(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-548726
(P2022-548726A)
(43)公表日　令和4年11月21日(2022.11.21)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00		４Ｂ０２９
Ｃ１２Ｍ	*1/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/00	Ａ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｑ	*1/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/02		４Ｂ０６５
Ｃ０８Ｊ	*5/00 (2006.01)*	Ｃ０８Ｊ	5/00	ＣＦＨ	４Ｆ０７１

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全37頁）

(21)出願番号　特願2022-517758(P2022-517758)
(86)(22)出願日　令和2年9月24日(2020.9.24)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月18日(2022.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/076749
(87)国際公開番号　WO2021/058657
(87)国際公開日　令和3年4月1日(2021.4.1)
(31)優先権主張番号　19199362.5
(32)優先日　令和1年9月24日(2019.9.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　590000248
コーニンクレッカ フィリップス エヌヴェ
Ｋｏｎｉｎｋｌｉｊｋｅ Ｐｈｉｌｉｐｓ Ｎ．Ｖ．
オランダ国 ５６５６ アーヘー アインドーフェン ハイテック キャンパス ５２
Ｈｉｇｈ Ｔｅｃｈ Ｃａｍｐｕｓ ５２，５６５６ ＡＧ Ｅｉｎｄｈｏｖｅｎ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ
(74)代理人　110001690
特許業務法人Ｍ＆Ｓパートナーズ
(72)発明者　ベッカース ルカス ヨハネス アンナ マリア
オランダ国 ５６５６ アーエー アイン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞培養材料

(57)【要約】
細胞を培養するための材料が開示されている。この材料は、Ｓｈｏｒｅ００ ２０からＳｈｏｒｅＡ ８０の範囲のショア硬度（ＤＩＮ ＥＮ ＩＳＯ ８６８）を有するバルク改質エラストマを含むと共に、該エラストマバルクに共有結合された複数の脂肪酸部分を有する。前記部分のカルボン酸基は前記結合をもたらすために前記材料の外部表面上で利用可能である。該バルク改質エラストマは、ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体、該ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量の０．５～５重量%の範囲の遊離若しくは鹸化不飽和脂肪酸、及び架橋触媒を含む組成物を、極性内面を有するモールド内で形成すると共に、前記ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマを、前記遊離若しくは鹸化不飽和脂肪酸を前記モールド内でエラストマバルクに、前記エラストマのビニル基若しくは水素化物基と前記不飽和脂肪酸の不飽和炭素－炭素結合との間の架橋反応により共有結合させることによりバルク改質して前記材料を得ることにより得られる。流体

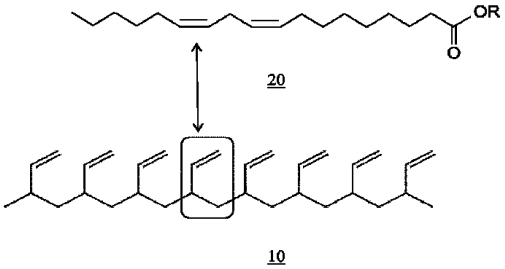


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞を培養するための外部表面を有する材料を含む細胞培養基体であって、前記材料は、エラストマバルクと各々が遊離及び／又は共役塩基形態の１以上の酸性基を含む複数の残基とを有するバルク改質エラストマを含み、前記複数の残基が前記エラストマバルクに前記１以上の酸性基の一部が前記外部表面上で利用可能となるように共有結合される、細胞培養基体。
【請求項２】
前記１以上の酸性基が、燐ベースの酸性基、硫黄ベースの酸性基及びカルボン酸基、又はこれらの２以上の混合物からなる群から選択される、請求項１に記載の細胞培養基体。
【請求項３】
前記残基は３以上で５０未満の炭素原子を含む脂肪族部分を含むか又は該脂肪族部分からなり、前記１以上の酸性基は前記脂肪族部分に共有結合され、該脂肪族部分が前記エラストマバルクに共有結合される、請求項１又は請求項２に記載の細胞培養基体。
【請求項４】
前記残基が不飽和脂肪酸残基である、請求項１から３の何れか一項に記載の細胞培養基体。
【請求項５】
前記不飽和脂肪酸残基が、ミリストレイン酸、パルミトール酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコスパエンタン酸、エルシン酸及びドコサヘキサエン酸からなる群から選択される脂肪酸の１以上の残基である、請求項４に記載の細胞培養基体。
【請求項６】
前記エラストマバルクがシリコーン又はポリブタジエン主鎖を有する、請求項１から５の何れか一項に記載の細胞培養基体。
【請求項７】
前記残基が前記エラストマバルクに、前記残基の前駆体の不飽和炭素－炭素結合と前記エラストマバルクのビニル又は水素化物官能基との間の反応の結果として共有結合される、請求項６に記載の細胞培養基体。
【請求項８】
前記バルク改質エラストマ又は対応する前駆体における残基濃度が、該エラストマを形成するための前駆体の混合物内の残基に関し、好ましくは、前記エラストマの全重量の２．１０$^{-4}$～２．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇ（重量モル濃度）の範囲内である、請求項１から７の何れか一項に記載の細胞培養基体。
【請求項９】
前記バルク改質エラストマは、ビニル官能化及び／又は水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体と、前記バルク改質エラストマの全重量の２．１０$^{-4}$～２．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇ（重量モル濃度）の範囲の濃度で定義される残基前駆体とを混合すると共に該混合物を加熱することにより得られ得るか又は得られ、好ましくは、前記エラストマがシリコーンベースのエラストマである場合、前記範囲は２．１０$^{-4}$～１．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇとする、請求項１から８の何れか一項に記載の細胞培養基体。
【請求項１０】
前記加熱が、金属金属酸化物内面を有する反応容器内で実行される、請求項９に記載の細胞培養基体。
【請求項１１】
前記基体が、前記材料を有する膜上に延びる流路を含んだ流体デバイスモジュールを有する、請求項１から１０の何れか一項に記載の細胞培養基体。
【請求項１２】
第１流路を規定する第１凹状構造を有する第１主面、及び該第１主面の反対側であって第２流路を規定する第２凹状構造を有する第２主面を有し、前記膜が前記第１流路を前記

第２流路から分離する、請求項１１に記載の細胞培養基体。
【請求項１３】
前記流体デバイスがモノリシック流体デバイスである、請求項１１又は請求項１２に記載の細胞培養基体。
【請求項１４】
細胞を培養するための外部表面を有する材料の使用方法であって、前記材料はエラストマバルク並びに各々が遊離及び／又は共役塩基形態の１以上の酸性基を含む複数の残基を有するバルク改質エラストマを含み、前記複数の残基は前記エラストマバルクに前記１以上の酸性基の一部が前記外部表面上で利用可能となるように共有結合され、当該使用方法が前記外部表面を培養されるべき細胞及び細胞成長媒質に接触されるステップを有する、使用方法。
【請求項１５】
細胞を培養する方法であって、前記方法は、
請求項１から１３の何れか一項に記載の細胞培養基体であって、オプションとしてモールド形成された基体である細胞培養基体を使用するステップ、及び
前記基体の露出された表面上で細胞を培養するステップ
を有する、細胞を培養する方法。
【請求項１６】
前記細胞培養基体が、請求項１１から１３の何れか一項に記載の細胞培養基体である、請求項１５に記載の細胞を培養する方法。
【請求項１７】
請求項１５に記載の細胞を培養する方法を有する薬品検査方法であって、
前記培養された細胞を、前記流体デバイスの一対の流路の他方を介して、検査されるべき薬品に曝露するステップ、及び
前記検査されるべき薬品に対する前記培養された細胞の反応を監視するステップ
を更に有する、薬品検査方法。
【請求項１８】
細胞培養基体を製造する方法であって、
モールド内で、ビニル官能化及び／又は水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体と、バルク改質エラストマの全重量の２．１０$^{-4}$～２．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇ（重量モル濃度）の範囲の濃度で定義される残基前駆体とを混合すると共に、該混合物を加熱するステップであって、好ましくは、前記エラストマがシリコーンベースのエラストマである場合、前記範囲が２．１０$^{-4}$～１．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇであるステップ、
を有する、細胞培養基体を製造する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞を培養するためのエラストマ材料を含む細胞培養基体に関する。
【０００２】
本発明は、更に、そのような細胞培養基体を有する流体デバイス及び流体デバイスモジュールに関する。
【０００３】
本発明は、更に、細胞を培養する方法に関する。
【０００４】
本発明は、更に、そのようなエラストマ材料を有する流体デバイスモジュールを用いた薬品検査方法に関する。
【０００５】
本発明は、細胞培養のためのエラストマ材料の使用に関する。
【０００６】

本発明は、細胞培養基体の製造に関する。

【背景技術】

【０００７】

哺乳類の細胞又は組織の試験管内（ｉｎｖｉｔｒｏ）試験は、調査中の該哺乳類材料の臨床的に重要な情報を取得するための重要な技術である。例えば、生検される哺乳類細胞又は組織材料には、そのような哺乳類材料における異常又は疾患を決定するために、又は罹患した哺乳類材料を薬品（例えば、実験的薬品）に曝露し、そのような曝露に対する該罹患した哺乳類材料の反応を監視するために、斯様な試験が施され得る。このようなアプローチは、例えば、腫瘍学的手順で頻繁に使用される。このアプローチは、薬品毒性等の多くの理由で望ましくない可能性のある一連の潜在的に有効な薬品に対して個人を暴露させることなく、個人の疾患をどの様に効果的に治療できかに関する重要な洞察を提供できる。更に、確立された満足のいく薬品治療が未だ利用できない既存の疾病に対する実験薬の有効性を、この方法で試験することができる。このような試験管内試験を展開する他の多くの理由も存在する。

【０００８】

このような試験管内試験への一般的なアプローチは、哺乳類材料を流体デバイスに固定することであり、該デバイスは、時には、生体機能チップ（Ｏｒｇａｎ－ｏｎ－ｃｈｉｐ）と呼ばれる。このようなアプローチにおいて、哺乳類材料は、通常、流体デバイスの２つの流路を分離する膜上に固定化され、第１の流路は当該哺乳類材料を供給するために使用され、第２の流路は該哺乳類材料を薬品治療等の関心のある化合物又は組成物に曝露する（例えば先に説明したように、当該薬品の有効性及び／又は毒性をテストするために）ために使用される。流体デバイス、又は少なくともその膜は、例えば関心のある化学化合物又は組成物への暴露に対する哺乳類材料の反応を評価するため等の評価目的のために該哺乳類材料を含む膜のスライスを得るために該流体デバイスをさいの目切り又はスライスできるように、エラストマから形成され得る。

【０００９】

このような試験管内試験での課題は、哺乳類材料、例えば細胞又は組織が当該流体デバイスの膜上で安定化されて正常に発育し、試験手順の期間にわたり生存することを保証することである。このことは、実験がかなり長くなり得る腫瘍学手順において特に困難である。この目的のために、哺乳類材料はフィブロネクチン等の生体適合性材料を使用して安定化することができ、これは、当該哺乳類細胞を該細胞に自然組織のものを模した化学的環境を提供することにより増殖し続けることを保証する。

【００１０】

一般的なアプローチは、ウェルセルプレートを、カルボン酸基を有するポリマでコーティングすることである。このような基はフィブロネクチンに（共有的に）結合でき、これにより、フィブロネクチンは当該ポリマを生物結合性にするので、流体デバイス内の膜上での哺乳類細胞の安定化を容易にするからである。しかしながら、このアプローチには欠点がある。第１に、流体デバイスを経る流体の流れは前述したポリマを部分的に除去する可能性があり、このことは、当該哺乳類材料の少なくとも一部が失われ得るという事実により該材料を所望の時点で評価する能力を損なわせる。他のアプローチでは、当該膜がＵＶ又はプラズマで処理されて、膜上にフィブロネクチンの結合部位を生成する。しかしながら、このアプローチは、そのような結合部位の不均一な分布を回避することがかなり困難であり、このことが試験結果の評価を妨げるという欠点を有する。

【００１１】

第２に、そのような生体適合性コーティングを含む膜は製造することが著しく困難であり、このことは、このような流体デバイスの製造をかなり高価及び面倒にさせる。例えば、このような膜は、通常、高価な薄膜技術を使用して製造されることを要すると共に、当該流体デバイス内に漏れることなく統合されることを要し、このことは容易ではない。更に、膜自体が生体適合性材料から形成されていない場合、該膜には、通常、細胞増殖を促進するために小さなピッチで複数の細胞サイズの孔を設ける必要があり、このことも達成

するのが困難である。
【００１２】
薄膜技術に基づくそのような人間の生体機能チップの微細加工の一例は、ＤｏｎｇｅｕｎＨｕｈらにより、Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ、Ｖｏｌ．８、Ｎｏ．１１、２０１３、２１３５～２１５７ページに開示されている。このプロトコルにおいては、マイクロエンジニアリングを使用して、薄い多孔質可撓膜で分離された２つの平行なエラストママイクロチャネル及び２つの全高ではあるが真空のチェンバを両側に含む多層マイクロ流体デバイスを作製するが、このデバイスは作製するのに約３日半が掛かる。全微細加工手順は１００以上のステップを含み、これらのうちの相当の数が重要なステップである。このことは、このような製造手順の複雑さを示している。
【００１３】
このような骨の折れるアプローチに対する改善が文献ＷＯ２０１８／０２１９６０Ａ１に開示されており、該文献は、例えば、コラーゲンのコーティングを使用して生体適合性にすることができるシリコンベースの（ＰＤＭＳ）流体デバイスを開示している。このようなデバイスは、数製造ステップのみで製造できるが、生体適合性材料によるコーティングを必要とし、該コーティングは、前述したように、流体の流れに曝されるとポリマ表面から浸食され、当該流体デバイス表面からの細胞材料の不所望な損失につながるという不利益を被る。このことは、文献ＷＯ２０１８／０２１９０６Ａ１においては、デバイスの表面をプラズマ処理し、次いで、機能化される表面をコラーゲンでコーティングする前に該表面を３－アミノプロピルトリエトキシシラン及びグルタルアルデヒドで機能化すると共に該流体デバイスのマイクロチャネルをＥＧＭ－２（Ｌｏｎｚａ社により販売されている内皮細胞増殖培地－２　ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ）でフラッシュすることによって非結合コラーゲンを除去することにより対処されている。したがって、生体適合性流体デバイスを提供するには、依然として相当の数の処理ステップが必要である。
【００１４】
この問題に対する解決策は、出願人により文献ＷＯ２０１９／０１５９８８Ａ１で開示されている。この出願においては、細胞培養タンパク質に結合するための材料が開示されている。この材料は、エラストマバルクに共有結合された複数の脂肪酸部分を有するバルク改質エラストマを含み、前記部分のカルボン酸基は、物体の形状であると共に前記脂肪酸部分の親水性カルボン酸基が極性内面に引き付けられるような極性内面を有するモールド内で前記エラストマを脂肪酸部分でバルク改質することにより、該バルク改質エラストマから形成された前記物体の表面上で前記結合をもたらすために利用可能である。この先行出願においては、フィブロネクチン等の生体適合性材料が、前記バルク改質エラストマの表面カルボン酸基に、その細胞培養特性を保持しながら共有結合され得ることが示されている。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１５】
細胞培養基体及びその製造の更なる改善に対する要望が存在する。
【課題を解決するための手段】
【００１６】
この必要性は、細胞培養タンパク質で表面を共有結合的に改質することを要さずに細胞を培養するためのエラストマ材料を利用又は提供する独立請求項によって定義された幾つかの態様を提供しようとする本発明により少なくとも部分的に満たされる。
【００１７】
一態様によれば、細胞を培養するための外部表面を備えた材料を有する細胞培養基体が提供され、前記材料はエラストマバルク及び各々が遊離及び／又は共役塩基形態の１以上の酸性基を含む複数の残基を有するバルク改質エラストマを含み、前記複数の残基は前記エラストマバルクに、前記１以上の酸性基の一部が前記外部表面上で利用可能となるように共有結合される。

