(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7145894号
(P7145894)

(45)発行日　令和4年10月3日(2022.10.3)

(24)登録日　令和4年9月22日(2022.9.22)

(51)国際特許分類

		FI		
C12M 1/00 (2006.01)		C12M	1/00	C
B01J 19/00 (2006.01)		B01J	19/00	321
C12N 5/00 (2006.01)		C12N	5/00	
G01N 33/50 (2006.01)		G01N	33/50	Z
G01N 33/15 (2006.01)		G01N	33/15	Z

請求項の数　19　（全24頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-570998(P2019-570998)
(86)(22)出願日　平成30年7月6日(2018.7.6)
(65)公表番号　特表2020-527942(P2020-527942A)
(43)公表日　令和2年9月17日(2020.9.17)
(86)国際出願番号　PCT/EP2018/068318
(87)国際公開番号　WO2019/015988
(87)国際公開日　平成31年1月24日(2019.1.24)
審査請求日　令和3年5月18日(2021.5.18)
(31)優先権主張番号　17181788.5
(32)優先日　平成29年7月18日(2017.7.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　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　100122769
弁理士　笛田 秀仙
(74)代理人　100163809
弁理士　五十嵐 貴裕
(74)代理人　100145654

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞培養材料

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

細胞培養タンパク質に結合するための材料であって、エラストマーバルクに共有結合した複数の脂肪酸部分を有するバルク修飾エラストマーを含み、前記部分のカルボン酸基が前記結合を提供するために前記材料の外表面上で利用可能であり、前記脂肪酸部分のそれぞれが、前記エラストマーのビニルまたはヒドリド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によって前記エラストマーバルクに共有結合している、材料。

【請求項２】

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、リノエラジン酸、α-リノレン酸、アラキドン酸、エイコスパエンテン酸、エルカ酸、ドコサヘキサエン酸から選択される、請求項１に記載の材料。

【請求項３】

前記エラストマーが、ポリブタジエン骨格またはシリコーン骨格を含む、請求項１または２に記載の材料。

【請求項４】

シリコーン骨格内のカルボン酸基の少なくとも一部が鹸化されている、請求項３に記載の材料。

【請求項５】

請求項１から４のいずれか一項に記載の材料と、前記カルボン酸基の少なくともいくつ

かに結合した細胞培養タンパク質とを含む細胞培養足場。
【請求項６】
前記タンパク質がフィブロネクチン、コラーゲンおよびエラスチンから選択される、請求項５に記載の細胞培養足場。
【請求項７】
請求項１から３のいずれか一項に記載の材料を含む膜上に延在するフローチャネルを含む流体装置モジュール。
【請求項８】
第1の流路を画定する第1の凹構造を含む第1の主表面と、
前記第１の主表面に対向し、第２の流路を画定する第２の凹構造を含む第２の主表面と、
を有し、
前記膜が前記第１の流路を前記第２の流路から分離する、
請求項７に記載の流体装置モジュール。
【請求項９】
前記流体装置がモノリシック流体装置である、請求項７または８に記載の流体装置モジュール。
【請求項１０】
請求項７から９のいずれか一項の流体装置モジュールと、前記流体装置モジュールを流体密封するための一対のカバープレートとを有する流体装置。
【請求項１１】
前記カバープレートの一方が前記第１の主表面を覆い、それにより前記第１の流体チャネルを密封し、前記カバープレートの他方が前記第２の主表面を覆い、それにより前記第２の流体チャネルを密封するように、前記カバープレートが配置される、請求項１０に記載の流体装置。
【請求項１２】
細胞培養タンパク質に結合するための材料を製造する方法であって、
極性の内面を有する型内にビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーまたはその少なくとも1つの前駆体、不飽和脂肪酸、および架橋触媒を含む組成物を形成し、
エラストマーのビニル基またはヒドリド基と不飽和脂肪酸の不飽和炭素-炭素結合との架橋反応により前記型のエラストマーバルクに前記脂肪酸を共有結合させることによって、前記ビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーをバルク修飾して前記材料を得る、方法。
【請求項１３】
前記ビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーがシリコーン骨格を含み、前記不飽和脂肪酸が鹸化され、得られた前記材料をプロトン酸で処理して前記鹸化を元に戻すことをさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
ビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーまたはその少なくとも１つの前駆体、不飽和脂肪酸および架橋触媒を含む組成物を形成することは、前記組成物を前記型に注入することを含む、請求項１２または１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記型は、請求項７から９のいずれか一項に記載の流体装置モジュールを提供するように成形される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記流体装置モジュールの膜にレーザで溝または穴を形成することをさらに含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記極性の内面は金属酸化物内面である、請求項１４から１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】

薬物試験方法であって、
請求項８または９に記載の流体装置モジュールを提供し、
前記流体装置モジュールの膜を細胞培養タンパク質に結合させて、細胞培養足場を得て、
採取された細胞培養物を前記細胞培養足場に適用して、準備された流体装置モジュールを取得し、
前記準備された流体装置モジュールで流体装置を形成し、
前記流体装置の一対のフローチャネルの一方を通して細胞培養物を供給し、
前記流体装置の一対のフローチャネルの他方を通して前記細胞培養物を試験される薬物に曝露し、
試験される前記薬物に対する前記細胞培養物の反応を監視する、薬物試験方法。
【請求項１９】
試験される薬物に対する細胞培養物の反応の監視は、
流体装置内に前記細胞培養物を固定し、前記流体装置モジュールをスライスして、固定された前記細胞培養物の少なくとも一部を含む顕微鏡評価のためのスライスを取得すること、または
共焦点顕微鏡を使用して、流体装置内で前記細胞培養物を監視すること、
を含む、請求項１８に記載の薬物試験方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞培養タンパク質を結合するためのエラストマー材料に関する。
【０００２】
本発明はさらに、そのような材料を含む細胞培養足場に関する。
【０００３】
本発明はさらに、そのような材料を含む流体装置モジュールに関する。
【０００４】
本発明はさらに、そのような材料を製造する方法に関する。
【０００５】
本発明はさらに、そのような材料を含む流体装置モジュールを用いた薬物試験方法に関する。
【背景技術】
【０００６】
哺乳類の細胞または組織の生体外試験は、調査中の哺乳類の材料の臨床的に重要な情報を得るための重要な技術である。例えば、生検哺乳類細胞または組織材料は、そのような哺乳類材料の異常または疾患を決定するために、または、病気の哺乳類の材料を薬物、例えば実験薬に曝露して、そのような曝露に対する病気の哺乳類材料の反応を監視するために、そのような試験に供され得る。これは、薬物毒性などのさまざまな理由で望ましくない可能性があるさまざまな潜在的に有効な薬物に個人をさらすことなく、個人の疾患を効果的に治療する方法に関する重要な洞察を提供できる。さらに、確立された満足のいく薬物治療がまだ利用可能でない既存の疾患に対する実験薬の有効性は、この方法でテストすることができる。このような生体外テストを展開する理由は他にも多くある。
【０００７】
そのようなin vitro試験への一般的なアプローチは、organ-on-chipと呼ばれることもある流体装置に哺乳動物物質を固定することである。そのようなアプローチでは、哺乳類の材料は、通常、流体装置の2つの流体チャネルを分離する膜に固定され、第１のチャネルは哺乳類の材料を供給するために使用され、第2のチャネルは、例えば、上述したように薬の有効性および/または毒性をテストするため、哺乳類の材料を薬物治療などの目的の化合物または組成物にさらすために使用される。流体装置、または少なくともその膜は、例えば、目的の化合物または組成物への暴露に対する哺乳動物材料の反応を評価するため哺乳動物材料を含む膜のスライスを得るために、流体装置をさいの目に切るかスライスす

ることができるように、エラストマーで作成されることができる。
【０００８】
そのようなin vitro試験における課題は、哺乳動物の材料、例えば細胞または組織が安定化され、試験手順の期間中生き続けるように流体装置の膜上で正常に発達することを保証することである。これは、実験がかなり長くなる可能性がある腫瘍学の手順では特に困難である。この目的のために、哺乳類材料はフィブロネクチンなどの生体適合性材料を使用して安定化でき、これにより、自然組織の化学環境を模倣する化学環境を細胞に提供することによって、哺乳類細胞が増殖し続ける。
【０００９】
一般的なアプローチは、ウェルセルプレートを、フィブロネクチンに（共有）結合できる基のようなカルボン酸基を有するポリマーでコーティングすることであり、これにより、フィブロネクチンがポリマーを生体結合性にするため、流体装置内の膜上の哺乳類細胞の安定化が促進される。ただし、このアプローチには欠点がないわけではない。第一に、流体装置を通る流体の流れは、前述のポリマーを部分的に除去する可能性があり、この材料の少なくとも一部が失われた可能性があるため、所望の時点で哺乳類材料を評価する能力を損なう。別のアプローチでは、膜をUVまたはプラズマで処理して、膜上のフィブロネクチンの結合部位を生成する。しかし、このアプローチには、そのような結合部位の不均一な分布を避けることがかなり難しいという欠点があり、これもまた、試験結果の評価を妨げる。
【００１０】
第二に、そのような生体適合性コーティングを含む膜は製造が困難であることで有名であり、このような流体装置の製造はかなり高価で扱いにくいものとなっている。例えば、そのような膜は、通常、高価な薄膜技術を使用して製造する必要があり、漏れなく流体装置内に統合する必要があり、これは簡単ではない。さらに、膜自体が生体適合性材料で作られていない場合、通常、膜には、細胞の成長を促進するために小さなピッチで複数の細胞サイズの穴を設ける必要があり、これも達成が難しい。
【００１１】
薄膜技術に基づくそのような人間のorgan-on-chipの微細加工の例は、Dongeun Huh et al. in Nature Protocols, Vol. 8, No. 11, 2013, pages 2135-2157に開示されている。このプロトコルでは、両側の2つの全面真空チャンバに沿った、薄い多孔質の柔軟な膜で分離された2つの平行なエラストマーマイクロチャネルを含む多層マイクロ流体装置の製造にマイクロ工学が使用され、この装置を製造するのに約31/2日かかる。全体の微細加工手順には100を超えるステップが含まれており、その多くが重要なステップである。これは、このような製造手順の複雑さを明確に示している。したがって、そのような生体適合性流体装置を簡素化された方法で提供する必要性が存在する。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
本発明は、そのような生体適合性流体装置を形成するために使用できる細胞培養タンパク質に結合するためのエラストマー材料を提供しようとするものである。
【００１３】
本発明はさらに、そのようなエラストマー材料を含む細胞培養足場を提供しようとするものである。
【００１４】
本発明はさらに、そのようなエラストマー材料を含む生体適合性流体装置を提供しようとするものである。
【００１５】
本発明はさらに、そのようなエラストマー材料の製造方法を提供しようとするものである。
【００１６】

