはアリール基であるか、または T との結合を表し、但し、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} の少なくとも 2 つは、T と結合しており、各 K が、独立に CH または N である)

に従った式を有する架橋剤。

(項目 4 8)

項目 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の架橋剤であって、次式：

$L - ((-CH_2-)_{xx} C(R^1) ((G) R^3 C(=O) R^4))_2)_m$

(式中、L は連結基であり、

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

各 G は、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、(CH₂)_t - O - または C=O であり、

各 R³ および R⁴ は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R³ および R⁴ は、(-CH₂-)_q、(-CH₂-)_r C=O (-CH₂-)_s、(-CH₂-)_r S (-CH₂-)_s、

(-CH₂-)_r S=O (-CH₂-)_s もしくは (-CH₂-)_r S (O)₂ (-CH₂-)_s、(-CH₂-)_r NR (-CH₂-)_s を介して一緒に繋ぎ合わされており、

各 R¹⁰ は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

各 R は、水素原子、またはアルキル基もしくはアリール基であり、

各 q は、1 から約 7 までの整数であり、

各 r は、0 から約 3 までの整数であり、

各 s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

各 t は、1 から約 10 までの整数であり、

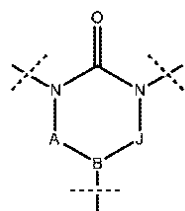
xx は、1 から約 10 までの整数である)

の化合物である架橋剤。

(項目 4 9)

項目 4 8 に記載の架橋剤であって、L が、構造 (I)：

【化 1 6】



(式中 A および J が、各々独立に水素原子、アルキル基、アリール基であるか、または B と共に環式環を形成し、但し、A および J が、各々独立に水素原子、アルキル基またはアリール基である場合は、B は存在しておらず、

B は、NR¹¹、O または (-CH₂-)_z であり、

但し、A、B および J が環を形成する場合は、A および J が、(-CH₂-)_z または C=O であり、

10

20

30

40

50

R^{11} は、水素原子、アルキル基、アリール基であるか、または T との結合を表しており、

各 z は、独立に 0 から 3 までの整数であり、
但し、A または J のいずれかが $C=O$ である場合は、B が、 NR^{11} 、O または $(-CH_2-)_z$ であって、 z は、少なくとも 1 でなければならない)
に従った式を有する架橋剤。

(項目 50)

項目 1 から 34 のいずれか一項に記載の架橋剤であって、次式：

$L - ((-C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4))_m$

(式中、L は連結基であり、

R^1 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

X は、O、S または NR^8R^9 であり、

P は、水素原子または保護基であるが、但し、X が NR^8R^9 であるときは、P は存在せず、

R^2 は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基であり、

G は、O、S、SO、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_rC(=O)(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rS(=O)(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_rS(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_rNR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、

R^8 および R^9 は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、

R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、

R は、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、

q は、1 から約 7 までの整数であり、

r は、0 から約 3 までの整数であり、

s は、0 から約 3 までの整数であり、

m は、2 から約 10 までの整数であり、

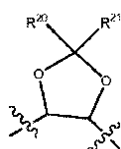
t は、1 から約 10 までの整数である)

の化合物である架橋剤。

(項目 51)

L が

【化 17】



であり、 R^{20} および R^{21} が、各々個別に水素原子、アルキル基またはアリール基である、項目 50 に記載の架橋剤。

(項目 52)

項目 1 から 34 のいずれか一項に記載の架橋剤であって、次式：

$L - ((GR^3C(=O)R^4))_m$

(式中 L は連結基であり、

G は、O、S、SO、 SO_2 、 NR^{10} 、 $(CH_2)_t-O-$ または $C=O$ であり、

R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール

10

20

30

40

50

もしくはヘテロアリーールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-CH_2-)_q$ 、 $(-CH_2-)_r C=O(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r S=O(-CH_2-)_s$ もしくは $(-CH_2-)_r S(O)_2(-CH_2-)_s$ 、 $(-CH_2-)_r NR(-CH_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、 R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリーールもしくはアリーールアルキル基であり、 R は、水素原子、アルキル基またはアリーール基であり、 q は、1から約7までの整数であり、 r は、0から約3までの整数であり、 s は、0から約3までの整数であり、 m は、2から約10までの整数であり、 t は、1から約10までの整数である)の化合物である架橋剤。

一実施形態によれば、本発明は、刺激応答性ポリマーを含む刺激応答性ナノ繊維である。刺激応答性ナノ繊維の一例は、熱応答性ポリマーを含む熱応答性ナノ繊維である。こうした実施形態のいずれにおいても、刺激応答性ナノ繊維は、少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤を含み得る。使用時に、光化学的、電気化学的または熱的な潜在反応基は、エネルギー源に曝されると共有結合を形成することになる。適切なエネルギー源には、放射線、電気および熱のエネルギーが挙げられる。幾つかの実施形態では、放射エネルギーは、可視光線、紫外線、赤外線、X線またはマイクロ波の電磁放射線である。

【0010】

架橋剤は、少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有し得る。これらの潜在反応基は、同一でもよく、異なってもよい。例えば、潜在反応基は全て、光化学反応基でもよい。あるいは、本発明の他の実施形態では、架橋剤は、光化学的、熱的双方の反応基を含んでもよい。更に、架橋剤は、モノマー物質もしくはポリマー物質でもよく、またはモノマー、ポリマー双方の物質の混合物でもよい。

【0011】

本発明の更なる実施形態によれば、熱応答性ポリマーは、ポリ(イソプロピルアクリルアミド)、ならびにポリエチレングリコール誘導体とのグラフトコポリマー誘導体などのポリ(イソプロピルアクリルアミド)の誘導体である。

【0012】

別の実施形態によれば、本発明は、基材の表面を処理する方法であって、熱応答性ポリマーなどの刺激応答性ポリマー、および少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤を組み合わせるステップ、組み合わせた混合物から少なくとも1本のナノ繊維を形成するステップ、表面をナノ繊維と接触させるステップ、ならびにナノ繊維と表面との結合を形成するステップを含む方法である。

【0013】

別の実施形態によれば、本発明は、物品の表面に対する表面被膜である。表面被膜は、熱応答性ポリマーなどの刺激応答性ポリマー、および少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤でコーティングされたナノ繊維を含んだ、刺激応答性ナノ繊維を含む。場合によって、被覆ナノ繊維または被覆表面は、生物活性物質、あるいは官能性ポリマーを含み得る。

【0014】

更に別の実施形態によれば、本発明は、熱応答性ナノ繊維を有する表面被膜を含む物品である。更なる実施形態によれば、その熱応答性ナノ繊維は、熱応答性ポリマー、および少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤を含む。

【0015】

更にまた別の実施形態によれば、本発明は、熱応答性ナノ繊維を有する表面被膜を含む細胞培養器具である。その熱応答性ナノ繊維は、熱応答性ポリマー、および少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤、および生物活性物質を含む。

【0016】

本発明の他の実施形態によれば、刺激応答性ナノ繊維は、1～100ミクロンの範囲の直径を有し得るものであり、更に他の実施形態は、1nm～1000nmの範囲の直径を有し得る。刺激応答性ナノ繊維は、少なくとも10から少なくとも100の範囲のアスペクト比を有し得る。

【0017】

本発明のまた更なる実施形態によれば、熱応答性ナノ繊維は、第1の所定温度範囲で第1の物理的性質、および第2の所定温度範囲で第2の物理的性質を有する。熱応答性ナノ繊維は、その系へ熱を加え、またはその系から熱を除いた際に、第1の物理的性質から第2の物理的性質へ転移することができる。

10

【0018】

考察した例示的实施形態に、本発明の範囲から逸脱せずに、多様な改変および追加を行い得る。例えば、上記の実施形態は特定の特徴に言及しているが、本発明の範囲は、特徴の異なる組合せを有する実施形態、および上記特徴の全ては含んでいない実施形態も包含する。したがって、本発明の範囲は、特許請求の範囲内に入るような全ての代替形態、改変形態および変形形態を、それらの全ての等価形態と共に包含することを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、実施例1に記載のポリカプロラクトンナノ繊維の電子的な画像を示す図である。

20

【図2】図2は、実施例3に記載のポリイソプロピルアクリルアミドナノ繊維の電子的な画像を示す図である。

【図3】図3は、実施例4に記載のポリイソプロピルアクリルアミド被覆ポリスチレンおよびポリイソプロピルアクリルアミドのナノ繊維に関するタンパク質吸着プロファイルを示す図である。

【図4】図4は、実施例4に記載のポリイソプロピルアクリルアミド被覆ポリスチレンおよびポリイソプロピルアクリルアミドのナノ繊維に関するタンパク質吸着プロファイルを示す図である。

【図5】図5は、実施例5に記載の各種表面からの細胞のリフトオフ時間に関する電子的な画像を示す図である。

30

【図6】図6は、実施例5に記載の各種表面からの細胞のリフトオフ時間に関する電子的な画像を示す図である。

【図7】図7は、ナノ繊維表面および平坦表面上で培養したT47-D細胞の電子的な画像を示す図である。

【図8】図8は、播種し直したBAEC細胞の電子的な画像を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

刺激応答性または「スマート」材料は、応力、温度、水分、pH、印加電場もしくは磁場、イオン強度、またはグルコースもしくは抗原などの生体分子などの外部刺激を加えることにより、制御した様式で変えることのできる1種または複数の性質を有する材料である。代表的な刺激応答性の材料およびポリマー、ならびにそれらの物理的特性は、参照により本明細書に組み込まれる、Gilら、「Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates」、Prog. Polym. Sci.、29巻、1173～1222頁（2004年）に報告されている。熱応答性ポリマーは、こうした材料の一例である。熱応答性材料は、周囲の環境または系の温度変化に応じて物理的性質を変える材料である。熱応答性ポリマーは、系またはその周囲の温度が、下部臨界溶液温度（LCST）を超えて上昇すると、親水性状態から疎水性状態へ変化し得る。親水性状態にあるとき、ポリマー鎖は膨潤する。逆に疎水性状態にあるとき、ポリマー鎖は折り畳まれ、該ポリマーは、水に不溶となる。大抵の場合、この過程は可逆的になり得る。

40

50

【0021】

本発明の一実施形態は、熱応答性ナノ繊維を対象とする。熱応答性ナノ繊維は、基材の表面を改質して機能化表面を得るために、使用することができる。より特定すれば、熱応答性ナノ繊維は、基材上に熱応答性表面を得るために、使用することができる。基材の熱応答性ナノ繊維改質表面の物理的性質は、系内温度の変化に応じて変化する。生物活性物質は、その基材の表面上で接触できる、またはその上に露出した官能基と反応することによって、ナノ繊維改質表面上に固定化することができる。通常、生物活性物質は、熱応答性ナノ繊維改質表面上に固定化された後、生物活性の全てまたは一部を保持している。生物活性物質の基材表面と結合する能力は、その改質表面の物理的状態に応じて影響を受け得る。したがって、改質表面の温度を制御することにより、生物活性物質に結合する能力を制御することができる。

10

【0022】

本発明の一実施形態によれば、熱応答性ナノ繊維は、熱応答性ポリマー、生物活性物質、および少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤を含む。熱応答性ナノ繊維は、基材表面とナノ繊維との共有結合の形成により、その表面にナノ繊維を結合することによって、基材表面を改質するために使用することができる。潜在反応性・活性化可能基の少なくとも1個は、適切なエネルギー源に曝されたとき活性化を受けて、基材表面と熱応答性ナノ繊維との間に共有結合を形成する。残りの潜在反応基（複数可）は、基材表面上に接触可能に、または露出して残される。ナノ繊維中に含まれる生物活性物質、または該表面上の接触可能なもしくは露出した潜在反応基は、基材の更なる表面改質に使用し得る。

20

【0023】

延伸、鋳型合成、相分離、自己集合または電気紡糸などの多くの加工技術が、ナノ繊維の調製に使用されてきた。

【0024】

例えば、熱応答性ナノ繊維は、熱応答性ポリマー、生物活性物質、および少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する架橋剤を含む、繊維形成性組合せの電気紡糸により形成することができる。電気紡糸は、溶液または液体に繊維を生成させるために、ポリマーまたは他の繊維形成性の溶液または液体を電場中へ導入することを一般に伴う。毛管出口を有するシリンジ中に保持された繊維形成性組合せに、強い静電場を印加すると、毛管出口からの繊維形成性混合物の懸垂液滴が、Taylorコーンに変形する。電圧が閾値を超えると、電気力が液滴上の表面張力に打ち勝ち、溶液または液体の荷電ジェットが、Taylorコーンの先端から放出される。次いで、放出ジェットは、低電位の対電極として作用する収集金属スクリーンへと移動する。そのジェットは、小さい荷電繊維または細繊維に分割され、存在する溶媒は全て蒸発して、後にはスクリーン上に形成された不織布マットが残される。

30

【0025】

一実施形態では、静電紡糸繊維は、非常に細い直径を有するように生成することができる。電気紡糸繊維の直径、粘稠度および均一性に影響するパラメーターには、熱応答性ポリマー、そのポリマーの分子量、繊維形成性混合物中の架橋剤濃度（添加量）、ポリマー溶液の流速、印加電圧、および針・収集具間距離が挙げられる。本発明の一実施形態によれば、刺激応答性ナノ繊維は、約1 nm～約100 μmの範囲の直径を有する。他の実施形態では、刺激応答性ナノ繊維は、約1 nm～約1000 nmの範囲の直径を有する。更に、該ナノ繊維は、少なくとも約10から少なくとも約100の範囲のアスペクト比を有し得る。微小な繊維径のために、該繊維は、質量単位当たり高い表面積を有することが理解されよう。この高い表面積対質量比のために、繊維形成性物質溶液は、溶媒和繊維形成性物質から固体ナノ繊維へ1秒にも満たないうちに変換されることが可能である。