【００１８】
細胞を培養するように適合された基体又は細胞培養基体（基質）という用語は、細胞培養での使用を目的とした如何なるデバイス又は表面も含むことを意味する。このように定義された基体は、細胞培養の分野における本明細書で定義されたエラストマ材料の使用を具現化することが意図されている。細胞培養とは、例えば、細胞を生かし続ける、細胞の数を増やす、及び／又は細胞を分化させることを含めようとするものである。残基は、前記酸性基を何れかの形態で保有すると共に、前駆体を前記エラストマバルクに共有結合させる反応に関与できるエチレン結合を有する前駆体分子の一部である。残基は、そのような反応の後に残存する前記前駆体の一部である。

【００１９】
このような表面が細胞の存在下で細胞培養培地と直接接触させられる場合、このような細胞は如何なる更なる表面処理なしでも培養され得ることが分かった。したがって、材料表面を細胞培養タンパク質で共有結合的に改質するステップを省略して、使用を容易にすることができる。理論に拘束されることは望まないが、表面で利用可能な前記酸性基は、この細胞培養機能のために重要な役割を果たしていると考えられる。結局のところ、参照としてのバルク改質されていないエラストマは、このような細胞培養特性は示さなかった。前記酸性基は、解離可能な陽子を帯びることを意味する遊離形態、又は陽子以外の正の対イオンを伴う共役塩基形態の何れかで表面に存在し得ることも分かった。理論に束縛されることは望まないが、典型的には約７．２のｐＨで緩衝される当該細胞培養培地において、典型的に５．５未満のｐＫａ値を有する斯様な酸性基は、それらの表面で利用できる元の形態に関係なく、大部分が解離された形態で存在すると考えられる。

【００２０】
前記酸性基は、好ましくは、これら基の殆どが解離形態となるように、５未満のｐＫａを有する。他の方法において、ｐＫａは４．５未満又は４未満ですらある。ｐＫａは５から１、５から２又は５から３の範囲であり得る。

【００２１】
重要なことに、任意の特定の形状を備える細胞培養基体を、バルク改質エラストマを形成するための適切な前駆体を混合すると共に、このような前駆体を射出成形装置のもののような反応容器内で反応させて、細胞培養基体の表面を更なる適応化なしに細胞培養のために使用できるように形成、成形及び準備することにより、１つのステップで効果的に準備することができる。このことは、このような一連のデバイスの複製を一層簡単に、かつ、より一定したものにもさせ得る。

【００２２】
幾つかの実施形態において、前記１以上の酸性基は、燐ベースの（燐系）酸性基、硫黄ベースの酸性基及びカルボン酸基、又はこれらのうちの２つ以上の混合物である。燐酸基及びそれらの共役塩基はスルホン酸基よりも好ましく、カルボン酸基は燐酸基よりも好ましい。このような基を保有する残基は、前記バルク改質の間に使用するのが一層容易である。このような改質方法の間においては、金属対イオンとの共役塩基形態の酸性基を有するそれらの前駆体及びそのような残基は、他の成分とより良く混合してエラストマを形成するからである。酸性基は、必要なｐＫａ（本明細書で先に指定したような）に従って選択できる。

【００２３】
幾つかの好ましい実施形態において、前記残基は３以上で５０未満の炭素原子を含む脂肪族部分を有し又は該部分からなり、前記１以上の酸性基は該脂肪族部分に共有結合され、該脂肪族部分は前記エラストマバルクに共有結合される。前記脂肪族部分は線状又は分枝状であり得る。該部分は、１以上の炭素－炭素二重又は三重結合、又はアリール若しくはベンゼン単位を有することができる。該脂肪族部分は、シクロヘキシル、シクロペンチル又は他のもの等の環状単位を含むことができる。該脂肪族部分は、好ましくは飽和炭化水素部分とする。該脂肪族部分は、好ましくは、炭素及び水素原子のみを有するものとする。

【００２４】
幾つかの実施形態において、前記脂肪族部分は末端で前記エラストマバルクに結合された線状鎖である。幾つかの実施形態において、該脂肪族部分は、更に、残基の柔軟性を高めるために炭素－炭素三重結合を有さない。
【００２５】
幾つかの実施形態において、バルク改質エラストマ内の前記残基は互いに異なり得、各々は本明細書で定義されるよう選択される。幾つかの実施形態において、前記残基の少なくとも一部は、２つの共有結合を介して前記エラストマバルクに結合され得る。これは、例えば、当該改質反応に関与させるための２つのエチレン結合を有する残基前駆体から生じ得る。
【００２６】
幾つかの実施形態において、当該部分は少なくとも５個の炭素原子、より好ましくは少なくとも１０個の炭素原子を有する。好ましくは、該脂肪族部分は、４０未満又は３０未満の炭素原子を有する。線形部分が好ましいが、このこと自体は必要とされない。このような部分の炭素原子の数は、好ましくは５から３０の間、より好ましくは５から２０の間又は５から１５の間である。該部分及び／又は鎖は１以上のアリール基を有し得る。前記酸性基の１以上は、ベンゼン環等のアリール基に直接結合され得る。
【００２７】
幾つかの実施形態において、前記残基は、それらのエチレン基（炭素－炭素二重結合）の１以上（存在する場合）の反応を介して前記エラストマバルクに共有結合された不飽和脂肪酸前駆体の残留物である。
【００２８】
例えば、前記不飽和脂肪酸残基は、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコスパエンタエン酸、エルカ酸及びドコサヘキサエン酸からなる群から選択される脂肪酸の１以上の残基である。
【００２９】
幾つかの実施形態において、前記残基は、１以上の酸性基及び少なくとも１つのエチレン基（炭素－炭素二重結合）を保有する線状又は分岐状アルキル鎖を有する前駆体の残部である。好ましくは、少なくとも１つの斯様なエチレン基は末端鎖エチレン基である。末端エチレン基は、当該製造プロセスにおけるエラストマバルクの形成の間において、非末端エチレン基と比較して反応性を高めることができる。１つの末端エチレン基及び１つの酸性基（例えば、カルボキシル基等）を持つ線状鎖が、好ましい例である。このような場合、当該鎖には５～１５個の炭素原子が存在し得る。
【００３０】
幾つかの実施形態において、前記エラストマバルクはシリコーン又はポリジエン主鎖を含む。ポリブタジエン及びポリイソルペンがポリジエンの例である。ポリジメチルシロキサンはポリシオキサン（シリコーン）の一例である。シリコーンは、より高い透水性を有すると共に、より透明であり、細胞培養の光学的検査を容易にする。
【００３１】
幾つかの実施形態において、前記残基は、該残基の前駆体の不飽和炭素－炭素結合と前記エラストマバルクのビニル又は水素化物官能基との間の反応の結果として、該エラストマバルクに共有結合される。ポリジエンにおいて斯様な反応はビニル基に対するものである一方、シリコーンにおいて斯様な結合は、通常、シリルヒジルド官能基とのものである。
【００３２】
幾つかの実施形態において、前記バルク改質エラストマ又は対応する前駆体における残基濃度は、該エラストマを形成するための前駆体の混合物における残基に関し、好ましくは、該エラストマの全重量の２．１０$^{-4}$～１．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇ（重量モル濃度）の範囲内である。より低い濃度は再現不可能な細胞培養特性を引き起こす一方、より高い

濃度は、前駆体の不完全な混合及び／又は前駆体間の不完全な反応がバルク改質材料の製造の間に起こり、再現不可能な又は悪化された培養特性を生じるという点で生成するのが困難であることが分かった。

【００３３】

幾つかの実施形態において、前記バルク改質エラストマは、ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体と、該バルク改質エラストマの全重量の２．１０$^{-4}$～１．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇの範囲内の濃度の残基前駆体とを混合すると共に該混合物を加熱することにより得ることができるか又は得られる。幾つかの実施形態において、上記加熱は、金属金属酸化物の内側表面を有する反応容器内で実行される。これは、前記酸性基（共役塩基形態）が反応容器内にある間に少なくとも部分的に上記酸化物表面と結合し、当該改質バルクを形成するために重合反応の間に上記酸性基の少なくとも一部が当該材料の表面で利用可能になるようにさせると考えられる。

【００３４】

他の態様においては、請求項に記載されるような細胞培養基体が提供され、該基体は、前記材料を有した膜上に延びる流路（フローチャネル）を含む流体デバイスモジュールを有する。

【００３５】

幾つかの実施形態において、該細胞培養基体は、第１の流路を画定する第１の凹状構造を備える第１主面、及び該第１の主面とは反対側で、第２の流路を画定する第２の凹状構造を備える第２の主面を有し、前記膜が第１の流路を第２の流路から分離する。

【００３６】

前記流体デバイスの幾つかの実施形態において、該流体デバイスの細胞培養基体はモノリシック流体デバイスである。

【００３７】

本発明の一態様によれば、細胞を培養するための外部表面を有する材料の使用が提供され、前記材料はエラストマバルク並びに各々が遊離及び／又は共役塩基形態の１以上の酸性基を含む複数の残基を有するバルク改質エラストマを含み、該複数の残基は前記エラストマバルクに前記１以上の酸性基の一部が前記外部表面上で利用可能となるように共有結合され、当該使用は、前記外部表面を培養されるべき細胞及び細胞増殖培地と接触させることを含む。この使用法を具現化する前記細胞培養基体について説明したように、このような使用法は、大きな利点を提供するが、知られていないか又は自明ではなかった。

【００３８】

更に他の態様によれば、

－　上記段落の何れかに記載された細胞培養基体であって、オプションとしてモールド形成された基体である細胞培養基体を使用するステップ；及び

－　当該物品の前記露出表面上で細胞を培養するステップ；

を有する細胞を培養する方法が提供される。

【００３９】

当該方法の幾つかの実施形態において、前記細胞培養基体は本明細書で定義されるものである。

【００４０】

幾つかの実施形態において、当該細胞培養方法は薬品検査方法の一部であり、後者は、更に、

－　培養される細胞を、前記流体デバイスの一対の流路のうちの他方を介して、検査されるべき薬品に曝露するステップ；及び

－　前記試験（検査）されるべき薬品に対する前記培養される細胞の反応を監視するステップ；

を有する。

【００４１】

改質のために特に有用な濃度範囲は後述される。

［他の限定するものでない実施形態］

【００４２】

幾つかの実施形態において、前記バルク改質エラストマは、ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体、該ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量の０．５～５重量％の範囲の遊離若しくは鹸化不飽和脂肪酸、及び架橋触媒を含む組成物を、極性内面を有するモールド内で形成し；並びに前記ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマを、前記遊離又は鹸化不飽和脂肪酸を前記型内でエラストマバルクに該エラストマのビニル基若しくは水素化物基と前記不飽和脂肪酸の不飽和炭素－炭素結合との間の架橋反応によって共有結合させることによりバルク改質して前記材料を得ることにより得られる。

【００４３】

幾つかの実施形態においては、細胞を培養するための材料の使用が提供され、該材料はＳｈｏｒｅ００２０からＳｈｏｒｅＡ８０の範囲のショア硬度（ＤＩＮ　ＥＮ　ＩＳＯ　８６８）を有するバルク改質エラストマを含むと共に、該エラストマバルクに共有結合された複数の脂肪酸部分を有し、該部分のカルボン酸基は前記結合をもたらすために前記材料の外部表面上で利用可能であり、前記バルク改質エラストマは、ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体、該ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量の０．５～５重量％の範囲の遊離若しくは鹸化不飽和脂肪酸、及び架橋触媒を含む組成物を、極性内面を有するモールド内で形成し；並びに前記ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマを、前記遊離又は鹸化不飽和脂肪酸を前記型内でエラストマバルクに該エラストマのビニル基若しくは水素化物基と前記不飽和脂肪酸の不飽和炭素－炭素結合との間の架橋反応によって共有結合させることによりバルク改質して前記材料を得ることにより得られる。

【００４４】

驚くべきことに、相対的に柔らかいエラストマ、すなわち、ＤＩＮ　ＥＮ　ＩＳＯ８６８で指定された測定方法を使用して決定されたＳｈｏｒｅ００２０からＳｈｏｒｅＡ　８０（又はＳｈｏｒｅ　Ａ　２－８０）の範囲のショア硬度を有するエラストマは、文献ＷＯ　２０１９／０１５９８８　Ａ１に以前に開示されたように不飽和脂肪酸でバルク改質された場合、該不飽和脂肪酸の量が当該エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量に基づいて０．５～５重量％（ｗｔ％）の範囲内であると、細胞材料をフィブロネクチン等の細胞外マトリックスを必要とせずに直接培養できる生体適合性材料として機能し得ることが分かった。理論に縛られることは望まないが、不飽和脂肪酸の濃度が０．５重量％未満である場合、鹸化された不飽和脂肪酸の場合のカルボン酸基又はカルボン酸塩（カルボキシレート）基の密度は、細胞が増殖すべき当該エラストマの外部表面を適切な増殖条件を達成するように十分に親水性にするには低過ぎる一方、この濃度が５ｗｔ％を超えると、幾らかの未反応の不飽和脂肪酸が当該バルク改質エラストマから浸出し、その外部表面に付着した細胞を害し得ると考えられる。したがって、この範囲内でエラストマ（又はその１以上の前駆体）と遊離又は鹸化形態の不飽和脂肪酸との間の架橋反応の全変換が予測されるとして、バルク改質エラストマは該エラストマの全重量に基づいて０．５～５ｗｔ％の範囲内の遊離又は鹸化脂肪酸基の共有結合画分を有すると予測される。

【００４５】

当該バルク改質エラストマは、該エラストマが細胞増殖を促進するために十分に柔軟であることを保証するために、Ｓｈｏｒｅ００　２０～ＳｈｏｒｅＡ　８０の範囲内の硬度を持つように選択される。例えば、幹細胞から成長される組織、例えば（心臓）筋肉、肺、腸及び血管組織等、は動くことを欲するという事実により、細胞担体材料の柔らかさは幹細胞の成長（及び分化）にとり必須であること自体は良く知られているからである。例えば心筋のような一部の臓器は、可動担体内で成長されることを要する。したがって、当該バルク改質エラストマ材料が８０を超えるショアＡ硬度を有する場合、該材料は、その機能化表面上での直の所望の細胞増殖を促進するためには不十分に伸縮可能的になり、その場合、発生中の細胞培養物に望ましい柔軟性を付与するために足場（スキャホールド）