本発明はさらに、そのような生体適合性流体装置を使用する薬物試験方法を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

一態様によれば、細胞培養タンパク質に結合するための材料が提供され、当該材料は、エラストマーバルクに共有結合した複数の脂肪酸部分を含むバルク修飾エラストマーを含み、前記部分のカルボン酸基は、前記結合を提供するために利用可能である。

【００１８】

本発明はそのような材料を、スピンコーティングまたは射出成形プロセスでは周囲の酸素への曝露が限られているから、エラストマーと脂肪酸炭素-炭素二重結合の架橋が脂肪酸炭素-炭素二重結合の著しいエポキシ化なしで達成できるため、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、ディスペンス）または射出成形プロセスでエラストマーと脂肪酸を結合させることにより、少数のステップ、例えば、いくつかの実施形態では単一ステップで製造できるという洞察に基づいている。その結果、脂肪酸のカルボン酸基が生体適合性材料に結合するのに利用可能な脂肪酸部分でエラストマーがバルク修飾された材料が提供される。また、硬化プロセスおよび/またはその中で材料が形成される型の特性を制御することにより、そのようなカルボン酸基は、材料の外表面に主に存在することができ、それにより、そのような外表面上にカルボン酸基の実質的に均一な分布を提供して、材料の各断面が、前述のように生体適合性材料のアンカーを接合または形成する必要がある膜材料とは対照的に、同じ表面特性を示すので、材料を流体装置の膜材料として使用するのに特に適したものにする。加えて、通常、エラストマーの炭素-炭素二重結合の一部のみがこのような架橋反応で消費されるため、 本発明の材料は、エラストマーの弾性を維持し、これは、流体装置で使用するための本発明の材料の適合性を追加し、調査目的のために本発明の材料のスライスまたは切断を容易にする。

【００１９】

好ましくは、脂肪酸部分の各々は、エラストマーのビニル官能基またはヒドリド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エラストマーバルクに共有結合しており、生体適合性材料への結合に利用できるカルボン酸基の数を最適化できるようにする。

【００２０】

不飽和脂肪酸は、任意の適切な不飽和脂肪酸であり得る。例示的な実施形態では、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、リノエラジン酸、α-リノレン酸、アラキドン酸、エイコスパエンテン酸、エルカ酸およ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。同様に、エラストマーは、任意の適切なエラストマーであり得る。例示的な実施形態では、エラストマーは、ポリブタジエン骨格またはシリコーン骨格を含む。エラストマーがシリコーン骨格を含む場合、シリコーン骨格内のカルボン酸基の少なくとも一部は、不飽和脂肪酸分子とエラストマー分子間の架橋前に、カルボン酸基の鹸化として鹸化され得、これは、不飽和脂肪酸分子のカルボン酸基のプロトンによって架橋触媒が失活するのを防ぐために必要となるだろう。

【００２１】

さらなる態様によれば、本明細書に記載の実施形態のいずれかによる本発明の材料と、前記カルボン酸基の少なくともいくつかに結合した細胞培養タンパク質とを含む細胞培養足場が提供される。そのような細胞培養足場は、本発明の材料のカルボン酸基への細胞培養タンパク質の単純な結合反応によって簡単な方法で製造することができ、それにより、本発明の材料の表面全体に細胞培養タンパク質の実質的に均一な分布を有する細胞培養足場をもたらす。そのような細胞培養タンパク質は、例えば、フィブロネクチン、コラーゲンおよびエラスチンから選択されてもよいが、他の細胞培養タンパク質が考えられてもよい。

【００２２】

さらなる態様によれば、本明細書に記載の実施形態のいずれかによる本発明の材料を含む膜上に延びる流路を含む流体装置モジュールが提供される。そのような流体装置モジュールは、第１の流路を画定する第１の凹構造を含む第１の主表面、第１の主表面に対向し、第２の流路を画定する第２の凹構造を含む第２の主表面を有し、前記膜が、第1の流路を第2の流路から分離する。好ましい実施形態では、流体装置モジュールはモノリシック流体装置モジュールであり、これは、装置モジュールが少数の処理ステップ、例えば単一の処理ステップで射出成形により製造できるという利点を有する。

【００２３】

膜は、膜を通って延びる複数の穴または溝を備えてもよい。しかしながら、上で説明したように細胞培養タンパク質に結合して細胞培養足場を形成することにより、膜を生体適合性にすることができるため、これらの穴または溝は、任意の適切な寸法を有することができ、細胞サイズの寸法に限定されず、これにより、そのような流体装置モジュールの製造がさらに簡素化される。

【００２４】

一実施形態では、第１の流路および第２の流路は、それぞれのセプタムを介してアクセス可能であり、その結果、別個の流路は、相互汚染のリスクなしに個別にアクセスされ得る。

【００２５】

さらに別の態様によれば、本明細書に記載の実施形態のいずれかの流体装置モジュールと、流体装置モジュールを流体密封するための一対のカバープレートとを含む流体装置が提供される。カバープレートの一方が第１の主表面を覆い、それにより第１の流体チャネルを密封し、他方のカバープレートが第２の主表面を覆い、それにより第２の流体チャネルを密封するようにカバープレートを配置できる。このような流体装置は、流体装置モジュールが前述のように少数の処理ステップで形成され、流体装置モジュールの柔軟な性質によって漏れに対して堅牢であるため、簡単な方法で製造することができる

【００２６】

さらなる態様によると、細胞培養タンパク質に結合するための材料を製造する方法が提供され、当該方法は、ビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーまたはその少なくとも1つの前駆体、不飽和脂肪酸および架橋触媒を含む組成物を形成し、エラストマーのビニル基またはヒドリド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によって前記型内のエラストマーバルクに脂肪酸を共有結合させることによりビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーをバルク修飾して、前記材料を得る。したがって、この方法は、細胞培養タンパク質との反応によって生体適合性を持たせることができる材料を提供する簡単な方法を提供し、結果として得られる細胞培養足場は、バルク修飾されたエラストマーの表面全体にわたって細胞培養タンパク質の実質的に均一な分布を有するようにする。

【００２７】

そのようなビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーがシリコーン骨格を含む場合、不飽和脂肪酸は、存在する架橋触媒、例えば白金触媒が、その中毒を防ぐために鹸化されてもよく、その場合、当該方法は、バルク修飾されたエラストマーの少なくとも露出表面でカルボン酸基を得るために、得られた材料をプロトン酸で処理して前記鹸化を元に戻すことをさらに含む。

【００２８】

ビニル官能化またはヒドリド官能化エラストマーまたはその少なくとも１つの前駆体、不飽和脂肪酸および架橋触媒を含む組成物を形成することは、好ましくは、当該組成物を型に注入することを含む。

【００２９】

好ましくは、型は、本明細書に記載の実施形態のいずれかの流体装置モジュールを提供するように成形され、そのような流体装置モジュールは、最小数の処理ステップを使用して簡単な方法で提供され得る。そのような流体装置モジュールの膜の溝または穴は、その

ような溝または穴を簡単な方法で提供するためにレーザーで形成されてもよいが、例えば、モジュールの成形中にそのような溝および穴が流体装置モジュールの膜に形成されるように型を成形することなどによるなどの、そのような溝または穴を形成するための他の技術も考えられる。

【００３０】

そのような型は、好ましくは、金属酸化物の内面などの極性の内面を有して、そのような内面と脂肪酸部分のカルボン酸基の整列を促進し、それにより、その外表面に高密度のカルボン酸基を有するバルク修飾エラストマーの形成を促進する。

【００３１】

さらなる態様によると、薬物試験方法が提供され、当該方法は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによる流体装置モジュールを提供し、流体装置モジュールの膜を細胞培養タンパク質に結合して、細胞培養足場を得て、採取した細胞培養物を細胞培養足場に適用して、準備された流体装置モジュールを得て、準備された流体装置モジュールで流体装置を形成し、流体装置の一対のフローチャネルの一方を通して細胞培養物を供給し、細胞培養物を、流体装置の一対のフローチャネルの他方を介して試験される薬物に曝露し、試験される薬物に対する細胞培養物の反応を監視する。このような薬物試験方法は、特に、そのような薬物試験方法で使用される流体装置の準備に関して、単純で簡単な方法で展開でき、それにより、典型的にそのような流体装置を準備するのが非常に面倒である既存の薬物試験方法の大幅な簡素化を提供する。

【００３２】

試験される薬物に対する細胞培養物の反応のモニタリングは、流体装置内で細胞培養物を固定し、流体装置モジュールをスライスして、顕微鏡評価用のスライスを取得し、前記スライスは、固定された細胞培養物の少なくとも一部を含む。本発明の教示によれば、細胞培養足場が流体装置モジュールの膜表面全体に均一に分布しているため、顕微鏡評価のためのそのようなスライスの生成はもはや重要ではなく、結果にむらがない。

【００３３】

あるいは、好ましい実施形態において、細胞培養物の反応のモニタリングは、共焦点顕微鏡法を使用して、組み立てられた流体装置内で実行され得る。これにより、そのような反応のリアルタイムな監視が容易になる。

【００３４】

本発明の実施形態は、添付の図面を参照して、非限定的な例としてより詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【００３５】