40

【0026】

ナノ繊維の形成に使用される刺激応答性ポリマーは、架橋剤と適合性のある任意の刺激応答性繊維形成性物質から選択され得る。一実施形態では、選択された熱応答性ポリマー

50

は、系の温度が下部臨界溶液温度を超えて上昇したとき、第1の物理的性質から第2の物理的性質への急速な変化を受けることができるべきである。例示的な熱応答性繊維形成ポリマーには、それだけに限らないが、ポリ（イソプロピルアクリルアミド）ならびにその混合物およびコポリマーが挙げられる。他の熱応答性ポリマーには、2-（2-メトキシエトキシ）エチルメタクリレートおよびオリゴ（エチレングリコール）メタクリレートのランダムコポリマーが含まれる。

【0027】

本発明の一実施形態によれば、熱応答性ポリマーはポリ（イソプロピルアクリルアミド）である。ポリ（イソプロピルアクリルアミド）は、およそ20～32℃の下方臨界溶解温度に達すると、主に親水性状態から主に疎水性状態へ変化する。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（PIPAAm）は、これまでで最も研究された熱応答性ポリマーの1つであるが、その理由は、体温に近い32℃付近の下部臨界溶液温度（LCST）を示すからだけでなく、そのLCSTが、環境条件に相対的に非感応性であるからでもある。pH、濃度または化学環境のわずかな変化は、LCSTに、ほんのわずかな程度しか影響しない。PIPAAmの水性相分離の主たる機構は、ポリマーのイソプロピル側鎖基に結合している水分子の熱誘発放出であり、LCSTを超えると、イソプロピル基同士の間で分子内および分子間疎水相互作用が起こることである。

【0028】

熱応答性ナノ繊維を形成する組成物内に架橋剤を含めると、熱応答性ナノ繊維が、広範囲の支持体表面に適合することが可能になる。潜在反応性架橋剤は、所望の表面特性を付与するために、単独または他の物質と組み合わせて使用することができる。

【0029】

適切な架橋剤には、放射線、電気エネルギーおよび熱エネルギーなどのエネルギー源に曝されると、他の物質と共有結合を形成できる少なくとも2個の潜在反応性・活性化可能基を有する、モノマー物質（低分子物質）またはポリマー物質のいずれかが挙げられる。一般に、潜在反応性・活性化可能基は、加えられた特定の外部エネルギーまたは刺激に応答して、活性種を生成する結果、隣接化学構造と共有結合を形成する化学実体である。潜在反応基は、保存条件下ではその共有結合を保持するが、外部エネルギー源で活性化されると、他の分子と共有結合を形成するような基である。幾つかの実施形態では、潜在反応基は、フリーラジカルなどの活性種を形成する。こうしたフリーラジカルには、外部から加えた電気、電磁または熱エネルギーを吸収した際のナイトレン、カルベン（carbene）または励起状態ケトンを含み得る。既知の潜在反応基の多様な例が、米国特許第4973493号、米国特許第5258041号および米国特許第5563056号、米国特許第5637460号および米国特許第6278018号に報告されている。

【0030】

トリクロロメチルトリアジンに基づく8種の市販多官能光架橋剤が、Aldrich Chemicals、Produits Chimiques Auxiliaires et de Synthèses（Longjumeau, France）、Shin-Nakamura Chemical、Midori Chemicals Co., Ltd. またはPanchim S. A.（France）から入手できる。その8種の化合物には、2,4,6-トリス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジン、2-（メチル）-4,6-ビス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジン、2-（4-メトキシナフチル）-4,6-ビス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジン、2-（4-エトキシナフチル）-4,6-ビス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジン、4-（4-カルボキシフェニル）-2,6-ビス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジン、2-（4-メトキシフェニル）-4,6-ビス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジン、2-（1-エテン-2-2'-フリル）-4,6-ビス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジンおよび2-（4-メトキシスチリル）-4,6-ビス（トリクロロメチル）-1,3,5-トリアジンが含まれる。

【0031】

幾つかの実施形態では、潜在反応基は同じであるが、他の実施形態では、潜在反応基は異なり得る。例えば、潜在反応基は、放射線で共に活性化される2種の異なる基でもよい。他の実施形態では、1つの潜在反応基は放射線で活性化し得るが、もう1つの潜在反応基は熱で活性化し得る。適切な架橋剤には、二官能性、三官能性および多官能性モノマーおよびポリマー物質が含まれる。

【0032】

熱的または熱エネルギーに反応する潜在反応基は、多様な反応性部分を包含し、熱分解して反応種を形成した後、共有結合を形成することになる既知の化合物を包含し得る。その共有結合により、架橋が隣接物質に結合することが可能になる。適切な熱反応基は、通常、熱感受性の、または熱不安定な結合をもつ一對の原子を有する。熱不安定な結合には、過氧化物結合などの酸素-酸素結合、窒素-酸素結合、および窒素-窒素結合が含まれる。このような結合は、80〜200℃を超えない範囲の温度で反応または分解することになる。

10

【0033】

熱発生したカルベンおよびナイトレンは共に、炭素結合挿入、移動、水素引抜きおよびダイマー形成を含む、多様な化学反応を受ける。カルベン発生剤の例には、ジアジリンおよびジアゾ化合物が含まれる。ナイトレン発生剤の例には、アリアルアジド、特に過フッ化アリアルアジド、アシルアジドおよびトリアゾリウムイリドが含まれる。それに加え、加熱した際に反応性三重項状態を形成する、ジオキセタンなどの基、またはラジカルアニオンおよびラジカルカチオンも、熱反応基の形成に使用され得る。

20

【0034】

一実施形態では、架橋剤の熱反応基は、過氧化物の-(O-O)-基を含む。熱反応性の過氧化物含有基には、例えば、熱反応性ジアシル過酸化基、熱反応性パーオキシジカーボネート基、熱反応性ジアルキル過酸化基、熱反応性パーオキシエステル基、熱反応性パーオキシケタール基、および熱反応性ジオキセタン基が挙げられる。

【0035】

ジオキセタンは、分子の環歪みのために、標準的な過氧化物と比較して低い温度で反応または分解する、4員環状過氧化物である。ジオキセタンの分解における初期段階は、O-O結合の切断であり、第2段階では、C-C結合を破壊して、励起三重項状態のカルボニルを1個、および励起一重項状態のカルボニルを1個創出する。励起三重項状態のカルボニルは、隣接物質から水素を引き抜き、2個のラジカル種を隣接物質上に1個および酸素の付いたそのカルボニルの炭素上に1個形成することができ、熱反応性ジオキセタンと隣接物質との間に新たな共有結合を形成することになる。

30

【0036】

代表的な熱反応性部分は、米国特許出願公開第20060030669号に報告されており、他の代表的な熱潜在反応基は、米国特許第5258041号に報告されている。これらの文書は共に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0037】

紫外線または可視線などの電磁線に反応する潜在反応基は、通常、光化学反応基と呼称される。

40

【0038】

潜在反応性・活性化可能なアリアルケトンの形態をした潜在反応性・活性化可能種の使用は、有用である。例示的な潜在反応性・活性化可能なアリアルケトンには、アセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン、アントロン様ヘテロ環（即ち、10位にN、OまたはSを有するものなどのアントロンのヘテロ環類縁体）、およびそれらの置換（例えば、環置換）誘導体が挙げられる。アリアルケトンの例には、アクリドン、キサントンおよびチオキサントンを含むアントロンのヘテロ環誘導体、ならびにそれらの環置換誘導体が挙げられる。特に、約360nmより大きい励起エネルギーを有するチオキサントンおよびその誘導体は、有用である。

【0039】

50

このようなケトンの官能基は、活性化／不活性化／再活性化サイクルを容易に受けることができるので、適している。ベンゾフェノン、三重項状態への系間交差を受ける励起一重項状態の初期形成により、光化学的に励起できるので、例示的な光化学反応性・活性化可能基である。励起三重項状態は、水素原子の引抜き（例えば、支持体表面から）により炭素－水素結合中に挿入し、したがってラジカル対を創出することができる。ラジカル対のその後の崩壊によって、新たな炭素－炭素結合が形成される。反応性結合（例えば、炭素－水素）が結合するために利用できない場合、ベンゾフェノン基の紫外光誘発励起は可逆的であり、その分子は、エネルギー源を除いたときに基底状態エネルギー準位に戻る。ベンゾフェノンおよびアセトフェノンなどの光化学反応性・活性化可能なアリールケトン、これらの基が、水中で多数回の再活性化を受け、そのためコーティング効率を増加させるため、特に重要である。

10

【0040】

本発明の幾つかの実施形態では、光化学反応性架橋剤は、異なる3種の分子ファミリーに由来し得る。幾つかのファミリーは、1つまたは複数の親水性部分、即ちヒドロキシ基（保護されていることもある）、アミン、アルコキシ基などを含む。他のファミリーは、疎水性および両親媒性部分を含み得る。一実施形態では、そのファミリーは、次式：



を有する。

【0041】

Lは連結基である。Dは、O、S、SO、SO₂、NR⁵またはCR⁶R⁷である。Tは、(−CH₂−)_x、(−CH₂CH₂−O−)_x、(−CH₂CH₂CH₂−O−)_xまたは(−CH₂CH₂CH₂CH₂−O−)_xである。R¹は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基である。Xは、O、SまたはNR⁸R⁹である。Pは、水素原子または保護基であるが、但し、XがNR⁸R⁹であるときは、存在しない。R²は、水素原子、アルキル、アルキルオキシアルキル、アリール、アリールオキシアルキルまたはアリールオキシアリール基である。Gは、O、S、SO、SO₂、NR¹⁰、(CH₂)_t−O−またはC=Oである。R³およびR⁴は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、またはR³およびR⁴は、(−CH₂−)_q、(−CH₂−)_rC=O(−CH₂−)_s、(−CH₂−)_rS(−CH₂−)_s、(−CH₂−)_rS=O(−CH₂−)_s、(−CH₂−)_rS(O)₂(−CH₂−)_sもしくは(−CH₂−)_rNR(−CH₂−)_sを介して一緒に結び合わされている。R⁵およびR¹⁰は、各々独立に水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基である。R⁶およびR⁷は、各々独立に水素原子、アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールまたはヘテロアリールアルキル基である。R⁸およびR⁹は、各々独立に水素原子、アルキル、アリールまたはアリールアルキル基であり、Rは、水素原子、アルキル基またはアリール基であり、qは、1から約7までの整数であり、rは、0から約3までの整数であり、sは、0から約3までの整数であり、mは、2から約10までの整数であり、tは、1から約10までの整数であり、xは、1から約500までの整数である。

20

30

40

【0042】

一実施形態では、Lは、約2～約10の間の炭素原子を有する分岐または非分岐アルキル鎖である。

【0043】

別の実施形態では、Dは、酸素原子(O)である。

【0044】

更に別の実施形態では、Tは、(−CH₂−)_xまたは(−CH₂CH₂−O−)_xであり、xは、1または2である。

【0045】

更にまた別の実施形態では、R¹は、水素原子である。

50

【0046】

また別の実施形態では、Xは酸素原子Oであり、Pは水素原子である。

【0047】

別の実施形態では、 R^2 は、水素原子である。

【0048】

更に別の実施形態では、Gは、酸素原子Oである。

【0049】

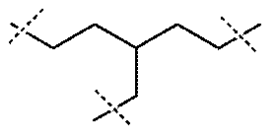
更にまた別の実施形態では、 R^3 および R^4 は、各々個別に、更に置換することができるアリール基であり、mは3である。

【0050】

特定の一実施形態では、Lは

【0051】

【化1】



であり、DはOであり、Tは $(-CH_2-)_x$ であり、 R^1 は水素原子であり、XはOであり、Pは水素原子であり、 R^2 は水素原子であり、GはOであり、 R^3 および R^4 はフェニル基であり、mは3であり、xは1である。

【0052】

また別の特定の実施形態では、Lは $(-CH_2-)_y$ であり、DはOであり、Tは $(-CH_2-)_x$ であり、 R^1 は水素原子であり、XはOであり、Pは水素原子であり、 R^2 は水素原子であり、GはOであり、 R^3 および R^4 はフェニル基であり、mは2であり、xは1であり、yは2から約6までの整数であり、特にyは2、4または6である。

【0053】

ある種の実施形態では、xは、約1～約500、より特定すれば約1～約400、約1～約250、約1～約200、約1～約150、約1～約100、約1～約50、約1～約25または約1～約10までの整数である。

【0054】

別の実施形態では、そのファミリーは、次式：

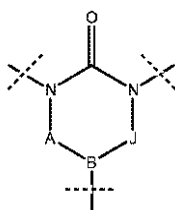
$L - ((T - C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4))_m$
を有し、L、T、 R^1 、X、P、 R^2 、G、 R^3 、 R^4 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、R、q、r、s、m、tおよびxは、上記に定義した通りである。

【0055】

一実施形態では、Lは、構造(I)：

【0056】

【化2】



(I).