又は細胞外マトリックス材料の使用が必要となる。

【００４６】

更に、当該エラストマのバルク改質に使用される不飽和脂肪酸は、例えばナトリウム塩等のように遊離又は鹸化形態で使用できる。鹸化された形態の不飽和脂肪酸の使用は、不飽和脂肪酸陽子による触媒被毒のリスクが回避されるという利点を有する一方、驚くべきことに、細胞培養はNa^+又はK^+等の適切な対イオンを持つカルボキシレート基を保有するバルク改質エラストマの外部表面上にも増殖することが分かった。したがって、このことは、前記鹸化が細胞培養の目的で当該バルク改質エラストマを使用する前に逆転されることは要しないという更なる利点を有する。

【００４７】

したがって、このようにして、細胞培養用の材料は、前記エラストマ及び脂肪酸をコーティング（スピンコーティング、ディップコーティング、スプレーコーティング、ディスペンシング）又は射出成形プロセスにおいて組み合わせることにより少数のステップで、幾つかの実施形態では単一のステップで製造することができ、その場合において、前記エラストマの脂肪酸炭素－炭素二重結合との架橋は、スピンコーティング又は射出成形プロセスにおける周囲酸素に対する限られた曝露により、該脂肪酸炭素－炭素二重結合の著しいエポキシ化無しで達成できる。結果として、前記エラストマが脂肪酸部分でバルク改質され、該（鹸化された）脂肪酸のカルボン酸又はカルボキシレート基が採取された細胞に直接結合するように利用可能となる材料が提供される。更に、硬化プロセス及び／又は当該材料が形成される前記モールドの特性を制御することにより、このようなカルボン酸又はカルボキシレート基も該材料の外部表面上に存在し、これによってカルボン酸又はカルボキシレート基の斯様な外部表面上での実質的に均一な分布をもたらし、このことは、当該材料を流体デバイスの膜材料としての使用に特に適したものにさせる。該材料の各断面は、前述したように生体適合性材料のためのアンカーが移植されるか又はそれ以外で形成されることを要する膜材料とは対照的に、同じ表面特性を示すからである。更に、通常、このような架橋反応では前記エラストマ炭素－炭素二重結合の一部しか消費されないため、本発明の材料は前記エラストマのエラストマ的特性を保持し、このことは、流体デバイスでの使用に対する本発明の材料の好適性を増加させると共に、調査目的での本発明の材料のスライシング又はそれ以外での切断を容易にする。

【００４８】

好ましくは、前記遊離又は鹸化脂肪酸部分の各々は前記エラストマバルクに該エラストマのビニル官能基又は水素化物官能基と不飽和脂肪酸の不飽和炭素－炭素結合との間の架橋反応を介して共有結合され、生体適合性材料への結合のために利用可能なカルボン酸又はカルボキシレート基の数が最適化され得ることを保証する。

【００４９】

前記不飽和脂肪酸は、任意の適切な不飽和脂肪酸であり得る。例示的実施形態において、該不飽和脂肪酸は、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコスペンテエン酸、エルカ酸、ウンドデカン酸及びドコサヘキサエン酸から選択される。リノール酸が特に言及される。

【００５０】

同様に、前記エラストマは任意の適切なエラストマであり得る。例示的実施形態において、該エラストマはポリブタジエン主鎖又はシリコーン主鎖を有する。当該エラストマがシリコーン主鎖を含む場合、該シリコーン主鎖内のカルボン酸基の少なくとも一部は鹸化され得る。不飽和脂肪酸分子とエラストマ分子との間の架橋に先行する該カルボン酸基の鹸化が、架橋触媒が不飽和脂肪酸分子のカルボン酸基の陽子によって不活性化されるのを防止するために必要とされ得るからである。同様に、前記ポリブタジエンは鹸化不飽和脂肪酸で架橋され得る。当該バルク改質材料の細胞培養特性は、先に説明したように、不飽和脂肪酸の鹸化によっては有意に影響されないからである。

【００５１】

一連の実施形態において、前記組成物は、ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量の０．５～２重量％の範囲内の遊離又は鹸化不飽和脂肪酸を含む。特に良好な細胞増殖は前記エラストマのバルクに組み込まれる遊離又は鹸化された不飽和脂肪酸の量が該範囲内にある場合に達成されることが分かっているからである。例えば、優れた細胞増殖は、前記組成物がビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量の約１重量％の遊離又は鹸化不飽和脂肪酸を有する場合に、当該バルク改質エラストマの外部表面上で直に達成される。

【００５２】

更に他の態様によれば、膜上に延びる流路（フローチャンネル）を含む流体デバイスモジュールが提供され、該膜は本明細書に記載の実施形態の何れかによる本発明の材料を有する。このような流体デバイスモジュールは、第１の流路を画定する第１の凹状構造を備えた第１の主面；及び該第１の主面とは反対側で、第２の流路を画定する第２の凹状構造を備える第２の主面を有し得、前記膜が第１の流路を第２の流路から分離する。好ましい実施形態において、該流体デバイスモジュールはモノリシック流体デバイスモジュールであり、この構成は、当該デバイスモジュールを少数の処理ステップで、例えば射出成形による単一の処理ステップで製造できるという利点を有する。

【００５３】

前記膜は、該膜を介して延びる複数の孔又は溝を有し得る。このような孔又は溝は、好ましくは、細胞が該膜を通過するのを防止するために細胞サイズの寸法を有する。

【００５４】

一実施形態において、前記第１の流路及び第２の流路は各々の隔壁（隔膜）を介してアクセス可能であり、別々の流路に相互汚染のリスクなしで個別にアクセスできるようにする。

【００５５】

更に他の態様によれば、本明細書に記載の実施形態の何れかの流体デバイスモジュールと、該流体デバイスモジュールを流体的に密閉するための一対のカバープレートとを有する流体デバイスが提供される。当該カバープレートは、これらカバープレートの一方が前記第１の主面を覆い、これにより前記第１の流路を密閉し、これらカバープレートの他方が第２の主面を覆い、これにより前記第２の流路を密閉するように配置できる。このような流体デバイスは、前記流体デバイスモジュールが前述したように少ない数の処理ステップで形成できるので簡単な方法で製造することができると共に、該流体デバイスモジュールの柔軟な性質により漏れに対してロバストである。

【００５６】

更に他の態様によれば、細胞を培養する方法が提供され、該方法は、本明細書に記載の実施形態の何れかのバルク改質エラストマ材料から形成されたモールド成形物品を準備するステップであって、前記該物品が自身の露出面の１つとして前記材料の外部表面を有するステップと；前記細胞を前記露出表面上で直接培養するステップと；を有する。この方法によれば、細胞は、このような物品の前記露出表面上で、フィブロネクチン等の細胞外マトリックスを該物品の露出表面に付着させることを要せずに直接増殖でき、これにより、細胞培養プロセスを大幅に簡素化する。

【００５７】

更に他の態様によれば、薬品検査方法が提供され、該薬品検査方法は、一実施形態による流体デバイスモジュールを準備するステップと；採取された細胞を前記流体デバイスモジュールの前記膜の表面に供給（塗布）するステップと；前記採取された細胞を前記表面上で培養するステップと；前記準備された流体デバイスモジュールで流体デバイスを形成するステップと；前記培養された細胞を該流体デバイスの前記一対の流路の一方を介して供給するステップと；前記培養された細胞を、前記流体デバイスの前記一対の流路の他方を介して、検査されるべき薬品に曝露するステップと；前記検査されるべき薬品に対する前記培養された細胞の反応を監視するステップと；を有する。このような薬品検査方法は

、特に、このような薬品検査方法で使用されるべき前記流体デバイスの準備の点で、簡単かつ容易な方法で実施することができ、これにより、このような流体デバイスを準備するのが、通常、非常に面倒である既存の薬品検査方法の大幅な簡素化をもたらす。

【００５８】

前記検査されるべき薬品に対する前記培養された細胞の反応を監視するステップは、前記培養された細胞を前記流体デバイス内で固定化及び固定するステップ、並びに前記流体デバイスモジュールをスライスして顕微鏡評価のためのスライスを得るステップを有することができ、前記スライスは前記固定化及び固定された培養された細胞の少なくとも一部を有する。本発明の教示によれば、顕微鏡評価のための斯様なスライスの生成は、培養された細胞が前述したような前記エラストマの遊離又は鹸化された不飽和脂肪酸によるバルク改質により前記流体デバイスモジュールの膜表面にわたって均一に分布されるという事実により、もはや厳しくはなくなり、又は変動する結果の影響を受けることもない。

【００５９】

他の例として、好ましい実施形態において、前記培養された細胞の反応の監視は、共焦点顕微鏡を使用して、組み立てられた流体デバイス内で実行することもできる。これにより、このような反応のリアルタイム監視が容易になる。

【図面の簡単な説明】

【００６０】

【図１】図１は、一実施形態による不飽和脂肪酸によるエラストマのバルク改質を示す。

【図２】図２は、一実施形態による流体デバイスモジュールの斜視図を示す。

【図３】図３は、一実施形態による流体デバイスモジュールの他の斜視図を示す。

【図４】図４は、他の実施形態による流体デバイスモジュールの斜視図を示す。

【図５】図５は、一実施形態による流体デバイスの分解斜視図を示す。

【図６】図６は、他の実施形態による流体デバイスの分解斜視図を示す。

【図７】図７は、更に他の実施形態による流体デバイスの分解斜視図を示す。

【図８】図８は、更に他の実施形態による流体デバイスの分解斜視図を示す。

【図９】図９は、一実施形態によるバルク改質エラストマ上で生育された細胞培養物の顕微鏡画像である。

【図１０】図１０は、そのようなバルク改質なしのエラストマ上で生育された細胞培養物の顕微鏡画像である。

【図１１】図１１は、１日間生育させた後の他の実施形態によるバルク改質エラストマ上の細胞培養物の顕微鏡画像である。

【図１２】図１２は、２日間生育させた後の他の実施形態によるバルク改質エラストマ上の細胞培養物の顕微鏡画像である。

【図１３】図１３は、７日間生育させた後の他の実施形態によるバルク改質エラストマ上の細胞培養物の顕微鏡画像である。

【図１４】図１４は、４日間生育させた後の他の実施形態によるバルク改質エラストマ上の細胞培養物の顕微鏡画像である。

【図１５】図１５は、４日間生育させた後の他の実施形態によるバルク改質エラストマ上の細胞培養物の顕微鏡画像である。

【図１６】図１６は、１重量％のリノール酸改質を有するシリコーンを備えた基体について測定された接触角を示すグラフであり、縦軸は度での接触角であり、各々が２つのバーの４つの組は４つのバッチの基体に関する平均接触角を表し、各組の左側のバーはｐＨ４での接触角を表し、各組の右側のバーはｐＨ１０での接触角を表し、最左端の組のバーは非改質シリコーンを表す一方、他のバーは細胞培養例１、２及び３で各々使用された改質基体を表す。

【発明を実施するための形態】

【００６１】

本発明の実施形態は、縮尺通りに描かれていない添付の概略図を参照して、非限定的例として詳細に説明される。

【００６２】
同一又は類似の部分を示すために、全図を通して同一の符号が使用されていると理解されたい。
【００６３】
図１は、本発明の幾つかの実施形態によるバルク改質エラストマ材料を生成するための、残基２０の前駆体のエチレン結合と、ポリマ主鎖１０のエチレン結合との間の反応を示す。この実施例において、反応は、脂肪酸前駆体残基であるリノレン酸と、ポリブタジエンの形態のビニル官能化エラストマ（以下、単にエラストマと呼ぶ）１０との間のものである。このような反応は、例えば過酸化物等の適切な触媒で触媒できる。この図では、ポリブタジエン１０が鹸化された形のリノール酸と反応することが示されており、Ｒは例えばリチウム、ナトリウム又はカリウムイオン等のアルカリ金属であるが、他のエチレン結合前駆体残基及び他のエチレン結合主鎖ポリマも斯様な反応タイプに使用できることは明らかであろう。
【００６４】
このような反応は、エラストマ１０との反応に関与した不飽和脂肪酸分子２０の少なくとも一部のカルボン酸基が当該バルク改質エラストマの外部表面上にもたらされ、これらのカルボン酸基が該バルク改質エラストマ１０の外部表面上で直接細胞培養を安定化させるために利用可能となるようなバルク改質エラストマをもたらし得ることが分かった。したがって、細胞安定化を促進するためにタンパク質を斯様なカルボン酸基に結合させるステップは最早必要とされず、このことは、相当の時間及び労力を節約し、当該材料を含む細胞培養基体を定義するための新たな機会を切り開く。例えば、当該エラストマの形成及び該エラストマの成形は、今や、適切な反応容器を使用して１つのステップで実施できる。好ましい例において、このような反応容器は例えば射出成形装置のモールド（鋳型）である。図１の例は、このようなプロセスで使用できる１つのタイプのエチレン結合化学に過ぎないことに注意されたい。以下に記載されるように、触媒の存在下でのエチレン結合に対する水素化シリルの添加に基づく反応も、以下に更に詳細に説明されるように使用できる。
【００６５】
好ましくは、エラストマ１０は、細胞誘導性運動を容易にするために柔軟又は可撓性とする。このような理由により、エラストマ１０は、通常、ＤＩＮ　ＥＮ　ＩＳＯ　８６８規格に従って決定された、ショア００　２０（すなわち、ショアＡ　２）からショアＡ８０、すなわち、２～８０のショアＡ硬度の範囲内のショア硬度を有し得る。好適なエラストマはポリブタジエン及びシリコーン等のポリエンを含む。
【００６６】
不飽和脂肪酸２０は、遊離不飽和脂肪酸とすることができ、その場合Ｒ＝Ｈであり、又は鹸化脂肪酸とすることができ、その場合、例えばＲ＝Ｎａ$^{+}$若しくはＫ$^{+}$（及びＣＯＯ基は、ＣＯＯ$^{-}$又はカルボキシレートアニオン基である）である。このような鹸化は、任意の適切な方法で、例えば濃縮されたＮａＯＨ又はＫＯＨ溶液を用いて達成できる。このような鹸化反応は、それ自体よく知られているので、簡略化のみのために、これ以上詳細には説明されない。
【００６７】
重要なことに、当該バルク改質エラストマにおける不飽和脂肪酸残基の鹸化は逆転されることを要しない。驚くべきことに、以下に更に詳細に説明されるように、バルク改質エラストマ１０の外部表面上での細胞増殖は、この表面が鹸化されたカルボン酸基、すなわち、Ｎａ＋又はＫ＋対イオン等の対イオンを有するカルボキシレート基で官能化される場合にも生じることが分かったからである。
【００６８】
バルク改質エラストマ１０の外部表面上のカルボン酸又はカルボキシレート基の存在は、エラストマ１０が、特にエラストマ１０が非極性溶媒に溶解される場合、非極性であり得るとすれば、驚くべきことと考えられ得る。このような非極性環境において、不飽和脂