【図１】一実施形態による不飽和脂肪酸によるエラストマーのバルク修飾を概略的に示す図。

【図２】そのようなバルク修飾エラストマーを含む細胞足場への哺乳類細胞の固定化を概略的に示す図。

【図３】一実施形態による流体装置モジュールの概略斜視図。

【図４】一実施形態による流体装置モジュールの別の概略斜視図。

【図５】一実施形態による流体装置の概略分解図。

【図６】別の実施形態による流体装置の概略斜視図。

【図７】さらに別の実施形態による流体装置の概略分解斜視図。

【図８】図７の流体装置の別の概略分解斜視図。

【図９】一実施形態によるバルク修飾エラストマーを形成するための組成物のＦＴ－ＩＲスペクトルの一部。

【図１０】バルク修飾反応時間の関数として図９のＦＴ－ＩＲスペクトルにおける２つの特徴的なピークの強度間の比の変化を示す図。

【図１１】バルク修飾反応時間の関数としての不飽和脂肪酸のＣ＝Ｃ伸縮振動のラマンスペクトルを示す図。

【図１２】修飾および非修飾シリコーン系エラストマーの接触角測定のグラフ。
【図１３】修飾および非修飾ポリブタジエン系エラストマーの接触角測定のグラフ。
【図１４】本発明の実施形態によるバルク修飾エラストマーとフィブロネクチンとの間の結合反応の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）スペクトルを示す図。
【図１５】本発明の実施形態によるバルク修飾エラストマーとフィブロネクチンとの間の結合反応の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）スペクトルを示す図。
【図１６】フィブロネクチンが結合する本発明の実施形態によるバルク修飾エラストマーとヒト組織細胞との間の結合反応のＳＰＲスペクトルを示す図。
【発明を実施するための形態】
【００３６】
図は単なる概略図であり、縮尺通りに描かれていないことを理解されたい。また、同じまたは類似の部品を示すために、図面全体を通して同じ参照番号が使用されることも理解されたい。
【００３７】
図１は、本発明の実施形態によるバルク修飾エラストマー材料を製造するための架橋反応を概略的に示している。この架橋反応では、ビニル官能化エラストマー10（以下、単にエラストマーと呼ぶ）は、エラストマー10の炭素-炭素二重結合の1つと不飽和脂肪酸の炭素-炭素二重結合20の1つとの間の架橋反応により不飽和脂肪酸20に架橋され、この架橋反応は、適切な架橋触媒を使用して触媒されることができる。驚くべきことに、このような架橋反応により、エラストマー10との架橋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バルク修飾エラストマーの外表面上に存在するバルク修飾エラストマーが得られ、これらのカルボン酸基が、フィブロネクチン、コラーゲン、エラスチンなどの細胞安定化（すなわち、細胞培養）タンパク質との結合反応に利用できることが、本発明者らによって発見された。これは、特にエラストマー10が非極性溶媒に溶解している場合、エラストマー10の性質が非極性である可能性があることを考えると、驚くべきことである。このような無極性環境では、不飽和脂肪酸分子２０はミセルを形成する傾向があり、これらの分子のカルボン酸部分はそのようなミセル内で内側に向けられ、典型的にはそのようなカルボン酸部分が修飾エラストマーのバルク内に落ち着く。または、以下でさらに詳細に説明するように、例えば、ヒドリド官能化シリコーンの場合など、エラストマー10と不飽和脂肪酸20との間の架橋反応は、エラストマー10のヒドリド官能基と不飽和脂肪酸20の炭素-炭素二重結合との間の反応による共有結合の形成を含み得る。
【００３８】
加えて、そのような不飽和脂肪酸20の炭素-炭素二重結合は、酸素の存在下で急速なエポキシ化を受けやすいため、するそのような化合物がエラストマー10との架橋反応に関与する能力が低下すること自体はよく知られている。
【００３９】
本発明の実施形態は、エラストマー10と不飽和脂肪酸20を含む反応混合物が極性表面と接触する場合に、これにより、このような極性表面に沿った脂肪酸分子のカルボン酸基の配向が促進され、バルク修飾エラストマー材料の外面がこれらのカルボン酸基の高密度および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。さらに、高温、例えば120-240℃の範囲の温度での射出成形プロセスにおいて、このようにエラストマー10をバルク修飾する場合、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、エラストマー10のバルク修飾を著しく妨害しない、すなわち、不飽和脂肪酸分子20とエラストマー10との間の架橋反応を著しく阻害しないことが発見された。理論に拘泥されることは望まないが、このような射出成形プロセスでは、射出成形装置内の反応混合物には分子状酸素がほとんど存在しないため、これらの炭素-炭素二重結合の望ましくないエポキシ化が抑制されると考えられる。
【００４０】
そのような射出成形プロセスで使用される型は、モノリシック流体装置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、流体装置モジュールの形態で成形

され得る。このようなモノリシック流体装置モジュールの外部表面上のカルボン酸基の高密度で均一な分布により、このような装置モジュールは、フィブロネクチン、コラーゲン、エラスチンなどの細胞培養タンパク質をバルク修飾エラストマーの外部表面の露出したカルボン酸基に結合することにより、簡単に生体適合性を持たせることができる。バルク修飾エラストマーのカルボン酸基の所望の配向を、その外面の少なくとも1つで達成するために、型は、ステンレス鋼、金属、または酸化アルミニウムなどの金属酸化物などの任意の適切な極性材料でコーティングされた内面で作られていてもよく、またはコーティングされていてもよい。

【００４１】

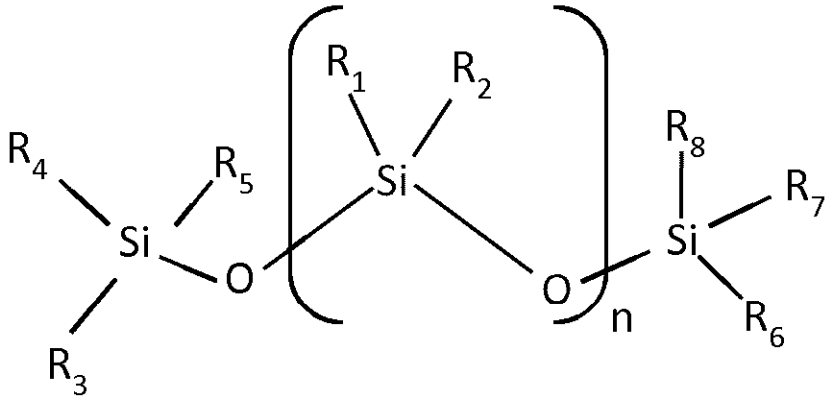
この目的のために、任意の適切なエラストマーを使用できる。例えば、エラストマーは、ホモポリマー、コポリマー、ブロックコポリマー、ターポリマー、ブロックターポリマーなどであり得る。特に適切なエラストマーは、ポリブタジエンなどのポリエンから選択されてもよい。ポリブタジエンが使用される場合、ポリブタジエンは、任意の適切な重合プロセスを使用して作成できる。特に好ましいのは、NdまたはLi触媒重合反応で形成されたポリブタジエンであり、このようなポリブタジエンは、分岐度が低く（通常5％未満）、多分散度（Mw/Mn）が約２と低いこと自体がよく知られている。リチウム触媒ポリブタジエンは、その高い1,2-ビニル含量（約11％）のために特に好ましい。しかしながら、他の種類のポリブタジエン、例えば、Co、Niまたは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してもよい。 ポリブタジエンなどのポリエンがエラストマー１０として使用される場合、エラストマー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され得る。別の有利な実施形態では、5～15％の範囲の分岐度を持つLi触媒ポリブタジエンが使用され、ポリブタジエンの分岐度がこの範囲にあると、ポリブタジエンと不飽和脂肪酸20との反応性が改善されることが発見された。ポリブタジエンを合成するときに分岐度をどのように制御するかは、それ自体よく知られているので、簡潔さのためだけにこれをさらに説明しない。

【００４２】

具体的に言及される別のクラスのエラストマーは、射出成形用のシリコーン（ポリシロキサン）です。そ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触媒付加反応による架橋を促進するためのビニル部分を含むPDMS骨格を含んでもよい。（ポリメチル）水素シロキサンとのこのような架橋の代わりに、またはそれに加えて、ビニル官能化PDMS骨格は不飽和脂肪酸20と架橋される。そのようなシリコーンは、ビニル官能化直鎖もしくは分岐シリコーンモノマーまたはオリゴマー（例えば、T分岐またはQ分岐シリコーンモノマーまたはオリゴマー）と直鎖ヒドリド官能化シリコーンモノマーまたはオリゴマーとの間、ヒドリド官能化直鎖もしくは分岐シリコーンモノマーまたはオリゴマー（たとえば、T分岐またはQ分岐シリコーンモノマーまたはオリゴマー）と直鎖ビニル官能化シリコーンモノマーまたはオリゴマーとの間の架橋反応により、あるいは、あるいは、ビニル官能化およびヒドリド官能化直鎖または分岐シリコーンモノマーまたはオリゴマー（例えば、T分岐またはQ分岐シリコーンモノマーまたはオリゴマー）の混合物、および/または、直鎖ヒドリド官能化およびビニル官能化シリコーンモノマーまたはオリゴマーの混合物により、形成され得る。

【００４３】

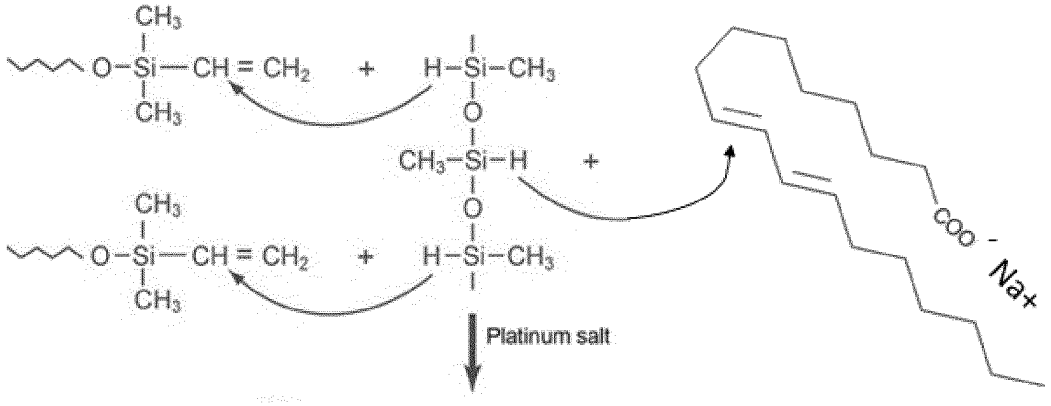
例えば、二成分シリコーンは、直鎖成分1と直鎖成分2との間の架橋反応によって形成されてもよく、それぞれが以下の一般式に対応してもよい。



成分1では、R_1およびR_2はC_1-C_3アルキルから個別に選択され、R_3-R_8はC_1-C_3アルキルおよびビニルから個別に選択され、R_3-R_5の少なくとも1つとR_6-R_8の少なくとも1つはビニルである。好ましくは、R_3-R_8の少なくとも3つはビニルである。すべての実施形態において、nは100～200,000の範囲であり得る。成分１の特定の実施形態では、アルキル基である基R_1 ～R_8のそれぞれはメチル基であり、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。成分2では、R_1は水素、R_2 = C_1-C_3アルキル、そしてR_2-R_8は、C_1-C_3アルキルまたは水素から個別に選択され、R_3-R_5の最大1つとR_{6-8}の最大1つが水素であり、nは、n = 3～1,000、より具体的にはn = 3～10などの、適切な値を持つことができる。成分２の特定の実施形態では、基R_3～R_8のいずれも水素ではない。成分2の別の特定の実施形態では、R_2～R_8のそれぞれはメチルである。