に従った式を有する。

【0057】

AおよびJは、各々独立に水素原子、アルキル基、アリール基であるか、またはBと共に環式環を形成し、但し、AおよびJが、各々独立に水素原子、アルキル基またはアリール基である場合は、Bは存在しておらず、Bは、 NR^{11} 、Oまたは $(-CH_2-)_z$ で

10

20

30

40

50

あり、但し、A、BおよびJが環を形成する場合は、AおよびJが、 $(-CH_2-)_z$ または $C=O$ であり、 R^{11} は、水素原子、アルキル基、アリール基であるか、またはTとの結合を表しており、各zは、独立に0から3までの整数であり、但し、AまたはJのいずれかが $C=O$ である場合は、Bが、 NR^{11} 、Oまたは $(-CH_2-)_z$ であって、zは、少なくとも1でなければならない。

【0058】

別の実施形態では、Tは、 $-CH_2-$ である。

【0059】

別の実施形態では、そのファミリーは、次式： $L - ((GTZR^3C(=O)R^4))_m$ を有し、L、T、G、 R^3 、 R^4 、 R^{10} 、R、q、r、s、m、tおよびxは、上記に定義した通りである。Zは、Tが $(-CH_2-)_x$ である場合、 $C=O$ 、 COO または $CONH$ でもよい。

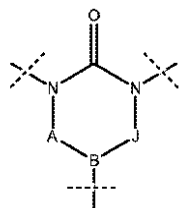
10

【0060】

一実施形態では、Lは、構造(I)：

【0061】

【化3】



(I)

20

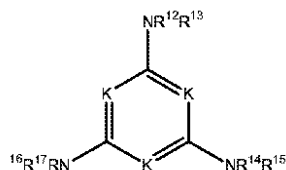
に従った式を有し、A、B、J、 R^{11} および z は、上記に定義した通りである。

【0062】

別の実施形態では、Lは、構造(II)：

【0063】

【化4】



(II).

30

に従った式を有する。 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} は、各々独立に水素原子、アルキルもしくはアリール基であるか、またはTとの結合を表し、但し、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} の少なくとも2つは、Tと結合しており、各Kは、独立にCHまたはNである。

【0064】

別の実施形態では、そのファミリーは、次式：

40

$L - ((TGQR^3C(=O)R^4))_m$ を有する。L、G、 R^3 、 R^4 、 R^{10} 、R、q、r、s、m、tおよびxは、上記に定義した通りである。Tは、 $(-CH_2-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_x$ であるか、または結合を形成する。Qは、 $(-CH_2-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2-O-)_p$ 、 $(-CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ または $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-)_p$ であり、pは、1から約10までの整数である。

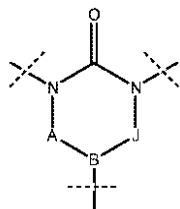
【0065】

一実施形態では、Lは、構造(I)：

【0066】

50

【化 5】



(I)

に従った式を有する。A、B、J、 R^{11} および z は、上記に定義した通りである。

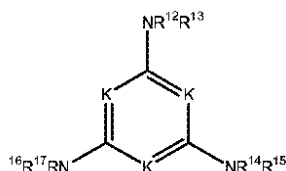
【0067】

10

別の実施形態では、Lは、構造 (II) :

【0068】

【化 6】



(II).

に従った式を有する。 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} は、各々独立に水素原子、アルキルもしくはアリール基であるか、または T との結合を表し、但し、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} の少なくとも 2 つは、T と結合しており、各 K は、独立に CH または N である。

20

【0069】

更にまた別の実施形態では、本発明の化合物は、 R^3 および R^4 が、共にフェニル基であり、CO、S または CH_2 を介して一緒に繋ぎ合わされていることを条件とする。

【0070】

また別の実施形態では、本発明の化合物は、 R^3 および R^4 が、共にフェニル基であるとき、そのフェニル基は、各々独立に、 $CH_3O-(CH_2CH_2O)_n-$ または $CH_3O(-CH_2CH_2CH_2O)_n-$ などの少なくとも 1 個のアルキルオキシアルキル基、 $HO-CH_2CH_2O-$ 、 $HO(-CH_2CH_2O)_n-$ または $HO(-CH_2CH_2CH_2CH_2O)_n-$ などのヒドロキシ化アルコキシ基などで置換することができ、式中 n は、1 から約 10 までの整数であることを条件とする。

30

【0071】

別の実施形態では、そのファミリーは、次式：

$L - ((-CH_2 -)_{xx} C(R^1) ((G) R^3 C(=O) R^4)_2)_m$
を有する。

【0072】

L、各 R、 R^1 、各 G、各 R^3 、各 R^4 、各 R^{10} 、各 q、各 r、各 s、各 t および m は、上記に定義した通りであり、 xx は、1 から約 10 までの整数である。

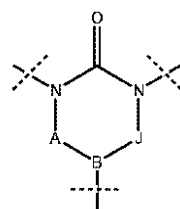
【0073】

40

一実施形態では、Lは、構造 (I) :

【0074】

【化 7】



(I)

50

に従った式を有する。A、B、J、 R^{11} および z は、上記に定義した通りである。

【0075】

別の実施形態では、A および B は、共に水素原子である。

【0076】

更に別の実施形態では、 x は、1 である。

【0077】

また別の実施形態では、 R^1 は、H である。

【0078】

更にまた別の実施形態では、G は $(-CH_2-)_t O-$ であり、 t は 1 である。

【0079】

別の実施形態では、 R^3 および R^4 は、各々個別にアリール基である。

【0080】

更にまた別の実施形態では、 x は 1 であり、 R^1 は H であり、各 G は $(-CH_2-)_t O-$ であり、 t は 1 であり、 R^3 および R^4 の各々は、各々個別にアリール基である。

【0081】

本発明の別の実施形態では、そのファミリーは、次式：

$L - ((-C(R^1)(XP)CHR^2GR^3C(=O)R^4)_m$

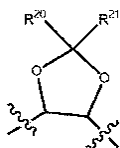
を有する。L、R、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、X、P、G、q、r、s、t および m は、上記に定義した通りである。

【0082】

一実施形態では、L は

【0083】

【化 8】



であり、 R^{20} および R^{21} は、各々個別に水素原子、アルキル基またはアリール基である。

【0084】

別の実施形態では、 R^1 は、H である。

【0085】

更に別の実施形態では、X は、O である。

【0086】

また別の実施形態では、P は、H である。

【0087】

更にまた別の実施形態では、 R^2 は、H である。

【0088】

別の実施形態では、G は $(-CH_2-)_t O-$ であり、 t は 1 である。

【0089】

更に別の実施形態では、 R^3 および R^4 は、各々個別にアリール基である。

【0090】

また別の実施形態では、 R^1 は H であり、X は O であり、P は H であり、 R^2 は H であり、G は $(-CH_2-)_t O-$ であり、 t は 1 であり、 R^3 および R^4 は、各々個別にアリール基であり、 R^{20} および R^{21} は、共にメチル基である。

【0091】

また別の実施形態では、本発明は、次式：

$L - ((GR^3C(=O)R^4)_m$

を有する化合物のファミリーを提供する。L は連結基であり、G は、O、S、SO、SO

10

20

30

40

50

$_2$ 、 NR^{10} 、 $(\text{CH}_2)_t-\text{O}-$ または $\text{C}=\text{O}$ であり、 R^3 および R^4 は、各々独立にアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリールもしくはヘテロアリールアルキル基であり、または R^3 および R^4 は、 $(-\text{CH}_2-)_q$ 、 $(-\text{CH}_2-)_r\text{C}=\text{O}(-\text{CH}_2-)_s$ 、 $(-\text{CH}_2-)_r\text{S}(-\text{CH}_2-)_s$ 、 $(-\text{CH}_2-)_r\text{S}=\text{O}(-\text{CH}_2-)_s$ もしくは $(-\text{CH}_2-)_r\text{S}(\text{O})_2(-\text{CH}_2-)_s$ 、 $(-\text{CH}_2-)_r\text{NR}(-\text{CH}_2-)_s$ を介して一緒に繋ぎ合わされており、 R^{10} は、水素原子、またはアルキル、アリールもしくはアリールアルキル基であり、 R は、水素原子、アルキルまたはアリール基であり、 q は、1から約7までの整数であり、 r は、0から約3までの整数であり、 s は、0から約3までの整数であり、 m は、2から約10までの整数であり、 t は、1から約10までの整数である。

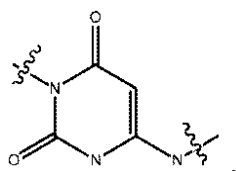
10

【0092】

一実施形態では、 L は、

【0093】

【化9】



である。

20

【0094】

別の実施形態では、 G は、 $\text{C}=\text{O}$ である。

【0095】

更に別の実施形態では、 R^3 および R^4 は、各々個別にアリール基である。

【0096】

また別の実施形態では、 G は $\text{C}=\text{O}$ であり、 R^3 および R^4 は、各々個別にアリール基である。

【0097】

「アルキル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、明示した数の炭素原子（即ち、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ は、1～6個の炭素原子を意味する）を有し、親のアルカン、アルケンまたはアルキンの単一炭素原子から、1個の水素原子を除くことにより誘導される、飽和または不飽和で、分岐、直鎖または環状の1価炭化水素基を指す。典型的なアルキル基には、それだけに限らないが、メチル；エタニル、エテニル、エチニルなどのエチル；プロパン-1-イル、プロパン-2-イル、シクロプロパン-1-イル、プロパー-1-エン-1-イル、プロパー-1-エン-2-イル、プロパー-2-エン-1-イル、シクロプロパー-1-エン-1-イル、シクロプロパー-2-エン-1-イル、プロパー-1-イン-1-イル、プロパー-2-イン-1-イルなどのプロピル；ブタン-1-イル、ブタン-2-イル、2-メチルプロパン-1-イル、2-メチルプロパン-2-イル、シクロブタン-1-イル、ブター-1-エン-1-イル、ブター-1-エン-2-イル、2-メチルプロパー-1-エン-1-イル、ブター-2-エン-1-イル、ブター-2-エン-2-イル、ブター-1, 3-ジエン-1-イル、ブター-1, 3-ジエン-2-イル、シクロブター-1-エン-1-イル、シクロブター-1-エン-3-イル、シクロブター-1, 3-ジエン-1-イル、ブター-1-イン-1-イル、ブター-1-イン-3-イル、ブター-3-イン-1-イルなどのブチルなどが挙げられる。特定の飽和度を意図する場合、以下に定義するように、術語「アルカニル」、「アルケニル」および／または「アルキニル」が使用される。「低級アルキル」とは、1～6個の炭素原子を有するアルキル基を指す。

30

40

【0098】

「アルカニル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、親アルカンの単一炭素原子から1個の水素原子を除くことにより誘導される、分岐、直鎖または環状の飽和アルキルを指す。典型的なアルカニル基には、それだけに限らないが、メタニル；エタニル；

50

プロパン-1-イル、プロパン-2-イル（イソプロピル）、シクロプロパン-1-イルなどのプロパニル；ブタン-1-イル、ブタン-2-イル（sec-ブチル）、2-メチルプロパン-1-イル（イソブチル）、2-メチルプロパン-2-イル（tert-ブチル）、シクロブタン-1-イルなどのブタニルなどが挙げられる。

【0099】

「アルケニル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、親アルケンの単一炭素原子から1個の水素原子を除くことにより誘導される、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有する分岐、直鎖または環状の不飽和アルキルを指す。この基は、二重結合（複数可）に関してシスまたはトランスのいずれかの配座を取り得る。典型的なアルケニル基には、それだけに限らないが、エテニル；プロパー-1-エン-1-イル、プロパー-1-エン-2-イル、プロパー-2-エン-1-イル、プロパー-2-エン-2-イル、シクロプロパー-1-エン-1-イル、シクロプロパー-2-エン-1-イルなどのプロペニル；ブター-1-エン-1-イル、ブター-1-エン-2-イル、2-メチルプロパー-1-エン-1-イル、ブター-2-エン-1-イル、ブター-2-エン-2-イル、ブター-1, 3-ジエン-1-イル、ブター-1, 3-ジエン-2-イル、シクロブター-1-エン-1-イル、シクロブター-1-エン-3-イル、シクロブター-1, 3-ジエン-1-イルなどのブテニルなどが挙げられる。

【0100】

「アルキルオキシアルキル」とは、酸素原子を介して一緒に繋ぎ合わされた2個のアルキル基を有する部分を指す。適切なアルキルオキシアルキル基には、メチル基などのアルキル基を末端とする、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドなどのポリオキシアルキレンが挙げられる。このような化合物の一般式は、 $R'-(OR'')_n$ または $(R'O)_n-R''$ と表すことができ、式中nは、1から約10までの整数であり、R'およびR''は、アルキルまたはアルキレン基である。

【0101】

「アルキニル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、親アルキンの単一炭素原子から1個の水素原子を除くことにより誘導される、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有する分岐、直鎖または環状の不飽和アルキルを指す。典型的なアルキニル基には、それだけに限らないが、エチニル；プロパー-1-イン-1-イル、プロパー-2-イン-1-イルなどのプロピニル；ブター-1-イン-1-イル、ブター-1-イン-3-イル、ブター-3-イン-1-イルなどのブチニルなどが挙げられる。

【0102】

「アルキルジイル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、明示した数の炭素原子（即ち、 $C_1 \sim C_6$ は、1～6個の炭素原子を意味する）を有し、親のアルカン、アルケンもしくはアルキンの異なる2個の各炭素原子から、1個の水素原子を除くことにより、または親のアルカン、アルケンもしくはアルキンの単一炭素原子から、2個の水素原子を除くことにより誘導される、飽和または不飽和で、分岐、直鎖または環状の2価炭化水素基を指す。2個の1価基中心、または2価基中心の各価標（valency）は、同じまたは異なる原子との結合を形成することができる。典型的なアルキルジイル基には、それだけに限らないが、メタンジイル；エタン-1, 1-ジイル、エタン-1, 2-ジイル、エテン-1, 1-ジイル、エテン-1, 2-ジイルなどのエチルジイル；プロパン-1, 1-ジイル、プロパン-1, 2-ジイル、プロパン-2, 2-ジイル、プロパン-1, 3-ジイル、シクロプロパン-1, 1-ジイル、シクロプロパン-1, 2-ジイル、プロパー-1-エン-1, 1-ジイル、プロパー-1-エン-1, 2-ジイル、プロパー-2-エン-1, 2-ジイル、プロパー-1-エン-1, 3-ジイル、シクロプロパー-1-エン-1, 2-ジイル、シクロプロパー-2-エン-1, 2-ジイル、シクロプロパー-2-エン-1, 1-ジイル、プロパー-1-イン-1, 3-ジイルなどのプロピルジイル；ブタン-1, 1-ジイル、ブタン-1, 2-ジイル、ブタン-1, 3-ジイル、ブタン-1, 4-ジイル、ブタン-2, 2-ジイル、2-メチルプロパン-1, 1-ジイル、2-メチルプロパン-1, 2-ジイル、シクロブタン-1, 1-ジイル、シクロブタン-1, 2-ジイ