肪酸分子２０はミセルを形成する傾向があり、その場合、これらの分子のカルボン酸部分は斯様なミセル内で内向きに回転され、このことは、このようなカルボン酸部分が改質されたエラストマのバルク内で終わることにつながる。更に、このような不飽和脂肪酸２０の炭素－炭素二重結合は酸素の存在下では急速にエポキシ化し易く、このことは、このような化合物のエラストマ１０との架橋反応に関与する能力を低下させること自体はよく知られている。

【００６９】

本発明の実施形態は、エラストマ１０及び鹸化された形態の不飽和脂肪酸２０を含む反応混合物が極性表面と接触させられる場合、このことが脂肪酸分子のカルボン酸基の斯様な極性表面に沿った配向を促進し、かくして、当該バルク改質エラストマ材料の外部表面は、これらカルボン酸基の高密度で均一な分布を示すようになるという洞察に基づいている。更に、エラストマ１０を射出成形プロセスにおいて斯様な方法により高い温度、例えば１２０～２４０℃の範囲の温度においてバルク改質する場合、不飽和脂肪酸分子２０の炭素－炭素二重結合のエポキシ化は、エラストマ１０のバルク改質を著しく妨害することはない、すなわち、不飽和脂肪酸分子２０とエラストマ１０との間の反応を大幅に阻害することはないことが分かった。理論に拘束されることを望まないが、このような射出成形プロセスにおいては、分子酸素は当該射出成形装置内の反応混合物にほとんど存在せず、これにより、これら炭素－炭素二重結合の望ましくないエポキシ化を抑制すると考えられる。

【００７０】

細胞を直接培養できるエラストマ１０を得るために、エラストマ１０は、該エラストマ１０の全重量又は該エラストマ１０の１以上の前駆体の全重量の２．１０$^{-4}$～１．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇ（モル重量濃度）の範囲内の遊離又は鹸化形態の一定量の不飽和脂肪酸２０でバルク改質される。より少ない量の遊離又は鹸化された形態の不飽和脂肪酸２０が使用された場合、細胞はバルク改質エラストマ１０上で実質的に増殖せず、これは、該細胞が播種されるバルク改質エラストマ１０の表面が本質的に過度に疎水性であるためであり得ることが分かった。一方、より大量の遊離又は鹸化された形態の不飽和脂肪酸２０が使用された場合、この場合も細胞はバルク改質エラストマ１０の表面上でほとんど増殖せず、及び／又は増殖結果は再現性がない程実験毎に相違し、これは、遊離又は鹸化形態の未反応の不飽和脂肪酸２０が当該バルク改質ポリマから浸出して当該細胞培養物を害することに起因し得る。更に、遊離又は鹸化形態の不飽和脂肪酸２０の量が前述した範囲内にある場合、未改質エラストマ１０の柔軟性又は硬度は、遊離又は鹸化された形態の不飽和脂肪酸２０によるバルク改質により著しく変化されることがないことが分かった。更に、当該エラストマの例えば可視光等の少なくとも光学的放射に対する透明性は、例えば、より高い濃度が使用された場合の不透明性による散乱の増加のために低くなる。このことは、当該細胞培養基体の細胞増殖又は培養の光学的検査のための使用を損なう可能性がある。

【００７１】

図１の例は、ポリジエンタイプのバルクエラストマについて説明されたが、他のエラストマも使用できる。好ましくは、そのようなエラストマも前記所望のショア硬度を有するものとする。

【００７２】

したがって、使用できるエラストマは、例えば、ホモポリマ、コポリマ、ブロックコポリマ、ターポリマ、ブロックターポリマ等である。特に好適なエラストマは、ポリブタジエン等のポリエン、又はイソプレン若しくはネオプレンから選択できる。ポリエンが使用される場合、これらは、任意の適切な重合プロセスを使用して形成でき、その後、図１を参照して記載されたような結合を実施できる。特に好ましいものは、Ｎｄ又はＬｉ触媒重合反応で形成されるポリブタジエンである。このようなポリブタジエンは、低い分岐度（典型的に５％未満）及び約２の低い多分散度（Ｍｗ／Ｍｎ）を有すること自体がよく知られているからである。Ｌｉ触媒によるポリブタジエンは、その高度の１，２－ビニル含有

量（約１１％）のため、特に好ましい。しかしながら、他のタイプのポリブタジエン、例えば、Ｃｏ、Ｎｉ又はＴｉ触媒重合反応から得られるポリブタジエンを代わりに使用することもできる。エラストマ１０としてポリブタジエン等のポリエンを使用する場合、エラストマ１０と不飽和脂肪酸２０との間の架橋反応は過酸化物触媒を使用して触媒することができる。他の有利な実施形態においては、５～１５％の範囲内の分岐度を有するＬｉ触媒ポリブタジェンが使用される。ポリブタジエンの分岐度がこの範囲内にある場合、ポリブタジエンの不飽和脂肪酸２０との反応性が改善されることが分かっているからである。完全を期すために、ポリブタジエンを合成する際に分岐の程度をどの様に制御するか自体は良く知られているので、このことは簡略化のためにこれ以上説明しないことに留意されたい。

【００７３】

所望のエラストマの他の部類はシリコーン（ポリシロキサン）である。これらは射出成形処理に適しているからである。このようなシリコーンは、例えば（ポリメチル）水素シロキサンとのＰｔ触媒付加反応を介しての架橋を促進するためにビニル部分を含むポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）主鎖を有し得る。（ポリメチル）水素シロキサンとの斯様な架橋の代わりに、又はそれに加えて、ビニル官能化ＰＤＭＳ主鎖を不飽和脂肪酸２０と反応させることもできる。

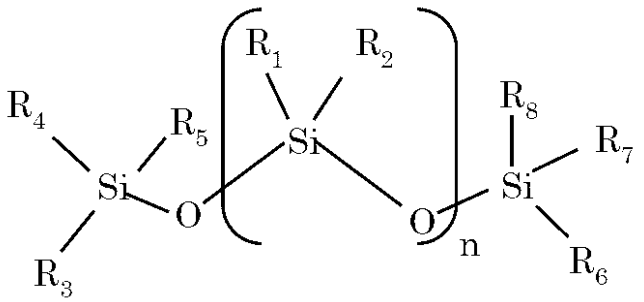
【００７４】

このようなシリコーンの形態のエラストマは、ビニル官能化された線状若しくは分枝状シリコーンモノマ又はオリゴマ、例えば、Ｔ分岐若しくはＱ分岐シリコーンモノマ又はオリゴマと、線状水素化物官能化シリコーンモノマ又はオリゴマとの間の、水素化物官能化線状若しくは分岐シリコーンモノマ又はオリゴマ、例えば、Ｔ分岐若しくはＱ分岐シリコーンモノマ又はオリゴマと、線状ビニル官能化シリコーンモノマ若しくはオリゴマ又はビニル官能化及び水素化物官能化線状若しくは分岐シリコーンモノマ又はオリゴマの混合物、例えば、Ｔ分岐若しくはＱ分岐シリコーンモノマ又はオリゴマ及び／又は線状水素化物官能化及びビニル官能化シリコーンモノマ若しくはオリゴマの混合物との間の架橋反応により形成され得る。

【００７５】

例えば、上記２成分シリコーンは線状成分１と線状成分２との間の架橋反応により形成でき、これらは、各々、以下の一般式に対応し得る：

【化１】



【００７６】

成分１において、Ｒ１及びＲ２はＣ１－Ｃ３アルキルから個別に選択され、Ｒ３～Ｒ８はＣ１－Ｃ３アルキル及びビニルから個別に選択され、ここで、Ｒ３～Ｒ５の少なくとも１つ及びＲ６～Ｒ８の少なくとも１つはビニルとする。好ましくは、Ｒ３～Ｒ８のうちの少なくとも３つはビニルである。全ての実施形態において、ｎは１００～２０００，０００の範囲内であり得る。成分１の特定の実施形態において、アルキル基である基Ｒ１～Ｒ８の各々は、メチル基である。すなわち、成分１は、末端ビニル基を有するビニル官能化ＰＤＭＳである。

【００７７】

成分２において、Ｒ１は水素、Ｒ２＝Ｃ１－Ｃ３アルキル、Ｒ２～Ｒ８はＣ１－Ｃ３ア

ルキル又は水素から個別に選択され、ここで、Ｒ３～Ｒ５のうちの最大で１つ及びＲ６～８のうちの最大で１つは水素であるとし、ｎはｎ＝３～１，０００、より具体的にはｎ＝３～１０等のように任意の適切な値をとることができる。成分２の特定の実施形態において、Ｒ３～Ｒ８基の何れも水素ではない。成分２の他の特定の実施形態において、Ｒ２～Ｒ８の各々はメチルである。

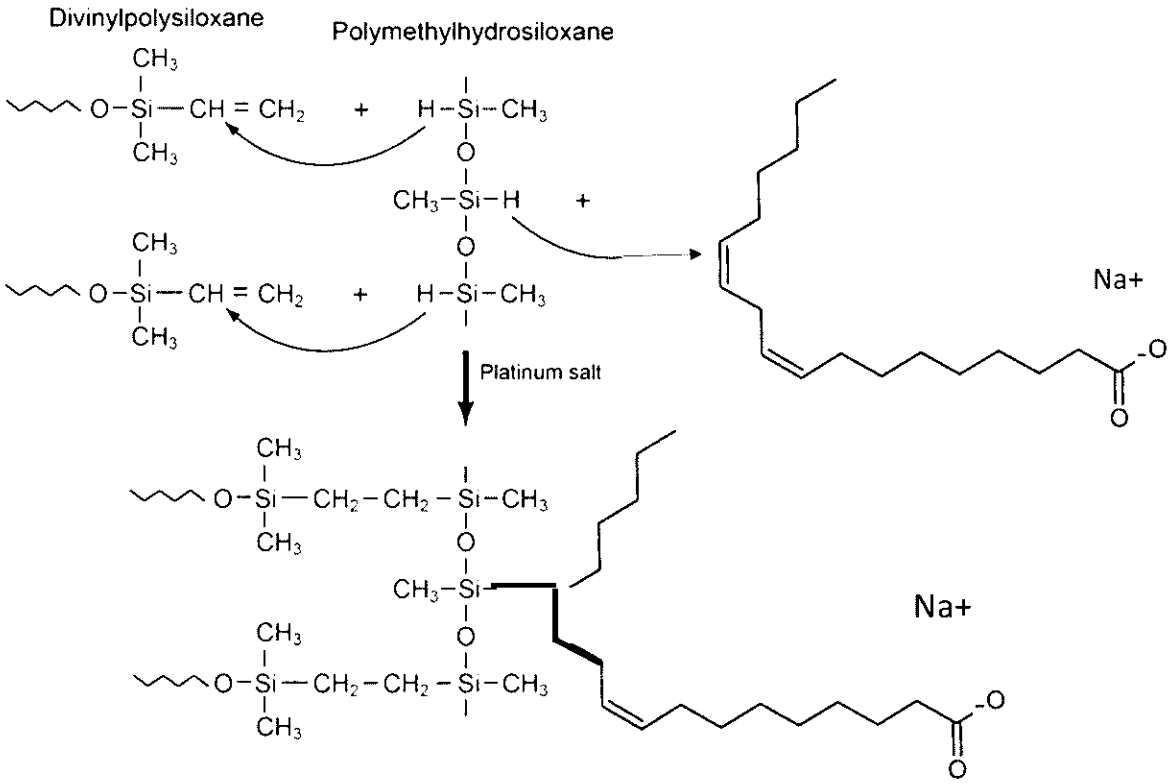
【００７８】

成分２は、典型的には、成分１の架橋剤として作用する。このような架橋反応は、通常、Ｐｔ触媒であり、それ自体はよく知られているので（例えば、ＷＯ２００９／１４７６０２　Ａ２参照）、簡略化のために、これ以上詳細には説明しない。

【００７９】

このようなシリコーンのバルクを改質することは、不飽和脂肪酸２０の存在下で当該エラストマを形成することにより実施でき、該シリコーンと不飽和脂肪酸２０との間の共有結合は、以下の反応メカニズムで示唆されるように、当該（架橋される）シリコーンの水素化物官能基と不飽和脂肪酸２０との間の反応により形成され得る：

【化２】



【００８０】

このような架橋反応の間における不飽和脂肪酸２０のカルボン酸基の陽子による触媒阻害を防止するために、該不飽和脂肪酸は、シリコーンエラストマとの架橋反応において鹸化された形態で、例えば、そのような不飽和脂肪酸のナトリウム塩として、使用され得る。一部の実施形態において、必要に応じて、当該反応生成物（バルク改質エラストマ）は、その後、プロトン酸、例えばＨＣｌ等で処理することができ、当該バルク改質エラストマの表面上のカルボン酸基を回復させるが、該バルク改質エラストマが自身の表面上で直接細胞を培養するために使用される場合、細胞は極性表面基がカルボキシレートアニオン、すなわち鹸化カルボン酸基である場合も増殖することが実証されていることを考えると、これは必要ではない。エチレン結合保有残留前駆体と反応するために存在する遊離シリルヒドリド基を有する如何なるシリコーンエラストマも、このようなエラストマのバルク改質に使用できる。