【００４４】

成分2は通常、成分1の架橋剤として機能する。典型的にはＰｔで触媒されるこのような架橋反応はそれ自体周知である（例えば国際公開第２００９／１４７６０２ Ａ２号を参照）ので、簡潔にするためにさらに詳細には説明しない。任意の適切なシリコーンエラストマーを使用してもよい。あるいは、不飽和脂肪酸20の存在下でそのようなシリコーンを架橋する場合、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、（架橋）シリコーンのヒドリド官能基と不飽和脂肪酸20との間の反応によって形成され得ることが理解されるべきである：



【００４５】

このような架橋反応中に不飽和脂肪酸20のカルボン酸基のプロトンによる触媒阻害を防ぐために、不飽和脂肪酸は、例えば、そのような不飽和脂肪酸のナトリウム塩として、シリコーンエラストマーとの架橋反応において鹸化された形態で使用されてもよく、その後

、架橋反応生成物は、バルク修飾エラストマーの表面のカルボン酸基を回復させるために、強プロトン酸、例えばHClなどで処理される。この実施形態では、バルク修飾エラストマーの表面とそのバルクとの間の拡散チャネルの長さに起因してプロトン酸がバルクに到達できない可能性があるため、バルク修飾エラストマーのバルク内の脂肪酸部分の一部は鹸化されたままであり得る。容易に理解されるように、その表面の1つまたは複数においてカルボン酸基が利用できるため、バルク修飾エラストマーは生体適合性を維持できるので、これは問題ではない。この目的のために、任意の適切なタイプのポリシロキサンを使用してもよい。

【００４６】

あるいは、（ポリメチル）水素シロキサン骨格などのシリコーン骨格は、ポリブタジエンおよびポリイソプレンなどのゴム状ポリマーと架橋され、不飽和脂肪酸がそのような架橋生成物に組み込まれる。これは、例えば、シリコーンは通常かなり開いた構造を持つ一方、そのようなゴム状ポリマーはかなり閉じた構造を持っており、架橋生成物の開放性、すなわち透水性は、その中のシリコーンとゴム状ポリマーの比率によって調整することができるので、最終材料の透水性を調整するために行うことができる。このようにして、この実施形態による材料の特性は、良好な足場を構築するための細胞/タンパク質相互作用について最適化され得る。例えば、エラストマーがシリコーンベース、たとえばPDMSベースの場合、水および他の化合物（例えば、薬物）に対して高度に透過性の材料が得られ、流体装置モジュール100の膜上の細胞へのこれらの化合物の最大限の灌流を促進する。しかしながら、

細胞による薬物消費のリアルタイムモニタリングが望ましい場合、これらの化合物の細胞への灌流速度は、膜を通る開口部の密度を使用して制御できるため、水や薬物を透過しないポリブタジエンベースの材料などのポリエンベースの材料が好ましい場合がある。

【００４７】

一実施形態では、ポリシロキサンは、ポリシロキサンの早期架橋を防ぐために、前述の多成分出発材料から形成されてもよい。そ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、そのような多成分出発材料キットは、ドイツはミュンヘンのWlaster Chemie AGによってElastosilという商品名で販売されている。

【００４８】

不飽和脂肪酸20に関しては、エラストマー10と架橋する目的で、任意の適切な不飽和脂肪酸を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、リノエラド酸、α-リノレン酸、アラキドン酸、エイコスパエンテン酸、エルカ酸、ドコサヘキサエン酸から選択することができる。本発明の実施例ではリノール酸を使用したが、これは非限定的な例に過ぎず、他の不飽和脂肪酸を代わりに使用できることを理解されたい。本出願の文脈において、不飽和脂肪酸20が参照されている場合、これは、１０～３０個の炭素原子と脂肪族尾部に少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む脂肪族尾部に共有結合したカルボン酸頭部基を含む任意の有機化合物を指すことを意図していることを理解されたい。脂肪族尾部は、非芳香族環構造、例えば、5員または6員のシクロペンチルまたはシクロヘキシル基で終わることがあり、それ自体が少なくとも1つの二重結合を含むことがある。不飽和脂肪酸20の上記定義内に入ることを意図した有機化合物の非限定的な例は、レチノイン酸である。本出願において明示的に言及された例示的な化合物に加えて、多くの他の化合物は、当業者には直ちに明らかであろう。

【００４９】

エラストマー１０および不飽和脂肪酸２０は、組成物中に任意の適切な比率で混合されて、バルク修飾エラストマーを形成してもよい。好ましくは、エラストマー１０のバルク修飾の際に、バルク修飾エラストマーが、エラストマーバルク中の炭素－炭素二重結合の残りの存在に対してその柔軟性を維持するように、不飽和脂肪酸２０は、エラストマー１０の０．０５～３５重量％の範囲でそのような組成物中に存在する。

【００５０】

ポリブタジエンなどのポリエンからバルク修飾エラストマーを製造するための合成手順の例を以下に示す（合成例1）。

【００５１】

合成例1

【００５２】

ドイツ、ケルンのランクセス社から入手したポリブタジエンの塊を、コンパウンダーまたは混合押出機に挿入する。塊には、触媒としてジクミルペルオキシドなどの過酸化物が含まれている。ポリブタジエン塊の1～30重量％の範囲の量のリノール酸（Aldrich Chemistryから入手したものを60～74％に濃縮）を110～150°Cの範囲の温度で混練することによりポリブタジエンバルクに混合する。得られた押出混合物は、流体装置を規定する、150-200°Cの範囲の温度で3-10分間押出混合物と接触する酸化内面を有するステンレス鋼金型に注入され、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装置モジュールを生成する。

【００５３】

シリコーンゴムからバルク修飾エラストマーを製造するための合成手順の例を以下に示す（合成例2）。

【００５４】

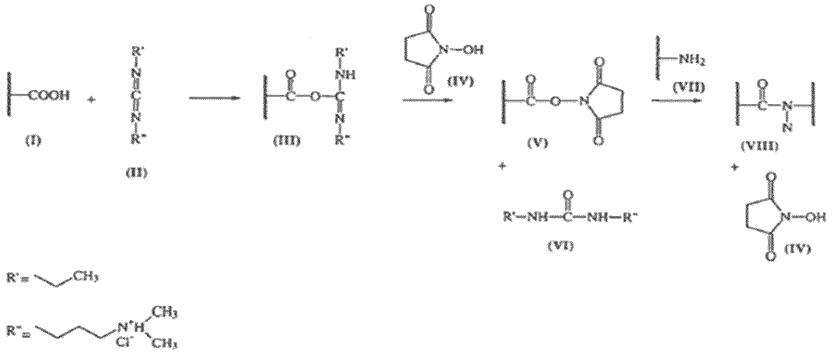
合成例2

【００５５】

121gのリノール酸ナトリウム水溶液（30重量％）をWacker Chemie AGのElastosil LR 3040のシリコーン成分A（240g）に混合し、室温で真空条件下で激しく攪拌して、組成物から水を蒸発させる。得られた混合物は、Wacker Chemie AGのエラストシルLR 3040の成分B（277g）（Pt触媒を含む）と混合され、射出成形装置に供給されて、結果として生じる混合物は、結果として生じる混合物と接触する酸化された内面を有する、流体装置モジュールを規定するステンレス鋼金型に注入され、150～200℃の範囲の温度で10～60秒間成形されて、リノール酸ナトリウムと架橋したシリコーンゴムのモノリシック流体装置モジュールを生成する。高濃度のリノール酸ナトリウムでは、不飽和脂肪酸の二重結合が過剰になって変換率が低下するのを防ぐために、反応混合物に追加の架橋剤（ポリメチルヒドロシロキサン）を加えることができる。その後、成形品をHCl水溶液（pH2～4）に滴下して、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する。

【００５６】

このようにバルク修飾されたエラストマーは、その表面の遊離カルボン酸基をフィブロネクチン、コラーゲン、エラスチンなどの細胞培養タンパク質と反応させることにより生体適合性を持たせることができる。これは図２に概略的に示されており、細胞培養タンパク質４０は、バルク修飾エラストマー３０の表面３１から延びる脂肪酸尾部３３の遊離カルボン酸基に結合して細胞培養足場を形成することができる。そのような細胞培養足場の細胞培養タンパク質40は、哺乳動物細胞または組織50、例えば、ヒト組織を安定化させることができ、その結果、細胞50は生きたままであり、長期間にわたって正常に増殖する。それ自体はよく知られているように、細胞培養タンパク質40はそのような細胞の自然環境を模倣しているからである。フィブロネクチンを表面カルボン酸基に共有結合するための、十分に裏付けられた結合プロトコルを以下に示す：



【００５７】
このプロトコルの説明は、L.H.H.Olde Daminnk, P,J,Dijkstra, M.J.A.Luyn, P.B.v. Wachem, P.Nieuwenhuis, and J.Feijen, "Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide", Biomaterials, 17(8) pp. 765-774 (1996)に開示されている。
【００５８】
このプロトコルでは、カルボン酸基（化合物I）を1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC、化合物II）と反応させた後、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS、化合物IV）と反応させることができ、これは、フィブロネクチン（化合物VII）のアミン基と反応して、フィブロネクチンをバルク修飾エラストマー30のカルボン酸基に共有結合させることができる。このようにして、フィブロネクチンは哺乳動物細胞を担持して培養するための足場を形成することができる。それ自体はよく知られているように、そのような細胞のインテグリン受容体は、フィブロネクチンの特定のアミノ酸配列、例えば、Arg-Gly-Asp-Ser配列などの配列を認識でき、それにより細胞は新しい環境を受け入れて、生き続ける。前に説明したように、そのような足場は、バルク修飾エラストマー30の表面、例えば、流体装置モジュールの膜の表面の被覆に関して、そのような表面全体にわたるカルボン酸基の高密度均一分布に起因して、高い均一性で形成され得る。
【００５９】
流体装置モジュール１００の典型的な例が図３および図４に概略的に示されており、流体装置モジュール１００の対向する主要表面の斜視図が概略的に示されている。流体装置モジュール１００は、少なくとも１つのフローチャネル１１５がその上に延在する膜１１０を備えてもよい。好ましくは、流体装置モジュール１００は、膜１１０によって空間的に分離された対向するフローチャネルを含む。少なくとも膜１１０はバルク修飾エラストマー３０で作られているが、好ましい実施形態では、流体装置モジュール１００全体がバルク修飾エラストマー３０で作られているため、モノリシックな流体装置モジュール１００が得られる。
【００６０】
流体装置モジュール１００は、そのようなフローチャネル１１５にアクセスすることができる１つ以上のセプタム１２０を備えてもよい。各フローチャネル１１５は、複数のフローチャネル１１５間の相互汚染が回避されるように、セプタム１２０の専用セットを介してアクセス可能であることが好ましい。上で説明したように、流体装置モジュール100は、上述のように膜110上のカルボン酸基を反応させて、細胞培養タンパク質、例えばフィブロネクチン、コラーゲンまたはエラスチンを膜110に共有結合させることにより生体適合性にすることができ、細胞５０は、このように形成された生体適合性膜１１０の細胞培養足場上で培養され得る。 そのような細胞培養タンパク質を含む生体適合性膜へのそのような細胞固定化手順はそれ自体よく知られているので、簡潔さのためだけにこれをさらに詳細には説明しない。この目的のために任意の適切なプロトコルを使用できると言えば