ル、シクロブタン-1, 3-ジイル、ブタン-1-エン-1, 1-ジイル、ブタン-1-エン-1, 2-ジイル、ブタン-1-エン-1, 3-ジイル、ブタン-1-エン-1, 4-ジイル、2-メチルプロパン-1-エン-1, 1-ジイル、2-メタニリデンプロパン-1, 1-ジイル、ブタン-1, 3-ジエン-1, 1-ジイル、ブタン-1, 3-ジエン-1, 2-ジイル、ブタン-1, 3-ジエン-1, 3-ジイル、ブタン-1, 3-ジエン-1, 4-ジイル、シクロブタン-1-エン-1, 2-ジイル、シクロブタン-1-エン-1, 3-ジイル、シクロブタン-2-エン-1, 2-ジイル、シクロブタン-1, 3-ジエン-1, 2-ジイル、シクロブタン-1, 3-ジエン-1, 3-ジイル、ブタン-1-イン-1, 3-ジイル、ブタン-1-イン-1, 4-ジイル、ブタン-1, 3-ジイン-1, 4-ジイルなどのブチルジイルなどが挙げられる。特定の飽和度を意図する場合、術語のアルカニルジイル、アルケニルジイルおよび／またはアルキニルジイルが、使用される。2個の価標が同じ炭素原子上にあることを特に意図する場合、術語「アルキリデン」が使用される。「低級アルキルジイル」は、1～6個の炭素原子を有するアルキルジイル基である。幾つかの実施形態では、アルキルジイル基は、基の中心が末端炭素にある、非環状の飽和アルカニルジイル基、例えば、メタンジイル（メタノ）、エタン-1, 2-ジイル（エタノ）、プロパン-1, 3-ジイル（プロパノ）、ブタン-1, 4-ジイル（ブタノ）などである（下記に定義するアルキレンとも称する）。

10

【0103】

「アルキレン」とは、それ自体または別の置換基の一部として、親の直鎖アルカン、アルケンまたはアルキンの2個の各末端炭素原子から、1個の水素原子を除くことにより誘導される、飽和または不飽和の直鎖アルキルジイル基を指す。特定のアルキレン中に二重結合または三重結合が存在する場合、その位置は鉤括弧で示す。典型的なアルキレン基には、それだけに限らないが、メチレン（メタノ）；エタノ、エテノ、エチノなどのエチレン；プロパノ、プロパ[1]エノ、プロパ[1, 2]ジエノ、プロパ[1]イノなどのプロピレン；ブタノ、ブタ[1]エノ、ブタ[2]エノ、ブタ[1, 3]ジエノ、ブタ[1]イノ、ブタ[2]イノ、ブタ[1, 3]ジイノなどのブチレンなどが挙げられる。特定の飽和度を意図する場合、術語のアルカノ、アルケノおよび／またはアルキノが使用される。幾つかの実施形態では、アルキレン基は、($C_1 \sim C_6$)アルキレンまたは($C_1 \sim C_3$)アルキレンである。他の実施形態は、直鎖飽和アルカノ基、例えば、メタノ、エタノ、プロパノ、ブタノなどを包含する。

20

30

【0104】

「アリール」とは、それ自体または別の置換基の一部として、明示した数の炭素原子（即ち、 $C_5 \sim C_{15}$ は、5～15個の炭素原子を意味する）を有し、親芳香環系の単一炭素原子から1個の水素原子を除くことにより誘導される、1価芳香族炭化水素基を指す。典型的なアリール基には、それだけに限らないが、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、コロネン、フルオランテン、フルオレン、ヘキサセン、ヘキサフェン、ヘキサレン、a s-インダセン、s-インダセン、インダン、インデン、ナフタレン、オクタセン、オクタフェン、オクタレン、オバレン、ペンター-2, 4-ジエン、ペンタセン、ペンタレン、ペンタフェン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、プレイアデン、ピレン、ピラントレン、ルビセン、トリフェニレン、トリナフタレンなどに、ならびにそれらの水素化異性体由来する基が挙げられる。幾つかの実施形態では、アリール基は、($C_5 \sim C_{15}$)アリール、あるいは($C_5 \sim C_{10}$)アリールである。他の実施形態は、フェニルおよびナフチルを包含する。

40

【0105】

「アリールアルキル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、炭素原子、通常は末端または sp^3 炭素原子に結合した水素原子の1つが、アリール基で置き換えられている非環式アルキル基を指す。典型的なアリールアルキル基には、それだけに限らないが、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジ

50

ル、2-ナフトフェニルエタン-1-イルなどが挙げられる。特定のアルキル部を意図する場合、術語のアリールアルカニル、アリールアルケニルおよび／またはアリールアルキニルが使用される。幾つかの実施形態では、アリールアルキル基は、(C₇～C₃₀)アリールアルキルであり、例えば、アリールアルキル基のアルカニル、アルケニルまたはアルキニル部は、(C₁～C₁₀)であり、アリール部は(C₆～C₂₀)である、あるいはアリールアルキル基は、(C₇～C₂₀)アリールアルキルであり、例えば、アリールアルキル基のアルカニル、アルケニルまたはアルキニル部は、(C₁～C₈)であり、アリール部は(C₆～C₁₂)である。

【0106】

「アリールオキシアルキル」とは、アリール基およびアルキル基が酸素結合を介して一緒に結び合わされている部分を指す。適切なアリールオキシアルキル基には、メトキシフェニルまたはエトキシフェニルなどのフェニルオキシアルキレンが挙げられる。

10

【0107】

「シクロアルキル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、「アルキル」基の環状型を指す。典型的なシクロアルキル基には、それだけに限らないが、シクロプロピル；シクロブタニルおよびシクロブテニルなどのシクロブチル；シクロペンタニルおよびシクロアルケニルなどのシクロペンチル；シクロヘキサニルおよびシクロヘキセニルなどのシクロヘキシルなどが挙げられる。

【0108】

「シクロヘテロアルキル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、1個または複数の炭素原子（および付随する任意の水素原子）が、同じまたは異なるヘテロ原子で独立に置換えられている、飽和または不飽和の環式アルキル基を指す。炭素原子（複数可）に置き換わる典型的なヘテロ原子には、それだけに限らないが、N、P、O、SまたはSiが挙げられる。特定の飽和度を意図する場合、術語「シクロヘテロアルカニル」または「シクロヘテロアルケニル」が使用される。典型的なシクロヘテロアルキル基には、それだけに限らないが、エポキシド、イミダゾリジン、モルホリン、ピペラジン、ピペリジン、ピラゾリジン、ピロリジン、キヌクリジンなどに由来する基が挙げられる。

20

【0109】

「ハロゲン」または「ハロ」とは、それ自体または別の置換基の一部として、別途明記しない限り、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードを指す。

30

【0110】

「ハロアルキル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、水素原子の1個または複数、ハロゲンで置換えられているアルキル基を指す。したがって、用語「ハロアルキル」は、モノハロアルキル、ジハロアルキル、トリハロアルキルなどパーハロアルキルまでを包含することを意図している。例えば、「(C₁～C₂)ハロアルキル」という表現は、フロオロメチル、ジフロオロメチル、トリフロオロメチル、1-フルオロエチル、1,1-ジフルオロエチル、1,2-ジフルオロエチル、1,1,1-トリフルオロエチルまたはパーフルオロエチルを包含する。

【0111】

「ヘテロアルキル、ヘテロアルカニル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、1個または複数の炭素原子（および付随する任意の水素原子）が、同じまたは異なるヘテロ原子基で各々独立に置換えられている、アルキル、アルカニル、アルケニルおよびアルキニル基をそれぞれ指している。典型的なヘテロ原子基には、それだけに限らないが、-O-、-S-、-O-O-、-S-S-、-O-S-、-NR'-、=N-N=、-N=N-、-N=N-NR'-、-PH-、-P(O)₂-、-O-P(O)₂-、-S(O)-、-S(O)₂-、-SnH₂-などが挙げられ、式中R'は、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリールまたは置換アリールである。

40

【0112】

「ヘテロアリール」とは、それ自体または別の置換基の一部として、親ヘテロ芳香環系

50

の単一原子から1個の水素原子を除くことにより誘導される、1価ヘテロ芳香族基を指す。典型的なヘテロアリール基には、それだけに限らないが、アクリジン、アルシンドール、カルバゾール、 β -カルボリン、ベンゾオキサジン、ベンズイミダゾール、クロマン、クロメン、シンノリン、フラン、イミダゾール、インダゾール、インドール、インドリン、インドリジン、イソベンゾフラン、イソクロメン、イソインドール、イソインドリン、イソキノリン、イソチアゾール、イソオキサゾール、ナフチリジン、オキサジアゾール、オキサゾール、ペリミジン、フェナントリジン、フェナントロリン、フェナジン、フタラジン、プテリジン、プリン、ピラン、ピラジン、ピラゾール、ピリダジン、ピリジン、ピリミジン、ピロール、ピロリジン、キナゾリン、キノリン、キノリジン、キノキサリン、テトラゾール、チアジアゾール、チアゾール、チオフエン、トリアゾール、キサンテンなどに由来する基が挙げられる。ヘテロアリール基は、5～20員ヘテロアリール、あるいは5～10員ヘテロアリールでもよい。幾つかの実施形態では、ヘテロアリール基は、チオフエン、ピロール、ベンゾチオフエン、ベンゾフラン、インドール、ピリジン、キノリン、イミダゾール、オキサゾールおよびピラジンに由来する基である。

10

【0113】

「ヘテロアリールアルキル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、炭素原子、通常は末端または sp^3 炭素原子に結合した水素原子の1つが、ヘテロアリール基で置き換えられている非環式アルキル基を指す。特定のアルキル基を意図する場合、術語「ヘテロアリールアルカニル」「ヘテロアリールアルケニル」および/または「ヘテロアリールアルキニル」が使用される。幾つかの実施形態では、ヘテロアリールアルキル基は、6～21員ヘテロアリールアルキルであり、例えば、ヘテロアリールアルキルのアルカニル、アルケニルまたはアルキニル部は、($C_1 \sim C_6$)アルキルであり、ヘテロアリール部は、5～15員ヘテロアリールである。他の実施形態では、ヘテロアリールアルキルは、6～13員ヘテロアリールアルキルであり、例えば、アルカニル、アルケニルまたはアルキニル部は、($C_1 \sim C_3$)アルキルであり、ヘテロアリール部は、5～10員ヘテロアリールである。

20

【0114】

「ヒドロキシアルキル」とは、それ自体または別の置換基の一部として、水素原子の1つまたは複数、ヒドロキシ置換基で置き換えられているアルキル基を指す。したがって、用語「ヒドロキシアルキル」は、モノヒドロキシアルキル、ジヒドロキシアルキルまたはトリヒドロキシアルキルを包含することを意図している。

30

【0115】

「親芳香環系」とは、共役 π 電子系を有する環式または多環式不飽和環系を指す。「親芳香環系」の定義内に具体的に含まれるものは、1個または複数の環が芳香族であり、1個または複数の環が飽和または不飽和である、例えば、フルオレン、インダン、インデン、フェナレン、テトラヒドロナフタレンなどの縮合環系である。典型的な親芳香環系には、それだけに限らないが、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、コロネン、フルオランテン、フルオレン、ヘキサセン、ヘキサフェン、ヘキサレン、インダセン、 s -インダセン、インダン、インデン、ナフタレン、オクタセン、オクタフェン、オクタレン、オバレン、ペンター2,4-ジエン、ペンタセン、ペンタレン、ペンタフェン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、プレイアデン、ピレン、ピラントレン、ルビセン、テトラヒドロナフタレン、トリフェニレン、トリナフタレンなど、ならびにそれらの多様な水素化異性体が挙げられる。

40

【0116】

「親ヘテロ芳香環系」とは、1個または複数の炭素原子（および付随する任意の水素原子）が、同じまたは異なるヘテロ原子で独立に置き換えられている親芳香環系を指す。炭素原子に置き換わる典型的なヘテロ原子には、それだけに限らないが、N、P、O、S、Siなどが挙げられる。「親ヘテロ芳香環系」の定義内に具体的に含まれるものは、1個または複数の環が芳香族であり、1個または複数の環が飽和または不飽和である、例えば

50

、アルシンドール、ベンゾジオキサン、ベンゾフラン、クロマン、クロメン、インドール、インドリン、キサンテンなどの縮合環系である。典型的な親ヘテロ芳香環系には、それだけに限らないが、アルシンドール、カルバゾール、 β -カルボリン、クロマン、クロメン、シンノリン、フラン、イミダゾール、インダゾール、インドール、インドリン、インドリジン、イソベンゾフラン、イソクロメン、イソインドール、イソインドリン、イソキノリン、イソチアゾール、イソオキサゾール、ナフチリジン、オキサジアゾール、オキサゾール、ペリミジン、フェナントリジン、フェナントロリン、フェナジン、フタラジン、プテリジン、プリン、ピラン、ピラジン、ピラゾール、ピリダジン、ピリジン、ピリミジン、ピロール、ピロリジン、キナゾリン、キノリン、キノリジン、キノキサリン、テトラゾール、チアジアゾール、チアゾール、チオフエン、トリアゾール、キサンテンなどが挙げられる。

10

【0117】

「脱離基」は、反応中に求核試薬により置き換えられる基である。適切な脱離基には、 $S(O)_2Me$ 、 $-SMe$ またはハロ（例えば、 F 、 Cl 、 Br 、 I ）が挙げられる。