【００８１】
エラストマ形成は、当該改質反応を実行する前に開始されていることは要しないことに留意されたい。このことは、幾つかの実施形態では実施され得るが、好ましくは、当該形成は、適切な量のエラストマ形成成分及び改質前駆体残基を混合することによりエラストマ形成の間に少なくとも部分的に実行される。
【００８２】
他の例として、（ポリメチル）水素シロキサン主鎖等のシリコーン主鎖を、ポリブタジエン及びポリイソプレン等のゴム状ポリマと架橋でき、不飽和脂肪酸は、そのような架橋生成物に組み込まれる。これは、例えば、最終材料の透水性を調整するために実施できる。シリコーンは通常かなり開いた構造を有する一方、このようなゴム状ポリマはかなり閉じた構造を有し、かくして、架橋生成物の開放性、すなわち透水性は、該生成物中のシリコーンとゴム状ポリマとの比率により調整できるからである。このようにして、この実施形態による材料の特性は、良好なスキャホールドを構築するために細胞／タンパク質相互作用に関して最適化できる。例えば、当該エラストマがシリコーンベース、例えばＰＤＭＳベースである場合、水及び他の化合物（例えば、薬品）に対して高度に透過性であり、流体デバイスモジュール１００の前記膜上の細胞への、これらの化合物の最大の灌流を促進するような材料が得られる。しかしながら、細胞による薬品消費のリアルタイム監視が望ましい場合、水及び薬品に対して非透過性であるポリブタジエンベースの材料等のポリエンベースの材料が好ましいであろう。これらの化合物の細胞への灌流速度を、当該膜を経る開口の密度を用いて制御できるからである。
【００８３】
一実施形態において、前記ポリシロキサンは、該ポリシロキサンの早計な架橋を防止するために、前述したように多成分出発材料から形成できる。このような多成分出発材料は、それ自体よく知られており、例えば、このような多成分出発材料キットは、ドイツ国、ミュンヘンのＷａｃｋｅｒ　Ｃｈｅｍｉ　ＡＧにより商品名Ｅｌａｓｔｏｓｉｌとして販売されている。しかしながら、エラストマを形成すると共に、エチレン結合と反応され得る他のシリコーンも可能である。
【００８４】
リノール酸が、当該バルク改質エラストマが改質される酸性基保有残基のための前駆体として使用されてきた。これは限定するものでない例としてのみのものであり、本明細書で以下に説明するように、他の酸性基保有残基も使用できると理解されたい。リノール酸で得られた前述した利点は、特に明記しない限り、以下の他の残基及びそれらの前駆体でも達成されるであろう。
【００８５】
このように、例えば不飽和脂肪酸２０に関し、如何なる適切な不飽和脂肪酸もエラストマ１０と反応させる目的で使用することができる。例えば、不飽和脂肪酸２０は、ミリストレイン酸、パルミトール酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコスペエンタン酸、エルシン酸、ウンドデカン酸及びドコサヘキサエン酸から選択できる。
【００８６】
図１の例に関連して不飽和脂肪酸２０が参照される本出願の文脈において、より一般的に、このことは、１以上の酸性基を遊離又は共役塩基形態の何れかで含むと共に少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む如何なる有機化合物も指すことを意図していることが理解されるべきである。
【００８７】
一般的に、当該バルク改質エラストマにおける残基は、残基前駆体（該バルク改質エラストマの改質に使用された）の、当該エラストマバルク又はその前駆体との反応から生じる。このような意味で、脂肪酸は、そのような残留前駆体の１つのタイプに過ぎない。他のものも存在し、それらが少なくとも１つの炭素－炭素二重結合及び１以上の酸性基を有する限り使用でき、これらは、シリコーン化学との関連で使用される場合、共役塩基の形

態であることを要する。ポリジエン化学では、そのような共役塩基形態自体は必要とされない。

【００８８】

幾つかの好ましい実施形態において、当該残基前駆体は、３以上の炭素原子及び５０未満の炭素原子を含む脂肪族部分、並びに前記１以上の酸性基が該脂肪族部分に共有結合される場合は少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含むか、又はそれらからなる。上記脂肪族部分は、線状又は分枝状であり得る。該部分は、１以上（例えば、２、３又は４）の炭素－炭素二重結合若しくは三重結合（好ましくは二重結合のみ）又はアリール若しくはベンゼン単位を含むことができる。該脂肪族部分は、シクロヘキシル、シクロペンチル又は他のもの等の環状単位を含むことができる。該脂肪族部分は、好ましくは、炭素及び水素原子のみを含む。該脂肪族部分は飽和炭化水素部分であり得る。幾つかの実施形態において、該脂肪族部分は、更に、当該残基の柔軟性を高めるために炭素－炭素三重結合を含まない。

【００８９】

幾つかの実施形態において、前記脂肪族部分は少なくとも１つの末端炭素－炭素二重結合（$H_2C=CH-R$、Ｒは該脂肪族部分の残部である）を有し、好ましくは、該部分は、少なくとも１つの（例えば、１つのみの）酸性基が該部分の他方の末端に連結された完全に線形のものである。

【００９０】

幾つかの実施形態においては、その残基の少なくとも一部が相互に異なるバルク改質エラストマに到達するために、前駆体残基の混合物が使用され得る。当該前駆体残基の各々は、本明細書で定義されるように選択できる。幾つかの実施形態において、前記残基前駆体の脂肪族部分の少なくとも一部は少なくとも２つの炭素－炭素二重結合を有する。このようにして、当該バルク改質エラストマにおける残基は、２以上の結合で該エラストマバルクに共有結合され得る。結果として、該エラストマバルクのポリマ鎖は残基を介して架橋され得る。

【００９１】

幾つかの実施形態において、当該前駆体残基の前記部分は、少なくとも５個の炭素原子、より好ましくは少なくとも１０個の炭素原子を含む。好ましくは、該脂肪族部分は、４０未満又は３０未満の炭素原子を含む。このような部分の炭素原子の数は、好ましくは５から３０の間、より好ましくは５から２０の間又は５から１５の間である。該部分及び／又は鎖は、１以上のアリール基を有し得る。前記酸性基の１以上は、ベンゼン環等のアリール基に直接結合され得る。

【００９２】

幾つかの実施形態において、当該残基前駆体は、不飽和脂肪酸及び残基、それらのエチレン基の１以上（存在する場合）の反応を介してエラストマバルクに共有結合された斯様な不飽和脂肪酸前駆体の残部（炭素－炭素二重結合）である。

【００９３】

例えば、前記不飽和脂肪酸残基は、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコスペンタエン酸、エルカ酸及びドコサヘキサエン酸からなる群から選択される脂肪酸の１以上の残基である。

【００９４】

幾つかの実施形態において、前記残基は、１以上の酸性基及び少なくとも１つのエチレン基（炭素－炭素二重結合）を保有する線状又は分岐状アルキル鎖を有する前駆体の残部である。好ましくは、少なくとも１つの斯様なエチレン基は、末端鎖エチレン基である。末端エチレン基は、製造プロセスにおける当該エラストマバルクの形成の間において、非末端エチレン基と比較して向上された反応性をもたらし得る。１つの末端エチレン基及び例えばカルボキシル基等の１つの酸性基を持つ直鎖が、好ましい例である。このような場合において、当該鎖には５～１５個の炭素原子が存在し得る。

【００９５】
このように、当該残基は、１以上の酸性基が共有結合された少なくとも３つの炭素原子を含む脂肪族部分を有し得る。このような残基のための対応する前駆体は、その脂肪族部分に少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む。好ましくは、該脂肪族部分は、５個以上、７個以上、９個以上、１１個以上の炭素原子を含む。好ましくは、該脂肪族部分は、３０未満、２０未満又は１５未満の炭素原子を含む。当該残基又は前駆体の脂肪族部分は線状又は分枝状とすることができ、線状が好ましい。これは周期的な構造も有し得る。該脂肪族の尾部は、非芳香族環構造、例えば５員若しくは６員のシクロペンチル又はシクロヘキシル基で終端でき、これ自体は少なくとも１つの二重結合を含み得る。不飽和脂肪酸２０の上記定義内に含まれることを意図する有機化合物の非限定的な例はレチノイン酸である。

【００９６】
上記脂肪族部分は、１つ、２つ、３つ又は４つのエチレン結合を有し得る。好ましくは３未満である。より好ましくは１つのみである。少なくとも１つのエチレン結合は少なくとも２つの水素原子で置換される。より好ましくは、少なくとも１つのエチレン結合は３つの水素原子で置換される。このようなエチレン結合は、典型的に、本明細書に記載の反応において増加された反応性を示し、後者のものに対してより高い反応性を示す。

【００９７】
前記脂肪族部分により保有される酸性基は、好ましくは、当該脂肪族部分の飽和炭素原子に結合される。酸性基は、カルボン酸基及びそれらのカルボキシレート基（共役塩基基）、リン酸基等の燐含有酸性基並びに対応するリン酸塩及び水素リン酸塩、亜リン酸基及び対応する共役塩基、及び／又はスルホン酸基等の硫黄含有酸性基及び対応するスルホン酸塩であり得る。

【００９８】
リン酸基は、各リン原子が酸化状態＋５であり、４つの酸素原子に結合されたリンオキソ酸である。これらのＰＯ４単位（四面体）の２以上は共有の単結合酸素により接続され、酸素原子の少なくとも１つが当該残基の残部に結合された線状又は分岐状鎖を形成する。共有されない単結合酸素原子は、酸性水素原子で完成されるか、又は陽子を受け入れることができる。リン酸基の一般式は$H_{n+1-2x}P_nO_{3n+1-x}$であり、ここで、ｎはリン原子の数、ｘは分子構造における基本サイクル数（０～（ｎ＋２）／２）である。当該残基、例えばそのような残基の脂肪族部分への結合のために予約された１つの結合が存在する。好ましくは、当該酸性基は、オルトリン酸基又はポリリン酸基Ｒ－Ｏ（Ｏ＝ＰＯＨＯ）$_n$－Ｈを有し、ｎはオルトリン酸については１であり、ポリリン酸についてはｎ＞２であり、Ｒは当該基が結合される残基の残部を表す。例えば、リン酸基は当技術分野で良く知られており、これ以上詳細には説明されないであろう。更なる定義は、有機化学に関する多くの教科書に記載されている。

【００９９】
例えば、カルボキシレート、ホスフェート、水素ホスフェートスルホネート等の酸性基の共役塩基の何れかは、好ましくは、アルカリ金属（例えば、リチウム、ナトリウム及びカリウム）及びアルカリ土類（例えば、バリウム及びカルシウム）金属のもの等の金属対イオンと結合され又はこれらにより鹸化される。

【０１００】
本出願で明示的に言及された例示的な化合物に加えて、他の多くの化合物も当業者によれば明らかであろう。

【０１０１】
残基又はそのような残基の前駆体ごとに１つの酸性基が存在し得る。そのような場合、当該バルク改質エラストマにおける又はそのようなバルク改質エラストマを準備するために使用される前駆体の残基の重量モル濃度も、該バルク改質エラストマ内に存在する酸性基の重量モル濃度を反映する。酸性基の最終的重量モル濃度を当該残基の重量モル濃度から計算するために、後者は残基あたりの酸性基の数により乗算されることを要する。当該

バルク改質エラストマ内の斯様な基の重量モル濃度が１．１０$^{-2}$ｍｏｌ残基／ｋｇバルク改質エラストマより高いことが、前述したように、この範囲限界よりも高い残留量に関連する問題に実質的に邪魔されることなく必要とされる場合、残基ごとに２以上の酸性基を有することが有益であり得る。

【０１０２】

本明細書において先に開示したように、当該バルク改質エラストマ又は対応する前駆体における残基濃度は、該エラストマを形成するための前駆体の混合物中の残基に関し、好ましくは、当該エラストマの全重量又は該エラストマの１以上の前駆体の全重量の２．１０$^{-4}$から２．１０$^{-2}$モル／ｋｇ重量モル濃度の範囲内とする。シリコーンタイプのエラストマの場合、この残基濃度範囲は、好ましくは、２．１０$^{-4}$から１．１０$^{-2}$ｍｏｌ／ｋｇである。これにより、使用前に未反応の前駆体を除去するための当該基体の洗浄が大幅に回避される。低濃度の酸性基の場合、残基重量モル濃度の範囲は２．１０$^{-4}$～２．１０$^{-3}$ｍｏｌ／ｋｇとなり得る。酸性基の濃度が高い場合、該範囲は１．１０$^{-3}$から５．１０$^{-3}$になり得る。異なる細胞株の細胞増殖は、上記範囲内で異なる濃度を必要とし得る。

【０１０３】

本明細書に開示されるモル濃度は、一般に知られている計算を使用して残基又は残基の前駆体のモル重量を考慮するとき、重量パーセントに変換することができる。

【０１０４】

シリコーンベースのエラストマを形成するためにビニル結合化学上でシリルヒドリド添加を用いる場合、当該残留前駆体は、それらの共役塩基の形態の酸性基とともに使用されることに留意されたい。例えば、それらは鹸化される。これらは、そのままでアルカリ又はアルカリ土類金属の塩として添加される。これにより、前述した化学に関して使用されるＰｔ触媒の汚染が回避される。しかしながら、このことは、当該化学では酸非感受性触媒が使用されるため、ポリジエンタイプの改質には必要とされない。

【０１０５】

ポリブタジエン等のポリエンから当該バルク改質エラストマを生成するための例示的合成手順が以下に示される（合成例１）。

［合成例１］

【０１０６】

ドイツ国、ケルンのＬａｎｘｅｓｓ　ＡＧから入手されたポリブタジエンのチャンク（塊）がコンパウンダ（混合器）又は混合押出機に挿入される。該チャンクは触媒としてジクミルペルオキシド等の過酸化物を含む。該ポリブタジエンチャンクの１～５重量％の範囲の量のリノール酸（Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙから得られた６０～７４％濃縮されたもの）が、１１０～１５０℃の範囲の温度で練ることにより当該ポリブタジエンバルクに混合される。結果として押し出される混合物は、流体デバイスを規定すると共に、押し出された混合物に接触する酸化された内面を有するステンレス鋼モールド内に、３～１０分にわたり１５０～２００℃の範囲の温度で注入され、上記リノール酸で架橋されたポリブタジエンゴムのモノリシック流体デバイスモジュールを得る。

【０１０７】

シリコーンゴムから当該バルク改質エラストマを生成するための例示的合成手順が以下に示される（合成例２）。

［合成例２］

【０１０８】

溶液中のリノール酸ナトリウムの重量分率が３０重量％となるような、水及びイソプロピルアルコールの溶液（溶媒の重量比は１：１）中の４．８４８ｇのリノール酸ナトリウム溶液が、Ｗａｃｋｅｒ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＡＧからのＥｌａｓｔｏｓｉｌ　ＬＲ３０４０のシリコーン成分Ａ（２４０ｇ）に混合され、真空条件下において室温で激しく撹拌されて、当該組成物から水を蒸発させた。結果としての混合物は、Ｗａｃｋｅｒ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＡＧからのＥｌａｓｔｏｓｉｌ　ＬＲ３０４０の成分Ｂ（２４０ｇ）と混合されて（

Ｐｔ触媒を含む）、射出成形装置に供給され、該射出成形装置において、上記結果としての混合物は、該結果としての混合物に接触する酸化された内面を有すると共に流体デバイスモジュールを規定するステンレス鋼モールド内に注入され、１５０～２００°Ｃの範囲内の温度で１０～６０秒間モールド成形されて、リノール酸ナトリウムで架橋されたシリコーンゴムのモノリシック流体デバイスモジュールを得、その場合において、リノール酸ナトリウムは当該ポリママトリックス中に該ポリママトリックスの重量に対して１重量％の量で存在する（出発物質の重量に基づく）。オプションとして、上記のモールド成形された製品は、次いで、ＨＣｌ水溶液（ｐＨ２～４）中に浸されて、該モールド成形品の表面の少なくとも炭酸ナトリウム基を遊離カルボン酸基に変換できる。

［合成例３］

【０１０９】

例２と同じであるが、例３のリノール酸ナトリウムに関して同一のモル濃度に到達するために、適切な量のウンデカン酸ナトリウムを使用する。

【０１１０】

合成例１及び２におけるエラストマのバルク改質を更に示すために、リノール酸との反応後の各エラストマのブロックが、前述したような極性モールド内で成形され、次いで、ミクロトームを用いて－４０°Ｃでスライスされて、該改質エラストマの内部スライス、すなわち、その主面の何れも該モールド成形エラストマブロックの外部表面ではないスライスを得た。