十分である。

【００６１】

膜１１０は、液体栄養および潜在的な薬物などの化合物を含む溶液が膜および細胞／組織の両側に到達できるように、複数の穴または溝を備えてもよく、これらの穴または溝は、たとえばレーザー切断など、任意の適切な方法で形成されることができる。膜１１０は上記のように生体適合性にできるため、これらの穴または溝のサイズおよびピッチは、細胞材料を固定および培養するために穴または溝が使用されていた従来技術の装置よりも重要ではない。言い換えれば、流体装置モジュール100の膜110のそのような穴または溝は、膜110に固定される細胞の典型的な直径よりも十分に大きく、そのような穴または溝の間のピッチは特に重要ではない。

【００６２】

図５に概略的に示されるような流体装置２００は、一対のカバープレート２１０、２２０の提供により、そのような流体装置モジュール１００から形成され得、このカバープレートは、流体装置モジュール１００の１つ以上の流路１１５を通過する流体が流体装置２００から漏れないように、流体装置モジュール１００を流体密封する。

【００６３】

一実施形態では、カバープレート２１０、２２０は、カバープレート２１０が流体装置モジュール１００の第１の主面を覆い、これにより流体装置モジュールの第1の流体チャネル115を密閉し、他方のカバープレート220が流体装置モジュール100の第2の主要表面を覆い、これにより流体装置モジュールの第2の流体チャネル115を密閉するように、配置される。カバープレート２１０および２２０は、任意の適切な材料、例えば、ガラスまたはプラスチック材料から作製され得る。好ましくは、カバープレートは、流体装置モジュール100との良好な適合を確保する一方で、流体装置200内の流体装置モジュール100の柔軟性を保持するために、伸縮性および可撓性である。そのような流体装置２００は、当業者によって容易に理解されるように、臓器オンチップとして展開され得る。

【００６４】

図６は、装置が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装置モジュール１００を含む流体装置２００の例示的な実施形態を概略的に示す。上部プレート２１０は、流体装置モジュール１００の膜１１０の下の下部チャネル（見えない）と流体接続する第１の入口２３１および第１の出口２３２を含み、膜１１０は、この下部チャネルを通過する流体と流体接触している。上部プレート２１０は、膜１１０がこの上部チャネル１１５を通過するさらなる流体と流体接触するように、膜１１０上の上部チャネル１１５と流体接続する第２の入口２３３および第２の出口２３４をさらに含む。例えば、下部チャネルを通過する流体は、以下により詳細に説明するように、膜110に付着した細胞培養物で試験される薬物を含んでもよく、例えば前述のように膜１１０に穴または溝をレーザーで穿孔することにより膜１１０が多孔質にされるので、膜１１０を通して細胞培養物に到達することができる。あるいは、極性モールド内に流体装置モジュール１００を形成するときに、そのような穴または溝を膜１１０に形成してもよい。これには、そのような流体通路（細孔）の規則的なパターンが膜110を通して形成され得るという利点がある。上部チャネル１１５を通過するさらなる流体は、そのような細胞培養物と直接接触し、そのような細胞培養物に栄養素を提供し得る。いくつかの実施形態における入口２３１、２３３および出口２３２、２３４はセプタムであり、それを通して、例えばセプタムを押すことにより、流体が前述のチャネルを通して膜１１０上に水圧で圧送され得る。あるいは、入口２３１、２３３および出口２３２、２３４は、管が取り付けられる、例えばクランプされることができるフェルールであってもよく、これは例えば、流体装置２００がラボオンチップシステムのウェルプレートなどとして使用される場合に有用である。

【００６５】

一実施形態では、例えば、上部および下部チャネルは、流体装置モジュール１００を成形するときに、（モノリシック）流体装置モジュール１００に組み込まれる。あるいは、上部チャネルおよび下部チャネルの少なくとも一方がカバープレートの一方に形成されて

もよい。図7は、透視上面図を概略的に示し、図８は、上部チャネル１１５が上部カバープレート２１０に形成され、下部チャネル１１５'が流体装置モジュール１００に形成されている流体装置２００の例示的な実施形態の斜視底面図を概略的に示す。もちろん、当業者には容易に理解されるように、底部カバープレート２２０に下部チャネル１１５'を形成することも等しく実現可能である。例えば図７および図８に示される装置などの流体装置２００は、ラボオンチップ装置のマイクロウェルとして使用されてもよく、複数のそのようなマイクロウェルをクランプまたは他の方法で固定して、各マイクロウェルが通常はサンプルの1つを含む単一のラボオンチップ装置内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る。

【００６６】

通常、上で説明したように膜110が生体適合性になった後に、そのような流体装置200に細胞培養物50を固定すると、固定化された細胞培養物50が目的の化合物を含む流体に曝露されて、この流体は、固定された細胞培養物５０を流体中の対象化合物に曝露して、そのような曝露に対する固定された細胞培養物５０の反応を監視するために、流体装置２００のフローチャネル１１５を通過し得る方法において、流体装置200を使用することができる。そのような方法は、例えば、そのような薬物に対する固定された細胞培養物50の応答を監視するために、固定された細胞培養物50が薬物、例えば化学療法薬にさらされる腫瘍学設定で展開され得る。この目的のために、固定化細胞培養物５０は、薬物の有効性を試験するために腫瘍細胞を含むことができ、および／または健康な組織に対する薬物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。

【００６７】

そのような薬剤試験方法は、典型的には、本発明の１つ以上の実施形態に従う流体装置モジュール１００を提供することを含み、例えば、モノリシック流体装置モジュール１００を提供し、流体装置モジュール１００の少なくとも膜１１０を細胞培養タンパク質４０、例えばフィブロネクチンに結合して、細胞培養足場を得る。次に、採取された細胞培養物５０が細胞培養足場に適用されて、準備された流体装置モジュール１００が得られ、それから、前に説明したようにorgan on chipなどの流体装置２００が形成される。流体装置２００内の細胞培養物は、細胞培養物を生かし続けるために、流体装置２００の一対のフローチャネル１１５の一方を通して供給されることができ、一方、細胞培養物は、流体装置200の一対のフローチャネル115の他方を通して、試験される薬物に曝露されることができ、薬物試験方法は、典型的には、試験される薬物に対する細胞培養物50の応答を監視することにより完了する。これは、例えば、カバープレート２１０、２２０を取り外し、流体装置モジュール１００をスライスすることにより、流体装置２００を分解することにより達成され得、細胞培養物50の一部を含むこのモジュールのスライスが得られ、このスライスは、試験中の薬物の細胞培養物50への影響を調べるために、顕微鏡などで調査されることができる。そのような調査中、細胞培養物５０は典型的には染色され、ホルマリンで処理され、そのような顕微鏡調査を容易にするためにパラフィンなどの固定剤で固定される。細胞培養物５０のそのような染色、処理、および固定は、例えば、細胞培養物５０が露出している流体装置２００の流体チャネル１１５を通して適切な化学薬剤を通過させることにより、流体装置２００内で展開され得る。

【００６８】

代替実施形態では、流体装置２００のそのような分解を回避することができ、試験される薬物などの１つまたは複数の化合物に対する細胞培養物５０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することができる。特に、流体装置200の実施形態が透明カバープレート210、220、例えばガラスプレートまたはポリマープレートを含む場合、共焦点顕微鏡を使用して、組み立てられた流体装置200内の細胞培養物50を監視することができる。これは、少なくとも底部カバープレート220を薄く、例えば150～300μmの範囲の厚さに保つことができるという事実により可能になり、細胞培養物50を担持する流体装置モジュール100の膜110と底部カバープレート220との間の距離は、共焦点顕微鏡の焦点距離制限（通常、調査対象から対物レンズまで約500 μm）のような200μm

未満である。この目的のために、膜１１０は、２０～３０μmの厚さなど、１０～１００μmの範囲の厚さを有し得る。上部カバープレート２１０の厚さは重要ではなく、300 μm～3 mmの厚さなどの任意の適切な厚さが考えられる。

【００６９】

共焦点顕微鏡を用いた流体装置200内の細胞培養物50の評価は、光路の焦点距離全体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、共焦点顕微鏡の光学対物レンズに位置決めするために、スフェロイドを含む膜110を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、流体装置200を分解しなければならない場合がある。

【００７０】

さらに、流体装置200の前述の寸法は、通常、流体装置200内の細胞培養物50のリアルタイム監視において当てはまることに留意されたい。例えばデジタルパソロジーのために、流体装置２００が前述のようにスライスされる実施形態において、流体装置２００の寸法は、ホルマリンおよびパラフィン固定がその上で実行され得る限り、それほど重要ではない。

【００７１】

当業者によって容易に理解されるように、このような薬物試験方法は、プロトコル、例えば、薬物投与量、投与頻度などに関して大幅に異なり得る。それが理解されるべきである。本発明の薬物試験方法は、そのような方法が、前に説明したように、そのカルボン酸基を細胞培養タンパク質と反応させることにより細胞培養足場に変換することにより少なくとも膜110が生体適合性となる本発明の実施形態による流体装置200を使用して展開できる限り、特定のプロトコルに限定されないことが理解されるべきである。

【００７２】

ここで、フィブロネクチンのそのようなバルク修飾エラストマー（のカルボン酸基）との成功裡の結合についてと同様に、エラストマー10と不飽和脂肪酸20の炭素-炭素二重結合との間の架橋反応について、補足証拠が提供される。