【0118】

「連結基」は、2個以上の末端基間の中間部位として働く基である。連結基の性質は、広範に変化でき、1つの分子部分を別の部分から隔てるために有用な、原子または基の事実上任意の組合せを包含することができる。例えば、リンカーは、非環式炭化水素架橋（例えば、メタノ、エタノ、エテノ、プロパノ、プロパ[1]エノ、ブタノ、ブタ[1]エノ、ブタ[2]エノ、ブタ[1, 3]ジエノなどの飽和または不飽和アルキレン）、単環式もしくは多環式炭化水素架橋（例えば、[1, 2]ベンゼノ、[2, 3]ナフタレノなど）、単純な非環式ヘテロ原子もしくはヘテロアルキルジイル架橋（例えば、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-PH-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)NH-$ 、 $-S(O)_2NH-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-O-CH=CH-CH_2-$ など）、単環式もしくは多環式ヘテロアール架橋（例えば、[3, 4]フラノ、ピリジノ、チオフエノ、ピペリジノ、ピペラジノ、ピラジジノ、ピロリジノなど）、またはこのような架橋の組合せでもよい。

20

【0119】

「保護基」は、例えば、不安定な水素原子に代わってヒドロキシ酸素に付加される基である。適切なヒドロキシ保護基（複数可）には、エステル（アセテート、エチルアセテート）、エーテル（メチル、エチル）、エトキシ化誘導体（エチレングリコール、プロピレングリコール）などが挙げられ、保護基が除かれ、水素原子で置き換えられるように、酸性または塩基性いずれかの条件下で除くことができる。適当な保護基の選択、ならびにその結合および除去の合成戦略に対する指針は、例えば、Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3版、John Wiley & Sons, Inc., New York (1999年)およびその中に引用された参考文献（以後では「Greene & Wuts」）に見出し得る。

30

【0120】

ポリオレフィン、ポリスチレン、ポリ（メチル）メタクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリ（酢酸ビニル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ塩化ビニルなどの塩素含有ポリマー、ポリオキシメチレン、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタン、フェノール樹脂、アミノエポキシ樹脂、ポリエステル、シリコーン、セルロース系プラスチック、フルオロポリマーおよびゴム様プラスチックなどのプラスチックまたは多孔膜は、本明細書に記載するように改質できる表面を与える支持体として、全て使用することができる。それに加え、熱分解炭素、パリレン被覆表面、およびガラス、セラミックまたは金属のシリル化表面で形成されたような支持体も、表面改質に適切である。

40

【0121】

本発明の方法では、支持体表面への生物活性物質の結合を伴ってもよい。例えば、架橋剤を含む熱応答性ナノ繊維は、支持体表面の存在下で2個以上の潜在反応性・活性化可能

50

基を有するように供給される。代替的な実施形態では、該ナノ繊維は、生物活性物質、または生物活性物質と反応する官能性ポリマーも含み得る。潜在反応基の少なくとも1個は、活性化され、その表面に共有結合する。残りの潜在反応基は、不活性状態で残ることが可能であり、後に活性化されることにより、生物活性物質または官能性ポリマーに結合し、基材表面へ生物活性物質を結合させる。

【0122】

官能性ポリマーは、生物活性物質と反応する、1個または複数の官能基を有するポリマーである。代表的な官能基には、生物活性物質と反応する、カルボキシ、エステル、エポキシ、ヒドロキシ、アミド、アミノ、チオN-ヒドロキシスクシンイミド、イソシアネート、酸無水物、アジド、アルデヒド、塩化シアヌリルまたはホスフィンの各基が挙げられる。

10

【0123】

あるいは、熱応答性ナノ繊維組成物中に提供された生物活性物質または官能性ポリマーは、第2の生物学的物質に結合することにより、例えば、系への加熱または系からの除熱による支持体表面の物理的性質を操作することによって、基材表面へ第2の生物学的物質を結合させてもよい。

【0124】

この方法の各ステップは、適切な任意の順序で行うことができる。例えば、本明細書に記載するような、熱応答性ポリマーおよび架橋剤を含む熱応答性ナノ繊維は、疎水相互作用によって物理的に、適切な支持体表面中に吸収またはその表面へ吸着させてもよい。光活性化すると、光活性化可能基（例えば、ベンゾフェノン基）の少なくとも1個は、支持体表面で共有結合の形成を受ける。残りの未結合の光活性化可能基（複数可）の近傍に引抜き可能な水素が存在しない場合、光活性化源が除かれることにより、その光活性化可能基は、励起状態から基底状態へ戻る。その後、こうした残りの光活性化可能基は、固定化するつもりで生物活性物質が存在し、処理済み表面が次の照射に曝された場合、再活性化することができる。この方法は、「2段階」手法と表現することができ、第1ステップでは、熱応答性ナノ繊維を施して潜在反応表面を創出し、第2ステップでは、生物活性物質を添加して、活性化された表面に結合させる。

20

【0125】

あるいは、「1段階」法と表現される方法は、本発明の熱応答性ナノ繊維を生物活性物質と共に混合し、組成物を形成することを条件とする。生成する組成物は、単一の光活性化ステップで物質を表面改質するために、使用される。この場合、光活性化は、少なくとも1個の光活性化可能基の基材表面との共有結合形成を誘発するだけでなく、その表面上に存在する任意の隣接生物活性物質との共有結合形成も同時に誘発する。

30

【0126】

代替的な実施形態では、熱応答性ナノ繊維が、熱応答性ポリマー、少なくとも2個の潜在性・活性化可能基を有する架橋剤、および生物活性物質を含む組合せまたは混合物から形成される。潜在反応基の少なくとも1個は、支持体表面で共有結合形成を受け、ナノ繊維をその基材表面に結合させる。残りの潜在反応基（複数可）は、光活性化を受けて、第2の生物活性物質と反応することができる。あるいは、ナノ繊維中に組み入れた生物活性物質自体が、第2の生物活性物質と反応し、基材を更に機能化することができる。

40

【0127】

別の代替法では、本発明の熱応答性ナノ繊維は、潜在反応基でそれ自体が官能化された分子の適用および結合の前に、基材表面の前処理に使用される。この方法は、特に困難な基材が最大限の被膜耐久性を必要とする状況において、有用である。このようにして、基材表面と潜在反応基で誘導体化した標的分子との間に形成される共有結合の数は、所望の潜在反応基含有標的分子だけによる表面改質と比較して、通常、増加させることができる。

【0128】

基材表面を本発明の熱応答性ナノ繊維でコーティングまたは処理した後、その熱応答性

50

表面は、系への加熱または除熱により、対象とする生物学的物質を選択的に結合させ、放出することによって、微調整することができる。熱を系に加えることにより、表面に結合している熱応答性ナノ繊維を親水性状態から疎水性状態へ変化させることができる。LCSTより高い温度の疎水性状態では、ポリマー鎖は折り畳まれ、表面が疎水性になる。この状態では、熱応答性ナノ繊維は、選択標的分子を引き付けることも、反発することもある。あるいは、基材をLCST未満に冷却することにより、系から熱を除くこともできる。冷却された後、熱応答性ナノ繊維は、最初の親水性状態に戻り、特定の標的分子に対する変化した親和性を再び示し得る。

【0129】

本発明で使用する適切な生物活性分子または標的分子は、多様な一群の材料または物質を包含する。こうした物質は、非誘導体形態で使用してもよく、または予め誘導体としてもよい。その上、標的分子は、単独で、または他種の標的分子と組み合わせて固定化することもできる。

10

【0130】

標的分子は、当該表面を本発明の熱応答性ナノ繊維で下塗りした後に（例えば、逐次に）、表面に固定化することができる。あるいは、標的分子は、基材の表面に熱応答性ナノ繊維を付着させる間に（例えば、と同時に）固定化される。

【0131】

通常、標的分子は、その表面および／またはその表面を有する器具もしくは物品に、特定の所望の性質を付与するように選択される。本発明の一実施形態によれば、標的分子または物質は、生物活性物質である。ナノ繊維改質基材の表面上に固定化され得る、またはナノ繊維組成物の一部として供給され得る生物活性物質には、一般に、それだけに限らないが、以下のもの：酵素、タンパク質、炭水化物、核酸およびそれらの混合物が挙げられる。生物活性物質を含めた適切な標的分子の更なる例、およびそれらを通常使用して付与される表面性質は、以下の非限定的な一覧によって表される。

20

【0132】

【数 1】

標的分子	機能活性
合成ポリマー	
スルホン酸置換	潤滑性、負荷電表面
ポリアクリルアミド	親水性
ポリアクリルアミド	潤滑性、タンパク質反発、親水性
ポリエチレングリコール	潤滑性、細胞およびタンパク質の反発、親水性
ポリエチレンイミン	正荷電表面
ポリ乳酸	生体侵食性表面
ポリビニルアルコール	潤滑性、親水性
ポリビニルピロリドン	潤滑性、親水性
四級アミン置換ポリアクリルアミド	潤滑性、正荷電表面
シリコーン	潤滑性、疎水性
導電性ポリマー物質、例えば、ポリビニルピリジン、ポリアセチレン、ポリピロール)	電気伝導性
炭水化物	
アルギン酸	潤滑性、親水性
セルロース	潤滑性、親水性、生分解性グルコース源
キトサン	正荷電表面、親水性、ホメオスタシス
グリコーゲン	親水性、生分解性グルコース源
ヘパリン	抗血栓性、親水性、細胞および増殖因子の付着、タンパク質親和性
ヒアルロン酸	潤滑性、負荷電表面
ペクチン	潤滑性、親水性
単糖、二糖	親水性
デキストラン硫酸	クロマトグラフィー媒体、親水性

【0 1 3 3】

【数 2】

標的分子	機能活性	
タンパク質		
抗体	抗原結合性、免疫アッセイ	
抗血栓剤(例えば、抗トロンビンⅢ)	抗血栓表面	
アルブミン	非血栓表面	
付着タンパク質/ペプチド(例えば、コラーゲン)	細胞付着	
酵素	触媒表面	10
細胞外マトリックスタンパク質/ペプチド	細胞の付着および増殖	
増殖因子、タンパク質/ペプチド	細胞増殖	
ヒルジン	抗血栓表面	
血栓溶解タンパク質(例えば、ストレプトキナーゼ、プラスミン、ウロキナーゼ)	血栓溶解活性	
脂質		
脂肪酸	疎水性、生体適合性	20
モノ、ジおよびトリグリセリド	疎水性、潤滑性、生分解性脂肪酸源	
リン脂質	疎水性、潤滑性、生分解性脂肪酸源	
プロスタグランジン/ロイコトリエン	非血栓表面/固定化メッセンジャー	
核酸		
DNA	ヌクレアーゼの基質/親和結合性、ゲノムアッセイ	
RNA	ヌクレアーゼの基質/親和結合性、ゲノムアッセイ	
ヌクレオシド、ヌクレオチド	プリン、ピリミジン、酵素補因子の供給源	
薬物/ビタミン/補因子		
酵素補因子	固定化酵素	30
ヘム化合物	グロビン結合/表面酸素化	
薬物	薬物活性	

【0 1 3 4】

【数 3】

標的分子	機能活性	
非高分子物質		
色素(例えば、アゾ染料)	着色剤	
蛍光化合物(例えば、フルオレセイン)	蛍光	40

本発明の熱応答性ナノ繊維は、フィルター、組織工學用足場、保護着、複合材料の強化およびセンサー技術を含む、多種多様な用途で 사용할 ことができる。

【0 1 3 5】

本発明の熱応答性ナノ繊維から作製し、またはそれをコーティングし、またはそれで処理することができる医療品には、それだけに限らないが、以下のもの：尿カテーテルおよび血管カテーテル（例えば、末梢および中心血管カテーテル）を含むカテーテル、創傷排液チューブ、動脈移植片、軟組織用パッチ、手袋、シャント、ステント、気管カテーテル、創傷包帯、縫合糸、ガイドワイヤーおよび補綴装具（例えば、心弁およびLVAD）を挙げることができる。本発明に従って調製できる血管カテーテルには、それだけに限らな

いが、単腔および多腔中心静脈カテーテル、末梢挿入中心静脈カテーテル、救急注入カテーテル、経皮的シース導入システム、熱希釈カテーテルが挙げられ、それらには、このような血管カテーテルのハブおよびポート、ペースメーカー、除細動器、人工心臓および埋込型バイオセンサーなどの電子装置へのリードが含まれる。

【0136】

本発明の熱応答性ナノ繊維から作製できる、またはそれでコーティングもしくは処理できる表面を有する、追加の物品には、それだけに限らないが、以下のもの：スライド、マルチウェルプレート、ペトリ皿、組織培養スライド、組織培養プレート、組織培養フラスコ、細胞培養器具、あるいはカラム支持体および／またはクロマトグラフィー媒体を挙げることができる。

10

【0137】

別の実施形態では、本発明の熱応答性ナノ繊維は、生体分子固定化用の顕微鏡スライドまたは「チップ」に適用することができる。

【0138】

また別の実施形態では、本発明の熱応答性ナノ繊維は、熱応答性表面を得るために、細胞培養器具の表面に適用することができる。

【0139】

各種の哺乳類細胞を、ポリイソプロピルアクリルアミド（PIPAAm）でコーティングした組織培養ポリスチレン（TCPS）上に播種した。その細胞は、未被覆TCPSと同様に接着し、増殖し、分化した。裸TCPS上の細胞については、トリプシン消化処理を実施して、細胞外マトリックスを溶解し、Caイオンをキレート化し、除去することにより、細胞を放出させるが、その過程で、細胞は、細胞表面の受容体、ギャップ結合および基礎の細胞外マトリックスを失う。細胞放出のための別の代替法は、その機械的使用により、形状不規則な組織断片が生成する細胞スクレーパーの使用である。熱応答性ポリマー被覆皿を用いると、細胞は、20°～32℃のポリマーが水和する温度に培養温度を下げることで、非侵襲的に剥離される。酵素的消化とは対照的に、接着タンパク質も、集密細胞間の細胞間結合も、保持されるので、足場の全くない三次元機能組織の生成が可能になる。