【０１１１】

改質残基酸性基の一部が実際に当該モールド成形されたエラストマの表面で利用可能であることを示すために、これらの内部スライスは、次いで、異なるｐＨ（ｐＨ４、ｐＨ７及びｐＨ１０）の２μｌの水滴と３分間接触させられ、その後、これらの内部スライスとの該水滴の接触角が測定された。当該リノール酸改質エラストマの内部スライスの測定された接触角を、対応する非改質エラストマの内部スライスの測定された接触角と比較するために、同じ手順が非改質エラストマに対して繰り返された。例示として、シリコーンベースのエラストマに関する結果が図１６のグラフに示されている。

【０１１２】

これらのグラフから分かるように、非改質シリコーンの接触角は、前記液滴のｐＨに対しほとんど不感である。理論に拘束されることは望まないが、ｐＨの増加に伴う非官能化シリコーンに関して測定された接触角の小さな増加は、水分子と当該シリコーンにおけるシラノール部分との間の水素結合へのｐＨ依存性の結果である可能性がある。以下に記載される異なる細胞型培養に使用される改質シリコーンバッチの場合、ｐＨ＝４における接触角は、ｐＨ＝１０における接触角よりも大幅に低い。

【０１１３】

当該改質シリコーンに関して観察された挙動（図示せず）は、表面で利用可能なカルボン酸基の形態（遊離又は共役塩基）に関係なく同じある。

【０１１４】

更に、当該バルク改質は、基体のバッチを２つの半部に切断することにより準備された切断面において観察される同一の挙動から明らかである。

【０１１５】

このように、リノール酸で架橋されたポリブタジエンの内部スライス（切断後に得られた）及び外部表面は、両方とも、ｐＨの増加に伴い減少する接触角が測定されるという、測定された接触角の強いｐＨ依存性を示した。

【０１１６】

ここには示されていないが、改質されたポリブタジエンに関しても同様の接触角の挙動が観察されるが、改質されていないポリブタジエンの測定された接触角は殆どｐＨ非依存的である。

【０１１７】

当該官能化エラストマのバルク及び表面に関する測定された接触角の強いｐＨ依存性は

、該改質エラストマのバルク内及び表面におけるカルボン酸基の存在を明確に示している。これは以下のように理解できる。より低いｐＨにおいて、このようなカルボン酸基は大部分がプロトン化されたままであり、これにより、当該エラストマの内部スライスの表面電荷を最少にする。ｐＨが増加すると、この表面電荷はカルボン酸基の脱プロトン化が増加するため増加し、このことは、これら内部スライスの表面との前記水滴の接触角を減少させる。一方、非改質エラストマにおけるように、このようなカルボキシル基が水滴に曝される表面に存在しない場合、該水滴のｐＨの変化は表面電荷の変化を引き起こさず、その結果、このような表面との異なるｐＨの水滴の測定される接触角は、これらのｐＨ変化に対して遙かに不感的である。

【０１１８】

当該接触角弁別方法に使用されるべき液滴のｐＨは、基体に使用される酸性基のｐＫａ値に依存する。リノール酸基の場合、ｐＫａは約４．７であり、したがって、低ｐＨ液滴は４．７未満のｐＨを有すべきであり、高ｐＨ液滴は、当該液滴内で完全な解離を生じさせるために、ｐＫａより約２ｐＨ単位高いｐＨを有すべきである。当業者であれば、特定のｐＫａを有する特定の酸性基に対して正しい条件を選択できるであろう。

【０１１９】

表面酸性基（カルボン酸基）の利用可能性をチェックするための他の方法が実行された。この目的のために、全てのスラブ又はスライスは、酸性基の如何なるアクセス可能な共役塩基もその酸性形態に戻すために本明細書に記載されているようにＨＣＬで処理された。結果としての乾燥されたスラブは、蛍光標識カダベリンに、該カダベリンのNH_2基をＥＤＣ／ＮＨＳの良く知られた結合化学を用いて当該酸性基に反応させることにより結合された。改質エラストマと非改質エラストマとの処理の比較は、非常に均一な空間グレイスケールを持つ後者の増加された蛍光及び非改質エラストマの蛍光の不存在を明瞭に示す。このような染色試験は、カルボン酸基等の表面でアクセス可能な酸性基の存在を示すために使用できる。

【０１２０】

酸性基のバルク存在は、反射モードと透過モードとの両方でのＩＲ測定及び元素分析を用いて調査された。

【０１２１】

当該改質エラストマを形成するための重合反応の完了又は進行はＩＲ及びラマン分光法を使用して追跡され、これから変換速度及び状態が決定された。例えば、改質する残基の前駆体のエチレン結合の振動の吸収の減少を見ることによるものである。

【０１２２】

バルク改質エラストマは、細胞を直接培養することができる物品又は細胞培養基体を生成するために、任意の適切な形態にモールド成形できる。このような物品は、任意の適切な形状をとることができる。特定の実施形態において、このような射出成形プロセスで使用されるモールドは、モノリシック流体デバイスモジュールが単一ステップの射出成形プロセスで形成され得るように、流体デバイスモジュールの形態に成形され得る。このようなモノリシック流体デバイスモジュールの外部表面（又は複数の外部表面）上のカルボン酸基又はカルボキシレート基の高い密度及び均一な分布により、このようなデバイスモジュールは、細胞培養基体として簡単な方法で使用できる。前記モールドは、当該バルク改質エラストマの該エラストマの外部表面の少なくとも１つ上でカルボン酸又はカルボキシレート基の所望の配向を達成するために、ステンレス鋼、金属又は酸化アルミニウム等の金属酸化物等の任意の適切な極性材料から形成され得るか、又は斯かる材料でコーティングされた内面を有し得る。流体デバイスモジュール１００の典型的な例が図２及び図３に概略的に示され、これらの図においては、流体デバイスモジュール１００の反対側の主面の斜視図が概略的に描かれている。流体デバイスモジュール１００は、少なくとも１つの流路１１５が延在する膜１１０を有し得る。好ましくは、流体デバイスモジュール１００は、膜１１０により空間的に分離された反対側のフローチャンネル（流路）を有する。少なくとも膜１１０はバルク改質エラストマ３０から形成されるが、好ましい実施形態にお

いては、流体デバイスモジュール１００全体がバルク改質エラストマ３０から形成され、これにより、モノリシック流体デバイスモジュール１００を得る。

【０１２３】

流体デバイスモジュール１００は、上記のような流路１１５にアクセスできるように１以上の隔壁（セプタム）１２０を有し得る。各流路１１５は、好ましくは、専用の組のセプタム１２０を介してアクセス可能であり、複数の流路１１５間の相互汚染が回避されるようにする。前述したように、流体デバイスモジュール１００の露出面、例えば膜１１０は、細胞培養物を直接結合するように使用でき、細胞を該生体適合性表面上で培養（増殖）できるようにする。

【０１２４】

膜１１０は、液体栄養及び溶液が可能性のある薬品等の化合物と共に該膜の両側及び細胞／組織に到達し得るように複数の孔又は溝を有し得、これら孔又は溝は、例えばレーザ切断を介して等のように任意の適切な方法で形成することができる。流体デバイスモジュール１００の膜１１０における斯様な孔又は溝は、好ましくは、膜１１０上に固定化されるべき細胞の典型的な直径と同程度であり、このような孔又は溝の間のピッチは特に重要ではない。

【０１２５】

図４に概略的に示される流体デバイス２００は、上記のような流体デバイスモジュール１００から、一対のカバープレート２１０、２２０を設けることにより形成でき、これらカバープレートは流体デバイスモジュール１００を、該流体デバイスモジュール１００の１以上の流路１１５を通過される流体が該流体デバイス２００から漏れ得ないように流体的に密閉する。

【０１２６】

一実施形態において、カバープレート２１０、２２０は、カバープレート２１０が流体デバイスモジュール１００の第１の主面を覆い、これにより、当該流体デバイスモジュールの第１の流路１１５を密閉する一方、他方のカバープレート２２０が流体デバイスモジュール１００の第２の主面を覆い、これにより、当該流体デバイスモジュールの第２の流路１１５を密閉するように配置される。カバープレート２１０及び２２０は、任意の適切な材料、例えば、ガラス又はプラスチック材料から形成できる。好ましくは、当該カバープレートは、流体デバイス２００内の流体デバイスモジュール１００の可撓性を維持しながら、流体デバイスモジュール１００との良好な適合を保証するために伸縮可能且つ可撓性のものとする。このような流体デバイス２００は、当業者により容易に理解されるように、生体機能チップとして配備できる。

【０１２７】

図５は、流体デバイス２００の例示的な実施形態を概略的に示しており、該デバイスは２つの剛性カバープレート２１０と２２０との間に本発明による流体デバイスモジュール１００を有する。上側プレート２１０は、流体デバイスモジュール１００における膜１１０の下側の下側流路（見えない）と流体接続状態の第１の流入口２３１及び第１の流出口２３２を有し、膜１１０が該下側流路を通過する流体と流体接触状態となるようにする。上側プレート２１０は、更に、膜１１０上の上側流路１１５と流体接続状態の第２の流入口２３３及び第２の流出口２３４を有し、膜１１０が該上側流路１１５を通過する他の流体と流体接触状態となるようにする。例えば、下側流路を通過する流体は、以下でより詳細に説明するように、膜１１０に付着された細胞培養物に対して試験（検査）されるべき薬品を有し得、該薬品は、膜１１０が前述したように例えばレーザが該膜１１０に孔又は溝をドリル加工することにより多孔性にされるという事実により、膜１１０を介して当該細胞培養物に到達できる。他の例として、このような孔又は溝は、流体デバイスモジュール１００を極性モールド内で形成する際に膜１１０に形成できる。この方策は、このような流体通路（細孔）の規則的なパターンを、膜１１０を通して形成できるという利点を有する。上側流路１１５を通過する他の流体は、このような細胞培養物と直接接触し、このような細胞培養物に栄養素を供給し得る。幾つかの実施形態における流入口２３１、２３

３及び流出口２３２、２３４は隔壁であり、該隔壁を経て流体を、例えば該隔壁を押すことにより、膜１１０上において前記溝を介して液圧的にポンプ送りすることができる。他の例として、流入口２３１、２３３及び流出口２３２、２３４は、配管を取り付けることができる、例えばクランプできるフェルール（口輪）とすることができ、これは、例えば、流体デバイス２００がラボオンチップシステムにおいてウェルプレート等として使用される場合に有用である。

【０１２８】

図６に概略的に示されている実施形態において、例えば流体デバイスモジュール１００を成形する際に、上側及び下側流路１１５が該（モノリシック）流体デバイスモジュール１００に組み込まれる（これら流路のうちの１つしか示されていない）。他の例として、上記上側及び下側流路のうちの少なくとも一方は、カバープレートの一方に形成できる。図７は流体デバイス２００の例示的実施形態の斜視上面図を概略的に示す一方、図８は斜視下面図を概略的に示し、その場合において、上側流路１１５は上側カバープレート２１０に形成される一方、下側流路１１５’は流体デバイスモジュール１００に形成される。当業者であれば容易に理解できるように、下側流路１１５’を底側カバープレート２２０に形成することも等しく可能である。例えば、図７及び図８に示されたデバイスのような流体デバイス２００はラボオンチップデバイスにおけるマイクロウェルとして使用でき、その場合において、複数の斯様なマイクロウェルはクランプ留め又はそれ以外で固定されて、単一のラボオンチップデバイス内での複数の異なるサンプルの並行試験を容易にすることができ、その場合、各マイクロウェルは、通常、これらのサンプルのうちの１つを有する。

【０１２９】

このような流体デバイス２００内に細胞培養物５０を固定化し、この細胞培養物を増殖させる際、該流体デバイス２００は固定化された増殖細胞培養物５０が対象化合物を含む流体に曝露されるような方法で使用でき、その場合、上記流体は流体デバイス２００の流路１１５を通過させられ、上記固定化された細胞培養物５０を該流体内の対象化合物に曝露させると共に、該固定化された細胞培養物５０の斯様な曝露に対する反応を監視することができる。このような方法は腫瘍学の設定環境において実施でき、その場合、固定化された細胞培養物５０は例えば化学療法薬品等の薬品に曝露され、そのような薬品に対する該固定化された細胞培養物５０の反応を監視できる。この目的のために、上記の固定化された細胞培養物５０は、薬品の有効性を試験するために腫瘍細胞を含むことができ、及び／又は健康な組織に対する薬品の毒性を試験するために健康な細胞を含むことができる。

【０１３０】

このような薬品検査方法は、典型的に、本発明の１以上の実施形態による流体デバイスモジュール１００を準備するステップ、例えばモノリシック流体デバイスモジュール１００を準備するステップ、及び採取された細胞培養物を少なくとも膜１１０に供給（塗布）するステップを含み、前記細胞培養物は該膜の露出表面上のカルボン酸又はカルボキシレート基に直接結合でき、前述したようにして流体デバイス２００、例えば生体機能チップが形成される準備された流体デバイスモジュール１００を得ることができる。流体デバイス２００内の細胞培養物は該細胞培養物を生かし続けるために該流体デバイス２００の一対の流路１１５の一方を介して供給できる一方、該細胞培養物は試験されるべき薬品に対して該流体デバイス２００の一対の流路１１５の他方を介して曝露でき、該薬品試験方法は、典型的に、試験される薬品に対する細胞培養物の反応を監視することにより完了する。このことは、例えば、カバープレート２１０、２２０を取り外すことにより流体デバイス２００を分解し、流体デバイスモジュール１００を、このモジュールの当該細胞培養物の一部を含むスライスが得られるようにスライスすることにより達成でき、このスライスは、当該細胞培養物に対する当該試験中の薬品の効果を調査するために顕微鏡等の下で調査することができる。このような調査の間において、当該細胞培養物は斯様な顕微鏡的調査を容易にするために、通常、染色され、ホルマリンで処理され、パラフィン等の固定剤で固定される。このような細胞培養物の染色、処理及び固定は、当該細胞培養物が露出さ

れる適切な化学薬品を流体デバイス２００の流路１１５に通過させることにより該流体デバイス２００内で実施できる。

【０１３１】

他の実施形態において、このような流体デバイス２００の分解は回避することができ、試験されるべき薬品等の１以上の化合物に対する細胞培養物の反応の監視は共焦点顕微鏡を使用してリアルタイムで達成できる。特に、流体デバイス２００の実施形態が透明なカバープレート２１０、２２０、例えば、ガラスプレート又はポリマプレートを有する場合、共焦点顕微鏡を使用して、組み立てられた流体デバイス２００内の細胞培養物を監視することができる。このことは、少なくとも底側カバープレート２２０は例えば１５０～３００μｍの範囲の有するように薄く保つことができ、細胞培養物を担持する流体デバイスモジュール１００の膜１１０と底側カバープレート２２０との間の距離が２００μｍ未満となり、共焦点顕微鏡の焦点長の限界（通常は、調査されるべき対象から対物レンズまで約５００μｍ）内となるという事実により可能とされる。この目的のために、膜１１０は、２０～３０μｍの厚さ等の、１０～１００μｍの範囲の厚さを有し得る。上側カバープレート２１０の厚さは重要ではなく、３００μｍ～３ｍｍの厚さ等の、任意の適切な厚さが考えられる。