【００７３】

以下では、サーモiS50 FTIRベンチを加熱可能なゴールデンゲートATRモジュールと組み合わせて使用して、FT-IRスペクトルが記録された。すべての測定で平均64回のスキャンが使用された。測定では、4000-650 cm^{-1}のスペクトル範囲を使用して、分解能を4 cm^{-1}に設定した。このような分解能を使用できるようにするために、分光計の内部開口を50%に設定した。

【００７４】

Coherent Innova 70C Ar +レーザーが提供する514 nmのレーザー励起波長と組み合わせたレニショーInViaラマン顕微鏡を使用して、ラマンスペクトルを記録した。63倍のガラス補正対物レンズと組み合わせて、50 mWの励起電力を使用した。1200線/ mmで構成される回折格子を使用し、662から3000 cm^{-1}のスペクトル範囲で2秒の積分時間を使用して、各スペクトルの記録に600秒かかるように平均300のスペクトルを使用して、ガラストップカバーを通してスペクトルを記録した。

【００７５】

図9は、リノール酸ナトリウムのFT-IRスペクトルの一部を示す。実線の矢印は、リノレン酸ナトリウムのC－C二重結合に割り当てられる約3,050 cm^{-1}のC－H伸縮振動を示し、一方、破線の矢印は、リノール酸ナトリウムのカルボキシレート基に割り当てられる約1600 cm^{-1}でのC=O伸縮振動を示す。図１０は、前述の合成例２による反応の進行の監視中の時間の関数として、このＣ－Ｈ伸縮振動の強度とＣ ＝ Ｏ伸縮振動の強度との比を示す。サンプルは2つの石英プレートの間に乗せられ、サンプルを200 °Cに加熱して架橋反応を誘発した。図10から明らかなように、リノール酸ナトリウムのC－C二重結合の減少が架橋反応中に見られるが、カルボキシレートの伸縮振動強度は変化せず、C－C二重結合が架橋反応で消費されていることを明確に示しており、それにより、リノール酸ナトリウム

とシリコーンエラストマーとの間の架橋を明確に示唆している。

【００７６】

これをさらに裏付けるために、FT-IRスペクトルの記録に使用したのと同じサンプル設定を使用して、架橋反応に対する環境酸素の影響を最小限に抑え、架橋反応をラマン分光法でさらに監視した。ラマンスペクトルでは、C=O伸縮振動は非活性であったが、C=C伸縮振動は図11に示すように明確な活性を示した。

【００７７】

t = 250秒までのサンプルの最初の熱安定化時に（その間にサンプルはラマン分光法で使用されるレーザーで熱平衡化される）、ラマンスペクトルはリノール酸ナトリウムのC=C伸縮振動の安定した減少を示し、これは、これらの結合がシリコーンエラストマーとの架橋において活性であることを明確に示している。

【００７８】

合成例1および2のエラストマーのバルク修飾をさらに実証するために、リノール酸との反応後の各エラストマーのブロックを前に説明したように極性モールドで成形し、続いてミクロトームで-40°Cでスライスして、修正されたエラストマーの内部スライス、すなわち、その主要表面のいずれも成形エラストマーブロックの外部表面ではないスライスを得た。その後、これらの内部スライスを異なるpH（pH 4、pH 7およびpH 10）の水2 μlの液滴と3分間接触させた後、これらの内部スライスとの水滴の接触角を測定した。同じ手順を非修飾エラストマーで繰り返して、リノール酸修飾エラストマーの内部スライスの測定接触角を、対応する非修飾エラストマーの内部スライスの測定接触角と比較した。シリコーン系エラストマーの結果を図12のグラフに示し、ポリブタジエン系エラストマーの結果を図13のグラフに示す。シリコーン系エラストマーの場合、6.6重量%のリノール酸を使用して形成された官能化エラストマーがバルクおよび表面接触角測定の両方に使用され、一方、ポリブタジエンエラストマーでは、表面接触角の測定には6重量%のリノール酸を使用して形成された官能化エラストマーが使用され、バルク接触角の測定には1.5重量%のリノール酸を使用して形成された官能化エラストマーが使用された。ポリブタジエンエラストマーの表面とバルクの接触角測定間のリノール酸の濃度のこの違いは、測定時のサンプルの入手可能性の結果にすぎない。

【００７９】

これらのグラフからわかるように、リノール酸で架橋したポリブタジエンの内部スライスと（鹸化）リノール酸で架橋したシリコーンの両方が、pHの増加とともに測定される接触角が減少するという、測定された接触角の強いpH依存性を示し、一方、未修飾ポリブタジエンとシリコーンの測定された接触角は、ほとんどpHに依存しなかった。理論に拘束されることを望まないが、pHの増加に伴う非官能化シリコーンについて測定された接触角のわずかな増加は、水分子とシリコーンのシラノール部分との間の水素結合のpH依存性の結果である可能性がある。

【００８０】

官能化エラストマーのバルクについて測定された接触角の強いpH依存性は、リノール酸などの不飽和脂肪酸で架橋されたエラストマーのバルク内のカルボン酸基の存在を明らかに示している。これは次のように理解できる。より低いpHでは、そ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、それによりエラストマーの内部スライスの表面電荷を最小化する。pHが増加すると、カルボン酸基の脱プロトン化が増加するため、この表面電荷が増加し、これらの内部スライスの表面と水滴の接触角が減少する。一方、未修飾エラストマーのように、そのようなカルボキシル基が水滴にさらされる表面に存在しない場合、水滴のpHの変化は表面電荷の変化を引き起こさないため、異なるpHの水滴とそのような表面との測定される接触角は、これらのpH変化に対する感度がはるかに低くなる。

【００８１】

フィブロネクチンなどの細胞培養タンパク質を結合する本発明の材料の能力をさらに実証するために、材料の例示的な実施形態をフィブロネクチンに結合させ、この結合反応を

実証するために表面プラズモン共鳴（SPR）スペクトルを記録した。

【００８２】

SPR実験は、ドイツ、ハンブルグのSierra Sensorsが提供するSPR2分光計を使用して、アミンSPRチップ（高容量アミンチップSPRアフィニティセンサー、Sierra Sesors、ハンブルグ、ドイツ）で、そして、n-ヘプタン中のポリブタジエン塊とリノール酸の溶液でスピンコートされたベアゴールドSPRチップ（ベアゴールド12pk, SPRアフィニティセンサー、Sierra Sensors、ハンブルク、ドイツ）で実施された。溶液は、ボトルを振とうしながら72時間にわたって70℃でガラスボトル内でポリブタジエン塊をn-ヘプタンに溶解することによって調製し、その後、リノール酸が添加され、混合物へと撹拌された。流れが観察され、フラッシングと脱気によってシステムが安定した後、角度スキャンを実行して、すべてのチャネル間の相関を確認しました。角度スキャンデータを保存し、フィブロネクチン架橋のアッセイを行った。

【００８３】

チップ表面は、表面に2つの溶液を3つのフェーズで注入することにより事前調整された。最初の注入は、流速10 μl/minの100 mM塩酸（HCl）60 μlと、解離時間を1秒に設定した。2回目の注入は、1Mの塩化ナトリウム（NaCl）と100 mMの水酸化ナトリウム（NaOH）からなる溶出バッファー60 μlで、流速10 μl/min、解離時間1秒に設定した。最初のフェーズはチャネル1と2を介して溶液を注入し、2番目のフェーズはチャネル3と4を介して溶液を注入し、3番目と最後のフェーズはチャネル1～4を介して溶液を注入した。

【００８４】

事前調整後、すべてのチャネルをクリーニングしてEDC / NHSを使用して活性化した。これは、MilliQストックで9.6 mg/mlの100 μlのEDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩，Sigma-Aldrich，セントルイス，米国）と100 μl NHS（N-ヒロドキシスクシンイミド、Sigma-Aldrich、セントルイス、米国）を一緒に混合することにより行われ、その後、60μlの混合物を、1秒の解離で10μl/minの流量で4つのチャネルすべての表面に注入した。

【００８５】

すべてのチャネルが事前調整され、EDC / NHSでアクティブにされた後、チャネルには、pH 5.5の酢酸ナトリウムバッファー（Biacore、Diegem、ベルギー）に溶解したウシ血漿粉末（細胞培養に適したBio Reagent、Sigma Aldrich、米国ミズーリ州セントルイス）からのフィブロネクチン60 μlが10 μl/minの流量で注入された。チャネル2に1 μg/mlのフィブロネクチンを1秒の解離時間で注入し、チャネル3に5 μg/mlのフィブロネクチンを1秒の解離時間で注入し、そしてチャンネル4に10 μg/mlのフィブロネクチンを1秒の解離時間で注入した（チャンネル1を基準として使用）。

【００８６】

続いて、システムの4つのチャネルすべてを、フィブロネクチンが本発明の材料に本当に結合したかどうかを判定するために、10μl/minの流速および1秒の解離時間で60μlのランニングバッファーPBS 0.05%Tweenでフラッシュした。スペクトルデータは保存されて、アナライザープログラム（Analyzer R2 Sierra Sensors Sierra Sensors、ハンブルク、ドイツ）で分析された。

【００８７】

図１４は、リノール酸で架橋され、修飾されたポリブタジエンを上記のようにEDCおよびNHSと反応させて、得られた構造をフィブロネクチンと反応させたポリブタジエン製の流体装置モジュール１００を含む流体装置２００の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）スペクトルを示す。SPRスペクトルから明らかなように、フィブロネクチンは修飾ポリブタジエンの表面に結合し、これにより、このようなバルク修飾エラストマーは細胞培養足場へと成功裡に変換されることができることが示されている。図15は、図14のSPRスペクトルの一部を示しており、この表面修飾が明確に示されている。図からわかるように、SPRベースラインは約2,000 RUシフトしているため、フィブロネクチンのリノール酸修飾ポリブ

タジエンへの結合を明確に示している。さらに、ＳＰＲスペクトルは、流体装置２００がさらされた流体ストリーム（フラッシング）の下で安定したままであり、これにより、この手順中にリノール酸が洗い流されなかったため、リノール酸がポリブタジエンに（共有的に）結合していることがさらに実証された。予想されたように、フィブロネクチンと本発明の材料との間の最も強い共有結合は、フィブロネクチンの最高濃度で（すなわち、チャネル4のチップ）観察された。