20

【0140】

細胞シート工学は、細胞培養基材として熱応答性ポリマーを使用することから生じた独特の技法である。37℃では、PIPAAmは、疎水性になり、タンパク質吸着およびそれに伴う細胞接着を促進する。その温度を20°～32℃へ下げることにより、細胞は、基礎の基材から遊離することができる。この転移に亘る疎水性から親水性への変化が、培養基材からのタンパク質および接着細胞の遊離を起こす。この技法により、細胞間接触、ギャップ結合および表面受容体、ならびに基礎の細胞外マトリックス（ECM）が、維持される。完全状態のECMは、細胞シートを多層化して、均一な組織移植片、例えば高拍動性の心臓組織移植片、または異なる各種細胞型、例えば内皮細胞および肝細胞からシートを多層化することにより、不均一な組織移植片を形成するための糊塗剤として役立つ。こうして生成した細胞シートは、動物移植試験に大いに適用可能であった。移植実験は、解離細胞対細胞シートの注射による応答を比較するために行った。4層細胞シート相当の解離心筋細胞を、左側の皮下背部組織中に注射し、熱応答性ポリマーを介した低温リフトオフで得られた4層細胞シートを、右側の皮下背部組織中に移植した。分離状態の細胞が、皮下に塊を形成する一方、シート移植部位は、滑らかなままであった。移植から1週間後、各々の部位を開放したところ、右側の断面図では、壊死が見られない、平坦で四角い心移植片が示され、コネキシン43（ギャップ結合マーカー）の染色により、多数のギャップ結合の存在が明らかになった。

30

40

【0141】

左側では、無細胞中心区域のある細胞緻密な移植片表面帯域が示され、コネキシン43を染色したところ、ほんの少数の沈着物しか見えなかった。組織培養ポリスチレン上へのPIPAAmのグラフト化、ならびに様々な細胞型の培養および採集のそれによる成功の

50

結果、Cell Seed Inc.（東京、日本）により市販される組織培養ポリスチレン皿の開発に到った。こうした表面の使用によって、培養温度を下げることで剥離が実現するため、細胞の収集時におけるトリプシンの使用は全く不要となる。こうして、面倒なピペティングの使用が除かれ、労力、時間および細胞／組織損傷が軽減される。

【0142】

培養表面も、PIPAAmと、その類縁カルボキシレート誘導体の2-カルボキシイソプロピルアクリルアミド(CIPAAm)との共重合によって、官能化することができる。インスリンは、CIPAAmのカルボキシレート基との標準的なアミド結合形成により、培養表面上に固定化した。インスリンを固定化した表面は、血清を添加せずとも、ウシ頸動脈内皮(BAEC)細胞の増殖の増加を示した。同様に、CIPAAm配列上のカルボキシ基は、培地中にウシ胎児血清を添加せずにBAEC細胞の接着および増殖を促進する、RGDSなどの細胞接着配列の固定化に使用することができる。したがって、細胞の培養およびその低温リフトオフにより、コストおよび安全性(プリオンおよびウシ海綿状脳症)の双方の使用に関わる懸念のある、血清を使用する必要性が回避される。こうした表面は、組織工学および移植の各種用途で後に使用できる、細胞および細胞シートの無血清培養に有用となろう。

【0143】

PIPAAmグラフト化TCPSからの自発的な細胞シート生成は、相対的に遅い過程であり、シート周辺から内部に向かって徐々に起こる。したがって、無傷の生細胞シートを完全に引き上げるために、相当なインキュベーション時間が必要である。細胞シートの迅速な回収は、回収細胞シートの生物学的機能および生存性の維持にとって、ならびに組織構造の実用的組立にとっても重要であると考えられる。細胞回収の律速段階は、細胞シートと相互作用する疎水化PIPAAmセグメントの水和であり、水透過性の高い基材を細胞シートと熱応答性表面との間の界面に組み込むことが望ましい。これに関しては、細胞シートの剥離過程を速めるために、幾つかの手法を試みてきた。20℃で1時間インキュベートした、集密状態のMadin-Darbyイヌ腎(MDCK)細胞上に親水化したPVDf膜を置くことが、細胞の容易な引上げに役立つことが示された。別の1組の実験では、PIPAAmでグラフトした多孔膜(PET)を利用した。既述のように、PIPAAmグラフト化TCPS皿上では、より低い温度でPIPAAmに水和するのに必要な水は、各細胞の周辺だけから、細胞とグラフト化PIPAAm鎖との間の界面へと培養マトリックスを容易に浸透することができる。多孔膜上では、PIPAAmの水和は、接着細胞下の孔から、ならびに各細胞の周辺から供給される。付着細胞下の孔からPIPAAmグラフトへ水塊が容易に迅速に到達することにより、単独細胞および細胞シートの剥離が加速される。膜の孔径は、細胞の接着および増殖を決定する上で重要な要因である。一般に、細胞は、その偽足より大きな孔径を有する表面上では増殖しない。孔径が5μmより大きい膜上では、線維芽細胞の接着および抑制が、著しく低下することが判明した。

【0144】

電気紡糸工程を介して生成したナノ繊維は、前例のない多孔度(>70%)、高い表面積対体積比、ならびに広範囲の孔径分布および高い相互接続性を有し得るが、これら物理的性質は全て、細胞の付着および増殖の促進に理想的である。更に、電気紡糸ナノ繊維のナノトポグラフィーは、ECMおよび基底膜のナノ線維およびナノ多孔の3D外形に酷似している。表面積の増加によって、細胞付着率(%)の増加、ならびにナノサイズの繊維径による様々な繊維上での多点の接着斑が可能になる。ナノ繊維の直径は、細胞サイズより数桁小さいので、細胞は、組織化され、伸展し、または多点斑で吸着タンパク質に付着することができる。

【0145】

電気紡糸ナノ繊維は、多種多様な細胞型を支持することができる。ヒト臍帯内皮細胞は、7μmのマикро繊維と比較して、直径300nmの50:50ポリ(L-乳酸-co-ε-カプロラクトン)(PLCL)繊維上に播種した際、良好に付着し、増殖した。マикро繊維に付着した細胞は、形状が丸く、非増殖性であったのに対し、ナノ繊維上では

、細胞は、多重繊維上で見事に伸展し、固定された。E l i a s および共同研究者は、炭素ナノ繊維上での骨芽細胞の接着、増殖、アルカリホスファターゼ活性およびECM分泌が、60～200nmの範囲で繊維径が減少すると共に増加したと報告した。ナノ溝付き表面は、ヒト角膜上皮細胞の接触誘導を引き起こし、該細胞が、その位相的特徴に沿って伸長し、細胞骨格を配列するようにすることができる。液液相分離を用いて創製されたナノスケール孔を有する、高多孔性PLL足場は、神経幹細胞の培養に使用されてきており、神経突起の伸出しに正の効果を及ぼすことが示された。最近の研究は、ポリアミドナノ繊維表面上でのNIH 3T3繊維芽細胞および正常ラット腎細胞の増殖が、形態、アクチン編成、接着斑集合、フィブロネクチン分泌および細胞増殖速度の変化を起こしたことを示しているが、こうした変化は、インビボでの繊維芽細胞の表現型をより良く表している。同じ表面上の乳房上皮細胞は、形態形成を受けて、ガラス上で培養した同じ細胞とは異なり、多細胞球状体を形成した。市販のポリアミドナノ繊維は、接着性の弱い細胞系、例えばPC12神経細胞系にとって、細胞付着のより良好な基材となることも示された。ポリアミド電気紡糸ナノ繊維は、マウス胚性幹細胞(ES-D3)の付着および増殖を支持することも示された。こうした細胞は、選択した培地に基づいてニューロン、乏突起膠細胞および星状細胞に分化した。ポリ(ε-カプロラクトン)(PCL)ナノ繊維足場上に播種したウシ胎児軟骨細胞は、3週間の培養中に軟骨細胞の表現型を維持し、具体的には、成熟軟骨細胞の表現型を示すIIB型コラーゲン発現を上方調節することができた。こうした研究は、ナノ繊維足場が、細胞適合性であるだけでなく、細胞増殖および表現型挙動を刺激し、促進するために使用することもできることを実証している。

10

20

【0146】

付着細胞から特異的な生物学的応答を誘発するために、ナノ繊維を、生物活性分子を用いて機能化することもなし得る。機能化は、通常、ナノ繊維表面への該分子のコンジュゲーション、または紡糸溶液中への生物活性分子の導入のいずれかにより、実施される。ポリ(ε-カプロラクトン-co-エチルエチレンホスフェート)(PCL-EEP)上ヘグラフトしたポリアクリル酸(PAA)は、肝細胞の付着を媒介するガラクトースリガンドのコンジュゲーションを可能にする。こうしたPCL-EEP機能化ナノ繊維足場上で培養した肝細胞は、ナノ繊維を取り込んだ20～100μmの球状凝集体を形成した。培養基材の重要性を強調するために、アミノ化ナノ繊維メッシュは、アミノ化フィルムと比較して、造血幹/前駆細胞の接着および増殖を高度に支持したことが、他の人たちにより示された。同様に、キトサンナノ繊維上への骨形態形成タンパク質2(BMP-2)のコンジュゲーションによって、骨芽細胞の増殖、アルカリホスファターゼ活性およびカルシウム沈着が改善された。

30

【0147】

まとめると、電気紡糸ポリマーナノ繊維のナノスケールという特質は、天然のECMを模倣している。ナノ繊維のECM類似性質は、細胞の増殖および分化を刺激し、促進するために使用することができる。その上、細胞は、インビボ類似の形態および機能を維持することができる。したがって、繊維の組成、形態、配列と、生物活性分子または増殖因子を組み込む能力との組合せは、天然ECMの機能の再現に役立つ。

40

【0148】

以下の非限定的な実施例に関して、本発明を更に説明する。本発明の範囲から逸脱せずに、上記の実施形態に多くの変更を加えることができることは、当業者には明らかであろう。したがって、本発明の範囲は、本出願に記載の実施形態に限定せずに、特許請求の範囲の言葉で表現した実施形態、およびそうした実施形態の均等物によってのみ限定すべきである。別途指示しない限り、全てのパーセンテージは重量基準である。

【実施例】

【0149】

(実施例1)

PCLおよびPSナノ繊維の電気紡糸

平均分子量80kDaのポリ(ε-カプロラクトン)(PCL)およびポリスチレン(

50

350000Da)をAldrich chemicals (Milwaukee, WI)から購入した。PCLまたはPS 14gを、テトラヒドロフラン (Fisher Scientific) およびN, N-ジメチルホルムアミド (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) からなる有機溶媒混合物 (1:1) 100ml中に溶解し、室温で24時間混合物を振盪してよく混合することにより、0.14g/mlの溶液を調製した。そのポリマー溶液を、27Gの鈍い針 (Strategic Applications, Inc., Libertyville, IL)をはめたプラスチック製シリンジに入れた。シリンジポンプ (KD Scientific, USA)を用いて、針先端にポリマー溶液を供給した。高電圧電源 (Gamma High Voltage Research, USA)を用いた電気紡糸により、ナノ繊維メッシュを作製した。針先端から一定の距離にある接地アルミホイル上に、ナノ繊維を収集した。次いでそのメッシュを取り除き、真空チャンバー中に少なくとも48時間入れて、残存有機溶媒を除いた後、デシケーター中に保存した。ナノ繊維は、顕微鏡 (Olympus BX 60) で評価した。

【0150】

PCLおよびPS電気紡糸繊維の直径、粘稠度および均一性に有意に影響するパラメーターは、ポリマー濃度、印加電圧、溶液供給速度および針・コレクター間距離であった。玉のない均一な繊維が、針詰まりなく連続的に紡糸されるまで、これらのパラメーターを最適化した。ポリマー濃度を3段階 (0.10g/ml、0.12g/mlおよび0.14g/ml)、電圧を2段階 (17kv、20kv)、および針・コレクター間距離を3段階 (8cm、12cm、15cm) で調べて、無欠陥ナノ繊維を得た。最適化した条件を表1に示す。

【0151】

【表1】

表1.電気紡糸パラメーター

ポリマー濃度	0.14g/ml
印加電圧	20kv
流速	0.02ml/分
針・コレクター間距離	12cm

図1は、PCLナノ繊維の典型的なSEM像を示す。ナノ繊維の平均繊維径は、 453 ± 146 nmである。試験した配合物では、高度に多孔性の構造を観察した。液体置換法で測定した多孔度は、0.90であった。

【0152】

(実施例2)

ナノ繊維メッシュの (PIPAAm) によるコーティング

各種のコーティング手法を用いて、様々な培養基材上に熱応答性ポリマーの薄い被膜を得た。そうした基材には、TCPS、Thermanoxカバーガラス (Nunc)、市販ナノ繊維メッシュ (Surmodics Inc., Corning Inc.) および自社製PCLナノ繊維が含まれていた。Thermanoxカバーガラスおよびナノ繊維挿入片を、20mg/mlのPIPAAm (ポリイソプロピルアクリルアミド Aldrich chemicals、Mw+ 20~25KDa、WI) および0.8mg/mlのTriLite (トリス [2-ヒドロキシ-3-(4-ベンゾイルフェノキシ) プロピル] イソシアヌレート) のIPA (イソプロピルアルコール) 溶液中でディップコーティングした。小片は、コーティング溶液中に10秒間浸漬してディップコーティングし、次いで0.5cm/秒の速度で抜き出した。そのメッシュは、風乾した後、5分間UVで照射した (300~400nm、Harland Medical UVM400, MN)。多様なディップ速度、濃度、ディップ回数および浸漬時間を試みた。被覆表面の有効性は、それぞれ37℃および20℃でのBAEC細胞 (Lonza Biosciences, NJ, USA) の付着および脱着挙動により、試験した。上記の条件は細胞