【０１３２】

共焦点顕微鏡を使用した流体デバイス２００内の細胞培養物の評価は、光路の全焦点長が共焦点顕微鏡による鮮明な画像のキャプチャを容易にすることを保証するために、細胞スフェロイドが５００μｍ未満、例えば約２００μｍの直径を有する場合に特に適している。より大きなスフェロイドの場合、流体デバイス２００は分解されねばならず、スフェロイドを含む膜１１０を、共焦点顕微鏡の光学対物レンズに位置決めするために、ガラスカバースリップに押し付けることができるようにする。

【０１３３】

更に、流体デバイス２００の上述した寸法は、通常、流体デバイス２００内の細胞培養物のリアルタイム監視の間に当てはまることに留意されたい。流体デバイス２００が例えばデジタル病理学のために前述したようにスライスされる実施形態において、流体デバイス２００の寸法は、ホルマリン及びパラフィン固定を実行できる限り、それほど重要ではない。

【０１３４】

上述した細胞培養基体は単なる例に過ぎない。他の斯様な基体も存在する。一例として、このような基体はウェルセルプレートであり得る。斯かる基体は、ウェルセルプレートと共に使用するように形成でき、例えば、該基体のスラブは、ウェルセルプレートの標準サイズのウェル内に挿入できるように適合された形状及びサイズを有するように構成できる。他の例として、開いたウェルを備えるウェルセルプレートを使用でき、前記材料の一部が該ウェルセルプレートの底を閉じる。このようなアンサンブル又は装置はクランプできる。

【０１３５】

当業者により容易に理解されるように、このような薬品検査方法は、薬剤の投与量、投与頻度等のプロトコルの点で大きく相違し得る。本発明による薬品検査方法は、このような方法が、細胞が当該デバイスの露出された表面、例えば前記膜１０上で直接培養される本発明の実施形態による流体デバイス２００を使用して実施され得る限り、特定のプロトコルに限定されるものではないと理解されたい。

【０１３６】

ここで、本発明のバルク改質エラストマ上での直接的な哺乳類細胞の培養の概念の実証が、以下の実験的証拠の形で提供されるであろう。

［一般的手順］

【０１３７】

サンプルは、該サンプルをイソプロパノール内で５分間洗浄することにより清浄化された。乾燥後、該サンプルは２４ウェルプレート内に配置された。不死化ヒト前立腺線維芽

細胞（ＷＰＭＹ－１細胞、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２８５４）の細胞培養物が、１０％ＦＢＳ（ウシ胎児血清）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン及び１％グルタマックスを含むＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地、サーモフィッシャー社）で提供された。２．０ｘ１０^{5}の細胞の全量が、全てのサンプルに播種され、３７°Ｃ及び５％CO_2の雰囲気下で一晩インキュベーター内に置かれた。このようにして生成された細胞培養物の画像が、ライカ反転明視野顕微鏡を使用して１００倍の倍率で作成された。

【０１３８】

例１：ＷＰＭＹ－１細胞培養物が、前述した一般的手順に従い、本発明の教示に従って０．５重量％のリノール酸でバルク改質されたシリコーンエラストマ上で生育された。この目的のために、合成例２は、本例で使用されるバルク改質シリコーンエラストマを得るために、４８．４８８ｇのリノール酸ナトリウムを２．４１ｇのリノール酸で置換することにより修正された。

【０１３９】

比較例１：ＷＰＭＹ－１細胞培養物が、前述した一般的手順に従い、例１と同じシリコーンエラストマではあるが、バルク改質なしのシリコーンエラストマ上で生育された。

【０１４０】

実施例２：ＷＰＭＹ－１細胞培養物が、前述した一般的手順に従い、合成例２に従って準備されたバルク改質シリコーンエラストマ（すなわち、１．０重量％のリノール酸ナトリウムを含む）上で生育された。

【０１４１】

図９は、一晩培養した後の例１の結果的細胞培養物を示している。この画像では、細胞がリノール酸官能化シリコーンの表面への良好な付着を示すことが明瞭に分かる。

【０１４２】

図１０は、一晩培養した後の比較例１の結果的細胞培養物を示している。この画像では、細胞が非機能化シリコーンエラストマの表面への最小限の付着しかを示さないことが明瞭に分かる。

【０１４３】

図１１は、一晩培養した後の例２の結果的細胞培養物を示している。この画像では、細胞がリノール酸ナトリウム官能化シリコーンの表面に対して良好な付着を示すことが明確に分かる。図１２は、２日間培養した後の例２の細胞培養物を示し、図１３は、７日間培養した後の例２の細胞培養物を示す。進行中の細胞増殖が、これらの画像から明確に認識でき、このことは、哺乳類細胞材料を本発明のバルク官能化エラストマ上で直接培養及び増殖させることができることを示している。

【０１４４】

同様の結果が、例２に対するのと同様であるが１重量％のリノール酸で準備及び処理された基体上で他の細胞型を使用して得られた。

【０１４５】

例３：内皮細胞Ｅａ．ｈｙ９２６細胞培養物が、前述した一般的手順に従い、合成例２に従って準備されたバルク改質シリコーンエラストマ（すなわち、１．０重量％のリノール酸ナトリウムを含む）上で生育された。

【０１４６】

例４：上皮細胞Ｃａｃｏ‐２細胞培養物が、前述した一般的手順に従い、合成例２に従って準備されたバルク改質シリコーンエラストマ（すなわち、１．０重量％のリノール酸ナトリウムを含む）上で生育された。

【０１４７】

図１４及び図１５は、例３及び例４に関する４日後の細胞増殖を各々示している。このように、全ての細胞株は、当該基体上で数日後に良好な増殖を示している。

「非限定的な実施例のリスト」

【０１４８】

実施例１：細胞を培養するための材料であって、該材料は、ショア００　２０からショ

ＡＡ　８０の範囲内のショア硬度（ＤＩＮ　ＥＮ　ＩＳＯ８６８）を有するバルク改質エラストマを含むと共に、該エラストマバルクに共有結合された複数の脂肪酸部分を有し、前記部分のカルボン酸基は前記結合をもたらすために前記材料の外部表面上で利用可能であり、該バルク改質エラストマは：

ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体、前記ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量の０．５～５重量％の範囲内の遊離若しくは鹸化された不飽和脂肪酸、及び架橋触媒を有する組成物を、極性内面を有するモールド内で形成し；及び

前記ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマを、前記遊離又は鹸化不飽和脂肪酸を前記エラストマバルクに前記モールド内で、前記エラストマのビニル基若しくは水素化物基と前記不飽和脂肪酸の不飽和炭素－炭素結合との間の架橋反応により共有結合させることによりバルク改質して、前記材料を得る、

ことにより得られる。

【０１４９】

実施例２：実施例１の材料であって、前記脂肪酸部分の各々が前記エラストマバルクに、前記エラストマのビニル若しくは水素化物官能基と前記不飽和脂肪酸の不飽和炭素－炭素結合との間の架橋反応を介して共有結合される。

【０１５０】

実施例３：実施例２の材料であって、前記不飽和脂肪酸が、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコスパエン酸、エルカ酸及びドコサヘキサエン酸から選択される。

【０１５１】

実施例４：実施例１～３の材料であって、前記エラストマがポリブタジエン主鎖又はシリコーン主鎖を有する。

【０１５２】

実施例５：実施例１～４の材料であって、前記組成物が、前記ビニル官能化若しくは水素化物官能化エラストマ又はその少なくとも１つの前駆体の全重量の０．５～２重量％の範囲の遊離若しくは鹸化不飽和脂肪酸を有する。

【０１５３】

実施例６：実施例１～５の材料であって、前記モールドの極性内面が金属酸化物内面である。

【０１５４】

実施例７：実施例１～６の何れかの材料を有する膜上に延在した流路を含む流体デバイスモジュール。

【０１５５】

実施例８：実施例７の流体デバイスモジュールであって、第１流路を規定する第１凹状構造を有する第１主面、及び前記第１主面の反対側であって第２流路を規定する第２凹状構造を有する第２主面を有し、前記膜が第１流路を第２流路から分離する。

【０１５６】

実施例９：実施例７又は８の流体デバイスモジュールであって、前記流体デバイスがモノリシック流体デバイスである。

【０１５７】

実施例１０：実施例７～９の何れかの流体デバイスモジュール、及び該流体デバイスモジュールを流体的に密閉するための一対のカバープレートを有する流体デバイス。

【０１５８】

実施例１１：実施例１０の流体デバイスであって、前記カバープレートが、前記カバープレートの一方が第１主面を覆い、これにより、第１流路を密閉し、前記カバープレートの他方が第２主面を覆い、これにより、第２流路を密閉するように配置される。

【０１５９】

実施例１２：細胞を培養する方法であって、
実施例１～５の何れかの材料から形成されたモールド成形物品を準備するステップであって、該物品が自身の露出面の１つとして前記材料の外部表面を有するステップ；及び
前記物品の前記露出面上で前記細胞を直接培養するステップ；
を有する。

【０１６０】

実施例１３：実施例１２の方法であって、前記物品が実施例７～９の何れかの流体デバイスモジュールを有する。

【０１６１】

実施例１４：薬品検査方法であって：当該方法は、
実施例８による流体デバイスモジュールを準備するステップ；
採取された細胞を前記流体デバイスモジュールの膜の表面に供給するステップ；
前記採取された細胞を前記表面上で培養するステップ；
前記準備された流体デバイスモジュールを用いて流体デバイスを形成するステップ；
前記流体デバイスの一対の流路の一方を介して前記培養された細胞を供給するステップ；
前記培養された細胞を、前記流体デバイスの一対の流路の他方を介して、試験されるべき薬品に曝露するステップ；
前記試験されるべき薬品に対する前記培養された細胞の反応を監視するステップ；
を有する。

【０１６２】

実施例１５：実施例１４の薬品検査方法であって、前記試験されるべき薬品に対する増殖された細胞培養物の反応を監視するステップが：
前記培養された細胞を前記流体デバイス内に固定化及び固定すると共に、前記流体デバイスモジュールをスライスして顕微鏡評価のためのスライスを得るステップであって、該スライスが前記固定化及び固定された増殖された細胞培養物の少なくとも一部を有するステップ；又は
共焦点顕微鏡を使用して、前記流体デバイス内の前記培養された細胞を監視するステップ；
を有する。

【０１６３】

上述した実施形態は、本発明を限定するというより例示したものであり、当業者は、添付請求項の範囲から逸脱することなく、多くの代替の実施形態を設計することができることに留意されたい。請求項において、括弧内に配置された如何なる参照記号も、請求項を限定するものと解釈されるべきではない。「有する（含む）」という言葉は、請求項に記載されているもの以外の要素又はステップの存在を排除するものではない。単数形の要素は、そのような要素が複数存在することを排除するものではない。本発明は、幾つかの別個の要素を含むハードウェアにより実施することができる。幾つかの手段を列挙する装置の請求項において、これらの手段の幾つかは、１つの同じハードウェア品目により具体化することができる。特定の手段が相互に異なる従属請求項に記載されているという単なる事実は、これら手段の組み合わせを有利に使用できないことを示すものではない。