【００８８】

次に、チャネル4のチップへの細胞株MDA-MB231およびMCF-7の結合を調べて、共有結合したフィブロネクチンがそのような細胞株に結合する能力を実証した。この目的を達成するために、上記のSPR手順が、チャネル2～4の新しいチップで繰り返され（チャネル1が再び参照として使用される）、そのうえで、新たなチップの表面をフィブロネクチンでコーティングするために、1秒の解離時間で10μl/minの流速で60μlの10μg/mlフィブロネクチンを流した。表面をフィブロネクチン細胞で再コーティングした後、$2 * 10^6$細胞/mlのMDA-MB231を200μlの4回の注入ステップで10μl/minの流速でチャネル2に流し、フィブロネクチンに結合するのに十分な時間を細胞に与えるために解離時間を最大1800秒に設定した。同じことが、200μlの4回の注入ステップで1.3×10^6細胞/mlの細胞株MCF-7を用いてチャネル4について行われた。合計で、細胞がチップ表面に結合するためにほぼ2時間が与えられた。続いて、細胞を、チャネル1～4に10μl/minの流速および最大解離時間で注入された0.05％Tweenを含む200μlのランニングバッファーPBSにさらし、チップ表面に結合していない細胞を洗い流した。結合された細胞は、10μl/minの流速および最大解離時間で、チャネル1、2、3および4に200μlの0.25％トリプシンを注入して、チップ表面から除去された。

【００８９】

各実験の後、SPR装置は、システムを70％エタノールで洗い流し、1-2％次亜塩素酸塩で消毒し、0.5％SDS、50 mMグリシン-NaOH（pH 9.5）で脱着することにより洗浄され、システム内の汚染物質やその他の汚れの蓄積を低減した。

【００９０】

図１６は、装置にＭＤＡ－ＭＢ２３１およびＭＣＦ－７細胞系からの細胞を播種した後のフィブロネクチン結合リノール酸修飾ポリブタジエンベースの流体装置２００のＳＰＲスペクトルを示す。フィブロネクチンに付着したこれらの細胞株は、リノール酸修飾ポリブタジエンに結合していることがわかる。細胞は、ランニングバッファで装置を洗い流している間、流体装置200に付着したままであったが、トリプシン溶液により切断された可能性がある。したがって、これは、フィブロネクチン（および結合細胞）がランニングバッファによって洗い流されないため、細胞が装置膜に効果的に結合し、フィブロネクチンが膜表面に共有結合することを明確に示している。

【００９１】

上記の実施形態は本発明を限定するのではなく例示するものであり、当業者は添付の特許請求の範囲から逸脱することなく多くの代替実施形態を設計できることに留意されたい。請求項では、括弧の間に置かれた参照符号は、請求項を制限するものとして解釈されてはならない。「含む」「有する」という言葉は、請求項に列挙されているもの以外の要素またはステップの存在を排除するものではない。要素に先行する単語「a」または「an」は、複数のそのような要素の存在を排除しない。本発明は、いくつかの別個の要素を含むハードウェアによって実施されることができる。いくつかの手段を列挙する装置請求項では、これらの手段のいくつかは、ハードウェアの同一のアイテムによって具体化されることができる。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、これらの手段の組み合わせが有利に使用できないことを示すものではない。