の付着および脱着に有効であったが、このディップ法では、組織培養形式の表面（例えば、マルチウェル皿または100mm皿）をコーティングすることができなかった。そのため、マルチウェル皿、ナノ繊維挿入片、市販ナノ繊維、96ウェルおよび100mmの皿を、先ず0.8mg/mlのTrilite溶液でコーティングする、別の手法を試みた。Trilite溶液を直ちに除き、30秒間UVで照射した。次いで、PIPAAm溶液（IPA中20mg/ml）をウェルに添加し、直ちに除き、2.0分間UVで照射した。処理済み表面は、IPAおよび組織培養等級の滅菌水で濯ぎ洗った後、細胞を播種した。

【0153】

（実施例3）

スマートポリマーナノ繊維

スマートポリマー光反応性ナノ繊維を合成するために、1.0wt%のTriliteを含有する4種の配合物を調製した。これらの配合物は、（DMF/THF）中PS、（DMF/THF）中PCL、（IPA/DMF）中PIPAAm、水中PIPAAm-co-PEG（1%）であった。ナノ繊維を、実施例2の電気紡糸法により作製した。ポリマー濃度、溶媒比、印加電圧および針・コレクター間距離などのパラメーターは、玉のない、平均直径500nm未満の均一な繊維を、針詰まりなく連続的に紡糸できるまで、最適化した。最適化した条件を表2に示す。乾燥後、PSおよびPCLを除く全てのナノ繊維は、UVランプ（Harland Medical UVM400, Eden Prairie, MN）下で5分間照射した。ナノ繊維は、顕微鏡下で評価した。PEG-PIPAAmは、開始剤として過硫酸アンモニウム（Sigma）および触媒としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（Aldrich）を用いる、水中でのN-イソプロピルアクリルアミド（Aldrich）とポリ（エチレングリコール）メチルエーテルメタクリレート（Mw2000, Aldrich）とのフリーラジカル共重合により、合成した。

【0154】

【表2】

表2

ポリマー	溶媒	ポリマー濃度	印加電圧	供給速度 ml/分	針・コレクター 間距離
PS	THF/DMF	14%	20kv	.02	12cm
PCL	THF/DMF	14%	20kv	.02	12cm
PIPAAm	IPA/DMF	25%	16kv	0.1	6cm
PEG-PIPAAm	水	5%	16 kv	0.2	6cm

（実施例4）

PIPAAm被覆ナノ繊維の表面特性決定およびスクリーニング

被覆ナノ繊維メッシュが完成した際、それらの表面トポグラフィー、タンパク質吸着および接触角を調べた。最初に、それらのスクリーニングを、顕微鏡検査による均一性（孔径の変化、および明白な剥離または非被覆区域を捜す）および接触角について自社内で行った。バルクPIPAAm、被覆および非被覆ナノ繊維メッシュ、ならびに疎水性ポリスチレンコアの間で比較すれば、表面変化の証拠が得られよう。被覆ナノ繊維の顕微鏡検査では、非被覆ナノ繊維と比較して、明白な剥離も形態の変化も何ら示されなかった。

【0155】

最初のスクリーニングに合格した被膜は、タンパク質吸着について評価した。37℃のPIPAAm表面は、相転移のために25℃の場合よりかなり多量のタンパク質を吸着するはずである。被覆および非被覆TCPSCoverglasを、37℃および4℃の1×PBS緩衝液中で2時間インキュベートし、次いで素早く取り出し、37℃および4℃の1mg/mlのBSA溶液中に6時間入れた。この期間は、タンパク質の吸着が起こるのに十

分なはずである。B S A インキュベーションの後、小片を $1 \times \text{PBS}$ で 3 回濯ぎ洗い、H R P 標識抗 B S A 抗体 (S i g m a) 中で 3 0 分間入れた後、標準的な濯ぎ洗いおよび H R P 比色アッセイを行った。3 7 °C および 2 5 °C でインキュベートした被覆片間のタンパク質吸着の差が、標準偏差の 1 倍を超え、非被覆片の対応値と有意に異なれば、小片は、熱応答性ポリマーで被覆されていると見なした。

【0156】

代替として、細胞接着タンパク質のフィブロネクチン (F N) も吸着させた。ウシ血漿 F N (B i o m e d i c a l T e c h n o l o g y I n c, M A) は、3 7 °C および 2 5 °C の P B S 溶液中で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の F N を 6 時間インキュベーションすることにより、ナノ繊維表面上に吸着させた。次いで、その被覆片を P B S で 5 回勢いよく洗浄した。それを、P B S 中の 0. 1 % ウシ血清アルブミン (B S A) で 1 時間ブロッキングし、2. 0 m g / m l のウサギポリクローナル抗ウシ F N 抗体 (B i o g e n e s i s, I n c, U K) と、希釈率 1 : 2 0 0 (最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 2 時間、それぞれ 3 7 °C および 2 5 °C で反応させた。0. 1 % B S A を含有する P B S で 5 回洗浄した後、それを、抗ウサギ I g G - H R P 抗体 (C h e m i c a l I n t e r n a t i o n a l, C A) と、希釈率 1 : 1 0 0 0 (最終濃度 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$) で更に 1 時間インキュベートし、H R P 基質と 1 0 分間インキュベートした。発色を 1. 0 N H_2SO_4 で停止し、吸光度の測定を分光計 (S p e c t r a m a x M 2) により 4 5 0 n m で行った。

【0157】

タンパク質吸着の 1 0 倍の差が、それぞれ 3 7 °C および 2 5 °C でインキュベートした P I P A A m 被覆表面において認められた。3 7 °C および 2 5 °C でタンパク質吸着の差を示した表面は、様々な細胞系を播種することにより、細胞の接着および脱着プロファイルについて更に評価した。

【0158】

(実施例 5)

ウシおよびヒトの培養細胞

ウシ大動脈内皮細胞 (B A E C) および T 4 7 - D 細胞を、 75 cm^2 のフラスコで D M E M - F 1 2 + 1 0 % F B S 中で予備培養した。細胞をトリプシン処理し、P I P A A m 被覆ナノ繊維および T C P S の表面上に播種した。市販の P I P A A m 被覆 T C P S 表面 (C e l l S e e d I n c) 上にも、細胞を播種した。両細胞系は、P I P A A m 被覆 6 ウェル皿中に 100000 細胞 / ウェルの密度で播種した。裸 T C P S および C e l l S e e d の表面を対照表面として用い、類似数の細胞をそれらの上に播種した。細胞は、5 % CO_2 の加湿雰囲気中、3 7 °C で 4 8 時間の期間培養した。両細胞系は、被覆表面に良好に付着し、その被膜が、細胞を付着させるのに十分に薄いことを示している。4 8 時間後、細胞を室温に移した。P I P A A m 被覆ナノ繊維、T C P S および C e l l s e e d の表面上に播種した B A E C 細胞は、約 1 5 ~ 2 0 分で持ち上がり始めた。およそ、約 3 5 分後に、完全な細胞シートが持ち上がった (図 4)。T 4 7 - D 細胞では、結果がより劇的であった。室温での 2 5 分間のインキュベーション後、細胞は、P I P A A m / T r i L i t e 被覆ナノ繊維および T C P S の表面からシートとして剥がれ始めたが、C e l l S e e d 表面上に播種した細胞は、室温での 1 2 0 分間のインキュベーション後でも、持ち上がることができなかった。C e l l S e e d 表面上では、細胞の脱着が起こらないが、P I P A A m / T r i L i t e 被覆表面からは、細胞の 5 0 ~ 7 0 % が、約半分の時間で持ち上がることが認められた (図 5)。

【0159】

(実施例 6)

培養したヒト上皮細胞

ナノ繊維表面上で増殖する細胞は、よりインビボ類似の形態を形成することが示された。こうした表面は、上皮細胞が形態形成を受けることも可能にする。本発明者らは、スマートポリマー表面上の本被膜が、マトリックスのナノ繊維的性質を妨害せず、細胞が、単なる温度低下で脱着する上に、依然として形態形成を受ける、またはよりインビボ類似の

構造を形成することを示した。

【0160】

形態形成試験のために、T47-D乳房上皮細胞を、PIPAAm/Triliteで被覆したナノ繊維および平坦表面上で培養した。対照は、裸のナノ繊維およびTCPSであった。細胞は、37℃で5%CO₂、95%空気の雰囲気中で、DMEM+10%ウシ胎児血清(FBS)の中で培養した。この特定の細胞系は、コラーゲンまたはマトリゲルとの三次元相互作用を促進する条件下で、管状および球状構造を取ることを示したので選択した。10日間の培養後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、Phalloidin Alexa Fluor 594 (1:500、Molecular Probes, OR)と室温で30分間インキュベートした。細胞を、PBSで3回濯ぎ洗い、倒立蛍光顕微鏡(Zeiss Axiovert 200M)下で観察した。ファロイジンは、フィラメント状アクチン(Fアクチン)に結合し、細胞の細胞骨格構成を可視化する。5日間の培養後、球状体および管状細胞の混合集団が、ナノ繊維上に観察された。8日目までに、多細胞球状体が支配的になっていたが、一部の管状体もなお存在していた。対照的に、平坦表面上でT47-D細胞を増殖させると、一群のストレスファイバーがある単層が示された。本発明者らは、ナノ繊維表面上の熱応答性ポリマーによる本被膜は、ナノ繊維の位相に影響せず、したがってT47-D細胞の形態形成、またはよりインビボ類似の細胞を、単なる温度低下でこうした表面上に得ることができることを示した。脱着細胞が、新たな表面上で素早く回復し、温度の低下後もその形態をなおも保持していることを示すために、第2組の細胞を、37℃で約5~10日間、集密するまで増殖させた。次いで、細胞を室温に約15~40分間移した。脱着した細胞シートを、10.0mlのピペットの補助で静かに取り出し、新たな組織培養表面へ移した。細胞を沈着させ、次いで、37℃で30分間インキュベーションしてから、4%パラホルムアルデヒドで固定した。再播種した細胞をファロイジンFアクチンで染色することにより、熱応答性ナノ繊維表面上で細胞を増殖させる利点は、平坦な熱応答性表面と異なり、よりインビボ類似の形態を実現し、保持できることであることを示した(D)。

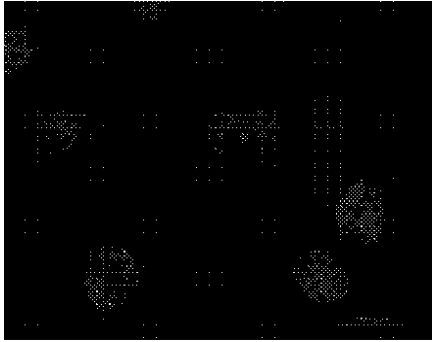
【0161】

図7Aは、PIPAAm/Trilite被覆ナノ繊維上で10日間の期間培養し、ファロイジンFアクチンで染色したT47-D細胞を示している。多細胞球状体の存在、および周辺でのアクチンフィラメントの組織化に注目されたい。図7Bの球状体の拡大図(400μm)は、球状体を通して延びる内腔を示す。PIPAAm/Trilite被覆TCPS上で10日間の期間培養したT47-D細胞も、固定し、ファロイジンFアクチンで染色した。図7Cの細胞では、伸展形態およびストレスファイバーの組織化に注目されたい。温度低下により持ち上がったT47-D細胞を、新たなナノ繊維上に再播種した。図7Dは、T47-D再播種細胞が、管状および球状形態、ならびに周辺でのアクチンの組織化(200μm)を維持していることを示す。

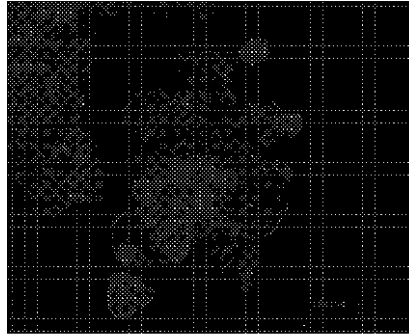
【0162】

再播種細胞シートに対して、ギャップ結合チャンネルの主成分と見なされているコネキシン43の発現も分析した。BAEC細胞を、50000細胞/22mmウェルの密度で播種した。細胞を集密するまで培養した後、その皿を20℃へ15分間移すことにより、細胞を持ち上げた。そのシートを、10mlのピペットの補助で新たなナノ繊維表面上へ移し、まくれ上がった縁部のカールを、シート上に培地1滴を添加することによりカールを除いた。次いで、シートを37℃の5%CO₂加湿インキュベーターへ移し、付着させた。30分後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗コネキシン43(Sigma)の1:1000希釈液で染色した。コネキシン43を染色した結果、シート全体に亘りコネキシン43が拡散して発現しており、無傷のギャップ結合が存在することを示唆した(図8)。