【図面】

【図１】

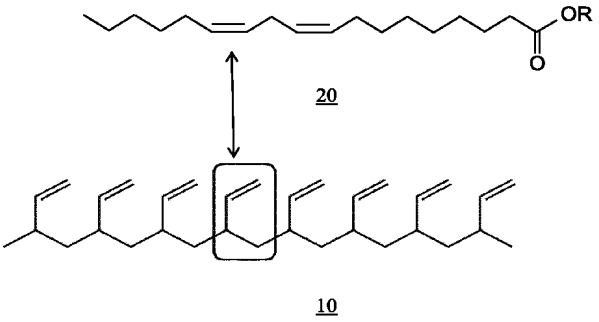


FIG. 1

【図２】

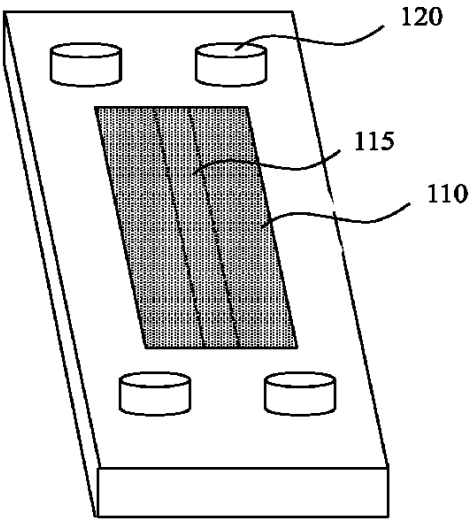


FIG. 2

【図３】

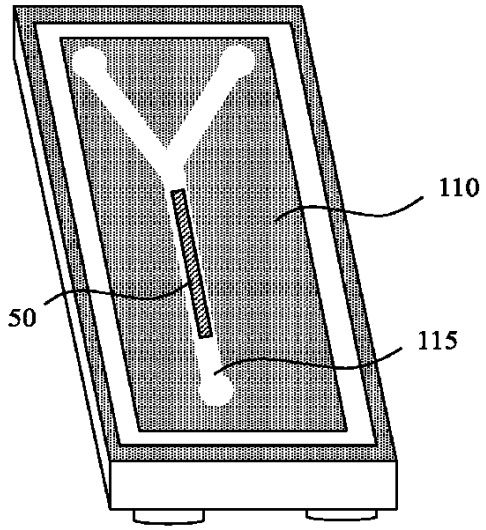


FIG. 3

【図４】

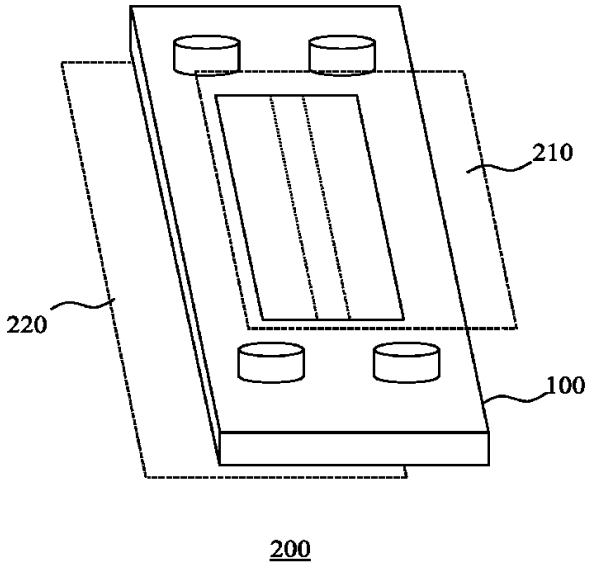


FIG. 4

【図５】

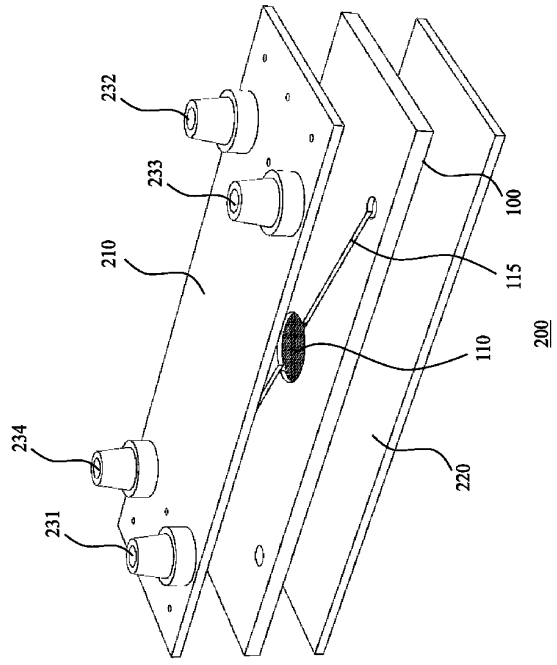


FIG. 5

【図６】

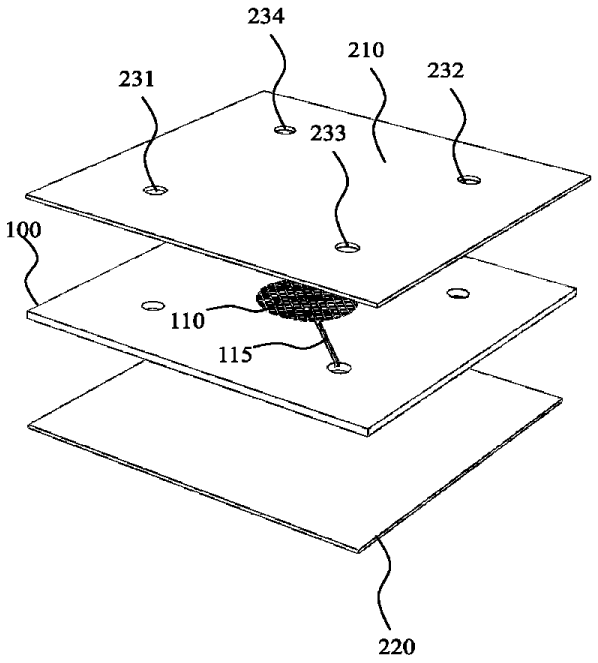
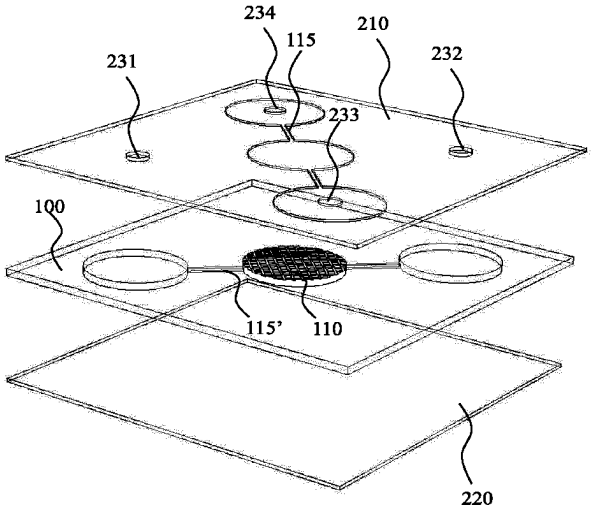


FIG. 6

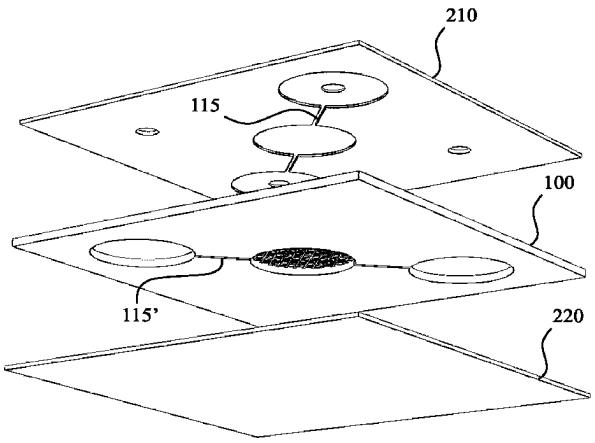
【図７】



200

FIG. 7

【図８】



200

FIG. 8

【図９】

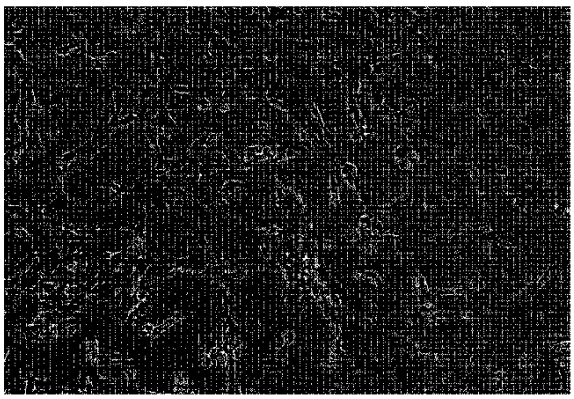


FIG. 9

【図１０】

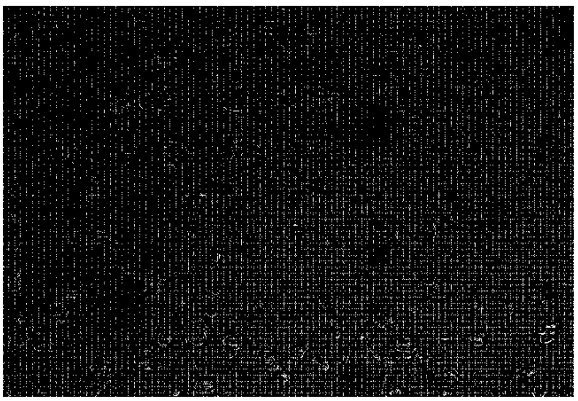


FIG. 10

【図１１】

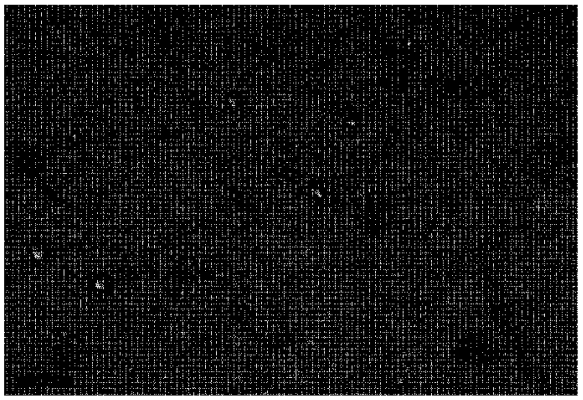


FIG. 11

【図１２】

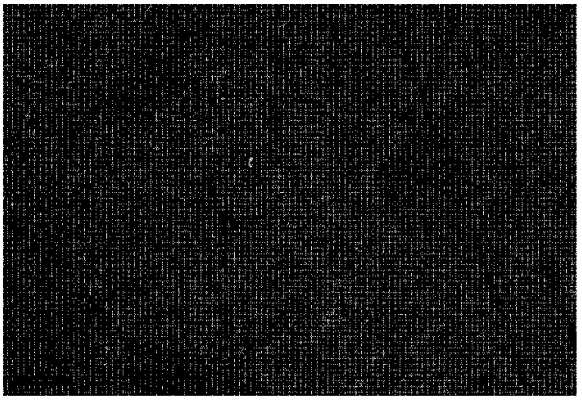


FIG. 12

【図１３】



FIG. 13

【図１４】

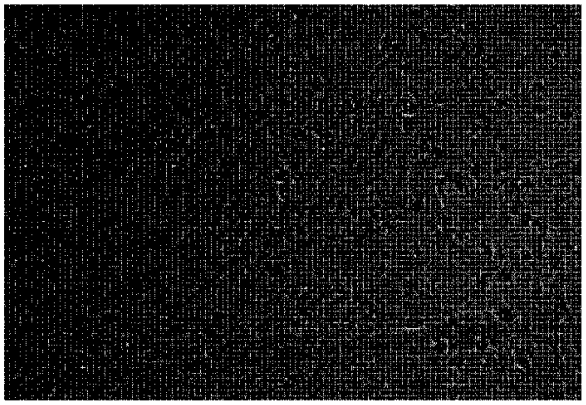


FIG. 14

【図１５】

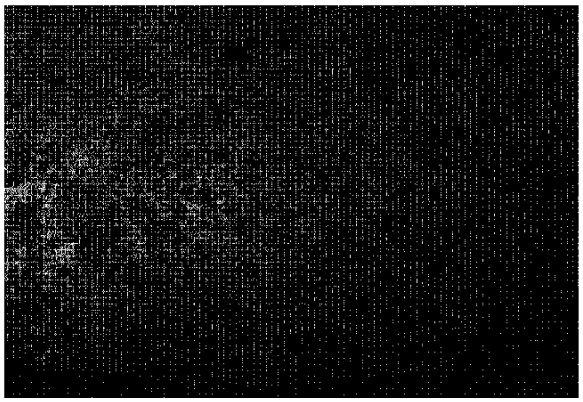


FIG. 15

【図１６】

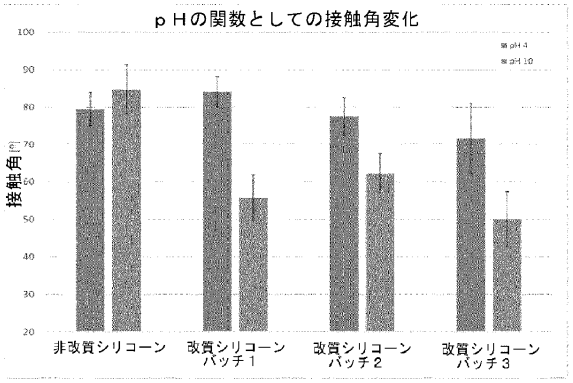


図１６

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/00 C07K14/47 C08C19/00
ADD.

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)
C12N C07K C09J C08C

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)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/015988 A1 (KONINKLIJKE PHILIPS NV [NL]) 24 January 2019 (2019-01-24) cited in the application examples 1,2 figures 1-4,12-15 claims 1-20	1-18
X	D. BIELINSKI ET AL: "Surface migration of carboxylic acid in styrene-butadiene rubber and its tribological consequences", JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE, vol. 86, no. 13, 9 October 2002 (2002-10-09), pages 3368-3376, XP055499162, US ISSN: 0021-8995, DOI: 10.1002/app.11321	1-13
Y	the whole document Experimental	1-18

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 November 2020	19/11/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bayer, Martin

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076749

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/150947 A2 (DOW CORNING [US]; DOW CORNING DO BRASIL LIMITADA [BR] ET AL.) 11 December 2008 (2008-12-11)	1-13
Y	paragraph [0046] - paragraph [0050] examples 1-8 claims 1-11	1-18
Y	S. PINTO ET AL: "Poly(dimethyl siloxane) surface modification with biosurfactants isolated from probiotic strains", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, vol. 98A, no. 4, 15 September 2011 (2011-09-15), pages 535-543, XP055429681, ISSN: 1549-3296, DOI: 10.1002/jbm.a.33146 the whole document Materials and Methods	1-18
Y	US 2011/275539 A1 (SPATZ JOACHIM P [DE] ET AL) 10 November 2011 (2011-11-10) paragraphs [0028], [0031], [0037], [0087] examples 1,2 figures 1c, 1d	1-18
Y	MARY L. KRAFT ET AL: "Multitechnique Characterization of Fatty Acid-Modified Microgels", LANGMUIR, vol. 20, 22 January 2004 (2004-01-22), pages 1111-1119, XP055428560, DOI: 10.1021/la035617j the whole document Experimental Section	1-18
Y	US 2009/186411 A1 (HOFFMANN BERND [DE] ET AL) 23 July 2009 (2009-07-23) paragraph [0039] - paragraph [0042] paragraph [0058] - paragraph [0066] paragraph [0148] claims 44,47	1-18
Y	JAN SCHWARZ ET AL: "A microfluidic device for measuring cell migration towards substrate-bound and soluble chemokine gradients", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 7 November 2016 (2016-11-07), XP055428717, DOI: 10.1038/srep36440 the whole document Materials and methods	1-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2020/076749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019015988 A1	24-01-2019	AU 2018304802 A1	05-03-2020
		BR 112020000819 A2	14-07-2020
		CA 3069993 A1	24-01-2019
		CN 110945117 A	31-03-2020
		EP 3431582 A1	23-01-2019
		EP 3591035 A1	08-01-2020
		EP 3655523 A1	27-05-2020
		JP 2020527942 A	17-09-2020
		KR 20200030102 A	19-03-2020
		US 2020148999 A1	14-05-2020
		WO 2019015988 A1	24-01-2019
		WO 2020148427 A1	23-07-2020
WO 2008150947 A2	11-12-2008	BR PI0812033 A2	18-11-2014
		CN 101743282 A	16-06-2010
		EP 2158268 A2	03-03-2010
		JP 2010529233 A	26-08-2010
		KR 20100053489 A	20-05-2010
		US 2010172856 A1	08-07-2010
		WO 2008150947 A2	11-12-2008
US 2011275539 A1	10-11-2011	CN 102317441 A	11-01-2012
		DE 102008060991 A1	10-06-2010
		EP 2356215 A1	17-08-2011
		US 2011275539 A1	10-11-2011
		WO 2010075933 A1	08-07-2010
US 2009186411 A1	23-07-2009	DE 102006029051 A1	27-12-2007
		EP 2032688 A1	11-03-2009
		JP 2009540805 A	26-11-2009
		US 2009186411 A1	23-07-2009
		WO 2007147389 A1	27-12-2007

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ドーフェン ハイ テック キャンパス 5 フィリップス インターナショナル ビー． ヴィ． インテレクチュアル プロパティー アンド スタンダーズ

(72)発明者 ファン ヘイセル トーマス ヨハネス

オランダ国 ５６５６ アーエー アインドーフェン ハイ テック キャンパス 5 フィリップス インターナショナル ビー． ヴィ． インテレクチュアル プロパティー アンド スタンダーズ

Ｆターム（参考） 4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 GB06
4B063 QA05 QQ08
4B065 AA93X BC41 CA46
4F071 AA12 AA67 AC09A AG01 AH19 BB05 BC07

【要約の続き】
デバイスモジュール、流体デバイス、細胞培養方法及び薬品検査方法も開示されている。