【図面】

【図１】

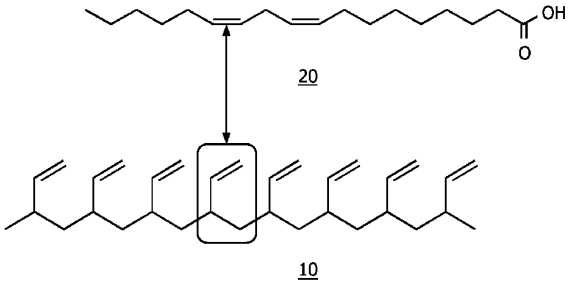


FIG. 1

【図２】

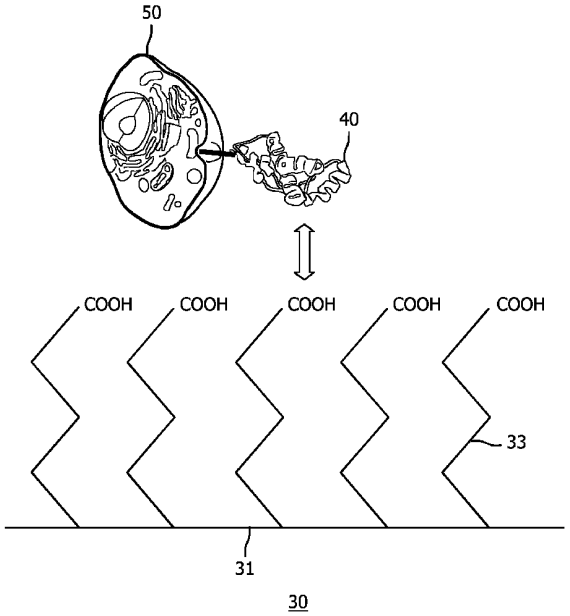


FIG. 2

【図３】

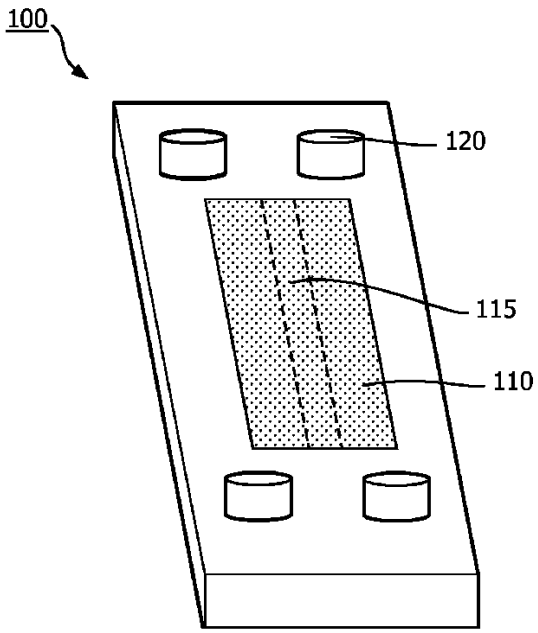


FIG. 3

【図４】

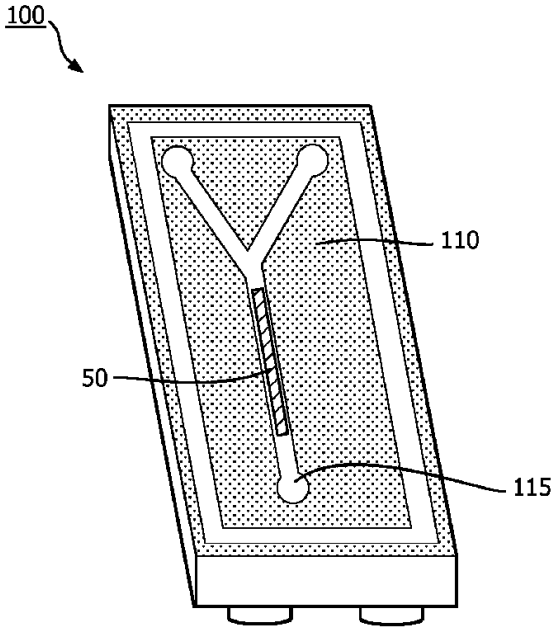


FIG. 4

【図５】

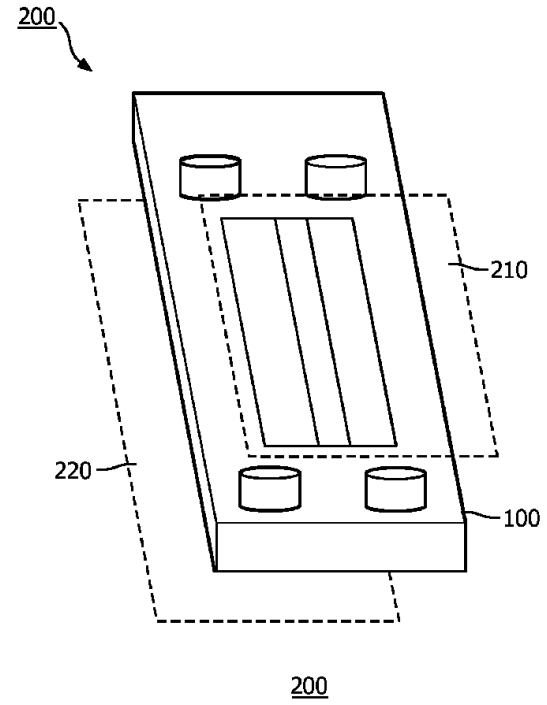


FIG. 5

【図６】

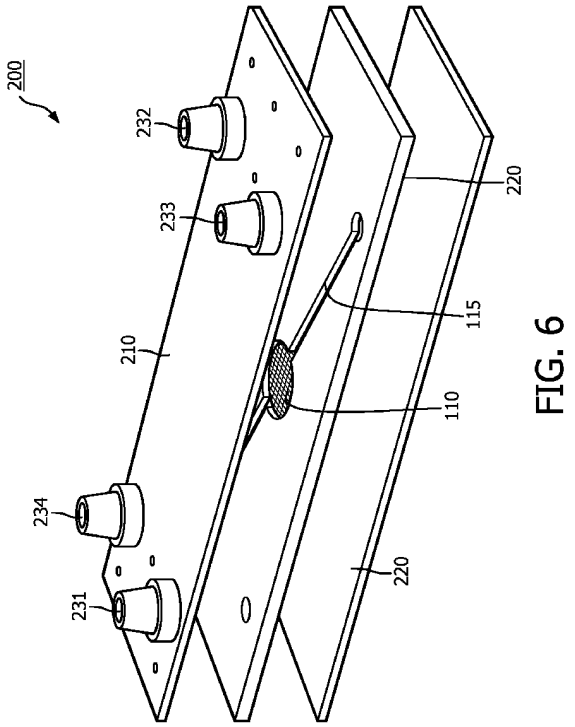


FIG. 6

【図７】

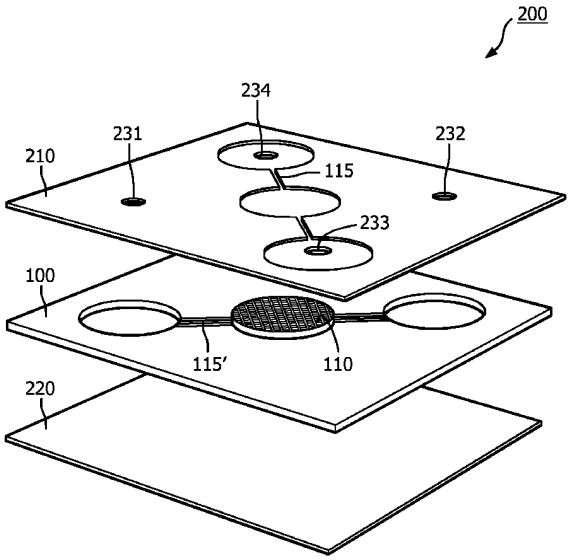


FIG. 7

【図８】

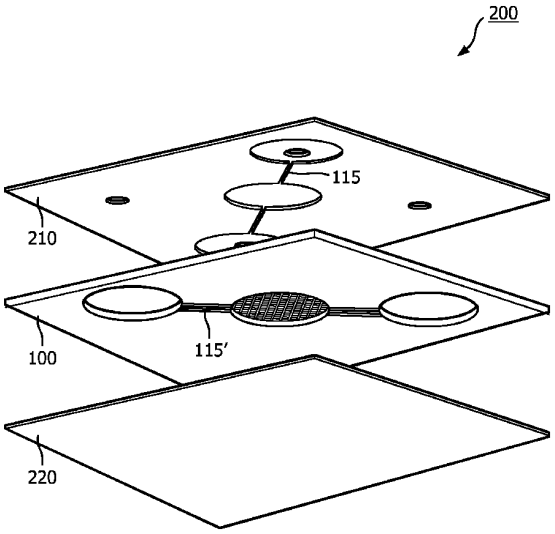


FIG. 8

【図９】

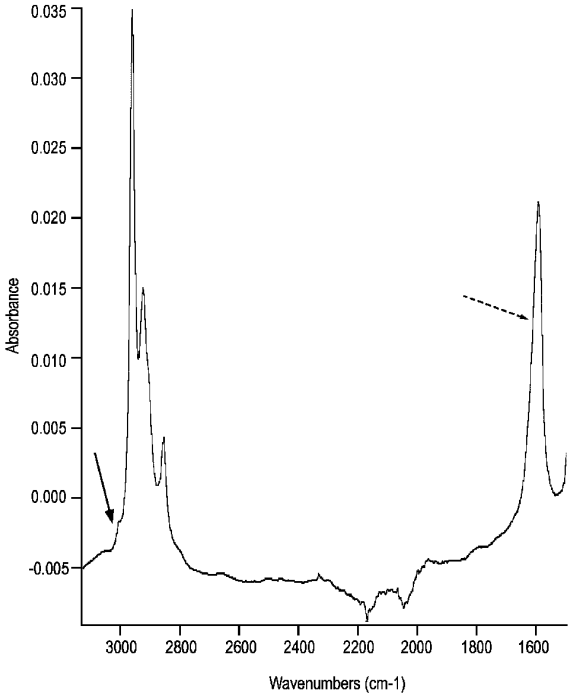


FIG. 9

【図１０】

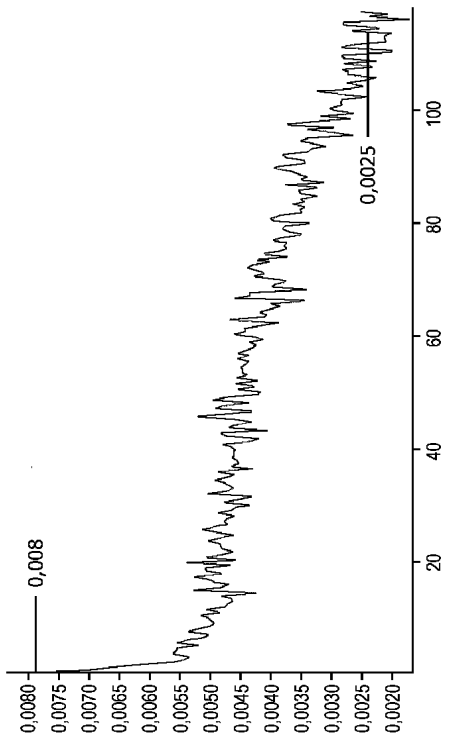


FIG. 10

【図１１】

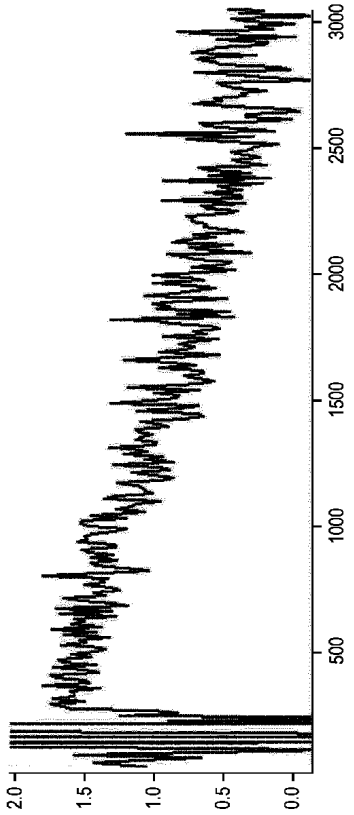


FIG. 11

【図１２】

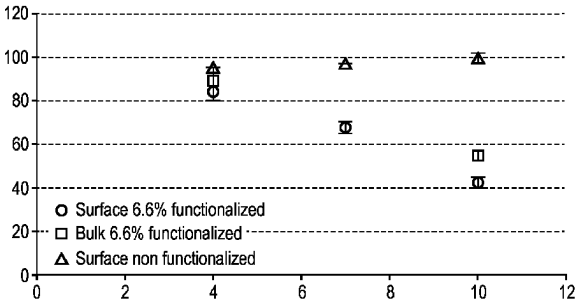


FIG. 12

【図１３】

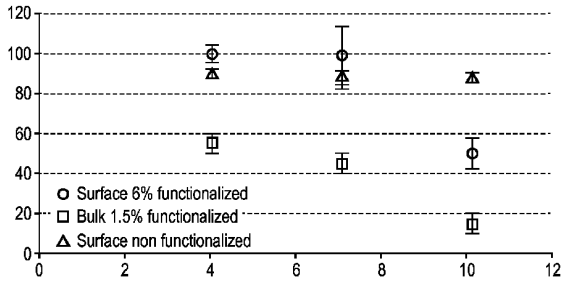


FIG. 13

【図１４】

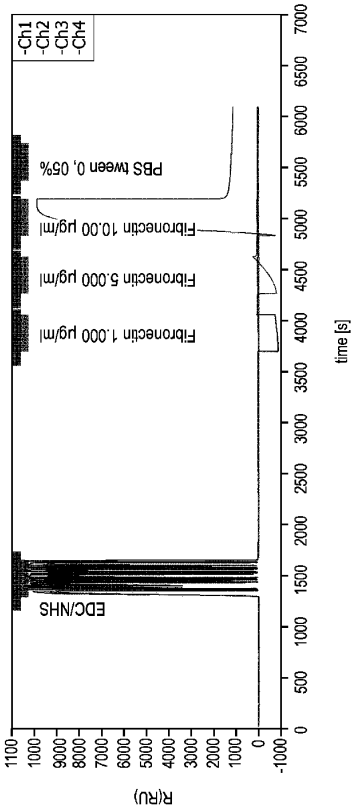


FIG. 14

【図１５】

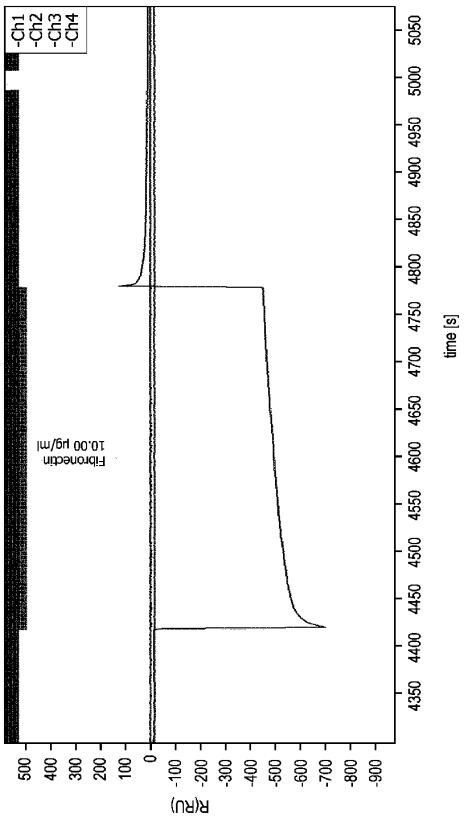


FIG. 15

【図１６】

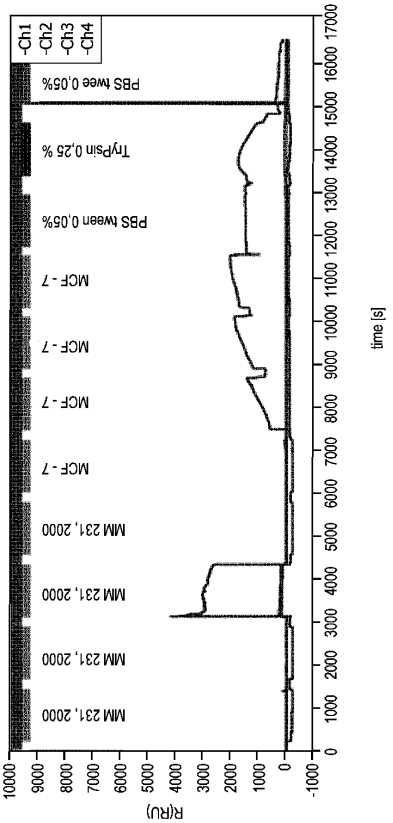


FIG. 16

フロントページの続き

(51)国際特許分類　　ＦＩ
Ｇ０１Ｎ　37/00　(2006.01)　　Ｇ０１Ｎ　37/00　１０１

弁理士　矢ヶ部 喜行
(72)発明者　ベッカーズ ルーカス ヨハネス アンナ マリア
オランダ国 ５６５６ アーエー アインドーフェン ハイ テック キャンパス ５
(72)発明者　クリーグ ヤン コルネリス
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

審査官　吉門 沙央里

(56)参考文献
特開平０６－１３３７６６（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５２９２３３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５２８２３２（ＪＰ，Ａ）
SATO, K. et al.，Microfluidics for nano-pathophysiology，Advanced Drug Delivery Reviews，2013年08月31日，Vol.74，pp.115-121

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ　１／００－ ３／００
Ｃ１２Ｍ　１／００－ ３／１０
Ｃ１２Ｎ　１／００－ ７／０８
Ｇ０１Ｎ　３３／４８－３３／９８
Ｂ０１Ｊ　１０／００－１２／０２
Ｃ０８Ｋ　３／００－１３／０８
Ｃ０８Ｌ　１／００－１０１／１４
Ｃ０８Ｇ　７７／００－７７／６２
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）