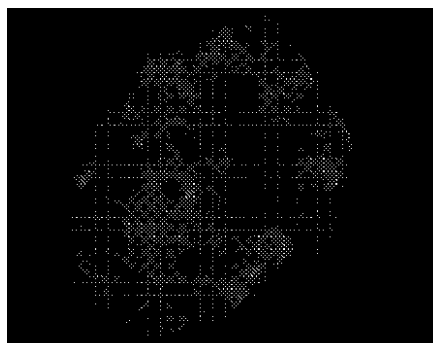
【図 7 A】

**Fig. 7A**

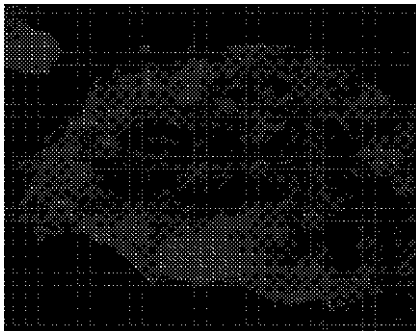
【図 7 B】

**Fig. 7B**

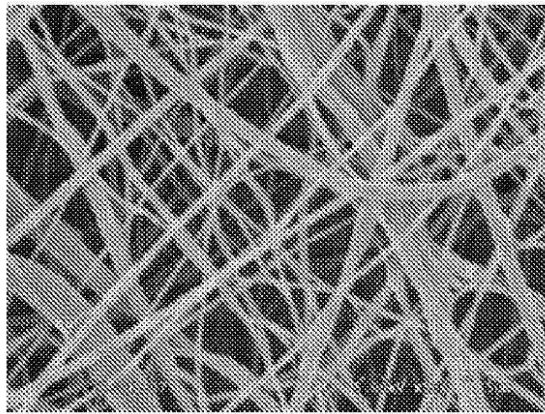
【図 7 C】

**Fig. 7C**

【図 7 D】

**Fig. 7D**

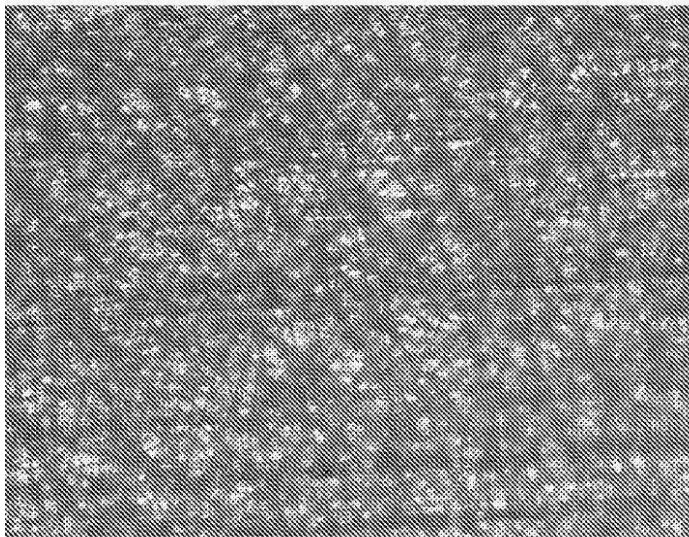
【図 1】



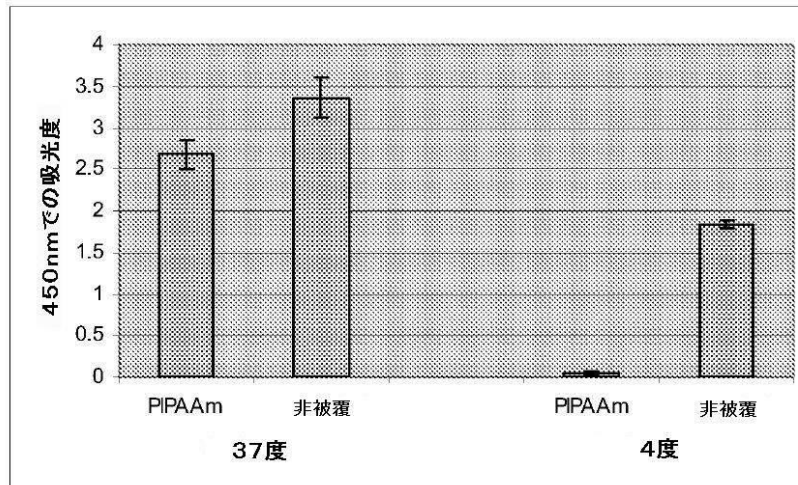
玉のない無欠陥ナノ繊維を示すPCLナノ繊維のSEM像

Fig. 1

【図 2】

PIPAAmナノ繊維の明視野像(スケールバー=200 μm)**Fig. 2**

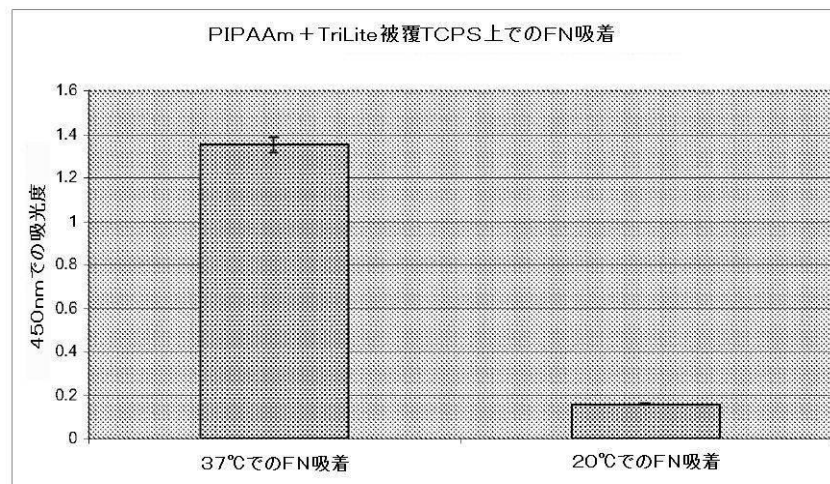
【図 3】



PIPAAm被覆ポリスチレンの異なる温度におけるタンパク質吸着プロファイル

Fig. 3

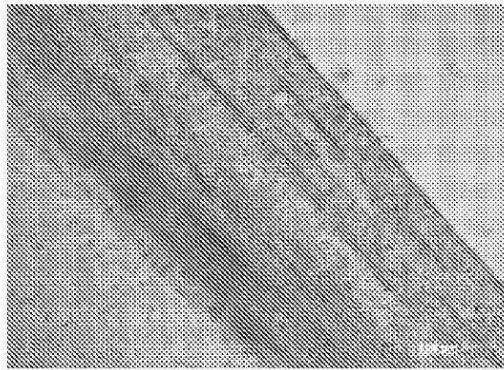
【図 4】



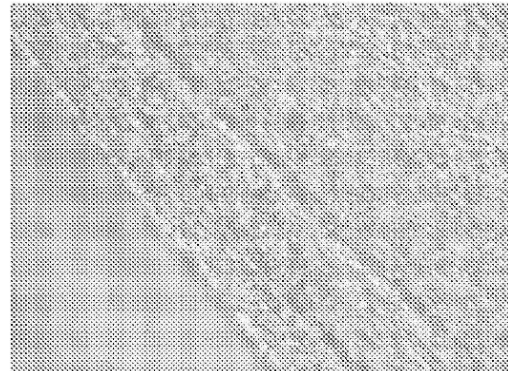
PIPAAm被覆ナノ繊維の各々37°Cおよび20°Cにおけるタンパク質吸着プロファイル

Fig. 4

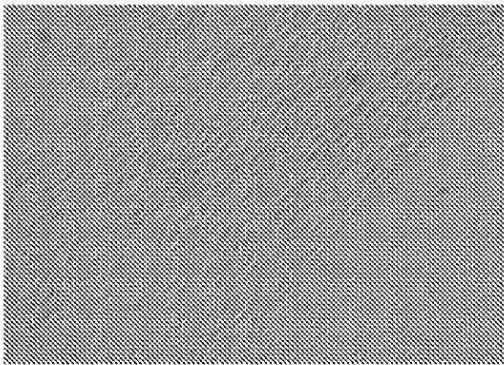
【図 5】



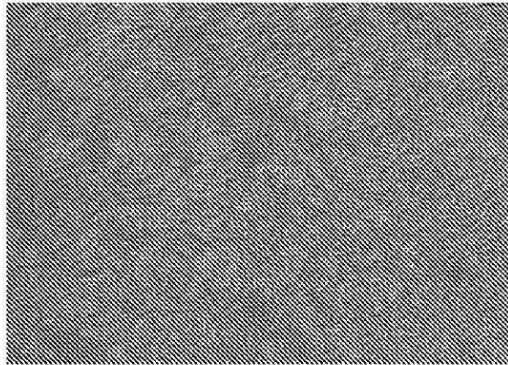
PIPAAm/TriLite被覆TCPS
細胞のリフトオフ時間=20分



Cell Seed Inc.
細胞のリフトオフ時間=20分



PIPAAm/TriLite被覆ナノ繊維
細胞のリフトオフ時間=20分

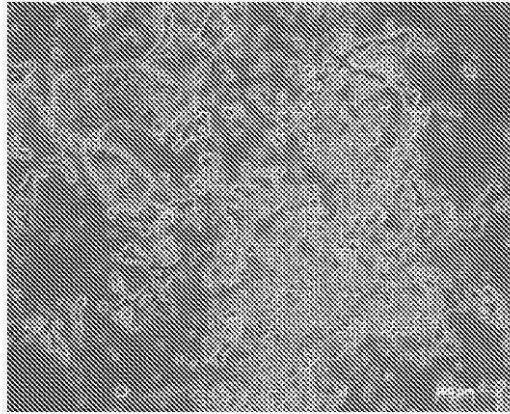


裸TCPS
脱着せず

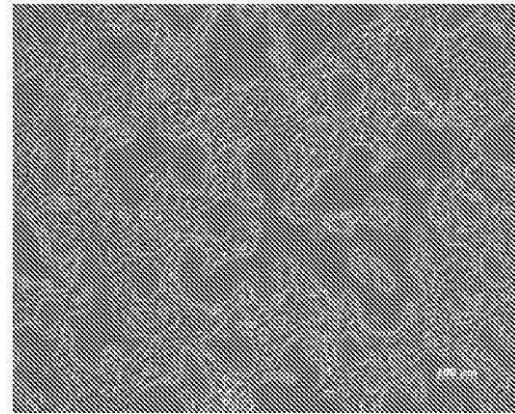
様々な表面上で培養したBAEC細胞のリフトオフ時間

Fig. 5

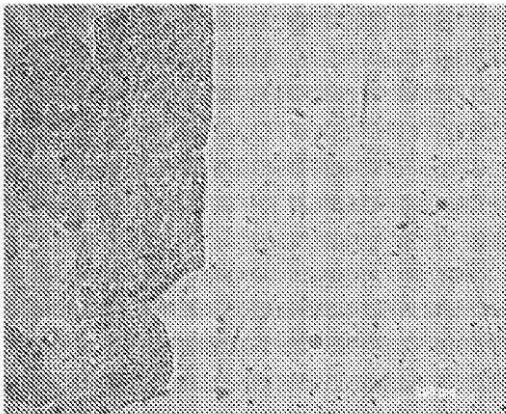
【図 6】



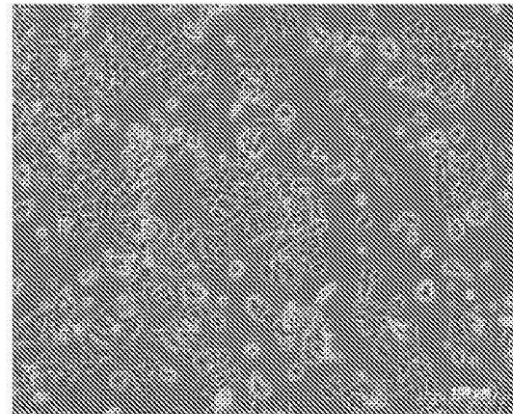
PIPAAm/TriLite被覆TCPS
細胞のリフトオフ時間=40分



Cell Seed Inc.
細胞のリフトオフ時間=120分+軽度の操作



PIPAAm/TriLite被覆ナノ繊維
細胞のリフトオフ時間=40分

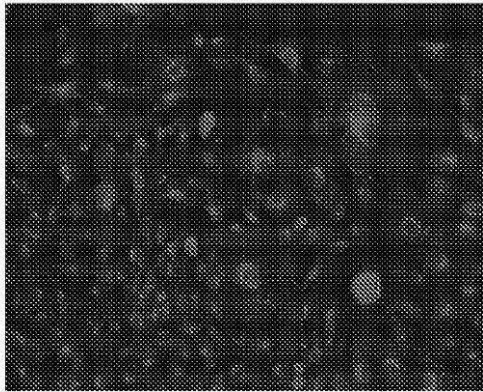


裸TCPS
脱着せず

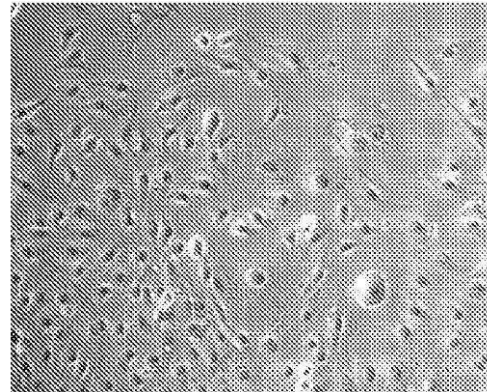
様々な表面上で培養したT47-D細胞のリフトオフ時間

Fig. 6

【図 8】



抗コネキシン43で染色した再播種BAEC細胞シート



再播種BAEC細胞シートの明視野像

熱応答性ナノ繊維表面からリフトオフし、新たな非被覆ナノ繊維上に再播種したBAEC細胞シート

Fig. 8

フロントページの続き

- (72)発明者 ナクビ, ターミナ
アメリカ合衆国 ミネソタ 55434, ブレイン, タイラー コート エヌイー 1086
8
- (72)発明者 ウェン, チー
アメリカ合衆国 ミネソタ 55347, エデン プレイリー, ベルベデール ドライブ 8
866
- (72)発明者 ギアー, パトリック
アメリカ合衆国 ミネソタ 55305, ホプキンス, ドリルレーン ロード ノース 71
1 1/2

審査官 斎藤 克也

- (56)参考文献 国際公開第2007/040118 (WO, A1)
特開平05-041976 (JP, A)
国際公開第01/68799 (WO, A1)
特表2009-502242 (JP, A)
国際公開第01/26702 (WO, A2)
国際公開第2004/044281 (WO, A2)
特表2007-510820 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12M 1/00 - 3/10